



Solución científica para la salud animal

I+D+i

FARVET RESEARCH

Revista Especializada en
Investigación Veterinaria



Solución científica para la salud animal

DESCUBRIR Y DESARROLLAR VACUNAS QUE AYUDEN A MEJORAR LA SALUD ANIMAL ES NUESTRA PASIÓN



Laboratorio de Microbiología y Serología

Laboratorio de Cultivo Celular y Virología



Producción de biológicos II

Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica



Producción de biológicos I



Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular

Producción de Biológicos Porcinos



Laboratorio de bioinformática

Producción de Fármacos



Laboratorio de Bioquímica





FARVET RESEARCH

Revista Especializada en Investigación Veterinaria

Farvet es una compañía biofarmacéutica innovadora, dedicada a la investigación científica, la manufactura y comercialización de una amplia gama de productos biológicos y farmacéuticos para la industria animal en Perú y Latinoamérica.

Nuestro liderazgo en el mercado de vacunas y farmacéuticos se basa en la experiencia en el campo veterinario, es así que el know how de la empresa se ve reforzado por los diversos socios y asesores estratégicos a nivel mundial y el compromiso de nuestros profesionales altamente capacitados, lo que nos ha permitido aplicar una gran variedad de tecnologías innovadoras con el objeto de consolidarnos a nivel nacional e insertarnos comercialmente en Bolivia, Colombia, Ecuador y Venezuela.

El plan de expansión científico-comercial de FARVET es convertirnos en uno de los laboratorios veterinarios especializados en aves y cerdos más importantes de Latinoamérica, con la capacidad de poder desarrollar productos basados en la investigación y estudio genómico de las principales enfermedades de la industria animal. Mediante el cumplimiento de los más altos estándares de calidad, profesionalismo e integridad, nos esforzamos constantemente por ser el socio de veterinarios, criadores profesionales y amantes de los animales.

Hoy, FARVET está listo para afrontar el reto de mantener una posición altamente competitiva a nivel nacional e internacional en el sector veterinario con el desarrollo de productos innovadores y de alta calidad apoyado en herramientas biotecnológicas para la salud animal.

I+D+i "Investigación + Desarrollo + innovación"

Es una revista de divulgación científica referida a las investigaciones hechas en FARVET.

DIRECTORIO

Manolo Fernández Díaz, CEO y Fundador
Manolo Fernández Sánchez, Gerente de producción

EDITORES DE CONTENIDOS

Manolo Fernández Díaz
Jorge Bendezú Eguis
Nora Vernimmen

DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN

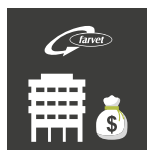
Jhonnatann Vargas Saavedra



- Desarrollo de una técnica molecular para la identificación de *Avibacterium paragallinarum* -Page 9-
- Evaluación filogenética del gen Hemaglutinina de *Avibacterium paragallinarum* y su relación con la serotipificación -Page 11-
- Evaluación de la proliferación y viabilidad celular por Citometría de Flujo en células Vero infectadas con metapneumovirus aviar (AMPV) -Page 12-
- Valores de referencia de linfocitos T y B por Citometría de Flujo para gallinas SPF y gallinas de postura comercial -Page 13-
- Citólisis de linfocitos B en gallinas libres de patógenos específicos (SPF) infectadas experimentalmente con adenovirus aviar serotipo 4 (AAV-4) -Page 14-
- Detección e identificación de virus ADN que infectan pollos utilizando multiplex TaqMan en PCR tiempo real -Page 16-
- Expresión soluble de la glicoproteína Espícula del virus de bronquitis infecciosa aviar usando el sistema de expresión de Baculovirus -Page 17-
- Presencia de las especies C, D y E de Fowl adenovirus (FAdV) en el Perú identificadas por PCR-RFLP y filogenias moleculares durante el periodo 2009-2011 -Page 18-
- Evaluación de la carga viral, viabilidad celular y apoptosis en células DF-1 infectadas con el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) utilizando fluido alantoideo de huevos embrionados de pollo como suplemento de cultivo -Page 20-
- Adenovirus aviar serotipo 4 induce apoptosis en células esplénicas mononucleares de gallinas libres de patógenos específicos (SPF) -Page 22-
- Empleo de proteínas multiepitópicas recombinantes para el diagnóstico del Adenovirus aviar tipo I -Page 23-
- Dinámica de células T y B entre órganos linfoides durante la infección experimental de gallinas libres de patógenos específicos (SPF) con el Adenovirus aviar (FAdV) serotipo 4 -Page 25-
- Serotipificación y sensibilidad antimicrobiana de aislados de *Avibacterium paragallinarum* procedentes de Perú -Page 27-
- Rescate de un virus lentogénico asintomático peruano de la enfermedad de Newcastle (RNDV-PE18) -Page 29-
- Proteína Matriz de Newcastle como plataforma para la obtención de Partículas Pseudoviricas (VLPs) de *Fowl Adenovirus* serotipo 4 (FAdV-4) generadas a partir de la Fibrina-2 -Page 33-



Evaluación del efecto in vivo e in vitro de una novedosa terapia antitumoral basada en el virus de la enfermedad de Newcastle en perros con tumor venéreo transmisible (TVT)	-Page 36-
Recuperación de partículas defectuosas del virus de la enfermedad de Newcastle	-Page 37-
Efecto de la incorporación de Interleuquina-2 de pollo (ChIL-2) bioactiva en la superficie de un virus de la enfermedad de Newcastle virulento (vNDV)	-Page 38-
Caracterización Biológica y Molecular de aislados peruanos del virus de la enfermedad de Newcastle	-Page 39-
Evaluación de vacuna oleosa inactivada de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> en cuyes	-Page 40-
Reporte de co-infección de serotipos de Fowl Adenovirus en muestras de Pucallpa	-Page 42-
Expresión y evaluación de la glicoproteína G como un candidato potencial a vacuna contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (ILTV)	-Page 44-
Reporte del aislamiento de dos nuevas variantes del virus de bronquitis aviar en el PERU	-Page 45-
Expresión de la glicoproteína J del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar en la envoltura viral de baculovirus y su capacidad de activación de PBMCs de aves.	-Page 47-
Avian Metapneumovirus in Cytodex 1 Microcarrier-Based Vero cell Culture	-Page 48-
Efecto del cambio de posición del gen de la Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN) hacia la región proxima al promotor en la virulencia del virus de la enfermedad de Newcastle	-Page 50-
Desarrollo de una vacuna multiepitópica contra el virus de influenza aviar A-H5N1 en base a herramientas inmunoinformáticas	-Page 52-
Predicción de la afinidad entre el complejo mayor de histocompatibilidad por simulaciones de dinámica molecular	-Page 56-
Desarrollo y validación de una Real-Time qPCR para la detección y cuantificación del Virus de Laringotraqueitis Infecciosa Aviar en fluido alantoideo en concordancia con Good Laboratory Practices	-Page 58-



Proyectos financiados

- Desarrollo de una vacuna múltiepitopica contra influenza aviar empleando herramientas genómicas e inmunobionfórmáticas **-Page 61-**
- Desarrollo de una vacuna viva contra el virus de newcastle que contiene interleuquina-2 para potenciar la respuesta inmune efectora y de memoria en pollos de engorde **-Page 62-**
- Desarrollo de un kit para el diagnóstico diferencial y rápido de la coriza infecciosa y el síndrome de cabeza hinchada en la industria avícola **-Page 63-**
- Desarrollo de una vacuna aviar basada en la expresión de una glicoproteína del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (iltv) en la envoltura viral de baculovirus **-Page 64-**
- Desarrollo de una vacuna vectorizada contra Hepatitis por Cuerpos de Inclusión (HCI) en un virus no patógeno de la Enfermedad de Newcastle **-Page 65-**
- Implementación de una plataforma de producción de anticuerpos monoclonales para el desarrollo de pruebas de diagnóstico rápido de importancia para sector pecuario **-Page 66-**



Artículos científicos

- Genome sequence and comparative analysis of *Avibacterium paragallinarum* -Page 68-
- An evaluation of serotyping of *Avibacterium paragallinarum* by use of a multiplex polymerase chain reaction -Page 69-
- Naturally Occurring b-Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Independent *Avibacterium paragallinarum* Isolate in Peru -Page 70-
- Characterization and Sequencing of a Genotype XII Newcastle Disease Virus Isolated from a Peacock (*Pavo cristatus*) in Peru -Page 71-
- Design of a predicted MHC restricted short peptide immunodiagnostic and vaccine candidate for Fowl adenovirus C in chicken infection -Page 72-
- Coinfection of *Avibacterium paragallinarum* and *Ornithobacterium rhinotracheale* in Chickens from Peru -Page 73-
- First evidence of detection of Asia/South America II (A/SAll) infectious bronchitis virus in a commercial broiler flock in Peru -Page 74-



TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN

Desarrollo de una técnica molecular para la identificación de *Avibacterium paragallinarum*

Maturrano-Hernández L.^{1,2}, Chumbe-Mendoza A.¹, Requena-Anicama D.¹, García-D. I.¹, Tarazona-J. D.¹, Fernández-Díaz M.¹ - ¹ Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. ² Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.

Trabajo de investigación presentado en el XXII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias (PANVET 2010), Lima – Perú, 01 al 04 de setiembre del 2010.

INTRODUCCIÓN

Avibacterium paragallinarum es el agente causante de la coriza infecciosa, una infección aguda de las vías aéreas altas en aves. Puede llegar a causar grandes pérdidas económicas en la producción avícola sobre todo cuando se complica con otros agentes microbianos o factores estresantes.

Existen diversos métodos de identificación de *A. paragallinarum* que van desde los microbiológicos, bioquímicos y serológicos, hasta los moleculares basados en el análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

OBJETIVO

El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar una prueba de PCR que permita la rápida identificación de *A. paragallinarum*.

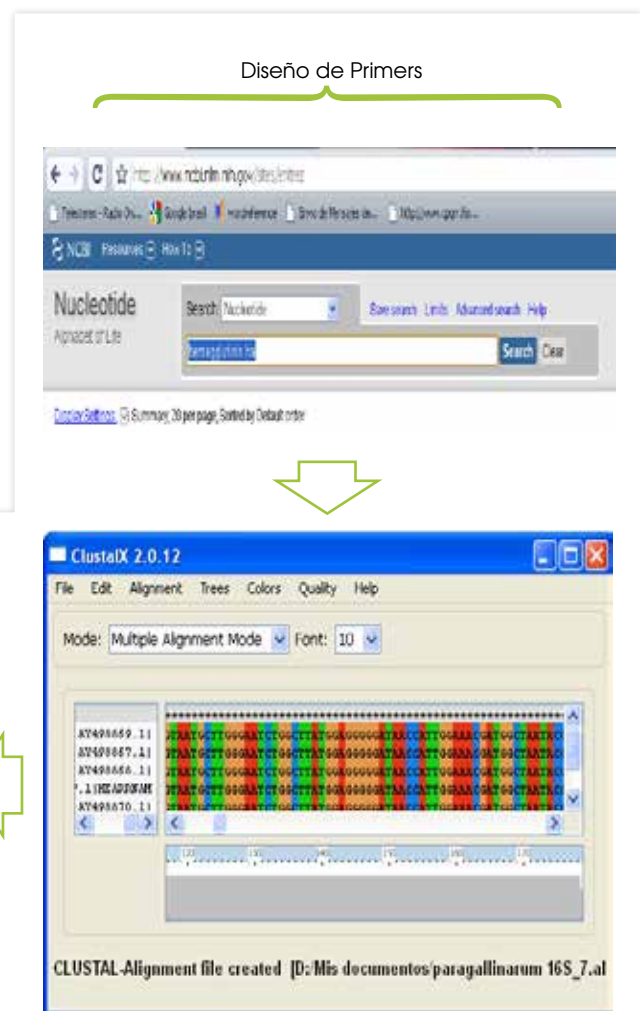


Figura 1. Esquema para el diseño de primers utilizado en el presente estudio

METODOLOGÍA

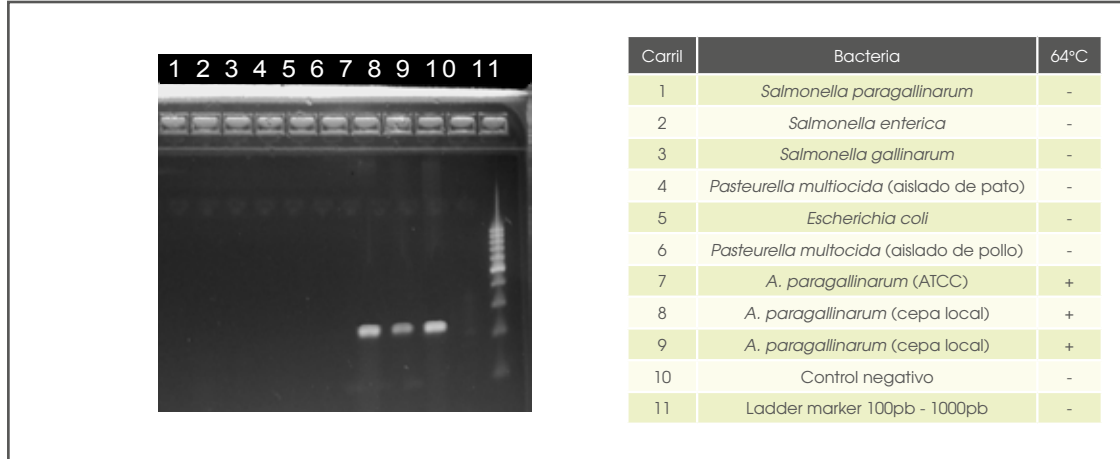


Figura 2. Ensayos de especificidad para la detección de *A. paragallinarum* frente a otros patógenos bacterianos de enfermedades relacionadas.

ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD

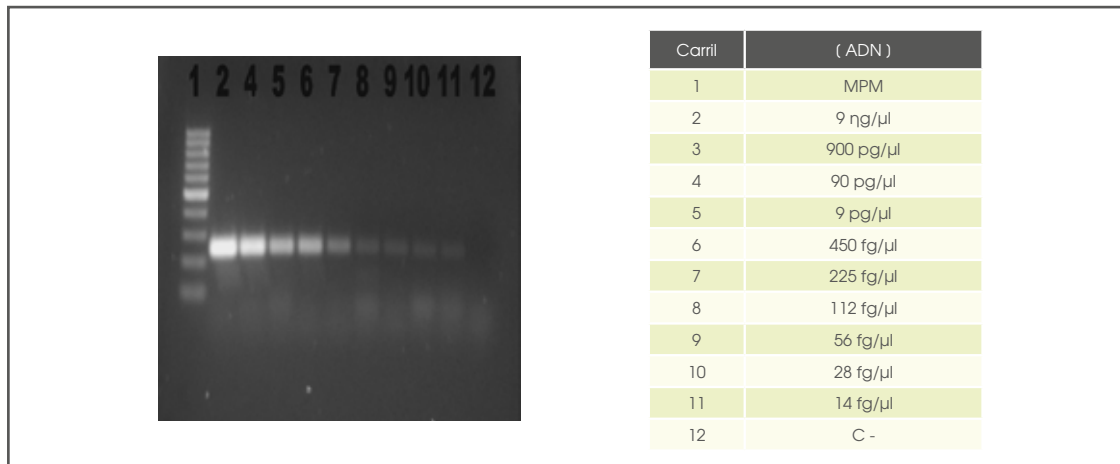


Figura 3. Ensayos de sensibilidad para la detección de ADN de *A. paragallinarum*

CONCLUSIONES

La técnica desarrollada permitió la detección e identificación de *A. paragallinarum*, mostró además ser altamente específica (100%) y sensible (capaz de detectar aproximadamente 5-10 células). El marcador molecular generado para la detección de *A. paragallinarum* mediante PCR es una buena alternativa, obteniéndose resultados certeros en pocas horas y podría ser empleado para la detección de dicho patógeno a partir de biopsias de aves infectadas.

PALABRAS CLAVE

Avibacterium paragallinarum, Identificación, PCR

Evaluación filogenética del gen Hemaglutinina de *Avibacterium paragallinarum* y su relación con la serotipificación

Maturrano-Hernández L.^{1,2}, Tarazona-J. D.¹, Chumbe-Mendoza A.¹, García-D. I.¹, Requena-Anicama D.¹, Fernández-Díaz M.¹ - ¹Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica – FARVET. ²Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos Perú.

Trabajo de investigación presentado en el XXII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias (PANVET 2010), Lima – Perú, 01 al 04 de setiembre del 2010.

INTRODUCCIÓN

Avibacterium paragallinarum es el agente causal de la coriza infecciosa, enfermedad que afecta el tracto respiratorio superior de los pollos. La enfermedad es considerada de importancia económica en varios países del mundo. Diferentes factores se han asociado con la patogenicidad de *A. paragallinarum* incluyendo cápsulas, lipopolisacáridos y hemaglutinina A (HA). Esta última ha sido considerada como el factor de virulencia más importante, debido a su participación en la adhesión al tejido. La identificación del patógeno incluye la serotipificación a través de dos esquemas: el esquema de Page mediante pruebas de aglutinación en placa permite identificar tres serovariedades designadas como A, B y C; y el esquema de Kume que mediante pruebas de inhibición de la hemaglutinación, identifica hasta siete hemoaglutininas (HA-1 a H-A7) distribuidos en tres serogrupos (I, II, III). En este trabajo se realizó un análisis filogenético de todas las secuencias de hemaglutininas disponibles en la base de datos a la fecha, con la finalidad de establecer la diversidad del gen y su relación con las serovariedades y/o serogrupos.

METODOLOGÍA

El análisis se realizó mediante alineamiento múltiple e inferencia bayesiana de 12 secuencias nucleotídicas del gen de hemaglutinina de la secuencia de *Avibacterium paragallinarum* aislada en Perú (Cepa

72) que fue obtenida por secuenciamiento con el 454 GS FLX Titanium. Se utilizó el modelo de sustitución nucleotídica HKY, tasa de variación gamma; 1'100,000 repeticiones y como outgroup se utilizó la secuencia del gen de hemaglutinina de *Pasteurella*.

RESULTADOS

Se observó que el árbol filogenético agrupó a las 12 secuencias en tres clados o grupos F1, F2 y F3. El clado F1 agrupó 5/12 cepas que comprenden los serovares A y C; el clado F2 agrupó 4/12 cepas correspondientes a los serovares A, B y C; y el clado F3 agrupó a 3/12 cepas correspondientes a los serovares A y C. Los resultados obtenidos nos muestran que existen 3 clados o grupos de genes HA en *A. paragallinarum* que no tienen relación con la serotipificación.

CONCLUSIONES

Se abre la posibilidad de utilizar una secuencia de HA de cada clado para desarrollar una vacuna que permita proteger contra los tres tipos de HA. Y que existen otras proteínas que pueden estar implicadas en las diferencias observadas por serotipificación y que estas son posibles obtenerlas conociendo el genoma completo de *Avibacterium paragallinarum*.

PALABRAS CLAVE

Avibacterium paragallinarum, Hemaglutinina, Filogenia, Serotipificación

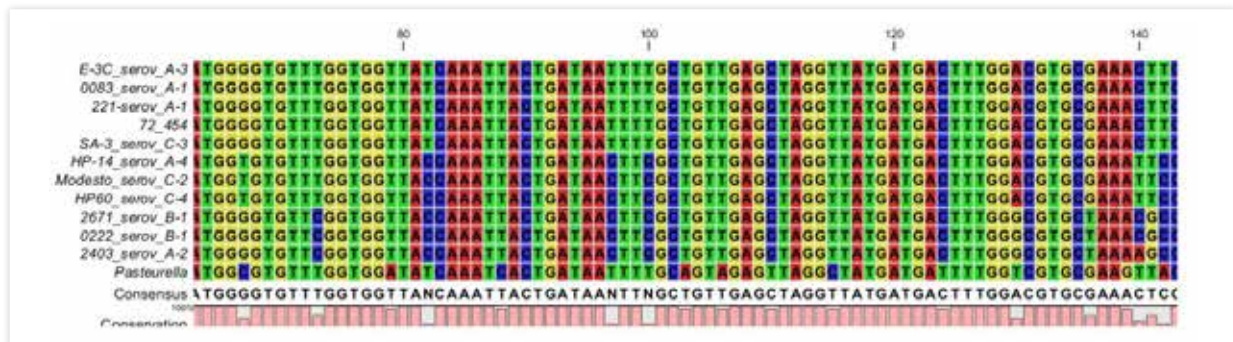


Figura 1. Alineamiento de secuencias nucleotídicas del gen de hemaglutinina de *A. paragallinarum*.

Evaluación de la proliferación y viabilidad celular por Citometría de Flujo en células Vero infectadas con metapneumovirus aviar (AMPV)

Medina-Corrales W.³, Best-Cuba I.³, Torriani-Medrano J.², Tataje-Lavanda L.¹, Saravia-Cahuana L.¹, Fernández-Sánchez M.¹, Fernández-Díaz M.^{1,2}.
¹Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. ²Laboratorio de Microbiología y Serología, FARVET. ³Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, FARVET.

Trabajo de investigación presentado en el X Congreso Latinoamericano de la Asociación de Inmunología ALAI (INMUNO PERÚ 2012), Lima – Perú, 31 de mayo del 2012 (Presentación oral).

INTRODUCCIÓN

Las células Vero son ampliamente utilizadas en la producción de vacunas virales dependientes de células. El objetivo de este estudio fue determinar el tiempo óptimo para la obtención de una mayor cantidad de células Vero infectadas con Metapneumovirus Aviar (AMPV) que presenten una aceptable viabilidad celular.

METODOLOGÍA

La proliferación y viabilidad celular fueron monitoreadas en cultivo celular durante 7 días mediante Citometría de Flujo utilizando los marcadores CellTrace Violet y 7-Aminoactinomicina D (7-AAD), respectivamente. El número de copias/μl de AMPV fue cuantificado por PCR en Tiempo Real.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que el día 6 post-infección es el tiempo óptimo para efectuar la cosecha celular de células Vero infectadas debido a que se observa un elevado número de copias/μl de AMPV, alto PI y una aceptable viabilidad celular.

PALABRAS CLAVE

Vacunas, cultivo celular, proliferación celular, viabilidad celular, citometría de flujo.

Tabla 1. Resultados obtenidos durante los 7 días post-infección.

	DÍAS POST-INFECCIÓN						
Índice de proliferación	1	2	3	4	5	6	7
(PI)	1.47	2.05	1.73	2.55	2.77	3.07	3.58
Viabilidad (%)	97.0	97.7	95.7	95.5	95.3	95.1	73.7
# copias AMPV/μl	5.3x10 ³	1.6x10 ⁵	4.4x10 ⁶	2.9x10 ⁷	2.3x10 ⁸	2.1x10 ⁹	6.9x10 ⁷

RESULTADOS

La proliferación celular evaluada como índice de proliferación (PI) se incrementó gradualmente desde el día 1 hasta el día 7 post-infección. Una viabilidad celular mayor al 95% fue observada durante los primeros 6 días, al séptimo día esta disminuyó al 73.7%. El mayor número de copias/μl de AMPV fue observado al día 5 post-infección.

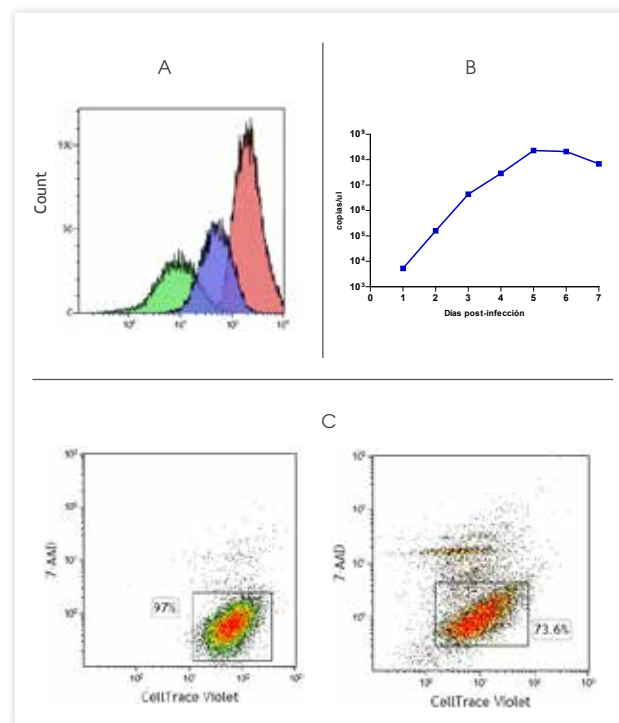


Tabla 1. Resultados obtenidos durante los 7 días post-infección. Figura 1. A. Proliferación celular: 0, 3 y 7 días post-infección; B. Niveles de AMPV en células vero; C. Viabilidad celular: 1 y 7 días post-infección.

Valores de referencia de linfocitos T y B por Citometría de Flujo para gallinas SPF y gallinas de postura comercial

Best-Cuba I.³, Medina-Corrales W.³, Alzamora-Pinao O.², Ticona-Claros T.¹, Fernández-Sánchez M.¹, Fernández-Díaz M.^{1,2}. ¹ Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. ² Laboratorio de Microbiología y Serología, FARVET. Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, FARVET.

Trabajo de investigación presentado en el X Congreso Latinoamericano de la Asociación de Inmunología ALAI (INMUNO PERÚ 2012), Lima – Perú, 31 de mayo del 2012 (Presentación oral).

INTRODUCCIÓN

Los linfocitos T y B participan en los mecanismos de defensa específicos frente a virus, bacterias, y otros agentes patógenos que atacan a aves durante su período productivo. El objetivo de este estudio fue comparar los niveles de linfocitos T y B entre 18 ponedoras SPF y 10 ponedoras comerciales, ambas de 23 semanas de edad, sin síntomas clínicos de enfermedad.

METODOLOGÍA

Los porcentajes de linfocitos T, sub-poblaciones T CD4⁺/CD8⁺ y linfocitos B fueron evaluados en células mononucleares de sangre periférica por Citometría de Flujo. La presencia de patógenos aviares comunes fue evaluada por ELISA.

RESULTADOS

Un incremento significativo en linfocitos T (mediana=89.38%) y subpoblación T CD4⁺ (mediana=52.31%) se observó en ponedoras comerciales respecto a linfocitos T (mediana=71.06%, P<0.05) y sub-población T CD4⁺ (mediana=39.50%, P<0.05) de ponedoras SPF. Una disminución significativa en linfocitos B y sub-población T CD8⁺ se observó en ponedoras comerciales respecto a linfocitos B y sub-población T CD8⁺ de ponedoras SPF (P<0.05). En este último grupo, no se detectó presencia de anticuerpos frente a patógenos comunes de aves, mientras que en ponedoras comerciales la titulación observada correspondió a una respuesta vacunal.

CONCLUSIÓN

Diferencias en la respuesta inmune celular entre ponedoras SPF y comerciales se debería al esquema de inmunización y/o exposición antigénica presentado por ponedoras comerciales.

PALABRAS CLAVE

Linfocitos T, linfocitos B, valores de referencia, gallinas de postura, citometría de flujo

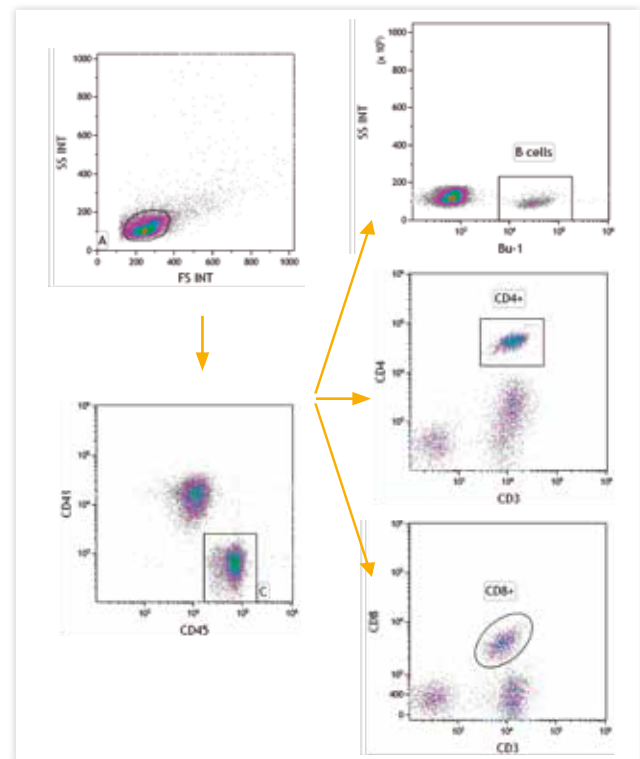


Figura 1. Estrategia de detección de linfocitos T y B por citometría de flujo.

Tabla 1. Niveles de linfocitos T y B en gallinas SPF y gallinas de postura comercial

	Gallinas SPF (n = 18)	Gallinas comerciales (n = 10)	P*
Células B (%)	24.93 (15.72)	7.64 (8.56)	0.000
Células T (%)	71.06 (14.45)	89.38 (7.93)	0.000
Células T CD4 ⁺ (%)	39.50 (9.55)	52.31 (14.22)	0.002
Células T CD8 ⁺ (%)	19.72 (8.55)	14.75 (6.78)	0.014

Citólisis de linfocitos B en gallinas libres de patógenos específicos (SPF) infectadas experimentalmente con adenovirus aviar serotipo 4 (AAV-4)

Medina-Corrales W.¹, Best-Cuba I.¹, Alzamora-Pinao O.², Choque-Moreau E.³, Fernández-Sánchez M.^{1,2,3}, Fernández-Díaz M.^{1,2,3}, ¹ Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, FARVET. ² Laboratorio de Microbiología y Serología, FARVET. ³ Laboratorio de Producción de Biológicos, FARVET.

Trabajo de investigación presentado en el XIII Congreso Nacional de Estudiantes de Biología - CONEBIOL, Ica – Perú, 28 de setiembre del 2012 (Presentación oral).

INTRODUCCIÓN

La infección por Adenovirus aviar (AAV) produce una enfermedad conocida como Hepatitis con Cuerpos de Inclusión (HCI), siendo el serotipo 4 (AAV-4) el más prevalente en el Perú. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la infección experimental con AAV-4 sobre los niveles de linfocitos B en bursa de Fabricio y sangre periférica de gallinas SPF.

METODOLOGÍA

Veintiún gallinas SPF de 12 semanas de edad fueron divididas en 2 grupos. El grupo I (n = 9) fue infectado con 6.25×10^9 copias de AAV-4 mientras que el grupo II (n = 12) correspondió al grupo control no infectado.

Los porcentajes de linfocitos B en bursa y sangre periférica fueron evaluados por Citometría de Flujo a los 2, 4 y 7 días post-infección (dpi), asimismo el peso de la bursa fue registrado durante todo el experimento.

RESULTADOS

Una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos B en bursa fue observada a los 4 dpi en el grupo infectado con AAV-4 (media=52.09%) comparado al grupo control (media=93.12%, $P < 0.05$). Del mismo modo, en sangre periférica, a los 4 dpi se observó una disminución de linfocitos B en el grupo infectado (media=4.63%) respecto al grupo control (media=13.67%) Coincidentemente, una disminución significativa en el peso de la bursa fue observada a los 2 y 4 dpi en el grupo infectado respecto al grupo control ($P < 0.05$).

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que la disminución en el porcentaje de linfocitos B en bursa de Fabricio y sangre periférica se debería al efecto linfo lítico producido por el AAV-4.

PALABRAS CLAVE

Adenovirus aviar serotipo 4, linfocitólisis, bursa de Fabricio, sangre periférica, gallinas

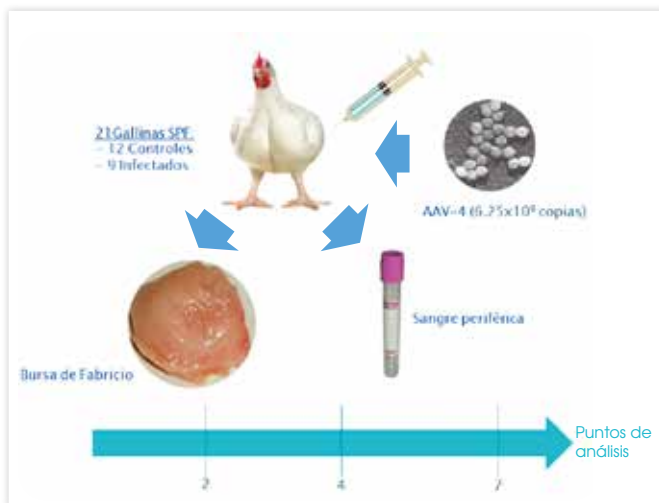


Figura 1. Diseño experimental.

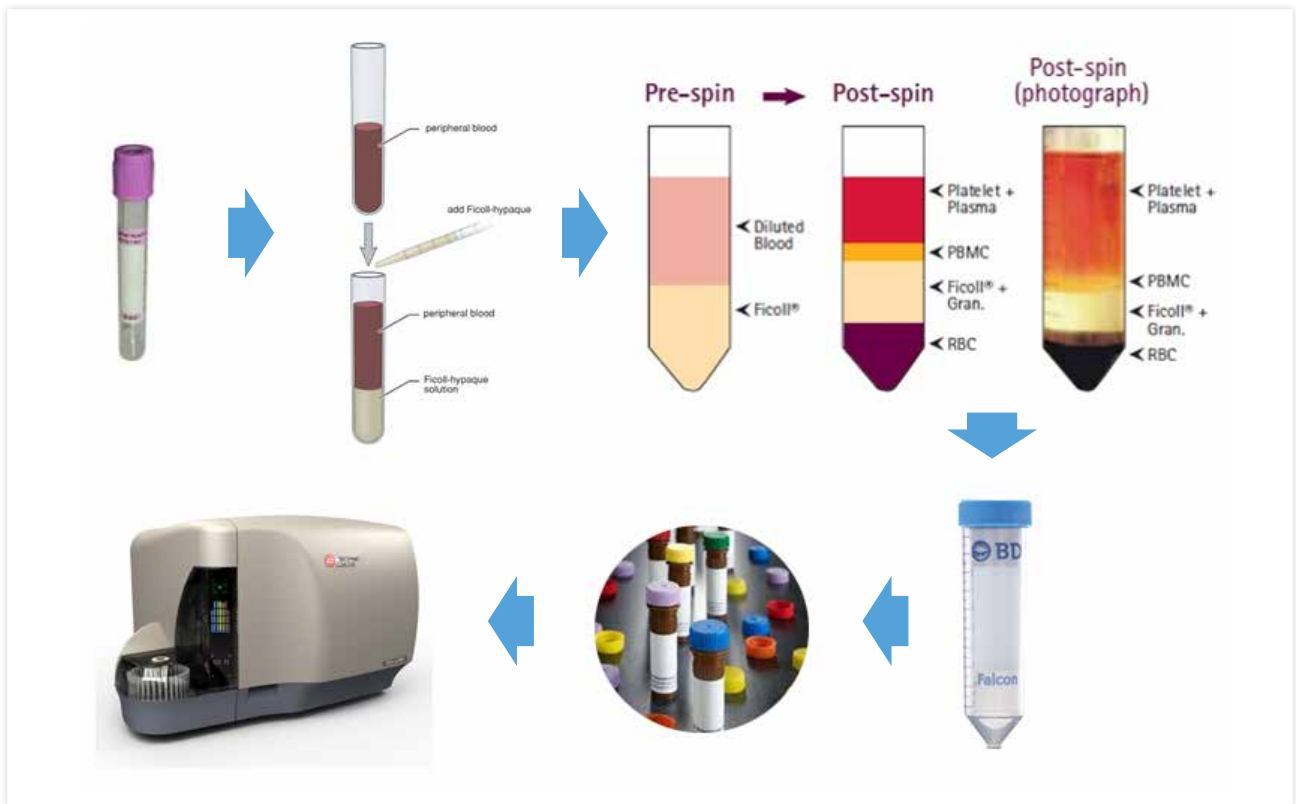


Figura 2. Células mononucleares de sangre periférica fueron obtenidas por gradiente de Ficoll, luego marcadas con anticuerpos específicos y detectados por citometría de flujo.

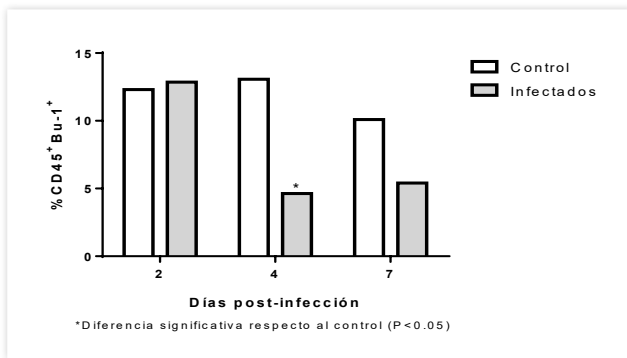


Figura 3. Niveles de linfocitos B en sangre periférica.

