



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Desarrollo de una Técnica Molecular Basada en RT- Múltiplex PCR-RFLP para la Tipificación del Virus de la Enfermedad de Gumboro

Gonzalo Martín Tomás Custodio

Pasantía de Grado

Orientador: Dr. Ruben Pérez

Co – orientador: Lic. Martín Hernández

Sección Genética Evolutiva

Facultad de Ciencias

Montevideo, Uruguay
Febrero 2010

AGRADECIMIENTOS...

...a mis padres, hermanos, y familiares más cercanos, por haberme acompañado y apoyado todos estos años, este trabajo está dedicado especialmente a ellos...

...a mi tutor Ruben Pérez, por haberme dado la oportunidad de ingresar al laboratorio y por todos sus consejos...

...a mi co-tutor Martín Hernández, por haberme enseñado tantas cosas, y por su amistad tan sincera...

...a Leticia Maya y Valeria Romero, porque ellas fueron quienes me enseñaron a dar mis primeros pasos dentro del laboratorio...

...a todos los compañeros, ya amigos, los del laboratorio y los de afuera, porque hoy tengo claro que sin gente como ellos no hubiese podido...

...al Dr. Diego Hernández, por haber colaborado con este trabajo a través de su conocimiento como veterinario...

...a todos los integrantes de la Sección Genética Evolutiva, porque todos en algún momento pusieron su granito de arena para que este trabajo saliera adelante, especialmente Yanina Panzera, siempre dispuesta a ayudar y contribuir...

...a todos los investigadores del exterior que apoyan y colaboran con nuestros estudios en enfermedades aviares, especialmente al Dr. Pedro Villegas de la Universidad de Georgia, quien ha abierto generosamente sus puertas a nuestras consultas y ha colaborado en nuestro desarrollo...

...a la ANII por la beca de Iniciación en la Investigación, la cual me permitió llevar a cabo este trabajo con el privilegio de un sueldo...

...al INIA, quien a través de su financiamiento en el marco de un proyecto FPTA, no solo demostró su confianza en este trabajo sino que lo hizo posible...

INDICE

Resumen.....	3
Introducción.....	4
Descripción de la problemática.....	4
Agente etiológico.....	4
IBDV y Enfermedad de Gumboro.....	7
Tipos virales.....	7
Epidemiología histórica.....	8
Estrategias de control.....	9
Objetivo de la presente pasantía.....	12
Materiales y métodos.....	12
Análisis de secuencias.....	12
Cebadores.....	14
Muestras virales.....	14
Extracción del genoma viral.....	15
RT – múltiplex PCR.....	16
Ensayos de restricción.....	16
Corridas electroforéticas.....	17
Resultados.....	17
Análisis de secuencias.....	17
Retrotranscripción.....	22
Múltiplex PCR.....	22
RFLP.....	24
Discusión.....	27
Importancia del diagnóstico.....	27
Detección de casos con reordenamientos genómicos.....	29
RT – múltiplex PCR eficiente y confiable.....	30
RFLP sencillo.....	31
Conclusiones y perspectivas.....	32
Bibliografía.....	33
Anexo I.....	40

RESUMEN

El Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (IBDV) o Gumboro causa una enfermedad inmunosupresora que constituye un grave problema sanitario para la industria avícola mundial. Miembro del género *Avibirnavirus* de la familia *Birnaviridae*, IBDV es un virus pequeño de 60 nm de diámetro, con una cápside icosaédrica sin envoltura y un genoma compuesto por RNA doble hebra bisegmentado, el cual codifica cinco proteínas (VP1, VP2, VP3, VP4 y VP5). Actualmente se conocen tres cepas del virus: clásicas (cIBDV), variantes (vaIBDV) e hipervirulentas (vvIBDV). Las dos primeras se caracterizan por ser de baja patogenicidad, a diferencia de la alta patogenicidad característica de las cepas hipervirulentas. Se diseñaron varias técnicas para la detección y tipificación de estas cepas, dentro de las que se destacan aquellas basadas en técnicas moleculares debido al importante número de ventajas que presentan. Dos de las técnicas más utilizadas a nivel mundial son basadas en RT-PCR-RFLP, en las cuales se utiliza un fragmento del segmento A del virus y varias enzimas de restricción. El hecho de usar un solo segmento genómico se ha vuelto una desventaja desde la aparición de virus reordenados. Una forma de detectar este tipo de virus es incluyendo en el análisis de tipificación al segmento genómico B. Teniendo esto en cuenta, en el presente estudio se lograron encontrar nuevos marcadores de patogenicidad en ambos segmentos genómicos, los cuales son capaces de ser digeridos de forma diferencial por una sola enzima de restricción. Complementariamente se diseñó y puso a punto una prueba de múltiplex PCR que permite la amplificación simultánea de las dos regiones que contienen los sitios de restricción, una ubicada en el segmento genómico A y la otra en el B. De esta manera se logró el desarrollo de una prueba de diagnóstico y tipificación de IBDV basada en RT-múltiplex PCR-RFLP, en la cual se pueden diferenciar las cepas de alta patogenicidad (vvIBDV) de las de baja patogenicidad (cIBDV y vaIBDV), y además detectar los posibles casos de reordenamiento genómico.

INTRODUCCIÓN

DESCRIPCIÓN DE LA PROBLEMÁTICA

La avicultura es una industria que ha ganado terreno a nivel mundial en los últimos años, alcanzando volúmenes de producción comparables a los de otras industrias pecuarias tradicionales. La intensificación de esta actividad industrial genera las condiciones ideales para la emergencia de enfermedades infecciosas que afectan a los pollos sometidos a la cría intensiva. En este sentido, un buen control de los agentes infecciosos es fundamental para la continuidad del éxito de esta cadena productiva. El desarrollo de métodos de diagnóstico cada vez más confiables y de rápida aplicación se convirtió en una tarea imprescindible para ayudar a controlar estos agentes. Mediante la aplicación de técnicas de diagnóstico y caracterización se obtiene información de gran utilidad para articular planes de manejo biosanitario, especialmente en lo que respecta al diseño de esquemas de vacunación para la prevención y el control de las diferentes enfermedades.

El virus de Gumboro o virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (del inglés Infectious Bursal Disease Virus [IBDV]) es el modelo utilizado en este trabajo de pasantía. IBDV es uno de los principales problemas que afecta la industria avícola, siendo causante de grandes pérdidas económicas a nivel mundial (Lukert & Saif, 2003).

AGENTE ETIOLÓGICO

El IBDV pertenece al género *Avibirnavirus* dentro de la familia *Birnaviridae* (Delmas et al., 2004). En esta familia se encuentran además los géneros *Aquabirnavirus* y *Entomobirnavirus*, los cuales comparten la característica de presentar un genoma compuesto por dos segmentos de RNA doble hebra.

La estructura de IBDV consiste en una cápside de simetría icosaédrica de 60 nm de diámetro sin envoltura lipídica (Fig. 1A). El segmento genómico A es el de mayor tamaño (3,3kb), y codifica cuatro de las cinco proteínas del virus a través de dos marcos abiertos de lectura (ORFs) parcialmente solapados (Spies et al., 1989) (Fig. 1B). El ORF A – 1 produce una poliproteína de 1012

aminoácidos, la cual mediante un proceso de autoproteólisis origina las proteínas pre-VP2, VP4 y VP3. Por otro lado, el ORF A – 2 codifica para una sola proteína, VP5. El segmento genómico B tiene un tamaño de 2,9kb, y codifica la proteína viral VP1 (Fig. 1B).

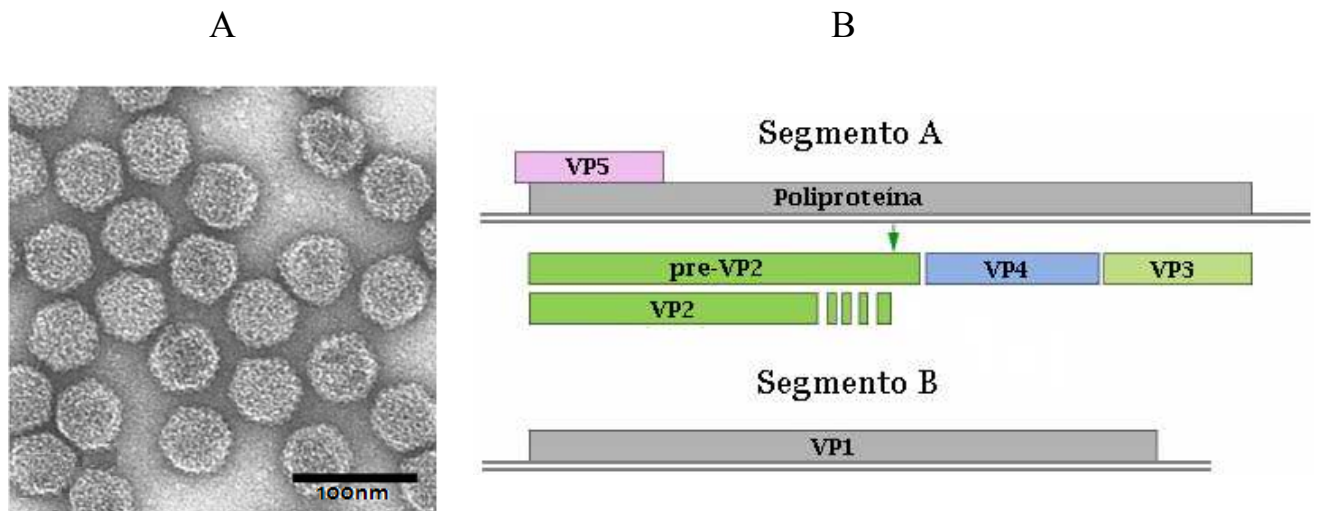


Fig. 1- (A) Apariencia de las partículas virales de IBDV obtenidas mediante microscopía electrónica; (B) Esquema representativo del genoma de IBDV donde se muestran los dos segmentos genómicos A y B, y sus productos proteicos correspondientes.

La proteína pre-VP2 está compuesta por 512 aminoácidos, y es la precursora de la proteína estructural VP2 (441 aminoácidos). En el proceso de proteólisis de pre-VP2 se producen además cuatro péptidos pequeños: dos de 7 aminoácidos, uno de 6 aminoácidos y otro de 11 aminoácidos. Aparentemente tres de estos péptidos formarían parte de la partícula viral, pero aún no está clara su función (Da Costa et al., 2002). VP2 es una de las proteínas más conocidas y estudiadas del virus, debido a su importante rol en la generación de anticuerpos neutralizantes (Azad et al., 1987). Esta proteína forma trímeros, los cuales están dispuestos en 260 unidades estructurales formando la cara externa de la cápside viral. Su estructura ha sido estudiada por varios métodos como criomicroscopía electrónica y cristalografía de rayos X (Böttcher et al., 1997; Navaza, 2008). La secuencia codificante de esta proteína tiene una región particular llamada hipervariable, en la cual se concentran una gran cantidad de cambios

nucleotídicos, varios de los cuales alteran la estructura primaria de la proteína funcional (Bayliss et al., 1990).

La proteína más importante involucrada en el procesamiento proteolítico que ocurre en el virus es VP4 (Hudson et al., 1986; Azad et al., 1987). Esta proteína es una serín proteasa encargada de procesar tanto la poliproteína como el precursor pVP2 (Lejal et al., 2000).

La cara interna de la cápside viral está ocupada por 200 unidades triméricas de la proteína VP3. Esta proteína es indispensable para el ensamblaje de la partícula viral ya que interacciona con la proteína de cápside VP2, con la RNA polimerasa viral VP1, e inclusive con ambos segmentos genómicos virales (Tacken et al., 2002). En este sentido, VP3 actúa como un “scaffold” o andamiaje al cual se unen los demás componentes del virión para poder formar una estructura estable.

En el ORF más pequeño del segmento genómico A codifica la proteína VP5 (Mundt et al., 1995). El gen de esta proteína presenta la particularidad de estar casi totalmente solapado con el gen de la poliproteína, donde la primera tiene su marco de lectura corrido un lugar con respecto a la segunda, así la primera base del codón del gen de la poliproteína corresponde a la tercera base del codón del gen vp5. Esta proteína es la más pequeña de las cinco codificadas por el virus (17kDa), y según algunos estudios se la relaciona con funciones de inducción de la lisis celular a través de su incorporación en la membrana celular del huésped (Lombardo et al., 2000). Por otro lado, otros estudios indican que VP5 intervendría en la vía de las caspasas con función anti-apoptótica, retrasando la lisis de la célula huésped y dándole tiempo al virus para replicarse (Liu & Vakharia, 2004).

