

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PCR EN TIEMPO REAL PARA
LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA TIPO A EN TEJIDOS
DE *Gallus gallus***

María Elena Rovalino

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Medicina Veterinaria

Quito

Febrero 2013

**Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias de la Salud**

HOJA DE APROBACION DE TESIS

**Estandarización de la técnica PCR en tiempo real para la detección del
virus de influenza tipo A en tejidos de *Gallus gallus***

María Elena Rovalino Córdova

Gabriel Trueba, Ph.D.
Director de Tesis

.....

María Inés Baquero, MSc.
Miembro del Comité de Tesis

.....

Alejandro Torres, MSc.
Miembro del Comité de Tesis

.....

Luis Donoso, MSc.
Coordinador Medicina Veterinaria

.....

Gonzalo Mantilla, Ph.D.
Decano del Colegio de Ciencias de
la Salud

.....

Quito, febrero de 2013

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de estetrabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art.144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Nombre: Maria Elena Rovalino

C. I.: 171904877-7

Fecha: 20 Mayo 2013

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento a la Dra. María Inés Baquero por su ayuda incondicional en el desarrollo de este proyecto. Sus enseñanzas y apoyo son un recuerdo que mantendré por siempre.

RESUMEN

La influenza es causada por un virus de RNA segmentado con envoltura, cadena simple y sentido negativo, perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*. Se lo clasifica en tres tipos A, B y C.; siendo el tipo A el único capaz de infectar de forma natural a las aves. Por ser una enfermedad que posee repercusiones económicas y sanitarias, la influenza es de importancia para la salud pública mundial por lo cual forma parte de la lista de enfermedades de notificación obligatoria para la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Debido a este motivo, la presencia del virus de influenza tipo A constituye una barrera para el comercio entre países. Hasta el momento en el Ecuador no se ha desarrollado un estudio que cuente con las herramientas de diagnóstico suficientemente sensibles y específicas para demostrar su ausencia. El objetivo de este estudio fue realizar la estandarización de la prueba de rRT-PCR utilizando tecnología Taqman para identificar el gen M de influenza tipo A en muestras traqueales provenientes de aves con sintomatología respiratoria de todo el país. Se realizaron 137 pruebas obteniéndose resultados negativos en todos los análisis.

Palabras claves: influenza tipo A, gen M, rRT-PCR.

ABSTRACT

Influenza is a disease caused by a segmented RNA virus enveloped, single-stranded and negative sense, belonging to the *Orthomyxoviridae* family. It is classified into three types A, B and C, in which the A type, is the only one capable of naturally infect birds. It is a disease of worldwide public health concern due to its economic and health impacts, therefore, is part of the list of reportable diseases to the World Organization for Animal Health (OIE). The presence of influenza A virus represents a barrier of trade between countries. So far Ecuador has not developed a study with adequate diagnostic tools to demonstrate the absence of the virus in the country. The purpose of this study is to standardize an rRT-PCR test using TaqMan technology to identify the M gene of influenza type A using tracheal samples from poultry with respiratory symptoms throughout the country. Yield 137 trials were conducted for all negative results.

Key words: influenza type A, M gene, rRT-PCR.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	10
MATERIALES Y MÉTODOS	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	26
RECOMENDACIONES	26
BIBLIOGRAFÍA	27

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Foto gel con presencia de RNA extraído de muestras traqueales 33
- Figura 2. rRT-PCR del gen M de influenza tipo A probado en muestras de RNA extraídas de los antígenos H1 y H3 para control positivo 31
- Figura 3. Prueba de rRT-PCR en serie de diluciones a partir del RNA extraído del antígeno H1 34
- Figura 4. Electroforesis con la amplificación del gen M para influenza tipo A 35
- Figura 5. Foto gel electroforesis cargado con amplicones probados para β -actina 32
- Figura 6. Prueba de rRT-PCR para el gen M de influenza tipo A en RNA obtenido de la extracción de muestras traqueales 36
- Figura 7. Porcentaje de muestras provistas por AGROCALIDAD a las que se realizo la prueba de rRT-PCR 37
- Tabla 1. Serie de diluciones a partir del mejor valor de Ct proveniente del RNA extraído del antígeno H1 utilizando 3 μ l en una reacción final de 20 μ l 38

INTRODUCCIÓN

En el último Censo Nacional Avícola realizado en el año 2006 se determinó que la población aviar tecnificada del Ecuador era de alrededor de 28.465.585 animales entre pollos broiler, reproductoras pesadas, reproductoras livianas y ponedoras (Ministerio Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, 2006).

El aumento en el consumo per cápita de carne de pollo y huevos en el país demuestran la preferencia que tiene el consumidor para estos. En el año 2000 se estimaba que el consumo anual per cápita de carne de pollo era de 12 kg y 90 huevos (Orellana, 2007) mientras que para el año 2012 el consumo se incremento a 32 kg y 140 huevos (ALA,2012).

Debido a que en la producción avícola se condensa gran número de aves en espacios relativamente pequeños, la susceptibilidad de los animales a contraer enfermedades es alta. Si bien, las de mayor importancia productiva y económica han sido controladas mediante estrictos programas de bioseguridad y planes de vacunación, existen otras, como el caso de influenza aviar, que a pesar del interés y preocupación mundial no ha suscitado interés en el país (CONAVE, 2006).

La Influenza es una enfermedad causada por un virus de RNA segmentado con envoltura, cadena simple y sentido negativo, perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae* (Steinhauer y Skehel, 2002). Se lo clasifica en tres tipos: (géneros) A, B y C (Jong y Hien, 2006). Dentro de los cuales el tipo A, es el único capaz de infectar de forma natural a las aves y de las que ha aislado virus con distintas combinaciones de glicoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) (Matrosovich, 2000) razón por la cual a este tipo de virus se lo conoce como influenza aviar (Causey, 2012).

El genoma del virus de influenza aviar está constituido por ocho segmentos: 1, 2 y 3 codifican las proteínas PB2 (Polymerase Basic 2), PB1 (Polymerase Basic 1) y PA (Polymerase Acidic) respectivamente y cumplen la función de RNA polimerasa. Los segmentos 4, 5 y 6 codifican las proteínas HA (Hemaglutinina), NP (Núcleo proteína) y NA (Neuroaminidasa) en ese orden, las que cumplen una función estructural. El segmento 7 codifica la proteína de matriz M1 que sirve como barrera de separación entre el complejo de RNP y las proteínas de la membrana además de cumplir un función importante en el ensamble y liberación de las partículas virales (Furuse et al, 2009); y la proteína M2 que se encuentra en la superficie de la envoltura y forma un canal iónico para la entrada de protones al virus lo que conduce a la separación de la nucleocapside, finalmente el segmento 8 codifica las proteínas no estructurales NS1 y NS2 relacionadas con el ensamblaje del virus y la respuesta antiviral respectivamente (Noda, 2006) .