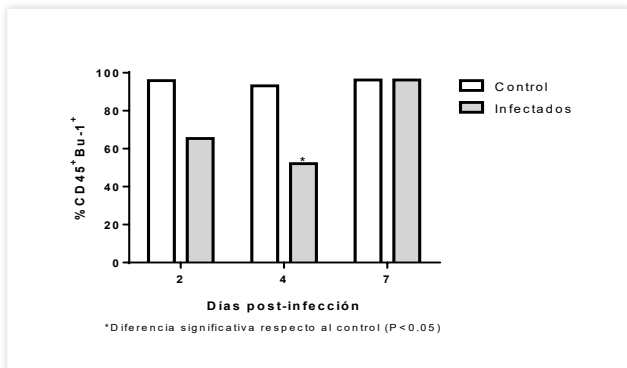


Figura 4. Niveles de linfocitos B en bursa de Fabricio



Figura 5. Bursas de pollos controles e infectados. Nótese en escala en la parte izquierda de ambas figuras.

Detección e identificación de virus ADN que infectan pollos utilizando multiplex TaqMan en PCR tiempo real

Morales-Ruiz S.¹, Bendezú-Eguis J.¹, Tataje-Lavanda L.¹, Requena-Anicama D.¹, Fernández-Díaz M.¹. ¹ Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET.

Trabajo de investigación presentado en el XXIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias (PANVET 2012), Cartagena de Indias – Colombia, 24 al 27 de octubre del 2012 (Presentación oral).

INTRODUCCIÓN

La producción avícola viene siendo afectada por la presencia de enfermedades virales que causan pérdidas económicas. Por lo que el desarrollo de técnicas que permitan una rápida detección e identificación de estos virus ADN en pollos es importante para prevenir la dispersión de estos. Real-Time PCR permite detectar y cuantificar moléculas de ADN. El uso de sondas TaqMan en PCR en tiempo real incrementan la sensibilidad de la amplificación de ADN, permitiendo un mejor y exacto diagnóstico que el PCR en tiempo real basado en Sybr Green. Un multiplex TaqMan PCR en tiempo real fue desarrollado y esto permitió un rápido análisis e identificación de múltiples virus ADN.

METODOLOGÍA

En este estudio 5 virus que afectan pollos fueron divididos en dos multiplex sets. Cada Multiplex set (MS) incluían primers y sondas específicos para la amplificación y detección de secuencias específicas de virus. MS-I detectó: MDV (MV094), EDS (ORF 1-hp) y FPV (4b); mientras MS-II: CAV (Vp 2), HVT (gp I) (Vacunas) y ILTV (gp B). Estas secuencias fueron determinadas por comparación genómica utilizando la base de datos de GenBank y los sets de multiplex fueron diseñados utilizando los programas PrimerBlast, NetPrimer y AlleleID. Los productos amplificados de PCR fueron secuenciados para verificar la correcta

identidad de los productos de PCR.

RESULTADOS

Para evaluar la sensibilidad y cuantificar los ADN blancos, los productos de PCR fueron clonados y luego diluidos en series de 10. La menor detección para la reacción de múltiplex fue: para MS-I: MDV (84.5 genomas), FPV (4.9 genomas) y EDS (43.95 genomas). Y para MS- II: CAV (630 genomas), ILTV (10 genomas) y HVT (8.75 genomas). Con el objetivo de validar cada set de multiplex, la sensibilidad (S) y especificidad (Sp) fueron calculadas utilizando muestras de ADN extraídas y analizadas durante los años 2008 – 2012 utilizando PCR en tiempo real con SybrGreen. 107 muestras fueron analizadas para MS-I. La S y Sp fueron 94.32% y 92.10% respectivamente. Para MS-II, 82 muestras fueron evaluadas. La S y Sp fueron 85.37% and 97.56% respectivamente.

CONCLUSIÓN

Este estudio demuestra la aplicación de Multiplex TaqMan en PCR tiempo real como una herramienta útil - eficaz para la detección rápida y simultánea de diferentes tipos de virus de ADN en pollos infectados.

PALABRAS CLAVE

Enfermedades virales aviares, sensibilidad, especificidad, Multiplex Real-Time TaqMan PCR.

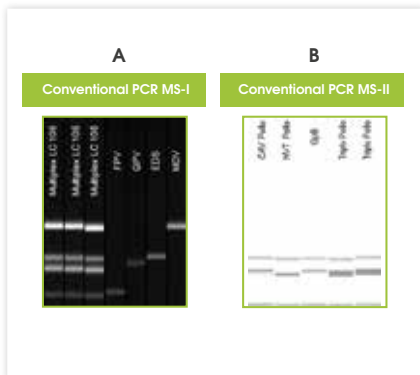


Figura 1. Detección por PCR convencional de virus DNA: A. Sistema MS-1 (MDV, EDS, FPV); B. Sistema MS-2 (CAV, HVT, LTV).

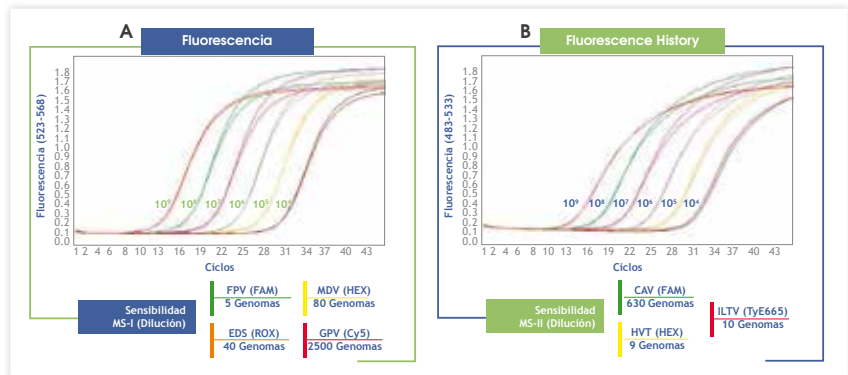


Figura 2. Curvas de sensibilidad por PCR en tiempo real para la detección de Virus ADN: A. Sistema MS-1 (MDV, EDS, FPV); B. Sistema MS-2 (CAV, HVT, ILTV).

Expresión soluble de la glicoproteína Espícula del virus de bronquitis infecciosa aviar usando el sistema de expresión de Baculovirus

Izquierdo-Lara R.¹, Chumbe-Mendoza A.¹, Tataje-Lavanda L.¹, Vakharia V.², Fernández-Sánchez M.¹. ¹ Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. ² Department of Marine Biotechnology – University of Maryland.

Trabajo de investigación presentado en el XXIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias (PANVET 2012), Cartagena de Indias – Colombia, 24 al 27 de octubre del 2012 (Presentación oral).

INTRODUCCIÓN

Las vacunas producidas en huevo contra la bronquitis infecciosa aviar (BIA) no son siempre efectivas y causan efectos indeseados dentro de poblaciones de aves vacunadas, por lo que surgen como alternativa las vacunas basadas en proteínas recombinantes. La glicoproteína espícula (S) ha sido reportada como una de las proteínas más protectivas contra bronquitis. Nativamente, S es homotrimérica y su dominio extracelular se compone de dos subdominios (S1 y S2) que probablemente contienen epítopes, que estimulen efectivamente el sistema inmune del ave.

OBJETIVO

Expresar solublemente el dominio extracelular completo de la glicoproteína S de bronquitis, para posteriormente usarla como vacuna y para diagnóstico.

METODOLOGÍA

Usando el sistema de expresión de baculovirus hemos generado una glicoproteína S soluble, derivada de la cepa Mass41 de bronquitis, modificada en el C-terminal con la secuencia de trimerización ("foldon") de la fibritina proveniente del bacteriófago T4 para estabilizar la triple hélice. Para lograr esto, se amplificó por PCR el dominio extracelular de S. Los primers forward y reverse contenían en sus extremos 5' sitios de restricción para BamHI y NheI, respectivamente, para ser clonado en un pAcGP67A (BD Bioscience), provisto por el Dr. Vikram Vakharia, el cual contenía el sitio de corte de la trombina, el "foldon" y 6x His-tag en su extremo 3'. La transfección y

obtención de baculovirus recombinante fue realizada según instrucciones del fabricante. Grandes stocks de virus fueron obtenidos inoculando células SF9 al 50% de confluencia, con MOI (multiplicidad de infección) menor a 0.2 durante cuatro días, luego se concentró el virus del sobrenadante por ultracentrifugación y fue resuspendido en PBS. La expresión soluble de la proteína se realizó en medio libre de suero y fue comprobada por Western Blot.

RESULTADOS

La expresión de S en medio libre de suero fue exitosamente identificada por una reacción positiva al cromógeno HRP de un anticuerpo monoclonal anti His-tag y a suero de pollo específico anti-bronquitis, que se visualizó como una banda de alrededor de 180kDa.

CONCLUSIONES

En trabajos anteriores se ha expresado S1, sin embargo este es el primer estudio donde se expresan ambos subdominios extracelulares (S1 y S2) lo que puede extrapolarse para cepas altamente virulentas. Estudios recientes en influenza, VIH y otros virus muestran que muchas veces mantener la conformación tridimensional de las proteínas confiere alta protección inmunológica, lo que podrá ser probado para bronquitis a partir de este trabajo.

PALABRAS CLAVE

Glicoproteína Espícula, Virus de Bronquitis infecciosa, Baculovirus

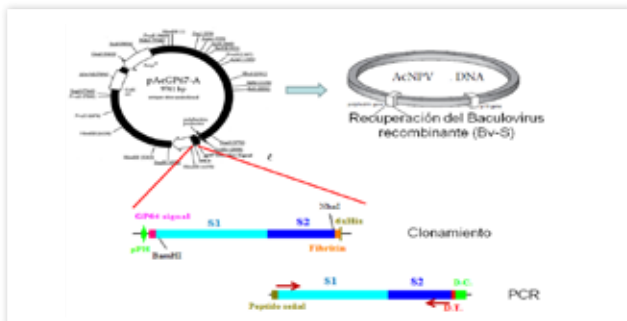


Figura 1. Construcción de Bv-S. Construcción del vector recombinante con el inserto de la glicoproteína S del virus de bronquitis.

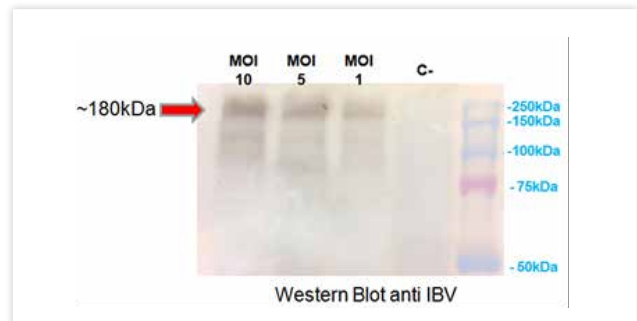


Figura 2. Expresión de la proteína. Detección de la proteína S mediante Western Blot.

Presencia de las especies C, D y E de Fowl adenovirus (FAdV) en el Perú identificadas por PCR-RFLP y filogenias moleculares durante el periodo 2009-2011

Chumbe-Mendoza A.¹, Tataje-Lavanda L.¹, Izquierdo-Lara R.¹, Best-Cuba I.², Saravia-Cahuana L.¹, Zavaleta-Apéstegui M.¹, Fernández-Díaz M.¹.
¹Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. ²Laboratorio de Microbiología y Serología, FARVET. ³Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, FARVET.

Trabajo de investigación presentado en el XXIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias (PANVET 2012), Cartagena de Indias – Colombia, 24 al 27 de octubre del 2012.

INTRODUCCIÓN

El género Aviadenvirus (FAdV) ha sido dividido en 5 especies en base a estudios a nivel molecular y subdividido en base a ensayos de neutralización cruzada en 12 serotipos (1 al 7, 8a, 8b y del 9 al 11) según el comité Internacional de taxonomía de virus (ICTV).

Los adenovirus son ubicuos en los pollos y han sido aislados en aves clínicamente enfermas y sanas. Sin embargo, pueden ser el responsable de considerables pérdidas económicas, con una mortalidad de hasta el 80% en caso de presentarse Síndrome de Hidropericardio (SHP) y hasta 30% en caso de Hepatitis a cuerpos de Inclusión (HCI), según la organización mundial de sanidad animal (OIE).

En el Perú, durante los años 2009-2010, FAdV ocasionó pérdidas mínimas en la industria avícola; sin embargo, en el 2011 se dieron diversos brotes de HCI y/o SHP

con tasas de mortalidad de hasta 50% en diferentes zonas del Perú. En los casos más severos las vacunas utilizadas, si bien protegían, no eran del todo efectivas, lo que hizo sospechar que podrían existir más de una especie de FAdV involucrada.

Con la finalidad de determinar las especies de FAdV presentes en el Perú, se implementó el método desarrollado por Meulemans G., et al 2001 que identifica serotipos de FAdV por medio de la técnica de PCR-RFLP para la región del loop L1 del hexon. En los casos en los que el PCR-RFLP no fue concluyente, se realizó un árbol filogenético basado en la secuencia nucleotídica de esta misma región.

METODOLOGÍA

Se evaluaron 20 biopsias de granjas que presentaban síntomas de HCI y/o SHP: 2 muestras del 2009, 2 muestras del 2010 y 16 muestras del 2011 de diferentes zonas del Perú.



Figura 1. Flujograma de trabajo. Detección y tipificación de especies: A. Extracción de ADN; B. PCR-RFLP. Muestras indeterminadas; C. Clonación en plásmido comercial; D. Secuenciación; E. Alineación de secuencias; F. Construcción de filogenia molecular.

RESULTADOS:

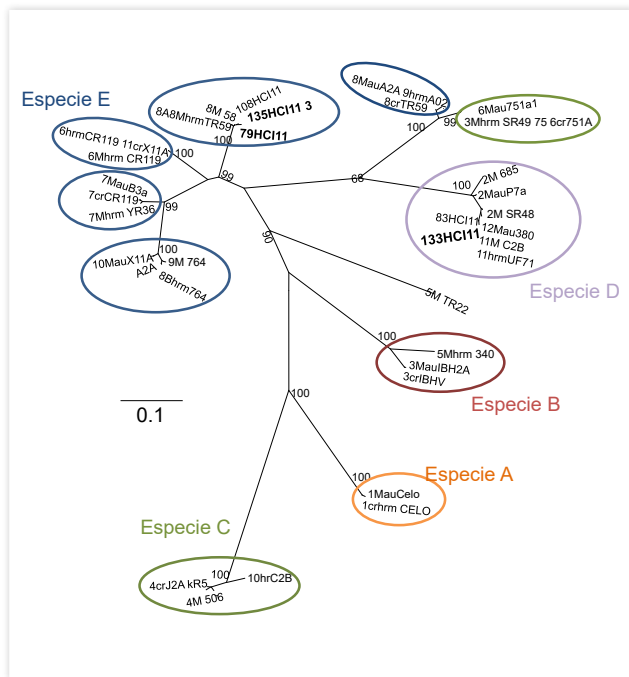


Figura 2. Filogenia Inferida usando el método Neighbor-Joining, en el programa MEGA 5.0

CONCLUSIONES

En base al árbol filogenético, se encontró a dos muestras incluidas en el cluster del serotipo 8a, que corresponde a la especie E. Otra muestra cercanamente relacionada al cluster del serotipo 11 (Especie D). Las restantes 17 muestras correspondieron al serotipo 4 (Especie C), según los análisis de PCR-RFLP. El hallazgo de las especies D y E, únicamente en el 2011 indica que estas han sido introducidas al Perú recientemente.

El método de PCR-RFLP propuesto por Meulemans G. et al., 2001 si bien logró asignar serotipos en el 85% de los casos, no fue del todo efectivo.

Probablemente, son necesarias analizar mutaciones puntuales (detectables únicamente por secuenciamiento) para poder conocer claramente la especie de FadV involucrada.

La identificación de los serotipos circulantes sirve de base para replantear los planes de vacunación y producir vacunas que controlen oportunamente el SHP y HCl.

PALABRAS CLAVE

Fowl adenovirus, PCR-RFLP, Filogenia

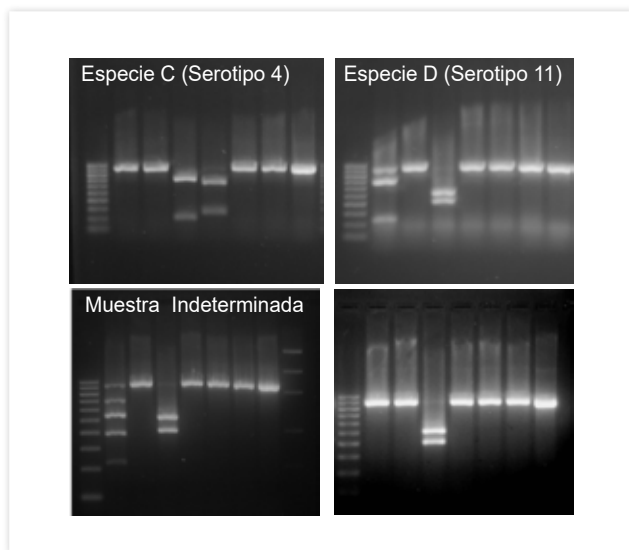


Figura 3. Patrón de Digestión con enzimas de restricción. En la figura se muestra el patrón de digestión enzimática de las muestras aisladas en Perú durante los años 2009 y 2011. En la parte superior izquierda se muestra el patrón de un serotipo 4; en la parte superior derecha se muestra una muestra serotipo 11; abajo a la izquierda se muestra una muestra indeterminada; y abajo a la derecha se muestra una muestra serotipo 8a.

Tabla 1. Muestras involucradas en el presente estudio

Año	Cantidad	Especie (Serotipo Asignado)
2009	2	C (Serotipo 4)
2010	2	C (Serotipo 4)
2011	13	C (Serotipo 4)
	2 (135HCl y 79HCl11)	E (Serotipo 8a)
	1 (133HCl11)	D (Serotipo 11)

Evaluación de la carga viral, viabilidad celular y apoptosis en células DF-1 infectadas con el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) utilizando fluido alantoideo de huevos embrionados de pollo como suplemento de cultivo

Torriani-Medrano J.¹, Best-Cuba I.², Medina-Corrales W.², Tataje-Lavanda L.¹, Pauyac-Antezana K.¹, Choque-Moreau L.¹, Fernández-Sánchez M.^{1,2,3}, Fernández-Díaz M.^{1,2,3}. ¹ Laboratorio de Cultivo Celular y Virología, FARVET. ² Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, FARVET. ³ Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET.

Trabajo de investigación presentado en el V Simposio Latinoamericano de Tecnología de Cultivos Celulares (V SLATCC), Santa Fe – Argentina; 25 al 27 de octubre del 2012 (Presentación oral).

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle (NDV) es una de las enfermedades más contagiosas y devastadoras en avicultura. Comúnmente, las vacunas para NDV se producen en huevos embrionados de pollo, un método que tiene la desventaja de ser laborioso y utilizar grandes cantidades de este material. Una alternativa es utilizar líneas celulares, las cuales permiten una producción más rápida y a gran escala

de antígenos virales. Durante la infección con NDV, se ha descrito que la suplementación con fluido alantoideo favorece la infectividad y patogenicidad del virus.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación con fluido alantoideo sobre el tiempo óptimo para realizar la cosecha de antígeno viral.

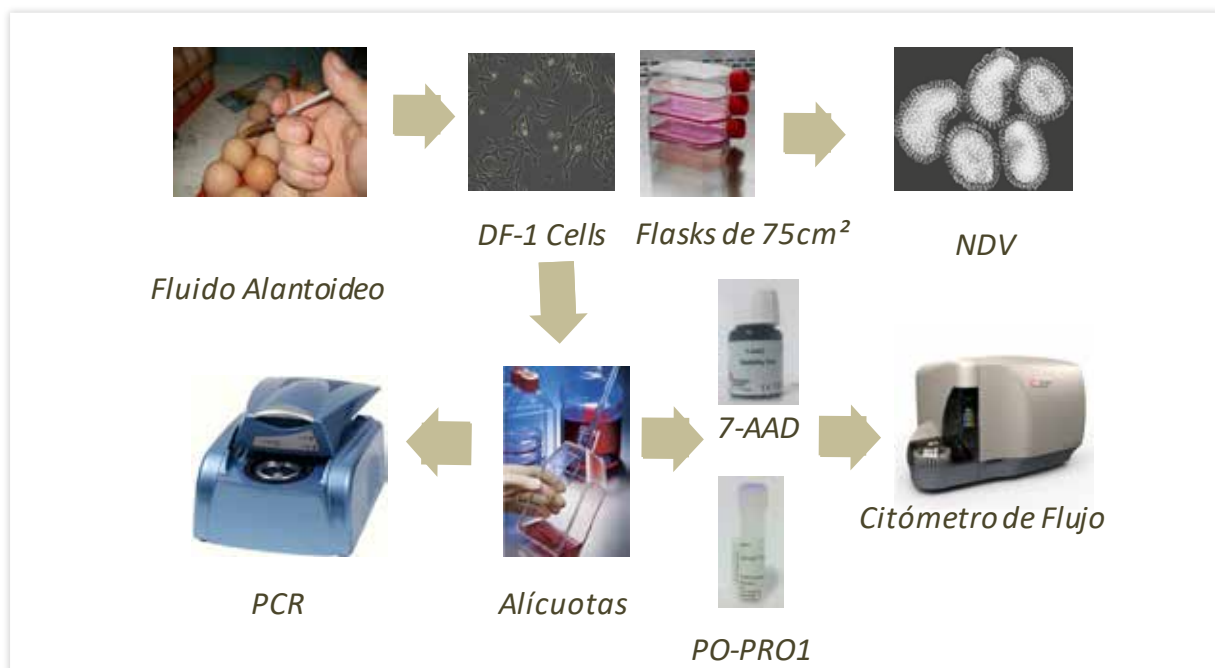


Figura 1. Flujo de trabajo

METODOLOGÍA

La producción de antígeno fue monitoreada durante 7 días en 2 grupos de células DF-1 infectadas con un NDV lentogénico a una multiplicidad de infección (MOI) de 3.5. El grupo I fue suplementado con fluido alantoideo al 3.5%, mientras que el grupo II no recibió suplementación. El número de copias/ μ l de NDV fue cuantificado por PCR en Tiempo Real. La viabilidad celular y apoptosis fueron evaluadas en porcentaje por Citometría de Flujo utilizando 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) y PO-PRO-1, respectivamente.

RESULTADOS

Desde el día 3 post-infección la viabilidad celular disminuyó progresivamente en el grupo I (67.1%) obteniéndose una disminución máxima de viabilidad en el día 6 post-infección (19.0%). La mínima viabilidad celular obtenida en el grupo II fue de

43.1%. Coincidentemente, en el día 3 post-infección se obtuvo la mayor carga de antígeno viral (4.13×10^7 copias/ μ l) en el grupo I, mientras que en el grupo II el pico más alto de carga viral (4.19×10^7 copias/ μ l) fue observado al día 5 post-infección. No se observaron mayores diferencias en la inducción de apoptosis entre el grupo I y II.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que la suplementación con fluido alantoideo favorece la infectividad del NDV y disminuye el tiempo óptimo para realizar la cosecha celular al día 3 post-infección.

PALABRAS CLAVE

Células DF-1, Virus de la enfermedad de Newcastle, Fluido alantoideo

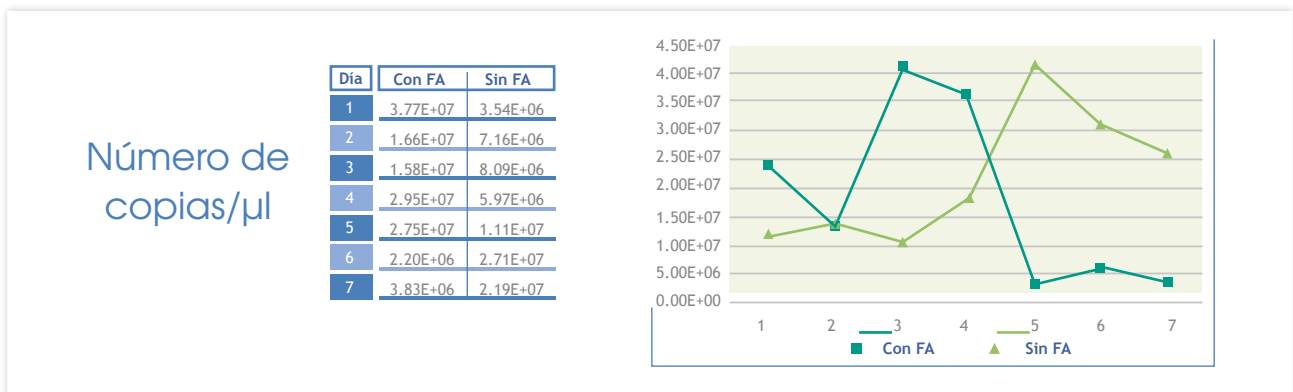


Figura 2. Evaluación de la presencia del fluido alantoideo en células DF-1 infectadas con el virus de Newcastle.

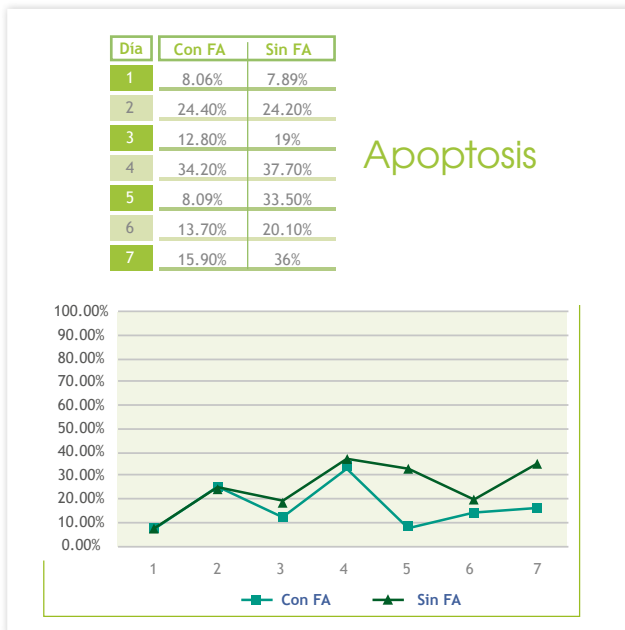


Figura 3. Evaluación de apoptosis en celular DF-1 infectadas con el virus de Newcastle en presencia y ausencia de fluido alantoideo.

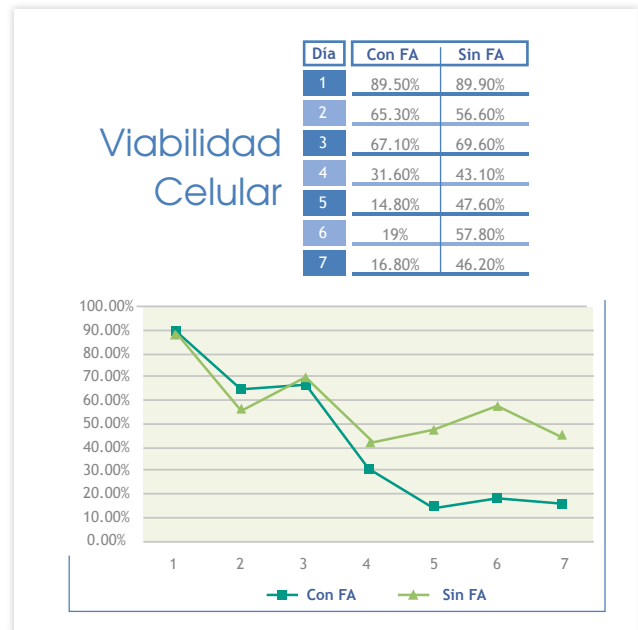


Figura 4. Evaluación de la viabilidad celular en células DF-1 infectadas con el virus de Newcastle en presencia y ausencia de fluido alantoideo.

Adenovirus aviar serotipo 4 induce apoptosis en células esplénicas mononucleares de gallinas libres de patógenos específicos (SPF)

Medina-Corrales W.¹, Best-Cuba I.¹, Choque-Moreau E.², Fernández-Díaz M.^{1,2}. ¹ Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, FARVET. ² Laboratorio de Producción de Biológicos, FARVET.

Trabajo de investigación presentado en el VII Seminario Internacional AMEVEA 2013, Lima – Perú, 26 al 28 de junio del 2013.

INTRODUCCIÓN

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada y puede ser inducida o inhibida por virus. La infección por Adenovirus aviar resulta en la enfermedad conocida como Hepatitis con Cuerpos de Inclusión siendo el serotipo 4 (FAdV-4) el agente etiológico del Síndrome del Hidropericardio. El objetivo de este estudio fue determinar apoptosis inducida por FAdV-4 en células esplénicas mononucleares (CEM) de gallinas libres de patógenos específicos (SPF).

METODOLOGÍA

Sesenta gallinas SPF Hy-line de 12 semanas de edad fueron divididas en tres grupos. El grupo I (n=20) fue infectado con FAdV-4 virulento; el grupo II (n=20) fue vacunado con una cepa inactivada de FAdV y posteriormente infectado con el virus virulento y el grupo III (n=20) sirvió de control negativo. Los análisis fueron realizados a los 0, 2, 4 y 7 días post-infección (dpi) por citometría de flujo usando los marcadores PO-PRO-1 y 7-Aminoactinomicina D. La prueba de Mann Whitney fue utilizada considerando significancia estadística cuando el P<0.05.

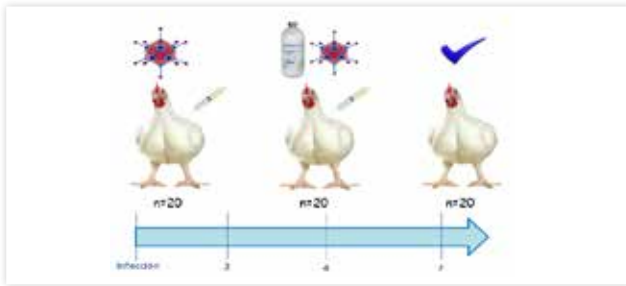


Figura 1. Diseño experimental

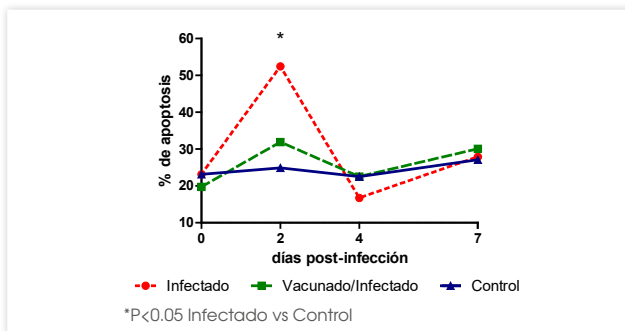


Figura 2. Resultados del análisis de apoptosis por citometría de flujo de CEM en representación gráfica. Los símbolos representan la mediana de cada grupo en cada punto de análisis.

RESULTADOS

Un aumento significativo de CEM en estado de apoptosis fue observado a los 2 dpi en el grupo infectado con FAdV-4 (mediana=52.42%) respecto al grupo control (mediana=24.89%). El grupo II vacunado/infectado no mostró significancia estadística respecto al grupo control en ningún punto del estudio.

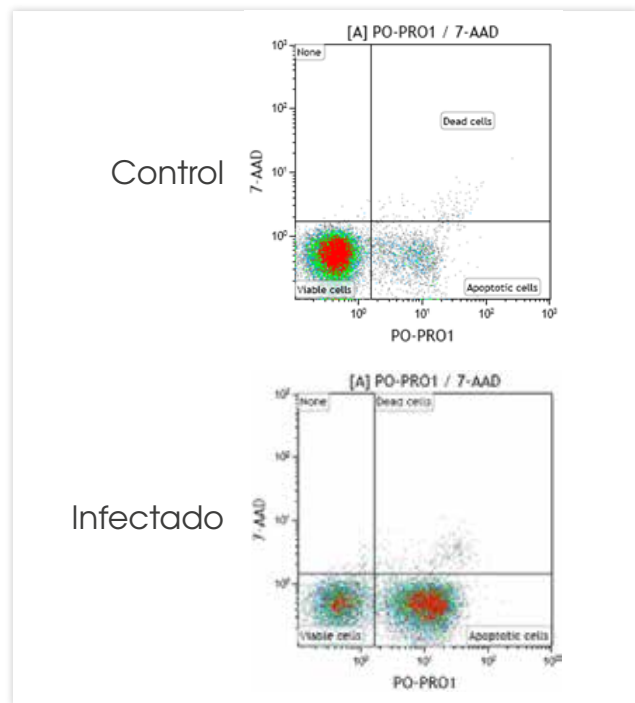


Figura 3. Gráficos de citometría de flujo de muestras representativas de los grupos control e infectadas.


CONCLUSIONES

La alta apoptosis en CEM se debería al mecanismo de defensa indirecto inducido por el FAdV-4 para evitar su destrucción. Tal efecto sería contrarrestado por una previa inmunización.

PALABRAS CLAVE

Adenovirus aviar serotipo 4, apoptosis, inmunosupresión, gallinas SPF, citometría de flujo



 Solución científica para la salud animal

Empleo de proteínas multiepitópicas recombinantes para el diagnóstico del Adenovirus aviar tipo I

Falconi-Agapito F.¹, Requena-Anicama D.^{2,4}, Ramírez-Sáenz M.^{2,4}, Valdivia-Olarte H.^{2,4}, Saravia-Cahuana L.³, Zímic-Peralta M.^{2,4}, Fernández-Díaz M.^{1,2,3}
¹ Laboratorio de Microbiología y Serología, FARVET. ² Laboratorio de Bioinformática, FARVET. ³ Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. ⁴ Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruano Cayetano Heredia.

Trabajo de investigación presentado en el VII Seminario Internacional AMEVEA 2013, V Encuentro Científico y V Expo AMEVEA, Lima – Perú, 26 al 28 de junio del 2013 (Presentación Oral).

INTRODUCCIÓN

La hepatitis con cuerpos de inclusión es una enfermedad que tiene como agente causal al Adenovirus aviar tipo I (FA_{AdV}) que afecta principalmente pollos de engorde y se caracteriza por presentar una elevada mortalidad.

En el presente estudio se evaluó el valor diagnóstico de tres proteínas multiepitópicas recombinantes en una prueba de ELISA para FA_{AdV} serotipo 4. Para ello, se realizó un análisis inmunoinformático de genomas completos de FA_{AdV}-4 empleando los servidores

NetMHCcons y NetMHCIIpan, prediciendo in silico epítopos T lineales conservados e inmunodominantes, potencialmente reactivos al MHC-I y MHC-II de pollo. Con estos epítopos, se construyeron tres genes sintéticos que codificaron a proteínas multiepitópicas, designadas como ISB, IISB y IWB.

Las proteínas fueron expresadas en *E. coli*, purificadas por resina de níquel y cuantificadas para su evaluación en una prueba de ELISA como antígenos de captura.

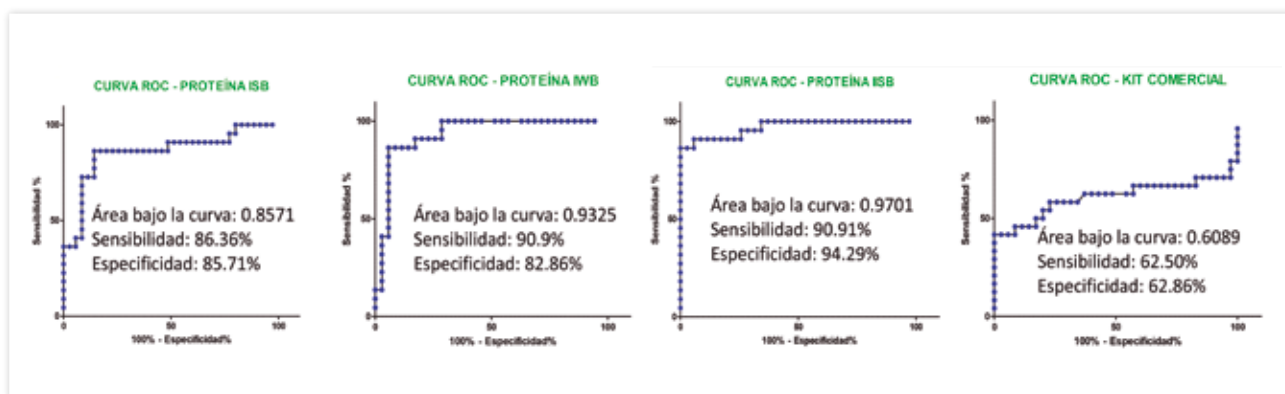


Figura 1. Curvas ROC (características operativas del receptor). A: Curva ROC de ISB, B: Curva ROC de IWB, C: Curva ROC de IISB, D: Curva ROC de Kit comercial. a: área bajo la curva ROC, b: sensibilidad; c: especificidad.

