



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS
VIRALES OBTENIDOS DE POLLOS BROILER CON ARTRITIS Y
TENDOSINOVITIS**

Ramón Alejandro Zegpi Lagos

Memoria para optar al título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

PROFESOR GUÍA: Héctor Hidalgo

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE

2015



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS
VIRALES OBTENIDOS DE POLLOS BROILER CON ARTRITIS Y
TENDOSINOVITIS**

Ramón Alejandro Zegpi Lagos

Memoria para optar al título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

NOTA FINAL:.....

FIRMA

PROFESOR GUÍA: HECTOR HIDALGO

PROFESOR CORRECTOR: FEDERICO CIFUENTES

PROFESOR CORRECTOR: VÍCTOR NEIRA

SANTIAGO, CHILE

2015

Resumen

En el presente trabajo se realizó una caracterización molecular a aislados virales de Reovirus aviar. Las muestras se obtuvieron a partir de aves que presentaron signología clínica semejante a la descrita para la artritis viral o tendosinovitis. Se obtuvo líquido sinovial de las articulaciones afectadas, el que fue inoculado en la membrana corioalantoídea de huevos embrionados de pollo SPF de 10 días de incubación y se incubaron por 5 días más. A partir de las membranas que presentaron lesiones significativas se extrajo el RNA de los virus que pudieran haber mediante el kit PureLink® Viral RNA/DNA Mini Kit. Se realizó la prueba de RT-PCR usando las enzimas SuperScript III ® y Platinum Taq Polimerase ®. Se usaron 4 sets de partidores, cada set teniendo como blanco parte de cada uno de los segmentos cortos (S1, S2, S3 y S4) del genoma del virus. Los productos del RT-PCR se sometieron a electroforesis en agar noble al 1% mezclado con Red Gel® y fueron observados en un transiluminador UV. Desde el gel se extrajo el ADN amplificado de las muestras positivas usando el kit Nucleospin® Extract II, sólo para la parte del fragmento S1 del genoma que codifica la proteína σ C. Este purificado fue secuenciado usando el método de Sanger y las secuencias fueron analizadas usando el programa computacional Geneious® versión 4.8.5. El análisis consistió en comparar secuencias genéticas codificantes de la proteína sigma C de cepas vacunales conocidas con respecto a las cepas aisladas, asimismo para las secuencias aminoacídicas. Los resultados mostraron que la secuencia genética que codifica a la proteína sigma C de cepas de campo difiere de cepas vacunales hasta en un 43% y que las secuencias aminoacídicas se diferencian hasta en un 52,2% entre estos aislados. Esta proteína tiene especial importancia en el desarrollo de una respuesta inmune protectora contra la enfermedad.

Palabras clave: Reovirus Aviar, Avian Orthoreovirus, RT-PCR.

Abstract

In the present work, a molecular characterization of avian reovirus isolates is performed. Samples were obtained from birds that showed signology similar to that described for clinical viral arthritis or tenosynovitis. The samples consisted of synovial fluid from affected joints, which was inoculated on the chorioallantoic membrane of SPF embryonated chicken eggs. From the membranes that showed significant injuries, RNA was extracted using the PureLink® kit Viral RNA / DNA Mini Kit. RT-PCR was performed using the SuperScript III® and Platinum® Taq Polymerase enzymes. Four sets of primers were used, each set having as target part of each of the short segments (S1, S2, S3 and S4) of the virus genome. The RT-PCR products were electrophoresed on 1% agar Noble gel mixed with Red Gel® and observed on a UV transilluminator. From the gel, the DNA amplified from positive samples was extracted using the NucleoSpin Extract II kit, only for part of the S1 genome fragment encoding the protein σ C. This purified DNA was sequenced using the Sanger method and the sequences were analyzed using the computer program Geneious® version 4.8.5. The analysis involved comparing genetic sequences coding for the protein sigma C from known vaccine strains against the isolates obtained from field samples. Also the amino acid sequence was compared. The results showed that the genetic sequence encoding the protein sigma C of field strains differ by up to 43% and amino acid sequences which differ by up to 52.2% when compared with vaccines strains. This protein is particularly important in developing a protective immune response against disease.

Keywords: Avian Reovirus, Avian Orthoreovirus, RT-PCR.

Índice

I.	Introducción.....	1
II.	Revisión bibliográfica	3
	Etiología	3
	Clasificación	3
	Morfología del virión	3
	Genoma.....	3
	Proteínas	3
	Replicación.....	4
	Diversidad antigénica.....	5
	Epidemiología	6
	Patogénesis.....	7
	Signos clínicos	7
	Identificación viral	8
	Aislamiento en Huevos Embrionados de Gallinas	8
	Clasificación de los reovirus aviares	9
	Situación de RVA en Chile	12
III.	Objetivo general.....	13
IV.	Objetivos específicos	13
V.	Materiales y métodos.....	14
	i. Materiales.....	15
	1. Materiales Biológicos.....	15
	2. Huevos Embrionados	15
	3. Equipamiento	15
	4. Reactivos y fungibles	16

5. Partidores.....	17
ii. Métodos	18
1. Obtención y preparación de muestras para aislamiento viral.....	18
2. Aislamiento viral en MCA-HE	18
3. Extracción y Purificación de RNA de aislados virales	19
4. RT-PCR para amplificar el fragmento de RNA de RVA.....	19
5. Electroforesis en Gel de Agarosa.....	22
6. Extracción, Secuenciación y análisis del fragmento S1	22
VI. Resultados.....	24
Aislamiento viral en HE.....	24
RT-PCR de aislados virales en HE	24
Secuenciación de segmento S1	27
VII. Discusión	29
VIII. Conclusiones.....	32
IX. Bibliografía.....	33
X. Anexos.....	39
Anexo 1.....	39
Anexo 2	39
Anexo 3	40
Anexo 4.....	41
Anexo 5	42
Anexo 6.....	43

I. Introducción

La producción industrial de carne de pollos broiler es una actividad económica que ha mostrado un crecimiento sostenido en la última década y se espera que mantenga esa tendencia a nivel mundial (Bruinsma, 2003).

Las lesiones podales en aves de carne son un daño en la salud y, por lo tanto, en el bienestar y en el desempeño productivo de las aves afectadas, provocando un desmedro en la economía de la actividad productiva. El hecho de que afecte la ganancia de peso, la eficiencia de conversión alimenticia y de que aumente los decomisos de carne, hace de esta situación un problema para la industria (Tang y Lu, 2015).

Dentro de las causas posibles de estas lesiones, están varias cepas de los Reovirus Aviarios (RVA), los que fueron identificados hace más de 40 años como el agente etiológico de la patología denominada artritis viral (AV) y tendosinovitis (TS) en pollos broiler (Olson y Kerr, 1966; Walker *et al.*, 1972). Las lesiones asociadas a AV o TS consisten en un aumento de líquido sinovial de las articulaciones afectadas, generalmente la tarso-metatarsal y la femoro-tibial; y en una inflamación del tendón gastrocnemio, extensor metatarsal y flexor digital que pueden notarse a simple vista. En casos avanzados, puede observarse la rotura del tendón gastrocnemio (Crespo y Shivaprasad, 2011).

Los RVA están distribuidos mundialmente y son uno de los cinco miembros del género Orthoreovirus dentro de la subfamilia Spinareovirinae, que a su vez pertenece a la familia Reoviridae (Mor *et al.*, 2013). Estos virus poseen un genoma empacado en una doble cápside proteica compuesto por 10 segmentos de ARN de doble hebra cuyo tamaño sumado es de 23500 pares de bases aproximadamente (Bányai *et al.*, 2011). Este genoma codifica al menos 12 proteínas, de las cuales ocho son estructurales del virus (Benavente y Martínez-Costas, 2005). Dentro de las proteínas estructurales, la proteína σ C otorga la capacidad al virus de adherirse a células y contra esta proteína el sistema inmune monta una respuesta protectora al enfrentarse al virus (Vasserman *et al.*, 2004).

El hecho de que el virus no posea envoltura lipídica lo hace muy resistente a diversas condiciones ambientales. Además presenta transmisión horizontal por vía digestiva y vertical a través del huevo (Al-Muffarej *et al.*, 1996). Por estas características es muy difícil de eliminar de un plantel de crianza contaminado. Además, debido a la alta prevalencia de los

RVA en las instalaciones y poblaciones avícolas, los pollos se exponen tempranamente a la infección. Es por esto que se ha preferido controlar la presentación de la enfermedad mediante vacunas aplicadas a las reproductoras, las que transfieren su inmunidad a la progenie (Zavala, 2010).

A nivel mundial, el estudio de este virus y de su relación con la enfermedad se ha hecho más robusto gracias a las técnicas de biología molecular que se han desarrollado en las últimas décadas. Anterior a esto, el diagnóstico dependía de los hallazgos patológicos, el aislamiento e identificación de RVA en huevos embrionados o cultivos celulares y de pruebas inmunológicas para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus. Los RVA pueden ser diferenciados entre sí por técnicas de seroneutralización (Kawamura *et al.*, 1965), pero es difícil identificarlos y clasificarlos de forma detallada con estos métodos. La introducción de la de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la transcripción inversa (RT) en el estudio del virus (Xie *et al.*, 1997), ha permitido caracterizar los RVA de manera que pueden ser agrupados por similitudes o diferencias de algunas proteínas codificadas por sus genomas.

En Chile se han utilizado exámenes serológicos para determinar la infección viral, que han sido hasta ahora pruebas de inmunodifusión en gel de agar y ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) a partir de muestras sanguíneas de casos sospechosos (Canales, 2011). Estas pruebas han permitido establecer a los RVA como la causa de AV o TS. Pero el recurso de identificación, caracterización y clasificación de estos virus mediante técnicas moleculares, que son más rápidas y sensibles, no han sido exploradas debidamente en nuestro país.

Durante el año 2014 e inicios del 2015 las dos compañías productoras de pollos broiler más grandes de Chile, que presentan el 90% de la carne de pollo producida en el país, han presentado una patología podal semejante a AV y/o TS, que afecta en forma notoria a algunos lotes de pollos (10 a 20% de las aves), a pesar de que una de ellas vacuna a sus reproductoras para entregar inmunidad pasiva contra RVA a los pollos broiler. Este estudio pretende establecer la asociación entre AV y/o TS clínica y el aislamiento viral y el reconocimiento molecular de RVA.

II. Revisión bibliográfica

Etiología

Clasificación

A partir del año 2011, los comúnmente conocidos como reovirus aviars (RVA) están clasificados por el Comité Internacional sobre la Taxonomía de Virus (ICTV) como *Avian Orthoreovirus*, dentro del género *Orthoreovirus*, perteneciente a la subfamilia *Spinareovirinae* de la familia *Reoviridae*.

Morfología del virión

Dentro de los integrantes de la familia *Reoviridae*, los pertenecientes al género *Orthoreovirus* poseen un genoma compuesto por RNA segmentado de doble hebra, envuelto por una doble cápside de simetría icosaédrica. La cápside externa presenta un número de triangulación icosaédrica (Caspar y Klugg, 1962) “T” igual a 13, mostrando una forma casi esférica. Por otro lado, la cápside interna tiene un “T” igual a 2, siendo su forma más similar a un icosaedro. Un virión mide alrededor de 85,7 nanómetros de diámetro. Como un miembro de la subfamilia *Spinareovirinae*, los RVA poseen proteínas ordenadas en estructuras compuestas de cinco proteínas, llamadas pentámeros, que sobresalen de su superficie y a partir de cada pentámero protruyen las proteínas de adhesión del virus.