El mecanismo de infección inicia con la interacción de la glicoproteína HA y el ácido siálico en la superficie de la célula seguida de una endocitosis y luego la fusión de la envoltura viral y la membrana del endosoma, la cual se logra gracias a la acidificación del interior del virus mediado por una bomba de protones (proteína M2) (Betakova, 2007). Esta disminución del pH ocasiona un cambio conformacional de la glicoproteína HA que invade las membranas virales y celular causando la liberación del nucleocapside en el citoplasma celular (Cross, Burleigh y Steinhauer, 2001). Este complejo de RNPs se encuentra formado por: la núcleo proteína (NP) encargada de envolver al RNA logrando que este tome una estructura de forma helicoidal y por el complejo de RNA polimerasa dependiente de RNA compuesto por las subunidades: “polymerase basic 1” (PB1), “polymerase basic 2” (PB2) y polymerase acidic protein (PA). (Fodor y Brownlee, 2002).

El complejo es transportado hacia el núcleo para la síntesis de tres tipos de RNA mediante la ayuda del complejo de RNA polimerasa viral dependiente de RNA. Una transcripción primaria se encarga de la formación de mRNA el cual servirá para dar origen a la síntesis de las proteínas virales. La transcripción secundaria tiene como objetivo producir copias de RNA viral complementario (cRNA) con sentido positivo que se utilizaran como molde para dar origen a la transcripción terciaria de RNA viral (vRNA) el cual es posteriormente transportado hacia el citosol para formar parte del ensamblaje de nuevas partículas virales (Portela y Digard, 2002)

Las síntesis de las proteínas de superficie HA, NA y M2 comienza en los ribosomas del cual son posteriormente transportadas hacia el retículo endoplasmático en donde son dobladas en trimeros y tetrámeros, a continuación pasan por el aparato de Golgi y son llevadas hacia la membrana plasmática de la célula. A diferencia de las proteínas del núcleo RNP y M1 que son sintetizadas y plegadas enteramente en el citosol. Tras la interacción y ensamblado de todos los componentes virales se produce la salida del virus, durante la cual, la proteína NA remueve el ácido siálico que mantienen unidos a las partículas virales con la célula infectada, permitiendo así la liberación de las mismas en el tracto respiratorio (Bouvier y Palese, 2008).

Los síntomas de influenza en aves domésticas son variados y dependen de la virulencia del virus infectante; un virus de baja patogenicidad puede no producir signos aparentes o cursar como una afección respiratoria leve con una ligera caída en la producción de huevos mientras que un virus de alta patogenicidad produce una considerable disminución en la producción de huevos, ronquidos, lagrimeo, sinusitis, cianosis, edema de cabeza, diarrea, afecciones nerviosas y un incremento en la mortalidad (Horimoto y Kawaoka, 2001). La

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) considera como un virus altamente patogénico (HPAI) a aquel capaz de causar mortalidades mayores al 75% en aves de 4-6 semanas inoculadas por vía intravenosa en un lapso de 10 días, de no cumplirse estas condiciones se estaría frente a un virus de baja potogenicidad (LPAI). La declaración de la enfermedad está orientada específicamente a los subtipos H5 y H7 (Capua y Alexander, 2004)

El virus de influenza aviar es zoonótico, y al igual que con las aves, distintos virus presentan diversos grados de virulencia. Adicionalmente el virus presenta dos fenómenos de cambio antigénico: la deriva genética (“antigenic drift”) causada por la acumulación de mutaciones durante el proceso de replicación (Suarez, 2000), las que causan pequeñas variaciones en los aminoácidos que forman la proteína viral particularmente la HA (Suarez y Schultz-Cherry, 2000) y la recombinación o cambio genético (“reassortment” o “antigenic shift”) causado por un intercambio de segmentos genómicos entre dos cepas virales. Este último proceso tiene lugar cuando dos virus de influenza diferentes invaden a una misma célula simultáneamente causando así que la formación de nuevas partículas virales contenga genes tanto de uno como de otro. El reordenamiento puede dar lugar tanto a nuevos tipos como subtipos de virus de influenza así como también a la formación de híbridos que contengan proteínas de influenza aviar, canina, equina, humana, etc (Spicker, 2009) (Thomas y Noppenberger, 2007).

La capacidad de producir epidemias se asocia a factores tales como el desarrollo mundial del comercio, los mercados de aves vivas (principalmente las aves silvestres) las cuales son portadores asintomáticos de cepas virales de baja patogenicidad (Kilpatrick et al., 2006). La participación del humano dentro del proceso de propagación de la enfermedad a causa

de malas prácticas de crianza en las que se mantienen múltiples especies domesticas dentro de una misma granja o por las deficientes barreras de bioseguridad que no evitan el contacto entre especies silvestres y domesticas son factor que debe ser también considerados (Alexander 2000).

La transmisión del virus se da a través del contacto directo con secreciones de aves infectadas, especialmente a través de las heces, en donde se ha encontrado que el virus puede permanecer viable en un rango de temperaturas desde 25°C por 2 días hasta a 4°C (Shortridge, 1998) durante 35 días. La diseminación también puede ser indirecta a través de vehículos, equipo, pienso y jaulas contaminadas (OIE, 2002)

La influenza aviar es una enfermedad con gran poder de difusión, que ocasiona elevadas pérdidas socioeconómicas y serias repercusiones en el comercio internacional (Capua y Alexander, 2006). Por tal razón la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) la ha considerado dentro de su lista de enfermedades de notificación obligatoria. Esta misma institución ha estimado importante realizar una distinción del subtipo viral conforme a la severidad de su presentación.

El virus de Influenza fue identificado por primera vez en aves acuáticas silvestres en Italia en 1878 y desde entonces se conoce que estos animales son portadores asintomáticos permitiendo así su distribución y adaptación a nuevos hospedadores (Ligon et al., 2005). A consecuencia de la alerta por la aparición de influenza aviar en el año 2003, las medidas de control sanitario han aumentado en la mayoría de los países por el temor del ingreso de la enfermedad, comprometiendo así las relaciones comerciales entre los mismos (Salles, 2006). La enfermedad toma importancia en la actualidad debido a los primeros brotes reportados en

aves de corral en Asia entre los años 2003- 2004 (FAO, 2006) que causaron alarma debido a la rapidez con la que se propagó entre continentes. Las principales instituciones de control sanitario consideraron conveniente el desarrollo de planes de prevención y control por medio del diagnóstico temprano de la enfermedad.