METODOLOGÍA

Se emplearon sueros positivos de aves SPF Hy-line infectadas experimentalmente con FAdV-4; así como sueros negativos de aves SPF y sueros de aves de Charles River positivos a patógenos aviarios distintos de FAdV-4. Los resultados fueron comparados con un kit comercial de ELISA.

Tabla 1. Características de las proteínas multiépítópicas evaluadas

Proteína	Epitope	Peso molecular
ISB	MHC-I	16 kDa
IISB	MHC-II	18 kDa
IWB	MHC-I	15.7 kDa

RESULTADOS

El valor diagnóstico de cada antígeno fue estimado en base a la curva ROC (Receiver Operating Curve). Las áreas bajo la curva fueron 0.8571, 0.9701, 0.9325 y 0.6089, para ISB, IISB, IWB y el kit comercial, respectivamente. Los valores de cut-off de 0.58, 0.381, 0.428 y 0.4028; con estimados de sensibilidad y especificidad para ISB, IISB, IWB y el kit comercial de 86.36 y 85.71%; 90.91 y 94.29%; 90.9% y 82.86%; y 62.50 y 62.86%, respectivamente.

CONCLUSIÓN

Según estos resultados, la proteína IISB es la mejor candidata como una futura herramienta de diagnóstico; resultados consistentes con el hecho que IISB está constituida por los mejores epítopes MHC-II identificados y asociados a una respuesta de anticuerpos.

PALABRAS CLAVE

Adenovirus aviar, epítopes inmunodominantes, curva ROC.

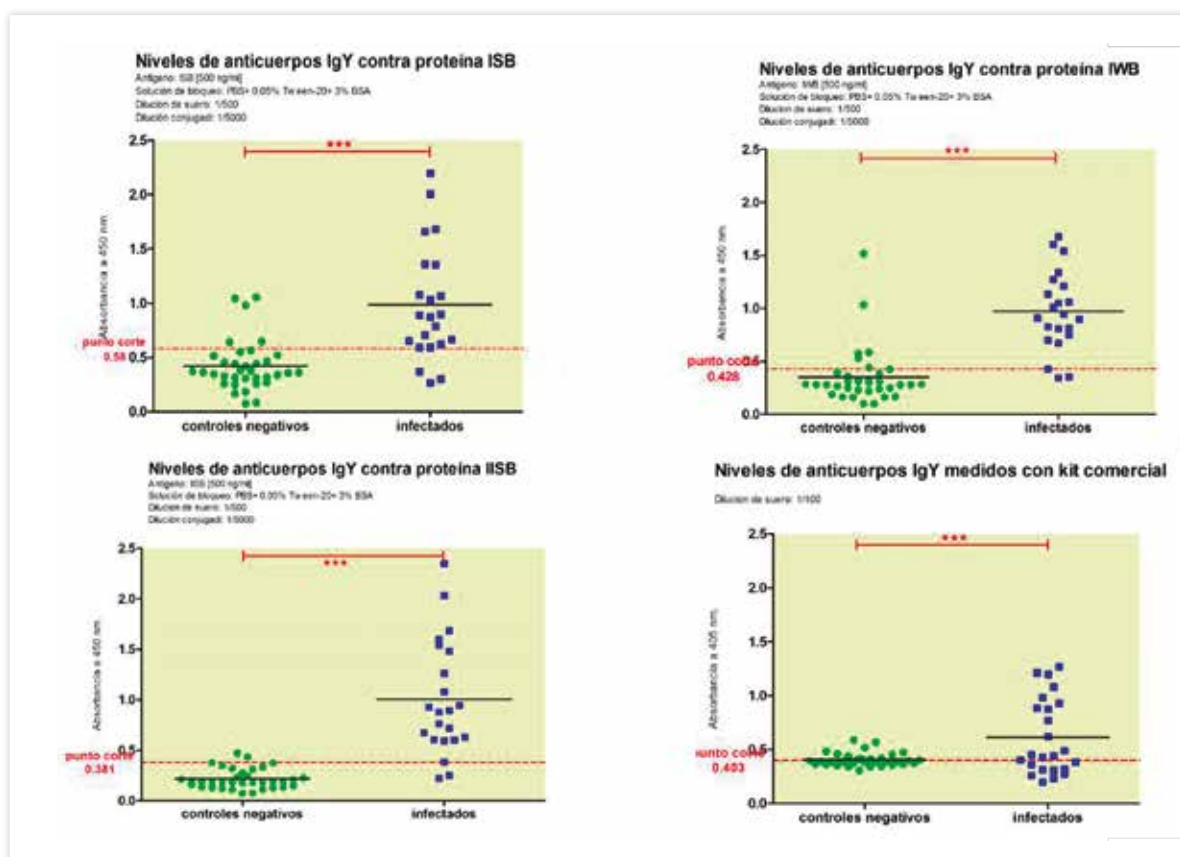


Figura 2. Niveles de IgY específicos contra las proteínas multiépítópicas (A: ISB; B: IWB; C: IISB; D: Kit comercial) evaluadas en individuos control negativos (n=35) e individuos infectados (n=22) con AVA. Cada punto representa un sujeto. Líneas negras horizontales representan la mediana y las líneas punteadas rojas el punto de corte. Prueba no paramétrica Mann-Whitney U; se asignó un $p < 0.05$ para la significancia estadística; ***: $p < 0.0001$.

Dinámica de células T y B entre órganos linfoides durante la infección experimental de gallinas libres de patógenos específicos (SPF) con el Adenovirus aviar (FAdV) serotipo 4

Best-Cuba I.¹, Medina-Corrales W.¹, Choque-Moreau E.², Fernández-Sánchez M.^{1,2}, Fernández-Díaz M.^{1,2}. ¹Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, FARVET. ²Laboratorio de Producción de Biológicos, FARVET.

Trabajo de investigación presentado en el 15th International Congress of Immunology, Milan – Italy, 22 al 27 de agosto del 2013 (Travel Grant otorgado por la American Association of Immunologists – AAI).

INTRODUCCIÓN

El Adenovirus aviar serotipo 4 (FAdV-4) está involucrado en la etiología de la Hepatitis con cuerpos de inclusión, una enfermedad que causa significativas pérdidas económicas en la industria avícola. El objetivo de este estudio fue evaluar los cambios dinámicos que ocurren en las sub-poblaciones de células CD3+, CD4+, CD8+ y linfocitos B entre órganos linfoides después de la infección experimental con FAdV-4.

METODOLOGÍA

Treinta y cinco gallinas SPF de 12 semanas de edad fueron divididas en 2 grupos: Grupo 1 (n=19) fue infectado con 6.25×10^9 copias de FAdV-4 mientras que el grupo 2 (n=16) correspondió al grupo control no infectado. Los porcentajes de células CD3+, CD4+, CD8+ y linfocitos B en bazo, timo, bursa y sangre periférica fueron medidos mediante Citometría de Flujo a los 2, 4 y 7 días post-infección (dpi).

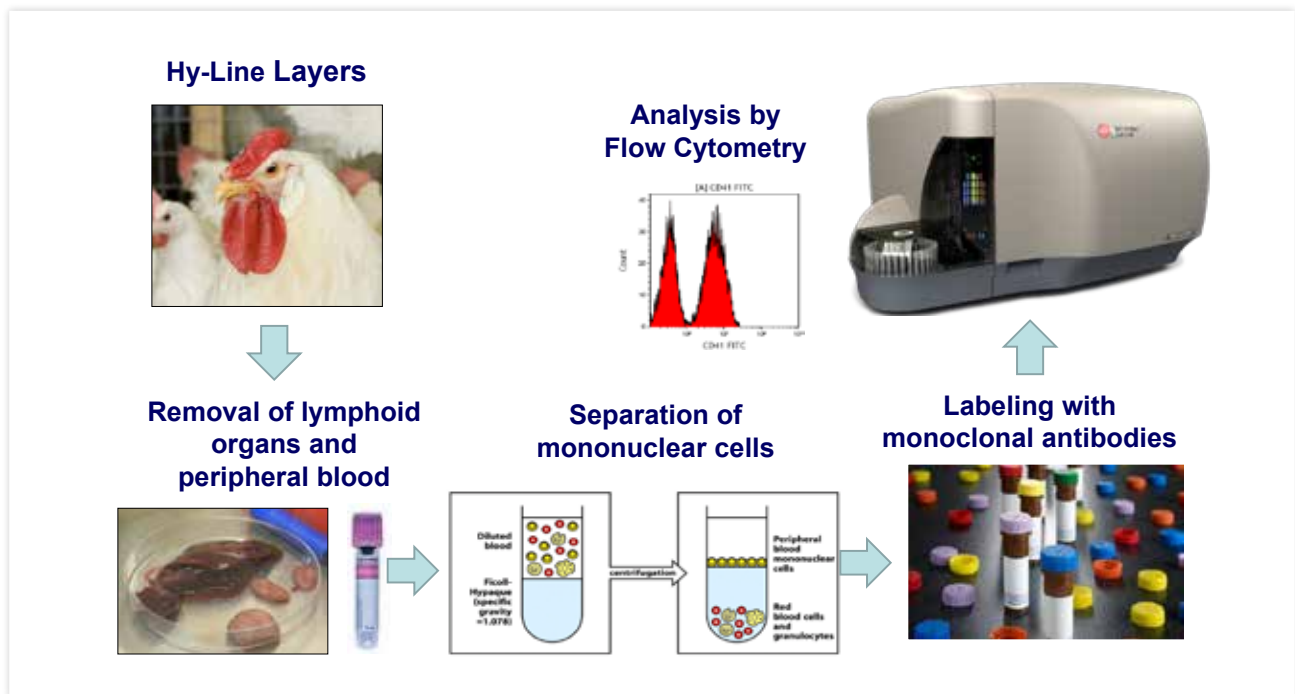


Figura 1. Flujo de trabajo.

RESULTADOS

A los 4 dpi, en el grupo infectado se observó una disminución significativa de células CD8+ (mediana=20.18%) en bazo, células B (mediana=68.39%) en bursa, células CD8+ (mediana=12.48%) y células B (mediana=2.54%) en sangre periférica respecto a células CD8+ (mediana=27.44%, $p < 0.05$) en bazo, células B (mediana=96.96%, $p < 0.05$) en bursa y células CD8+ (mediana=18.91%, $p < 0.05$) y células B (mediana=10.64%, $p < 0.05$) de sangre periférica del grupo control. Asimismo, la población CD45 hi en el timo fue significativamente más alta en el grupo infectado (mediana=89.64%) respecto al grupo control (mediana=66.58%, $p < 0.05$). A los 7 dpi, no se

observaron diferencias en las sub-poblaciones de células T y linfocitos B entre los diferentes grupos. FAdV-4 origina una rápida disminución de células CD8+ y células B entre los diferentes órganos linfoides.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que el timo podría estar relacionado a la repoblación de células T y a la reconstitución inmune después de la enfermedad.

PALABRAS CLAVE

Adenovirus aviar serotipo 4, inmunosupresión, órganos linfoides, gallinas, citometría de flujo

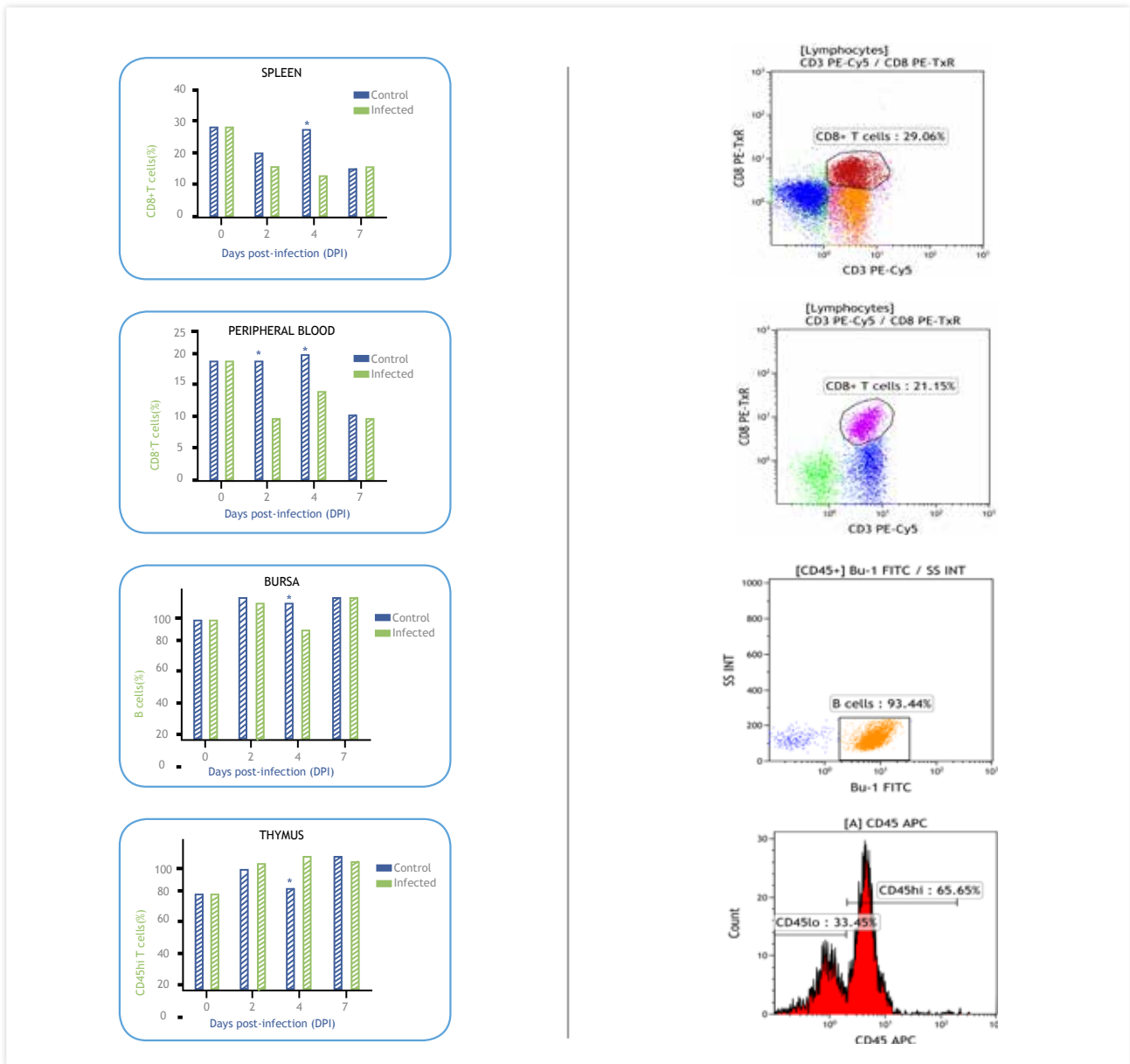


Figura 2. Frequency of T and B cells in lymphoid organs after experimental infection with FAdV-4. Only P-values which indicate significant differences, are shown as follows: * $p < 0.05$.

Serotipificación y sensibilidad antimicrobiana de aislados de *Avibacterium paragallinarum* procedentes de Perú

Morales-Erasto V.¹, Luna-Galaz G.¹, Falconi-Agapito F.², Icochea-D'Arrigo E.^{2,3}, Soriano-Vargas E.¹, Fernández-Díaz M.^{2,1} Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. ²Laboratorio de Microbiología y Serología, FARVET. ³Laboratorio de Patología Aviar, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Trabajo de investigación presentado en el VII Seminario Internacional AMEVEA 2013, V Encuentro Científico y V Expo AMEVEA, Lima – Perú, 26 al 28 de junio del 2013. También presentado en el XXIII Congreso Latinoamericano de Avicultura, El Salvador, noviembre del 2013.

INTRODUCCION

La coriza infecciosa es una enfermedad respiratoria aguda de pollos causada por la bacteria *Avibacterium paragallinarum*. Debido a las grandes pérdidas en la industria avícola, esta enfermedad tiene relevancia a nivel mundial (Blackall y Soriano, 2008). Kume et al. (1983) propusieron un sistema de serotipificación basado en hemaglutininas el cual consiste en 3 serogrupos.

Actualmente en estos serogrupos se reconocen nueve serovariedades serovariedades: A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3, y C-4 (Blackall et al., 1990). En América se han identificado las serovariedades A-1, B-1 y C-2 en Estados Unidos de América; A-3 en Brasil; B-1 en Panamá; A-3, B-1 y C-1 en Ecuador y en México A-1, A-2, B-1, C-1 y C-2 (Morales-Erasto et al., 2011).

Existen dos puntos de vital importancia en el control de coriza infecciosa, i) la serotipificación de los aislamientos infectantes que permita establecer programas de vacunación específicos a las serovariedades identificadas y, ii) el tratamiento antimicrobiano, para lo cual es necesario conocer el patrón de sensibilidad de aislamientos pertenecientes a una misma región para brindar una terapia adecuada. Por lo mencionado anteriormente, nos planteamos como objetivo serotipificar aislamientos de *Avibacterium paragallinarum* procedentes de Perú y determinar su sensibilidad a diferentes antimicrobianos.

METODOLOGÍA

Bacterias. Se incluyeron 19 aislamientos para el estudio de serotipificación, provenientes de 4 zonas del Perú (Arequipa, Ica-Chincha, Lima y Ucayali- Pucallpa), los cuales fueron obtenidos en el periodo del 2010- 2012 y un solo aislamiento obtenido en el presente año. Así mismo 15 de estos aislamientos fueron utilizados para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana. Medios de cultivo. Para el mantenimiento y propagación de las bacterias se empleó caldo infusión cerebro corazón suplementado con 1% de suero inactivado de caballo y 25 µg/mL de dinucleótido de adenina nicotidamida (NAD) y placas de base de agar sangre con 10% de sangre de ovino y *Staphylococcus* spp. como colonia nodriza. Para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana se empleó agar TM/ SN suplementado con 1% de suero inactivado de caballo y 25 µg/mL de NAD.



Figura 1. Se muestra la sensibilidad antimicrobiana del aislamiento FARPER-033. Se empleó el método de difusión en disco. Cada ensayo se realizó por duplicado y el halo de inhibición calculado fue la media de las repeticiones.

Serotipificación. Los aislamientos fueron asignados a un serogrupo por medio de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación con antisueros específicos a

los nueve serotipos reconocidos. La preparación de los antiseros se realizó mediante al procedimiento previamente reportado (Soriano et al. 2001). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.

Se utilizó la prueba de difusión en disco, la cual se realizó como recomienda el CLSI por sus siglas en inglés Clinical Laboratory Standards Institute, con algunas modificaciones. La suspensión bacteriana de cada aislamiento se ajustó con un estándar de turbidez de 0,5 Mc Farland. Cada aislamiento fue probado frente a 9 antimicrobianos (Amoxicilina + Ac. Clavulánico Doxiciclina, Ampicilina, Estreptomina, Neomicina, Penicilina, Oxacilina, Sulfametoxazol + trimetoprim y Tetraciclina), por duplicado. Las cepas de referencia utilizadas como control de calidad fueron *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

RESULTADOS

En este estudio se serotipificaron 19 aislamientos de *A. paragallinarum* de Perú y se determinó la sensibilidad antimicrobiana de 15 de ellos frente a 11 antibióticos mediante el método de difusión en disco.

De los 19 aislamientos, 1 fue serotipificado como serovariedad A-1, 5 serovariedad A-2, 4 serovariedad B-1, 4 serovariedad C-1 y 4 de ellos no pudieron ser tipificados (NT) (Tabla 1). En un estudio realizado por Mendoza Espinoza A, et al., en el 2009, también reportan la presencia de los 3 serogrupos en el Perú, sin embargo no se logra la identificación de los serovares en dicho trabajo.

Los aislamientos mostraron alta sensibilidad (>70%) a ampicilina, y amoxicilina+ácido clavulánico; mientras que más del 75% fueron resistentes a sulfametoxazol+trimetoprim y estreptomina. Todos los aislados resultaron resistentes a oxacilina (Tabla 2). Resultados similares fueron hallados por Chukiatsiri et al. en el 2012.

CONCLUSIONES

Se identificaron las serovariedades A-1, A-2, B-1 y C-1 en aislamientos de *Av. paragallinarum* de Perú. Este resultado indica la necesidad de emplear bacterinas trivalentes para la prevención de coriza infecciosa en la industria avícola de este país. Los porcentajes de sensibilidad antimicrobiana que mostraron los aislamientos de *Av. paragallinarum* sugieren la necesidad de un seguimiento continuo de aislamientos provenientes de brotes de coriza infecciosa frente a los antimicrobianos utilizados para tratar la enfermedad, con la finalidad de brindar una

terapia más adecuada.

Los resultados sugieren el uso de bacterinas para prevenir la enfermedad y así reducir el empleo terapéutico de antimicrobianos.

PALABRAS CLAVE

Coriza infecciosa, *Avibacterium paragallinarum*, serotipificación, susceptibilidad antimicrobiana.


Tabla 1. Resultados de serotipificación de aislamientos de *Avibacterium paragallinarum* de Perú incluidos en el estudio.

Serovariedad*	Departamento			
	Arequipa	Ica (Chincha)	Lima	Ucayali (Pucallpa)
A-1 (1)	0	1	0	0
A-2 (5)	0	4	1	0
B-1 (5)	1	2	2	0
C-1 (4)	0	0	3	1
NT (4)	1	3	0	0

Tabla 2. Porcentajes de sensibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Av. paragallinarum* incluidos en el estudio.

Agentes antimicrobianos	2010 - 2013a n = 15
Amoxicilina + Ac. Clavulánico (30ug)	73.3
Ampicilina (10ug)	80.0
Doxiciclina (30 ug)	33.3
Estreptomina (300 ug)	13.3
Neomicina (30ug)	66.7
Penicilina (10ug)	33.3
Oxacilina (1ug)	0.0
Sulfametoxazol + trimetoprim (23.75/1.25ug)	20.0
Tetraciclina (30ug)	46.7



 Solución científica para la salud animal

Rescate de un virus lentogénico asintomático peruano de la enfermedad de Newcastle (RNDV-PE18)

Chumbe-Mendoza A.¹, Izquierdo-Lara R.¹, Tataje-Lavanda L.¹, Falconi-Agapito F.², Fernández-Díaz M.^{1,2}, Vakharia V.³. ¹Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. ²Laboratorio de Microbiología y Serología, FARVET. ³Institute of Marine & Environmental Technology, University of Maryland Baltimore.

Trabajo de investigación presentado en el 63rd Western Poultry Disease Conference & XXXIX Convención Anual Aneca, Puerto Vallarta, Jalisco - México, 01 al 05 de abril del 2014.

RESUMEN

La enfermedad de Newcastle (NDV) es responsable de pérdidas significativas en granjas de crianza avícola. NDVs lentogénicos (ICPI de 0.0 a 0.7) son usados como vacunas vivas contra NDV, pero incluso estas cepas lentogénicas pueden ocasionar síntomas post-vacunales indeseables en algunos casos. En 1984, un virus local de NDV fue aislado y atenuado mediante sucesivos pasajes en huevos libres de patógenos (ICPI actual de 0.42). Con la finalidad de producir un sistema de genética reversa para este aislado, amplificamos, clonamos y secuenciamos la secuencia nucleotídica completa de este aislado en siete fragmentos. La secuencia completa de cDNA de rNDV-PE18 fue construida entre la ribozima autoclivable hammerhead y el antígenoma de la ribozima del Hepatitis Delta Virus en un vector pCI modificado (pCI/HDV). Los plásmidos de soporte fueron construidos a partir del plásmido pNDV-PE18 y para probar la expresión de éstos un minigenoma conteniendo la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) fue también construido. El virus rNDV-PE18 fue recuperado exitosamente a partir de células VERO y ha replicado eficientemente al menos por 10 pasajes. El test de Patogenicidad mostró que el virus rNDV-PE18 era completamente avirulento (IPIC = 0.00). Así rNDV-PE18 es un prometedor candidato a vacuna, especialmente para pollos de engorde, y un potencial vector para llevar genes foráneos. Una versión completa de este trabajo será publicado en breve.

INTRODUCCIÓN

NDV es responsable de importantes pérdidas económicas en granjas avícolas de todo el mundo (12,1). Esto es especialmente relevante en América del Sur, especialmente en Perú, donde la cría de traspatio es una actividad común y existen muchas empresas avícolas informales con bajos niveles de bioseguridad (9). La organización del genoma y los factores de virulencia de NDV están muy bien descritos (2), gracias a la genética reversa, que desde

1999 ha permitido manipular genéticamente a NDV (11,10). Varios grupos han reportado de la capacidad de NDV para transportar genes exógenos y conferir protección al patógeno secundario (3,14).

NDV ha estado presente en el Perú desde 1970. A mediados de los años 80 nuestro Laboratorio de Microbiología (en FARVET) fue capaz de recuperar un NDV (NDV-PE) aislado de campo, que tiene un índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) de 0.42. Desde entonces, esta cepa se propagó en huevos SPF varias veces y se ha utilizado de forma continua como una vacuna viva.

La vacunación de NDV está muy bien regulada y es obligatoria para las aves de corral, que incluyen vacunas vivas (15). Debido a nuestras condiciones de crianza especiales, se tomó la iniciativa de desarrollar un vector de NDV que pueda satisfacer nuestras necesidades. Con el objetivo de producir nuestros propios virus recombinantes basados en este aislado, hemos desarrollado un sistema de genética reversa para ello.

METODOLOGÍA

Cultivo de virus. El virus NDV-PE se obtuvo del banco Master de la vacuna viva de FARVET y se amplificó en huevos embrionados libres de patógenos específicos (SPF) de 9 días de edad.

Secuenciación de NDV-PE. El RNA viral se extrajo a partir de muestras de fluido alantoideo infectado con el kit QIAmp MiniElute Virus-Spin-Kit (Qiagen). Basándonos en los cebadores publicados para la cepa de no virulenta LaSota (4), el virus NDV-PE aislado se amplificó por RT-PCR en 7 fragmentos con la polimerasa de alta fidelidad Pfx (Life Technologies), utilizando 7 pares de cebadores (Tabla 1). Cada fragmento se clonó en el vector pGemT-easy y se secuenció con los cebadores T7 / SP6.

Construcción del cDNA que codifica al rNDV. Un vector pCI modificado (pCI / HDV), el cual incluye al antigenoma de la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV), se utilizó para construir el plásmido conteniendo el cDNA completo del rNDV-PE (pNDV-PE). Un fragmento de 1677 nucleótidos flanqueado por Spel y RsrII se sintetizó y se insertó en el pCI / HDV entre NheI y RsrII. Este gen sintético incluyó la secuencia de la ribozima auto-clivable *Hammerhead* (HhRz), la región *leader* parcial, el gen parcial de la fosfoproteína y el gen parcial de la Matriz. Para construir el pNDV-PE18, se incluyeron varios sitios de restricción en este gen sintético, permitiendo las 7 subclonaciones posteriores (Figura 1). Además, un sitio RsrII presente en NDV-PE fue eliminado para facilitar la clonación del primer fragmento del pNDV-PE18, esta mutación también fue utilizada como un marcador genético para identificar el virus rNDV-PE18. El producto 7F-7R, la primera pieza

a insertar, fue reamplificada con los cebadores 7F y 7R-Rsr para incluir el fragmento del antigenoma de la ribozima HDV (Tabla 1).

Los plásmidos de soporte pCI-N14, pCI-P15 y pCI-L4 se construyeron a partir pNDV-PE18, con los cebadores Nfor, Nrev, Pfor, Prev, Lfor and Lrev (Tabla 1).

Construcción del minigenoma. Para verificar que nuestro sistema de rescate construido funciona, se diseñó un minigenoma entre HhRz y HDV que estaba flanqueada por los extremos 5' y 3' UTR del genoma NDV rodeando el ORF de la EGFP (5). El plásmido que contenía al minigenoma fue denominado pNDV-Mini.

Transfección y recuperación. La transfección se llevó a cabo como ha sido reportado anteriormente para NDV (6,11). Brevemente, células Vero se mantuvieron

Tabla 1. Cebadores usados en este estudio. Los sitios de restricción están subrayados. Se muestra en negrita las secuencias de Kozak. La posición en el genoma de NDV es indicada. Las letras en mayúscula forman parte de la secuencia de NDV.

Nombre	Posición	Secuencia (5' → 3')	Sitio de restricción
1F	(1-24)	ACCAAAACAGAGAATCCGTAAGTTA	-
1R	(2338-2363)	GTTTCCGCGGCTGGGTGACTCCCCT	SacII
2F	(2343-2365)	AGTCAACCCAGCCGCGGAAACAG	SacII
2R	(4943-4964)	GAGCTGCGGCCGCTGTTATTG	NotI
3F	(4948-4968)	AACAGCGGCCCGCAGCTCTGAT	NotI
3R	(6276-6301)	TACAACGCGTAGTTTTTCTTAAGT	MluI
4F	(6288-6312)	AACTACGCGTGTAGATGACCAAAG	MluI
4R	(8351-8366)	GCACTACGTATTTGCCCTGTATCTC	SnaBI
5F:	(8358-8383)	CAAATACGTAATGGTAAATAATACGGGTAGGACATG	SnaBI
5R	(10024-10052)	TCAGCTTAGCGAAGATCCGTCATTAAGT	BlnI
6F	(10039-10071)	CTTCGCTAAGCTGACAAAGAAGTTAAGGAAGT	BlnI
6R	(12817-12844)	GTCTAGGCCTCTACTCTCAGGTAATAG	StuI
7F	(12833-12854)	AGAGGCCTAGACAATATTGTCT	StuI
7R	(15159-15186)	ACCAAAACAAAGATTTGGTGAATGACGAG	-
7R-Rsr	(15159-15186)	gatccggaccgcgaggagggtggagatgccatgccgACCCACCA- AACAAAGATTTGGTGAATGACGAG	RsrII
T7	-	TAA TACGA CTCAC TATAG GG	-
SP6	-	TTC TATAG TGTC A CCTAA AT	-
Nfor	(122-140)	ggaattgccaccATGCTTCCGTAATTGATG	EcoRI
Nrev	(1591-1572)	gcgccgcTCAATACCCCCAGTCGGTGT	NotI
Pfor	(1887-1906)	tgaattgccaccATGGCCACCTTTACAGATGC	EcoRI
Prev	(3074-3057)	gcgccgcTTAGCCATTAGAGCAAG	NotI
Lfor	(8381-8400)	tactagtgccaccATGGCGAGCTCCGGTCTCTGA	SpeI
Lrev	(14995-14976)	gcgccgcTTAAGAGTCACAGTACTGT	NotI
ForRsr	(2491-2510)	gatcaaggcagagccaagac	-
RevRsr	(2736-2755)	gaaatgtggcacaaccggg	-

con medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS). Las células Vero fueron cultivadas a 80% confluencia en placas de 12 pocillos, donde se transfectaron con una cantidad total de DNA de 3.8ug (2 ug de pNDV-PE18, 1 ug de la pCI-N14, 0,6 ug de la pCI-P15 y 0.2 de la pCI-L4) utilizando Lipofectamine LTX / OptiMEM (Life Technologies).

Un día después, las células transfectadas se trataron con tripsina y fueron re-sembradas en un frasco. Cinco días más tarde, el sobrenadante fue cosechado y ultracentrifugado durante 12 horas a 28000 rpm. El virus rNDV-PE18 se resuspendió en 1 ml de DMEM 5% y se inoculó en huevos SPF de 8 días de edad. Luego de un pasaje ciego, el virus rNDV-PE18 fue recuperado y se propagó por al menos 10 pases en huevos embrionados SPF.

Identificación de rNDV-PE18 por marcadores genéticos. Un RT-PCR seguido de una digestión con endonucleasas de restricción fue realizado para identificar una mutación hecha en rNDV-PE18. La RT fue hecha con el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche), utilizando cebadores hexámeros aleatorios y poli-A. Los PCRs fueron realizados con la polimerasa Pfx y los cebadores ForRsr y RevRsr (Tabla

1). Las digestiones se realizaron con RsrII (New England Biolabs).

Pruebas de Hemaglutinación (HA) y de patogenicidad.

El HA fue realizado utilizando globulos rojos de aves SPF (8). El índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) fue determinado en pollos de un día de edad, como se ha sido descrito por Alexander (13).

RESULTADOS

Secuencia de NDV-PE. La secuencia de NDV-PE resultó ser muy similar a otras cepas lentogénicas de NDV, encontrándose sólo dos cambios de aminoácidos que no fueron encontrados en ninguna otra secuencia de NDV.

Verificación de los plásmidos de soporte. La correcta expresión de pCI-N14, pCI-P15 y pCI-L4 fue verificada por la co-expresión de todos estos junto con el plásmido pNDV-Mini. Veinticuatro horas después de la transfección, se observaron las primeras células verdes. En contraste, no se observó expresión de la EGFP cuando pNDV-Mini se transfectó sin el plásmido pCI-L4 (Figura 2). Estos plásmidos se utilizaron también para optimizar nuestro protocolo de transfección para la recuperación.

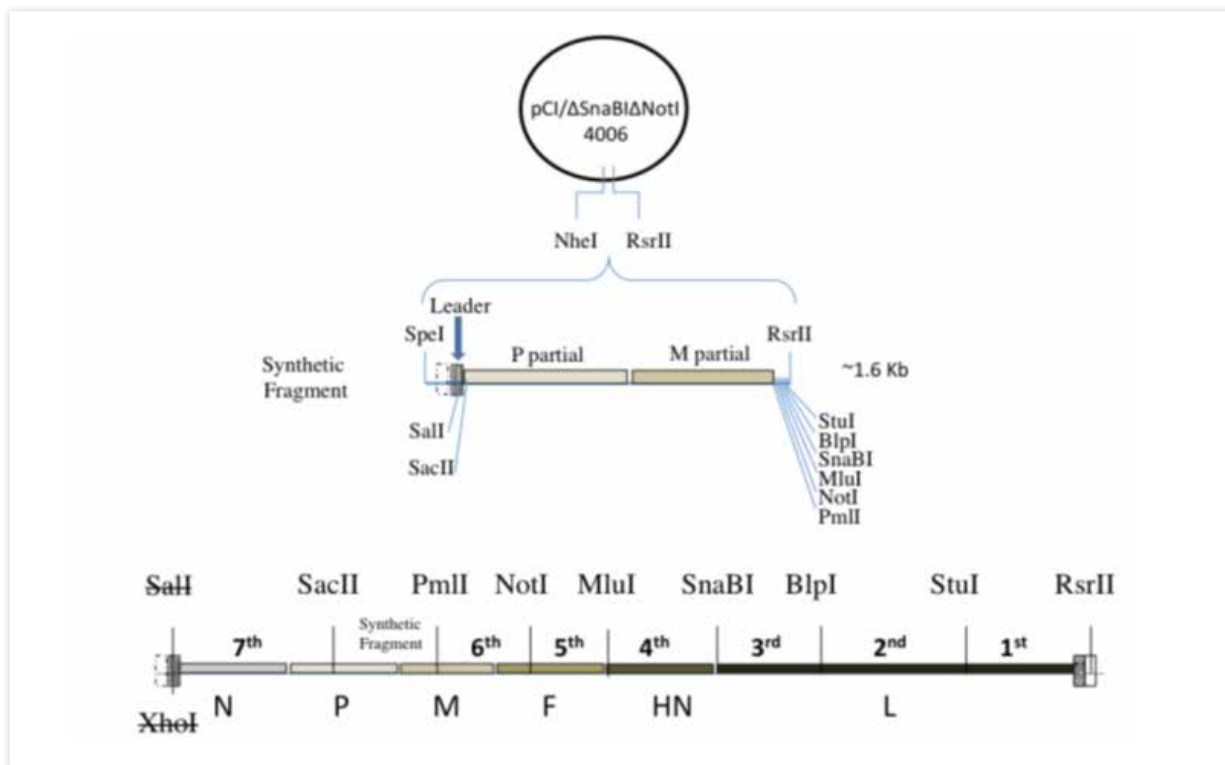


Figura 1. Diagrama esquemático de la estrategia de subclonamiento de rNDV-PE18. Se hicieron siete subclonaciones consecutivas para construir el virus rNDV-PE18. En un plásmido pCI modificado (sitios SnaBI y NotI destruidos) se insertó entre NheI y RsrII un fragmento de ~1,6 Kb que incluía varios sitios de restricción, fragmentos parciales de la fosfoproteína y la proteína Matrix. Luego, el producto de amplificación de los cebadores 7F y 7R-RSR fue insertado entre StuI y RsrII, ya que el sitio RsrII original en NDV-PE fue destruido en el fragmento sintético. El segundo fragmento, producto de amplificación de los cebadores 6F y 6R, fue insertado entre StuI y BlnI. Los fragmentos del 3 al 7 fueron productos de amplificación de los cebadores 5F y 5R, 4F y 4R, 3F y 3R, 2F y 2R y 1F y 1R, respectivamente, entre los sitios especificados en el esquema.