Genoma

El genoma de los *Orthoreovirus* Aviars está compuesto por 10 segmentos de RNA, que se han clasificado en tres grupos según su movilidad electroforética. Hay tres segmentos grandes: L1, L2 y L3, cuyos tamaños esperados son: 3959, 3907 y 3906 respectivamente. Hay tres medianos: M1, M2 y M3, cuyas longitudes son respectivamente: 2283, 2159 y 1996. Finalmente los cuatro pequeños son: S1, S2, S3 y S4 y sus pares de bases son 1643, 1324, 1199 y 1192. Estos valores fueron descritos por Bányai *et al.* en el año 2011.

Proteínas

El genoma del virus posee genes para codificar al menos 12 productos primarios, de los cuales, ocho son proteínas estructurales (Varela y Benavente, 1994).

Las proteínas codificadas por los segmentos L se denominan lambda (λA , λB y λC), por segmentos M se denominan mu (μA , μB y μNS) y por segmentos S se denominan sigma (σA , σB , σC , σNS , p10 y p17). La función de estas proteínas se describe en la Tabla Nro 1.

Tabla Nro. 1. Proteínas de RVA y su función		
Segmento de RNA	Proteína Codificada	Función
L1	λA	Forma parte de la cápsula interna del virus, protegiendo el RNA y la RNA polimerasa viral.
L2	λB	Componente menor del núcleo viral. Se cree que corresponde a la RNA polimerasa del virus.
L3	λC	Se encuentra asociada en pentámeros que atraviesan la doble cápside desde dentro del núcleo hasta la superficie.
M1	μA	Componente menor de la cápside interna, se cree que está relacionada con el anclaje viral a la célula.
M2	μB	Escindida en μBN y μBC después de la traducción. μB , μBN y μBC forman parte de la cápside externa. Se cree que μBC ayuda en el ingreso del virus a la célula.
M3	μNS	Dividida μNSN y μNSC después de la traducción. Su rol no está definido en el ciclo viral, pero se cree que es la unidad mínima que se requiere para comenzar la morfogénesis del virus.
S1	σC	Se ordena en trímeros, protruye desde los pentámeros formados por la proteína λC . Permite el acoplamiento viral a células. Induce la producción de anticuerpos específicos.
	p10	Induce fusión celular y aumenta la permeabilidad de membranas celulares.
	p17	Ralentiza el metabolismo celular y atrapa DNA.
S2	σA	Componente de la cápsula interna. Atrapa RNA de doble hebra. Se cree que otorga al virus resistencia frente al sistema inmune. Puede que esta proteína participe en la morfogénesis viral.
S3	σB	Componente más abundante de la cápside externa. Se le atribuye cierta capacidad inmunogénica.
S4	σNS	Capacidad de atrapar RNA de hebra simple sin importar la secuencia de éste.

Basado en la publicación de Benavente y Martínez-Costas, 2007.

Replicación

La replicación de un RVA se lleva a cabo en el citoplasma celular.

El acoplamiento extracelular del virus está dado por la interacción entre la proteína σC y receptores de superficie celular. Estudios llevados a cabo por Benavente y Martínez-Costas (2005) indican que el receptor que σC tiene como blanco es una proteína de superficie ubicada en células blanco de aves.

El virión entra a la célula por endocitosis mediada por receptor; una vez dentro de vacuolas intracelulares se produce el degradamiento de las proteínas de la cápside mediante proteólisis endosómica y acidificación del medio dentro de los endosomas.

Después de este proceso, el núcleo viral es liberado en el citoplasma, en donde se sintetizan los mRNA para los 10 segmentos de genoma. Este proceso es catalizado por una RNA polimerasa dependiente de RNA de doble hebra que se encuentra dentro del núcleo viral.

El RNA mensajero de RVA cumple dos funciones en células infectadas: (a) programar la síntesis de proteínas virales en los ribosomas y (b) ser usados como molde para la síntesis de la hebra de RNA de sentido negativo (Dermody *et al.*, 2013).

La síntesis de polipéptidos virales se detecta desde etapas tempranas de la infección y a medida que avanza el tiempo la mayoría de las proteínas sintetizadas en la célula infectada son virales.

La liberación del virus fuera de la célula hospedero es facilitada por la proteína p10, debido a su capacidad de aumentar la permeabilidad y de inducir fusión de membranas celulares.

Diversidad antigénica

Los reovirus aviáres son antigénicamente heterogéneos. Así lo ha demostrado Kawamura *et al.* (1965) quienes en Japón clasificaron 77 aislados de reovirus aviar dentro de cinco serotipos distintos usando la técnica de inmunodifusión en gel de agar. Además, Sahu y Olson (1975) clasificaron nueve aislados provenientes de Estados Unidos en cuatro serotipos usando la técnica de neutralización viral en placa y la misma técnica que Kawamura *et al.* (1965). Por otra parte, Wood *et al.* (1980) hizo una comparación entre la cepa clásica de reovirus S1133 y cinco reovirus del Reino Unido, Alemania y Estados Unidos agrupando estas seis cepas en tres serotipos usando pruebas de neutralización viral en cultivos celulares de riñones de embriones de pollo (CEKC).

Evidencia experimental entregada por Hyeronimus *et al.* (1983), quienes usaron seroneutralización cruzada en cultivos celulares de CEKC. Sus resultados clasifican seis cepas en tres grupos.

Robertson y Wilcox (1984) utilizaron la precipitación en gel de agar y pruebas de seroneutralización viral en cultivos celulares de CEKC para clasificar 10 cepas en tres grupos distintos.

Estos estudios muestran que existe seroneutralización cruzada entre cepas distintas.

La cepa de RVA S1133 se considera presente en todas las producciones avícolas del mundo. Es una de las primeras cepas que se aisló y se usa como base para la producción de vacunas usadas mundialmente (Jones, 2000). Sin embargo, existen variantes regionales contra las cuales la cepa S1133 puede no inducir una respuesta inmune protectora (Vasserman *et al.*, 2004).

Epidemiología

El virus está distribuido en todo el mundo (Tang y Lu, 2015) y se ha aislado desde varias especies de aves además de las gallinas y los pavos (Sellers, 2013). También se ha aislado de gansos (Bezerra *et al.*, 2012), patos (Baroni *et al.*, 1980), palomas (Vindevogel *et al.*, 1982), codornices (Magee *et al.*, 1993) y psitácidos (Sanchez-Cordon *et al.*, 2002).

La transmisión más común del virus es la horizontal. Los RVA pueden ser excretados por la vía respiratoria e intestinal por lo menos 10 días post-inoculación, siendo la vía entérica la que se mantiene excretando el virus por períodos más largos de tiempo, lo que sugiere que la vía oro-fecal es el origen principal de la infección (Jones, 2013). Además el virus puede ser transmitido de forma vertical a través del huevo por las madres a la progenie como se demostró en el estudio de Al-Muffarej *et al.* (1996) en el que se aisló RVA en huevos puestos por gallinas inoculadas con el virus entre cinco a 17 días post-inoculación. Por último, se ha demostrado que el virus puede entrar por zonas dañadas en la zona plantar de las patas de pollos susceptibles (Al-Afaleq y Jones, 1990).

Kerr y Olson (1964) describieron que los pollos tienden a ser menos susceptibles a presentar AV o TS a medida que su edad aumenta. Esto fue demostrado mediante inoculaciones seriadas a las dos, cinco, 10, 15 y 20 semanas de edad en pollos broiler, en donde se observó que el virus mostró notoriamente una baja en su capacidad infectiva en aves de 10 semanas de edad o más. A una conclusión similar llegaron Jones y Georgiou (1984), quienes inocularon por vía oral y por vía parenteral en la planta de la pata a cinco grupos de pollos SPF cuyas edades fueron: un día, dos semanas, cuatro semanas, seis semanas y nueve semanas.

Patogénesis

El tiempo de incubación depende de la edad del hospedero, del patotipo del virus y de la ruta de exposición (Jones, 2013). Olson y Khan (1972) estudiaron tres vías de inoculación en pollos de dos semanas de edad. Sus resultados mostraron que por vía subcutánea en la zona plantar de las patas de los pollos, por vía intramuscular, por vía intranasal y por vía intratraqueal, el período de incubación fue de uno, 11, nueve y 13 días respectivamente.

A menudo, las infecciones de campo son inaparentes y demostrables sólo por estudios serológicos o aislamientos virales.

Simulando la transmisión natural, la infección experimental por vía oral demuestra que el sitio inicial de replicación es el epitelio intestinal y la bursa de Fabricio, comenzando de dos a 12 horas después de la inoculación. Posteriormente el virus se distribuye a varios tejidos, incluyendo la articulación tarso metatarsal dentro de las siguientes 24 a 48 horas (Jones et al. 1989). Se han reportado cepas de reovirus que causan cambios inflamatorios microscópicos en los tendones flexor digital y extensor metatarsal sin el desarrollo de lesiones observables a simple vista (Olson y Kerr, 1967).

El desarrollo de lesiones en las articulaciones es un proceso lento. En infecciones naturales normalmente no se nota el daño en pollos antes de cuatro semanas de edad (Jones, 2013).

Signos clínicos

Los signos de AV o TS en pollos son observables típicamente después de las cuatro o cinco semanas de edad, aun cuando la infección haya ocurrido en los primeros días de edad del pollito (Jones, 2013).

En infecciones agudas algunos pollos pueden tener dificultad para desplazarse. En cambio, cuando la enfermedad se hace crónica, las cojeras son más pronunciadas. A medida que la enfermedad progresa, los pollos más afectados muestran un aumento de volumen en ambas articulaciones tarsometatarsales, aumento de tamaño de los tendones gastrocnemio, flexor digital, extensor metatarsal y están inmovilizados cerca de los bebederos. La inflamación de la zona plantar es menos común. Es posible que al palpar estas lesiones se note un aumento de la temperatura en la zona articular.

La ruptura del tendón gastrocnemio (Crespo y Shivaprasad, 2011) ocurre en casos extremos y está asociado con un alto peso corporal. En general, esto se presenta acompañado de petequias y de ruptura de vasos sanguíneos.

La mortalidad suele ser baja, pero la morbilidad puede llegar hasta un 100% (Jones, 2013). Un brote de este virus en reproductoras broiler estudiado por Dobson y Glisson (1992) provocó un desmedro en la incubabilidad y venta de los huevos fértiles; un aumento de los costos de vacunación, medicación y de la mortalidad; y una disminución de la calidad de la carne de los pollos engendrados por esas reproductoras en el matadero con el consecuente aumento de los descartes. En el estudio de Lu *et al.* (2015) se menciona que las pérdidas debidas a infecciones de RVA en el estado de Pennsylvania, Estados Unidos, desde el año 2011 han sido de al menos USD\$ 23000 por cada lote de pollos broiler afectado. Cada uno de estos lotes de pollos constaba de 28000 pollos en promedio.

Identificación viral

El diagnóstico presuntivo de AV o TS puede basarse en la presencia de signos clínicos como cojeras y en la conversión serológica de pollos afectados. Sin embargo, enfermedades como la micoplasmosis (*Mycoplasma Synoviae*) y las artritis bacterianas pueden presentar signología similar (Rosenberger y Spackman, 2008). Además, se pueden producir problemas de cojeras asociados a más de un agente infeccioso. Por lo tanto, el diagnóstico definitivo de AV o TS requiere de pruebas de laboratorio dirigidas al aislamiento e identificación del reovirus aviar.