Según reportes de la FAO en el continente americano el virus de influenza aviar se ha detectado en Guatemala, El Salvador y México para el subtipo de baja patogenicidad H5N2 y en el caso de este último país a finales de 1994 y principios de 1995 el mismo subtipo pero de alta patogenicidad fue eliminado; en Chile en el año 2003 se identificó y eliminó el subtipo de baja y alta patogenicidad H7N3, mientras que en Colombia en el año 2005 se eliminó el virus H9N2 (FAO, 2007). Durante junio del 2012 como lo menciona un reporte de la FAO en el distrito de Jalisco, México se ha detectado un brote del subtipo H7N3 de alta patogenicidad que ha llevado a la eliminación de más de 4.9 millones de aves, a la cuarentena de 9.3 millones más y a 80 millones de dosis vacúnales aplicadas. Con esto se confirma que el virus de Influenza aviar es una amenaza latente para el continente americano (FAO, 2012).

En el Ecuador fue implementado un plan piloto de buenas prácticas para la producción avícola en zonas de riesgo de Influenza Aviar, gracias al trabajo conjunto del Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria (actual AGROCALIDAD) con el apoyo del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) y la Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador (CONAVE) (IICA, 2000). De la misma forma se ejecutó un plan de vigilancia epidemiológica activa a partir de pruebas basadas en serología, sin embargo estos resultados no garantizan la ausencia del virus de influenza debido a que pruebas como el ELISA tienen la desventaja de carecer de especificidad (OIE, 2008).

De igual manera, a partir del año 2008 el Ministerio del Ambiente junto con la organización Aves y Conservación, desarrollaron un programa de monitoreo sanitario en aves silvestres. El monitoreo estuvo orientado particularmente hacia la especie *Dendro cigna* bicolor (pato María), un ave migratoria que podría ser considerada como posible portadora del virus en varios humedales del país (Aves y conservación, 2009); sin embargo para esas instancias los laboratorios nacionales no contaban con la tecnología suficiente que permitiera diagnosticar la presencia del virus de influenza aviar.

Por tal razón existe la necesidad de implementar una herramienta de diagnóstico molecular que ofrezca la posibilidad de obtener resultados con mayor precisión para la pronta detección del virus. Las pruebas serológicas no poseen un nivel de sensibilidad, especificidad y eficiencia como lo tiene el RT-PCR (Sabefar, 2009).

La prueba de rRT-PCR permite detectar y medir la acumulación del producto amplificado durante su proceso. Para esta técnica además del uso de cebadores específicos para la detección del virus se incluye la utilización de una sonda Taqman, la misma que es un fragmento de DNA de cadena simple que contiene una secuencia específica al molde de cDNA que se quiere detectar y que en su extremo 5' presenta un fluoróforo reportero (que produce fluorescencia) y en el 3', un fluoróforo inhibidor (Bio-Rad Laboratories, 2006). Un resultado positivo se observa una vez que la enzima Taq polimerasa a través de su actividad exonucleasa 5' – 3' separa el fluoróforo reportero del inhibidor y se produce un incremento en la emisión de fluorescencia (Schweiger, 2000).

En el caso del diagnóstico para Influenza aviar la técnica molecular de rRT-PCR tiene la ventaja de detectar al virus sin tener que realizar el aislamiento viral, lo cual disminuye el

riesgo biológico de estos análisis a bioseguridad nivel 2 sin importar el grado de patogenicidad de la cepa (Blanton, 2011).

El objetivo de este estudio fue la estandarización de la prueba molecular rRT-PCR utilizando tecnología Taqman para detectar la presencia del virus que causa la influenza aviar tipo A en aves con sintomatología respiratoria. La misma que permitirá establecer la presencia o ausencia del virus de influenza tipo A en el país; además de constituirse como una herramienta necesaria para proveer información que permita implementar un sistema de vigilancia epidemiológica que sirva para generar un documento oficial necesario para el comercio con otros países.

MATERIALES Y MÉTODOS

Laboratorio de Experimentación

El proyecto en su totalidad fue realizado utilizando los equipos del laboratorio del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

Primers β - actina

Los primers usados en la prueba de β -actina fueron diseñados por Invitrogen, teniendo como secuencia delantera 5' CGG AAC CGC TCA TTG CC 3' y reversa 5' ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA 3' la misma que se encuentra publicada en el trabajo de Du Breuil, Patel y Mendelow (1993) como mecanismo para el control de agentes inhibitorios apoyándose en el hecho de que este gen es parte de la lista de los llamados “house-keeping” que se encuentran altamente conservados en mamíferos y aves.

Primers y sonda gen M Influenza tipo A

Para el desarrollo de la prueba rRT-PCR se utilizaron los primers y sondas diseñadas por Biosearch Technologies Inc. Teniendo el primer delantero FLUA-MAT-F la siguiente secuencia 5'CTTCTAAC CGAGGTCGAAACGTA 3' y el primer reverso FLUA-MAT-R las bases 5'GTGACAGGATTGGTCT TGTCTTT A 3'. La sonda FA-MAT-PR fue diseñada con la secuencia FAM-TCAGGCCCCCTCAAAG CCGAG-BHQ1. Tanto los primers como la sonda fueron tomados de la publicación de Chidlow et al empleado para la detección del gen M en el virus de Influenza tipo A (Chidlow et al, 2010).

Muestras Traqueales

Se contó con un total de 235 muestras traqueales, de las cuales 160 fueron provistas por el laboratorio de la Universidad San Francisco de Quito las restantes 75 fueron entregadas como parte del convenio firmado con AGROCALIDAD en el lapso de los meses de agosto a octubre. Para el procesamiento de estas últimas, se elaboró un sistema de evaluación en el cual se valoraron 3 factores la cantidad, en la cual se consideraban como aptas muestras con un tamaño aproximado a 7cm de largo; calidad, muestras que por su apariencia permita determinar si corresponden a aves con signos respiratorios (enrojecimiento de membranas, presencia de moco o sangre) y transporte en el cual se evaluó la forma de envío y las condiciones de manejo de temperatura.

Dentro del laboratorio las muestras permanecieron almacenadas a una temperatura constante de -20°C, cada una en funda separada y rotulada mediante un código que indica el número de llegada, número de muestra y su origen.

Control Positivo

Como control positivo se utilizó virus de influenza utilizado como antígeno de influenza H1 inactivado con BPL (beta- propiolactona), proveniente del kit Influenza Reagent para la Inhibición de la Hemoaglutinación distribuido por la OMS (Cat No VA2930 /Lot No. 08-0221).

Durante el proceso de estandarización se pusieron a prueba tanto el antígeno H1 como el antígeno H3 para los ensayos de rRT-PCR de influenza aviar utilizando volúmenes de 1,3 y 7.4 μl de RNA en una reacción final de 20 μl (Ver figura 1).