La única proteína codificada por el segmento genómico B es una RNA polimerasa RNA dependiente denominada VP1 (Morgan et al., 1988; von Einem et al., 2004). Esta proteína forma parte de la partícula viral a través de su asociación con los extremos de ambos segmentos genómicos y de su interacción con la proteína interna de la cápside VP3 (Kibenge & Dhama, 1997; Maraver et al., 2003). Se ha documentado que esta proteína tiene una incidencia directa en la eficiencia de la replicación viral, y por ende en la virulencia (Liu & Vakharia, 2004).

IBDV Y ENFERMEDAD DE GUMBORO

IBDV genera la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (IBD) o Enfermedad de Gumboro. Esta patología altamente contagiosa afecta particularmente a pollos jóvenes de entre 3 y 6 semanas de edad. Se caracteriza por la destrucción de los órganos linfoides, principalmente la Bursa o Bolsa de Fabricius, donde el virus se replica y destruye los linfocitos B inmaduros provocando un estado de inmunosupresión generalizado en las aves afectadas (Hirai et al., 1981).

TIPOS VIRALES

Se conocen dos serotipos de IBDV, denominados 1 y 2, descritos originalmente por McFerran en un estudio basado en tests de neutralización (McFerran et al., 1980). Solamente el serotipo 1 es capaz de producir la enfermedad en pollos (Jackwood et al., 1985). Dentro del serotipo 1 se encuentran las tres cepas conocidas: clásicas (cIBDV), variantes (vaIBDV), e hipervirulentas (vvIBDV). Las cepas clásicas o también llamadas estándar fueron las primeras en surgir, y por lo tanto fueron las primeras sobre las que se desarrollaron planes de control. Sin embargo, a partir de los años 80 comenzaron a fallar las vacunas como consecuencia de la aparición de las cepas variantes (Rosenberger & Cloud, 1986). Estas cepas se caracterizaron por tener un nivel de patogenia similar a las observadas en las cepas clásicas pero diferían antigénicamente, lo que les permitía escapar a la inmunización provocada por las vacunas diseñadas con cepas clásicas administradas hasta el momento. Luego del desarrollo de vacunas específicas para estas variantes antigénicas, la enfermedad pudo ser controlada nuevamente. Sin embargo, hacia finales de la década del 80 aparecieron los primeros casos de cepas hipervirulentas (Chettle et al., 1989). Estas presentaban un nivel de patogenia claramente mayor al encontrado en las cepas clásicas pero a diferencia de lo que sucedía con las cepas variantes, no presentaban diferencias a nivel antigénico (Eterradossi et al., 1992). El control de estas cepas constituye actualmente un desafío ya que no se cuenta con vacunas específicas. Desde un punto de vista clínico, las parvadas afectadas con IBD presentan una morbilidad muy alta, que llega a alcanzar valores del 100%. La mortalidad es

variable, dependiendo principalmente de la cepa viral. Las cepas consideradas de baja patogenicidad, como las clásicas y variantes, producen tasas de mortalidad de entre 1% y 2% para las primeras, y de 5% para las segundas. Sin embargo, las cepas de alta patogenicidad (hipervirulentas) son responsables de tasas de mortalidad que alcanzan el 30% en parrilleros y 60% en aves de postura. Cuando aves libres de patógenos específicos (SPF) son infectadas con vvIBDV, se observan tasas de mortalidad del 100% (Berg et al., 1991).

EPIDEMIOLOGÍA HISTÓRICA

Los registros más antiguos de esta enfermedad fueron realizados por Cosgrove en el año 1962 al analizar pollos de granjas productoras ubicadas en la localidad de Gumboro, Delaware – de ahí que esta enfermedad sea conocida también con el nombre de Enfermedad de Gumboro (Cosgrove, 1962). En aquel momento Cosgrove constató graves daños en los riñones de los pollos afectados, de manera que inicialmente nombró a esta enfermedad como “nefrosis aviar”. No fue hasta el año 1970 cuando Hitchner propuso el nombre actual de Enfermedad Infecciosa de la Bursa (Hitchner, 1970). Luego de su primera aparición en el año 1962 la enfermedad se dispersó rápidamente. Para mediados de la década del 60 ya estaba presente en la mayoría de las regiones de EEUU, y a fines de la misma década se habían reportado casos en Europa y Medio Oriente. Pero fue a partir de la aparición de nuevas cepas del virus a finales de los años 80, cuando la enfermedad sufrió una explosión en cuanto a su distribución, principalmente a través de las cepas hipervirulentas. Luego de su surgimiento en Europa, los vvIBDV se dispersaron rápidamente reportándose casos en Asia, África, Sudamérica, Centroamérica y recientemente EEUU (Lin et al., 1993; Ikuta et al., 2001; Abdel-Alim et al., 2003; Banda & Villegas, 2004; Stoute et al., 2009). Un reporte realizado en 1995 indica que el 95% de los países que forman parte de la OIE (Oficina Internacional de Epizootias) han declarado casos de IBD (Etteradossi, 1995).

ESTRATEGIAS DE CONTROL

La estrategia para controlar al virus radica en el uso de vacunas, básicamente a través de la protección mediante inmunidad pasiva y activa. La inmunidad pasiva se realiza mediante la hiperinmunización de reproductores, quienes luego confieren protección a la progenie mediante la transferencia de anticuerpos vía yema del huevo (Kramer & Cho, 1970). Los anticuerpos maternos tienen sus niveles más altos en los primeros días post eclosión, pero comienzan a decaer de forma continua hasta que la protección desaparece (Fahey et al., 1987). Igualmente, el tiempo que pasa desde la eclosión hasta que la protección de anticuerpos maternos desaparece es variable, y depende entre otras cosas del nivel inicial de anticuerpos que la madre transfiere al huevo (Al-Natour et al., 2004). Mediante estudios de ELISA se puede evaluar la cinética del nivel de decaimiento de anticuerpos maternos para determinar el mejor momento para vacunar a los pollos jóvenes, provocando un booster de protección de la progenie en el momento preciso. Gran parte del éxito de un buen programa de vacunación radica en lograr la articulación óptima entre la inmunidad pasiva y activa, impidiendo que durante las primeras etapas de vida del pollo los niveles de anticuerpos lleguen a decaer a punto tal de no lograr la protección adecuada contra el virus que circula. Es tan importante este punto que cuando se ven problemas en el campo relacionados con la aparición de brotes de IBDV una de las primeras medidas que se toman es la revisión del programa de vacunación.

Sin embargo, a pesar de lograr implementar buenos planes de manejo biosanitario y eficientes esquemas de vacunación, IBDV ha logrado escapar de esas barreras de control fundamentalmente mediante variaciones asociadas a cambios antigénicos (cepas variantes [vaIBDV]) e incremento de virulencia (cepas hipervirulentas o de alta patogenicidad [vvIBDV]). Investigaciones realizadas indican que dichos cambios fenotípicos son efecto de variaciones genéticas en regiones genómicas involucradas tanto en la antigenicidad como en la virulencia, aunque aún no se ha determinado la base genética precisa de este último carácter (Lana et al., 1992; Berg et al., 1996). En cualquier caso, la detección de los diferentes cambios adaptativos que van ocurriendo en las variantes virales es sumamente relevante para el control epidemiológico de esta enfermedad. Si bien los cambios a nivel antigénico pueden ser detectados por

técnicas inmunológicas tradicionales como el ELISA, los cambios que no involucran variaciones antigénicas, como es el caso de la virulencia en los vvIBDV, no logran ser detectados mediante este tipo de técnica. Contrariamente, por su gran capacidad de discriminación de variantes virales las técnicas de análisis genético se han transformado sin duda en la metodología más utilizada para diagnosticar y caracterizar brotes de IBDV (Wu et al., 2007). La amplificación de determinadas regiones genómicas para la detección de presencia viral, y su posterior secuenciación para su caracterización, es uno de los principales procedimientos aplicados en el análisis de IBDV. Sin embargo, a pesar de ser el método de análisis que otorga la mayor cantidad de información, la caracterización viral por secuenciación aún continúa siendo impráctica en muchos centros de diagnóstico a nivel mundial debido a que consume mucho tiempo y dinero como para incorporarse de forma rutinaria.

Se ha demostrado que no es necesario caracterizar base a base un fragmento genómico para realizar una correcta identificación viral. Existen sitios específicos del genoma cuya variación se asocia a caracteres de interés, tales como la patogenicidad. A estos sitios se los conoce como marcadores genéticos, y son empleados como claves de identificación. Una vez que estas claves son identificadas para un modelo viral, se desarrollan técnicas rápidas de reconocimiento de alguno, o eventualmente todos los marcadores. La digestión con enzimas de restricción es una metodología de reconocimiento muy utilizada que ha ayudado mucho en este tipo de tareas.

No obstante, no hay que perder de vista que por el contenido informativo que ofrece la secuenciación, es recomendable que sea aplicada en instancias posteriores al diagnóstico e identificación de los virus involucrados en un brote, para incorporar información a los estudios epidemiológicos y evolutivos correspondientes.

A nivel mundial existen muchos centros de investigación que se han dedicado al estudio de técnicas más rápidas y menos costosas de caracterización viral. Las principales técnicas desarrolladas utilizan, como dijimos anteriormente, sistemas de enzimas de restricción y posterior análisis del largo de los fragmentos obtenidos de la digestión (RFLP) para la caracterización de amplicones informativos específicos del genoma de IBDV. Además de que el RFLP tiene menor costo y es sensiblemente más rápido que la secuenciación, se trata de una tecnología que requiere instrumentos comúnmente encontrados en

la mayoría de los laboratorios de diagnóstico. Probablemente las dos principales pruebas de RFLP para caracterizar IBDV aplicadas a nivel mundial han sido las diseñadas por investigadores de la Universidad de Ohio y la Universidad de Georgia (Jackwood & Sommer, 1997; Banda et al., 2001). Las pruebas desarrolladas por ambos centros han demostrado ser muy efectivas, constatado por su aplicación en numerosas publicaciones de trabajos realizados en varias regiones del mundo (Majó et al., 2002; Abdel-Alim et al., 2003; Sareyyüpoğlu & Akan, 2006; Lone et al., 2009). Resumidamente, ambas se basan en la amplificación de un corto fragmento de la región hipervariable de la región codificante de VP2, y su posterior digestión con varias enzimas de restricción. Sin embargo, a pesar de ser muy utilizadas por los laboratorios de diagnóstico, la capacidad de discriminación que estas técnicas tienen para identificar los diferentes tipos virales, así como su costo de aplicación, aún presentan varios puntos que pueden ser mejorados.

En el año 2006, investigadores de la French Agency for Food Safety (AFSSA), reportaron por primera vez un brote de IBDV con segmentos genómicos reordenados (Le Nouën et al., 2006). El virus involucrado tenía un segmento genómico A característico de una cepa hipervirulenta, mientras que su segmento B correspondía a una cepa clásica. Dicho aislamiento presentaba características patológicas intermedias entre ambas cepas involucradas. El reordenamiento genómico es una estrategia exclusiva de los virus RNA segmentados para generar variabilidad y concebir nuevas posibilidades evolutivas. Este tipo de mecanismo tiene la característica de provocar grandes cambios en un solo evento molecular. Es por eso que luego del primer reporte de un caso reordenado en IBDV, para poder realizar una caracterización completa de un brote de campo, se comenzó a tener en cuenta que los estudios genéticos incluyeran una región informativa ubicada en el segmento genómico B (Hernández et al., 2006; Stoute et al., 2009). Consecuentemente, en los subsiguientes años se comenzaron a reportar nuevos casos de reordenamientos genómicos en IBDV, indicando que el virus está utilizando esta estrategia evolutiva como una de las herramientas para generar variabilidad (Wei et al., 2006; Gao et al., 2007; Wei et al., 2008). Hasta el momento ningún grupo de investigación ha logrado atender la necesidad de contar con una técnica de diagnóstico específica, que no solo identifique casos de IBDV de cepas típicas, sino que además detecte casos de virus con segmentos genómicos reordenados

entre diferentes cepas.