Tradicionalmente, la confirmación de la presencia del virus se hace mediante el aislamiento viral en huevos embrionados, para luego realizar pruebas de inmunodifusión en gel de agar (Jones, 2000) estableciéndose una banda de precipitado en donde las concentraciones de antígenos y anticuerpos se equilibran para las muestras positivas.

Aislamiento en Huevos Embrionados de Gallinas

Las muestras que se obtienen de pollos enfermos consisten en líquido sinovial de articulaciones afectadas, es decir, que presenten un aumento de volumen y presencia de exudado en el interior. Este líquido se inocula en dosis de 0,1 ml sobre la membrana corioalantoídea de huevos embrionados (MCA-HE) de 10 días de edad y son incubados durante seis días a 37° C. Los embriones luego son estudiados para detectar las lesiones

esperadas características de RVA. En los cultivos sucesivos realizados se manifestaron diversas alteraciones como: lesiones puntiformes en la zona de inoculación, engrosamiento de la MCA y opalescencia de la misma (Baroni *et al.*, 1980). En los últimos pasajes se detectó muerte embrionaria en algunos casos (Guneratne *et al.*, 1982). En Chile, en un estudio realizado por Canales (2011) se presentaron lesiones entre el quinto y el séptimo pasaje en huevos embrionados SPF, siendo las lesiones hiperplasia, edema y lesiones blanquecinas en sobre relieve en la MCA. En este estudio, el virus se identificó mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar en tres aislados de pollas White Leghorn de reposición de la línea genética Shaver de 7 a 14 semanas de edad que presentaban presuntamente AV/TDS, es decir, que manifestaban signos y síntomas clínicos patológicos de claudicación o postración.

Clasificación de los reovirus aviares

En la actualidad no existe un acuerdo sobre un sistema de clasificación definitivo para RVA. La diferenciación de reovirus aviar según su serotipo ha sido usada para establecer medidas de control, realizar investigación y para explicar la epidemiología y evolución del virus, pero el hecho de que exista serología cruzada incluso entre cepas distintas (Jones, 2013) hace difícil clasificar detalladamente una cepa mediante estas técnicas. El uso de tecnologías más recientes como RT-PCR y secuenciación genética ha permitido caracterizar cepas según las secuencias que codifican sus proteínas, estableciendo similitudes y diferencias entre distintos reovirus en valores concretos (Day, 2009).

Existen publicaciones en las que se identifica y clasifica distintos RVA según su genoma a partir de exudado intra-articular o vainas tendíneas de aves afectadas por AV o TS (Kant *et al.*, 2003; Liu y Giambrone, 1997; Liu *et al.*, 2003; Tang y Lu, 2015). Esta clasificación se hace a partir del gen que se encuentra en el fragmento S1 del RNA viral que codifica a la proteína σC (Teng *et al.*, 2014). Existen tres motivos que justifican lo anterior: (i) debido a la tasa de evolución mayor y divergencia de este fragmento del genoma con respecto a otros genes de clase S (Vasserman *et al.*, 2004), (ii) por la importancia de esta proteína en la capacidad del virus de adhesión a la membrana celular de tejidos del huésped (Martínez-Costas *et al.*, 1997) y (iii) debido a la importancia de la proteína σC en el desarrollo de una respuesta inmune protectora contra el virus (Jones, 2013).

Las técnicas de biología molecular usadas para determinar el genotipo de cepas de RVA se explican a continuación.

1. Transcripción reversa (RT)

El descubrimiento de enzimas polimerasas de DNA dependientes de RNA en 1970 resolvió la incógnita sobre qué método usan ciertos virus para transformar su RNA genómico en DNA (Baltimore 1970, Temin y Mizutani 1970). Este descubrimiento permite transformar RNA en DNA.

El proceso de transcripción reversa consiste en entregar a una transcriptasa inversa todo lo necesario para que produzca la hebra de DNA complementaria (cDNA) a una hebra de RNA. Para que esta reacción se lleve a cabo, se debe suplir a la enzima un medio tamponado que facilite su funcionamiento, un partidador que hibride la hebra de RNA en un lugar deseable, deoxinucleótidos que formarán parte de la hebra de cDNA, el RNA de una muestra y una temperatura que le permita funcionar.

2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La primera descripción de un PCR fue publicada en el año 1971 por Kleppe *et al.* en el año 1971, pero no fue hasta la publicación de Kary Mullis (1990) que se comenzó a abarcar todas las posibilidades de la PCR.

La reacción es catalizada por una DNA polimerasa, siendo la más usada la Taq Polimerasa, la cual produce millones de copias de un fragmento de DNA blanco al entregarle a la enzima un ambiente propicio para su funcionamiento, es decir, poner a la enzima en un medio que contenga: partidores, deoxynucleótidos (dNTPs), una hebra simple de DNA, buffer para la enzima y sales divalentes.

3. Secuenciación Génica

La secuenciación génica de un virus es una técnica que permite comparar las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos entre distintos aislados.

El estudio de zonas conservadas y variables en la secuencia de aminoácidos de proteínas puede entregar directrices sobre la función, estructura, patogenicidad, caracterización y epidemiología del virus (Liu *et al.*, 2003).

La secuenciación puede ser realizada de cualquier fragmento del genoma, así se han secuenciado genomas completos de RVA (Tang y Lu, 2015).

Usualmente se realiza la secuenciación del gen que codifica la proteína σC , el que se encuentra en el fragmento S1. Esto se debe a la variabilidad de σC con respecto a otras proteínas del virus (Liu *et al.*, 2003) y a la relación entre la mayor variabilidad de la secuencia de aminoácidos de σC y la consecuente menor protección que ofrecen vacunas hechas con cepas poco similares a la cepa de campo (Vasserman *et al.*, 2004).

A nivel mundial, existe una amplia variedad de publicaciones que avalan el uso de RT-PCR para diagnosticar RVA, como en Estados Unidos (Crespo y Shivaprasad, 2011; Tang y Lu, 2015); Alemania (Kant *et al.*, 2003); Suiza (Bruhn *et al.*, 2005); Hungría (Bányai *et al.*, 2011) y Túnez (Hella *et al.*, 2013).

Desde el año 2011, Lu *et al.* (2015) han estudiado aislados de RVA en el estado de Pennsylvania, Estados Unidos. Las secuencias que estos investigadores han descrito dan cuenta de la aparición de variantes de RVA en planteles productivos de pollos broiler. Estas secuencias pueden ser encontradas en GenBank. Parte de estas secuencias son listadas en el Anexo 6, en donde se consideran sólo las que describen el código del gen de la proteína σC de RVA aislados de pollos broiler.

En todos estos hallazgos científicos se caracterizan distintos aislados de RVA mediante RT-PCR, secuenciación y análisis de la secuencia obtenida. En Chile no hay a la fecha ninguna publicación similar.

Secuencias publicadas en la base de datos online GenBank® pueden ser usadas para comparar secuencias mediante la construcción de árboles filogenéticos que agrupan las distintas cepas según su similitud genómica. Es importante señalar que los datos de la secuenciación sirven para definir la estructura primaria de una proteína, es decir, la secuencia aminoacídica. Las diferencias detectadas no implican necesariamente diferencias de antigenicidad o cambios en las funciones biológicas, las que no pueden ser dilucidadas mediante la secuenciación (Kant *et al.*, 2003).

Situación de RVA en Chile

En Chile, se ha identificado el virus en el estudio realizado por Canales (2011). En este estudio se analizaron muestras obtenidas de pollas de reposición de raza White Leghorn que presentaron cojeras. Estas se mantenían confinadas en una granja ubicada en la comuna de Quilpué, V región. De estas aves se extrajeron muestras de hígado y bazo, de las que se aisló el virus en MCA-HE. Posteriormente se realizó la prueba de inmunodifusión en gel de agar con sueros de referencia que mostró bandas de precipitación tanto para cepas de referencia como para el aislado de campo. Los resultados de este trabajo muestran que efectivamente en Chile existe RVA.

En Chile, como en el mundo, se usan vacunas contra RVA en las reproductoras, las que transfieren su inmunidad a su progenie a través del huevo. La industria avícola vacuna típicamente a los lotes de reproductoras al menos dos veces con vacunas vivas atenuadas usualmente emparentadas con la cepa clásica S1133 dentro de las primeras seis semanas de edad. Posteriormente las hembras son vacunadas con virus inactivados, generalmente entre las 12 a 18 semanas de edad, antes del comienzo de la postura de huevos. Esto último con el objetivo de estimular la inmunidad materna que será transferida a los polluelos como se indicó anteriormente (Zavala, 2010). Las vacunas usadas en Chile son, efectivamente, la cepa S1133 y dos similares: la cepa 1733 y 2408.

Durante el año 2014 e inicio del 2015, en Chile se produjo un aumento en la presentación de artritis y tendosinovitis en pollos broiler en dos empresas productoras de pollos broiler. La prevalencia de la AV o TS fue de un 10% a un 20% en algunos lotes de pollos, afectando incluso a reproductoras vacunadas. La etiología de este brote fue atribuida presuntivamente a AV o TS. En este período descrito, llegaron al Laboratorio de Patología Aviaria de la Universidad de Chile pollos presentando una signología similar a AV o TS. A partir de las muestras obtenidas se realizó este estudio.

III. Objetivo general

Contribuir al diagnóstico confirmativo de artritis y tendosinovitis viral de pollos broiler en Chile y a la caracterización de los reovirus aviáres causales mediante técnicas moleculares.

IV. Objetivos específicos

1. Aislar y multiplicar el virus de campo desde muestras clínicas de pollos broiler con artritis y tendosinovitis en huevos embrionados de gallinas.
2. Identificar a los aislados virales obtenidos mediante sus características genómicas a través de la técnica de RT-PCR.
3. Comparar a los aislados de campo de reovirus aviar respecto de cepas de referencia por la secuenciación de segmentos específicos de sus ARN, para establecer similitudes o diferencias.

V. Materiales y métodos

A continuación se presenta un esquema de la estrategia experimental del presente trabajo a partir de los pollos con sintomatología clínica de AV o TS.

Obtención de muestra para obtención de RVA

(Exudado de articulaciones afectadas)



Aislamiento viral en MCA-HE



Extracción de RNA viral



Cuantificación y pureza del RNA viral por espectrofotometría



Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

(Segmentos S1, S2, S3 y S4)



Electroforesis de los productos en gel de agarosa al 1%



Extracción de productos desde el gel (Sólo para el fragmento S1)



Secuenciación de S1

Centro de secuenciación automática de ADN, U. Católica.



Análisis de secuencia de S1

i. **Materiales**

1. **Materiales Biológicos**

1.1. Aislados virales de referencia y de campo de RVA.

1.1.1. Cepa de referencia estándar, como control positivo, para la identificación de aislados de campo de RVA.

Consistió en la cepa de RVAS1133 obtenida de la vacuna comercial viva atenuada NOBILIS® REO 1133.

1.1.2. Cepa de referencia nacional.

Se usó como cepa de reovirus de referencia nacional el aislado obtenido por Canales (2011).

1.1.3. Aislados virales de campo obtenidos de casos clínicos de AV o TS.

Se obtuvo el líquido sinovial de pollos con AV o TS clínica.

2. **Huevos Embrionados**

Para el aislamiento de RVA fueron utilizados huevos embrionados de gallina de 10 días de incubación. Los huevos provenían de un lote experimental de gallinas sin anticuerpos contra patologías propias de las aves, incluyendo reovirus.

