

OPTIMIZACION DE UNA PRUEBA DE PCR PARA EL DIAGNOSTICO DEL VIRUS DE LEUCOSIS AVIAR (ALV)

Calderón R M, Rodríguez LA., Vera VJ. Ramírez G. C¹

Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia. Departamento de Salud y
Producción Animal.

RESUMEN

El virus de leucosis aviar (ALV) ocasiona una enfermedad crónica persistente, causante de grandes pérdidas económicas. En 1998 se determinó en el país la presencia de virus del subgrupo J, por prueba de ELISA, sin realizarse aislamiento viral. Dada la necesidad de establecer un diagnóstico certero y a su vez diferenciar entre los subtipos de ALV, en ésta investigación se optimizó una prueba de transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), usando dos grupos de primers diseñados para la detección específica de ALV A-D y ALV-J respectivamente. Estos primers amplifican una región bien conservada del gen que codifica para la glicoproteína de superficie *gp85*. Con la prueba de RT-PCR se examinaron 47 muestras de sueros provenientes de un brote de leucosis aviar reportado en Colombia en 1998, las cuales fueron previamente diagnosticadas por prueba de ELISA en el ICA encontrando 33 positivos, sin diferenciar el subgrupo actuante. Los mismos 47 sueros evaluados por RT-PCR indicaron que 39 fueron positivos para el ALV-D y 8 negativos, a su vez cuando se evaluaron con los primers específicos para ALV-J se encontraron 14 positivos y 33 negativos, estableciéndose que 12 de las muestras positivas lo fueron tanto para ALV-J como para ALV-D, demostrando la alta confiabilidad de la prueba. La

¹ E-mail: dgcramire@veterinaria.unal.edu.co

adecuación del RT-PCR para el diagnóstico de Leucosis Aviar es una alternativa real para la aplicación de programas de prevención, control y erradicación de la enfermedad y puede emplearse como sistema de detección temprana de la infección tanto a nivel de incubadoras, plantas de reproductoras así como en la recepción de aves en las granjas de producción.

PALABRAS CLAVE: Leucosis aviar, RT-PCR, diagnóstico.

PCR OPTIMIZATION FOR AVIAN LEUKOSIS VIRUS

DIAGNOSIS (ALV).

SUMMARY

Avian leukosis virus produces a chronic, persistent disease, and is responsible for important economic losses in the poultry industry. The presence of the disease was established in Colombia in 1998 by an ELISA test without virus isolation. Due to the necessity for a right diagnosis and to differentiate between ALV subtypes, an RT-PCR was optimized. Two pairs of primers against a well conserved region of the gp85 surface glycoprotein were used. 47 serum samples from a field outbreak were evaluated using the RT-PCR test. From a previous ELISA test conducted at the Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) 33 out of the 47 samples were diagnosed as positive, without subgroup differentiation. The RT-PCR for the same serum samples indicated 39 positive to ALV-D and 8 negative. With specific primers for ALV-J 14 positive and 33 negative results were obtained. According to this 12 samples were positive for ALV-J as for ALV-D, showing a high confidence for the RT-PCR. The normalization of an RT-PCR for avian leukosis is an excellent

alternative to use for the control, prevention and helpfully eradication programmes. This procedure can be used early in the infection period with breeders and in poultry farms at the reception of chicks.

Key words: Avian leucosis, RT-PCR, diagnosis

INTRODUCCIÓN

La leucosis aviar (ALV) es causada por un retrovirus - oncovirus tipo C. Agrupa enfermedades comunes que inducen neoplasias benignas y malignas, los virus del género ALV que afectan usualmente a las aves son los subgrupos A,B,C,D, E y J que causan importantes pérdidas económicas en integraciones avícolas (Zabala, 1998). Esta enfermedad se caracteriza por ser una entidad inmunosupresora, con signos clínicos particulares y mortalidad variable, relacionada generalmente con la asociación a otros agentes infecciosos que la potencializan (Payne, 1998a). Se ha demostrado que las proteínas de superficie *gp85*, en los subgrupos A al E presentan entre un 80 y un 85% de homología entre ellos en tanto el subgrupo J solo presenta una homología del 40% (Ruis et al., 1999). Los trabajos sobre leucosis han sido dirigidos a la obtención de métodos diagnósticos sensibles y específicos, que aseguren la detección certera del virus y a su vez orienten los planes de control y erradicación a nivel mundial (Payne et al., 1997).