Inspirados en esto, y frente a la aparición cada vez más frecuente de casos de reordenamientos genómicos, es que comenzamos a analizar la posibilidad de desarrollar una técnica diagnóstica basada en los mismos principios exitosos de aquellas existentes hasta el momento (RT-PCR-RFLP), pero incorporando la capacidad de detectar casos de reordenamientos genómicos, además de incluir el plus de ser sensiblemente menos costosa.

OBJETIVO DE LA PRESENTE PASANTÍA

Desarrollar una prueba de tipificación de IBDV que permita diferenciar las cepas de alta y baja patogenicia, y además detectar los casos de reordenamientos genómicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Todas las secuencias usadas en este análisis fueron obtenidas de la base de datos del GenBank. El mismo fue realizado usando el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software versión 4.0., disponible en el sitio <http://www.megasoftware.net/> (Tamura et al., 2007). Con las secuencias genómicas obtenidas se realizaron alineamientos. Estos incluyeron las secuencias de los segmentos genómicos A y B de 35 aislados, dentro de los que se encontraban las secuencias más representativas de cada uno de los tres tipos de cepas de IBDV. El nombre de cada aislado y el número de acceso correspondiente a cada secuencia se muestran en la tabla 1. A partir de estos alineamientos se buscaron sitios informativos capaces de diferenciar las cepas mediante enzimas de restricción. Luego se hicieron las secuencias consenso de cada una de las cepas y se procesaron usando la herramienta WatCut de la Universidad de Waterloo

Tabla 1- Nombre del aislado, tipo viral y número de acceso correspondiente a cada secuencia del segmento A y B utilizadas en el presente estudio.

Aislado		Número de Acceso	
Nombre	Tipo viral	Segmento A	Segmento B
D6948	Hipervirulento	AF240686	AF240687
UK661	Hipervirulento	X92760	X92761
MG7	Hipervirulento	DQ286035	EU544150
TASIK	Hipervirulento	AF322444	AF322445
KS	Hipervirulento	DQ927042	DQ927043
MB	Hipervirulento	DQ927040	DQ927041
HK46	Hipervirulento	AF092943	AF092944
Cro-Ig/02	Hipervirulento	EU184685	EU184686
Cro-Po/00	Hipervirulento	EU184687	EU184688
OKYM	Hipervirulento	D49706	D49707
To9	Hipervirulento	AY099456	AY099457
UPM94/273	Hipervirulento	AF527039	AF527038
UPM97/61	Hipervirulento	AF247006	AF527040
02015.1	Reordenado	AJ879932	AJ880090
Harbin-1	Reordenado	EF517528	EF517529
GX	Reordenado	AY444873	AY705393
GZ/96	Reordenado	AY598356	AY598355
KZC-104	Reordenado	AB368968	AB368969
ZJ2000	Reordenado	AF321056	DQ166818
TL2004	Reordenado	DQ088175	DQ118374
Edgar	Clásico	AY918950	AY918949
Lukert	Clásico	AY918948	AY918947
Irwin Moulthrop	Clásico	AY029166	AY029165
Cro-Pa/98	Clásico	EU184689	EU184690
Gt	Clásico	DQ403248	DQ403249
Ct	Clásico	AJ310185	AJ310186
B87	Clásico	DQ906921	DQ906922
D78	Clásico	EU162087	EU162090
CU-1	Clásico	X16107	AF362775
CEF94	Clásico	AF194428	AF194429
J1C7	Clásico	EF646853	EF646854
HZ2	Clásico	AF321054	AF493979
JD1	Clásico	AF321055	AY103464
GLS	Variante	AY368653	AY368654
Variant E	Variante	AF133904	AF133905

(<http://watcut.uwaterloo.ca/watcut/watcut/template.php>), la cual permite encontrar las enzimas de restricción que cortan en un sitio determinado por el usuario. Una vez encontrada la enzima que digería el sitio genómico seleccionado, se estudiaron las secuencias para el diseño de los cebadores, y finalmente se analizaron los posibles patrones de restricción obtenidos. Para la anotación y visualización de los cebadores y de los sitios de corte se utilizó el programa Artemis, disponible en el sitio <http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>.

CEBADORES

Los cebadores utilizados en este estudio fueron diseñados con el software PrimerPlex (PREMIER Biosoft International). Las secuencias de los mismos y las posiciones de hibridación se muestran en la tabla 2. Para analizar las T_m y evaluar las posibles estructuras secundarias formadas por los oligos se usó la herramienta Oligo Analyzer 1.2 del paquete Gene Link Software, disponible en el sitio <http://www.genelink.com/tools/gl-oe.asp>. Los amplicones generados por estos primers tienen un tamaño de 296pb para el segmento genómico A, y 372pb para el segmento genómico B (Fig. 4).

MUESTRAS VIRALES

Los ensayos prácticos de este trabajo se realizaron con virus de campo obtenidos de brotes de IBDV de granjas uruguayas y virus de vacunas comerciales. Las muestras de campo correspondieron a cepas hipervirulentas (M8 y M10) provenientes de un brote reportado en 2004 en una granja ubicada en el oeste del departamento de Canelones (reportado por Hernández et al., 2006), mientras que la única muestra de campo clásica fue la M01/09, colectada en 2009 en una granja del mismo departamento. Las muestras consistieron en bolsas extraídas directamente de los pollos afectados con Gumboro. En cada ocasión, las muestras fueron remitidas a la Facultad de Ciencias (Universidad de la República, Montevideo, Uruguay) donde se mantuvieron en freezer (-80°C) hasta su procesamiento. Los virus vacunales se obtuvieron de la vacuna

comercial Nobilis Gumboro D78 de Laboratorios Intervet, la cual incluye en su formulación virus de una cepa clásica atenuada. La misma viene liofilizada en presentación de 1000 dosis.

Tabla 2. Descripción de los cebadores utilizados en el múltiplex PCR.

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Segmento al cual hibrida	Localización ^a (bases)	Polaridad ^b
MAF	AGA GAC CTC GAC CTA CAA TTT GAC TG	A	250 - 275	+
MAR	CAT CTG TCA GTT CAC TCA GGC TTC C	A	545 - 521	-
MBF	AGT GGC TCC TCT TCT TGA TGA TTC TAC	B	81 - 107	+
MBR	TGT GTT GGG TAG TAT TTA GGG AAG TAC	B	452 - 426	-

^a Localización según la secuencia AF240686 del segmento A y AF240687 del segmento B, ambas del aislado D6948.

^b Sentido (+) o antisentido (-).

EXTRACCIÓN DEL GENOMA VIRAL

Para la extracción de RNA viral de las muestras de campo se utilizó el procedimiento previamente descrito por Hernández et al. (2006). Este consiste en el pretratamiento de una porción de la bursa con SDS (dodecil sulfato sódico) y proteinasa K, y posterior extracción del RNA viral con el método de TRIzol Reagent™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Anexo I). Como resultado se obtienen 50µl de RNA eluidos en agua ultra pura. Posteriormente las extracciones se almacenan en freezer (-80°C) hasta su utilización. En cuanto a la muestra vacunal, la extracción del RNA se llevó a cabo utilizando el PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA), luego de resuspender la vacuna en PBS (solución salina amortiguada por fosfatos) (Anexo I). Al igual que el RNA extraído de las muestras de campo, el RNA viral fue resuspendido en agua

ultra pura y guardado en freezer (-80°C) hasta ser utilizado.

RT-MÚLTIPLEX PCR

Las síntesis del DNA copia (cDNA) se realizaron mediante el uso del RevertAid™ Minus First Strand cDNA Síntesis Kit (Fermentas Life Sciences Inc., Hanover, MD). Un total de 10 µl de extracción de RNA fueron usados en cada retrotranscripción, usando random primers como cebadores para la síntesis de cDNA. El protocolo con las condiciones y cantidades de reactivos usados se muestra en el anexo I.

Las reacciones de múltiplex PCR fueron realizadas en un volumen final de 15 µl utilizando la Taq DNA Polymerase (Fermentas Life Sciences Inc., Hanover, MD), según las condiciones detalladas en el anexo I. Para la amplificación de los fragmentos genómicos del múltiplex PCR se utilizó un termociclador Corbett Research PCR Thermal Cycler.

ENSAYOS DE RESTRICCIÓN

Las digestiones enzimáticas se realizaron directamente sobre el producto del múltiplex PCR. La enzima de restricción utilizada fue la FastDigest® TfiI (Fermentas Life Sciences Inc., Hanover, MD), la cual reconoce y corta en la secuencia g`awtc (w=a/t). Las condiciones bajo las cuales se realizaron las digestiones se aclaran en el anexo I. La forma mediante la cual esta enzima es capaz de diferenciar a las cepas de alta patogenicidad (vvIBDV) de las de baja patogenicidad (cIBDV y vaIBDV), y a su vez a éstas de las reordenadas, es a través de los sitios de corte, diferenciales y conservados, que se encuentran en ambos amplicones generados en el múltiplex PCR. El amplicón del segmento A (296 pb) presenta un sitio de corte en las cepas de baja patogenicidad, que no se encuentra en las cepas de alta patogenicidad. Contrariamente, el amplicón del segmento B (372 pb) presenta dos sitios de corte, uno de los cuales se encuentra en ambos tipos de cepas, mientras que el otro se encuentra solo en aquellas de alta patogenicidad (Fig. 2).

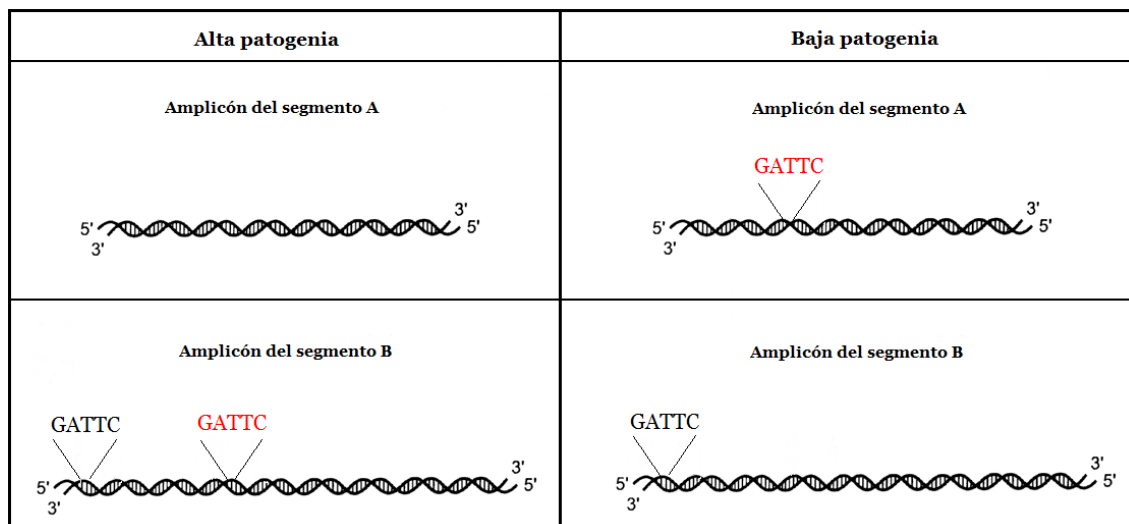


Fig. 2- Esquema representativo de los amplicones generados en el múltiplex PCR donde se detalla la secuencia de los sitios de corte diferenciales (rojo) y no diferenciales (negro) de la enzima TfiI para muestras de alta y baja patogenicia.

CORRIDAS ELECTROFORÉTICAS

Para la visualización de los amplicones del múltiplex PCR se realizaron geles de agarosa 0.8%, corridos con buffer TAE 1X a 90V. Por otro lado, para la corrida electroforética de las digestiones se realizaron geles de agarosa 3%, usando también buffer TAE 1X, pero en este caso a 75V. La visualización de las bandas se realizó en transiluminador UV, previa tinción con bromuro de etidio. Los geles fueron registrados mediante fotografía digital y los archivos fueron guardados en la base de datos del laboratorio.