Debido a la rapidez con la que se degrada el RNA se realizaron 4 alícuotas que contenían 12.5 μl cada una, esto en base al protocolo del kit Qiagen que sugiere diluir el material genético obtenido en la extracción para un volumen final del 50 μl . Inmediatamente después fue almacenado a una temperatura de -70°C . Una alícuota del control positivo fue mantenida a -20°C para ser utilizada en los análisis rutinarios. Todas las alícuotas fueron rotuladas con la fecha en la que fueron preparadas, indicando claramente que se trataba del control positivo, y la concentración a la que fueron diluidas.

RT-PCR β - actina

Para la realización del master mix se utilizó el kit comercial SuperScriptIII Platinum One-Step Quantitative RT-PCR de Invitrogen en un volumen de reacción final de 12.5 μl compuesto por 6.25 μl de Reaction Mix a una concentración 2x, 0.25 μl tanto del primer F β -actina como del primer R β -actina ambos a una concentración de 10 μM , 0.25 μl Super Script

RT + Taq Platinum cuya concentración se desconoce, 3 μ l de Agua para PCR y 2.5 μ l de RNA de muestra.

El programa de RT-PCR utilizado en el termociclador fue de 1 ciclo a 55°C por 30 minutos para la síntesis cDNA, para la desnaturalización 1 ciclo a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos para la amplificación a 94°C por 15 segundos, 45°C por 30 segundos y 68°C por 1 minuto. Una extensión final de 1 ciclo a 68°C por 5 minutos.

La electroforesis de los fragmentos amplificados fue realizada utilizando 8 μ l de las muestras con 2 μ l de buffer de carga y un marcador de peso molecular en un gel de agarosa con TBE 1X al 1.2% a 80 Voltios por 45 minutos. Se esperaba observar como positivo un fragmento de peso aproximado a 289 pares de bases (Ver figura 2). Esta prueba fue realizada en todas las muestras de RNA traqueales y para el control positivo como mecanismo de control de agentes inhibitorios.

rRT-PCR Influenza

El master mix para la prueba de rRT-PCR del gen M de Influenza aviar tipo A fue realizado utilizando el kit comercial de Invitrogen SuperScriptIII Platinum One-Step Quantitative RT-PCR en las siguientes proporciones: 10 μ l Reaction Mix 2x, 0.8 μ l de primer F FLUA-MAT-R como del Primer F FLUA-MAT-R ambos a una concentración 20 μ M, 0.2 μ l de sonda FA-MAT-PR 10 μ M, 0.4 μ l Super Script RT + Taq Platinum cuya concentración es desconocida, 4.8 μ l de Agua para PCR y 3 μ l de RNA de muestra para una reacción final de 20 μ l.

La programación del equipo fue de 1 ciclo a 50°C por 3 minutos, 1 ciclo a 94°C por 2 minutos ambos con una temperatura en la tapa de 40°C; 40 ciclos con una temperatura de 94°C por 15 segundos, 55°C por 60 segundos y 72°C por 15 segundos esto a una temperatura de la tapa de 94°C.

Extracción de RNA

Durante la extracción se probaron 3 métodos distintos los kits comerciales SV total RNA isolation de Promega, RNeasy de Qiagen y el protocolo basado en la utilización de TRizol descrito a continuación:

1. Se agregó 100 µl de la muestra en 150 µl de buffer de extracción recientemente preparado (20mM TrisHCl pH7.4, 10mM CaCl₂, 0.85% NaOH)
2. En un nuevo tubo se colocó 250 µl de muestra/buffer en 750 µl de Trizol
3. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos

Fase de separación

4. Se agregó 150 µl de cloroformo y se mezcló por 15 segundos
5. Se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 minutos
6. Se centrifugó a 4°C a 12,000 x g durante 5 minutos
7. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo

Precipitación RNA

8. Se adicionó 375 µl de isopropanol 100%
9. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos
10. Se centrifugó a 4°C 12.000 x g por 10 minutos

Lavado RNA

11. Se removió sobrenadante
12. Se adicionó al pellet 750 μ l de Etanol 75%
13. Se centrifugó a 4°C a 7500 x g durante 5 minutos
14. Se eliminó el líquido con cuidado de no desechar el pellet
15. Se dejó secar durante 10 minutos

Resuspensión

16. Se resuspendió en 30 μ l de agua libre de RNasas
17. Se incubó a 55°C durante 10 minutos
18. Se almacenó -80°C

Sin embargo de la eficiencia de todos los métodos, tanto las muestras traqueales como el control positivo fueron extraídos utilizando el kit comercial RNeasy de Qiagen siguiendo las especificaciones indicadas en su manual.

Se realizó la extracción a partir del cepillado de las muestras traqueales así como utilizando el hisopo colocado en el medio de transporte M4RT transport (REMEL) que debía contener RNA tomado directamente de la tráquea al momento de la colecta de muestras, no se encontró ninguna diferencia en los resultados tras realizar la prueba de β -actina para confirmar la presencia de RNA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Ecuador no hay reportes oficiales en los que se establezca la presencia del virus de Influenza tipo A, sin embargo, tampoco existe un programa de vigilancia que permita aseverar la ausencia del mismo. Por tanto, como parte de la implementación de este proceso es necesario desarrollar una prueba con la especificidad de la técnica de rRT-PCR que busque amplificar al gen M, el cual se conoce que se encuentra altamente conservado en los diversos subtipo del virus (Hoffmann et al., 2008).

Extracción muestras traqueales

Se realizó la extracción de 235 muestras traqueales utilizando el kit comercial RNeasy de Qiagen, con los cuales se procedió a efectuar una electroforesis, evidenciándose barridos que demostraron la presencia del material genético como resultado de todos los procesos realizados (Ver figura 3).

Control positivo

Durante el proceso de estandarización del control positivo se realizó la extracción tanto del antígeno H1 como H3 los cuales fueron sometidos a la prueba de prueba de β -actina, proceso para el cual se obtuvo en reiteradas ocasiones un resultado negativo. Esto condujo a pensar que podría tratarse de un antígeno puro que no contenga material genético de eucariota, sin embargo, para cerciorarse que no existía presencia de agentes inhibitorios se realizó la prueba de β -actina sobre RNA proveniente de raspado traqueal y del antígeno obteniendo para esta combinación un resultado positivo.

De la prueba de rRT-PCR utilizando como control positivo diferentes volúmenes de los antígenos H1 y H3 se obtuvo como mejor valor de Ct, la muestra del antígeno H1 utilizando 3µl de RNA. Decisión que se basa en la formación de la curva en el ciclo 23.88, que indica una concentración adecuada de material genético además de presentar la emisión de fluorescencia mayor dentro de su grupo. Una vez obtenido el resultado, se procedió a realizar 5 series de diluciones a partir de 1:10 hasta 1:100000, las cuales se probaron por duplicado y previo a la realización de la prueba de rRT-PCR fueron medidas su concentración (Ver Tabla 1.)