Pensando en esto se han desarrollado varias pruebas diagnósticas para esta enfermedad entre las cuales se encuentran la prueba de ELISA, COFAL, el aislamiento viral y la RT-PCR. El uso de PCR es justificado por ser rápido, específico y mas sensible que las pruebas diagnósticas convencionales para la detección de ALV (Smith et al., 1998).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se origina de la replicación de DNA donde se producen grandes cantidades de una secuencia deseada a partir de secuencias heterogéneas. La PCR puede amplificar copias de una región seleccionada de 50 a varios miles de pares de bases, obteniéndose un producto final con una longitud característica que corresponde al tamaño de la región amplificada y ha sido previamente analizada a partir del genoma de interés (Calnek et al., 1997). Para detectar virus RNA se deben obtener copias de DNA complementario (DNAc) a partir del RNA usando una enzima denominada transcriptasa reversa, esta técnica se denomina RT-PCR. (Silva y Smith, 1997). La PCR es un procedimiento altamente sensible para la detección de agentes infecciosos en tejidos (sangre, riñón hígado, encéfalo), aunque la infección se encuentre en pocas células. Otras características de la PCR son, que no diferencia entre organismos viables y no viables, puede identificar y amplificar secuencias integradas en el DNA de células infectadas y tiene un papel importante en la evaluación de vacunas (OIE., 2000). La PCR tiene muchos usos en el diagnóstico de infecciones crónicas persistentes como las causadas por retrovirus e infecciones latentes como las causadas por herpes virus. Estos agentes infecciosos presentan serios problemas para su diagnóstico y prevención ya que los animales infectados no manifiestan signos clínicos hasta que la enfermedad está avanzada y para entonces los animales infectados ya han diseminado el virus (Current Protocols, 1992).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y manejo de sueros

Para el estudio se evaluaron 47 sueros provenientes de brotes de Leucosis Aviar que se presentaron en 1998, originarios de la zona centro del país, pertenecientes al banco de sueros del laboratorio de patología aviar en el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA); dichos sueros (tanto positivos como negativos) fueron analizados con la prueba de ELISA directa para determinar antígeno de ALV (IDEXX® ALV-Ag), y dichos resultados fueron desconocidos en el desarrollo de la prueba de PCR.

Los sueros se fraccionaron en 2 alícuotas de 200µl en tubos eppendorf de 1.5µl por cada muestra; una de éstas se tomó para ser tratada con TRIZOL® Reagent (Life Technologies) en relación de 2:3 (200µl de suero y 300µl de TRIZOL) y las dos se almacenaron a -70 °C hasta el proceso de extracción.

Como control positivo se emplearon muestras de sobrenadante de cultivo celular CEF (fibroblastos de embrión de pollo) de virus de leucosis aviar de los subgrupos A, B, C, D y J, provenientes del banco de virus de la Universidad de Athens en Georgia. Como control negativo se usó sangre completa de pollos SPF del ICA y el virus de leucosis bovina VLB, también se evaluó virus de la reticuloendoteliosis, variable Virus de necrosis del Bazo (REV - SNV), con el fin de descartar reacciones cruzadas con otros retrovirus. Este material fue almacenado a -70 °C hasta el proceso de extracción.

Extracción de RNA de controles y muestras

Se tomaron 500µl de cada uno de los controles positivos y negativos, se trataron con TRIZOL®LS en una proporción 1:2 (1000µl de TRIZOL®LS Reagent).