RESULTADOS

ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Análisis Primario. Inicialmente se adquirió un gran número de secuencias de ambos segmentos genómicos de IBDV, y posteriormente se realizaron los alineamientos correspondientes. Las secuencias presentaban mutaciones puntuales que marcaban un patrón de diferenciación de cepas según su patogenicia (Fig. 3). Más precisamente, este tipo de mutaciones lograba

Segmento A

	280	290	300	310	320	330	340	350	360
cIBDV Edgar	TGACTGTGGG	GGACACAGGG	TCAGGGCTAA	TTGTCTTTT	CCCTGGATTG	CCTGGCTCAA	TTGTGGGTGC	TCACTACACA	CTGCAGAGCA
cIBDV Lukert									
cIBDV D78									G.....
cIBDV Irwin Moul									
cIBDV CEF94									
cIBDV CU-1									
cIBDV J1C7						A.....			
cIBDV CI									G.....
cIBDV Gt									G.....
cIBDV HZ2									
cIBDV JD1									
cIBDV B87						A.....			G.....
cIBDV Cro-Pa/98									G.....
reIBDV ZJ2000									
reIBDV IL2004									
vaIBDV variant E									
vaIBDV GLS									
vvIBDV D6948					T.....				
vvIBDV UK661					C.....				
vvIBDV HK46					T.....				
vvIBDV MG7					T.....				
vvIBDV Cro-Ig/02					T.....				
vvIBDV UPM94/273					T.....				
vvIBDV UPM97/61					T.....				
vvIBDV ks					T.....				
vvIBDV TASIK					T.....				
vvIBDV Cro-Po/00		A.....			T.....				
vvIBDV OKYM					T.....				
vvIBDV T09					T.....				
vvIBDV mb					T.....				
reIBDV GX					T.....				
reIBDV GZ/96					T.....				
reIBDV Harbin-1					T.....				
reIBDV 02015.1					T.....				
reIBDV KZC-104					T.....				

Segmento B

	100	110	120	130	280	290	300	310
vvIBDV D6948	TCTTCTTGAT	GATTCTACCA	CCATGAGTGA	CGTTTTCAT	CCTCAGGGAA	AACGGCTACA	AGATTCTGCA	GCCACGGTCT
vvIBDV UK661								
vvIBDV ks								
vvIBDV mb								
vvIBDV TASIK								
vvIBDV UPM94/273								
vvIBDV UPM97/61				C.....				
vvIBDV HK46						T.....		
vvIBDV MG7								
vvIBDV Cro-Ig/02								
vvIBDV OKYM		G.....						
vvIBDV Cro-Po/00			TA.....					
vvIBDV T09			T.....		T.....			
reIBDV ZJ2000						G.....		
reIBDV IL2004		A.....						
cIBDV Irwin Moul		G.....	A.....C		T.....A.....G		AG.....T	
cIBDV Edgar		G.....	A.....C		A.....G		AG.....T	
cIBDV JD1	C.....	G.....	C.....C	A.....C	A.....G		AG.....T	
cIBDV HZ2		G.....	A.....C		A.....G		AG.....T	
cIBDV Gt		G.....	A.....C		A.....G		AG.....T	G.....
cIBDV Lukert		G.....	A.....C		A.....G		AG.....T	
cIBDV D78		G.....	A.....C		A.....G		AG.....T	G.....
cIBDV J1C7		G.....	A.....C		A.....G		AG.....T	
cIBDV CEF94		G.....	A.....C		A.....G		AG.....T	
cIBDV B87		G.....	A.....C		A.....G		AG.....T	
cIBDV CI		G.....	A.....C		A.....G		AG.....T	G.....
cIBDV Cu-1		G.....	A.....C		A.....G		AG.....T	
cIBDV Cro-Pa/98		G.....	A.....C		A.....G		AG.....T	G.....
vaIBDV variant E		G.....	A.....C		T.....A.....G		AG.....T	A.....
vaIBDV GLS		G.....	A.....C		A.....G		AG.....T	
reIBDV Gx		G.....	A.....		A.....G	T.....	A.....CT	
reIBDV GZ/96		G.....	A.....		A.....G	T.....	A.....CT	
reIBDV Harbin-1		G.....	A.....		A.....	T.....	A.....C	G.....
reIBDV 02015.1			A.....C		A.....G		AG.....T	G.....
reIBDV KZC-104					A.....	T.....	AG.....CT	

Fig. 3- Alineamientos correspondientes a las regiones genómicas de los segmentos A y B que contienen los sitios de corte de la enzima TfiI (GATTC, sombra amarilla). Sombreado en rojo aparecen las secuencias de alta patogenicidad, mientras que en azul aparecen las de baja patogenicidad. Se ven mutaciones que diferencian ambos tipos de cepas.

diferenciar las cepas de alta de las de baja patogenia, siendo raro encontrar un sitio mutado que agrupara a dos cepas de patogenias diferentes. Además, algunas de estas mutaciones puntuales se encontraban inmersas en regiones altamente conservadas en todas las cepas. Esta característica tan particular encontrada en las secuencias nos permitió pensar en la posibilidad de desarrollar una técnica de diagnóstico y tipificación que explote dicha particularidad, usando esos sitios como la base para un RFLP que pueda diferenciar las cepas según el nivel de patogenia que presente. Además, como se está trabajando con ambos segmentos genómicos, la metodología a desarrollar podría también detectar reordenamientos genómicos.

Sitios de Restricción. Una vez encontrados los sitios informativos, se comenzó la búsqueda de enzimas de restricción capaces de reconocerlos. Esta tarea se dividió en dos instancias: la búsqueda de sitios de restricción en el segmento genómico A y, por otro lado, la búsqueda de sitios en el segmento genómico B. A pesar que el segmento A tiene un largo aproximado de 3.3 kb, no se tuvo en cuenta la totalidad del mismo para la búsqueda ya que hay muy pocas secuencias en la base de datos que abarquen toda su longitud, por lo que no pareció adecuado basar nuestra técnica en unas pocas secuencias. Es por eso que centramos nuestra atención en el primer cuarto de este segmento, el cual contiene el gen *vp5* y la región codificante de la proteína VP2 (ver esquema de la Fig. 1B) En esta región encontramos varios sitios de corte de diferentes enzimas de restricción, los cuales fueron marcados como sitios candidatos para desarrollar el RFLP.

Por otro lado el análisis del segmento B fue algo diferente. A pesar que la metodología empleada fue la misma que para el segmento A, nos encontramos con que este segmento genómico tiene una variabilidad nucleotídica mayor (ver alineamiento de la Fig. 3), lo que agregó complejidad al estudio. No obstante, al igual que para el segmento A, se encontraron varios sitios de corte candidatos.

Una vez completado el estudio de sitios candidatos de discriminación, nos dedicamos a analizar las regiones de ambos segmentos genómicos a la vez para evaluar que enzimas serían las ideales para usar. Se encontró una enzima que servía tanto para digerir el segmento A como el segmento B, y que a su vez arrojaba un patrón de RFLP cómodo para diferenciar los grupos de patogenia. La enzima TfiI reconoce y digiere en la secuencia $g^{\text{a}}wtc$ ($w = a/t$). A través del

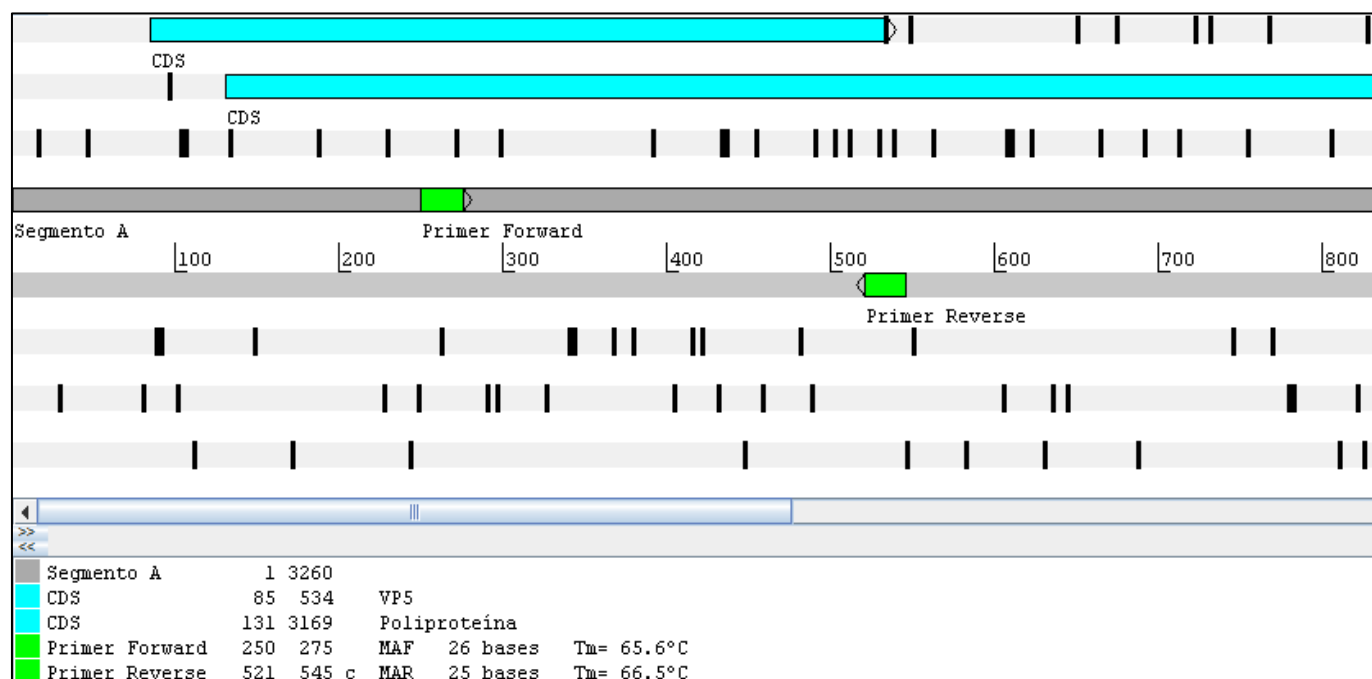
reconocimiento y corte de esta secuencia en los amplicones generados por ambos segmentos (múltiplex PCR), se genera un patrón de restricción que discrimina las cepas de alta patogenicidad (vvIBDV) de las de baja patogenicidad (cIBDV y vaIBDV). Claramente, en presencia de un caso de IBDV con genoma reordenado, se genera un patrón de restricción que evidencia el origen de cada segmento y verifica el reordenamiento genómico.

Diseño de Cebadores. Luego de haber encontrado los sitios de restricción en ambos segmentos genómicos, diseñamos los cebadores que utilizaríamos para generar los amplicones en el múltiplex PCR (Tabla 3). Para ello se tuvo en cuenta las recomendaciones encontradas en la bibliografía para el caso específico de un múltiplex. El largo de los mismos no debería ser menor a 24 bases, por lo que se diseñaron cebadores de entre 25 y 27 bases de longitud. Por otro lado la T_m de los mismos debería ser mayor a 60°C, consecuentemente se diseñaron cebadores cuya T_m estaba entre los 64.0°C y 66.5°C. Los amplicones generados con estos cebadores tienen una longitud de 296 pb para el segmento A, y 372 pb para el segmento B. En la figura 4 se muestran los cebadores del segmento A (MAF/MAR) y los del segmento B (MBF/MBR) ubicados en un esquema generado utilizando el programa de anotación Artemis.

Tabla 3. Características de los cebadores utilizados en el múltiplex PCR y tamaño de los amplicones generados.