3. **Equipamiento**

3.1. Termociclador “MaxiGene II”, de Axygen Biosciences.

3.2. Centrifuga para microtubos “Heraeus Megafuge 16R” Thermo Scientific.

3.3. Vortex “SuperMixer Cat. N°1291” Lab-line Instruments.

3.4. Gabinete de bioseguridad Clase II-A2 con luz UV, LabTech.

3.5. Baño de agua termoregulado MRC Scientific Instruments.

3.6. Cámaras de electroforesis “Gel Box Midiplus”, Select BioProducts con electrodos.

3.7. Fuente de poder “BioVolt 300V”, Select Bioproducts.

3.8. Transiluminador UV “MD-20 312 nm”, Wealtec.

4. Reactivos y fungibles

- 4.1. Kit de extracción y purificación de DNA/RNA “PureLink® Viral RNA/DNA Mini Kit” de Invitrogen.
- 4.2. Agua libre de nucleasas grado biología molecular HyClone de ThermoScientific.
- 4.3. Tampón 10X para Platinum® Taq DNA polimerasa de Life Technologies.
- 4.4. Desoxiribonucleotidotrifosfato (dNTP's) RBC Biosciences (10 mM).
- 4.5. Partidores Positivos para RVA, sintetizados por Life Technologies (10 pmoles/ µl)
- 4.6. Partidores Negativos para RVA, sintetizados por Life Technologies (10 pmoles/ µl)
- 4.7. Platinum® Taq DNA polimerasa, Life Technologies.
- 4.8. Transcriptasa Inversa Superscript® III, Life Technologies.
- 4.9. Dimetil Sulfoxido (DMSO), Life Technologies.
- 4.10. Agarosa LE en polvo, grado biología molecular, libre de nucleasas de Axygen, Biosciences.
- 4.11. Buffer TAE 1X.
- 4.12. Gel de tinción de ácidos nucleicos 10000X en DMSO Gel Red®, marca Biotium.
- 4.13. Marcador de pares de bases GeneRuler® 1000bp DNA ladder, marca Fermentas.
- 4.14. Buffer de corrida DNA 6X, marca Fermentas.
- 4.15. Micropipetas AccumaxPro® de 0,1 -2,5 µl, 2-20 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl. Micropipeta Hirschmann Laborgerate 5-50 µl.
- 4.16. Microtubos libres de DNAsa y RNAsa de 200 µl y de 1,5 ml, Biologix Research Company.
- 4.17. Guantes de látex desechables libres polvo, Top Globe.
- 4.18. Puntas desechables para pipetas, libres de DNAsas, RNAsas, libre de pirógenos, Axygen Scientific de 0,5-10 µl, 1-200 µl y 50-1000 µl.

5. Partidores

Se describen a continuación los partidores usados en este estudio (Anexo 1).

5.1. Partidores para el segmento S1:

Estos partidores fueron diseñados según Kant *et al.* (2003). Las secuencias son:

5.1.1. Partidor Positivo RVAS1P1FW: AGTATTTGTGAGTACGATTG

5.1.2. Partidor Negativo RVAS1P1REV: GGCGCCACACCTTAGGT

El tamaño esperado del producto de PCR es de 1089 pares de bases.

5.2. Partidores para el segmento S2:

Las secuencias de estos partidores fueron publicadas por Bruhn *et al.* (2005).

Corresponden a lo siguiente:

5.2.1. Partidor Positivo RVAS2P1FW: CCCATGGCAACGATTTC

5.2.2. Partidor Negativo RVAS2P1REV: TTCGGCCACGTCTCAAC

El tamaño esperado del producto es de 399 bases.

5.3. Partidores para el segmento S3:

Estos partidores fueron diseñados por nosotros durante el desarrollo de este proyecto usando el programa de computador Geneious® versión 4.0.8 que ocupa el algoritmo Primer3®. Las secuencias son:

5.3.1. Partidor Positivo RVAS3P18FW: CTCCTGCTTGCTGGAATG

5.3.2. Partidor Negativo RVAS3P18REV: TGGTCCAACAGATGCTCAG

Para diseñar el partidor se hizo un alineamiento entre las secuencias obtenidas en GenBank® para el fragmento S3 del genoma viral, las que se enumeran en el Anexo 2. A partir de este alineamiento, se seleccionaron zonas conservadas de 18 o 19 bases de longitud a manera de partidores. Estos partidores fueron analizados en la página web “<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>” para determinar si forman homodímeros o heterodímeros de partidores, así como también para determinar si se pliegan sobre sí mismos, siendo estas características indeseables (Dieffenbach *et al.*, 1993).

El tamaño esperado del producto es de 241 bases.

5.4. Partidores para el segmento S4:

Las secuencias de este par de partidores se obtuvieron de la publicación de Bruhn *et al.* (2005). Sus secuencias son:

5.4.1. Partidor Positivo RVAS4P1FW: GTGCGTGTTGGAGTTTC

5.4.2. Partidor Negativo RVAS4PIREV: ACAAAGCCAGCCATGAT

El producto esperado de PCR con estos partidores debe ser de 437 bases.

En el Anexo 3 se muestra las zonas que hibrida cada partidor en los distintos fragmentos.

ii. **Métodos**

1. *Obtención y preparación de muestras para aislamiento viral.*

Para el aislamiento de RVA se obtuvo fluido inflamatorio de las articulaciones tarsometatarsales de pollos broiler con signos de AV o TS recibidos por el Laboratorio de Patología Aviaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Las muestras de líquido sinovial fueron obtenidas de lotes de pollos broiler en los que se presentaron casos de postración o cojera, asociada a un aumento del volumen y temperatura de las articulaciones tarso metatarsales, de dos procedencias diferentes: Agrosuper (AS, V región) y Ariztía (AR, RM y V región). Los líquidos inflamatorios articulares fueron mantenidos a -20° C hasta el momento de su uso.

2. Aislamiento viral en MCA-HE

Las muestras se inocularon en MCA-HE de gallina de 10 días de incubación. Después de mantenerlos cinco días en la incubadora se recolectaron las membranas corioalantoideas con alteraciones significativas como: engrosamientos de la membrana y lesiones puntiformes en la zona de inoculación, para ser inoculados nuevamente. Se efectuaron hasta cuatro pasajes esperando la multiplicación del virus, luego las MCA afectadas se congelaron y descongelaron tres veces. Posteriormente se centrifugaron a 12000g y a partir del sobrenadante se realizó la extracción de RNA viral mediante el kit obtenido comercialmente.

3. Extracción y Purificación de RNA de aislados virales

La extracción y purificación del RNA genómico de RVA se realizó usando el kit PureLink® Viral RNA/DNA Mini Kit de Life Technologies siguiendo las indicaciones del fabricante. Se usó 200 µl de sobrenadante de MCA para este proceso. El control negativo en cada grupo de extracciones fue agua libre de nucleasas.

Brevemente, el proceso consta de los siguientes pasos:

- a) Mezclar los 200 µl de muestra, 25 µl de proteinasa K, 200 µl de buffer de lisis y 5,6 µl de RNA Carrier. Homogeneizarlo pipeteando suavemente, evitando la formación de espuma.
- b) Incubar la mezcla a baño maría a 56° C por 15 minutos. Agregar 250 µl de etanol al 95-100% y mezclar por vórtice durante 15 segundos, luego incubar a temperatura ambiente por cinco minutos.
- c) Pasar la mezcla a una columna de extracción (la provee el kit). Centrifugar la columna de extracción con la muestra cargada a 6800 g por un minuto y descartar el filtrado. Lavar la columna de filtrado con 500 µl de Buffer de lavado (Wash Buffer W5 del kit) centrifugando a 6800 g por un minuto. Descartar el filtrado. Repetir este lavado una vez más.
- d) Descartar el tubo colector y reemplazarlo por otro. Centrifugar a 12000 g por un minuto para secar el filtro.
- e) Poner la columna de extracción en un tubo de recuperación limpio. Agregar al filtro 10 a 50 µl de agua libre de nucleasas. Incubar por un minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a 12000 g por un minuto.

El RNA obtenido se guardó a -80° C hasta su uso.

4. RT-PCR para amplificar el fragmento de RNA de RVA

Las reacciones fueron preparadas de forma individual en un lugar limpio y con instrumentos dedicados sólo a esta tarea. El volumen total de los reactivos para una reacción de transcripción inversa (RT) es de 10 µl y el volumen total para una reacción de PCR es de 25 µl. Las cantidades de los reactivos que componen cada reacción, así como los ciclos de temperatura a los que serán sometidas cada una de las reacciones están descritos a continuación.

4.1. Reacción de RT-PCR:

Se realiza una desnaturalización previa en la que se somete la muestra a dos ciclos de 98° C y 70° C, en una solución que contiene los partidores y DMSO para el primer ciclo. En el segundo ciclo se agregan los dNTPs y agua ultrapura. Esto se conserva en hielo hasta ser usado en la reacción de transcripción inversa.

4.1.1. Transcripción Inversa (RT)

Se produce la hebra de ADN complemento (ADNc) adicionando los siguientes reactivos al resultado de la desnaturalización previa descrita: buffer 5x para RT (2 µl), DTT 0,1 molar (1 µl), Rnasin (0,5 µl) y SuperScript ® III (0,5 µl). Esta mezcla se somete en el termociclador a una temperatura de 50° C por 60 minutos, luego a 70° C por 15 minutos y finalmente a 4° C como temperatura de mantención.

4.1.2. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

El procedimiento requiere de siete componentes fundamentales (Sambrook y Russel, 2001):

- Una polimerasa de DNA termoestable para catalizar la síntesis y amplificación de DNAc a partir de una hebra modelo de DNA.
 - La enzima más usada es la *Taq* polimerasa, entre 0,5 a 2,5 unidades se usan en reacciones de 25 a 50 µl. Esto equivale de $2 \cdot 10^{12}$ a 10^{13} moléculas de la enzima.
 - La eficiencia de la enzima ha sido estimada en una proporción de 0,7 (Gelfand y White, 1990; Lubin et al., 1991), por lo que la actividad de las moléculas de enzima se vería limitada al alcanzar la producción de $1,4 \cdot 10^{12}$ a $7 \cdot 10^{12}$ de copias amplificadas.
- Una pareja de oligonucleótidos sintéticos para empezar la síntesis de DNA.
 - La eficiencia y la especificidad de la reacción dependen de un buen diseño de partidores.

- Deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs).
 - Un PCR estándar necesita cantidades equimolares de dATP, dTTP, dCTP y dGTP.
 - Se recomienda una concentración de 200 a 250 μM de cada dNTP en una reacción de Taq polimerasa que contenga una concentración de 1,5 mM de MgCl_2 .
- Cationes divalentes.
 - Todas las DNA polimerasas requieren cationes divalentes libres, como el Mg^{2+} , para funcionar.
 - Los dNTPs y los partidores atrapan los cationes Mg^{2+} , por lo que concentración molar de Mg^{2+} debe sobrepasar la concentración molar de los dNTPs y partidores moléculas combinados.
- Tampón de pH.
 - El pH del buffer comúnmente usado, el Tris-Cl, se agrega ajustado a un pH de 8,3 a 8,8. Al calentarlo a los 72° normalmente usados en la fase de alongamiento de la hebra de DNA del PCR, el pH baja en una unidad, quedando alrededor de 7,2, siendo óptimo para la reacción.
- Cationes monovalentes.
 - El uso de KCl (cloruro de potasio) aumenta la cantidad de producto en la reacción.
- DNA molde obtenido de la reacción de transcripción inversa a partir de la extracción de RNA viral.