Todo el material biológico tratado con el buffer de lisis (TRIZOL®) fue llevado a temperatura ambiente por 5 minutos, se centrifugó a 12.000g (10.000rpm, a 4°C en centrífuga refrigerada BECKMAN J2-21) por 10 minutos, luego se tomó el sobrenadante y se agregaron 200µl de cloroformo; se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se mantuvo a temperatura ambiente por 3 minutos, para ser nuevamente centrifugado a 12.000g (10.000rpm, centrífuga refrigerada a 4°C BECKMAN J2-21) por 15 minutos; se tomó el sobrenadante (fase acuosa) y se le adicionaron 250µl de isopropanol y 250µl de una solución de NaCl 1.2M y citrato de sodio 0.8M, se realizó agitación por vortex y se mantuvo a temperatura ambiente por 10 minutos para ser nuevamente centrifugado a 12.000g (10.000rpm, centrífuga refrigerada a 4°C BECKMAN J2-21) por 10 minutos, se eliminó todo el sobrenadante teniendo cuidado de conservar el pellet de RNA, se agregó 1 ml de etanol, se realizó agitación por vortex y se centrifugó a 7500g (8.000rpm, centrífuga refrigerada a 4°C BECKMAN J2-21) por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y el pellet fue llevado a baño maría a 68°C hasta que no se observaron residuos de líquido, teniendo cuidado de no secar mucho el pellet el cual fue resuspendido en 60µl de agua DEPC a 68°C.

Selección de Primers

En el estudio se emplearon los primers H5, H7, AD1 que fueron derivados de la publicación “*Development and Application of polymerase chain reaction (PCR) test for the detection of subgroup J avian leucosis virus*” (Smith et al., 1998). El par H5-H7 reconoce los virus de la leucosis aviar subgrupo J, su secuencia va dirigida a amplificar una región bien conservada del gen que codifica la glicoproteína de superficie *gp85*, el fragmento que se encuentra con este par de primers corresponde a una longitud de 545 pb.

El par de primers H5-AD1 reconoce los virus de leucosis aviar subgrupos A-D, que tienen entre ellos una homología del 80-85 % de su genoma (Smith et al., 1998), donde las porciones que codifican para los genes *gag* y *pol* presentan 96 a 97 % de identidad (Bai et al., 1995). Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de primers, posición, objetivo de amplificación y tamaño esperado del producto de PCR (tomado de Smith L. M. 1998).

PRIMER	SECUENCIA 5'-3'	POSICION	OBJETIVO DE AMPLIFICACIÓN	TAMAÑO DEL PRODUCTO*
H5	GGATGAGGTGACTAAGAAAG	5258-5277	-----	-----
H7	CGAACCAAAGGTAACACACG	5783-5802	subgrupo J de ALV	545 pb
AD1	GGGAGGTGGCTGACTGTGT	5327-5345	subgrupo A-E de ALV	295 – 326 pb

Trascricpción reversa (RT)

Se tomaron 5 µl de RNA a los cuales se le adicionaron 5 µl de random primer (500ng) y 10 µl de agua DEPC y se calentaron a 70°C por 5 minutos en el termociclador, se enfrió rápidamente para facilitar la unión de los random primers

al RNA, a esta solución se le agregó una premezcla para RT con las siguientes características: 10µl de Buffer II de MMLV PROMEGA® (que contiene 50 mM de Tris HCl (pH8.3), 75 mM de KCl, 3 mM MgCl₂ y 10 mM de DTT), 10 mM de dNTPs, 40 U/µl de RNAsin inhibitor (PROMEGA®), 200 U/µl de M-MLV (PROMEGA®), agua DEPC hasta completar 50 µl de reacción final, se incubó a 42°C por una hora en el termociclador (Gene-Amp ® PCR SYSTEM 9700 APPLIED BIO SISTEM), el producto obtenido se utilizó en la PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se tomaron 5 µl del producto obtenido en la RT (cDNA), 10µl de Buffer A Taq DNA Polymerase, PROMEGA®, (50 mM de Tris HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% Glicerol y 1% Triton X-100) MgCl₂ 3 mM, 10 mM dNTPs, 100 pmol de cada primer, 5 U de Taq polimerasa y se completaron 50 µl de reacción final con agua DEPC, esta mezcla se llevó al termociclador en donde se usaron los siguientes pasos para la amplificación: denaturalización inicial a 94 °C por 4 minutos seguido de 35 ciclos con temperatura de denaturación de 94 °C por 30 segundos, annealing 58°C por un minuto, extensión de 72°C por 90 segundos y una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

El DNA obtenido se observó en geles de agarosa al 2%, se usó como buffer de electroforesis TBE 1X que contiene por cada litro 12.11g de Trizma base, 6.12g de ácido bórico, 4 g de EDTA 0.5M pH 8.0 en 1L de agua destilada; para su

visualización los geles fueron teñidos con Bromuro de etidio al 0.5 % (Yackwood y Yackwood, 1995; Payne, 1998a, 1998b).