Construceto pNDV-PE18. El plásmido pNDV-PE18 fue ensamblado a partir de fragmentos de cDNA, como se muestra en la figura 1, entre la HhRz y HDV. Para su construcción, 7 mutaciones fueron creadas por medio de cebadores para crear 3 nuevos sitios de restricción: *Sac* II (2354), *Mlu* I (6294-95) y *Sna* B I (8352-54-55-57). Además, se introdujeron 9 mutaciones puntuales: cuatro de ellas para facilitar el clonamiento, eliminación de un sitio *Xho* I (80G> T), el reemplazo de un segundo *Xho* I por *Sac* I (100C> G, 105G> C) y la destrucción de *Rsr*II (2665C> T); y cinco mutaciones para crear *Pac*I (3071C> T, 3078C> A) y *Asc*I (3270A> C, 3272T> C, 3276C> T), lo que finalmente permitirá utilizar este rNDV-PE18 como vector para introducir genes exógenos.

Identificación de rNDV-PE18. Después de recuperado, el virus rNDV-PE18 se propagó por varios pasajes en huevos SPF de 9 días. El análisis de la RT-PCR seguida por el patrón de digestión por enzimas de restricción reveló la ausencia del sitio *Rsr*II en rNDV-PE, tal como se calcula a partir de los tamaños de las bandas, mientras que los productos de RT-PCR del virus silvestre NDV-PE fueron digeridos por *Rsr*II (Fig. 2C).

HA y prueba de patogenicidad. El fluido alantoideo fue cosechado 5 días post-inoculación y dio un título positivo de HA desde 32 a 128 HAU. El IPIC mostró que rNDV-PE18 fue completamente avirulento (IPIC = 0.00), mientras que NDV-PE, que tiene una ICPI de 0.42.

DISCUSIONES

El virus rNDV-PE18 se puede distinguir del virus parental, ya que posee marcadores genéticos que se introdujeron para el clonamiento. Las mutaciones realizadas en él fueron identificadas por RT-PCR y la digestión enzimática. El NDV recombinante, derivado de la cepa de la vacunal NDV-PE, se generó y se

recuperó con éxito en células VERO utilizando un sistema basado en un promotor de polimerasa II, descrito previamente por Li (7). Se comprobó que el virus rNDV-PE18 amplifica y replica de manera eficiente durante al menos 10 pasajes. El virus rNDV-PE18 resultó ser lentogénico asintomático, con un ICPI menor al del virus parental. El bajo ICPI puede ser explicado por las mutaciones introducidas en las regiones intergénicas, sin embargo, se necesitan más estudios para determinar cuáles son las mutaciones exactas que causan este efecto. Esta característica podría resultar en una menor reacción post-vacunal en pollos, por lo que rNDV-PE18 puede resultar ser una prometedora vacuna candidata para toda la industria de aves de corral, especialmente para pollos de engorde, que son muy susceptibles a generar reacciones post-vacunación. Además, rNDV-PE18, debido a sus características podría ser un vector potencial de genes expresar genes foráneos. Finalmente, rNDV-PE18 fue capaz de replicar en huevos embrionados tan bien como el virus parental, produciendo altos títulos virales y el mismo efecto citopático que se observa para el virus parental NDV-PE.

CONCLUSIÓN

Este virus es la primer NDV recombinante recuperado en América del Sur y, debido a su bajo ICPI, puede ser utilizado como una vacuna contra NDV. Por otra parte, rNDV-PE18 tiene el potencial de ser utilizado como vector para la inserción de genes de diferentes patógenos causantes de brotes, lo que conduciría a una mejora en los programas de vacunación para satisfacer las necesidades de nuestra industria avícola.

PALABRAS CLAVE

Virus de la enfermedad de Newcastle, genética reversa, EGFP



Figura 2. (A) Microscopía de fluorescencia de células Vero (200x) 36h después de la transfección con los plásmidos pNDV-Mini, pCI-N14, pCI-P15 y pCI-L4. (B) Control negativo, células Vero transfectadas con los mismos plásmidos excepto pCI-L4, donde no se detectó fluorescencia. (C) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR utilizando los cebadores ForRsr y RevRsr, los cuales fueron digeridos con *Rsr*II (carriles del 2 al 7) y no digeridos (carriles del 9 al 14). Las muestras de los carriles del 2 al 6 son muestras del virus recuperado rNDV-PE18 y el carril 7 corresponde al virus parental NDV-PE. Los carriles 1 y 15 corresponden al marcador de tamaño molecular Fermentas 100pb. El carril 8, corresponde al marcador Novagen 50pb.

Proteína Matriz de Newcastle como plataforma para la obtención de Partículas Pseudoviricas (VLPs) de *Fowl Adenovirus* serotipo 4 (FAdV-4) generadas a partir de la Fibra-2

Izquierdo-Lara R.¹, Chumbe-Mendoza A.¹, Figueroa-Rodríguez A.², Saravia-Cahuana L.¹, Fernández-Díaz M.^{1,2}. ¹ Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. ² Laboratorio de Cultivo Celular y Virología, FARVET.

Trabajo de investigación presentado en el 63rd Western Poultry Disease Conference & XXXIX Convención Anual Anexca, Puerto Vallarta, Jalisco - México, 01 al 05 de abril del 2014.

RESUMEN

Fowl adenovirus serotipo 4 (FAdV-4) causa Hepatitis a cuerpos de Inclusión (HCI) y Síndrome de Hidropericardio (SHP), generando pérdidas en la industria avícola. Actualmente, las vacunas contra FAdV no son totalmente efectivas y en ocasiones pueden revertir, por lo que es necesario desarrollar nuevas vacunas para controlar esta enfermedad. Por otro lado, los VLPs han mostrado ser excelentes inmunógenos. Sin embargo, FAdV es un virus sin envoltura, estructuralmente complejo, por lo que generar VLPs de este virus es un desafío técnicamente muy difícil de realizar. Para superar este inconveniente, hemos aprovechado la cualidad de la proteína Matriz (M) del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), de tomar parte de la membrana del hospedero y formar viriones, para generar VLPs con envoltura cuya superficie contiene a la proteína Fibra-2 de FAdV-4. Para ello, se expresó simultáneamente en células DF-1 la Matriz y la Fibra-2. Esta última fusionada en el extremo N-terminal a los dominios citoplasmático y transmembrana de la proteína HN de Newcastle. Los VLPs purificados fueron evaluados por western blot, obteniéndose bandas positivas a suero anti-NDV de ~40 kDa correspondiente a la Matriz, y a suero anti-Fibra2 obteniendo una banda de ~60 kDa.

Este es el primer reporte de la obtención de VLPs para un adenovirus, dando un paso importante en el desarrollo de la siguiente generación de vacunas contra FAdV. Sin embargo, estos VLPs necesitan ser probados para determinar su eficiencia como vacuna contra FAdV-4.

INTRODUCCIÓN

FAdV-4 produce HCI y SHP (1); condiciones que han sido reportadas en muchos países del mundo, especialmente en Asia, centro y Suramérica (2), causando pérdidas en la industria avícola. Varias formulaciones de vacunas han sido usadas en campo, especialmente las producidas de hígados afectados, pero ninguna de ellas cumple el criterio de inducir una respuesta

inmune pronta y duradera contra brotes naturales de la enfermedad (3).

FAdV-4 pertenece a la familia *Adenoviridae*, que se caracterizan por ser virus icosaédricos, sin envoltura y con un genoma de DNA de doble cadena (4). En general, la cápside de FAdV contiene 4 proteínas estructurales principales: el Hexón, el Pentón, la Fibra-1 y la Fibra-2. De estas proteínas, la proteína Fibra-2 juega un rol principal en la entrada del virus a la célula huésped (5). Además, se ha demostrado que la Fibra-2 es capaz de generar una eficiente protección cuando se usa como proteína recombinante (6).

Los VLPs consisten en una o más proteínas estructurales, semejando al virión sin incluir el genoma del virus, así, generando potenciales vacunas más seguras sin la necesidad de usar adyuvantes (7). La proteína M de NDV tiene la capacidad de tomar parte de la membrana celular y ensamblar con alta eficiencia viriones vacíos cuando es expresada en células aviares (8). Esta característica ha permitido el desarrollo VLPs que usan como plataforma la proteína M y los DC y DT de las proteínas F y HN de NDV (9).

En este trabajo, hemos desarrollado un VLP para FAdV-4, utilizando como la proteína M y los DC y DT de la HN de NDV para incorporar la proteína fibra-2 al virion.

METODOLOGÍA

Construcción de plásmidos que codifican los VLP.

Se realizó un RT-PCR para amplificar el ORF completo de la proteína M a partir de RNA extraído de NDV, utilizando los primers: 5' -caatGCTAGCACCATG-GACTCATCTAGGACAATTGGGC -3' y 5' -gaGCGC-CGCTTATTCTTAAAAGGATTGTATTGG-3' (las bases subrayadas corresponden a los sitios NheI y NotI, respectivamente). El ORF de la proteína M fue insertado en el plásmido pcDNA3.1 (Invitrogen®) entre los sitios NheI y NotI, generando el plásmido pcDNA3.1/M.

El plásmido pcDNA3.1 contiene los promotores CMV y SV40, donde el primero se usa para expresar el gen de interés, mientras que el segundo expresa el gen de resistencia a la neomicina. Para usar el promotor SV40 para expresar un segundo gen de interés, se amplificó a pcDNA3.1/M con los primers 5'-TTGCGTACGCCTG-CAGGGCGGGACTCTGGGGITCGAAATG-3' y 5'-AATGGCTAAGCGATCGCCCGGGAGCTTTTGC AAAA-GC-3' eliminando el gen de resistencia a la neomicina y colocando los sitios SbfI y AsiSI (bases subrayadas) a los extremos. Luego se insertó la EGFP, sintetizada por GeneScript (Piscataway, NJ), obteniéndose el plásmido pcDNA3.1(+).

La fibra-2 de FAdV-4 fue fusionada en su extremo N-terminal a los DC y DT de la HN de NDV, generando la proteína hnF2. El gen que codifica esta proteína, fue sintetizado por GeneScript (Piscataway, NJ). El gen hnF2 fue insertado entre AsiSI y SbfI en el pcDNA3.1/M, generando el plásmido pcDNA3.1/M-hnF2. Un esquema de todos los plásmidos se muestra en la figura 1.

Transfección de células DF-1. Para encontrar la proporción óptima de PEI25 (Sigma-Aldrich) y DNA que debe ser usada para la transfección de células DF-1, 1 y 2 µg del plásmido pcDNA3.1/M-EGFP fue transfectado con diferentes cantidades de PEI25 en una placa de 12 pocillos. La solución de trabajo del PEI25 fue una dilución de 1:1000 (w/v) en agua ultrapura. La obtención de VLPs se realizó transfectando células DF-1 con el plásmido pcDNA3.1/M-hnF2 con la proporción óptima de PEI25/DNA, escalada en base al área para flask T-225. Luego de 4h de incubación las células fueron lavadas con D-PBS y se les colocó medio DMEM al 5% de SFB.

Purificación de los VLP. Se modificó el protocolo de McGinnes et al (10). Brevemente, el sobrenadante fue colectado a las 72 y 96 h post-transfección y el debris fue removido por centrifugación a 2000 xg por 10 min. Los VLPs fueron ultracentrifugados en el rotor type 19 (Beckman) a 18000rpm por 12h. El pellet fue resuspendido en Buffer TNE, cargado sobre una gradiente discontinua de sucrosa (65%-20%) y centrifuga-

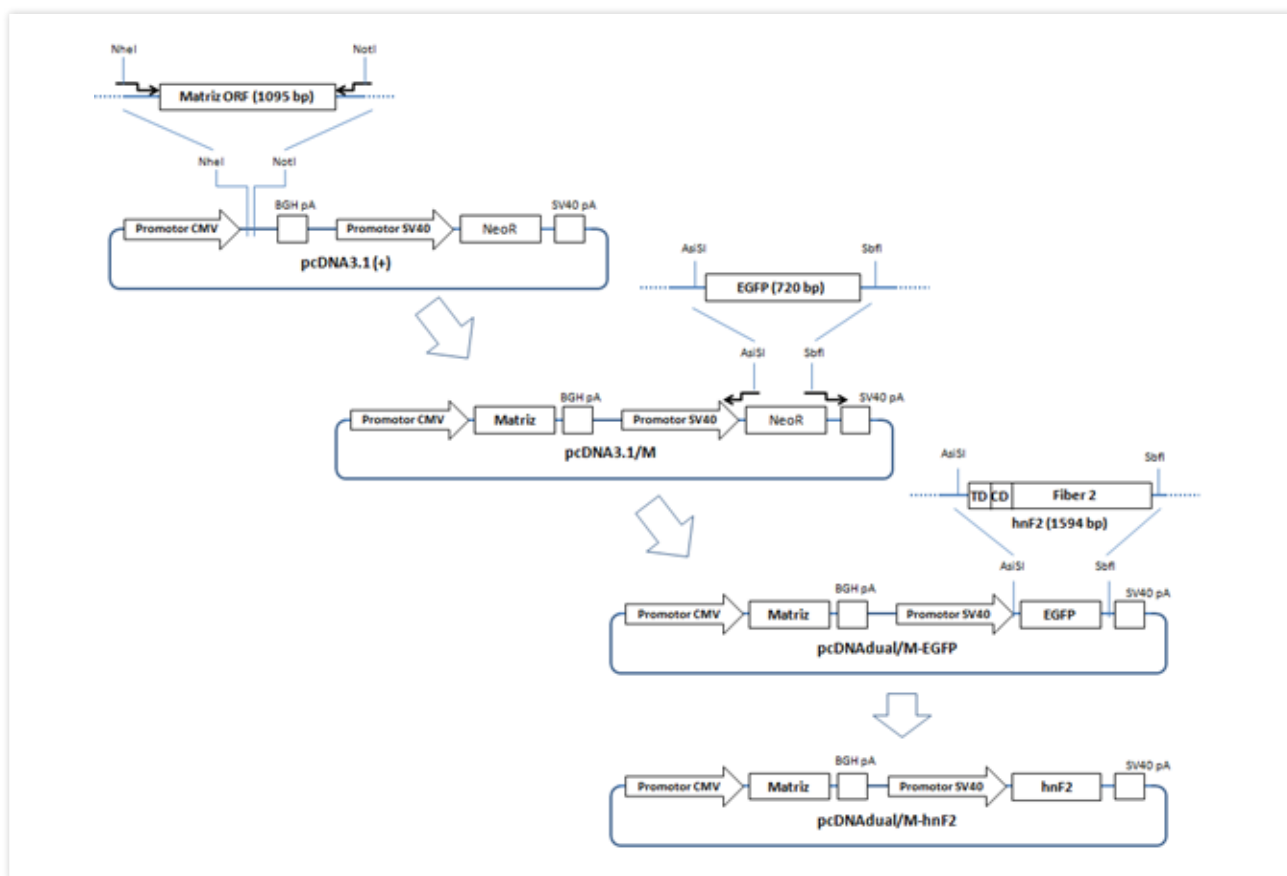


Figura 1. Esquema de clonamiento del plásmido que codifica el VLP. El ORF completo de la proteína M fue amplificado a partir de RNA extraído de NDV e insertado en el plásmido pcDNA3.1 entre NheI y NotI, generando el plásmido pcDNA3.1/M. Para usar el promotor SV40 para expresar un segundo gen de interés, se amplificó a pcDNA3.1/M eliminando el gen de resistencia a la neomicina y colocando los sitios SbfI y AsiSI a los extremos. Luego se insertó la EGFP, obteniéndose el plásmido pcDNA3.1/M-EGFP. La Fibra-2 de FAdV-4 fue fusionada en su extremo N-terminal a los DC y DT de la HN de NDV, generando la proteína hnF2. El gen hnF2 fue insertado entre AsiSI y SbfI en el pcDNA3.1/M-EGFP, generando finalmente el plásmido pcDNA3.1/M-hnF2.

do en el rotor SW28 (Beckman) a 24000 rpm por 6h. La capa "esponjosa" situada en la interface entre 20% y 65% de sucrosa, fue colectada, mezclada con 2 volúmenes de 80% de sucrosa y colocada sobre 1ml de sucrosa al 80%, luego se colocó en la parte superior 3.5ml de sucrosa al 50% y 2 ml de sucrosa al 10%. La gradiente fue centrifugada a 38000rpm por 18h en el rotor SW41 (Beckman). Los VLPs en la interface de 50% y 10% de sucrosa fueron colectados y concentrados en una columna amicon de 100kDa. Todas las centrifugaciones fueron hechas a 4°C.

Análisis de proteínas de los VLPs purificados

La evaluación de las proteínas presentes en los VLPs purificados fue evaluada por WB. Para ello se realizó un SDS-PAGE de gradiente discontinua (5% y 10%). Luego las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se realizaron 2 WB: el primero para la detección de la proteína M de NDV y el segundo para la detección de la proteína hnF2. Para la detección de la proteína M se usó antisuero de pollo contra NDV (Charles Rivers) y para la detección de hnF2 se utilizó antisuero de pollo contra la proteína fibra-2 de FAdV-4. Para ambos WB, el anticuerpo secundario fue un anticuerpo de ratón contra IgY de pollo conjugado con HRP (Promega).

RESULTADOS

Optimización de la transfección. La cantidad óptima de DNA/PEI25 para cada pocillo de una placa de 12 pocillos fue de 1 µg de DNA por 2 µl de PEI. Esta proporción fue extrapolada para los flask T225 en base al área (~60 veces el área de un pocillo de una placa de 12 pocillos). Finalmente cada flask T225 fue transfectado con 60 µg del plásmido pcDNA dual/M-hnF2 y 120 µl de PEI.

Obtención de VLP. Los VLP recuperados en el sobrenadante de las células transfectadas fueron purificados por varios pasos de ultracentrifugación. Luego las proteínas fueron detectadas por WB. La proteína M dio una banda de ~40kDa positiva a suero anti NDV, coincidiendo con el tamaño antes reportado (11). Por otro lado, la proteína hnF2 resultó positiva al suero anti Fibrin-2, generando una banda de más de 60kDa. La figura 2 muestra el WB realizado a los VLPs, tanto con suero anti NDV, como con suero anti Fibrin-2.

DISCUSIONES

Las proteínas M y hnF2 fueron encontradas juntas en los VLPs purificados, indicando que la incorporación de la proteína hnF2 en los viriones fue exitosa. El extremo N-terminal de la proteína hnF2, compuesto de los DC y DT de la proteína HN, tiene la capacidad de interactuar con la proteína M (8), lo que explica la incorporación eficiente la proteína hnF2 al virión.

El VLP generado tiene un alto potencial inmunogénico y si bien, la única proteína de FAdV-4 incorporada en el VLP es la Fibrin-2, se espera que la protección generada contra el virus sea mayor que la protección obtenida por la proteína sola. Esto debido principalmente a dos razones: la primera es que los VLPs exhiben una gran repetición del antígeno en su superficie, lo que puede inducir una fuerte respuesta inmune de células B (12); la segunda razón se debe a que los

VLPs presentan un tamaño similar al de un patógeno, lo que les permite ser captados por las células presentadoras de antígeno (en especial células dendríticas) y su subsecuente procesamiento y presentación vía MHC-I y MHC-II (12).

CONCLUSIÓN

El presente trabajo es el primero en reportar la obtención de VLPs para un adenovirus, dando un paso importante en el desarrollo de la siguiente generación de vacunas contra FAdV. Sin embargo, el potencial inmunológico de estos VLPs necesita ser probado in vivo, para determinar su eficiencia como vacuna contra FAdV-4.

PALABRAS CLAVE

Fowl adenovirus serotipo 4, Partículas pseudoviricas, Fibrin-2, proteína Matriz, expresión de proteínas

ABREVIACIONES

DC = dominio citoplasmático; DPBS = Buffer Fostafó Salino Dulbecco; DT= dominio transmembrana; EGFP = Proteína Verde Fluorescente Potenciada; FAdV-4 = Fowl adenovirus serotipo 4; HCl = Hepatitis a cuerpos de Inclusión; M = Matriz; NDV = Virus de la enfermedad de Newcastle; PEI25 = polietilenimina de 25kDa; RT-PCR = Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa; SDS-PAGE = electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato sódico); SFB = suero fetal bovino; SHP = Síndrome de Hidropericardio; VLPs = Partículas pseudoviricas; WB = Western Blot.

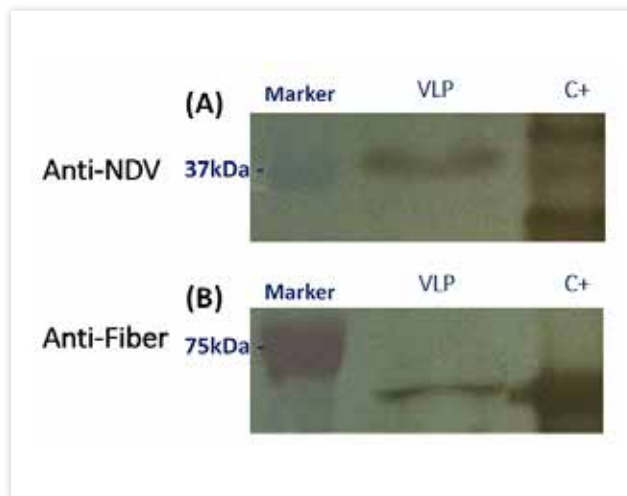


Figura 2. Western Blot de los VLP purificados. Los VLPs purificados del sobrenadante de células transfectadas fueron corridos por SDS-PAGE y luego transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Luego las proteínas fueron detectadas por WB. (A) La proteína M, en el carril 1, dio una banda de ~40kDa positiva a suero anti NDV. En el carril 2 se corrió NDV completo como control positivo. (B) La proteína hnF2, carril 1, resultó positiva al suero anti Fibrin-2, generando una banda de más de 60kDa. El carril 2 contiene proteína Fibrin-2 purificada de E.coli como control positivo.

Evaluación del efecto in vivo e in vitro de una novedosa terapia antitumoral basada en el virus de la enfermedad de Newcastle en perros con tumor venéreo transmisible (TVT)

Best-Cuba I.¹, Tamo C.², Medina-Corrales W.¹, Galarza E.², Fernández-Díaz M.¹. ¹Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, FARVET. ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional San Luis Gonzaga.

Trabajo de investigación presentado en el 33th Annual Meeting of the American Society for Virology (ASV), Fort Collins, Colorado - USA, 21 al 25 de junio del 2014.

INTRODUCCIÓN

La quimioterapia con vincristina es un efectivo tratamiento contra el tumor venéreo transmisible canino (TVT); sin embargo, el tiempo necesario para una completa remoción del tumor varía dependiendo tanto del estado del tumor como del animal.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue investigar una terapia alternativa contra TVT mediante la aplicación del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), la cual no produzca efectos adversos y mejore la respuesta inmune contra el tumor.

METODOLOGÍA

Cinco perros (1 macho/4 hembras, mediana de edad=6 años, mediana de peso =15.5 kg) de un área sub-urbano de la ciudad de Chincha (Ica-Perú) y diagnosticados con TVT por microscopía, fueron inyectados semanalmente con 2.5×10^8 copias/mL de una cepa velogénica del NDV directamente al tumor. La fórmula (largo x ancho x alto x $\pi/4$ (cm³)) fue utilizada para calcular el tamaño del tumor, el cual fue evaluado por 5 semanas. Células individuales obtenidas de biopsias del tumor fueron cultivadas por 11 días y luego infectadas con NDV a una multiplicidad de infección de 1. A los 4 días post-infección (dpi), carga viral y apoptosis/necrosis fueron evaluadas por PCR en tiempo real y citometría de flujo, respectivamente.

RESULTADOS

Previo al tratamiento, el tamaño de los tumores se encontraba en el rango de 2.5 a 567.5 cm³; post-tratamiento se observó una disminución entre 25 a 99% y sin la presencia de síntomas. 3/5 animales mostraron una reducción mayor del 50%. In vitro a los 4 dpi, se observó un incremento significativo de apoptosis temprana (mediana=13.5%) y apoptosis tardía/necrosis (mediana=21.6%) en células infectadas respecto al control no infectado (mediana=6.0% y

mediana=4.8%; respectivamente, $P < 0.05$). La carga viral mediana en células infectadas fue de 5×10^7 copias/mL.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que NDV es capaz de replicar en células de TVT, inhibiendo directamente el crecimiento celular mediante la inducción de apoptosis/necrosis in vivo e in vitro.

PALABRAS CLAVE

Virus de Newcastle, tumor venéreo transmisible, viroterapia oncolítica, cáncer, perros.

Antes del tratamiento



Después de 5 semanas de tratamiento



Recuperación de partículas defectuosas del virus de la enfermedad de Newcastle

Izquierdo-Lara R.^{1*}, Chumbe-Mendoza A.^{1*}, Fernández-Díaz M.¹. ¹Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. *Estos autores contribuyeron igualmente a este trabajo.

Trabajo de investigación presentado en el 33th Annual Meeting of the American Society for Virology (ASV), Fort Collins, Colorado - USA, 21 al 25 de junio del 2014.

INTRODUCCIÓN

El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) es utilizado como vehículo para expresar antígenos foráneos de patógenos aviares y otros, así como un vector para tratamiento de cáncer debido a sus propiedades oncolíticas. Sin embargo, la potencial liberación del virus al ambiente en un eventual tratamiento de cáncer se debe resolver para obtener vectores de NDV más seguros y eficientes. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un vector NDV con una propagación restringida, que se pueda utilizar tanto como un vector vacunal, así como un vector para el tratamiento del cáncer.

METODOLOGÍA

Hemos desarrollado un sistema para producir un nuevo vector de NDV recombinante (rNDVΔM1), en el que se eliminó el gen que codifica la proteína matriz (M). Utilizando el sistema de transposón piggyBac, se modificaron las células DF-1, generando la línea celular DFM, que expresa constitutivamente la proteína M. Basándose en el plásmido pCI/NDVF5, previamente construido, que contiene el genoma completo de NDV, se generó el plásmido pCI/NDVΔM1 (Figura 1). Para evitar complementar los medios de cultivo con proteasas exógenas similares a la tripsina, el sitio de escisión de la proteína de Fusión se modificó a partir de un motivo monobásico (GGRQG↓R) a un motivo polibásico (GRRQKR↓F). La recuperación de rNDVΔM1 se realizó por co-transfección del plásmido pCI/NDVΔM1 y los plásmidos de soporte en células DFM. El virus rNDVΔM1 recuperado fue cultivado en células DFM, donde se evaluó el efecto citopático (CPE) a

través de los pasajes. Para verificar la presencia de las proteínas de NDV se realizó una inmunofluorescencia contra un anticuerpo policlonal anti-NDV.

RESULTADOS

El virus rNDVΔM1 recuperado se ensambló correctamente, mostrando un CPE típico asociado a la infección por NDV. El virus es capaz de replicar en células DFM durante al menos 10 pasajes, pero no en células DF-1 normales por más de un pasaje. Tanto el virus parental como el virus recombinante mostraron formación de sincicios y positividad al anticuerpo anti-NDV (Figura 2).

CONCLUSIÓN

Aunque el genoma es capaz de replicarse y los genes virales se expresan, rNDVΔM1 ha perdido la capacidad de formar partículas infecciosas nuevas, extendiéndose únicamente mediante la fusión célula a célula. Por estas razones, el virus rNDVΔM1 podría ser utilizado como una vacuna por sí mismo o como un vector para entregar antígenos extraños o como un vector para el tratamiento de cáncer reduciendo al mínimo el riesgo de propagación al ambiente, siendo más seguro que un NDV completo. Por lo tanto, rNDVΔM1 representa un paso importante hacia el desarrollo de la próxima generación de vectores de NDV.

PALABRAS CLAVE

Virus de la enfermedad de Newcastle, proteína Matriz, transfección, inmunofluorescencia.

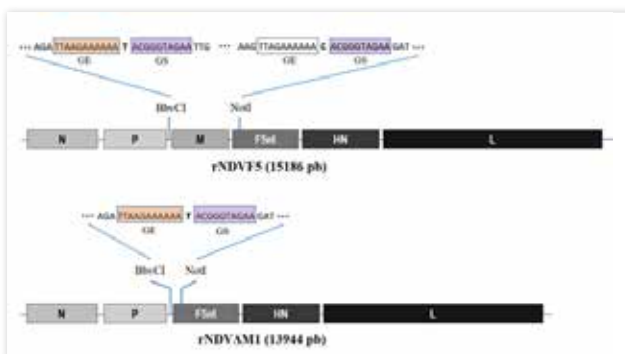


Figura 1. Mapas de los genomas virales. Arriba se muestran el mapa genómico del virus parental (rNDVF5) y en detalle las regiones flanqueantes del gen M. Abajo se muestra el virus rNDVΔM1 y en detalle las regiones flanqueantes generadas luego de remover el gen M del genoma.

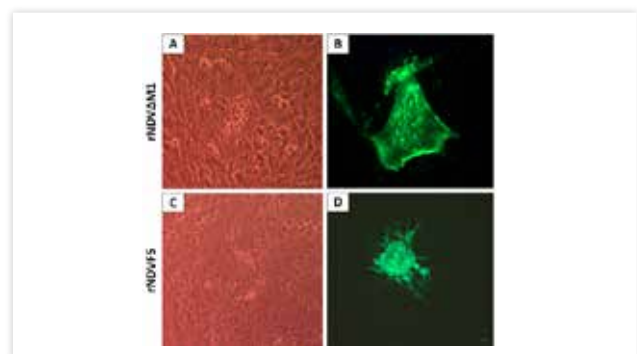


Figura 2. Morfología de la infección de rNDVΔM1 (A-B) y rNDVF5 (C-D) en células DF-1. (A y C) Sincicios observados bajo campo claro. (B y D) Inmunofluorescencia contra un anticuerpo policlonal anti-NDV y un anticuerpo secundario marcado con FITC.

Efecto de la incorporación de Interleuquina-2 de pollo (ChIL-2) bioactiva en la superficie de un virus de la enfermedad de Newcastle virulento (vNDV)

Chumbe-Mendoza A.¹, Izquierdo-Lara R.¹, Best-Cuba I.², Figueroa-Rodríguez A.³, Medina-Corrales W.², Chipana-Flores N.³, Fernández-Díaz M.^{1,2,3}.
¹ Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET ² Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, FARVET. ³ Laboratorio de Cultivo Celular y Virología, FARVET.

Trabajo de investigación presentado en el 33th Annual Meeting of the American Society for Virology (ASV), Fort Collins, Colorado - USA, 21 al 25 de junio del 2014.

INTRODUCCIÓN

La Interleuquina 2 (ChIL-2), aunque ampliamente considerada como un adyuvante útil, puede ser citotóxica, dispersar lejos del antígeno y elevar los costos de producción. El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) es una enfermedad infecciosa altamente letal en pollos pero puede ser controlada mediante la vacunación. Sin embargo, incluso las cepas lentogénicas de NDV causan reacciones post-vacunales indeseables (RPV). Hipotetizamos que un estímulo inicial de ChIL-2, asociada con la partícula de NDV, es suficiente para estimular el sistema inmune y en consecuencia reducir la RPV.

METODOLOGÍA

Hemos generado una línea celular estable a través de la transfección del plásmido de expresión pcDNA3.1+/HNIL2, que expresa una ChIL-2 unida a membrana, para esto, los dominios transmembrana e intracelular de la Hemaglutinina-neuraminidasa de NDV fueron fusionados en frame con la ChIL-2 madura. La bioactividad de la ChIL-2 de varios clones fue evaluada por citometría de flujo usando células de bazo de pollo activadas con Concanavalina-A y teñidas con CellTrace Violet. La proliferación de células T fue analizada mediante el porcentaje de células divididas y el índice de división celular. La clona de DF-1 con el mayor porcentaje de células divididas y células DF-1 normales fueron infectadas con un vNDV y ambos sobrenadantes fueron inoculados de manera intracerebral o intraorbital. El índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) se realizó inoculando el sobrenadante del cultivo en 10

pollos libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad, y fueron evaluados durante ocho días. La inoculación intraorbital se llevó a cabo 15 pollos de 10 días de edad y se monitoreó durante 20 días.

RESULTADOS

Las clonas evaluadas presentaron índices de proliferación similares, sin embargo la clona DH12-23 mostró un porcentaje de células divididas de 74,8% (Figura 1). El vNDV cubierto de ChIL-2 derivado de las células DH12-23 (vNDV/DH12-23) y el vNDV cultivado en células DF-1 normales (vNDV / DF1) mostraron ICPIs de 1.52 y 1.51, respectivamente. Por otro lado, 14 de los 15 pollos inoculados de manera intraorbital con vNDV / DF1 murieron, mientras que las aves inoculadas con vNDV / DH12-23 no mostraron mortalidad y RPV mínima.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que la ChIL-2 estimula el sistema inmune del pollo cuando es inoculado de manera intraorbital, sin embargo, en un entorno donde la respuesta mediada por células T está ausente (ruta intracerebral) la presencia de la ChIL-2 no presentó diferencias con el grupo control. Por lo tanto, NDVs cultivados en células DH12-23 fácilmente podrían prevenir la RPV, con los mismos costos de fabricación que un sistema regular basado en cultivo celular.

PALABRAS CLAVE

Interleuquina-2, virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), linfocitos T, células DF-1

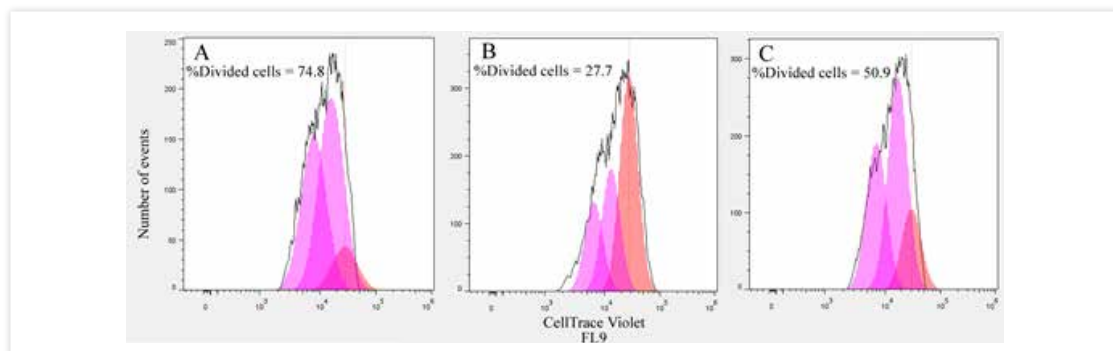


Figura 1. Curvas de proliferación de linfocitos de bazo de pollo pre-activados por Concanavalina-A y estimulados por la ChIL-2 bioactiva de células DH12-23, evaluadas por CellTrace Violet (A), estimuladas por células DF-1 como control negativo (B) y estimuladas por 20 ng / ml de ChIL-2 soluble en presencia de células DF-1 como control positivo (C).



Solución científica para la salud animal

Caracterización Biológica y Molecular de Aislados peruanos del virus de la enfermedad de Newcastle

Chumbe-Mendoza A.¹, Izquierdo-Lara R.¹, Tataje-Lavanda L.¹, Falconi-Agapito F.², Fernández-Díaz M.^{1,2}, Icochea-D'Arrigo E.³. ¹ Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. ² Laboratorio de Microbiología y Serología, FARVET. ³ Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Trabajo de investigación presentado en el Annual Meeting Denver, Colorado - USA, 26 al 29 de julio del 2014.

INTRODUCCIÓN

El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) causa una enfermedad prevalente en el Perú y el mundo. NDV es responsable de una infección viral altamente contagiosa que afecta a muchas especies de aves. Dada la importancia de NDV, son necesarias una vigilancia continua y la caracterización de aislados virulentos.