Nombre	Longitud (bases)	T _m (°C)	Amplicón (pb)
MAF	26	65.6	296
MAR	25	66.5	
MBF	27	65.7	372
MBR	27	64.0	

Segmento A



Segmento B

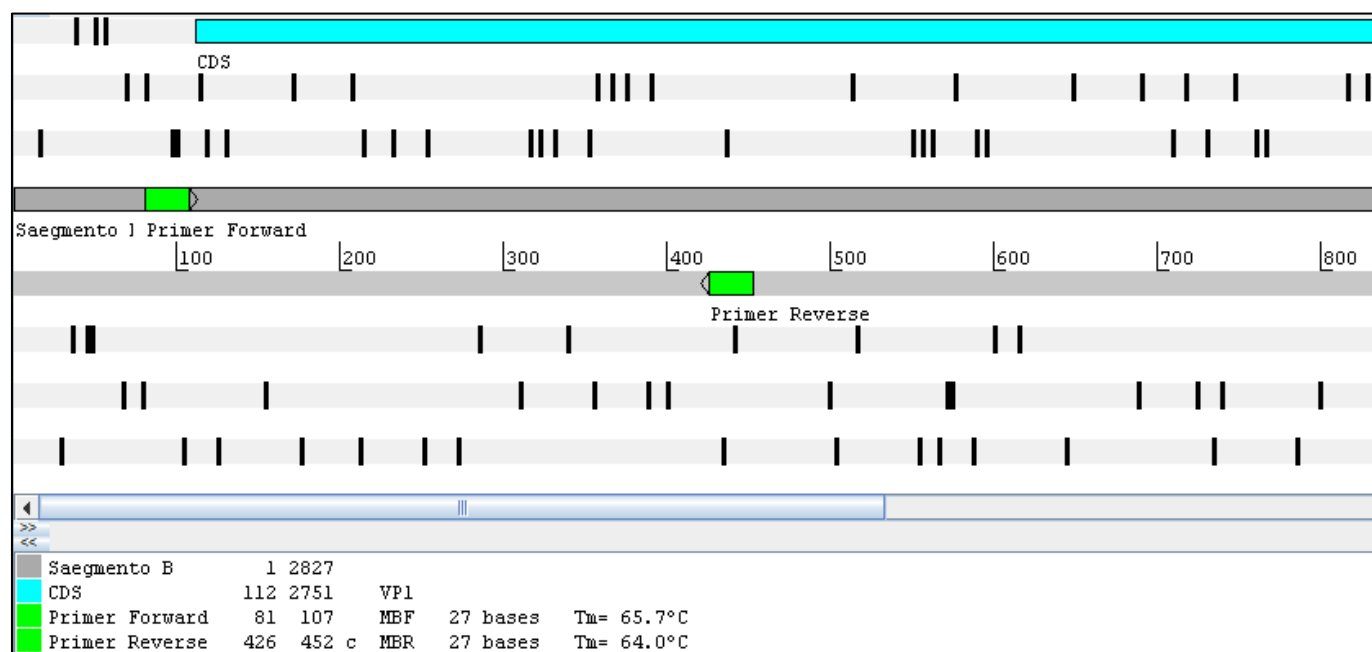


Fig. 4- Esquema realizado con el programa Artemis donde se muestran las posiciones de los primers usados en el múltiplex PCR, además de detallar el tamaño y Tm de cada uno. En la parte superior se muestra el segmento A y en la inferior el segmento B.

RETROTRANSCRIPCIÓN

La síntesis del cDNA siempre fue realizada con la misma enzima retrotranscriptasa usando random primers como cebadores. La utilización de este tipo de cebadores nos proporcionó resultados excelentes, equiparables a los obtenidos con cebadores específicos.

MÚLTIPLEX PCR

Los primeros ensayos que se realizaron incluyeron la amplificación por separado de los fragmentos del múltiplex PCR, obedeciendo las recomendaciones al respecto encontradas en la bibliografía. Estas pruebas tuvieron como objetivo testear el funcionamiento de los cebadores en diferentes

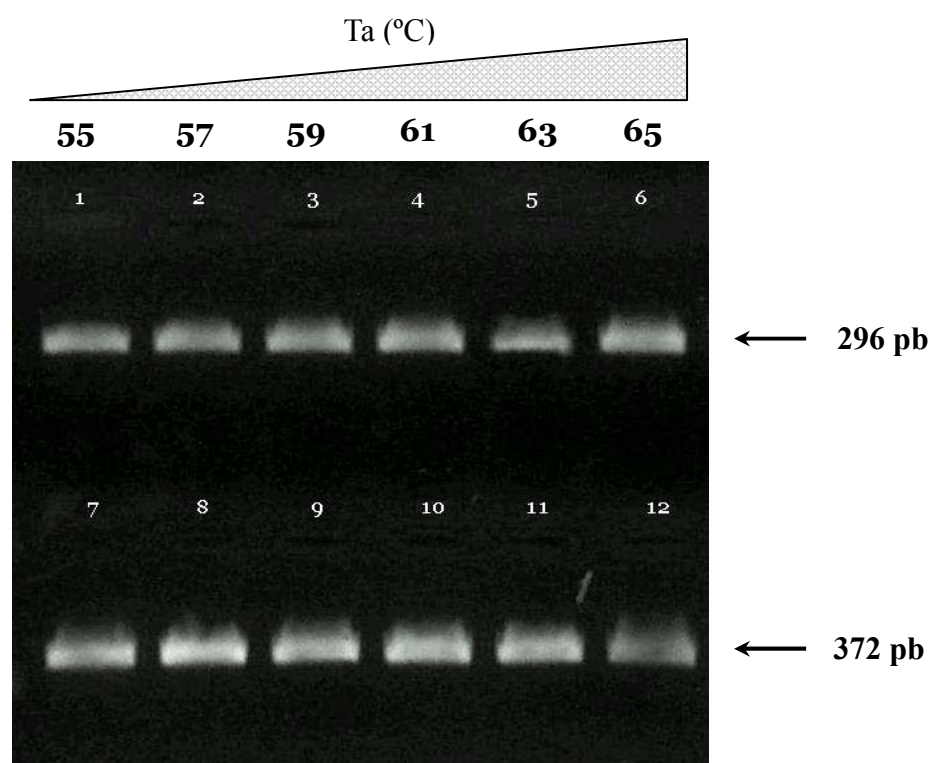


Fig. 5- Gel de agarosa 0.8% donde se muestran los amplicones correspondientes a los primers MAF/MAR del segmento A (carriles del 1 al 6) y MBF/MBR del segmento B (carriles del 7 al 12). Se usó un gradiente de temperatura de annealing (Ta) desde 55°C hasta 65°C. Para esta prueba se usó cDNA de una muestra hipervirulenta (M8).

entornos para poder encontrar las condiciones óptimas de funcionamiento de cada juego. Las dos principales variables evaluadas en este caso fueron la temperatura de annealing usada en el ciclado de la PCR y la cepa viral usada como molde. Los resultados que obtuvimos con estas pruebas fueron satisfactorios. Los dos juegos de cebadores mostraron una actividad excelente en un rango amplio de temperaturas de annealing las cuales iban desde 55°C hasta 65°C (Fig. 5). Cuando los cebadores fueron probados usando muestras de diferentes cepas virales, en este caso una de tipo clásico y otra de tipo hipervirulento, se constató una respuesta positiva, encontrándose bandas con intensidades similares entre las dos muestras (dato no mostrado).

Una vez determinado el rango de eficiencia de los cebadores por separado, se comenzó con los ensayos de múltiplex PCR propiamente dicho. Al igual que lo hecho con los juegos de cebadores por separado, las pruebas del múltiplex PCR involucraron las mismas variables, temperatura de annealing y cepa usada como molde. Se realizaron varios ensayos, primero testeando la temperatura de annealing óptima de las cepas hipervirulentas y luego de las cepas clásicas, hasta encontrar la que podía ser utilizada indistintamente para cualquiera de las dos. Como era esperable según lo observado anteriormente en las pruebas de los cebadores por separado, los resultados fueron buenos. Nos encontramos frente

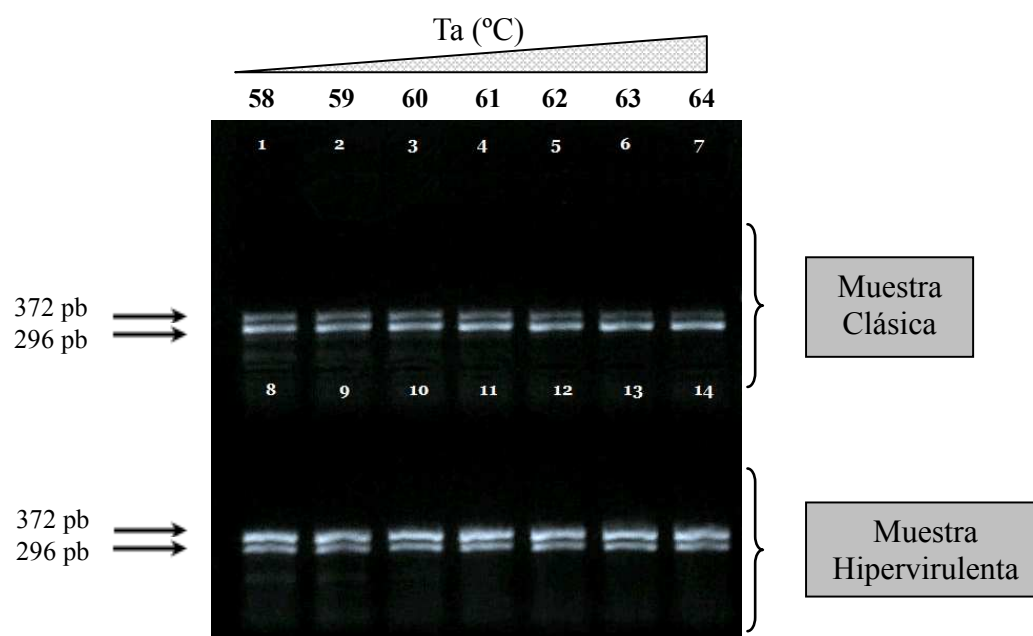


Fig. 6- Fotografía de un gel de agarosa 0.8% correspondiente a un ensayo de múltiplex PCR, donde se ve el amplicón del segmento A (296 pb) y B (372 pb). De izquierda a derecha se muestra un gradiente de temperatura de annealing (Ta) que recorre desde los 58°C hasta los 64°C. Los carriles superiores (1 a 7) corresponden a la amplificación por múltiplex PCR de una muestra de cepa clásica (M01/09), mientras que los carriles inferiores (8 a 14) corresponden a una muestra de cepa hipervirulenta (M8).

a un rango de temperaturas de annealing bastante amplio en el que el múltiplex PCR funcionaba correctamente (Fig. 6). Como muestra la intensidad de las bandas en el gel de la figura 6, ambos amplicones tienen una buena eficiencia de amplificación, y no se advierten mayores inespecificidades, a no ser por una pequeña banda que aparece a temperaturas bajas.

RFLP

En el esquema de la figura 7 se muestran los patrones de digestión que se deberían encontrar frente a los diferentes tipos de IBDV que circulan. Como se