Dicho todo lo anterior, las múltiples copias del ADNc se sintetizaron mezclando los siguientes reactivos con 2,5 μl del producto del paso 5.2.1: agua ultrapura libre de nucleasas (16,25 μl), 10x PCR buffer (2,5 μl), dNTPs (0,5 μl), MgCl_2 50 mM (1 μl), partidor positivo 10mM (1 μl), partidor negativo 10mM (1 μl), platinum Taq Polimerase cinco U/ μl (0,25 μl). El volumen total de la reacción es de 25 μl .

Teniendo estos componentes, la reacción de PCR necesita además de ciclos de temperatura que aseguren la desnaturalización del DNA de doble hebra, el

alineamiento de partidores en sitios específicos de la secuencia a amplificar y la extensión de la hebra de DNA complementaria a la procesada por la enzima. Los ciclos de temperatura dependen de las temperaturas de alineamiento y del largo de los productos esperados para cada set de partidores. Los ciclos se describen a continuación según cada par de partidores:

4.1.2.1. Desnaturalización previa a 94° C por dos minutos (1 ciclo)

4.1.2.2. 35 Ciclos de:

4.1.2.2.1. Desnaturalización a 94° C por un minuto

4.1.2.2.2. Alineamiento por 30 segundos, distintas temperaturas: S1 a 55° C, S2 y S4 a 50° C y S3 a 50,5° C.

4.1.2.2.3. Extensión a 72° C, distintos tiempos: S1 por dos min. y S2, S3 y S4 por 45 segundos.

4.1.2.3. Extensión final a 72° C por 10 minutos (1 ciclo) y mantención a 4° C hasta guardar o utilizar el producto.

5. Electroforesis en Gel de Agarosa

Se utilizó agar noble al 1% con Red Gel ® y Buffer TAE 1X como medio. La electroforesis de los productos se llevó a cabo durante 30 minutos con una diferencia de potencial de 90 voltios. Transcurrido el tiempo, el gel de agarosa fue analizado bajo luz ultravioleta, tomándose registro visual de los resultados.

6. Extracción, Secuenciación y análisis del fragmento S1

6.1. Extracción de DNA desde gel de agar.

Para la extracción se usó un kit disponible comercialmente, el NucleoSpin® Extract II. Se retiró del gel de agarosa la zona que tenía los ácidos nucleicos correspondientes al gen de la proteína σ C amplificado y se purificaron con el kit según las indicaciones del fabricante. El producto final se guardó en la solución buffer que provee el kit. Haciendo una síntesis del método de uso del kit, se comienza cortando el gel que

contiene el producto de PCR y pesando el gel cortado. Por cada 100 mg de gel se debe adicionar 200 ul de buffer NT propio del kit, incubar la mezcla a 50° C por cinco a 10 minutos y agitar en un vórtice hasta que se disuelva el gel. Luego se carga en una columna de filtrado. Centrifugar a 11000g por un minuto. Descartar filtrado y poner en la columna de nuevo. Agregar 700 ul de buffer NT3, centrifugar a 11000g por un minuto y eliminar el centrifugado. Para secar el filtro de residuos de buffers se debe centrifugar a 11000 g por dos minutos. Para rescatar el ADN amplificado desde el filtro se debe colocar la columna de filtrado en un tubo eppendorf de 1,5ml, agregar de 15 a 50 ul de buffer de elución, incubar a temperatura ambiente por un minuto y centrifugar a 11000g por un minuto. El ADN se guardó a -20° C hasta su envío al laboratorio de secuenciación.

6.2. Secuenciación de productos de PCR del fragmento S1

Los amplificados obtenidos para el gen de la proteína σ C contenido en el fragmento S1 fueron enviados al Centro de Secuenciación Automática de DNA de la Universidad Católica. Los partidores requeridos para secuenciar son los mismos que los que se necesitan en la reacción de PCR (Anexo 1).

6.3. Análisis de secuencias genómicas

Obtenidas las secuencias, se analizaron mediante el programa Geneious® según la metodología descrita por Quinteros (2014) para definir la secuencia consenso y se buscaron similitudes entre lo obtenido y las secuencias genéticas que alberga GenBank®.

Además, se hizo un análisis de la filogenia del RVA mediante un árbol filogenético sin raíz, usando el modelo de sustitución “General Time Reversible” (GTR, Arenas, 2015 citando a Tavaré, 1986) considerando las correcciones de: distribución gama de la tasa de variación (G) y proporción de sitios invariantes (I) (Yang, 1996). El árbol fue optimizado usando el método de “Bootstrap”. El programa usado para construir el árbol filogenético fue Mega versión 6.06.

VI. Resultados

Aislamiento viral en HE

Los pasajes de las muestras en MCA-HE que mostraron lesiones características de RVA como hiperplasia focal o difusa de la MCA (Figura Nro. 1) corresponden a aislados virales de las muestras 13180 y 13184 (origen AS) y 13297 (origen AR). A partir del homogeneizado de las MCA afectadas se realizó la extracción de RNA viral.



Figura Nro. 1. Foto de MCA-HE que muestran lesiones post-inoculación con muestras de campo sospechosas de AV o TS.

RT-PCR de aislados virales en HE

Los sets de partidores que tienen como blanco regiones conservadas del genoma de los fragmentos S2, S3 y S4 de los RVA (RVAS2P1FW, RVAS2P1REV, RVAS3P18FW, RVAS3P18REV, RVAS4P1FW y RVAS4P1REV) permitieron comprobar que los aislados 13180, 13184 y 13297 comparten similitudes genómicas con los RVA y se identifican como tales.

El resultado de PCR para las muestras 13180 y 13184 mostró la amplificación de DNA para los tres sets de partidores nombrados en el párrafo anterior, como se observa en la Figura Nro. 2.

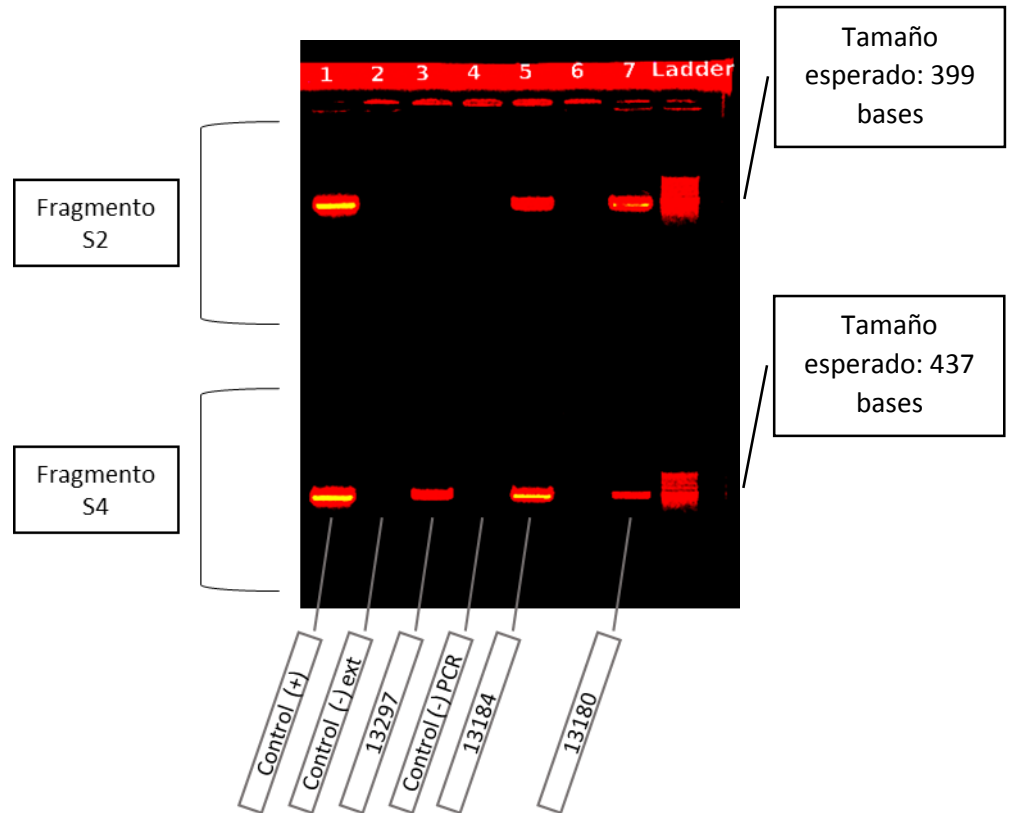


Figura Nro. 2. Electroforesis en gel de resultados de PCR. Las bandas de la parte de arriba de la imagen corresponden a parte del fragmento S2 (, las de abajo a parte de S4. Las muestras analizadas por carril son: (1) Control positivo Vacuna Nobilis® Reo 1133, (2) Control negativo de extracción de RNA, (3) Muestra 13297, (4) Control negativo de PCR, (5) Muestra 13184, (7) Muestra 13180.

Con respecto al aislado 13297, se obtuvo reacciones positivas en las PCR que amplificaron sólo para los partidores RVAS3P18FW, RVAS3P18REV, RVAS4P1FW y RVAS4P1REV. Estos resultados se aprecian en las Figuras Nro. 2 y 3.

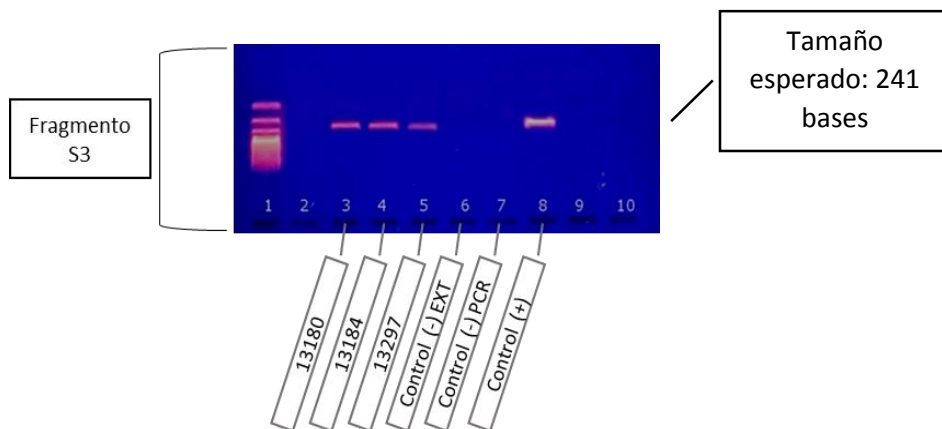


Figura Nro. 3. Electroforesis en gel de resultados de PCR. Amplicones de parte del segmento S3. Las muestras analizadas por carril son: (3) muestra 13180, (4) muestra 13184, (5) muestra 13297, (6) control negativo de extracción, (7) control negativo de PCR, (8) control positivo de la cepa de referencia nacional aislada por Canales (2011).

Los dos partidores que tienen como blanco el gen de la proteína σ C (RVAS1P1FW y RVAS1P1REV) dieron resultados positivos en las PCR en las que se amplificó el DNAc de las muestras 13180, 13184 y 13297. En la Figura Nro. 4 se observan los resultados para 13180 y 13184.