METODOLOGÍA

Ocho cepas aisladas entre 2004 y 2011 fueron evaluadas en este estudio: 3 provenientes de gallos (*Gallus gallus*), 3 de pollos de engorde (*G.gallus*), 1 de una gallina ponedora (*G.gallus*) y 1 de un pavo real (*Pavo cristatus*). Las muestras fueron evaluadas mediante dos RT-PCR basados en los genes de la matriz (M) y de fusión (F), reportados por Wise M., 2004 y validados por la *United States Department of Agriculture* (USDA). Los aislados fueron propagados en huevos embrionados de pollo específicos libres de patógenos de 9 días de edad. El RNA fue extraído a partir de muestras de fluido alantoideo con el kit QIAmp Minielute Virus Spin Kit (Qiagen). Las muestras de RNA fueron analizadas por RT-PCR de los genes M y F, el primero diseñado para detectar todas las cepas de la clase II de NDV y el segundo diseñado para diferenciar NDVs lentogénicos (no virulentos) de mesogénicos y velogénicos (virulentos), basados en los cambios de secuencia en el sitio de clivaje de la F. Se determinó la virulencia in vivo mediante el índice de patogenicidad intracerebral (IPIC), según es descrito por Alexander, 1998.

RESULTADOS

Todas las muestras evaluadas fueron positivas para el gen M. Siete aislados fueron clasificados como virulentos por el gen F; lo que se correspondió con los resultados de IPIC, los cuales resultaron estar entre 1,68 y 1,85. Por otro lado, el aislado proveniente de gallina ponedora fue negativo para el gen F y presentó un IPIC de 0,00.

CONCLUSIÓN

La mayoría de los aislamientos que circularon en Perú durante 2004 hasta 2011 fueron cepas virulentas, aisladas especialmente en *G.gallus* (gallos y pollos de engorde). Los RT-PCR validados por la USDA demostraron ser una herramienta fiable para la detección de NDVs virulentos. La secuenciación y el análisis filogenético son necesarios para la genotipificación del paramixovirus aviar de tipo I en Perú.

PALABRAS CLAVE

Virus de la enfermedad de Newcastle, gen de la proteína de Fusión, patogenicidad, RT-PCR.

Posición en la secuencia de aminoácidos							Muestras	IPIC
112	113	114	115	116	117			
GGG	AGA	CAG	GGG	CGC	CTT		Chicken-Laying/Lurin-Lima/2004	0
Gly	Arg	Gln	Gly	Arg	Leu			
AGG	AGG	CAG	AAA	CGC	TTT		Chicken-fightingbird/Lurin-Lima/2004	1.75
Arg	Arg	Gln	Lys	Arg	Phe			
AGG	AGG	CAG	AAA	CGC	TTT		Chicken-broiler/Apurimac/2005	1.78
Arg	Arg	Gln	Lys	Arg	Phe			
AGG	AGG	CAA	AAA	CGC	TTT		peacock-pet/SanMiguel-Lima/2011	1.80
Arg	Arg	Gln	Lys	Arg	Phe			
AGG	AGG	CAG	AAA	CGC	TTT		Chicken-broiler/Piura/2006	1.83
Arg	Arg	Gln	Lys	Arg	Phe			
AGG	AGG	CAG	AAA	CGC	TTT		Chicken-fightingbird/Iavictoria-Lima/2006	1.84
Arg	Arg	Gln	Lys	Arg	Phe			
AGG	AGG	CAG	AAA	CGC	TTT		Chicken-fightingbird/Barranco-Lima/2004	1.85
Arg	Arg	Gln	Lys	Arg	Phe			

112R-R-Q-K-R-F117 (Secuencia consenso de las cepas virulentas)

Figura 1. Características de los NDV aislados en Perú. A la izquierda, secuencias de los sitios de clivaje de la F de las cepas evaluadas. Al centro el nombre de las cepas aisladas. A la derecha se muestra el IPIC de cada una de las cepas.

Evaluación de vacuna oleosa inactivada de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* en cuyes

Falconi-Agapito F.¹, Flores-Pérez A.¹, Ibarra A.², Caballero C.², Montalván-Avalos A.¹, Fernández-Díaz M.¹. Laboratorio de Microbiología y Serología, FARVET. ² Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional San Luis Gonzaga.

Trabajo de investigación presentado en el XXI Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias, Arequipa, Peru, 16 al 19 de setiembre del 2014.

INTRODUCCIÓN

Las exportaciones de carne de cuy se elevaron a 11 toneladas en el año 2012. La enfermedad con mayor repercusión en la crianza comercial de este animal, debido a las elevadas tasas de mortalidad y morbilidad es la salmonelosis. *Salmonella Typhimurium* (ST) es el serotipo más frecuentemente asociado a

cuadros clínicos ocasionados por salmonelosis en cuyes, reportándose hasta un 95% más en relación a otros serotipos. En el Perú, no existe vacuna comercial que ayude a controlar los estragos producidos por esta enfermedad, por lo que la principal medida de control es en base a antibióticos.

METODOLOGÍA

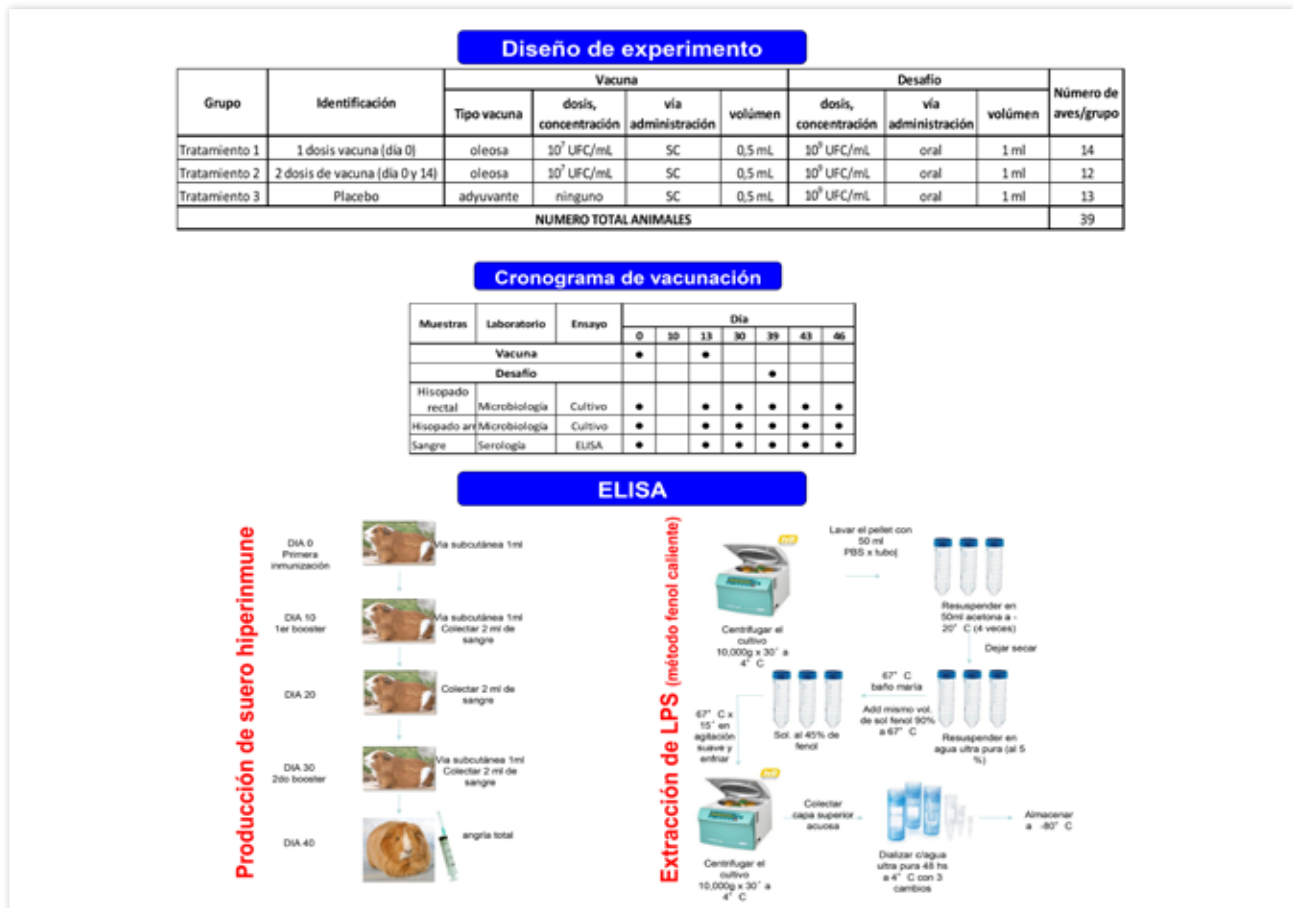
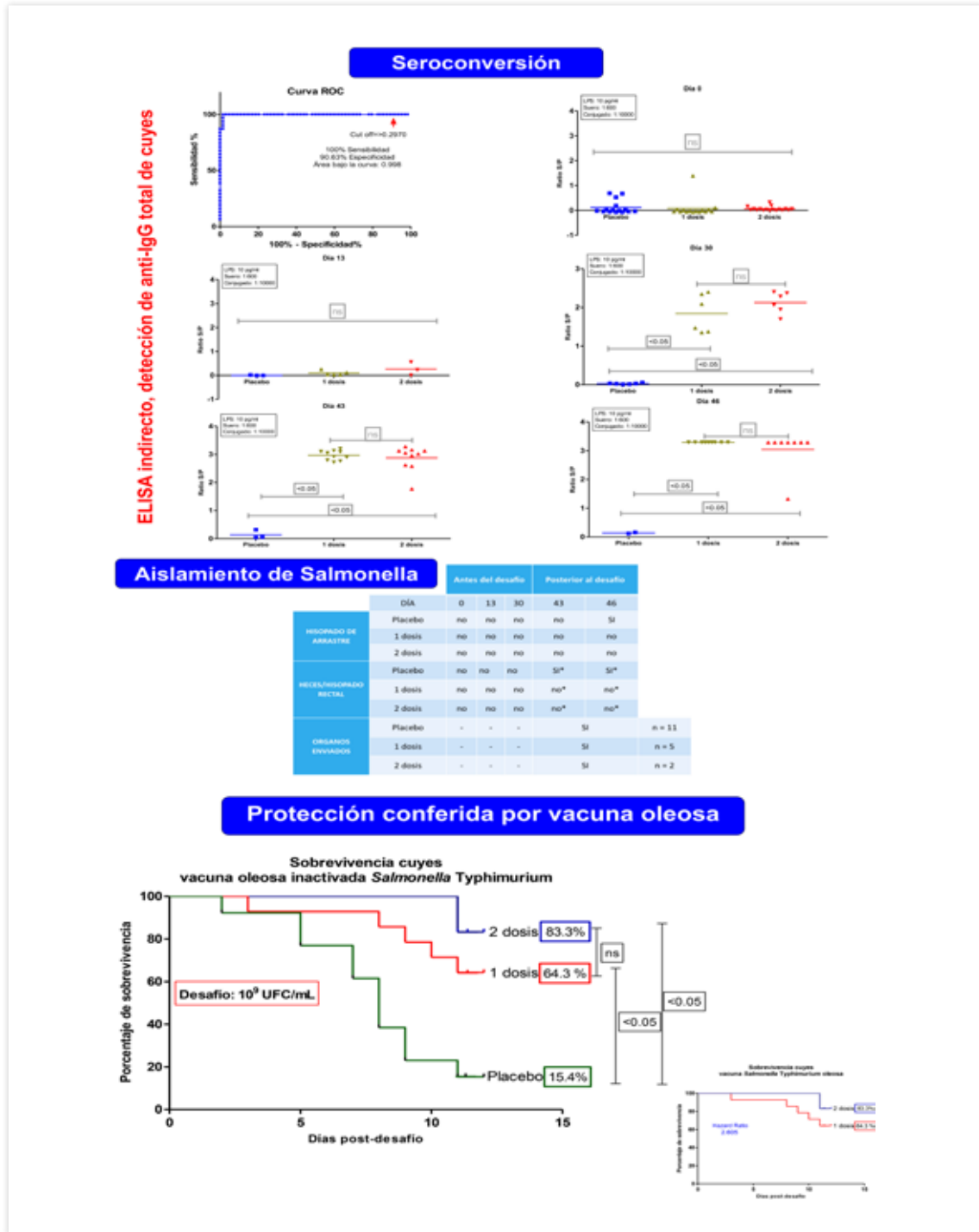


Figura 1. Flujograma de trabajo para la evaluación de la vacuna oleosa inactivada de *Salmonella entérica* serovar *Typhimurium* en cuyes.

RESULTADOS



CONCLUSIÓN

Los resultados sugieren que una vacuna oleosa inactivada en base a ST protege frente al desafío con el patógeno en condiciones controladas y por lo tanto representaría una herramienta para controlar la infección por salmonella en las explotaciones cuyeras.

No existe diferencia significativa entre la aplicación de 1 y 2 dosis de la vacuna.

El empleo de LPS como antígeno en la prueba de ELISA muestra elevada sensibilidad y especificidad pudiendo emplearse como ensayo para monitoreo serológico en campo de animales vacunado y/o desafiados por Salmonella.

Reporte de co-infección de serotipos de Fowl Adenovirus en muestras de Pucallpa

Zavaleta-Apéstegui M.¹, Perinango-Prieto C.¹, Saravia-Cahuana L.¹, Pauyac-Antezana K.², Torriani-Medrano J.², Falconi-Agapito F.³, Fernández-Díaz M.^{1,2,3}. ¹ Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. ² Laboratorio de Cultivo Celular y Virología, FARVET. ³ Laboratorio de Microbiología y Serología, FARVET.

Trabajo de investigación presentado en el XXI Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias, Arequipa, Perú, 16 al 19 de setiembre del 2014.

INTRODUCCIÓN

La hepatitis a cuerpos de inclusión es una enfermedad causada por el Fowl Adenovirus. Esta enfermedad genera grandes pérdidas en la industria avícola. A pesar de la prevalencia reportada del serotipo 4 en nuestro país, se ha detectado la presencia simultánea de los serotipos 8a y 11 en muestras provenientes de Pucallpa. Mediante el análisis de HRM, RFLP y secuenciación se pudo confirmar la co-infección de dichos serotipos. Fue necesaria la separación a partir

de los productos de PCR por medio de clonación. Se encontró que la proporción entre los serotipos era de 1 en 20. Se separaron las clonas y se secuenciaron. Las secuencias correspondieron a los serotipos 8a y 11 reportados en la base de datos del GenBank con una identidad mayor al 80%. Este constituiría el primer reporte molecular de co-infección de serotipos de diferentes especies de Fowl Adenovirus en el Perú a partir de muestras de campo.

METODOLOGÍA

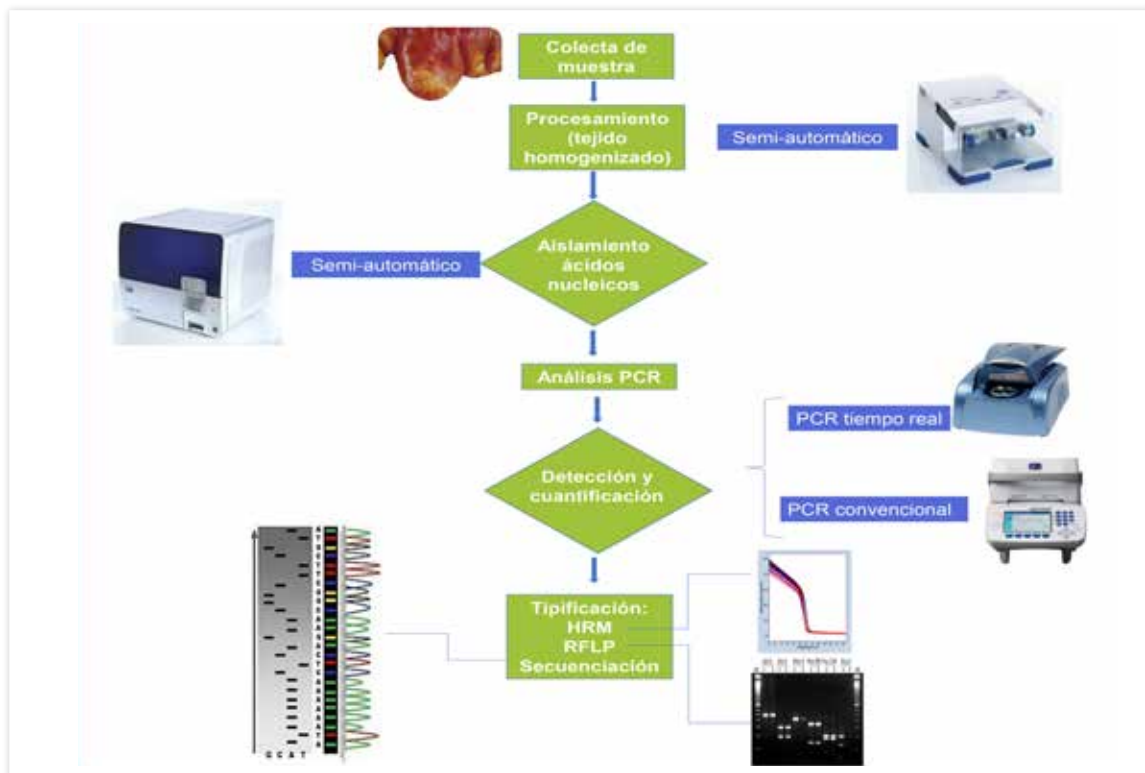


Figura 1. Flujo de trabajo para la serotipificación de Fowl Adenovirus.

RESULTADOS

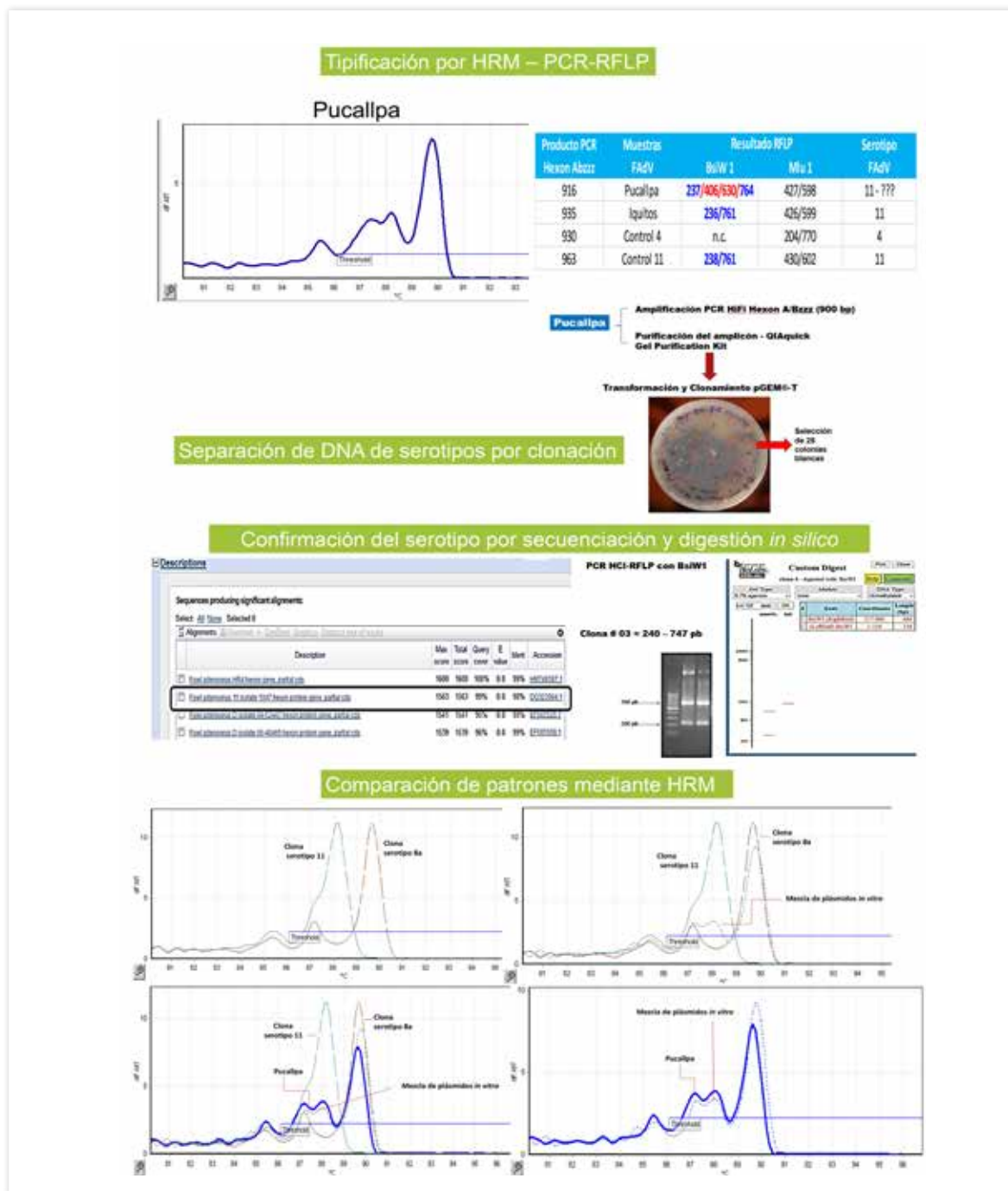



Figura 2. Serotipificación de Fowl Adenovirus mediante HRM-PCR-RFLP y confirmación mediante secuenciación.

CONCLUSIÓN

Los métodos de tipificación empleados permitieron detectar y discriminar a nivel molecular la presencia de dos serotipos de especies diferentes de Fowl Adenovirus. La secuenciación permitió confirmar los serotipos detectados. Los signos clínicos observados (mortalidad, petequias en el hígado, etc.) correspondieron a un aislado altamente virulento. La presente investigación constituye el primer reporte de co-infección de serotipos (8a y 11) de especies diferentes (E y D) en muestras de campo provenientes del oriente del país.



 Solución científica para la salud animal

Expresión y evaluación de la glicoproteína G como un candidato potencial a vacuna contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (ILTV)

Morales-Ruiz S.¹, Bendezú-Eguis J.J., Figueroa-Rodríguez A.², Falconi-Agapito F.³, Best-Cuba I.⁴, Choque-Moreau E.⁵, Fernández-Díaz M.^{1,2,3,4,5}.
¹Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. ²Laboratorio de Cultivo Celular y Virología, FARVET. ³Laboratorio de Microbiología y Serología, FARVET. ⁴Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, FARVET. ⁵Laboratorio de Producción de Biológicos, FARVET.

Trabajo de investigación presentado en The International Society for BioProcess Technology (ISBioTech), Washington DC - USA, 9 al 11 de marzo del 2015.

INTRODUCCIÓN

La glicoproteína G (gpG) es una proteína secretada por células infectadas con el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (ILTV, siglas en inglés) la cual facilita la evasión del sistema inmune del huésped mediante la interacción con quimoquinas.

METODOLOGÍA

La proteína recombinante gpG (rgpG) fue obtenida mediante el uso del sistema de expresión de proteínas Bac-to-Bac (Life Technologies). gpG fue modificada para favorecer la expresión de éstas en la membrana de las células de insecto (Sf9), además la secuencia codificante de gpG fue fusionada a la proteína fluorescente DsRed2 para monitorear su localización celular.

RESULTADOS

Los ensayos de citometría de flujo determino que 90% de las células de insecto expresaban DsRed2 en su membrana celular. Adicionalmente, se detectó reactividad positiva para el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) usando suero de aves infectadas con ILTV (Charles River Laboratories International Inc., EE.UU).

Pollos SPF de 14 días de edad fueron divididos en tres grupos e inmunizados intravenosamente: (A) inóculo por pollo: 0.84×10^7 de células de insecto que expresan gpG en su membrana celular (n=5); (B) inóculo por pollo: 3×10^7 UFP de sobrenadante de células de insecto que expresan gpG en su membrana celular

(n=5); (C) inóculo por pollo: 0.84×10^7 de células de insecto (grupo control) (n=3). Todos los grupos fueron desafiados intranasalmente a los 35 días después de la inmunización usando virus de campo aislado en Perú (dosis: 103 TCID₅₀). El ensayo de ELISA indirecto detectó producción de anticuerpo contra gpG desde la primera hasta la quinta semana después de la inmunización. Las primeras manifestaciones de los signos clínicos se observaron al tercer día después del desafío en 67% para el grupo C, 80% para el grupo B y 20% para el grupo A. Se detectó carga viral en muestras tomadas de hisopados traqueales para el grupo C y B (103 and 105 copias virales/ul respectivamente) mientras que en el grupo A no se detectó carga viral mediante ensayos de qPCR.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que las células de insecto que expresan gpG en su membrana celular podrían tener un posible rol protectoro contra ILTV, no obstante más evaluaciones son necesarias para determinar su importancia como vacuna potencial contra ILTV.

PALABRAS CLAVE

gpG, ILTV, baculovirus, célula de insecto



Solución científica para la salud animal

Reporte del aislamiento de dos nuevas variantes del virus de bronquitis aviar en el PERÚ

Tataje-Lavanda L.¹, Requena-Anicama D.², Montalván-Avalos A.³, Huamán-Gutiérrez K.I., Fernández-Díaz M.^{1,2,3}, ¹Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. ²Laboratorio de Bioinformática, FARVET. ³Laboratorio de Microbiología y Serología, FARVET.

Trabajo de investigación publicado en los medios avícolas: Actualidad Avípecuaria, MAP, Engormix y Sector Pecuário, 12 de junio del 2015.

RESUMEN

El virus de la bronquitis aviar (IBV) es un patógeno viral económicamente importante en la industria avícola y en el presente estudio se aislaron 2 variantes de IBV que difieren claramente de la cepa vacunal Massachusett. Para ello, se colectaron muestras de tejido traqueal de pollo con sintomatología sospechosa de IBV provenientes de diferentes granjas del Perú. Se secuenciaron los genes S1 de muestras positivas a IBV y por análisis filogenéticos se clasificaron las cepas como genotipos cercanos Sur Americano II (A/SAII) y similar al genotipo Sur Americano I (SAI) (Marandino et al., 2015). Dentro de las cepas evaluadas: La cepa VFAR-77 (2015) está cercanamente emparentada al genotipo SAI y las cepa VFAR-75 (2015) pertenece al genotipo A/SAII.

INTRODUCCIÓN

El virus de la bronquitis aviar (IBV, del inglés Infectious Bronchitis Virus) es un patógeno altamente contagioso que causa serios problemas económicos a la industria avícola mundial, afectando tanto a gallinas ponedoras como a pollos broilers (Mondal et al., 2012).

Las frecuentes mutaciones y recombinaciones genéticas son las principales causas del surgimiento de nuevos serotipos de IBV, y estos confieren poca o nula protección cruzada, lo cual genera un mayor desafío en cuanto a la prevención y control de IBV (Ababneh et al., 2012; Mo et al., 2013; Song et al., 2013). Recientemente diversas variantes de IBV han emergido en Latinoamérica causando problemas respiratorios, nefropatogénicos y reproductivos los cuales requieren cambios dramáticos en los programas de vacunación, por ello la continua determinación de la epidemiología de los serotipos y producción de nuevas vacunas son cruciales para el control de IBV en cada región geográfica del país (Feng et al., 2012; Marandino et al., 2015).

El IBV es miembro del género Gammacoronavirus, subfamilia Coronavirinae, familia Coronaviridae y orden Nidovirales (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2014). Su genoma de aproximadamente 27.6 kilobases (kb) está compuesto por ARN de sentido positivo de cadena simple (ssRNA+). Dentro de las proteínas estructurales tenemos la Glicoproteína Spike (S), que es clivada post-transcripcionalmente en dos subunidades (S1 y S2) (Mo et al., 2013). La porción S1 es altamente variable pudiendo diferir de 20% a 50% en su composición de aminoácidos entre serotipos esta propiedad convierte a S1 en un gen ideal para tipificación molecular de IBV por RT-PCR y secuenciación (Ababneh et al., 2012). La habilidad del IBV de mutar continuamente ofrece una oportunidad única a la comunidad científica para detallar estudios en la dinámica de subpoblaciones virales que es requerida para una mejor comprensión de la evolución de IBV y su epidemiología (Li et al., 2013).

METODOLOGÍA

Se recolectaron pollos broilers con sintomatología atípica de Bronquitis procedentes de diversas granjas a nivel nacional. Se tomaron las tráqueas, se extrajo el ARN con el kit QIAamp®MinElute Virus Spin (Qiagen, Alemania) según instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Se amplificó el gen N con el kit QuantiFast®Probe RT-PCR (Qiagen, Alemania) en un volumen final de 20 µl que contenía 0.4 µM de cada primer, 0.3 µM de sonda Taqman (Meir et al., 2010). Se usó el ciclado sugerido por los fabricantes en el Rotor-Gene®Q (Qiagen, Alemania). Se seleccionaron las tráqueas positivas, se homogenizaron en PBS estéril, se filtró a 0.22 µM y se inocularon en la cavidad alantoidea por 9 días en huevos SPF para incrementar el título viral. El fluido fue cosechado después de 72 horas. Se extrajo el ARN viral y se amplificó el gene

S (Feng et al., 2012) con el kit OneStep®RT-PCR Kit (Qiagen, Alemania), la reacción contenía 0.6 µM de cada primer y 5 µl de ARN, en un volumen final de 25 µl. El ciclado se realizó con 50°C por 30 min (incubación), 95°C por 15 min, 40 ciclos (94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg, 72°C por minutos) y una elongación final de 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 2% y posteriormente enviados a secuenciar (Macrogen, Korea).

El alineamiento y la reconstrucción filogenética exploratoria fue realizada usando el programa MEGA6 (Tamura et al., 2013), el alineamiento fue realizado por el algoritmo Clustal W. Para la reconstrucción filogenética, se construyó un árbol inicial usando el algoritmo Neighbour-Joining con un bootstrap de 1000. Este árbol fue usado como semilla para construir un nuevo árbol filogenético con el método Maximum Likelihood con una tasa de variación en entres posiciones uniforme, con modelo de sustitución Jukes-Cantor y un bootstrap de 1000.

RESULTADOS

La empresa Farvet realiza monitoreos continuos a lo largo del país, como parte de su programa de vigilancia continua en busca de nuevas amenazas virales y bacterianas que afecten a la industria avícola. En el año 2014, al norte del país se encontraron casos de IBV atípicos, la mayoría de ellos presentando cuadros respiratorios suaves y no mortales (Tataje-Lavanda et al., 2016).

En ésta oportunidad a lo largo del año 2015, se encontraron nuevos casos de IBV atípicos al norte y sur del país de los cuales colectamos 2 cepas nuevas. En base a nuestro análisis del gen S1, el aislado VFAR-75 se agrupó con un bootstrap de 99 junto VFAR47 (Tataje-Lavanda et al., 2016), ubicándose dentro del grupo Sur Americano II (A/SAII), pero con mayor similitud a las cepas Chinas y Taiwanesas que a las cepas sudamericanas. En el caso del aislado VFAR-77 se ubicó próximo al grupo Sur Americano I (SAI) con un bootstrap de 67, sin embargo para establecer con mayor precisión su clasificación, se requieren estudios posteriores con mayor número de aislamientos (Fig. 1).

CONCLUSIONES

El genotipo SAI ha sido encontrado en otros países como Argentina, Brasil, Uruguay y Perú; mientras que el genotipo A/SAII ha sido reportado en Argentina, Uruguay, China y Taiwán (Marandino, 2013; Marandino et al., 2015; Tataje-Lavanda et al., 2016). Ambos genotipos difieren de la cepa vacunal Massachusetts y tienen la habilidad de evadir la respuesta inmune de este tipo de vacuna (Marandino et al., 2015).

La secuenciación de nucleótidos junto con el análisis genético brindan un rápido y preciso método para clasificar serotipos, y son un poderoso instrumento para monitorear la evolución filogenética y epidemiológica de los subtipos de IBV (Han et al., 2011). Con los últimos hallazgos que hemos reportado, demostramos que existe una emergencia de variantes de IBV en el Perú, por este motivo se requiere vigilar de manera periódica la emergencia de nuevas variantes virales.

PALABRAS CLAVE

Virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV), Genotipo Sur Americano I (SAI), Genotipo Sur Americano II (A/SAII), PCR, Análisis filogenético.

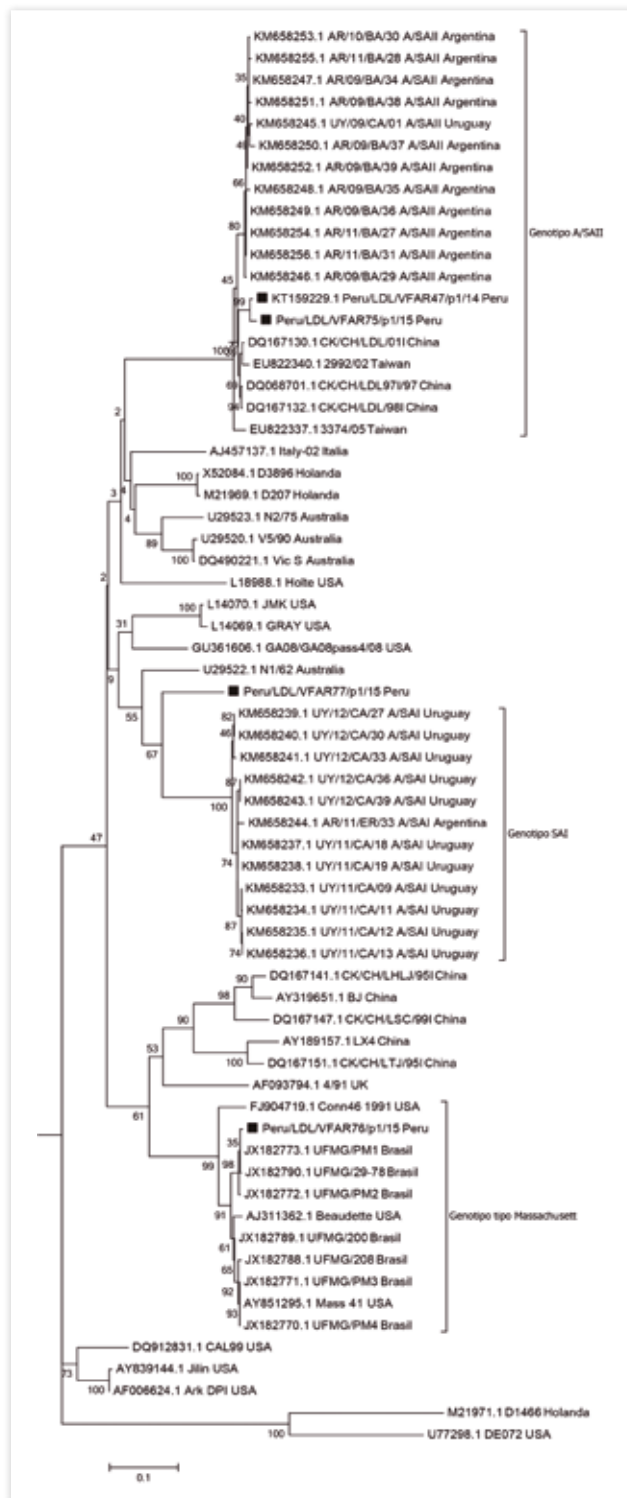



Figura 1. Análisis filogenético inferido usando método Maximum Likelihood. La reconstrucción filogenética fue realizada usando la región hipervariable (HVR) 1 y 2 del gen S1 de las cepas referenciales de IBV y aislamientos hechos por Farvet. Los números sobre los nodos indican el valor de bootstrap de los clados formados. Los recuadros en negro señalan las cepas de IBV aisladas por Farvet.



 Solución científica para la salud animal

Expresión de la glicoproteína J del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar en la envoltura viral de baculovirus y su capacidad de activación de PBMCs de aves.

Morales-Ruiz S.¹, Bendezú-Eguis J.¹, Medina-Corrales W.², Choque-Moreau L.³, Figueroa-Rodríguez A.³, Montalván-Avalos A.⁴, Fernández-Díaz M.^{1,2,3,4}. ¹ Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. ² Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, FARVET. ³ Laboratorio de Cultivo Celular y Virología, FARVET. ⁴ Laboratorio de Microbiología y Serología, FARVET.

Trabajo de investigación presentado en el XI Congreso Argentino de Virología y II Congreso Latino Americano de Virología, Buenos Aires - Argentina, 23 al 26 de junio del 2015.

INTRODUCCIÓN

El virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (ILTV, siglas en inglés) es el agente causante de pérdidas económicas en la industria avícola mundial. ILTV, subfamilia alphaherpesviridae, causa reducción en la producción de huevos así como desórdenes agudos en el tracto respiratorio de pollos que conllevan a la muerte por asfixia. El desarrollo de nuevas vacunas que confieran una mayor protección de la respuesta inmune es necesario para evitar la diseminación de los focos de infección causados por ILTV. La glicoproteína J (gpJ) representa el principal antígeno presente en la envoltura viral de ILTV y está relacionado a procesos de invasión. Debido a éstas características, gpJ ha sido seleccionado como un potencial candidato a vacuna.