Los resultados obtenidos muestran la formación de curvas secuenciales en ciclos ascendentes de acuerdo al incremento en su dilución (Ver Figura 4). Con estos datos se estableció un rango de Ct ideales a partir de la concentración de RNA, que para el caso de influenza oscila entre 23,98 en una muestra sin diluciones hasta 27.33 en una muestra con una dilución de 1:10000, tomando en cuenta el ciclo en el que aparecen las curvas y la emisión de fluorescencia de las mismas.

Con el fin de confirmar que se estaba obteniendo como resultado la amplificación del segmento apropiado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.8% que dio como resultado la presencia de una banda de tamaño 155 pares de bases correspondiente al fragmento esperado del gen M (Ver figura 5).

Secuenciamiento: Con el amplicon obtenido como control positivo a partir del RNA extraído del antígeno H1 se procedió a su secuenciamiento. Se analizó sus resultados mediante el programa MEGA 5.1 y se obtuvo un 100% en identidad con el gen M de influenza aviar tipo A de acuerdo al GenBank.

Prueba β - actina

Del total de 235 muestras traqueales se realizaron 198 pruebas de β -actina teniendo en todas estas resultados positivos. Las muestras fueron divididas en 2 grupos de acuerdo a su distinto origen. Dentro del primer grupo de 160 muestras se obtuvieron 65 resultados positivos en un primer ensayo debiéndose repetir la prueba para las 15 restantes, consiguiendo en este segundo intento un resultado positivo. En el segundo grupo conformado por 75 muestras se efectuó la prueba para 42 de ellas, obteniendo 25 resultados positivos, se debió repetir para las restantes 17 dentro de las cuales se obtuvieron 4 muestras negativas, estas junto con las restantes 16 fueron descartadas por provenir de tráqueas sin evidentes signos respiratorios.

Prueba rRT-PCR gen M Influenza tipo A

Se realizaron 137 pruebas de rRT-PCR para el gen M de Influenza aviar sobre RNA proveniente de muestras traqueales, para las cuales se obtuvieron resultados negativos en todas ellas, mostrando en todas un Ct dentro de lo esperado para el control positivo. Se corrieron únicamente 37 muestras de RNA de las provistas por AGROCALIDAD debido a que estas no cumplían con los parámetros establecidos ya sea por no presentar signos evidentes de problemas respiratorios, por haber sido muestras incorrectamente tomadas o mal transportadas (Ver figura 6).

Analizando únicamente las muestras provistas por AGROCALIDAD observamos que del 100% de muestras correspondiente a 75 tráqueas extraídas, únicamente al 49.3% (37 tráqueas) se le realizó la prueba de rRT-PCR para la identificación del gen M de influenza aviar. Es decir que la eficiencia en la toma de muestras fue menor al 50%, si bien el proyecto fue desarrollado a partir de un muestreo intencional no probabilístico el hecho de tener un alto

número de muestras descartadas disminuyó aun más la probabilidad de encontrar un positivo (Ver figura 7).

CONCLUSIONES

El virus de influenza aviar es de importancia mundial para la salud pública, hechos recientes muestran que el continente americano no se encuentra libre de esta amenaza. Es de vital importancia establecer un correcto programa de vigilancia epidemiológica que cuente con las herramientas tanto serológicas como moleculares que permitan dar a conocer la situación real de esta enfermedad en el país.

Se logró realizar la estandarización de la prueba de rRT-PCR para la detección de gen M de influenza aviar utilizando muestras traqueales de aves con sintomatología respiratoria y como control positivo el antígeno H1 del virus de influenza tipo A.

Se analizaron 37 de las 235 tráqueas obtenidas, sin obtener ningún resultado positivo tras la ejecución de la prueba de rRT-PCR para la identificación del gen M de influenza aviar sobre las muestras traqueales consideradas como provenientes de aves con sintomatología respiratoria.

RECOMENDACIONES

En el caso del virus de influenza tipo A es necesario tomar en cuenta dos escenarios distintos. El primero, para aves silvestres, en el cual se recomienda realizar un programa de vigilancia epidemiológica activa el cual permitirá establecer la zonificación de áreas de riesgo. Con esta información realizar la toma de muestra de un número representativo de aves, las

mismas que se sugieren deberán ser analizadas mediante pruebas serológicas que permitan mantener monitoreada la enfermedad.

El segundo escenario para aves de corral se recomienda mantener un programa de vigilancia epidemiológica pasiva. Esto permitirá dar una respuesta rápida ante la posible presencia de la enfermedad. Se sugiere en ese caso utilizar la prueba de rRT-PCR para influenza tipo A en aves que muestren sintomatología respiratoria compatible con la enfermedad y para las cuales hayan sido previamente descartadas la presencia de otros agentes compatibles con dichos signos.

BIBLIOGRAFÍA

- ALA. (2012). *Asociación Latinoamericana de Avicultores*. Obtenido de Estadísticas de Producción y Consumo de Pollos y Huevos en Latinoamérica: <http://avicolatina.org/estadis.html>
- Alexander, D. (2000). A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*, 3-13.
- Aves y Conservación. (2009). Obtenido de http://avesconservacion.org//index.php?option=com_contact&catid=12&Itemid=70
- Betakova, T. (2007). M2 Protein—A Proton Channel of Influenza A Virus. *Current Pharmaceutical Design* , 3231-3235 .
- Blanton, L., Brammer, L., Finelli, L., Grohskopf, L., Bresee, J., Klimov, A., & Cox, N. (2011). Chapter 6: Influenza. En *VPD Surveillance Manual*. 5th Edition.
- Bouvier, N., & Palese, P. (2008). The Biology of Influenza Viruses. *Vaccine*, 49-53.