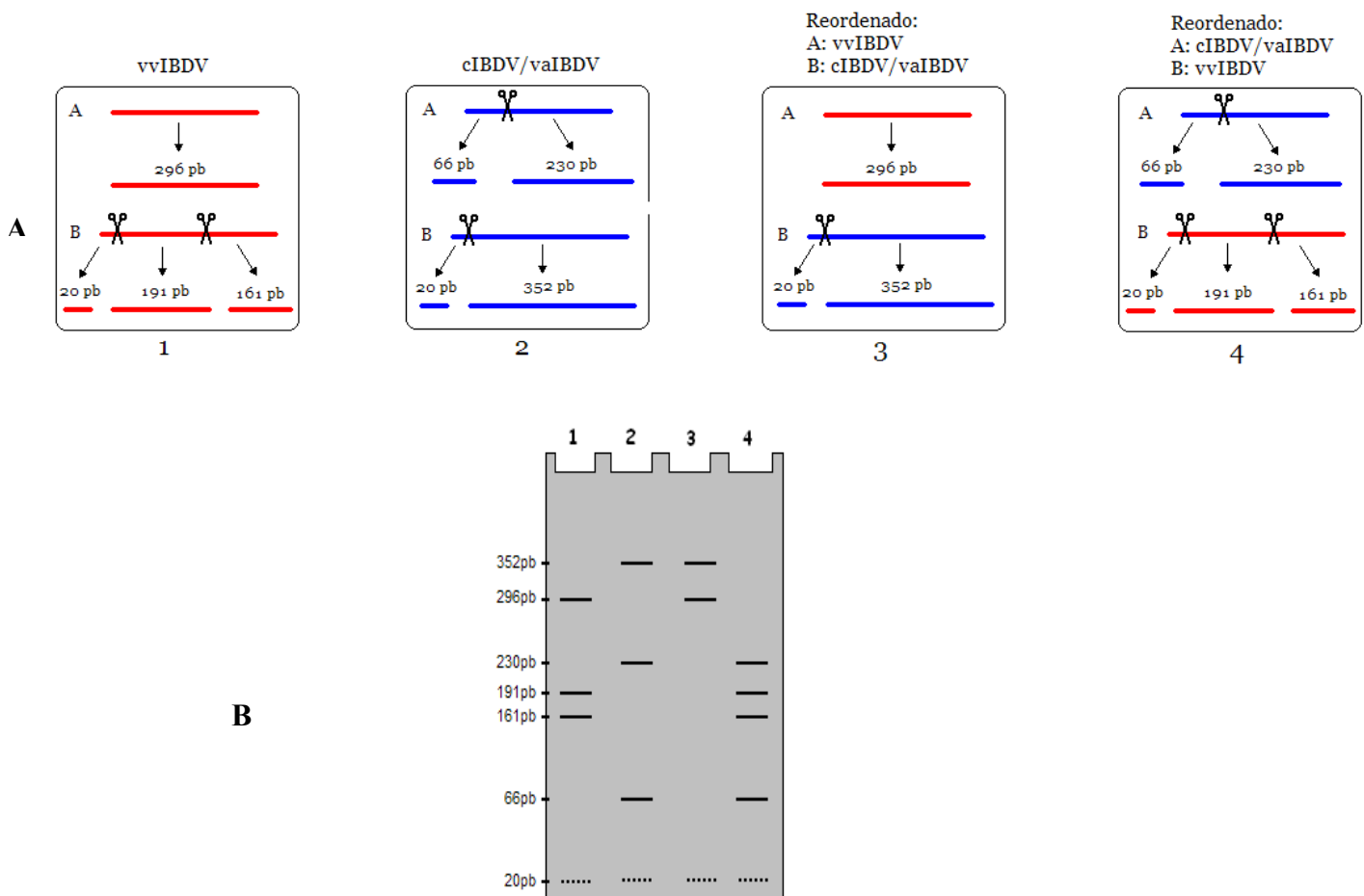


Fig. 7- A) Esquema representativo de los cuatro tipos virales diferenciados por RFLP. Se pueden ver los amplicones del segmento A y del segmento B de cada tipo viral, además de los sitios de corte de la enzima TfiI ($\propto$) y los fragmentos generados. B) Esquema de un gel de agarosa donde se muestran las bandas obtenidas en la digestión de una muestra de alta patogenicidad (1), baja patogenicidad (2), y los dos reordenamientos posibles (3 y 4). Las bandas de 20 pb aparecen punteadas representando las bandas que no se ven en un gel de agarosa.

mencionó, en este estudio se trabajó con muestras clásicas e hipervirulentas, pero la técnica no se pudo aplicar a muestras de campo variantes y/o reordenadas. Esto responde a que las cepas variantes no circulan en Uruguay, y hasta el momento tampoco se han registrado casos de IBDV con segmentos genómicos reordenados. Por este motivo, el patrón de restricción de estas dos muestras fue realizado mediante análisis *in silico*.

Los patrones de restricción generados dependen del tamaño de los amplicones y de los sitios donde corte la enzima de restricción. Estos últimos son los responsables de las diferencias observadas entre los patrones de los diferentes tipos virales analizados. La enzima TfiI es capaz de reconocer tres sitios de corte dentro de los amplicones generados en el múltiplex PCR, dos de los cuales participan en la diferenciación de los tipos. El sitio particular presente en todas las cepas virales analizadas se encuentra en uno de los extremos del amplicón del segmento B, y genera un fragmento de tan solo 20pb, el cual no alcanza a visualizarse en un gel de agarosa, por lo que no será tenido en cuenta en el análisis de restricción (Fig. 7). Los otros dos sitios son informativos y se encuentran en los diferentes amplicones, uno en el amplicón A de las cepas de baja patogenicidad, y el otro en el amplicón B de las cepas de alta patogenicidad. Estos son los responsables de diferenciar los grupos virales. Cuando se trata de una muestra de IBDV de alta patogenicidad (vvIBDV) se espera un patrón de tres bandas visibles, las cuales tienen un tamaño de 296 pb (amplicón del segmento A sin digerir), y 191 pb y 161 pb producto de la digestión del amplicón del segmento B (Fig. 7 y 8). Si por otro lado se analiza una muestra de baja patogenicidad (cIBDV y vaIBDV), el patrón esperado mostraría tres fragmentos: uno de 352 pb correspondiente al amplicón del segmento B sin los 20 pb del extremo 5', y uno de 230 pb y otro de 66 pb producto de la digestión del amplicón del segmento A (Fig. 7 y 8). A partir de estos patrones de digestión se pueden inferir los patrones esperados para las muestras reordenadas. Si se está frente a una muestra reordenada que conste de un segmento genómico A de patogenicidad alta y un segmento genómico B de patogenicidad baja, la digestión del mismo generaría dos fragmentos, uno de 352 pb y otro de 296 pb, ambos sin digerir en los sitios diagnósticos (Fig. 7). Si en su lugar la muestra estudiada contiene el segmento genómico A de baja patogenicidad y el segmento genómico B de alta patogenicidad, se espera encontrar un patrón de digestión con cuatro fragmentos: de 230 pb y 66 pb del segmento A, y de 191 pb y 161 pb del

segmento B (Fig. 7).

El gel que se muestra en la figura 8 corresponde a la corrida electroforética de la digestión de una muestra de alta patogenicia (hipervirulenta) y de baja patogenicia (clásica). Además se muestra el producto del múltiplex PCR correspondiente sin digerir, para poder comparar los tamaños de banda. El resultado obtenido fue satisfactorio ya que se pudieron ver de forma clara los patrones esperados según el esquema, corroborando el buen funcionamiento de la técnica desarrollada.

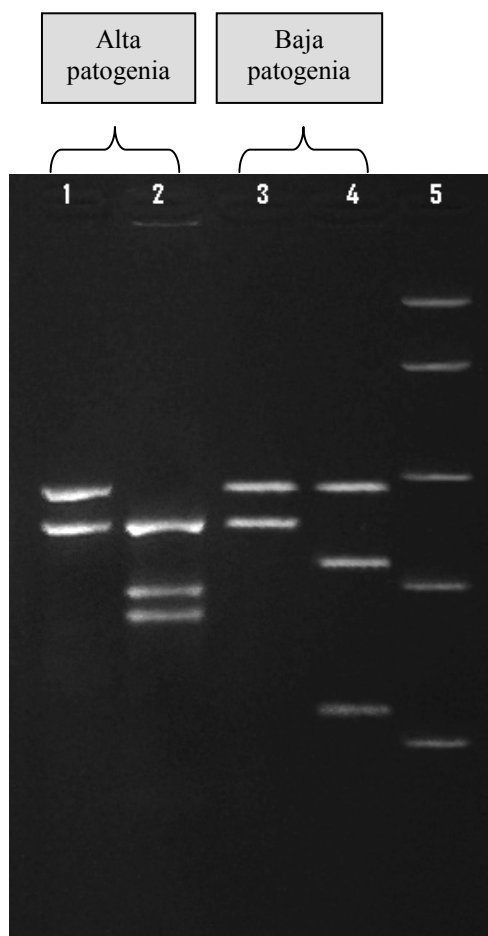


Fig. 8- Gel de agarosa 3% correspondiente al análisis de RFLP de una muestra de alta patogenicia y otra de baja patogenicia. En ambos casos se corrió primero el producto del múltiplex PCR sin digerir y luego el mismo producto digerido. Los carriles 1 y 2 corresponden a una muestra hipervirulenta (M8), mientras que los carriles 3 y 4 corresponden a una clásica (MO1/09). En el carril 5 se ve el marcador de peso molecular con los siguientes tamaños: 50 pb, 200 pb, 400 pb, 850 pb y 1500 pb.

En este caso se puede ver como el mayor porcentaje de agarosa de este gel mejora aún más la visualización de los amplicones generados en el múltiplex PCR. El resultado positivo de este gel es consecuencia de los buenos ensayos que

precedieron al RFLP, y por lo tanto sirve para demostrar el buen funcionamiento de la totalidad de la técnica y confirmar la identidad de los fragmentos amplificados.

DISCUSIÓN

IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO

Los problemas sanitarios causados por agentes patógenos como virus y bacterias fueron y seguirán siendo centro de preocupación para la industria avícola mundial. En este sentido, el desarrollo de técnicas moleculares para el rápido diagnóstico y tipificación del agente infeccioso adquiere una relevancia mayúscula, ya que en base a éstas es que se planifican los planes de control sanitario y esquemas de vacunación correspondientes. Los virus, y más los que usan RNA como material genético, se caracterizan por formar poblaciones virales altamente variables y dinámicas, donde el tipo viral que predomina en un momento y una región dados puede ser diferente al tipo viral encontrado un tiempo después o en una región adyacente. Esta característica de los virus RNA los hace sumamente problemáticos ya que esa plasticidad les permite escapar de forma sencilla de las presiones aplicadas para detener su proliferación, como ocurre con el uso de las vacunas. Una de las formas posibles de actuar frente a ese problema es a través del activo relevamiento de muestras de campo y su análisis diagnóstico y de tipificación, para así tener actualizada la información acerca de qué tipo viral es el que está predominando, y por lo tanto saber que tipo de vacuna es el que más se ajusta en un lugar y momento dados. En este sentido, se han desarrollado algunas técnicas de rápido diagnóstico y tipificación de IBDV que faciliten esta tarea. Las pruebas más conocidas desarrolladas hasta el momento se basan en RT-PCR-RFLP, y utilizan un amplicón generado a partir del segmento genómico A, más específicamente de la región hipervariable de la secuencia codificante de la proteína de cápside VP2 (Jackwood & Sommer, 1997; Banda et al., 2001). Estas pruebas permiten diferenciar una gran cantidad de tipos virales, básicamente a través de la identificación de subtipos dentro de las cepas clásicas y variantes. Sin embargo, la alta variabilidad de esta región, sumado al alto número de enzimas de

restricción utilizadas en las pruebas, lleva al surgimiento frecuente de patrones de restricción novedosos que no coinciden con ninguno de los descritos hasta ese momento, dificultando la tarea de tipificación y demostrando lo frágil que pueden llegar a ser estos análisis (Sapats & Ignjatovic, 2002; Abdel-Alim et al., 2003; Sareyyüpoğlu & Akan, 2006; Lone et al., 2009). Si bien el análisis de esta región es muy útil para detectar nuevos cambios nucleotídicos en el genoma, carece de la estabilidad requerida para el diagnóstico y tipificación de IBDV por detección de sitios de restricción específicos. Contrariamente, una de las ventajas de la metodología presentada en esta tesina es que utiliza como sitios diana de la enzima regiones nucleotídicas más conservadas. Se ha observado en otros modelos virales que presentan genes solapados, que las regiones nucleotídicas incluidas en el solapamiento generalmente presentan un alto grado de conservación (Mizokami et al., 1997; Zhao et al., 2007). Estudios realizados por nuestro grupo de investigación constataron que en el caso de IBDV, la región de solapamiento entre el gen vp5 y el extremo 5' del gen de la poliproteína presenta un alto nivel de estabilidad. Este fue uno de los motivos por lo que esta región del segmento genómico A fue seleccionada como blanco de nuestra técnica de diferenciación en el segmento A. Al trabajar sobre una región conservada se facilita la tarea de encontrar sitios de restricción conservados dentro del mismo tipo viral, en nuestro caso las cepas de patogenicidad alta y baja. Además, disminuye la probabilidad de que aparezcan nuevos sitios de restricción o que cambien los ya existentes, simplemente por la baja tasa de mutación que existe en esa región, lo que le confiere mayor perpetuidad a la técnica. Por otro lado, para lograr un análisis más completo se incluyó en el estudio un fragmento del segmento B. Al igual que para el segmento A, se procuró ubicar una región genómica conservada donde se pudieran diseñar cebadores que amplificaran todas las cepas y que además el amplicón incluya un sitio diana correspondiente a un SNP (polimorfismo de nucleótido simple) capaz de diferenciar las cepas de alta y baja patogenicidad. El uso de un fragmento del segmento B en una prueba de RT-PCR-RFLP nunca había sido reportado en Gumboro.