RESULTADOS

Resultados H5-AD1 (ALV)

Al examinar los controles positivos de los subgrupos A-D de ALV, se encontraron bandas del tamaño reportado (295 – 326 pb), se evaluó también REV (virus de retículoendoteliosis), se observaron dímeros de primer y en el pozo correspondiente al control negativo (células VERO infectadas con el virus de la leucosis bovina) no se observó banda (Figura 1). Al evaluar las muestras de brotes locales se hallaron 39 sueros positivos a leucosis ALV (Figura 2).

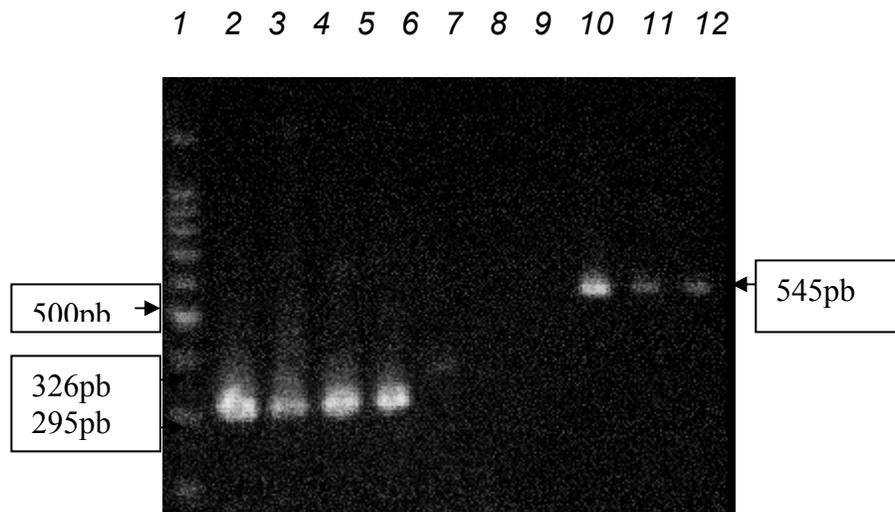


Figura 1. ALV A-D enfrentado a los primer AD1-H5: 1. patrón de peso molecular, 2. ALV-A, 3. ALV-B, 4. ALV-C, 5. ALV-D, 7. REV-SNV, 8. control negativo (virus de leucosis bovina). ALV J enfrentado a los primer h7-h5, 9. control negativo (virus de leucosis bovina), 10. j1, 11. j2, 12. j3.

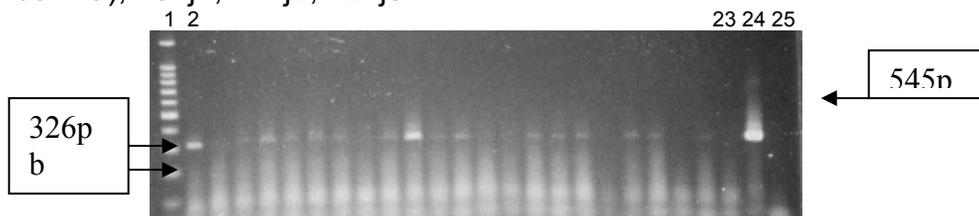


Figura 2. Muestras de campo enfrentadas a los primer AD1-H5, 1. patrón de peso molecular, 2-23 muestras de campo, 24 control positivo, 25 control negativo.

Resultados H5-H7 (ALV-J)

Como resultado de la evaluación de los virus ALV del subgrupo J se observó un producto del tamaño esperado (545 pb); en el control negativo no se observó banda; al correr las muestras provenientes de brotes de leucosis aviar en el país se encontraron 14 sueros positivos (producto de 545 pb), en los 33 restantes no se observó dicha banda (Figura 3).