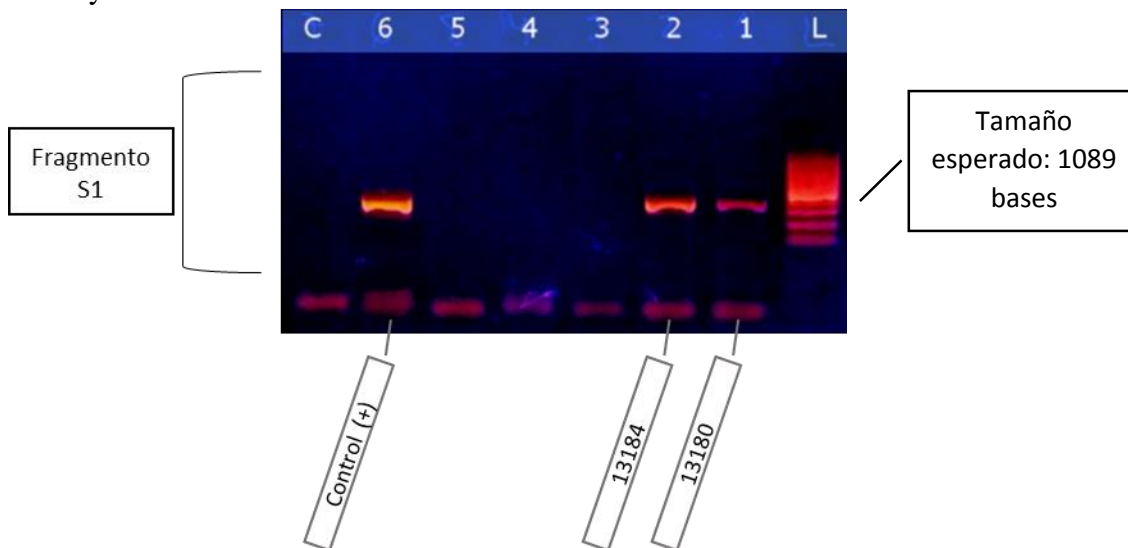


Figura Nro. 4. Electroforesis en gel de resultados de PCR. En la imagen se muestran las bandas de los amplicones del gen de la proteína σ C contenido en el fragmento S1. Las muestras analizadas por carril son: (1) muestra 13180, (2) muestra 13184, (4) control negativo de extracción, (5) control negativo de PCR, (6) control Vacuna Nobilis® Reo

Secuenciación de segmento S1

La información obtenida en la secuenciación del gen de la proteína σ C de los aislados 13180 y 13184 (AS) obtenidas de pollos broiler muestra secuencias genéticas idénticas entre estos dos aislados. De esta manera, denominamos a esta secuencia como CL013184, la que fue indexada en GenBank con el número de acceso KP713686.

La secuencia del gen de la proteína σ C obtenida del aislado 13297 (origen AR) presenta un 98% de homología a la secuencia CL013184 (origen AS).

Comparando la secuencia del fragmento S1 de la cepa clásica S1133 disponible en GenBank, se puede observar que las sustituciones de nucleótidos están distribuidas aleatoriamente en la secuencia de CL013184, y que inserciones y supresiones ocurrieron en el gen de la proteína σ C de esta cepa, como se aprecia en el Anexo 4. Además, se aprecia en el Anexo 5 que las sustituciones, inserciones y supresiones de nucleótidos en el RNA viral indujeron más cambios no-sinónimos que sinónimos en el código de los aminoácidos de la proteína.

El gen de la proteína σ C del genotipo CL013184 presenta una divergencia genética notoria con el mismo gen de las cepas vacunales S1133, 1733 y 2804 empleadas en las aves comerciales de Chile, con una similitud genómica de entre un 57,9 a un 58,5% y aminoacídica de entre un 47,8% a 48,1% como se muestra en la Tabla Nro. 2.

Registro GenBank	Cepa de vacuna	Genoma	Aminoácidos
AF330703	S1133	57,9	47,8
AF004857	1733	58,1	48,1
AF204945	2408	58,5	48,1

Al realizar una búsqueda BLAST (Zhang *et al.*, 2000; Morgulis *et al.*, 2008) se obtuvieron distintas secuencias nucleotídicas del fragmento codificante para la proteína σ C de RVA publicadas en GenBank. A partir de estas secuencias fueron seleccionadas aquellas que estuvieron asociadas a AV o TS en pollos broiler. Dentro de estas secuencias se encuentran algunas publicadas por Lu *et al.* (2015) las que comienzan con “KP” o “KR” en su código de registro en GenBank. Además se consideraron las secuencias que corresponden a las cepas

vacunales S1133, 2408 y 1733. Luego, estas secuencias (descritas en el Anexo 6) se agruparon junto con la secuencia CL013184 en un árbol filogenético (Figura Nro. 5) según la metodología descrita en materiales y métodos.

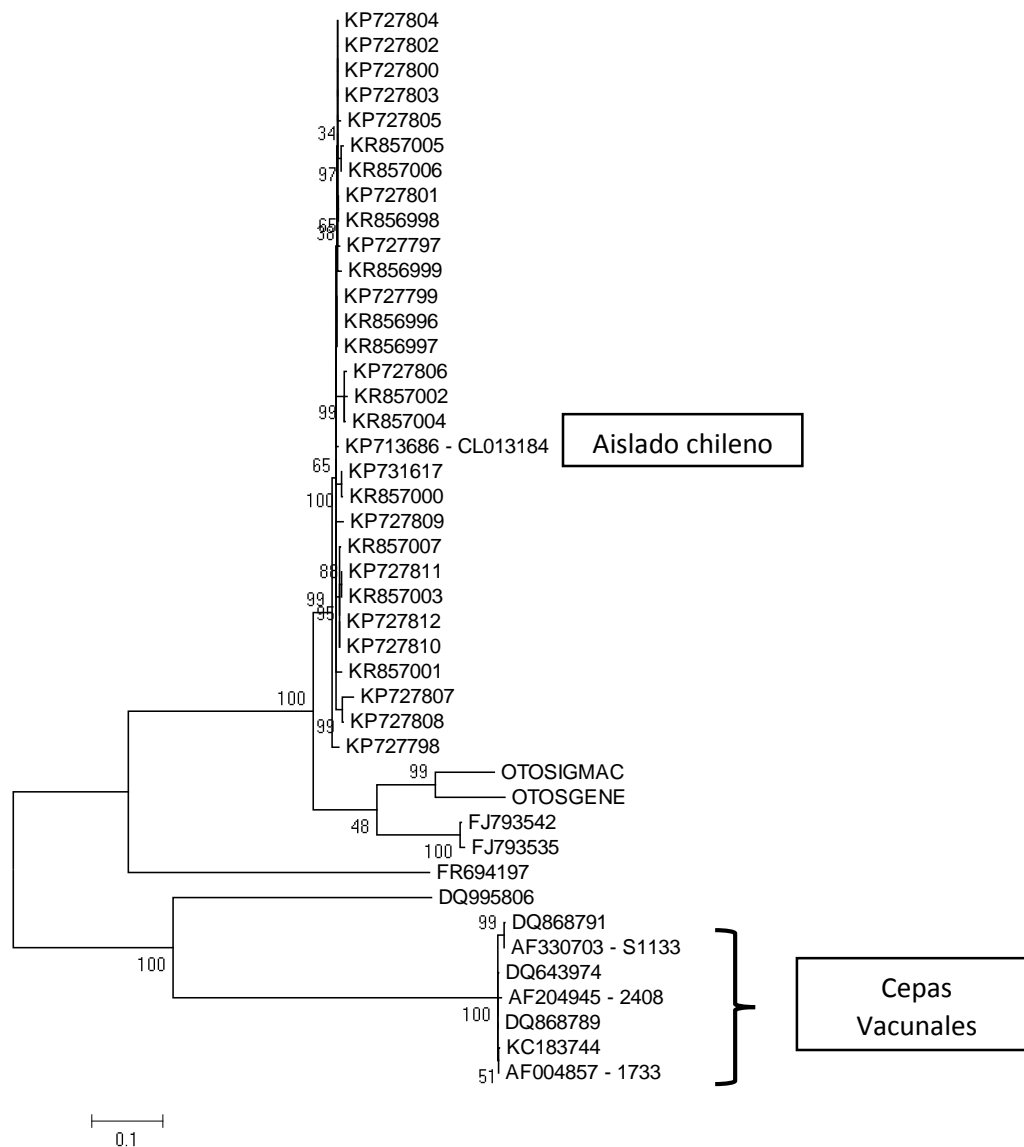


Figura Nro. 5. Árbol filogenético de parte del gen de la proteína σC . Se muestra en los nodos el porcentaje de iteraciones que definió cada rama como tal. Se observa que el aislado CL013184 tiene mayor similitud con cepas estadounidenses (cuyos códigos de GenBank comienzan con KR o KP). La cepa CL013184 se encuentra en un grupo distinto del de las cepas vacunales S133, 1733 y 2408

VII. Discusión

La caracterización y clasificación de los RVAs es un proceso importante para el estudio de esta patología respecto a su patogenia, epidemiología, aspectos mutacionales y la efectividad de estrategias de protección vacunal.

La serotipificación mediante neutralización cruzada en HE o cultivos celulares es un proceso largo, laborioso y costoso. En cambio, la implementación de RT-PCR permite confirmar la presencia del virus de forma rápida y certera. Esta técnica ha permitido genotipificar a decenas de aislados de RVA a nivel mundial. Aún no se ha logrado establecer una relación específica entre el código genético y la patogenicidad de una cepa de RVA, pero las diferencias generalmente van asociadas a una menor capacidad de los pollos para defenderse de una infección (Vasserman *et al.*, 2004).

Durante este estudio se obtuvieron tres aislados de RVA desde pollos con AV o TS de dos empresas productoras de pollos, los que se aislaron en pasajes en MCA-HE y fueron caracterizados posteriormente por RT-PCR.

Con el propósito de asegurar el éxito en la identificación genómica de un RVA como tal, se usaron cuatro sets de partidores que tienen como blanco parte de los segmentos S1, S2, S3 Y S4 del genoma de RVA para cada muestra. Dos de estos sets fueron diseñados según Bruhn *et al.* (2005). En su estudio ellos determinan que estos partidores identifican a un 80% de los RVA en general. El par de partidores desarrollados durante este estudio (RVAS3P1FW y RVAS3P1REV), que tienen como blanco una zona conservada del fragmento S3, son capaces de reconocer las 28 secuencias obtenidas desde GenBank indicadas en el Anexo 2. Dentro de todas las secuencias disponibles, se seleccionaron las que pertenecieran al segmento S3 de RVAs aislados de pollos o gallinas y que estuvieran asociadas a casos de AV o TS. A partir de estas secuencias se diseñaron los partidores antes nombrados. Por último, los partidores usados para el fragmento S1 del genoma viral fueron diseñados y publicados por Kant *et al.*, (2003).

Al realizar una búsqueda BLAST (Zhang *et al.*, 2000; Morgulis *et al.*, 2008) de todos estos partidores, los resultados muestran que son específicos para RVA. De todas formas, es importante tener en cuenta que pueden haber cepas variantes que no sean amplificadas con todos estos partidores, así se ve en la Figura Nro. 2 en la que para los partidores RVAS2P1FW

y RVAS2P1REV la cepa 13297 fue negativa, a pesar de ser positiva para los otros partidores. Es por esto que es necesario usar varias parejas de partidores para asegurar el reconocimiento del virus.

Para estudiar la asociación de AV o TS con RVAs, es de especial importancia secuenciar el gen que codifica la proteína σC , que al ser más variante (Liu *et al.*, 2003) y estar relacionada con la respuesta inmune protectora de aves afectadas (Vasserman *et al.*, 2004), es la más idónea para diferenciar cepas según su diversidad genética (Liu *et al.*, 2003).