METODOLOGÍA

Se obtuvo un baculovirus recombinante que exprese en su membrana viral la gpJ fusionada a la proteína Dsred2 (Bv-gpJ). Mediante ensayos de Western blot utilizando anticuerpos anti his se detectó la presencia de la gpJ en membranas de células de insecto a los días 1 y 2 post-infección utilizando MOIs de 1, 5 y 20. Se utilizó el Bv -gpJ y baculovirus wild- type para infectar células de insecto que luego de fueron lisadas y sus membranas utilizadas como antígenos para ensayos de ELISA indirecto con sueros de aves infectadas experimentalmente con ILTV, estos ensayos confirmaron la presencia de gpJ en las células de insecto infectadas.

El sobrenadante de las células infectadas fueron concentradas por filtración tangencial (10 veces),

seguido de un paso de ultracentrifugación en sucrosa (10 veces) para obtener Bv-gpJ concentrado. Este concentrado fue utilizado para ensayos de seroneutralización con sueros de aves infectadas con ILTV así como sueros de pollos libres de patógenos (SPF, siglas en inglés) en células insecto.

RESULTADOS

No se detectó fluorescencia a los 7 días post-infección en los sueros de aves infectadas hasta la dilución 1/16 demostrando así la posible exposición de gpJ en la membrana viral de baculovirus y su reconocimiento por anticuerpos presentes en el suero. Además, los Bv concentrados fueron utilizados para ensayos de transducción en células mononucleares periféricas sanguíneas (PBMCs, siglas en inglés) de aves. Se determinó una relación lineal entre la dosis de baculovirus modificados utilizados para transducir PBMCs (expresados en MOIs) con la producción de IL-12 (pg/ml) y la expresión de MHC-2 en la superficie de los PBMCs (1.5 veces).

CONCLUSIÓN

Una vacuna es óptima si es capaz de evocar una respuesta inmune primaria frente al agente extraño, para este caso la producción de IL12 y PBMCs expresando MHC-2 es un indicio de la activación de los PBMCs, lo que indica que Bv-gpJ es capaz de estimular la respuesta inmune innata del ave. Futuros ensayos son necesarios para corroborar su potencial como vacuna.

PALABRAS CLAVE

gpJ, ILTV, baculovirus, célula de insecto, PBMC, IL-12

Avian Metapneumovirus in Cytodex 1 Microcarrier-Based Vero cell Culture

Figuroa-Rodríguez A.¹, Pauyac-Antezana K.¹, Fernández-Díaz M.¹. ¹Laboratorio de Cultivo Celular y Virología, FARVET.

Trabajo de investigación presentado en el 34th Annual Meeting of the American Society for Virology, Colorado - USA, 11 al 15 de julio del 2015

INTRODUCCIÓN

Avian metapneumovirus (aMPV) causes turkey rhinotracheitis (TRT) and is associated with swollen head syndrome (SHS) in chickens (1), resulting in heavy economic losses for poultry industry (2). Traditional vaccines have been produced in embryonated chicken eggs. However, egg-based vaccines have the disadvantages of being labor-intensive, time consuming and requires large area for the incubation of eggs (3). Cell cultures on the other hand are more convenient, less expensive than eggs and also convenient to examine microscopically for evidence of viral proliferation. Microcarrier technology, was introduced by Van Wezel for culturing anchorage-dependent cells in suspension, is easily applied in stirred tank bioreactors; it is scalable, and able to produce high number of cells per volume ratio (4). Microcarrier cell culture system offers many advantages over conventional flasks or bottle cultures in growing anchorage-dependent cells and has been used for the industrial manufacture of diverse vaccines (3,5). In this work, we evaluated the effects of time of infection (TOI) on virus production and propagation of subtype A avian metapneumovirus (aMPV-A) in Vero

cells grown on Cytodex-1 microcarriers.

METODOLOGÍA

Cell Culture: Vero cell line obtained from Cell Line Service (CLS) was used in this study. Culture media was Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12 1:1 (DMEM/F-12) supplemented with 5% FBS.

In order to prepare inocula for microcarrier-based cultivations, cells were propagated in culture flasks at 37°C under 5% CO₂ atmosphere. After reaching confluence, cells were trypsinized, counted and used to inoculate spinner flasks at a ratio of 4 x 10⁵ cells/mL. Experiments were carried out in 125 mL-spinner flasks with a working volumen of 100 mL, containing 3 g/L of cytodex 1 microcarriers, at 37°C and 40 rpm under 5% CO₂ atmosphere. Microcarriers were prepared according to the manufacturer's instructions. Before infection, samples from spinners were taken every 12 hours for evaluation of glucose and lactate concentrations.

Infection conditions: For virus infection, agitation was stopped to settle down microcarriers and the culture

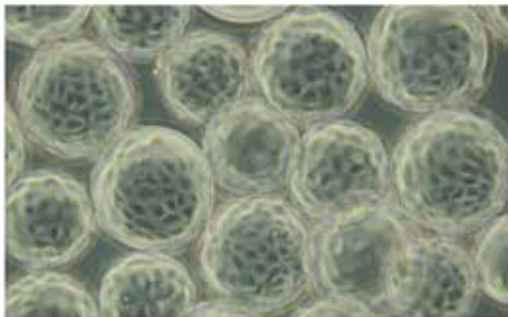


Figure 1. Vero cells morphology after 48 h of growth.

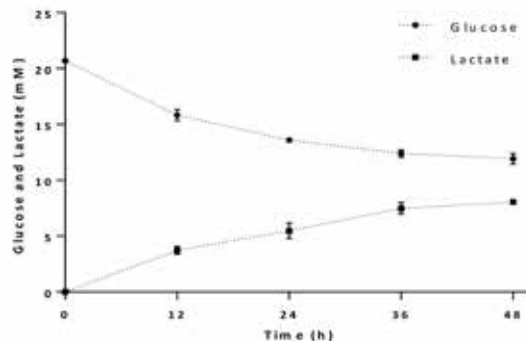


Figure 2. Glucose and lactate concentrations during culture of Vero cells on cytodex 1.

media was removed, then agitation was restarted and 35 mL of culture media containing the subtype A avian metapneumovirus was added to the spinner. After a period of one hour for virus adsorption onto the cells, more culture media was added until the working volume reaches 100mL. Multiplicity of infection (MOI) of 0.005 was used and infection was carried out 48 h post-inoculation. After infection, samples were taken every 12 hours to determine virus titer.

Analytical methods: To measure cell concentration, cells removed from microcarriers by trypsinisation were counted using a neubauer chamber. Glucose and lactate concentrations were quantified using a reflectometer (RQflex 10). Virus titer was determined by plaque assay on Vero cell monolayers. All experiments were done in triplicate.

RESULTADOS

Vero cell growth on cytodex 1 microcarriers

The microcarriers were confluent after 48 h (figure 1), reaching a cell concentration of $9.85 \pm 0.28 \times 10^5$ cells/mL. Along cultivation, glucose concentration was declining because cells use it as a carbon and energy source to grow, producing lactate in the process which was accumulated in the medium (figure 2).

Effects of TOI on virus production

Syncytium formation appeared after 36 hours post-infection (figure 3A) and in the next hours cytopathic effect (CPE) on Vero cells was increasing (figure 3B and 3C) until almost all cells were detached from microcarriers and lysed by the virus 72 hours post-infection (figure 3D). Moreover, a maximum virus titer of $8.2 \pm 2.23 \times 10^7$ pfu/mL was obtained 60 hours post-infection (figure 4). Virus titer stopped increasing at 60 hours post-infection, exactly when cytopathic effect started to rapidly increase as can be observed in figure 3, which is related with a low cell viability.

CONCLUSION

In contrast to virus titer of 3×10^6 pfu/mL obtained previously using T-flask or roller bottle in our laboratory (data not shown), high yield of virus titer could be achieved using microcarrier-based cell culture (approximately 27 times more than T-flask), which represent a promising alternative for the production of vaccines. To the best of our knowledge, this is the first report describing production of aMPV based on microcarriers, constituting valuable information on the development of a large-scale microcarrier cell culture process for producing aMPV vaccine.

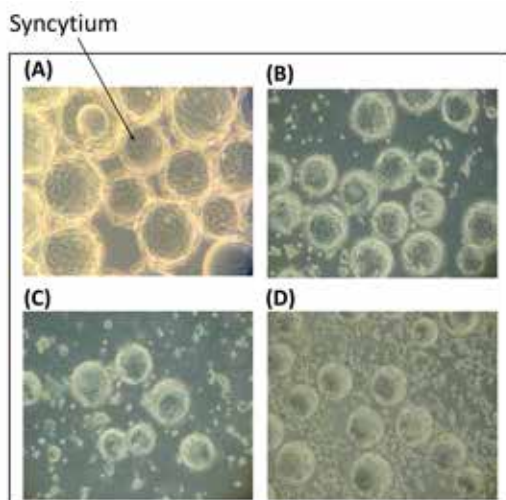


Figure 3. CPE after virus infection of cultures. (A) 36 hpi; (B) 48 hpi ; (C) 60 hpi and (D) 72 hpi.

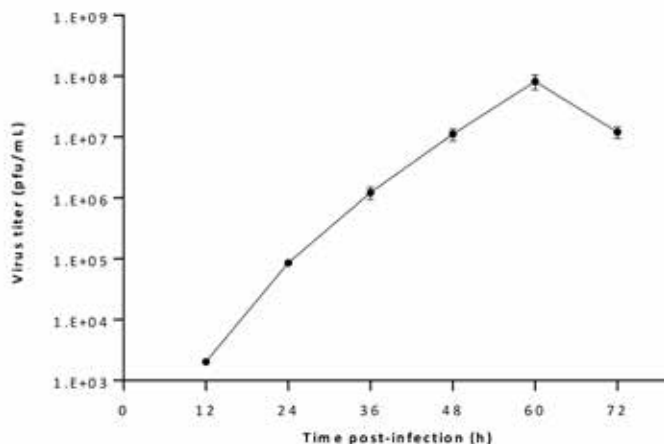


Figure 4. Virus production in spinner flasks. Viral infection was carried out at a MOI of 0.005.

Efecto del cambio de posición del gen de la Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN) hacia la región proxima al promotor en la virulencia del virus de la enfermedad de Newcastle

Izquierdo-Lara R.¹, Chumbe-Mendoza A.¹, Montalván-Avalos A.², Fernández-Díaz M.^{1,2}. ¹Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. ² Laboratorio de Microbiología y Serología, FARVET.

Trabajo de investigación presentado en el 34th Annual Meeting of the American Society for Virology (ASV), Colorado - USA, 11 al 15 de julio del 2015.

INTRODUCCIÓN

El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) es una enfermedad respiratoria altamente contagiosa y mortal en aves de corral. Las vacunas vivas atenuadas se han utilizado para controlar la enfermedad, sin embargo, por lo general causar reacciones post-vacunación que conducen a una disminución en la producción. Una estrategia para controlar la expresión génica, la replicación viral y la virulencia en Mononegavirales es el reordenamiento de genes. Aquí hemos desarrollado un nuevo NDV (rHNDVF5) cuyo gen HN ha sido cambiado desde la quinta hacia la primera posición en el genoma.

METODOLOGÍA

Sobre la base del plásmido pCI / NDVF5, utilizado anteriormente para recuperar el virus parental rNDVF5, el virus rHNDVF5 fue construido. El virus

rNDVF5 se deriva de la cepa LaSota cuyo sitio de clivaje en la proteína de fusión (F) fue modificado a un motivo polibásico (111GRRQKR↓F117). Primero, se eliminó el gen HN del plásmido pCI/NDVF5, luego, el casete de la proteína HN, compuesto del ORF de la HN y flanqueado por las secuencias 3' y 5' UTR del gen de la Nucleoproteína, fueron introducidas en la región 3' próxima al promotor del genoma (ver figura 1). La recuperación se realizó por co-transfección del plásmido pCI / HNDVF5 junto con plásmidos de soporte, pCI-N, pCI-P y pCI-L, en células Vero utilizando el sistema de la RNA-polimerasa II; luego el sobrenadante se inoculó en huevos embrionados de pollo SPF de 8 días de edad.

Pruebas de hemaglutinación y RT-PCR se llevaron a cabo para verificar la recuperación de rHNDVF5. Un SDS-PAGE de las partículas purificadas se llevó a cabo

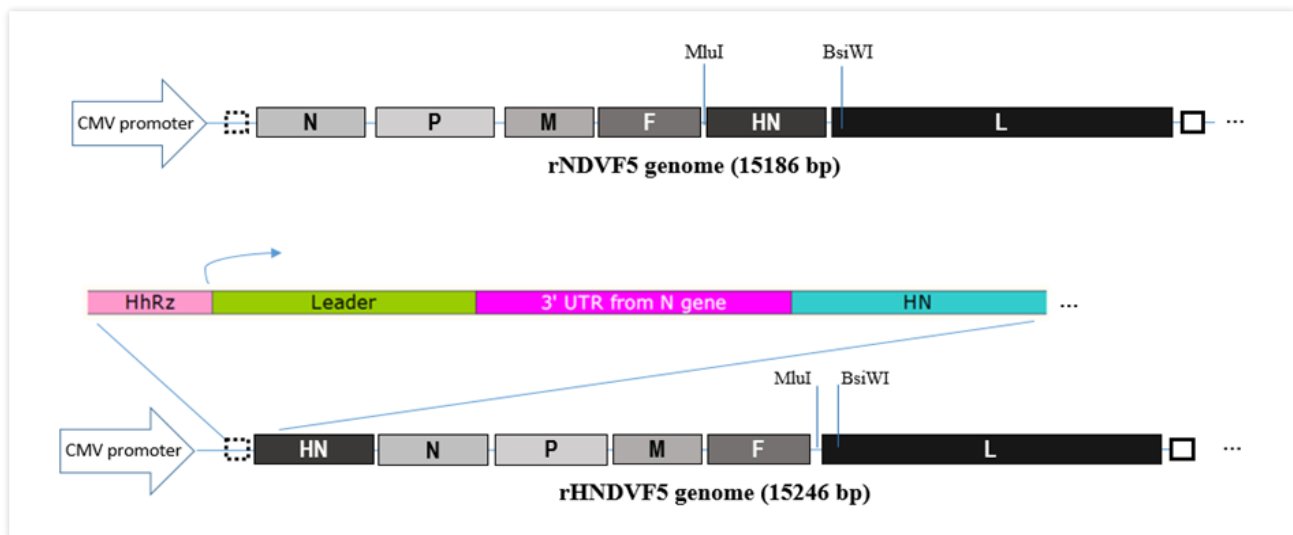


Figura 1. Mapas genéticos de los plásmidos que codifican el genoma completo de los virus recombinantes. Arriba el virus parental rNDVF5 y abajo el NDV recombinante rHNDVF5.

para evaluar la proporción de proteínas en los viriones ensamblados. Para evaluar la patogenicidad, se evaluó el índice patogenicidad intracerebral (ICPI) de rNDVF5 y rHNDVF5, según lo descrito por Alexander, 1998.

RESULTADOS

El virus rHNDVF5 fue recuperado exitosamente con altos títulos. El análisis del SDS-PAGE mostró que hubo una diferencia de 2.6 veces en la proporción de HN incorporado en rHNDVF5 respecto al virus parental (figura 2). Por otro lado, la evaluación de la expresión de la proteína HN en células DF-1 por citometría de flujo mostró que inicialmente rHNDVF5 expresa más proteína HN que el virus parental rNDVF5 (figura 3).

Sin embargo, luego de 14 horas el virus parental parece la cantidad de HN expresada en el virus parental iguala y sobrepasa a la de rHNDVF5 (figura 3). Finalmente, el ICPI reveló una reducción en la patogenicidad de 1.6 (rNDVF5) a 1.3 (rHNDVF5) al mover el gen de la HN.

CONCLUSIÓN

El reordenamiento de genes puede ser explotado para diseñar vacunas de NDV, tanto con menor patogenicidad, así como para mejorar su antigenicidad.

PALABRAS CLAVE

virus de la enfermedad de Newcastle, reordenamiento de genes, expresión de proteínas, Hemaglutinina-neuraminidasa.

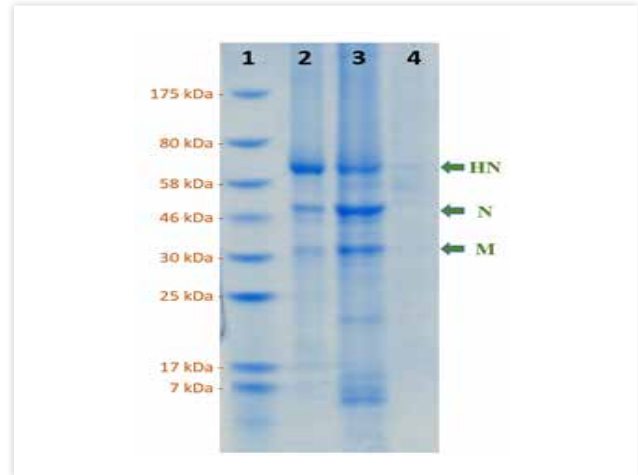


Figura 2. Análisis de la proporción de proteínas en los virus recombinantes por SDS-PAGE. Carril 1: Marcador de peso molecular (7-175 kDa). Carril 2: rHNDVF5 semipurificado por ultracentrifugación. Carril 3: rNDVF5 semipurificado por ultracentrifugación. Carril 4: Control negativo (fluido alantoideo con el mismo tratamiento que los virus). HN: proteína hemaglutinina-neuraminidasa; N: nucleoproteína; M proteína Matriz.

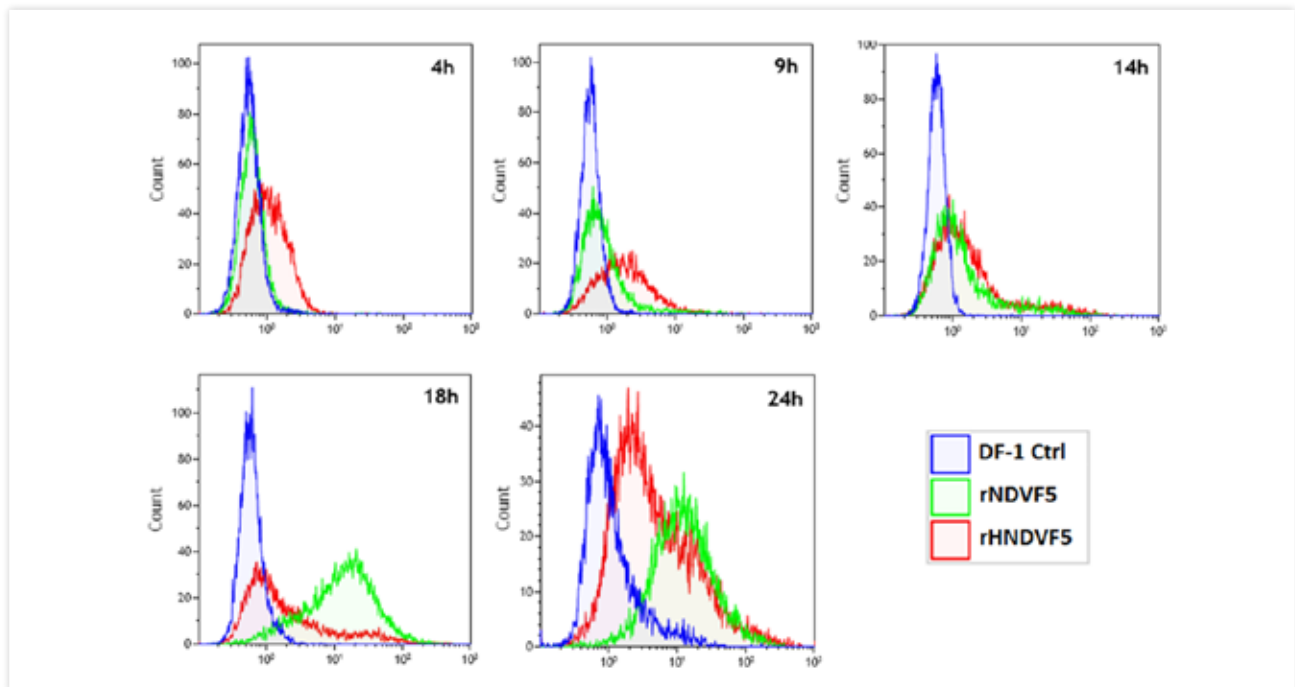


Figura 3. Comparación de la expresión de la proteína HN en células DF-1, tanto para rNDVF5 como para rHNDVF5. Se analizó la expresión de la proteína HN por citometría de flujo. La expresión de la proteína HN por parte de rHNDVF5 parece ser mayor en el inicio de la infección (4 y 9 hpi) en comparación con rNDVF5. Sin embargo, después de 14 hpi la expresión de la HN fue igualada por el virus parental y, por último, luego de 18 hpi la expresión fue mayor en el virus parental. La citometría fue realizada con un anticuerpo monoclonal anti-HN.

Desarrollo de una vacuna multiepitópica contra el virus de influenza aviar A-H5N1 en base a herramientas inmunoinformáticas

Ramírez-Sáenz M.¹, Requena-Anicama D.¹, Valdivia-Olarte H.¹, Bueno-Basurco C.¹, Saravia-Cahuana L.², Ponce-Almeri R.², Fernández-Díaz M.^{1,2}, Zímic-Peralta M.². ¹ Laboratorio de Bioinformática, FARVET. ² Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET.

Trabajo de investigación publicado en los medios avícolas: Actualidad Avipecuaria, MAP y Engormix, 03 de noviembre del 2015.

INTRODUCCIÓN

La gripe aviar es una enfermedad infecciosa viral de las aves. El virus de la influenza aviar infecta no sólo a las aves silvestres, sino también a las aves de corral domésticas y causan brotes a gran escala, generando repercusiones en la economía local, mundial y el comercio internacional. La mayoría de los virus de la gripe aviar normalmente no afectan a los humanos, sin embargo existen subtipos que sí lo logran, como el A-H5N1 y A-H7N9, generando graves consecuencias (1). Se calcula que en el mundo han muerto cerca de 800 millones de aves de diferentes especies (2).

Para prevenir la infección efectiva con el virus de la influenza se recurre al uso de vacunas. En general, el desarrollo de vacunas convencionales (vivas, atenuadas) es un proceso que puede tomar entre 10 a 15 años. Además del prolongado tiempo de desarrollo, una de las mayores limitantes de las vacunas compuestas por virus atenuados es el riesgo de reactivación del patógeno. Frente a ello, existe otro tipo de vacunas basadas en proteínas recombinantes, las cuales son más seguras. Sin embargo, estas incluyen un alto costo de producción y generalmente se limitan a un número reducido de antígenos empleados, por lo cual no alcanzan una efectividad óptima. En estos últimos años, el Laboratorio FARVET S.A.C. ha venido desarrollando una investigación novedosa y pionera en inmunoinformática aviar, la cual se basa en conocimientos de genómica, bioinformática, biología molecular e inmunología aviar. Como primeros resultados, ha logrado la predicción de epítopes inmunogénicos de diversas proteínas de la influenza aviar A-H5N1 y el desarrollo de una proteína multiepitópica potencialmente protectora contra la gripe aviar.

LA GRIPE AVIAR

El virus de la influenza A es un virus segmentado, cuyo genoma está compuesto de 8 segmentos de RNA de una sola cadena codificante en sentido negativo. Tres de estas proteínas se expresan en la membrana y son incorporadas sobre la envoltura del virión: Hemaglutinina (HA), Neuraminidasa (NA) y la proteína matriz (M1 y M2). La bicapa lipídica del virus es una estructura de mosaico que incluye lípidos saturados, no saturados, colesterol y componentes derivados de la membrana plasmática del huésped. Incluye además otras cinco proteínas: la polimerasa B2 (PB2), la polimerasa A (PA), la proteína de nucleocápside (NP), la polimerasa B1 (PB1) y la proteína no estructural (NS1 y NS2) (3) (Figura 1).

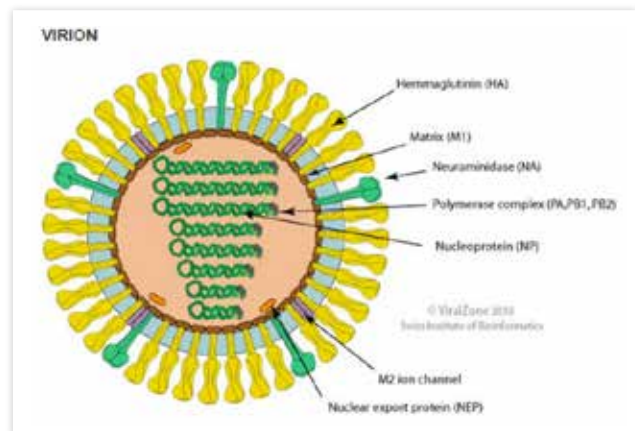


Figura 1. Estructura del virión del virus de la influenza A.

El complejo de mayor de histocompatibilidad El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), juega un rol importante en la respuesta inmunológica mediante la presentación de fragmentos (epítopes) de bacterias, virus y/o parásitos a los linfocitos (4). Los epítopes son la mínima unidad inmunológica capaz de estimular una respuesta inmune. Luego de darse el reconocimiento de los epítopes y la formación del complejo CMH-epítope, estos son presentados a los receptores de los linfocitos T. Las moléculas del CMH son de dos tipos: clase I y clase II, los cuales producen la activación de los linfocitos CD8+ y CD4+, respectivamente (Figura 2).

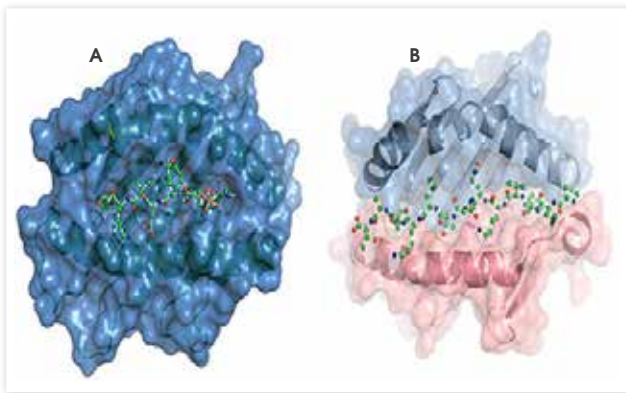


Figura 2. A. Estructura 3D del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Tipo I contenido en un epítope en el surco, el cual está conformado por la subunidad alfa. B. Estructura 3D del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Tipo II contenido en un epítope en el surco, el cual está conformado por las subunidades alfa y beta.

INMUNOINFORMÁTICA

La inmunoinformática es un área novedosa, que consiste en la aplicación de la bioinformática y la inteligencia artificial para el estudio del sistema inmunológico. Esta disciplina emergente aborda aspectos importantes de inmunología y vacunología, basándose en el análisis de grandes bases de datos de pruebas experimentales para desarrollar métodos de predicción. Ello permite obtener candidatos con mayor probabilidad de éxito, permitiendo reducir el número de pruebas experimentales necesarias (5).

Entre sus ventajas, la inmunoinformática permite la identificación computacional de potenciales epítopes, mediante la predicción de afinidad entre un péptido cualquiera y el CMH y bajo la hipótesis que seleccionar a los péptidos con buena afinidad con el CMH predispone a una posterior presentación a los linfocitos T y el desarrollo de una respuesta inmune efectiva (6).

MATERIALES Y MÉTODOS

Secuenciamiento de los genes del CMH I y II del pollo Cobb

Se realizó el secuenciamiento de los genes de las cadenas alfa y beta que conforman el CMH del pollo Cobb, tanto para la clase I y como para la clase II.

Este procedimiento se realizó siguiendo el protocolo estándar del secuenciador de ADN 454 GS Junior de Roche en el laboratorio de Biología Molecular de FARVET S.A.C.

Un total de 6 animales fueron muestreados en distintas granjas ubicadas en Chincha, ciudad importante en la crianza de pollos ubicada en el sur de Perú.

Predicción de epítopes de alta afinidad al CMH I y II del pollo Cobb

Se analizaron 1536 secuencias de aminoácidos disponibles en el Genbank, correspondientes a las proteínas del virus de la influenza aviar A-H5N1. De ellas, se realizó la predicción de afinidad al CMH-I y CMH-II.

De este análisis, se identificaron péptidos con alta afinidad (SB), con baja afinidad (WB) y no afines (NB) al CMH. Adicionalmente, se puso especial atención en las proteínas Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA).

Se compararon los péptidos SB predichos teóricamente en estas proteínas con los epítopes con evidencia experimental reportados en literatura.

Diseño de proteínas multiepitópicas

Los epítopes teóricos seleccionados para el CMH clase I fueron concatenados linealmente en una sola cadena proteica, llamada "proteína multiepitópica".

Esto se realizó análogamente para el CMH clase II (Figura 3). La posición de los epítopes en la proteína multiepitópica se organiza de tal manera que la interfase entre dos epítopes no origine un péptido SB que pueda interferir con la respuesta inmune deseada. Para producir las proteínas multiepitópicas de manera recombinante, se diseñaron genes sintéticos en plásmidos. Estos genes fueron clonados y expresados como proteínas recombinantes en *E. coli*.

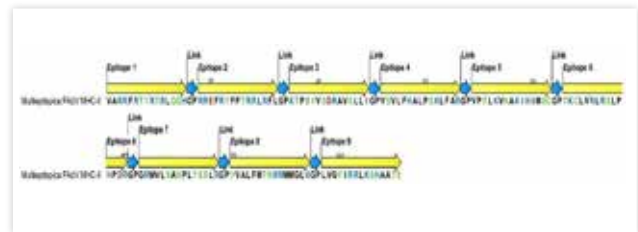


Figura 3. Cadena multiepitópica conteniendo epítopes teóricos.

PRUEBAS EXPERIMENTALES

La inmunización se realizó en una población experimental de pollos Cobb SPF de aproximadamente 3-4 meses de edad y 2Kg de peso. Esta se dividió en dos grupos: un grupo vacunado (14 pollos) y un grupo control (12 pollos).

La proteína MIIB fue administrada en conjunto con buffer urea 8M con 100mM de imidazol, mientras que el placebo consistió en urea 8M con 100mM de imidazol. En el día 1 se obtuvo suero pre-inmune y plasma. El monitoreo se realizó durante 28 días, en los cuales el día 1 y el día 15 se realizaron la primera y la segunda inmunización, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Cronología del ensayo de la proteína multiepitópica MIIB

Fechas	Actividad realizada
Día 1	Suero pre-inmune y plasma de 5 pollos al azar.
Día 8	Obtención de suero de 4 animales de cada grupo.
Día 15	Sacrificio de 4 animales de cada grupo de la primera dosis.
Día 15	2da dosis de la vacuna multiepitópica MIIB.
Día 21	Sacrificio de 4 animales de cada grupo de la segunda dosis.
Día 28	Sacrificio de 5 animales de cada grupo de la segunda dosis

Al finalizar el ensayo de vacunación, se realizó el ensayo de ELISA para todas las muestras del grupo control y el grupo vacunado.

En el caso del grupo control positivo se usó el kit comercial ChR para detectar anticuerpos específicos de influenza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del secuenciamiento de los genes del MHC de pollo Cobb, se identificaron 12 secuencias de MHC clase I y 11 secuencias de MHC clase II.

Las secuencias de MHC clase I fueron alineadas para determinar la similitud entre las secuencias y la obtención de los alelos más frecuentes en la población de pollos Cobb. Se obtuvo un alelo más abundante para el MHC clase I y 3 alelos para el MHC clase II.

De la predicción de epítopes afines a los alelos más frecuentes del CMH I, se obtuvo un total de 18 epítopes WB (de baja afinidad) en las proteínas PB2, NP, PA, HA, M1, PB1 (Tabla 2).

Análogamente, de las predicciones de epítopes afines a los tres alelos de MHC clase II, se obtuvieron 40 epítopes SB (Strong Binding) de la proteína Hemaglutinina y 18 epítopes SB (Strong Binding) de la proteína Neuraminidasa.

Tabla 2. Muestreo de las proteínas correspondiente al proteoma del virus de influenza H5N1, usadas para la predicción de epítopes en el CMH I.

PROTEINAS	NUMERO DE SECUENCIAS	TAMAÑO DE SECUENCIAS
HA	2091	567
M1	1865	252
M2	1419	97
NA	1297	496
NP	1732	225
NS1	1437	121
NS2	1280	716
PB1	1318	756
PB2	1157	759
TOTAL	15367	

Tras la comparación de los epítopes experimentales y los predichos computacionalmente, se observó coincidencia en secuencia entre ambos. Esto se puede ver como solapamiento en la Figura 4, lo cual refuerza la predicción mediante evidencia experimental.

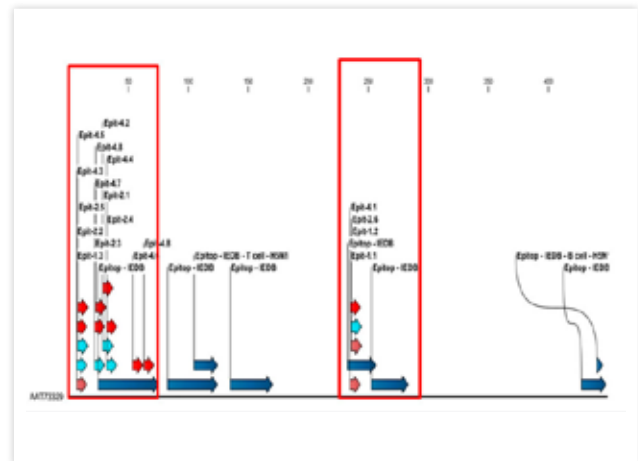


Figura 4. Comparación de los epítopes teóricos obtenidos en el proyecto contra los experimentales para el caso de la proteína Neuraminidasa. En los recuadros rojos se puede observar que existe solapamiento entre los epítopes teóricos (color Rojo, Rosa y Celeste) contra los epítopes experimentales reportados (color Azul).

En el diseño de la proteína multiepitópica se obtuvieron de 3 secuencias de ADN (MIA, MIB y MIIB). Del proceso de producción de las proteínas, sólo

se logró expresar y purificar la proteína MIIB, la cual se usó en las pruebas experimentales y los ensayos inmunológicos.

En la inmunización, a partir del séptimo día se detecta una estimulación de anticuerpos, la cual fue en aumento los días 14, 20 y 28. En todos los casos, se evidencia que la proteína MIIB presenta mayores niveles de anticuerpos respecto al grupo control. Además, se observa que los títulos de anticuerpos del grupo control están alrededor del cut-off (Figura 5).

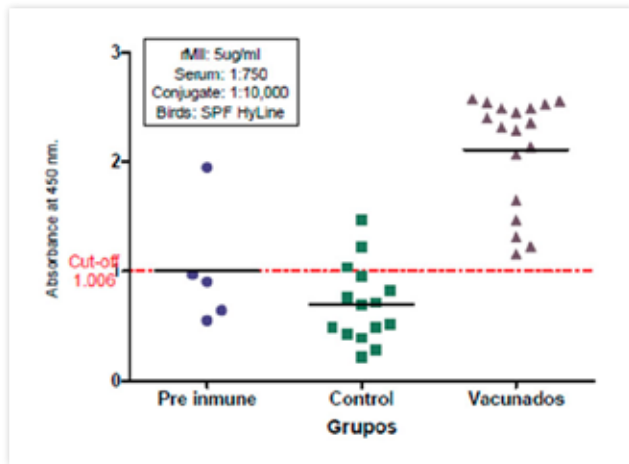


Figura 6. Medición de niveles de anticuerpos en los 28 días de ensayo de la proteína multiepitópica MIIB.

Finalmente, los resultados obtenidos en las pruebas de ELISA para el grupo pre-inmune, control positivo y la proteína MIIB, mostraron que se obtuvo un mayor número de anticuerpos contra la proteína multiepitópica MIIB (Figura 6).

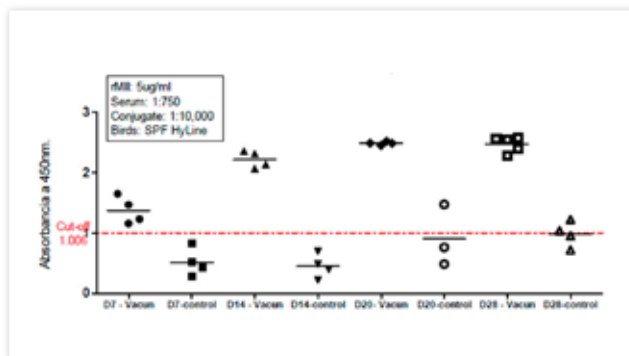


Figura 5. Medición de niveles de anticuerpos en los 28 días de ensayo de la proteína multiepitópica MIIB.