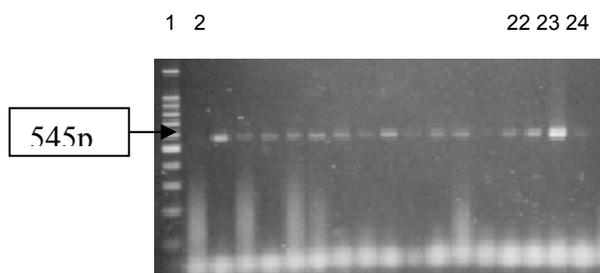


Figura 3. . Muestras de campo enfrentadas a los primer H7-H5: 1. patrón de peso molecular, 2-22 muestras de campo, 23 control positivo, 24 control negativo.

DISCUSIÓN

Con la normalización de la técnica de RT-PCR para el virus de leucosis aviar se cuenta actualmente con una herramienta diagnóstica con ventajas comparativas frente a las técnicas serológicas de uso común en su diagnóstico. Su empleo permite detectar el virus aún en casos en los cuales se presentan infecciones persistentes; como en la metodología se estableció la comparación de RT-PCR

con pruebas de ELISA se ratifica su confiabilidad y en particular, a pesar de realizarse una prueba con muestras tomadas años atrás, permitió la confirmación y mejora de los diagnósticos de esa época, lo cual es un indicativo para estudio de brotes de campo en los cuales se haya almacenado el material biológico para su posterior comprobación.

Adicionalmente, la evaluación por prueba de ELISA permitió establecer la presencia de la enfermedad sin definir exactamente cuales eran los tipos actuantes del virus. Hoy en día con base en la evaluación molecular se pudo comprobar la presencia del virus J en 14 de los sueros evaluados, lo que evidencia la necesidad de contar con métodos de alta sensibilidad como pueden ser las técnicas moleculares.

Se estima que la amplificación de la gp85 es específica para los subgrupos A-D y para el subgrupo J, no se reporta en la literatura la presencia de infecciones mixtas como las establecidas en el presente trabajo. Es importante tener en cuenta éste hallazgo en futuras presentaciones de la enfermedad, lo cual implica que se debe realizar RT-PCR para los dos tipos de grupos definidos en la enfermedad.

Debido a la limitante de no contar con un número representativo de muestras, dadas las mismas condiciones de trabajar con un banco de sueros, no fue posible establecer comparaciones de sensibilidad y especificidad entre la prueba de ELISA y la RT-PCR.

Con la prueba molecular se pueden detectar falsos negativos, lo cual frente a pruebas de ELISA que detectan anticuerpos circulantes le confiere ventajas comparativas; no obstante en la actualidad también se cuenta con pruebas de ELISA de captura de antígeno. Como se demostró en el brote de leucosis la prueba de ELISA de captura de antígeno, diagnostica la enfermedad más no el subgrupo actuante; en el caso de RT- PCR, cuando se emplea con primers específicos para los subgrupos, permite diferenciar la presencia del subgrupo J de los restantes, lo cual desde el punto de vista de acciones sanitarias en el manejo de la enfermedad es importante.

El haber empleado primers específicos contra el Virus de leucosis - sarcoma aviar (ALV), complejo de enfermedades de tipo crónico y persistente que permanecen dentro de una explotación sin tener una manifestación evidente, (Zabala, 1998), permite igualmente, con una misma muestra ampliar la cobertura diagnóstica de la prueba de RT-PCR.

Un diagnóstico adecuado de este tipo de enfermedades facilita el manejo de las mismas y aunque no puede asegurar el 100% de detección, pruebas como la PCR pueden ofrecer un diagnóstico adecuado y mucho mas preciso (dada su alta sensibilidad y su especificidad) (Thuy et al., 1999)

Aunque se trabajó con un bajo número de muestras sospechosas a leucosis aviar por ser muestras provenientes de un banco de sueros, los resultados confirman la

presencia de leucosis aviar grupo J en el brote de 1998; por tanto se recomienda en futuros trabajos de comparación de las pruebas ELISA y RT-PCR la utilización de un mayor número de muestras que permita establecer la sensibilidad y especificidad de las pruebas.