La forma más conveniente de controlar la AV o TS es mediante el uso de vacunas en las reproductoras para que éstas transfieran inmunidad pasiva a la progenie (Zavala, 2010). La cepa clásica que se ha usado mundialmente para inmunizar aves contra el virus es la S1133 y otras similares como la 2408 y la 1733. Estas cepas se aplican en su forma atenuada e inactivada. Se ha publicado la pobre protección que las cepas clásicas otorgan a lotes afectados con cepas variantes (Vasserman *et al.*, 2004) y se ha asociado un aumento de la presentación de AV o TS a la aparición de cepas variantes en Estados Unidos caracterizadas en el estudio de Lu *et al.* (2015).

El genotipo CL013184 obtenido en este estudio presenta una marcada diferencia con respecto a las cepas vacunales S1133, 1733 y 2408 (Tabla Nro. 2). Además, en el árbol filogenético (Figura Nro. 5) se observa que CL013184 es muy similar en su proteína σC a cepas variantes aisladas en Estados Unidos (Lu *et al.*, 2015), con un 99% de similitud o más.

Los RVAs estudiados provienen de dos empresas, una de las cuales vacuna a sus reproductoras con cepas clásicas y la otra no usa vacunas contra reovirus. La caracterización molecular de la variante encontrada permite inferir que las vacunas usadas normalmente probablemente no protegen debidamente contra una infección del virus del genotipo CL013184. Dado que una mejor protección contra desafíos de campo se logra mediante vacunación con cepas homólogas (Zavala, 2010), no es de extrañar que las aves afectadas hayan presentado signos de AV o TS aun estando vacunadas.

Los datos obtenidos analizados mediante un árbol filogenético indican que la cepa chilena aislada presenta una alta similitud con cepas de Estados Unidos, las que también han sido asociadas a cuadros de AV o TS.

La divergencia mostrada por la proteína σC es probablemente un reflejo de las presiones evolutivas ejercidas por el sistema inmune de los hospederos. Esto puede llevar a la aparición de mutantes que eviten la eliminación del sistema inmune o a la aparición de una amplia variedad de mutantes dentro de la población viral. Además de la deriva de antígeno de la proteína σC de RVA, la aparición de nuevas cepas puede verse favorecida por la combinación entre la mutación genética y la recombinación entre cepas cocirculantes.

VIII. Conclusiones

Se logró establecer un protocolo de RT-PCR para la identificación de RVA en el laboratorio de diagnóstico FAVET.

Se logró asociar la presentación de AV o TS clínica en pollos broiler de empresas chilenas con el aislamiento e identificación genómica de RVA.

Las diferencias genómicas entre CL013184 y las cepas vacunales en uso sugieren la conveniencia de la genotipificación de las cepas de campo de RVA para establecer la vacuna adecuada y minimizar el impacto de AV o TS en producciones avícolas.

IX. Bibliografía

AL-AFALEQ, A.; JONES, R. 1990. Localisation of avian reovirus in the hock joints of chicks after entry through broken skin. *Res. Vet. Sci.* (48):381–382.

AL-MUFFAREJ, S.; SAVAGE, C.; JONES, R. 1996. Egg transmission of avian reoviruses in chickens: comparison of a trypsin-sensitive and a trypsin-resistant strain. *Avian Pathol.* (25):469-480.

ARENAS, M. 2015. Trends in substitution models of molecular evolution. [en línea] *Front. Genet.* (6):1-9. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4620419/pdf/fgene-06-00319.pdf>> [consulta: 24-12-2015]

BALTIMORE, D. 1970. Viral RNA-dependent DNA polymerase: RNA-dependent DNA polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature* (226):1209-1211.

BÁNYAI, K.; DANDÁR, E.; DORSEY, K.; MATÓ, T.; PALYA, V. 2011. The genomic constellation of a novel avian orthoreovirus strain associated with runting-stunting syndrome in broilers. *Virus Genes* (42):82–89.

BARONI, A.; BERTONCIN, P.; D'APRILE, P.; FELLUGA, B. 1980. Ultrastructural histopathology of chick embryo chorioallantoic membrane infected with an avian reovirus. *Avian Pathol.* 9(3):341-354.

BENAVENTE, J.; MARTÍNEZ-COSTAS, J. 2005. Avian Reovirus: Structure and Biology. *Virus Res.* 123(2):105-19.

BEZERRA, D.; DA SILVA, R.; KAIANO, J.; SILVESTRE, R.; DE SOUZA OLIVEIRA, D.; LINHARES, A.; GABBAY, Y.; MASCARENHAS, J. 2012. Detection of avian group D rotavirus using the polymerase chain reaction for the VP6 gene. *J. Virol. Methods* (185):189–192.

BRUHN, S.; BRUCKNER, L.; OTTIGER, HP. 2005. Application of RT-PCR for the detection of avian reovirus contamination in avian viral vaccines. *J. Virol. Methods* (123):179-186.

BRUINSMA, J. 2003. World Agriculture: towards 2015/2030, a FAO perspective. [en línea] <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/y4252E/y4252e.pdf>> [consulta: 09-11-2015]

- CANALES, C.** 2011. Aislamiento y caracterización del virus causal de la artritis viral y tendosinovitis en una granja de pollas leghorn de reposición. Título de Médico Veterinario. Viña del Mar, Chile. U. de Viña del Mar. 68 p.
- CASPAR, D.; KLUGG, A.** 1962. Physical Principles in the Construction of Regular Viruses. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. (27):1-24.
- CRESPO, R.; SHIVAPRASAD, H.** 2011. Rupture of gastrocnemius tendon in broiler breeder hens. Avian Dis. (55): 495-498.
- DAY, J.** 2009. The Diversity of the Orthoreoviruses: Molecular Taxonomy and Phylogenetic Divides. Infec, Genet. Evol. (9):390-400.
- DERMODY, T.; PARKER, J.; SHERRY, B.** 2013. Orthoreoviruses **In:** Knipe, D.; Howley, P. Fields Virology. 6^a Edición. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, EE.UU. pp. 1304-1346.
- DIEFFENBACH, C.; LOWE, T.; DVEKSLER, G.** 1993. General concepts for PCR primer design. Genome Res. (3):30-37
- DOBSON, K.; GLISSON, J.** 1992. Economic impact of a documented case of reovirus infection in broiler breeders. Avian Dis. 36(3):788-791.
- GUNERATNE, J.; JONES, R.; GEORGIU, K.** 1982. Some observations on the isolation and cultivation of avian reoviruses. Avian Pathol. 11(3):453-462.
- HELLA, Y.; BOUROGÂA, H.; GRIBAA, L.; SCOTT-ALGARA, D.; GHRAM, A.** 2013. Molecular characterization of avian reovirus isolates in Tunisia. Virol. J. (19):12.
- HYERONIMUS, D.; VILLEGAS, P.; KLEVEN, S.** 1983. Identification and serological differentiation of several reovirus strains isolated from chickens with suspected malabsorption syndrome. Avian Dis. 27(1):246-254.
- JONES, R.** 2000. Avian Reovirus Infections. Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz. 19 (2), 614-625.
- JONES, R.** 2013. Reovirus Infections **In:** Swayne, D. Diseases of Poultry. 13^a Edición. Blackwell Publishing. Iowa, EE.UU. pp. 351-374.
- JONES, R.; GEORGIU, K.** 1984. Reovirus-induced tenosynovitis in chickens: The influence of age at infection. Avian Pathol. (13):441-457.

- JONES, R.; ISLAM, M.; KELLY, D.** 1989. Early pathogenesis of experimental reovirus infection in chickens. *Avian Pathol.* (18):239-253.
- KANT, A.; BALK, F.; BORN, L.; VAN ROOZELAAR, D.; HEIJMANS, J.; GIELKENS, A.; TER HUURNE, A.** 2003. Classification of Dutch and German avian reoviruses by sequencing the sigma C protein. *Vet. Res.* (34):203-212.
- KAWAMURA, H.; SHIMIZU, F.; MAEDA, M.; TSUBAHARA, H.** 1965. Avian Reovirus: its properties and serological classification. *National Institute Animal Health Q (Tokyo)* (5):115-124.
- KERR, K.; OLSON, N.** 1964. Control of infectious synovitis. The effect of age of chickens on the susceptibility to three agents. *Avian Dis.* (8):256–263.
- KLEPPE, K.; OHTSUKA, E.; KLEPPE, R.; MOLINEUX, I.; KHORANA, H.** 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* (56):341–361.
- LIU, H. J.; GIAMBRONE, J. J.** 1997. Amplification, cloning and sequencing of the σ C-encoded gene of avian reovirus. *J. Virol. Methods* (63):203-208.
- LIU, H. J.; LEE, L.H.; HSU, H.W.; KUO, L.C.; LIAO, M.H.** 2003. Molecular evolution of avian reovirus: evidence for genetic diversity and reassortment of the S-class genome segments and multiple cocirculating lineages. *Virology* (314):336–349.
- LU, H; TANG, Y.; DUNN, P.; WALLNER-PENDLETON, E.; LIN, L.; KNOLL, E.** 2015. Isolation and molecular characterization of the newly emerging avian reovirus variants in broilers, layers and turkeys in Pennsylvania, USA, 2011 - 2014. [en línea] <<http://www.nature.com/articles/srep14727>> [consulta: 28-12-2015]
- MAGEE, D.; MONTGOMERY, R.; MASLIN, W.; WU, C.; JACK, S.** 1993. Reovirus associated with excessive mortality in young bobwhite quail. *Avian Dis.* (37):1130–1135.
- MARTÍNEZ-COSTAS, J.; GRANDE, A.; VARELA, R.; GARCIA-MARTÍNEZ, C.; BENAVENTE, J.** 1997. Protein architecture of avian reovirus S1133 and identification of the cell attachment protein. *J. Virol.* (71):59–64.

MOR, S.; SHARAFELDIN, T.; PORTER, R.; ZIEGLER, A.; PATNAYAK, D.; GOYAL, S. 2013. Isolation and Characterization of a Turkey Arthritis Reovirus. *Avian Dis.* (57):97-103.

MORGULIS, A.; COULOURIS, G.; RAYTSELIS, Y.; MADDEN, T.; AGARWALA, R.; SCHÄFFER, A. 2008. Database Indexing for Production MegaBLAST Searches. *Bioinformatics* (24): 1757-1764.

MULLIS, K. 1990. Amplification techniques and specific applications of the polymerase chain reaction method. *Clin. Biochem.* 23(4), 307-308.

OLSON, N.; KERR, K. 1966. Some Characteristics of an Avian Arthritis agent. *Avian Dis.* (10):470-476.

OLSON, N.; KERR, K. 1967. The duration and distribution of synovitis-producing agents in chickens. *Avian Dis.* 11:578–585.

OLSON, N.; KHAN, M. 1972. The effect of intranasal exposure of chickens to the Fahey-Crawley virus on the development of synovial lesions. *Avian Dis.* 16:1073–1078.

QUINTEROS, J. 2014. Recombination in Australian infectious bronchitis viruses. Master of Veterinary Science. Melbourne, Australia. Universidad de Melbourne. 128 pp.

ROBERTSON, M.; WILCOX, G. 1984. Serological characteristics of avian reoviruses of Australian origin. *Avian Pathol.* (13):585-594.

ROSENBERGER, J.; SPACKMAN, E. 2008. Viral Arthritis/Tendosynovitis and other Reovirus Infections. In: Dufour-Zavala, L.; Swayne, D.; Glisson, J.; Pearson, J.; Reed, W.; Jackwood, M.; Woolcock, P. A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens. 5^{ta} edición. American Association of Avian Pathologists. Athens, Georgia, USA. pp 181-183.