CONCLUSIONES

La proteína multiepitópica ha sido capaz de levantar una respuesta de tipo humoral en las aves inmunizadas. Este es un resultado alentador que refuerza el interés de seguir evaluando este tipo de antígenos a nivel de protección frente a una infección.

FINANCIAMIENTO

Este estudio ha sido financiado gracias al apoyo del FINCyT (Convenio N° 147-FINCyT-FIDECOM-PIPEA-2012), el laboratorio FARVET S.A.C. y con colaboración de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Predicción de la afinidad entre el complejo mayor de histocompatibilidad por simulaciones de dinámica molecular

Ramírez-Sáenz M.¹, Bueno-Basurco C.¹, Valdivia-Olarte H.¹, Requena-Anicama D.^{1,2}, Fernández-Díaz M.², Zímic-Peralta M.^{1,2}. ¹ Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular. Universidad Peruana Cayetano Heredia. ² Laboratorio de Bioinformática, FARVET.

Trabajo de investigación presentado en el SolBio International Conference of Bioinformatics and Computational Biology for Innovative Genomics, Riviera Maya, Mexico, 22 al 26 de abril del 2016.

INTRODUCCIÓN

La inmunoinformática es la aplicación de técnicas computacionales para el estudio del sistema inmunológico. Uno de sus principales objetivos es la predicción de epítopes afines al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para el diseño de vacunas y/o inmunodiagnóstico. Para lo cual se han desarrollado diferentes herramientas bioinformáticas, como el uso de SVM, métodos de inteligencia artificial, redes neuronales artificiales, QSAR, bioinformática estructural, etc. Todos los predictores de epítopes hasta el momento están dirigidas a humanos, ratones, macacos, cerdos. El presente estudio desarrolló un método alternativo de estimación de la afinidad de epítope-MHC mediante simulaciones de dinámica molecular.

METODOLOGÍA

Estimación de la afinidad entre el complejo *pMHC* por medio de simulaciones moleculares computacionales. Se usaron cinco complejos estructurales *pMHC* del PDB (3rew, 1qew, 1t21, 3mre, 3v5d), las cuales fueron seleccionadas del IMGT. Durante la simulación se calculó las fuerzas de interacción de cada átomo de la molécula y luego se actualizó la posición de la simulación usando el campo de fuerza Martini. Por otro lado, el agua se simuló implícitamente.

Se tuvo que realizar una simulación molecular inicial para determinar la trayectoria de reacción. En la cual se aplicó una fuerza al péptido en dirección perpendicular al plano definido por las hojas beta de la base del MHC. Se usó el método "Umbrella Pulling" para medir el potencial de fuerza media del epítope utilizando un resorte que mantiene al péptido alrededor de una distancia al centro de masas definido para el MHC y mide la fuerza de atracción o repulsión causada por esta molécula. Finalmente se calcula la energía de afinidad mediante el método de análisis de histogramas ponderados (WHAM), mediante el cual se integra el potencial de fuerza y se obtiene la energía libre requerida para liberar al péptido del MHC.

Condiciones de simulación

- Campo de fuerza: MARTINI
- Algoritmo de temperatura: 310K
- Presión: 1.0 bar
- Punto de corte de interacciones de Van-der Waals y electrostáticas: 1.2 nm
- Constante dieléctrica: 15 (agua implícita)
- Intervalos de tiempo 10 fs

Protocolo utilizado

Equilibración:

- Duración: 500 pasos
- Velocidad: 1nm/ns
- Constante de resorte: 10MJ/mol.nm²

Simulación de puntos equidistantes de la trayectoria de reacción

- Duración: 100 000 000 pasos (x 50 simulaciones independientes)
- Intervalo de distancia: 0.1 nm
- Constante de resorte: 1MJ/mol.nm²

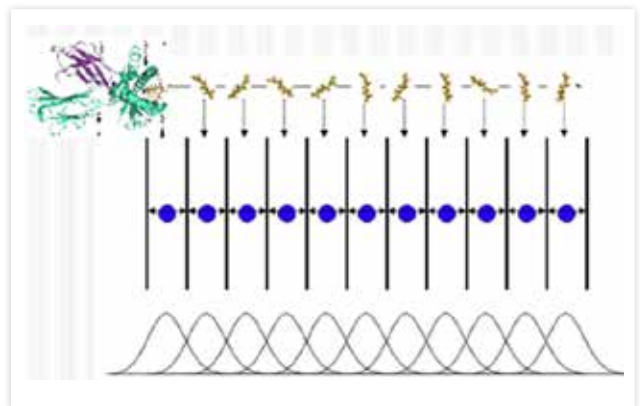


Figura 1. Esquema del método Umbrella Sampling, en el cual se parte de una dinámica en la cual el ligando se aleja del receptor mediante una fuerza constante en un proceso de no-equilibrio. De esta dinámica se toman puntos equidistantes para realizar una dinámica en equilibrio en cada punto. Se calcula el potencial de fuerza media necesario para alejar el epítope del MHC.

RESULTADOS

Estimación de la afinidad epítipo-MHC por medio de simulaciones moleculares

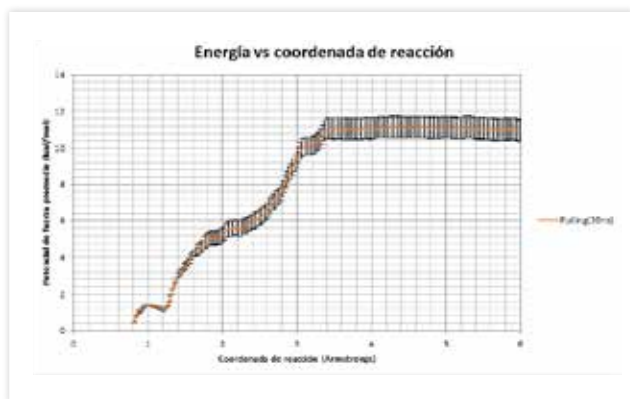


Figura 2. Energía libre vs coordenada de reacción para la separación del complejo pMHC. En la gráfica se puede observar el comportamiento de la energía libre a través de la coordenada de reacción. Se observa la finalización del cálculo a 20 ns

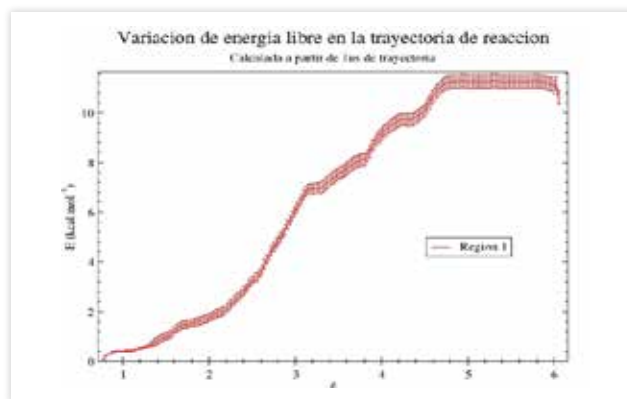


Figura 3. Energía libre vs coordenada de reacción para la separación del complejo pMHC. Se observa la finalización del cálculo a 1 μ s. Esta trayectoria fue dividida en 5 secciones para determinar la convergencia de las energías obtenidas por el método Umbrella Pulling.

Tabla 1. Energías libres de unión del complejo pMHC para cada sección de la trayectoria de 1 μ s.

Sección	Energía	Desviación
1	7.810237	0.5009
2	9.999769	0.461979
3	12.779218	0.358209
4	12.866572	0.462544
5	11.947378	0.427825

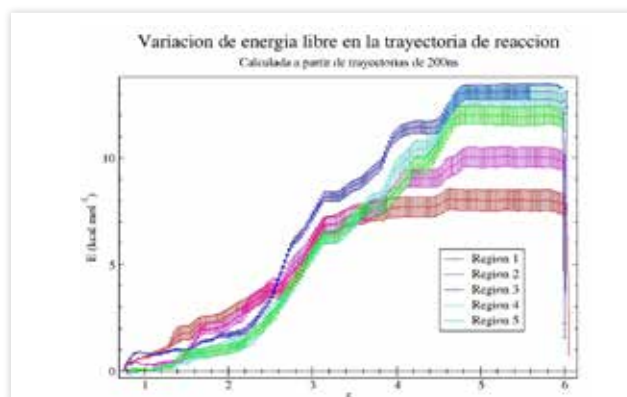


Figura 4. Energía libre vs coordenada de reacción para la separación del complejo pMHC en cada sección de 200 ns. En esta trayectoria se obtiene una energía de 11 ± 2 kcal/mol.

Para obtener resultados que puedan ser correctamente procesados utilizando este método se utilizaron tiempos de simulación largos, (alrededor de 3600 horas por péptido). La correlación encontrada entre ambos métodos fue baja ($R^2=0.81$), sin embargo, gran parte de este error se debe al cristal 1t21.

Se obtuvieron los valores de energía libre a partir de las simulaciones moleculares computacionales para los cristales 3rew (-4.61 Kcal/mol), 1qew (-9.24 Kcal/mol), 1t21 (-8.89 Kcal/mol), 3mre (-3.76 Kcal/mol) y 3v5d(-5.62Kcal/mol).

CONCLUSIONES

Se realizó un histograma total de simulaciones (42 simulaciones), en la cual se observa la falta de cobertura en los 3 puntos mencionados. Estos tienen una separación de 2.6, 3.2 y 3.8 Å del MHC respectivamente. En esta trayectoria se obtuvo una energía de 11 ± 2 kcal/mol.

Se obtuvieron los valores de energía libre a partir de las simulaciones moleculares computacionales para los cristales obtenidos del PDB: 3rew (-4.61 Kcal/mol), 1qew (-9.24 Kcal/mol), 1t21 (-8.89Kcal/mol), 3mre (-3.76 Kcal/mol) y 3v5d(-5.62Kcal/mol)

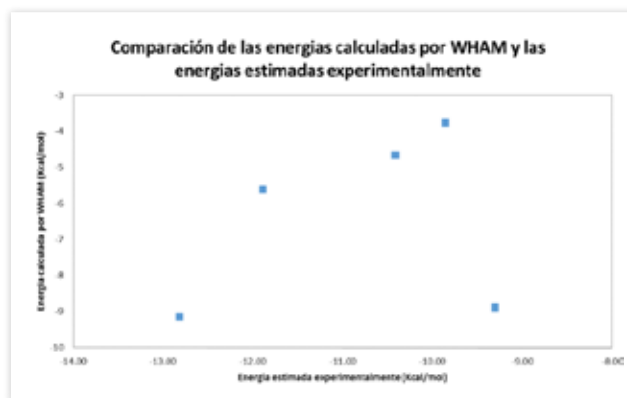


Figura 5. Comparación de las energías calculadas por WHAM y las energías estimadas experimentalmente.

AGRADECIMIENTOS

Fundación de investigación, Fondos para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT). Proyecto FINCyT PIAP – 233-13.



Solución científica para la salud animal

Desarrollo y validación de una Real-Time qPCR para la detección y cuantificación del Virus de Laringotraqueitis Infecciosa Aviar en fluido alantoideo en concordancia con Good Laboratory Practices

Huamán-Gutiérrez K.¹, Tataje-Lavanda L.¹, Longa-Bobadilla V.¹, Bendezú-Eguis J.¹, López-Campana G.², Nolasco-Cárdenas O.², Fernández Díaz M.¹ ¹ Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. ² Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt", Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Trabajo de investigación publicado en los medios avícolas: Actualidad Avípecuaria, MAP, Engormix y Sector Pecuario, 12 de junio del 2015

INTRODUCCIÓN

El desarrollo y validación de técnicas cuantitativas no normalizadas es una actividad analítica clave y necesaria para asegurar la dosificación de las vacunas en aves. Los métodos empleados para la cuantificación de partículas virales producidas en fluido alantoideo (FA) como por ejemplo: el ensayo en placa y dosis infectiva al 50% en embrión de pollo (DIEP 50) resultan ser costosas y pueden demandar demasiado tiempo; por el contrario los métodos moleculares tipo Real-Time PCR (qPCR) son más rápidas hasta de menor costo.

Pero muy pocos son los laboratorios en la industria avícola que desarrollan métodos de qPCR con un proceso correcto de validación y sobretodo que evalúen su rendimiento.

Esta alta exigencia está siendo implementada a nivel mundial según las guías de la "International Conference on Harmonization" de la Food and Drug Administration (ICH - FDA por sus siglas en inglés), es por ello que presentamos la validación de una sistema de cuantificación por qPCR para dosificar el virus de Laringotraqueitis Infecciosa Aviar (ILTV virus por sus siglas en inglés), en el cual se evidenció científicamente los parámetros de rendimiento como: Precisión, sensibilidad, especificidad, límite de blanco (LoB), límite detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ).

OBJETIVO

Validar basándose en parámetros de rendimiento un método de qPCR para cuantificar ILTV en fluido alantoideo.

METODOLOGÍA

Durante el proceso de validación se siguieron los

principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio y las guías para la industria establecidos por la FDA. Se empleó ADN de una línea celular de fibroblasto de pollo (línea DF1).

Se propagó una cepa tipificada de ILTV en huevos embrionados SPF y se aisló el ADN viral del fluido alantoideo (FA). Se caracterizó la integridad, pureza y ausencia de otros patógenos aviares. Se diseñó un par de cebadores que anclan una región conservada del gen de la glicoproteína B (gB) de ILTV. Se clonó un plásmido con la secuencia del gen gB y el número de copias del plásmido se determinó teóricamente, haciéndose diluciones del plásmido para la curva estándar.

Todas las muestra fueron amplificadas en un termociclador LightCycler®480 (Roche, Alemania) y los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. El número de copias de ILTV fue estimado como número de copias gB por μL .

RESULTADOS

Las medias de las las repeticiones (precisión) fueron homogéneas ($p > 0.05$) lo que permitió crear gráficos de control X. Empleando ADN procedentes de aislados con otros virus (sin presencia de ILTV) la qPCR tuvo una especificidad del 100% (Fig.01).

Diluciones sucesivas (Fig.02) de la cepa ILTV permitió: (a) obtener la deriva de los picos de fluorescencia $-d$ (d/dT) que logró determinar el LoB en 0.044 y el LoD en 1.56 (10170 copias/ μL de FA) y (b) Determinar el LoQ=16.6fg/ μL (33900 copias/ μL de FA) (Fig.03). El valor del LoD asumió una estrategia diagnóstica (sensibilidad diagnóstica) en que valores ≥ 1.56 denota "presencia ILTV" y valores ≤ 1.56 denota "ausencia ILTV" (Tabla).

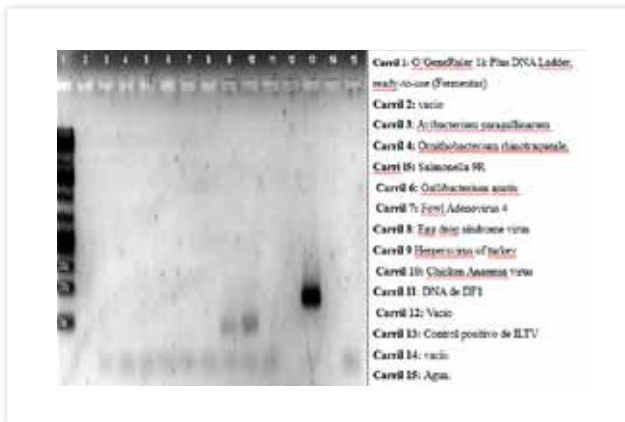


Figura 1. Electroforesis para la evaluación de la especificidad.

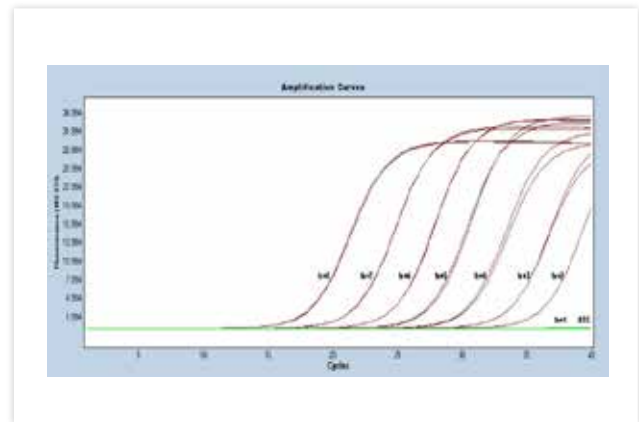


Figura 2. LoD y LoQ del qPCR (LightCycler®480). La curva estándar del qPCR usada para cuantificar ILTV fue generada de diluciones seriadas al décimo del plásmido con inserto de gB (1×10^8 a 1×10^1 copias).

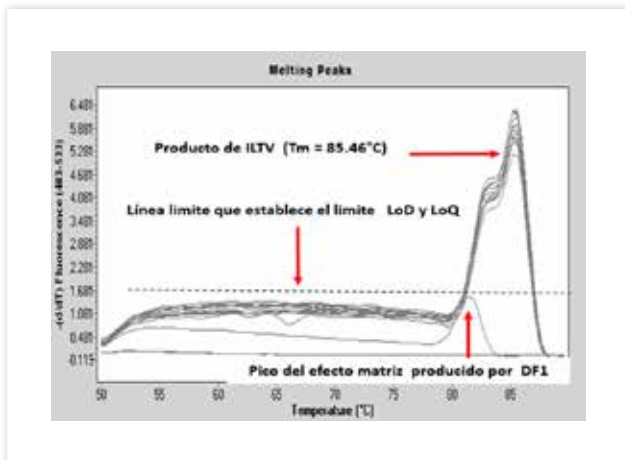


Figura 3. Picos melting de los productos de qPCR y el límite establecido. Para determinar el LoD y LoQ a partir del pico formado por ADN de DF1 LightCycler®480.

Tabla. Resumen estadístico de los valores hallados en la validación del qPCR.

Características del ensayo	Criterios de aceptación	Resultado de la validación
Especificidad	$p\text{-Value} < \alpha$ ($\alpha=0.01$ a 95% nivel de confianza)	Aceptado ($p\text{-Value}=0.0001$)
Precisión	$p\text{-Value} > \alpha$ ($\alpha=0.05$ a 95% nivel de confianza)	Aceptado ($p\text{-Value}=0.9336$)
LoB	$-(d/dT) = 0.044$	0 copias/ μl
LoD	$-(d/dT) = 1.56$	101700 copias/ μl (10 ag/ μl)

CONCLUSIONES

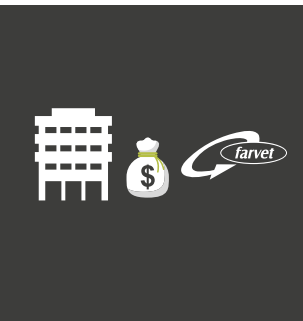
Se validó un método de qPCR para la cuantificación de ILTV en fluido alantoideo con alta especificidad de detección, ajustándose a la mejora continua de la producción de vacunas eficaces y los parámetros precisión, exactitud y reproducibilidad pueden ser verificables en el tiempo. Además de ajustarse a los principios de Good Laboratory Practices (GLP) y de la FDA se estableció una estrategia confirmatoria para la detección de ILTV “a dos plataformas”.

PALABAS CLAVE

Validación, qPCR, ILTV, vacunas.

Pg: 1pg = 0,0000000000001 o la billonésima parte de un gramo.

Fg: 1fg = 0,000000000000001 o la milbillonésima parte de un gramo.



PROYECTOS FINANCIADOS




PERÚ

Ministerio
de la Producción

Programa Nacional de
Innovación para la
Competitividad y Productividad

Innovate Perú



 Solución científica para la salud animal

Desarrollo de una vacuna múltiepitópica contra influenza aviar empleando herramientas genómicas e inmunobionfórmáticas

Contrato: N° 147-FINCYT-FIDECOM-PIPEA-2012. Entidades ejecutoras: FARVET SAC / MULTIVET / LAPROVET / Universidad Peruana Cayetano Heredia. Coordinador general: David Requena Anicama. Contacto: farvet@farvet.com

RESUMEN DEL PROYECTO

La empresa FARVET SAC, con el co-financiamiento del Programa de Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate - Perú) ejecutó el estudio "Desarrollo de una vacuna múltiepitópica contra influenza aviar A (H5N1) empleando herramientas genómicas e inmunobionfórmáticas", con la finalidad de desarrollar una proteína múltiepitópica que sirva como vacuna contra la influenza aviar A H5N1. Para ello, se elaboró una proteína múltiepitópica en base al virus de influenza aviar A H5N1 Y se estudió su actividad inmunológica de en pollos Cobb de la ciudad de Chincha (Ica, Perú).

Se observó que la proteína inducía la estimulación de anticuerpos y la proliferación de células B en mayores niveles que los grupos control. Durante el proyecto, se obtuvo la secuencia de los alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) tipo I y II, mediante el secuenciamiento de los genes que codifican a sus subunidades. Además, se recopiló las proteínas del virus de influenza aviar (H5N1) disponibles en la bases de datos biológicas.

A partir de estas proteínas se predijeron potenciales epítopes (regiones mínimas inmunogénicas) usando el programa NetCMH y NetCMHpan, que permiten calcular la afinidad entre un péptido cualquiera y los CMH tipo I y II. Usando los potenciales epítopes seleccionados, se realizó el diseño de tres proteínas múltiepitópicas. Se realizó exitosamente la expresión y purificación de una de las proteínas múltiepitópicas (etiquetada como MIIIB), con la cual se realizaron ensayos inmunológicos. Se evaluó el efecto de la

proteína MIIIB como antígeno en suero de pollos, comparando el grupo vacunado versus el control.

PALABRAS CLAVE

Inmunoinfórmica, complejo mayor de histocompatibilidad, proteína múltiepitópica, epítope, vacuna.

RESULTADOS DEL PROYECTO

- Se obtuvo por primera vez la secuencia de alelos del CMH del pollo Cobb peruano.
- Se desarrolló una metodología para la construcción de proteínas múltiepitópicas. Esta metodología ha sido publicada en la revista científica indexada "Bioinformation".
- Se obtuvieron tres proteínas múltiepitópicas, constituidas por epítopes altamente afines a los CMH clase I y clase II del pollo Cobb.
- Una de las proteínas fue evaluada y logró elicitar una respuesta humoral inmunológica en pollos Cobb Chinchano mayor que en el grupo control.
- Se publicó un artículo con los resultados del proyecto en la revista especializada "MAP" del mundo avicultor y porcicultor. Se espera que el artículo publicado sirva de referencia para el uso de esta nueva tecnología.

ESTADO

Terminado.




PERÚ

Ministerio
de la Producción

Programa Nacional de
Innovación para la
Competitividad y Productividad

Innovate Perú



 Solución científica para la salud animal

Desarrollo de una vacuna viva contra el virus de Newcastle que contiene interleuquina-2 para potenciar la respuesta inmune efectora y de memoria en pollos de engorde

Contrato: N° 140-FINCYT-PIPEI-2012. Entidades ejecutoras: FARVET SAC. Coordinador general: Ray Izquierdo Lara. Contacto: ray.izquierdo@farvet.com

RESUMEN DEL PROYECTO

Con la finalidad de potenciar y disminuir los síntomas post-vacunales de las vacunas vivas del virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV), la empresa FARVET SAC estudió el efecto de la incorporación de la Interleuquina-2 (IL-2) de pollo en la superficie de NDV. Para determinar la potencia de la vacuna, se comparó la vacuna convencional de NDV vs la vacuna NDV/IL-2, tomando como parámetros la tasa de supervivencia post desafío, excreción viral e inducción de respuesta celular y tasa de conversión alimenticia.

Los resultados mostraron que la incorporación de la IL-2 en la vacuna mejoró significativamente la potencia de la vacuna, llegando a obtenerse hasta 100% de protección cuando se usaron 2 dosis de NDV/IL-2, mientras que a 2 dosis de NDV solo se obtuvo 95,8% de protección. Además, la vacuna con IL-2 fue capaz de reducir la excreción viral en su totalidad aún con una sola dosis, lo que no ocurre cuando se usa la vacuna convencional.

Por otro lado, el efecto de la IL-2 en la disminución de la reacción post-vacunal fue evaluado utilizando una cepa más virulenta del virus de la enfermedad de Newcastle, donde se observó que la presencia de la IL-2 era capaz de disminuir la patogenicidad del virus aún en aves sin inmunidad previa contra NDV.

PALABRAS CLAVE

Enfermedad de Newcastle, vacuna viva, Interleuquina-2 (IL-2), pollo de engorde.

RESULTADOS DEL PROYECTO

- Se estableció una línea celular derivada de DF-1 (fibroblastos de pollo espontáneamente inmortalizados) que expresa establemente IL-2 en su superficie.
- Se demostró que la IL-2 es capaz de disminuir la patogenicidad de NDV y por lo tanto en la vacuna esto se traduce como disminución de la respuesta post-vacunal.
- Se logró incrementar la protección de la vacuna de 84,0% a 91,7% cuando se administró una sola dosis de vacuna viva.
- Se publicó un artículo científico en la revista indexada Genome Announcements y un artículo en la revista especializada Actualidad Avipecuaria.

ESTADO

Terminado.



PERÚ

Ministerio
de la Producción

Programa Nacional de
Innovación para la
Competitividad y Productividad

Innovate Perú



Solución científica para la salud animal

Desarrollo de un kit para el diagnóstico diferencial y rápido de la coriza infecciosa y el síndrome de cabeza hinchada en la industria avícola

Contrato: N° 184-FINCYT-FIDECOM-PIPEA-2014. Entidades ejecutoras: FARVET SPF SAC/ MULTIVET / LAPROVET. Coordinador general: Manolo Fernández Díaz. Contacto: farvet@farvet.com

RESUMEN DEL PROYECTO

La producción avícola se ha vuelto intensa en nuestro país y ha vuelto los animales más sensibles, haciendo cada vez más necesarios los esfuerzos en prevención, diagnóstico, tratamiento y control de enfermedades aviares.

La incidencia de enfermedades como la coriza infecciosa (CI) y el síndrome de cabeza hinchada (SCH), que tienen como agentes causales a la bacteria *Avibacterium paragallinarum* y el metapneumovirus aviar (MPVa), respectivamente ocasionan grandes pérdidas en la industria avícola (reducción en la producción de huevos entre un 10 - 40%).

Existe una dependencia con los servicios de diagnóstico, que incluyen sacrificio de animales y envío de muestras a laboratorios especializados, esto consume tiempo y tiene costo elevado.

La CI por ejemplo, es una infección persistente y de rápido contagio (1-2 días de incubación y pico alto

de infección en 4 días), su detección y diferenciación de SCH es vital para la aplicación de medidas de control rápidas. El uso de tira inmunocromatográfica incrementaría la eficiencia del tratamiento de las aves.

En el mercado actual no existen pruebas rápidas similares para el diagnóstico de estas enfermedades lo cual permitiría a nuestro producto abrir un nuevo mercado para la empresa, insertarse y liderar el diagnóstico a nivel nacional. Al finalizar el proyecto se obtendrá un prototipo de tira inmunocromatográfica para el diagnóstico diferencial y rápido de coriza infecciosa y el síndrome de cabeza hinchada en la industria avícola.

PALABRAS CLAVE

Coriza infecciosa; síndrome de cabeza hinchada; tira inmunocromatográfica; diagnóstico rápido.

ESTADO

En ejecución.



PERÚ

Ministerio de la Producción

Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad

Innóvate Perú



Solución científica para la salud animal

Desarrollo de una vacuna aviar basada en la expresión de una glicoproteína del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (iltv) en la envoltura viral de baculovirus

Contrato: N° 007-FINCYT-FIDECOM-PIPEI-2014. Entidades ejecutoras: FARVET SPF SAC. Coordinador general: Manolo Fernández Díaz. Contacto: farvet@farvet.com

RESUMEN DEL PROYECTO

La laringotraqueitis es una infección que afecta el tracto respiratorio en los pollos, causado por el virus laringotraqueitis infecciosa aviar (Familia Herpesvirus), que causa una severa pérdida productiva debido al incremento de la mortalidad de las aves y/o disminución en la producción de huevos, por lo que su diseminación afectará a la industria avícola en el Perú.

Actualmente en el mercado nacional se cuenta con vacunas importadas cuyo nivel de protección inmunológico es bajo, lo cual implica un mayor número de dosis/ave. Así mismo el desarrollo de estas vacunas que son derivados de fragmentos atenuados cuya reversión genera nuevos focos infecciosos, por lo que incrementaría los costos de producción en la industria avícola, incrementando las pérdidas económicas en la industria. La implementación de paquetes tecnológico a través de herramientas biotecnológicas como son las vacunas, ha permitido disminuir la incidencia de enfermedades en humanos y animales.

En la industria avícola el desarrollo de vacunas a través de un sistema de expresión inocuo (baculovirus) que permita incrementar los niveles de protección (1 a 2 dosis/ave), el uso de fragmentos no atenuados disminuirá los brotes infecciosos, permitirá disminuir los costos de producción y tener una menor pérdida económica en la industria avícola. El virus ILTV, presenta una glicoproteína en su envoltura denominada "gpJ"; los reportes acerca de la glicoproteína ha permitido

asociar la glicoproteína con la virulencia del ILTV, así mismo los estudios genómicos acerca de la pérdida de la "gpJ" ha permitido experimentalmente disminuir la virulencia en comparación a las cepas silvestres. Los estudios experimentales y en animales infectados naturalmente con la "gpJ" inducen la producción de anticuerpos específicos; por lo que se propone a "gpJ" como un antígeno dominante para la respuesta inmune humoral contra ILTV.

El presente proyecto tiene como propósito el desarrollo de una vacuna segura y efectiva a partir de la inserción del gen de la glicoproteína J del virus ILTV en el sistema de baculovirus, para el desarrollo del proyecto se ha trazado cinco componentes; el cual consta de cuatro componentes de investigación con lo que se obtendrá los resultados esperados. El primer componente permitirá secuenciar, clonar y evaluar la expresión del constructo así mismos la inserción en baculovirus; el segundo componente permitirá evaluar experimentalmente a nivel celular la respuesta de la vacuna, el tercer componente permitirá comparar la vacuna desarrollada versus una comercial en pollos SPF. El cuarto componente permitirá evaluar en aves ponedoras comerciales la respuesta de la vacuna.

PALABRAS CLAVE

laringotraqueitis infecciosa aviar, vacuna, baculovirus, glicoproteína J, aves ponedoras comerciales.

ESTADO

En ejecución.




PERÚ

Ministerio
de la Producción

Programa Nacional de
Innovación para la
Competitividad y Productividad

Innovate Perú



 Solución científica para la salud animal

Desarrollo de una vacuna vectorizada contra Hepatitis por Cuerpos de Inclusión (HCI) en un virus no patógeno de la enfermedad de Newcastle

Contrato: N°277-INNOVATEPERU-ITAI-2016. Entidades ejecutoras: FARVET SAC/ Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Coordinador general: Manolo Fernández Díaz. Contacto: farvet@farvet.com

RESUMEN DEL PROYECTO

La Hepatitis por Cuerpos de Inclusión (HCI) es una enfermedad que puede ser letal en aves jóvenes, afectando principalmente el hígado de las aves infectadas y que además es prevalente en el Perú.

La enfermedad es causada principalmente por el serotipo 4 del Aviadenovirus de Pollo (FAdV), aunque otros serotipos también pueden causarla. Las vacunas comerciales actuales son inactivadas, por lo que no inducen una respuesta inmune completa que garantice la protección de las aves (básicamente solo respuesta humoral).

En consecuencia, la protección no es siempre completa y tardan en generar una adecuada protección, requiriéndose múltiples dosis. Además, son relativamente costosas y su aplicación en grandes parvadas puede ser laboriosa.

A través de técnicas de genética reversa, el proyecto busca desarrollar una nueva vacuna vectorizada contra la HCI, expresando la proteína Fibra-2 de FAdV-4 (descrita como la que confiere mayor protección contra HCI), en el vector no patogénico del Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) desarrollado por FARVET: rNDV-LS1. Para aumentar la probabilidad de

éxito se harán varios diseños que incluyan diferentes formas de expresar la proteína Fibra. El vector recombinante rNDV-LS1 funciona como un "casette" de expresión. Expresa in vitro e in vivo cualquier proteína que se inserte, en este caso, la proteína Fibra-2 de FAdV-4. Esto implica que cada célula infectada por este virus recombinante expresará la proteína Fibra-2, estimulando una respuesta inmune contra esta proteína.

La vacuna desarrollada debe conferir protección tanto contra FAdV-4 como contra NDV, ya que es el virus vector. Por otro lado, debido a que NDV se aplica regularmente como vacuna viva, esto permitirá la inmunización contra la HCI de manera tan sencilla como se hace para NDV (gota al ojo, spray o disuelta en el agua), pero sin las complicaciones de las vacunas inactivadas y a un costo mucho menor que el actual.

PALABRAS CLAVE

Adenovirus de pollo, Fibra-2, virus de la enfermedad de Newcastle, genética reversa

ESTADO

En ejecución.



PERÚ


Ministerio
de Agricultura



PNIA

Programa Nacional de Innovación Agraria



 Solución científica para la salud animal

Implementación de una plataforma de producción de anticuerpos monoclonales para el desarrollo de pruebas de diagnóstico rápido de importancia para sector pecuario

Contrato: N°021-2015-INIA-PNIA/UPMSI/IE. Entidades ejecutoras: FARVET SAC/ FARVET SPF SAC. Coordinador general: Manolo Fernández Díaz. Contacto: farvet@farvet.com

RESUMEN DEL PROYECTO

La demanda por un diagnóstico rápido y oportuno de las principales enfermedades pecuarias contribuiría a su mejor control, sin embargo para el desarrollo de los kits de diagnóstico o también llamadas pruebas de diagnóstico rápidos (PDR) se requiere del uso de anticuerpos monoclonales (Am).

En la actualidad, la producción de Am está sujeto a costos que conllevan la importación de estos desde laboratorios internacionales y su correcto manejo en condiciones locales (cultivos y purificación).

El presente estudio tiene como propósito la implementación de una plataforma de producción de anticuerpos monoclonales, desde la producción de antígenos recombinantes mediante el sistema de expresión de baculovirus para llevar a cabo ensayos de inmunización en ratones y el uso de la tecnología de hibridomas para la obtención y purificación de los anticuerpos.

La implementación de esta biotecnología en la industria pecuaria peruana permitirá la especialización de investigadores en la producción de anticuerpos monoclonales mediante el dominio de la técnica de producción de hibridomas lo que afianzará el manejo de cultivos celulares para la producción de éstos. La capacitación en esta biotecnología permitirá reforzar el conocimiento práctico permitiendo al investigador desenvolverse en este campo y aplicar este conocimiento en el desarrollo de herramientas para diferentes campos de la salud veterinaria y pública.

Esta plataforma permitirá la producción local de Am de forma costo-efectiva y permitirá contribuir al desarrollo de futuras PDR de interés pecuario.

PALABRAS CLAVE

Plataforma de producción, anticuerpos monoclonales, hibridomas, pruebas de diagnóstico rápido.


ESTADO

En ejecución.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS





 Solución científica para la salud animal

Genome sequence and comparative analysis of *Avibacterium paragallinarum*

David Requena^{1,2}, Ana Chumbe¹, Michael Torres^{1,2}, Ofelia Alzamora¹, Manuel Ramirez^{1,2}, Hugo Valdivia-Olarte^{1,2}, Andres Hazaet Gutierrez^{1,2,3}, Ray Izquierdo-Lara¹, Luis Enrique Saravia¹, Milagros Zavaleta¹, Luis Tataje-Lavanda¹, Ivan Best¹, Manolo Fernández-Sánchez¹, Eliana Icochea^{1,4}, Mirko Zimic^{1,2} & Manolo Fernández-Díaz^{1*} - FARVET Research Group. ¹FARVET S.A.C. ²Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia. ³Institute for Immunology and Informatics, University of Rhode Island. ⁴Laboratorio de Patología Aviar, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Manolo Fernández-Díaz *Corresponding author. † Correspondencia al autor Dr. Manolo Fernández Díaz.

RESUMEN

Antecedentes: *Avibacterium paragallinarum*, el agente causante de la coriza infecciosa, es una enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa de las aves de corral, que afecta mundialmente a pollos comerciales, gallinas ponedoras y pollos de engorde.

METODOLOGÍA

En este estudio, se realizó el secuenciamiento, ensamblaje y la anotación del genoma completo de un aislado peruano de *A. paragallinarum*. El genoma fue procesado en un secuenciador GS FLX Titanium 454. El ensamblaje de novo de la secuencia se llevó a cabo usando el software GS De Novo Assembler 2.6; y la anotación se realizó utilizando el modelo génico de *H. influenzae* str. F3031. La curación manual del genoma se realizó usando el programa Artemis. La función putativa de los genes se predijo con Blast2GO. Los factores de virulencia se identificaron por comparación con la Base de Datos de Factores de Virulencia (VFDB).