DETECCIÓN DE CASOS CON REORDENAMIENTOS GENÓMICOS

El virus de Gumboro tiene un genoma segmentado, y como todos los virus con este tipo particular de genoma puede generar variantes a través del reordenamiento genómico entre distintos tipos virales. Esta estrategia de generación de variantes es particularmente importante debido a que un cambio tan grande en el genoma de un virus puede potencialmente acarrear consecuencias de la misma magnitud. El ejemplo más conocido de los últimos tiempos es el del virus influenza H1N1, pero la importancia de esta estrategia generadora de variabilidad parece también quedar en evidencia en el virus de Gumboro (Khiabanian et al., 2009). Un trabajo reciente que analiza los orígenes filogenéticos de los segmentos genómicos de la cepa vvIBDV, presenta fuertes argumentos a favor de que el segmento A de estas cepas ya había surgido unos 20 años antes de su expansión, y que fue el reordenamiento genómico con otro segmento B lo que provocó el surgimiento del fenotipo hipervirulento (Hon et al., 2006). Sin duda éste hecho marca uno de los momentos más importantes en la historia evolutiva del virus de Gumboro. El reordenamiento genómico en IBDV parece ser una realidad que así como habría disparado la formación de variantes de alta patogenicidad, podría modificar el escenario epidemiológico actual de forma drástica y abrupta. Consecuentemente, la posibilidad de detectar este tipo de casos adquiere una importancia mayúscula en el estudio de este virus, y debido a esto surgieron trabajos que analizaron ambos segmentos genómicos y encontraron casos reordenados (Wei et al., 2006; Wei et al., 2008; Xia et al., 2008). Sin embargo, la metodología empleada en estos casos es la secuenciación de fragmentos de ambos segmentos genómicos, lo cual es lento y costoso. Consecuentemente, laboratorios de bajo alcance económico tienen actualmente imposibilitada la detección de reordenamientos genómicos, debido a que no existe una técnica alternativa a la secuenciación capaz de detectar estos casos. La técnica desarrollada en nuestro laboratorio no solo permite la detección de casos con reordenamientos genómicos, además de diferenciar las cepas de alta y baja patogenicidad, sino que además lo hace a través de una metodología sencilla y accesible económicamente.

RT – MÚLTIPLEX PCR EFICIENTE Y CONFIABLE

Otra parte importante a destacar de la prueba desarrollada es que la amplificación de los dos fragmentos, uno del segmento genómico A y otro del B, se realiza mediante un múltiplex PCR, generando los dos amplicones en un mismo tubo. Previamente, se realiza una retrotranscripción usando random primers, lo cual permite reducir los costos ya que se está ahorrando en cebadores específicos, además de que las mismas retrotranscripciones luego pueden ser usadas para amplificar cualquier otra región del genoma de IBDV.

Los cebadores diseñados, luego de revisar bibliografía relacionada con las pruebas de múltiplex PCR demostraron tener un rendimiento excelente (Nicodème & Steyaert, 1997; Kaderali et al., 2003). Es sabido que la posibilidad de formación de estructuras secundarias no deseadas (dímeros u horquillas) en una prueba múltiplex se ve incrementada debido al aumento en las posibles combinaciones de hibridación entre los diferentes cebadores. Por lo tanto, poner a punto una prueba de múltiplex PCR no es sencillo, pero lograrlo brinda varias ventajas. Probablemente una de las principales se relaciona al ahorro de reactivos, ya que si hubiese que amplificar cada fragmento por separado se estaría gastando el doble. Otra importante ventaja es que se gasta menos muestra para el diagnóstico y caracterización del virus. Este punto es fundamental ya que generalmente no es sencillo conseguirlas, y muchas veces se cuenta con una muestra pequeña para realizar varios tipos de análisis, por lo que el aprovechamiento del material en estos casos se transforma en algo primordial. En cuanto a las ventajas particulares de la técnica desarrollada en este trabajo, se destacan la eficiencia y conveniencia de los cebadores diseñados. En este sentido, se buscó generar amplicones de pequeño tamaño para facilitar el proceso de amplificación, asegurando la reproducibilidad del ensayo. No obstante la diferencia de tamaño entre uno y otro es suficiente para ser detectada en una corrida electroforética sencilla, con un gel de agarosa no muy concentrado (0.8%), facilitando su visualización y manteniendo al mínimo los gastos. Por otro lado, en referencia a las características de los cebadores, una de las principales ventajas que ofrecen a la prueba es la gran flexibilidad en cuanto a la temperatura de annealing a la cual pueden ser usados, característica válida tanto para las muestras clásicas como para las hipervirulentas (Fig. 6). Además, su buen rendimiento a T_m elevadas y las longitudes un poco mayores a la de

cebadores corrientes, reducen la probabilidad de que aparezcan amplificaciones inespecíficas. Las características recién mencionadas aumentan la confiabilidad y robustez de la técnica, lo que sumado a la sencillez para reproducirla, hace que tenga los elementos esenciales de una efectiva prueba de diagnóstico y tipificación.

RFLP SENCILLO

La técnica desarrollada culmina con la realización del RFLP, el cual también presenta varias ventajas. Como fue mencionado, se usa una sola enzima de restricción, y esto se ve reflejado en la sencillez del análisis del patrón de restricción. Cuatro son los posibles patrones de restricción obtenidos: uno para las cepas de alta patogenicidad (296 pb, 191 pb y 161 pb), otro para las cepas de baja patogenicidad (352 pb, 230 pb y 66 pb), y uno para cada uno de los reordenamientos posibles: segmento A de alta patogenicidad con segmento B de baja patogenicidad (352 pb y 296 pb), y segmento A de baja patogenicidad con segmento B de alta patogenicidad (230 pb, 191 pb, 161 pb y 66 pb) (ver Fig 7B). Como puede verse en la figura 3B, los patrones de restricción son pocos y cada uno de ellos presenta un número de fragmentos fácilmente analizables. Otra ventaja particular de este RFLP es que sea cual sea el tipo de muestra analizada, la enzima siempre va a cortar algún fragmento y esto podrá ser visto en el gel. Recuérdese que la enzima *TfiI* tiene un sitio diana en todos los amplicones del segmento B, sea cual sea la cepa, el cual genera un fragmento de 20 pb. Si bien la detección de este pequeño fragmento no es posible en un gel de agarosa 0.8%, este corte se puede evidenciar debido a la reducción en el tamaño del otro fragmento del segmento B. Esta es una estrategia para no tener que usar un control positivo de la enzima, nuevamente economizando y facilitando la técnica.

Los sitios de restricción elegidos dentro de las regiones conservadas ya descritas, tienen la ventaja de ser reconocidos por la misma enzima de restricción. Este hecho no es menor ya que es la primera vez que se realiza una prueba de RFLP para caracterización de cepas de IBVD usando una sola enzima. Contrariamente, usar más de una enzima de restricción en una prueba de RFLP tiene varias desventajas. En principio, se incrementa la complejidad a la hora de la manipulación en el laboratorio, teniendo que atender a los diferentes

protocolos de utilización de cada enzima, convirtiendo a la técnica en algo tedioso e incrementando la posibilidad de cometer errores de manipulación. Además, eleva sensiblemente los costos, impidiendo la posibilidad de que laboratorios que cuentan con pocos recursos económicos puedan implementar la técnica. Finalmente, la complejidad de los patrones de restricción se ve aumentada, haciendo más dificultosa la interpretación de los resultados. Por otro lado, la enzima utilizada, TfiI, nunca había sido usada en otras pruebas de RFLP en IBDV. Esto se debe a que los marcadores nucleotídicos de diferenciación seleccionados son totalmente novedosos para este modelo, es decir, es la primera vez que se proponen como clave de tipificación de ambos segmentos genómicos

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Fueron varios los motivos por los cuales se decidió realizar el trabajo que aquí se describe, pero uno de los principales y quizás más importante de ellos era el hecho de atender una problemática que hasta el momento no estaba resuelta. Luego de la aparición del reordenamiento genómico en IBDV en el año 2006, no se ha publicado ningún trabajo que haya desarrollado una técnica de diagnóstico y tipificación rápida y sencilla que sea capaz de detectar estos nuevos tipos virales. Transcurrido más de un año de trabajo dedicado al diseño experimental y puesta a punto, logramos desarrollar una técnica que cumple con todas las características y ventajas que nos habíamos propuesto originalmente. No solo creemos que esta técnica puede ser hoy día una buena elección para ser reproducida en cualquier laboratorio del mundo, sino que además puede servir como disparador para que otros laboratorios e investigadores reporten estos nuevos tipos virales y así poder generar una visión epidemiológica más completa de IBDV. En cuanto a nuestras perspectivas particulares, gracias a todo el estudio dedicado a este trabajo, creemos haber aprendido lo suficiente como para pensar en seguir por la misma línea de trabajo, ya sea mejorando la técnica aquí desarrollada o mediante un nuevo diseño experimental. Sin duda el Real – Time PCR es una de las herramientas más importantes que han aparecido en el último tiempo. Seguramente con el correr de los años será una tecnología adoptada por la mayoría de los

laboratorios de diagnóstico. Por este motivo uno de los próximos desafíos que nos proponemos es incorporar la tecnología de Real-Time al diagnóstico y caracterización de IBDV con especial atención a la detección de virus con segmentos genómicos reordenados.

BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Alim, G., M. H. Awaad & Y. M. Saif. Characterization of Egyptian field strains of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 47(4):1452-7. 2003.

Al-Natour, M. Q., L. A. Ward, Y. M. Saif, B. Stewart-Brown & L. D. Keck. Effect of different levels of maternally derived antibodies on protection against infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 48(1):177-82. 2004.

Azad, A., M. Jagadish, M. Brown, & P. Hudson. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology* 161:145-152. 1987.

Banda, A., P. Villegas, J. El-Attrache, & C. Estévez. Molecular characterization of seven field isolates of infectious bursal disease virus obtained from commercial broiler chickens. *Avian Dis.* 45(3):620-30. 2001.

Banda, A., & P. Villegas. Genetic characterization of very virulent infectious bursal disease viruses from Latin America. *Avian Dis.* 48(3):540-9. 2004.

Bayliss, C. D., U. Spies, K. Shaw, R.W. Peters, A. Papageorgiou, H. Muller, & M. E. G. Boursnell. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J. Gen. Virol.* 71:1303-1312. 1990.

Berg, T. P., M. Gonze & G. Meulemans. Acute infectious bursal disease in poultry: Isolation and characterisation of a highly virulent strain. *Avian Pathol.* 20(1):133-43. 1991.

Berg, T. P., M. Gonze, D. Morales & G. Meulemans. Acute infectious bursal disease in poultry: Immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain. *Avian Pathol.* 25(4):751-68. 1996.

Böttcher, B., N. A. Kiselev, V. Y. Stel'Mashchuk, N. A. Perevozchikova, A. V. Borisov & R. A. Crowther. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J Virol.* 71(1):325-30. 1997.

Chettle, N. J., J. C. Stuart, & P. J. Wyeth. Outbreaks of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Vet. Rec.* 125: 271–272. 1989.

Cosgrove, A. S. An apparently new disease of chickens- avian nephrosis. *Avian Diseases.* 6:385-389. 1962.

Da Costa, B., C. Chevalier, C. Henry, J.-C. Huet, S. Petit, J. Lepault, H. Boot, & B. Delmas. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J. Virol.* 76: 2393–2402. 2002.

Delmas, B., F. S. B. Kibenge, J. C. Leong, E. Mundt, V. N. Vakharia & J. L. Wu. Birnaviridae. In: *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L. A. Ball, eds. London Academic Press. 561-9. 2004.

Eterradossi, N., J. P. Picault, P. Drouin, M. Guittet, R. L'Hospitalier & G. Bennejean. Pathogenicity and preliminary antigenic characterization of six infectious bursal disease virus strains isolated in France from acute outbreaks. *Zentralbl Veterinarmed B.* 39(9):683-91. 1992.

Eterradossi, N. Progress in the Diagnosis and Prophylaxis of Infectious Bursal Disease in Poultry, Comprehensive reports on technical items presented to the International Committee or to regional Commissions. *OIE.* 75 – 82. 1995.

Fahey, K. J., J. K. Crooks & R. A. Fraser. Assessment by ELISA of passively

acquired protection against infectious bursal disease chickens. *Aust. Vet. J.* 64(7):203-7. 1987.

Gao, H. L., X. M. Wang, Y. L. Gao & C. Y. Fu. Direct evidence of reassortment and mutant spectrum analysis of a very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 51(4):893-9. 2007.