SAHU, S.; OLSON, N. 1975. Comparison of the characteristics of avian reoviruses isolated from the digestive and respiratory tract, with viruses isolated from the synovia. *Am. J. Vet. Res.* 36(6):847-50.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual. 3rd edición. Capítulo 8. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

- SANCHEZ-CORDON, P.; HERVAS, J.; CHACON DE LARA, F.; JAHN, J.; SALGUERO, F.; GOMEZVILLAMANDOS, J.** 2002. Reovirus infection in psittacine birds (*Psittacus erithacus*): morphologic and immunohistochemical study. *Avian Dis.* (46):485–492.
- SELLERS, H.** 2013. Update on Variant Avian Reoviruses Isolated from Clinical Cases of Viral Arthritis/Tenosynovitis in Broilers. *Poultry Informed Professional* (127):1-3.
- TANG, Y.; LU, H.** 2015. Genomic characterization of a broiler reovirus field strain detected in Pennsylvania. *Infect. Genet. Evol.* (31):177–182.
- TAVARÉ, S.** 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences In: Miura, R. Some mathematical questions in biology/DNA sequence analysis. 1^{ra} Edición. The American Mathematical Society. Providence, Rhode Island, Estados Unidos. (17):57-86.
- TEMIN, H.; MIZUTANI, S.** 1970. RNA-dependant DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* (226):1211-1213.
- TENG, L.; XIE, Z.; XIE, L.; LIU, J.; PANG, Y.; DENG, X.; XIE, ZH.; FAN, Q.; LUO, S.; FENG, J.; KHAN, M.** 2014. Sequencing and Phylogenetic Analysis of an Avian Reovirus Genome. *Virus Genes* 48(2):381-386.
- VARELA, R.; BENAVENTE, J.** 1994. Protein coding assignment of avian reovirus strain S1133. *J. Virol.* 68(10):6775-6777.
- VASSERMAN, Y.; ELIAHOO, D.; HEMSANI, E.; KASS, N.; AYALI, G.; POKAMUNSKI, S.; PITCOVSKI, J.** 2004. The Influence of Reovirus SigmaC Protein Diversity on Vaccination Efficiency. *Avian Dis.* (48): 271–278.
- VINDEVOGEL, H.; MEULEMANS, G.; PASTORET, P.; SCHWERS, A.; CALBERG-BACQ, C.** 1982. Reovirus infection in the pigeon. *Ann. Rech. Vet.* (13):149–152.
- WALKER, E.; FRIEDMAN, M.; OLSON, N.** 1972. An electron microscopic study of an Avian Reovirus that causes Arthritis. *J. Ultrastruct. Res.* (41):67–79.

WOOD, G.; NICHOLAS, R.; HERBERT, C.; THORNTON, D. 1980. Serological comparisons of avian reovirus. *J. Comp. Path.* (90):29-38.

XIE, Z.; FADL, A.; GIRSHICK, T.; KHAN, M. 1997. Amplification of Avian Reovirus RNA Using the Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *Avian Dis.* (41):654-660.

YANG, Z. 1996. Maximum-Likelihood Models for Combined Analyses of Multiple Sequence Data. *J. Mol. Evol.* (42):587-596.

ZAVALA, G. 2010. The role of vaccines in the control of Avian Reovirus infection. *Avian Insight* (4):1-3.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7(1-2):203-14.

X. Anexos

Anexo 1.

Se describen a continuación los partidores usados en este estudio.

Partidor	Longitud (bp*)	Tm **	Secuencia	Objetivo	Producto esperado (bp)	Fuente
RVAS1P1FW	20	45,02	AGTATTTGTGAGTACGATTG	S1	1089	Kant <i>et al.</i> , 2003.
RVAS1P1REV	17	53,54	GGCGCCACACCTTAGGT	S1		
RVAS2P1FW	17	47,92	TTCGGCCACGTCTCAAC	S2	399	Bruhn <i>et al.</i> , 2005
RVAS2P1REV	17	51,61	CCCATGGCAACGATTTTC	S2		
RVAS3P18FW	18	50,1	CTCCTGCTTGCTGGAATG	S3	241	LPA***
RVAS3P18REV	19	51,28	TGGTCCAACAGATGCTCAG	S3		
RVAS4P1FW	17	48,3	GTGCGTGTGGAGTTTC	S4	437	Bruhn <i>et al.</i> , 2005
RVAS4P1REV	17	47,92	ACAAAGCCAGCCATGAT	S4		
* Pares de Bases (bp)						
** Temperatura de "melting" corregida a una concentración de sal monovalente de 50mM						
***Laboratorio de Patología Aviaria (LPA), Universidad de Chile						

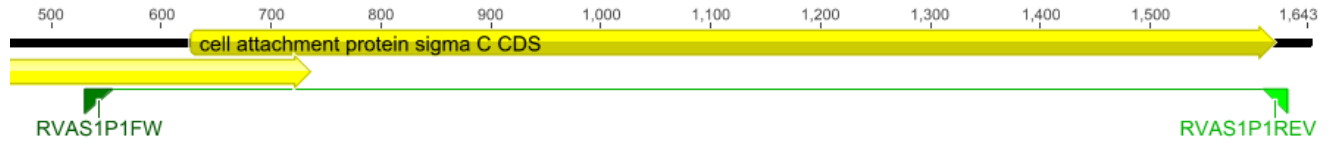
Anexo 2

Secuencias usadas para el alineamiento en el que se determinaron las zonas conservadas de los fragmentos S3 de RVA para el diseño de partidores:

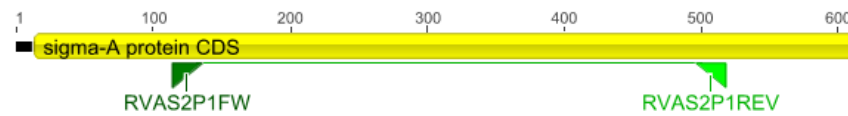
AY029700, AY029702, AY029701, DQ415659, AF208036, AF208038, AF301474, AF208035, AF301471, AY008383, AY008384, AF301472, AF301473, AF208034, AF208037, JN559377, KC865794, AO20642, KC183746, JQ916907, EF030496, AF059720, AF004856, EF030497, AF059721, EF030498, KF741764, EF030499

Anexo 3

Se muestra parte del fragmento S1 y se indica la posición de los partidores RVAS1P1FW y RVAS1P1REV en la secuencia:



Se muestra parte del fragmento S2 y se indica la posición de los partidores RVAS2P1FW y RVAS2P1REV en la secuencia:



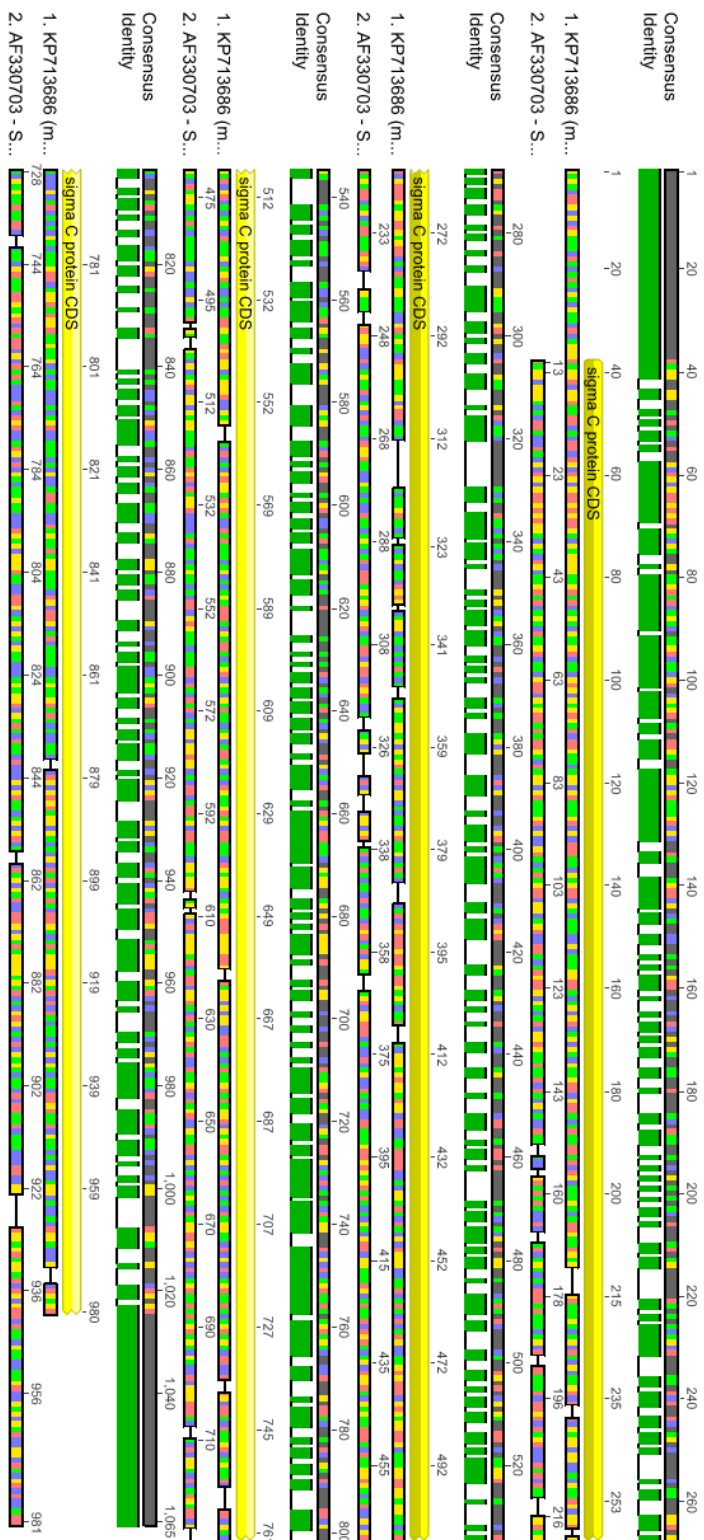
Se muestra parte del fragmento S1 y se indica la posición de los partidores RVAS3P1FW y RVAS3P1REV en la secuencia:



Se muestra parte del fragmento S1 y se indica la posición de los partidores RVAS4P1FW y RVAS4P1REV en la secuencia:



Anexo 4. Se muestra la comparación entre el gen que codifica la proteína σ C KP713686 (CL013184) con respecto a su equivalente en la cepa S1133. La línea “Consensus Identity” muestra la similitud (color verde) o diferencia (color blanco) entre ambas secuencias.



Anexo 6.

Estas secuencias fueron seleccionadas desde GenBank con el propósito de construir un árbol filogenético para el gen de la proteína σ C. Entre ellas se destacan las cepas vacunales S1133, 2408 y 1733. Además se señala la secuencia del aislado chileno, CL013184, con su código KP713686. Los códigos que comienzan con KP o KR en su mayoría son secuencias obtenidas por Lu *et al.* (2015) en Estados Unidos.

AF004857 - 1733	KP727806	OTOSIGMAC
AF204945 - 2408	KP727807	
AF330703 - S1133	KP727808	
DQ643974	KP727809	
DQ868789	KP727810	
DQ868791	KP727811	
DQ995806	KP727812	
FJ793535	KP731617	
FJ793542	KR856996	
FR694197	KR856997	
KC183744	KR856998	
KP713686 - CL013184	KR856999	
KP727797	KR857000	
KP727798	KR857001	
KP727799	KR857002	
KP727800	KR857003	
KP727801	KR857004	
KP727802	KR857005	
KP727803	KR857006	
KP727804	KR857007	
KP727805	OTOSGENE	