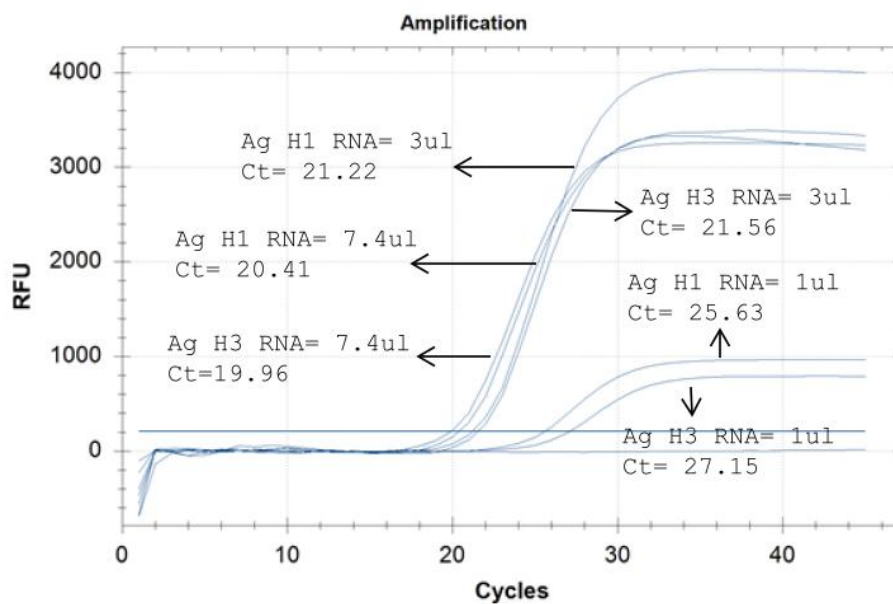
- Capua, I., & Alexander, D. (2004). Avian influenza: recent developments. *Avian Pathology* , 393-404.
- Capua, I., & Alexander, D. (2006). The challenge of avian influenza to the veterinary community. *Avian Pathology*, 189-205.
- Causey, D., & Edwards, S. (2008). Ecology of Avian Influenza Virus in Birds. *JID* , 29-33.
- Chidlow, G., Harnett, G., Williams, S., Levy, A., Speers, D., & Smith, D. (2010). Duplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays for Rapid Detection and Identification of Pandemic (H1N1) 2009 and Seasonal Influenza A/H1, A/H3, and B Viruses. *J. CLIN. MICROBIOL* , 862-866.
- CONAVE. (Junio de 2006). *CONAVE* . Obtenido de Boletín No2: [http://www.conave.org/upload/boletines/BOLETIN %202.pdf](http://www.conave.org/upload/boletines/BOLETIN%202.pdf)
- Cross, K., Burleigh, L., & Steinhauer, D. (2001). Mechanisms of cell entry by influenza virus. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 1-8.
- Du Breuil, R., Patel, J., & Mendelow, B. (1993). Quantitation of B-actin specific mRNA transcripts using Xeno – Competitive PCR. *Cold Spring Harbor Laboratories Press*.
- FAO. (2006). *Situación Actualizada de la Influenza Aviar Altamente Patógena (H5N1) en Asia*. Obtenido de <http://www.rlc.fao.org/es/prioridades/transfron/aviar/pdf/notasia.pdf>
- FAO. (2007). *Epidemiología de la Influenza Aviar*. Obtenido de <http://www.rlc.fao.org/es/prioridades/transfron/aviar/epidemio.htm>
- FAO. (2012). *Highly Pathogenic Avian Influenza in Mexico (H7N3)*. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/016/an395e/an395e.pdf>
- Fodor, E., & Brownlee, G. (2002). Influenza Virus Replication. *Perspectives in Medical Microbiology*, 1-29.
- Furuse, Y., Suzuki, A., Kamigaki, T., & Oshitani, H. (2009). Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis. *Virology* , 6-67.

- Hoffmann, B., Beer, M., Reid, S., Merten, P., Oura, C., van Rijn, P.A., Slomka, M.J., Banks, J., Brown, I.H., Alexander, D.J., & King, D.P. (2008). A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organization for Animal Health. *Veterinary Microbiology*, doi:10.1016/j.vetmic.2009.04.03.
- Horimoto, T., & Kawaoka, Y. (2001). Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 129-149.
- IICA. (2000). Obtenido de <http://www.iica.int/Esp/regiones/andina/Ecuador/Paginas/sanidad02.aspx>
- Jong, M., & Hien, T. (2006). Avian influenza A (H5N1). *Journal of Clinical*, 2–13.
- Kilpatrick, A., Chmura, A., Gibbons, D., Fleischer, R., Marra, P., & Daszak, P. (2006). Predicting the global spread of H5N1 avian influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 19368–19373.
- Bio-Rad Laboratories. (2006). Real-Time PCR Applications Guide.
- Ligon, L. (2006). Avian Influenza Virus H5N1: A Review of Its History and Information Regarding Its Potential to Cause the Next Pandemic. *Elsevier*, 326-335.
- Matrosovich, M., Matrosovich, T., Gray, T., Roberts, N., & Klenk, H.-D. (2004). Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *PNAS*, 4620–4624.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2006). *Censo Avícola Ecuatoriano*. Obtenido de http://201.219.3.97/sinagap/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=265>
- Noda, J. (2006). Virus de la Influenza Aviar: características genéticas, antigénicas y diagnóstico actual. *Rev Salud Anim*, 147-157.
- OIE. (2008). OIE Manual for Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals.

- Orellana, J. (2007). *El gremio avícola nacional sus acciones, incidencias de las mismas y la necesidad del fortalecimiento gremial*. Obtenido de AMEVEA: http://www.amevea-ecuador.org/datos/AMEVEA_2007___ING._JOSE_ORELLANA.PDF
- Portela, A., & Digard, P. (2002). The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *Journal of General Virology*, 723–734.
- Sabefar, E., Najafi, A., Goodarzi, Z., & Lashini, H. (2009). Multiplex reverse transcription-PCR assay for detection of type A influenza virus plus differentiation of Avian H7 and H9 hemagglutinin subtypes in Iran. *Iranian J Publ*, 29-34.
- Salles, J. (2006). Gripe aviar: los impactos comerciales de las barreras sanitarias y los desafíos para América Latina y el Caribe. *Naciones Unidas. CEPAL. División de Comercio Internacional e Integración*.
- Schweiger, B., Zadow, I., Heckler, R., Timm, H., & Pauli, G. (2000). Application of a Fluorogenic PCR Assay for Typing and Subtyping of Influenza Viruses in Respiratory Samples. *J. Clin. Microbiol* , 1552–1558.
- Shortridge, K., Zhou, N., Guan, Y., Gao, P., Ito, T., Kodihalli, S., Kraus, S., Markwell, D., Murti, K.G., Norwood, M., Senne, D., Sims, L., Takada, A., & Webster, R. (1998). Characterization of Avian H5N1 Influenza Viruses from Poultry in Hong Kong. *Virology* , 331–342.
- Spicker, R. (2009). Influenza. *CFSPH*.
- Steinhauer, D., & Skehel, J. (2002). Genetics of Influenza Viruses. *Annu. Rev. Genet*, 305–332.
- Suarez, D. (2000). Evolution of avian influenza viruses. *Veterinary Microbiology*, 15–27.
- Suarez, D., & Schultz-Cherry, S. (2000). Immunology of avian influenza virus: a review. *Developmental and Comparative Immunology*, 269–283.
- Thomas, J., & Noppenberger, J. (2007). Avian influenza: A review. *Am J Health-Syst Pharm*, 149-165.