Hernández, M., A. Banda, D. Hernández, F. Panzera, & R. Pérez. Detection of very virulent strains of infectious bursal disease virus (vvIBDV) in commercial broilers from Uruguay. *Avian Dis.* 50: 624-631. 2006.

Hirai, M.K., T. Funakoshi, T. Nakai, & S. Shimakura. Sequential changes in the number of surface immunoglobulin-bearing B lymphocytes in infectious bursal disease virus-infected chickens. *Avian Dis.* 25:484-496. 1981.

Hitchner, S. B. Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs. *Poult. Sci.* 49:511-516. 1970.

Hon, Ch. C., T. Y. Lam, A. Drummond, A. Rambaut, Y. F. Lee, C. W. Yip, F. Zeng, P. Y. Lam, P. T. Ng & F. C. Leung. Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent infectious bursal disease virus and reassortment of its genome segment B. *J Virol.* 80(17):8503-9. 2006.

Hudson, P. J., N. M. McKern, B. E. Power & A. A. Azad. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res.* 14(12):5001-12. 1986.

Ikuta, N., J. El-Attrache, P. Villegas, E. M. García, V. R. Lunge, A. S. Fonseca, C. Oliveira & E. K. Marques. Molecular characterization of Brazilian infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 45(2):297-306. 2001.

Jackwood, D. J., & S. E. Sommer. Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 41(3):627-37. 1997.

Jackwood, D. J., Y. M. Saif & P. D. Moorhead. Immunogenicity and antigenicity

of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens. *Avian Dis.* 29(4):1184-94. 1985.

Juneja, S. S., Ramneek, D. Deka, M. S. Oberoi & A. Singh. Molecular characterization of field isolates and vaccine strains of infectious bursal disease virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 31(1):11-23. 2008.

Kaderali, L., A. Deshpande, J. P. Nolan & P. S. White. Primer-design for multiplexed genotyping. *Nucleic Acids Res.* 31(6):1796-802. 2003.

Khiabani, H., V. Trifonov, R. Rabadan. Reassortment patterns in Swine influenza viruses. *PLoS Curr Influenza.* 21:RRN1008. 2009.

Kibenge, F. S., & V. Dhama. Evidence that virion-associated VP1 of avibirnaviruses contains viral RNA sequences. *Arch Virol.* 142(6):1227-36. 1997.

Kramer, T. T., & H. C. Cho. Transfer of immunoglobulins and antibodies in the hen's egg. *Immunology.* 19:157-167. 1970.

Lana, D. P., C. E. Beisel & R. F. Silvia. Genetic mechanisms of antigenic variation in infectious bursal disease virus: analysis of a naturally occurring variant virus. *Virus Genes.* 6(3):247-59. 1992.

Le Nouën, C., G. Rivallan, D. Toquin, P. Darlu, Y. Morin, V. Beven, C. de Boisseson, C. Cazaban, S. Comte, Y. Gardin & N. Eterradossi. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. *J Gen Virol.* 87(Pt 1):209-16. 2006.

Lejal, N., B. Da Costa, J-C. Huet, & B. Delmas. Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *J. Gen. Virol.* 81: 983-992. 2000.

Lin, Z., A. Kato, Y. Otaki, T. Nakamura, E. Sasmaz & S. Ueda. Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis.* 37(2):315-23. 1993.

Liu, M., & V. N. Vakharia. VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. *Virology*. 330(1):62-73. 2004.

Lombardo, E., A. Maraver, I. Espinosa, A. Fernández-Arias, & F. J. Rodríguez. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology*. 277: 345-357. 2000.

Lone, N. A., S. F. Rehmani, S. U. Kazmi, R. Muzaffar, T. A. Khan, A. Khan, S. A. Khan & A. Ahmed. Molecular characterization of Pakistani field isolates of infectious bursal disease virus. *Avian Dis*. 53(2):306-9. 2009.

Lukert, P. D., & Y. M. Saif. Infectious bursal disease. In: *Diseases of poultry*, 11th ed. Y. M. Saif, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, and D. E. Swayne, eds. Iowa State University Press, Ames, IA. Pp. 161 – 179. 2003.

Majó, N., J. El-Attrache, A. Banda, P. Villegas, A. Ramis, A. Pagès & N. Ikuta. Molecular characterization of Spanish infectious bursal disease virus field isolates. *Avian Dis*. 46(4):859-68. 2002.

Maraver, A., R. Clemente, J. F. Rodríguez & E. Lombardo. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. *J Virol*. 77(4):2459-68. 2003.

McFerran, J. B., M. S. McNulty, E. R. McKillop, T. J. Connor, R. M. McCracken, D. S. Collins & G. M. Allan. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. *Avian Pathol*. 9(3):395-404. 1980.

Mizokami, M., E. Orito, K. Ohba, K. Ikeo, J. Y. Lau & T. Gojobori. Constrained evolution with respect to gene overlap of hepatitis B virus. *J Mol Evol*. 44 Suppl 1:S83-90. 1997.

Morgan, M. M., I. G. Macreadie, V. R. Harley, P. J. Hudson & A. A. Azad.

Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-kDa product. *Virology*. 163(1):240-2. 1988.

Mundt, E., J. Beyer, & H. Müller. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells *J. Gen. Virol.* 76: 437-443. 1995.

Navaza, J. Combining X-ray and electron-microscopy data to solve crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 64(Pt 1):70-5. 2008.

Nicodème, P., & J. M. Steyaert. Selecting optimal oligonucleotide primers for multiplex PCR. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* 5:210-3. 1997.

Rosenberger, J. K., & S. S. Cloud. Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *J Am Vet Med Assoc.* 189:357. 1986.

Sapats, S. I., & J. Ignjatovic. Restriction fragment length polymorphism analysis of the VP2 gene of Australian strains of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.* 31(6):559-66. 2002.

Sareyyüpoğlu, B., & M. Akan. Restriction fragment length polymorphism typing of infectious bursal disease virus field strains in Turkey. *Avian Dis.* 50(4):545-9. 2006.

Spies, U., H. Müller & H. Becht. Nucleotide sequence of infectious bursal disease virus genome segment A delineates two major open reading frames. *Nucleic Acids Res.* 17(19):7982. 1989.

Stoute, S. T., D. J. Jackwood, S. E. Sommer-Wagner, G. L. Cooper, M. L. Anderson, P. R. Woolcock, A. A. Bickford, C. G. Senties-Cué, & B. R. Charlton. The diagnosis of very virulent infectious bursal disease in California pullets. *Avian Dis.* 53(2):321-6. 2009.

Tacken, M. G., B. P. Peeters, A. A. Thomas, P. J. Rottier & H. J. Boot. Infectious Bursal Disease Virus Capsid Protein VP3 Interacts both with VP1, the RNA-

Dependent RNA Polymerase, and with Viral Double-Stranded RNA. Society. 76(22): 11301-11311. 2002.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, & S. Kumar. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 2007

von Einem, U. I., A. E. Gorbalenya, H. Schirrmeier, S. E. Behrens, T. Letzel & E. Mundt. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. J Gen Virol. 85(Pt 8):2221-9. 2004.

Wei, Y., J. Li, J. Zheng, H. Xu, L. Li & L. Yu. Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. Biochem Biophys Res Commun. 350(2):277-87. 2006.

Wei, Y., X. Yu, J. Zheng, W. Chu, H. Xu, X. Yu & L. Yu. Reassortant infectious bursal disease virus isolated in China. Virus Res. 131(2):279-82. 2008.

Wu, C. C., P. Rubinelli, & T. L. Lin. Molecular detection and differentiation of infectious bursal disease virus. Avian Dis. 51(2):515-26. 2007.

Xia, R. X., H. Y. Wang, G. M. Huang & M. F. Zhang. Sequence and phylogenetic analysis of a Chinese very virulent infectious bursal disease virus. Arch Virol. 153(9):1725-9. 2008.

Zhao, X., K. M. McGirr & G. C. Buehring. Potential evolutionary influences on overlapping reading frames in the bovine leukemia virus pXBL region. Genomics. 89(4):502-11. 2007.

ANEXO I

EXTRACCIÓN DE RNA DE BURSA

Pretratamiento con SDS 5% y proteinasa K

Tomar una porción de tejido de los pliegues internos de la bursa de aproximadamente 50 mg y colocarla en un eppendorf con 100 µl de SDS 5%. Macerar con tijera esterilizada hasta lograr una buena disociación del tejido. Agregar 4 µl de proteinasa K (18mg/ml) e incubar a 60°C por una hora aproximadamente, hasta observar la total disociación del tejido.

Centrifugar 2 min a 10.000 g.

Homogeneización

Agregar 1 ml de TRIzol al eppendorf recién centrifugado.

Mezclar usando vortex.

Separación de fases

Incubar el homogeneizado por 5 min a temperatura ambiente.

Agregar 200 µl de cloroformo.

Mezclar con vortex por unos segundos hasta que la mezcla alcance un color rosado uniforme.

Incubar 3 min a temperatura ambiente.

Centrifugar 15 min a 12.000 g.

Precipitación del RNA

Transferir la fase superior conteniendo el RNA a un nuevo eppendorf.

Agregar 500 µl de isopropanol frío.

Incubar 10 min a temperatura ambiente.

Centrifugar 10 min a 12.000 g para la formación del pellet de RNA.

Lavado del RNA

Descartar el sobrenadante teniendo cuidado de no deshacerse del pellet de RNA.

Resuspender el RNA en 1 ml de etanol 75% frío.

Agitar con vortex.

Centrifugar 5 min a 7.500 g.

Descartar el sobrenadante y eliminar los restos de etanol incubando el eppendorf abierto en estufa a 55°C, teniendo cuidado de no secar el pellet de RNA.

Disolver el RNA en 50 µl de agua ultra pura. Guardar en freezer (-80°C) si no se va a utilizar inmediatamente.

EXTRACCIÓN DE RNA DE VACUNA

Resuspender 0.01 grs de vacuna liofilizada Nobilis Gumboro D78 en 1 ml de PBS 10 mM.

Usar 500 µl de de esta solución para realizar la extracción con el PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit, según las recomendaciones del fabricante.

RETROTRANSCRIPCIÓN

Agregar a un tubo de 0.2 ml, siempre en hielo:

10 µl de extracción.

1 µl de random primers (100µM).

1 µl de agua ultra pura.

Mezclar y dar un spin.

Incubar la mezcla 5 min a 98°C (desnaturalización) y pasar inmediatamente a hielo.

Dar un spin.

Agregar al tubo en hielo:

4 µl de buffer de reacción 5X.

1 µl de Ribolock (20u/µl) inhibidor de ribonucleasas.

2 µl de dNTP mix (10 mM).

Mezclar y dar un spin.

Incubar 5 min a 25°C.

Agregar 1 µl de Retrotranscriptasa RevertAid™ Minus M-MuLV Reverse Transcriptasa (200 u/µl).

Incubar 10 min a 25°C.

Incubar 1 h a 42°C para que actúe la enzima RT.

Detener la reacción incubando 10 min a 70°C.

PCR

Agregar los siguientes reactivos por cada tubo de 0.2 ml:

7.775 µl de agua ultra pura.

1.5 µl de buffer de PCR 5X.

1.5 µl de MgCl₂ (25 mM).

0.375 µl de dNTPs (10 mM c/u).

0.75 µl de primer forward MAF (10 µM).

0.75 µl de primer reverse MAR (10 µM).

0.75 µl de primer forward MBF (10 µM).

0.75 µl de primer reverse MBR (10 µM).

0.15 µl de Taq (5 u/µl).

0.7 µl de cDNA.

Parámetros del termociclador:

Primera desnaturalización..... 5 min a 95°C

Desnaturalización..... 30 seg a 95°C

Annealing.....1 min a 61°C

Extensión..... 1 min a 72°C

Extensión final..... 15 min a 72°C

DIGESTIÓN

Agregar a un eppendorf de 1.5 ml:

17 µl de agua ultra pura.

2 µl de 10x FastDigest buffer.

10 µl de producto del múltiplex PCR.

1 µl de FastDigest TfiI.

Mezclar y centrifugar brevemente.

Incubar 10 min a 37°C.

Inactivar la enzima incubando 5 min a 65°C.

Guardar en freezer (-20°C) hasta su corrida electroforética.