RESULTADOS

El genoma obtenido tiene una longitud de 2.47 Mb con 40,66% de contenido de GC. Se obtuvieron setenta y cinco contigs grandes (>500 nt), en los cuales se obtuvo 1,204 genes predichos. Todos los contigs están disponibles en GenBank (GenBank: PRJNA64665). Un total de 103 factores de virulencia, reportados en la VFDB, se encontraron en *A. paragallinarum*. Cuarenta y cuatro de ellos están presentes en 7 especies de *Haemophilus*, los cuales están relacionados con la patogenia, virulencia y la evasión del sistema inmune. Se encontró un transposón asociado a resistencia de tetraciclina (Tn10) en *A. paragallinarum*, actuando posiblemente como un mecanismo de defensa.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La disponibilidad del genoma de *A. paragallinarum* representa una importante fuente de información para el desarrollo de pruebas de diagnóstico, genotipificación y nuevos antígenos para potenciales vacunas contra la coriza infecciosa. La identificación de factores de virulencia contribuye a una mejor comprensión de la patogénesis y a la planificación de esfuerzos de prevención y control de la enfermedad.

ABSTRACT

Background: *Avibacterium paragallinarum*, the causative agent of infectious coryza, is a highly contagious respiratory acute disease of poultry, which affects commercial chickens, laying hens and broilers worldwide.

METHODOLOGY

In this study, we performed the whole genome sequencing, assembly and annotation of a Peruvian isolate of *A. paragallinarum*. Genome was sequenced in a 454 GS FLX Titanium system. De novo assembly was performed and annotation was completed with GS De Novo Assembler 2.6 using the *H. influenzae* str. F3031 gene model. Manual curation of the genome was performed with Artemis. Putative function of genes was predicted with Blast2GO. Virulence factors were identified by comparison with the Virulence Factor Database.

RESULTS

The genome obtained has a length of 2.47 Mb with 40.66% of GC content. Seventy five large contigs (>500 nt) were obtained, which comprised 1,204 predicted genes. All the contigs are available in Genbank (GenBank: PRJNA64665). A total of 103 virulence factors, reported in the Virulence Factor Database, were found in *A. paragallinarum*. Forty four of them are present in 7 species of *Haemophilus*, which are related with pathogenesis, virulence and host immune system evasion. A tetracycline-resistance associated transposon (Tn10), was found in *A. paragallinarum*, possibly acting as a defense mechanism.


DISCUSSION AND CONCLUSION

The availability of *A. paragallinarum* genome represents an important source of information for the development of diagnostic tests, genotyping, and novel antigens for potential vaccines against infectious coryza. Identification of virulence factors contributes to better understanding the pathogenesis, and planning efforts for prevention and control of the disease.

KEY WORDS

Infectious coryza, genome sequencing, virulence factors, syntenic homology, Tn10 transposon.



 Solución científica para la salud animal

An evaluation of serotyping of *Avibacterium paragallinarum* by use of a multiplex polymerase chain reaction

Vladimir Morales Erasto, José de Jesús Posadas Quintana, Manolo Fernández Díaz, Luis E. Saravia, José Simón Martínez Castañeda, Patrick J. Blackall, Edgardo Soriano Vargas¹. From the Center for Advanced Investigations and Studies on Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny, Autonomous University of the State of Mexico, Mexico (Morales-Erasto, Posadas Quintana Martínez-Castañeda, Soriano-Vargas); FARVET S.A.C., Chincha Alta, Peru (Fernández-Díaz, Saravia); and the Queensland Alliance for Agriculture and Food Innovation, The University of Queensland, St Lucia, Queensland, Australia (Blackall). ¹Corresponding Author: Edgardo Soriano-Vargas, CIESA-FMVZUAEM, Instituto Literario No. 100, Col. Centro, Toluca 50000, México. soriano@uaemex.mx

RESUMEN

En el presente estudio, la habilidad de una reciente PCR múltiple (mPCR) para la identificación de los serogrupos (A, B y C) de *Avibacterium paragallinarum* fue evaluada. Un total de 12 cepas de referencia y 69 aislamientos de *Av. paragallinarum* de Ecuador, México, Panamá y Perú fueron incluidos en el estudio. Con algunas excepciones (las cuales fueron serotipificadas en el presente estudio), todos los aislamientos y cepas de referencia han sido previamente examinados por dos esquemas de serotipificación (Page y Kume) o fueron las cepas de referencia originales de los esquemas. Tres de 6 (50%) de las cepas de referencia del serogrupo A, 2 (100%) del serogrupo B, y 1 de 4 (25%) de las cepas de referencia del serogrupo C fueron correctamente serotipificadas por la mPCR.

Con los aislamientos de campo, la mPCR reconoció correctamente 16 de los 17 aislamientos del serogrupo A, 10 de 12 aislamientos del serogrupo B y 18 de 37 aislamientos del serogrupo C. De manera general, la especificidad y sensibilidad de la prueba de PCR fueron las siguientes: 82.6% y 87.3% (serogrupo A), 85.7% y 71.9% (serogrupo B), y 46.3% y 100% (serogrupo C). El bajo rendimiento de la mPCR en términos del reconocimiento de aislamientos del serogrupo C (baja sensibilidad del 46.3%) y el relativamente alto nivel de incertidumbre respecto a la exactitud de los resultados del serogrupo A y B (especificidad de 87.3% y 71.9%, respectivamente) nos indica que el ensayo no es recomendado para reemplazar a la serotipificación convencional.


ABSTRACT

In the present study, the ability of a recently proposed multiplex polymerase chain reaction (mPCR) to determine the serogroups (A, B, and C) of *Avibacterium paragallinarum* was evaluated. A total of 12 reference strains and 69 field isolates of *Av. paragallinarum* from Ecuador, Mexico, Panama, and Peru were included in the study. With some exceptions (which were serotyped in the current study), all of the isolates and strains had been previously examined by 2 serotyping schemes (Page and Kume) or were the formal reference strains for the schemes. Three of 6 (50%) reference strains of serogroup A, 2 (100%) of serogroup B, and 1 of 4 (25%) reference strains of serogroup C were correctly serotyped by the mPCR. With the field isolates, the mPCR correctly recognized 16 of the 17 serogroup A isolates, 10 of the 12 serogroup B isolates, and 18 of the 37 serogroup C isolates. Overall, the specificity and sensitivity of the PCR test was as follows: 82.6% and 87.3% (serogroup A), 85.7% and 71.9% (serogroup B), and 46.3% and 100% (serogroup C). The poor performance of the mPCR in terms of recognition of serogroup C isolates (low sensitivity of 46.3%) and the relatively high level of uncertainty about the accuracy of the serogroup A and B results (specificity of 87.3% and 71.9%, respectively) means that the assay cannot be recommended as a replacement for conventional serotyping.

KEY WORDS

Avibacterium paragallinarum; infectious coryza; polymerase chain reaction; poultry; serotyping.



 Solución científica para la salud animal

Naturally Occurring β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide–Independent *Avibacterium paragallinarum* Isolate in Peru

Francesca Falconi-Agapito, Luis E. Saravia, Aldo Flores-Pérez, and Manolo Fernández-Díaz[†] FARVET S.A.C., Carretera Panamericana Sur 766, Km 198.5, Chincha Alta, Chincha, Ica, Peru Received 18 November 2014; Accepted 18 February 2015; Published ahead of print 25 February 2015

RESUMEN

Presencia natural de *Avibacterium paragallinarum* independiente de β -Nicotinamida Adenina Dinucleótido aislado en Perú.

El requerimiento de β -nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) ha sido considerado esencial para el aislamiento del agente causal de la coriza infecciosa (CI), *Avibacterium paragallinarum*; sin embargo reportes de aislamientos independientes de NAD (NAD-I) de esta bacteria en Sudáfrica y en México rechazan este paradigma y por lo tanto es actualmente aceptado que ambos aislamientos dependientes de NAD (NAD-D) así como los independientes de NAD son capaces de causar la coriza infecciosa y por lo tanto pertenecen a la especie *A. paragallinarum*. Se reporta por primera vez en Perú, un aislamiento independiente de NAD procedente de aves con signos típicos de coriza infecciosa. El aislamiento fue identificado con base a su morfología, así como por pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares. El análisis de la secuencia parcial del gene 16S rRNA confirmó el aislamiento como *A. paragallinarum*. Previamente, ningún caso de *A. paragallinarum*, independiente de NAD, había sido reportado en Sudamérica, por lo que el incremento de reportes en el mundo de aislamientos independientes de NAD resalta la necesidad de una reconsideración con respecto a los requerimientos nutricionales in vitro para el correcto aislamiento de esta especie, sino también para la protección conferida por vacunas comerciales de coriza infecciosa contra aislamientos independientes de NAD.

ABSTRACT

The β -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) requirement has been considered to be essential for the isolation of the causal agent of infectious coryza, *Avibacterium paragallinarum*. Nevertheless, NAD-independent reports from South Africa and Mexico dismissed this paradigm. It is now accepted that both NAD-dependent and NAD-independent agents are able to cause infectious coryza and thus belong to the species *A. paragallinarum*. Here, we report for the first time in Peru a NAD-independent isolate from broiler chickens with typical signs of infectious coryza that have received a trivalent inactivated vaccine against infectious coryza.

The isolate was identified based on its morphology, biochemical and serologic tests, and PCR results. Partial 16S rRNA gene sequence analysis confirmed the isolate as *A. paragallinarum*. There have been no cases of NAD-independent *A. paragallinarum* isolates reported in South America.

Increasing reports around the world highlight not only the need to reconsider the in vitro nutritional requirements of this species for its correct isolation but also the cross-protection conferred by commercial infectious coryza vaccines against NAD-independent isolates.

KEY WORDS

Avibacterium paragallinarum, β -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), NAD-independent, V-factor.



 Solución científica para la salud animal

Characterization and Sequencing of a Genotype XII Newcastle Disease Virus Isolated from a Peacock (*Pavo cristatus*) in Peru

Ana Chumbe,^a Ray Izquierdo-Lara,^a Luis Tataje Lavanda,^a Aling Figueroa,^a Karen Segovia,^{b*} Rosa Gonzalez,^b Giovana Cribillero,^b Angela Montalvan,^a Manolo Fernández Díaz,^a Eliana Icochea^b. Farvet S.A.C. Chinchá Alta, Ica, Perú^a. Laboratory of Avian Pathology, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Perú^b. * Present address: Karen Segovia, Department of Population Health, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, Georgia, USA.

RESUMEN

El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), del género *Avulavirus* dentro de la familia *Paramixoviridae*, es responsable de una enfermedad respiratoria aguda y muy contagiosa en aves. Las aves silvestres han sido implicadas en la propagación de la enfermedad a aves domésticas (1). Basados en el análisis de la secuencia del gen de la proteína de fusión (F), las cepas de NDV se clasifican en clase I o II. Las cepas de clase I no son virulentas en pollos, mientras que las cepas de clase II pueden ser lentogénicas, mesogénicas o velogénicas. La clase II se subdivide en al menos 18 genotipos del I al XVIII (2). Varios brotes han sido observados en el Perú en los últimos años, pero la información con respecto a qué genotipos están circulando es escasa.

En 2011, se aisló un NDV a partir de hisopados orales y cloacales de pavos reales (*Pavo cristatus*) con síntomas nerviosos y respiratorios en Huachipa, Lima, Perú. El aislamiento se realizó en huevos embrionados libres de patógenos específicos (SPF) de 9 días de edad. La dosis letal media (LD₅₀) se calculó en pollos SPF de 4 semanas de edad, por diluciones seriadas de 10 en 10. El índice de patogenicidad intracerebral (IPIC) se calculó de acuerdo con protocolos estándar (3). La secuencia completa de NDV/peacock/Peru/2011 se amplificó por 8 pares de cebadores de oligonucleótidos sobrelapantes. Los amplicones purificados se clonaron en el plásmido pGEM-T Easy (Promega) y se secuenciaron con los cebadores T7/SP6. El ensamblaje y el alineamiento fueron hechos en SnapGene y ClustalW, respectivamente. El análisis filogenético y la comparación de secuencias se realizaron en MEGA 6.0.

ABSTRACT

Here, we report the first complete sequence and biological characterization of a Newcastle disease virus (NDV) isolated from a peacock in South America (NDV/peacock/Peru/2011). This isolate, classified as genotype XII in class II, highlights the need for increased surveillance of noncommercial avian species. Newcastle disease virus (NDV) is able to infect 250 species of birds worldwide and is also responsible for an

acute and very contagious respiratory disease. NDV (genus *Avulavirus*, family *Paramixoviridae*) possesses a negative-sense single-stranded RNA genome. Wild birds have been implicated in the spread of the disease to domestic birds (1). Based on sequence analysis of the fusion protein (F) gene, NDV strains are classified in class I or II. Strains of class I are avirulent in chickens, whereas strains in class II can be lentogenic, mesogenic, or velogenic. Class II is subdivided into at least 18 genotypes from I to XVIII (2). Several outbreaks have been observed in Peru in recent years, but information regarding which genotypes are circulating is poor. In 2011, 9 out of 10 peacocks (*Pavo cristatus*) died in a zoo farm in Huachipa, Lima, Peru, with nervous and respiratory symptoms.

The virus isolation, from oral and cloacal swabs, was carried out in 9-day-old embryonated specific-pathogen-free (SPF) chicken eggs. Allantoic fluid (AF) was collected and assessed by hemagglutination and a hemagglutination inhibition test using NDV hyperimmune serum. Amplified AF was clarified, aliquoted, stored at 80°C, and quantified by plaque assay. The 50% lethal dose (LD₅₀) was calculated in 4-week-old SPF chickens by 10-fold serial dilutions.


The intracerebral pathogenicity index (ICPI) was calculated according to standard protocols (3). All protocols that included animals were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Peru. The complete sequence of NDV/peacock/Peru/2011 was amplified by 8 pairs of overlapping oligonucleotide primers using the OneStep reverse transcription-PCR (RT-PCR) kit (Qiagen). Purified amplicons were cloned into the pGEM-T Easy (Promega) and sequenced with T7/SP6 primers.

The assembly and alignment were made on SnapGene and Clustal W, respectively. Phylogenetic analysis and sequences comparison were done in MEGA 6.0.

KEYWORDS

Newcastle disease virus (NDV), genotype XII, genome sequence.



 Solución científica para la salud animal

Design of a predicted MHC restricted short peptide immunodiagnostic and vaccine candidate for Fowl adenovirus C in chicken infection

Hugo Valdivia-Olarte^{1,2}, David Requena^{1,2}, Manuel Ramirez^{1,2}, Luis E Saravia¹, Ray Izquierdo¹, Francesca Falconi-Agapito¹, Milagros Zavaleta¹, Iván Best¹, Manolo Fernández-Díaz¹, Mirko Zimic^{1,2*}. ¹Farvet s.A.C. Carretera Panamericana Sur N° 766 Km 198.5, Chinchá Alta, Ica – Peru; ²Laboratorio de Bioinformática y Biología. Molecular, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, San Martín de Porres, Lima – Peru; Mirko Zimic – E mail: mirko.zimic@upch.pe; Phone: (+511) 3190000 ext. 2604; *Corresponding author

RESUMEN

Fowl adenovirus (FAdVs) es un agente etiológico de múltiples patologías en el pollo. Existen cinco especies diferentes de FAdVs, agrupados como FAdV-A, FAdV-B, FAdV-C, FAdV-D, y FAdV-E. Esto es de interés para el desarrollo de métodos de inmunodiagnóstico y candidatos vacunales para infecciones de FAdV-C en pollos peruanos, con el uso de predicción de péptidos de unión al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, *siglas en ingles*). Hemos secuenciado el genoma completo de una cepa FAdV-C aislada de pollos de granja local. Se identificó un total de 44 genes, los cuales codifican proteínas en el genoma de FAdV. Hemos secuenciado doce alelos MHC de pollo Cobb de diferentes granjas de la costa central de Perú, y posteriormente se determinó tres alelos humanos sustitutos para el MHC-I y cuatro alelos humanos sustitutos para el MHC-II para la predicción de péptidos con unión al MHC. Para la predicción de epítomos candidatos se usaron alelos humanos sustitutos de MHC (como alelos de MHC adecuados al pollo) y el programa bioinformático de predicción NetMHC que usa un modelo de predicción péptido-MHC con todos los genomas FAdV disponible. Los péptidos de FAdV específicos con valores de unión calculados a los MHCs conocidos como MHC-I y MHC-II se filtraron adicionalmente para diagnóstico y epítomos potenciales a vacunas. Se consideró en este análisis la promiscuidad a los alelos MHC-I/II humanos y conservación entre los genomas FAdV disponibles. La localización de los epítomos en la superficie de la proteína fue considerada para los péptidos predichos por el MHC clase II. Por lo tanto, un set de péptidos de FAdV específicos al MHC clase I y clase II fueron reportados en este estudio. Por lo que, una proteína multiepitópica fue construida con estos péptidos, y posteriormente, la prueba para confirmar la producción de anticuerpos específicos en pollos.

ABSTRACT

Fowl adenoviruses (FAdVs) are the etiologic agents of multiple pathologies in chicken. There are five different species of FAdVs grouped as FAdV-A, FAdV-B, FAdV-C, FAdV-D, and FAdV-E. It is of interest to develop immunodiagnostics and vaccine candidate for Peruvian FAdV-C in chicken infection using MHC restricted short peptide candidates.

We sequenced the complete genome of one FAdV strain isolated from a chicken of a local farm. A total of 44 protein coding genes were identified in each genome. We sequenced twelve Cobb chicken MHC alleles from animals of different farms in the central coast of Peru, and subsequently determined three optimal human MHC-I and four optimal human MHC-II substitute alleles for MHC-peptide prediction.

The potential MHC restricted short peptide epitope-like candidates were predicted using human specific (with determined suitable chicken substitutes) NetMHC MHC-peptide prediction model with web server features from all the FAdV genomes available. FAdV specific peptides with calculated binding values to known substituted chicken MHC-I and MHC-II were further filtered for diagnostics and potential vaccine epitopes. Promiscuity to the 3/4 optimal human MHC-I/II alleles and conservation among the available FAdV genomes was considered in this analysis. The localization on the surface of the protein was considered for class II predicted peptides. Thus, a set of class I and class II specific peptides from FAdV were reported in this study.

Hence, a multiepitopic protein was built with these peptides, and subsequently tested to confirm the production of specific antibodies in chicken.



 Solución científica para la salud animal

Coinfection of *Avibacterium paragallinarum* and *Ornithobacterium rhinotracheale* in Chickens from Peru

V. Morales-Erasto,^{A,D} F. Falconi-Agapito,^B G. A. Luna-Galaz,^A L. E. Saravia,^{B,A} Montalvan-Avalos,^B E. Soriano-Vargas E,^A and M. Fernández-Díaz^B.
^ACentro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50200, México. ^BFARVET S.A.C., Carretera Panamericana Sur Km 198,5, Chíncha Alta, Ica, Perú. ^DCorresponding author. CIESA, FMVZ, UAEM, Carretera Panamericana Toluca-Atzacmulco km 15.5, Toluca 50200, México.

RESUMEN

Nota de investigación - Coinfección de *Avibacterium paragallinarum* y *Ornithobacterium rhinotracheale* en pollos en Perú.

En este artículo se reporta la coinfección de *Avibacterium paragallinarum* y *Ornithobacterium rhinotracheale* en dos brotes de coriza infecciosa del Perú. El diagnóstico fue confirmado por el aislamiento bacteriológico, por pruebas de PCR y por la secuenciación del gene del ARN ribosomal 16S. Se determinó la susceptibilidad de los aislamientos a 12 agentes antimicrobianos mediante el método de difusión en disco. Los aislamientos fueron sensibles a la amoxicilina/ácido clavulánico y al florfenicol y fueron resistentes a la oxacilina y al sulfametoxazol/trimetoprim. Se evaluó la coinfección de *Av. paragallinarum* y *O. rhinotracheale* y la gravedad de los signos clínicos mediante la infección experimental de pollos libres de patógenos específicos. El grupo inoculado únicamente con *O. rhinotracheale* solo presentó signos clínicos mínimos en tres de diez pollos. Sin embargo, los grupos inoculados con *Av. paragallinarum* junto con *O. rhinotracheale* indujeron los signos clínicos más severos en comparación con el grupo inoculado únicamente con *Av. paragallinarum*. En conclusión, las coinfecciones con *Av. paragallinarum* y con *O. rhinotracheale* pueden ocurrir y estos brotes pueden ser más severos que las infecciones individuales. Por lo tanto, la prevención, el control y el diagnóstico de *Av. paragallinarum* con *O. rhinotracheale* son importantes en los brotes de la coriza infecciosa.

ABSTRACT

The coinfection of *Avibacterium paragallinarum* and *Ornithobacterium rhinotracheale* in two outbreaks of infectious coryza from Peru is reported. The diagnosis was confirmed by bacteriologic isolation, PCR testing, and sequencing of the 16S rRNA gene. The susceptibility of the isolates to 12 antimicrobial agents was tested by a disk diffusion method. The isolates were susceptible to amoxicillin/clavulanic acid and florfenicol and were resistant to oxacillin and sulfamethoxazole/trimethoprim. The coinfection of *Av. paragallinarum* and *O. rhinotracheale* and the severity of clinical signs were evaluated by experimental infection of specific pathogen-free chickens. The group inoculated with *O. rhinotracheale* alone presented minimal clinical signs in 3 of 10 chickens.

However, the groups inoculated with both *Av. paragallinarum* and *O. rhinotracheale* induced the most-severe clinical signs compared with the group inoculated with *Av. paragallinarum* alone. In conclusion, coinfections with *Av. paragallinarum* and *O. rhinotracheale* may occur, and these outbreaks could be more severe than single infections. Hence, the prevention, control, and diagnosis of *Av. paragallinarum* with *O. rhinotracheale* are important in outbreaks of infectious coryza.

KEY WORDS

Avibacterium paragallinarum, *Ornithobacterium rhinotracheale*, infectious coryza, poultry.



First evidence of detection of Asia/South America II (A/SAll) infectious bronchitis virus in a commercial broiler flock in Peru

Luis Tataje Lavanda, Francesca Falconi Agapito, Ángela Montalván, Carlos Bueno, David Requena, Manolo Fernández Díaz, Tataje-Lavanda L, et al. *Vet Rec Case Rep* 2016;**4**:e000292. doi:10.1136/vetreccr-2016-000292

RESUMEN

El virus de la bronquitis infecciosa (IBV) es causante de grandes pérdidas económicas en la industria avícola a nivel global. El presente reporte describe el aislado de una muestra de IBV proveniente de un pollo broiler criado en una granja del norte del Perú, y sus relaciones genéticas con otras cepas de IBV. Fue secuenciado parte del gen codificante S1 incluyendo las regiones hipervariables HVR1 y HVR2. El aislado VFAR47 fue clasificado con el genotipo Asia/South América II (A/SAll) o también conocido como cepa Q1, usando RT-PCR y el análisis filogenético. Este hallazgo enriquece la información epidemiológica sobre IBV siendo de utilidad para el control de enfermedades en Perú y Latinoamérica.

ABSTRACT

The infectious bronchitis virus (IBV) causes great economic losses to the global poultry industry. This report describes an IBV sample isolated from a broiler farm in the north of Peru and its genetic relationship with other strains of IBV. The authors sequenced part of the S1 coding region including the sequence of the hypervariable regions HVR1 and HVR2. By RT-PCR and phylogenetic analysis, this isolate was classified into the Asia/South America II (Q1-type strain), which has not been previously reported in Peru. This enriches the molecular epidemiology information about IBV and is useful for the control of this disease in Peru and Latin America.

KEY WORDS

Infectious bronchitis virus (IBV), VFAR47, gene sequences, A/SAll genotype



Solución científica para la salud animal

Complete Genome Sequence of Fowl Aviadenvirus Serotype 8b Isolated in South America

Ray Izquierdo-Lara^{a,b}, Katherine Calderón^a, Ana Chumbe^a, Ricardo Montesinos^a, Ángela Montalván^a, Armando E. González^a, Eliana Icochea^a, Manolo Fernández-Díaz^a ^aFARVET S.A.C., Chincha Alta, Ica, Peru. ^bUniversidad Nacional Mayor de San Marcos, Faculty of Veterinary Medicine, San Borja, Lima, Peru

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Los *Fowl aviadenovirus* (FAdVs) están distribuidos en todo el mundo y son los agentes causales de la hepatitis por cuerpos de inclusión (HCI) en pollos. La HCI se caracteriza por necrosis hepática con cuerpos de inclusión intranucleares de eosinófilos o de basófilos en hepatocitos y tasas de mortalidad de alrededor de 10%. Los FAdVs han agrupados en 5 especies (FAdV-A a FAdV-E) sobre la base de su estructura genómica y luego subdividida en 12 serotipos (FAdV-1 a -8a y -8b a -11), basado en pruebas de neutralización cruzada. Todos los serotipos han sido asociados con brotes de HCI. A pesar de la presencia de brotes de HCI en América del Sur, la información sobre las cepas que circulan en este continente es aún limitada.

METODOLOGÍA

En enero de 2016, se observó un brote HCI en pollos de engorde en una granja ubicada en Arequipa, Perú. El brote se caracterizó por una disminución en la ganancia de peso, tasas de mortalidad entre 5 y 10% en pollos jóvenes (2-4 semanas) y la presencia de hígados necróticos en las aves afectadas. El virus (FV211-16) fue aislado en células LMH a partir de los hígados colectados. El ADN viral fue secuenciado en el secuenciador *Genome Sequencer FLX* (Roche, Mannheim, Alemania). Se utilizó el programa *De Novo Assembler 2.6* para el ensamblaje *de novo*. El alineamiento de las secuencias y el análisis filogenético se realizaron en los programas PRANK y Mega 6.0,

respectivamente. Una inoculación intramuscular de la cepa FV211-16 en pollos libres de patógenos específicos (SPF) de 21 días de edad, seguida durante 3 semanas, se llevó a cabo bajo la aprobación del Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Perú.

RESULTADOS

La secuencia completa del genoma de FV211-16 es de 43,976 nucleótidos (nt) de longitud, con un contenido de G + C de 57,9%. El virus codifica 46 marcos de lectura abierta (ORFs) y tiene una organización genética similar a la de otros FAdV-E (serotipos 6, 7, 8a y 8b). Ambas secuencias repetidas terminales invertidas (ITR) son de 71 nt de longitud y son perfectamente complementarias entre sí. Las comparaciones con los otros seis genomas de FAdV-E disponibles en el GenBank (julio, 2016) mostraron identidades desde 84,9 hasta 97,1%. Los análisis filogenéticos basados en los genomas completos mostraron que FV211-16 se agrupa junto con cepas del serotipo 8b (números de accesión: KU517714, GU734104 y KT862811), con identidades entre 95,4 y 97,1%, estando estrechamente relacionado con la cepa de Malasia UPM04217. Alineamientos de amino-ácidos revelaron que la proteína Pentón está altamente conservada a través de todos los FAdV-E, con identidades entre 97,8 y 100%. Comparaciones con otros FAdV-E, mostraron que las proteínas Fibra y Hexón de FV211-16 tienen 9 y 2 mutaciones únicas,

respectivamente. Las mutaciones en el Hexón se encuentran principalmente en las regiones del loop-1 y el loop-2, mientras que las mutaciones en la proteína de Fibra se encuentran en las posiciones 198 (tallo) y 396 (cabeza). Bajo condiciones experimentales, FV211-16 (1.3×10^8 unidades formadoras de placa / ave) mostró 0% de mortalidad (0/20) y signos clínicos mínimos. Del mismo modo, la necropsia reveló lesiones macroscópicas leves típicas de HCl en el hígado y en el tracto intestinal.

CONCLUSIÓN

Este es el primer reporte de una secuencia completa del genoma de un FAdV que circula en América del Sur. Por otra parte, la presencia de FAdV-8b sugiere que otras cepas pueden estar circulando en nuestro país. La vigilancia epidemiológica debe ser incrementada para ayudar en la prevención de HCl.

Número de accesión de la secuencia de nucleótidos. La secuencia completa del genoma de FV211-16 ha sido depositada en el GenBank bajo el N° de accesión KX258422.

ABSTRACT

Fowl aviadenoviruses (FAdVs) are worldwide-distributed viruses and are the causative agents of the inclusion body hepatitis (IBH) in chickens. IBH is characterized by hepatic necrosis with microscopic eosinophil or basophilic intranuclear inclusion bodies in hepatocytes and mortality rates around 10%. FAdVs have been grouped into five species (FAdV-A to FAdV-E) on the basis of their genome structure and further divided into 12 serotypes (FAdV-1 a -8a y -8b a -11), based on a cross-neutralization test. All serotypes have been associated with IBH outbreaks. Despite the presence of IBH outbreaks in South America, information about the circulating strains in this continent is still limited.

METHODS

In January 2016, an IBH outbreak was observed in broiler chickens in a farm located in Arequipa, Peru. The outbreak was characterized by decreased weight gain, mortality rates around 5 to 10% in young chickens (2 to 4 weeks), and necrotic livers in affected birds. The virus was isolated from collected livers in LMH cells. Viral DNA was sequenced on the Genome Sequencer FLX platform (Roche, Mannheim, Germany). The de novo Assembler 2.6 software program was used for de novo assembly. Sequence alignment and phylogenetic analysis were performed on PRANK and Mega 6.0, respectively. An experimental intramuscular inoculation of FV211-16 in 21-day-old specific-pathogen-free (SPF) chickens, followed for 3 weeks, was performed under the approval of the Institutional

Animal Care and Use Committee of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Peru.

RESULTS

The full-genome sequence of FV211-16 was 43,976 nucleotides (nt) long, with 57.9% G+C content. The virus codifies 46 open reading frames (ORFs) and has a gene organization similar to that of FAdV-E (serotypes 6, 7, 8a, and 8b). Both inverted terminal repeat (ITR) sequences are 71 nt long and match perfectly to each other. Comparisons with the other six FAdV-E genomes available in the GenBank (as of July 2016) showed identities of 84.9 to 97.1%.

Phylogenetic analyses based on complete genome sequences showed that FV211-16 clusters together with serotype 8b strains (accession numbers KU517714, GU734104, and KT862811), with identities between 95.4 and 97.1%, with the most closely related strain being the Malaysian strain UPM04217. Amino acid alignments revealed that Penton protein was highly conserved through all FAdV-E strains, with identities between 97.8 and 100%. Compared with other FAdV-E strains, the hexon and fiber proteins of FV211-16 have nine and two unique amino acid mutations, respectively. The mutations in the hexon are mainly located in loop-1 and loop-2 regions, while mutations in fiber protein were located in positions 198 (shaft) and 396 (knob).

Under experimental conditions, FV211-16 (1.3×10^8 PFU/bird) showed no mortality (0/20) and minimal clinical signs. Likewise, necropsy revealed mild gross lesions of IBH in the liver and intestinal tracks.

CONCLUSION


Overall, this is the first complete genome sequence of an FAdV circulating in South America. Moreover, the presence of FAdV-8b suggests that other strains may be circulating in our country. Surveillance should be increased to aid in the prevention of IBH.

Accession number(s): The complete genome sequence of FV211-16 has been deposited to GenBank under accession no. KX258422.

KEYWORDS

Inclusion body hepatitis, *Fowl Aviadenovirus*, genome sequencing, Fiber, Hexon.



 Solución científica para la salud animal

Pathotyping and Phylogenetic Characterization of Newcastle Disease Viruses Isolated in Peru: Defining two novel subgenotypes within Genotype XII

Chumbe-Mendoza A.,^{AB#} Izquierdo-Lara R.,^{AB#} Tataje-Lavanda L.,^A Rosa González,^B Giovana Cribillero,^B Armando E. González,^B Fernández-Díaz M.,^A Icochea-D'Arrigo ^{E,B}. ^ALaboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET. ^BLaboratorio de Patología Aviar, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, San Borja, Lima, Perú. [#]Estos autores contribuyeron igualmente para este trabajo.

RESUMEN INTRODUCCIÓN

Las infecciones aves de corral con cepas virulentas del Paramixovirus aviar 1 (APMV-1), también conocido como virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), causan la enfermedad de Newcastle (ND). Esta enfermedad altamente contagiosa afecta a aves de corral y muchas otras especies de aves alrededor del mundo. En países donde la enfermedad es prevalente, el monitoreo constante y la caracterización de aislados que causan brotes de la enfermedad son necesarios.

METODOLOGÍA

En este estudio, reportamos los resultados de las pruebas de patogenicidad y los análisis filogenéticos basados en el gen de fusión (F) de siete cepas de NDV aisladas de varias regiones de Perú desde 2004 hasta 2015.

RESULTADOS

Seis de los virus exhibieron un índice de patogenicidad intracerebral (ICPI) entre 1.75 y 1.88, correspondiente al de un patotipo velogénico. El virus restante tuvo un ICPI de 0.00, correspondiente a un patotipo lentogénico. Estos resultados fueron consistentes con

las secuencias de aminoácidos en el sitio de clivaje de la proteína F. Todos los aislados velogénicos presentaron la secuencia de aminoácidos polibásicos 112RRQKR↓F117 en el sitio de clivaje de la F. Los análisis filogenéticos de las secuencias completas del gen F revelaron que todos los aislados están clasificados en la clase II de los APMV-1. Las cepas velogénicas fueron clasificadas en el genotipo XII, mientras que el virus lentogénico pertenece al genotipo II y está altamente relacionada la cepa vacunal LaSota. Además, la topología del árbol, los valores de bootstrap y las distancias genéticas observadas dentro del genotipo XII resultaron en la identificación de los nuevos subgenotipos XIIa (en América del Sur) y XIIb (en China), y posiblemente dos clados dentro del genotipo XIIa. Todos los virus velogénicos aislados en Perú pertenecen al subgenotipo XIIa.

CONCLUSIÓN

En general, nuestros resultados confirman la presencia del genotipo XII en Perú y sugieren que es el genotipo prevalente actualmente circulando en nuestro país. La caracterización filogenética de estos aislados ayudará para caracterizar la evolución de NDV, y puede ayudar al desarrollo de vacunas específicas acorde a nuestras necesidades regionales.



ABSTRACT

INTRODUCTION

Infections of poultry with virulent strains of the Avian Paramyxovirus 1 (APMV-1), also known as Newcastle disease viruses (NDVs), cause the Newcastle disease (ND). This highly contagious disease affects poultry and many other species of birds worldwide. In countries where the disease is prevalent, constant monitoring and characterization of isolates causing outbreaks is necessary.

METHODS

In this study, we report the results of pathogenicity testing and phylogenetic analyses of seven NDVs isolated from several regions of Peru between 2004 and 2015.

RESULTS

Six viruses had intracerebral pathogenicity indices (ICPI) of between 1.75 and 1.88, corresponding to a velogenic pathotype. The remaining virus had an ICPI of 0.00, corresponding to a lentogenic pathotype. These results were consistent with amino acid sequences at the fusion protein (F) cleavage site. All velogenic isolates had the polybasic amino acid sequence 112RRQKR↓F117 at the F cleavage site.

Phylogenetic analyses of complete F gene sequences showed that all isolates are classified in class II of APMV-1. The velogenic viruses are classified in genotype XII, while the lentogenic virus is classified in genotype II, closely related to the LaSota vaccine strain. Moreover, tree topology, bootstrap values and genetic distances observed within genotype XII resulted in the identification of novel subgenotypes XIIa (in South America) and XIIb (in China), and possibly two clades within genotype XIIa. All velogenic Peruvian viruses belonged to the subgenotype XIIa.

CONCLUSION

Overall, our results confirmed the presence of genotype XII in Peru and suggested that it is the prevalent genotype currently circulating in our country. The phylogenetic characterization of these isolates helps to characterize the evolution of NDV, and may help with the development of vaccines specific to our regional necessities.

KEYWORDS

Newcastle disease virus, fusion gene, phylogenetic analysis, genotype XII, Peru.



FARVET S.A.C. OFICINA EN LIMA
Cristóbal de Peralta Sur N° 395,
Surco Valle Hermoso, Lima - Perú
Telf. (51) 1 3441419 Cel. 998324596
Email: farvet@farvet.com / farvetlima@farvet.com

FARVET S.A.C. Planta de producción y centro de
investigación, desarrollo e innovación en Chincha
Panamericana Sur N° 766 Km 198.5, Chincha Alta - Ica - Perú
Telf. (51) 56 262267 - eFax (51) 17057202 Cel. 998344760
Email: farvet@farvet.com / farvetchincha@farvet.com

farvet.com