Al enfrentar las muestras de campo a ambos pares de primers se encontró que en el brote de campo evaluado muy probablemente había una infección mixta de leucosis A-D y J; la historia y los hallazgos de necropsia de estas aves coinciden con cualquiera de las dos entidades; clínicamente las aves evaluadas presentaban una sintomatología similar. Manifestaban depresión, anorexia, claudicación, baja en la producción, se hallaron aves con hepatomegalia y esplenomegalia con infiltraciones en la superficie y el parénquima, nódulos en tráquea, pulmón, páncreas mesenterio, rosario nodular blanquecino en la cara interna del esternón, hemorragias subcutáneas y lesiones neoplásicas retrooculares (ICA, 1998).

Finalmente, cabe anotar que el uso de estas pruebas como un método rápido y sensible de detección de virus en estudios epidemiológicos y en programas de erradicación está confirmado (Smith et al., 1998), por tanto se deben realizar éste tipo de pruebas en planes de control y erradicación en aves de alto valor comercial.

BIBLIOGRAFIA

1. Bai. J., Payne. L. N., Skinner. M. A.,. HPRS-103 (Exogenous avian leucosis virus, subgroup J) has an env gene related to those of endogenous elements

EAV-0 and E51 and E element found previously only in sarcoma viruses. *J Virol.* 69, 779-784, 1995.

2. Calnek, W., Barnes H. J., Beard C. W., McDougald, L. R. and Saif, Y. M. eds. *Diseases of Poultry*, B, 10 th ed, University Press, Ames, IA., pp 342 – 385. 1997.

3. Committee reports. Report of the Committee on Transmissible Diseases of Poultry and Other Avian Species. United States Animal Health Association, 1999.

4. CURRENT PROTOCOLS., THE POLYMERASE CHAIN REACTION (15-16) 1992.

5. ICA., *Historias clínicas* 1998.

6. OIE, 2000. Principles of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases. Manual of Standards for diagnostic test and vaccines, 4th edition.

7. Payne, L. N. Lymphoid leucosis, *Poultry International* May, pp 31-32. 1998a.

8. Payne, L. N. HPRS-103: retrovirus strikes back. The emergence of subgroup J Avian Leukosis Virus, *Avian Pathology*, pp. s36-s45. 1998b.

9. Payne, L. N., Howes K., Smith L. M. and Venugopal K., Current status of diagnosis, epidemiology and control of Alv - J, Proc. avian tumor viruses symposium, American Association of Avian Pathologists. Kennnett Square, PA, pp 58 - 62. 1997.

10. Ruis. B. L., Benson. S. J., Conklin. K. F.,. Genome structure and expression of the Ev/J family of avian endogenous viruses. *J Virol.* 73:5345-5355. 1999.

11. Silva R. F. and Smith E. J., PCR as a tool for the diagnosis of avian tumor viruses and tumors, Proc. Avian Tumor Viruses Symposium, American Association of Avian Pathologists. Kennnett Square, PA, pp 19 - 22. 1997.

12. Smith, L. M., Brown, S. R., Howes, K., McLeod, S., Arshad, S. S., Barron, G. S., Venugopal, K. McKay, J. C. & Payne, L. N.,. Development and application of polymerase chain reaction (PCR) test for the detection of subgroup J avian leukosis virus, *Virus Res.* 54, 87-98. 1998.

13. Thuy D, Spencer J., Traina-Dorge V, Mullin D., Garry R and Eric S. Detection of exogenous and endogenous avian leukosis virus in commercial chicken eggs using reverse transcription and polymerase chain reaction assay *Avian Pathol.* 28, 383-389. 1999.

14. Venugopal, K ., Smith. L. M., Howes. K., Payne. L. N.,. Antigenic Variants of subgroup J avian leukosis virus: Sequence Analysis reveals multiple changes in the env gene. *J Gen Virol.* 79, 757-766. 1998

15. Yackwood, D. and Yackwood, M. Molecular Techniques for the diagnosis of avian viruses. Memorias XIV Congreso Latinoamericano de Avicultura. Octubre, pp 21-26. 1995.

16. Zabala, G. An overview of myeloid leukemia in meat - type chicken, the Poultry Informed Professional. Published by the University of Georgia, pp 58 - 60. 1998.