FIGURAS

Figura 1. rRT-PCR del gen M de influenza tipo A probado en muestras de RNA extraídas de los antígenos H1 y H3 para control positivo

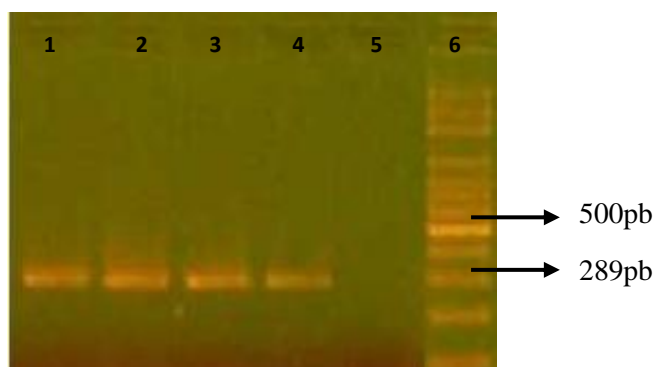


Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	FAM	H3 1	Pos Ctrl		27,15	27,15	0,000
A02	FAM	H1 1	Pos Ctrl		25,63	25,63	0,000
A11	FAM	H3 3	Pos Ctrl		21,56	21,56	0,000
A12	FAM	H1 3	Pos Ctrl		21,22	21,22	0,000
H01	FAM	H3 7.4	Pos Ctrl		19,96	19,96	0,000
H02	FAM	H1 7.4	Pos Ctrl		20,41	20,41	0,000
H03	FAM		Neg Ctrl		N/A	0,00	0,000

Curvas obtenidas como resultado del rRT-PCR para la identificación del gen M de influenza aviar, en el cual se ponen a prueba diferentes volúmenes (1 μ l, 3 μ l y 7.4 μ l) tanto del antígeno H1 como H3 empleados como control positivo. Se establece como mejor resultado el antígeno H1 utilizando 3 μ l, esto en base al valor de Ct y la emisión de fluorescencia.

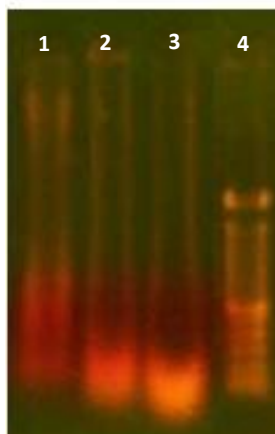
Figura 2. Foto gel electroforesis cargado con amplicones probados para β -actina



Las bandas amplificadas muestran un peso de 289pb. 1)Traquea T92. 2) Traquea T96. 3) Traquea T97. 4) Traquea T98. 5) Control Negativo. 6) Ladder 100pb.

Electroforesis de amplicones probados para β -actina resultantes de la extracción realizada a muestras traqueales consideradas como sintomatológicas. Se observan bandas de un tamaño de 289 pares de bases correspondiente a lo esperado para β -actina, señalando una correcta extracción y la no presencia de compuestos inhibitorios.

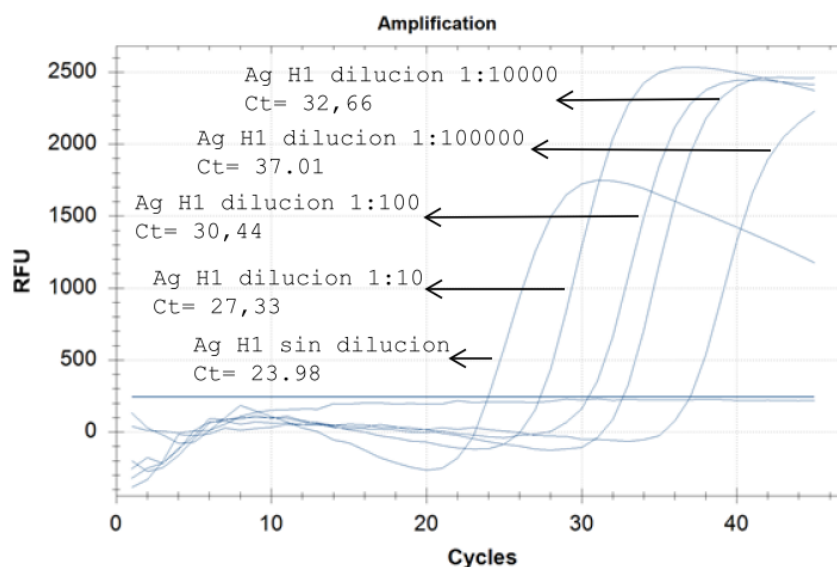
Figura 3. Foto gel con presencia de RNA extraído de muestras traqueales



1)Traquea 1. 2) Traquea 2. 3) Traquea 3. 4) Ladder 100pb.

Electroforesis que muestra barridos correspondientes a material genético que se obtuvo, producto de la extracción de muestras traqueales utilizando el kit RNeasy (Qiagen).

Figura 4. Prueba de rRT-PCR en serie de diluciones a partir del RNA extraído del antígeno H1



* Algunas de las curvas de las muestras duplicadas fueron borradas, están señaladas únicamente las que aparecen en el gráfico.

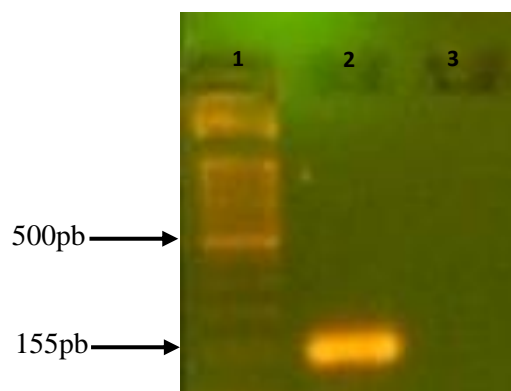
*La curva para la muestra en una dilución de 1:1000 fue borrada ya que su resultado no era congruente.

Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	FAM	H1 3	Pos Ctrl-1		23,98	23,98	0,000
A02	FAM	H1 3	Pos Ctrl		27,64	27,64	0,000
A03	FAM	H1-1	Pos Ctrl		27,33	27,33	0,000
A04	FAM	H1-1	Pos Ctrl		27,19	27,19	0,000
A05	FAM	H1-2	Pos Ctrl		30,44	30,44	0,000
A06	FAM	H1-2	Pos Ctrl		31,12	31,12	0,000
H06	FAM	H1-3	Pos Ctrl		33,23	33,23	0,000
H07	FAM	H1-3	Pos Ctrl		32,83	32,83	0,000
H08	FAM	H1-4	Pos Ctrl		32,66	32,66	0,000
H09	FAM	H1-4	Pos Ctrl		31,23	31,23	0,000
H10	FAM	H1-5	Pos Ctrl		37,01	37,01	0,000
H11	FAM	H1-5	Pos Ctrl		37,60	37,60	0,000
H12	FAM		Neg Ctrl		N/A	0,00	0,000

Curvas obtenidas como resultado del rRT-PCR para la identificación del gen M de influenza aviar, para el cual se realizaron una serie de diluciones (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000) del antígeno H1 tomado como control positivo para establecer un rango ideal para el cual se considera una muestra como positiva. Este rango corresponde a los valores de Ct 23,98 - 27,33.

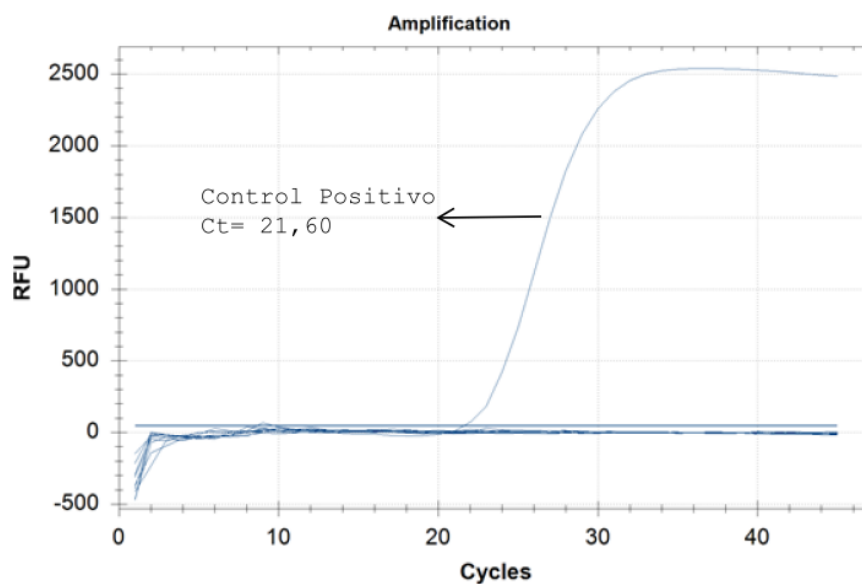
Figura 5. Electroforesis con la amplificación del gen M para influenza tipo A



La banda amplificada muestra un peso de 155pb. 1) Ladder 100pb. 2) Control positivo. 3) Control Negativo.

Electroforesis de antígeno H1 utilizado como control positivo para la prueba de rRT-PCR de influenza aviar en la cual se observa una banda con un tamaño de 155 pares de bases equivalente a lo esperado como tamaño del gen M del virus.

Figura 1. Prueba de rRT-PCR para el gen M de influenza tipo A en RNA obtenido de la extracción de muestras traqueales

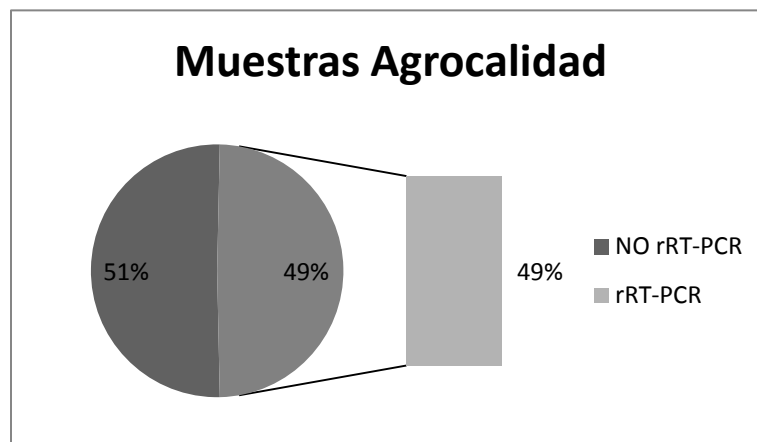


Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev.
A01	FAM	M13	Unkn		N/A	0,00	0,000
A02	FAM	M18	Unkn		N/A	0,00	0,000
A03	FAM	M21	Unkn		N/A	0,00	0,000
A04	FAM	M40	Unkn		N/A	0,00	0,000
A05	FAM	M53	Unkn		N/A	0,00	0,000
H01	FAM	M66	Unkn		N/A	0,00	0,000
H02	FAM	M68	Unkn		N/A	0,00	0,000
H03	FAM		Pos Ctrl		21,60	21,60	0,000
H04	FAM		Neg Ctrl		N/A	0,00	0,000

Resultado obtenido tras la ejecución de la prueba de rRT-PCR para la identificación del gen M de influenza aviar, sobre RNA de muestras traqueales de aves con sintomatología respiratoria que obtuvo un resultado positivo en la prueba de β -actina. Se observa un resultado negativo para las todas las muestras y un valor de Ct (21,60) esperado para el control positivo, lo cual indica una correcta ejecución de la prueba.

Figura 2. Porcentaje de muestras provistas por AGROCALIDAD a las que se realizo la prueba de rRT-PCR



De las 75 muestras traqueales provistas por AGROCALIDAD se realizaron únicamente a 37 (49%) de ellas la prueba de rRT-PCR para detectar el gen M de influenza aviar debido a que las restantes 38 (51%) fueron descartadas por no cumplir satisfactoriamente las características establecidas en el sistema de evaluación.

TABLAS

Tabla 1. Serie de diluciones a partir del mejor valor de Ct proveniente del RNA extraído del antígeno H1 utilizando 3µl en una reacción final de 20µl

Diluciones	
H1 10	11.1ng/µl
A_{260/280}	1.616
A_{260/230}	0.101
H1 10⁻¹	2.4ng/µl
A_{260/280}	1.875
A_{260/230}	0.154
H1 10⁻²	1.1ng/µl
A_{260/280}	1.588
A_{260/230}	0.351
H1 10⁻³	0.2ng/µl
A_{260/280}	0.714
A_{260/230}	0.217
H1 10⁻⁴	-1.2
A_{260/280}	1.706ng/µl
A_{260/230}	0.337
H1 10⁻⁵	-0.2ng/µl
A_{260/280}	0.750
A_{260/230}	0.158

Concentraciones obtenidas en el Nanodrop a partir de la serie de diluciones (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000) del antígeno H1 tomado como control positivo para la prueba de rRT-PCR de influenza aviar, las cuales fueron posteriormente ensayadas para establecer un rango ideal para considerar una muestra como positiva.