



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y SALUD ANIMAL**

**“CINÉTICA DE EXCRECIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA EN  
EL PATO”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**JOSÉ MANUEL CARRANZA FLORES**

**TUTOR:**

**GARY GARCÍA ESPINOSA**

**COMITÉ TUTORAL:**

**ELIZABETH LOZA RUBIO**

**LUIS PADILLA NORIEGA**

**MÉXICO, D.F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

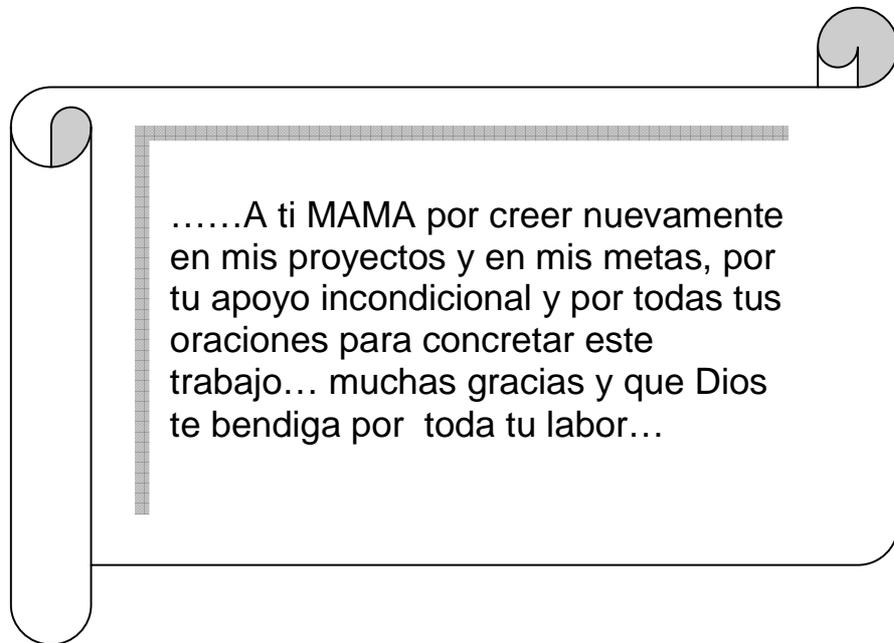
## **DECLARACIÓN.**

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

---

M.V.Z. José Manuel Carranza Flores

# DEDICATORIA.....



# AGRADECIMIENTOS

Se agradece a las siguientes instituciones que hicieron posible la elaboración de este trabajo de investigación:

- Universidad Nacional Autónoma de México
- Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
- Programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT-IN210608).

Así mismo, me es grato agradecer a las siguientes personas que participaron con su apoyo y profesionalismo:

Al comité:

- Dr. Gary García Espinosa
- Dra. Elizabeth Loza Rubio
- Dr. Luis Padilla Noriega

Al jurado:

- Dr. Alvaro Aguilar Setien
- Dr. Eliseo Hernández Baumgarten
- Dr. Néstor Ledesma Martínez
- Dr. Humberto Ramírez Mendoza

Así como a mis los estimados colaboradores:

- M.C. Monica Salas
- Dr. Renato León
- Dr. Fernando Diosdado
- M.C. Clara Aguillón
- M.V.Z. Elia Armas
- MVZ. Stivalis Cárdenas
- M.V.Z. Ernesto Godínez

**El presente trabajo fue realizado con el equipo e instalaciones del laboratorio de Ecomedicina Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, el laboratorio de biología molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, y en el laboratorio y unidades de aislamiento de alta seguridad del Cenid-Microbiología Inifap Palo Alto en Cuajimalpa D.F., siendo los responsables de dichos laboratorios: Dr. Gary García Espinosa, Dr. Luis Padilla Noriega y La Dra. Elizabeth Loza Rubio, respectivamente.**

## RESUMEN.

**José Manuel Carranza Flores.** Cinética de excreción del virus de influenza en el pato. Bajo la dirección de Dr. Gary García Espinosa, Dra. Elizabeth Loza Rubio y el Dr. Luis Padilla Noriega.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la cinética de excreción del virus de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad aislado de pollo en el 2007 en el pato Pekín (*Anas platyrhynchos domesticus*). Las muestras biológicas consistieron en hisopos de laringe y cloaca colectados a las 12, 24, 48, 72 horas así como primera, segunda y tercera semana postinoculación.

Un grupo de pollos Leghorn fue establecido como testigo positivo de la infección. Las muestras fueron analizadas por técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y aislamiento viral en embrión de pollo. Adicionalmente se colectó suero para cuantificar la producción de anticuerpos semanalmente por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación. Ambos grupos de aves fueron inoculados con 10,000,000 dosis infectantes en embrión de pollo al 50 por ciento. El método de cuantificación empleado para la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real correspondió a una cuantificación absoluta y fue necesario el diseño de un par de primers con sonda dirigidos al gen M del virus de influenza aviar y un par de primers y sonda para el gen beta actina, este último como testigo interno. La señal de fluorescencia fue transformada a un valor numérico en unidades de nanogramos/microlitro. Los resultados de este estudio mostraron que el virus H5N2 de baja patogenicidad aislado de pollo en el 2007 es específico del pollo. La cinética de excreción mostró la detección por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real durante las 3 semanas de monitoreo en ambas especies; sin embargo, la eliminación más alta en patos ocurrió por vía cloacal durante las primeras 72 horas aunque esta carga viral no fue infecciosa en embrión de pollo, por el contrario, la carga viral en laringe se presentó en menor cantidad y con capacidad infecciosa solo a las 12 horas postinoculación. En contraste, los pollos testigos de la infección manifestaron una carga viral exponencial y aislamiento positivo en embrión de pollo siendo la laringe el sitio de mayor excreción viral y con capacidad infecciosa.

Con lo anterior se concluye que el pato Pekín es capaz de infectarse sin manifestar signos clínicos y eliminar el virus en cantidades limitantes por vía cloacal y laríngea. Estos resultados aportan datos epidemiológicos para entender los procesos de propagación del virus H5N2 de baja patogenicidad residente en México y la importancia de mantener el monitoreo de esta enfermedad en aves domésticas.

**PALABRAS CLAVE:** Influenza aviar, H5N2, cinética de excreción, RRT-PCR, pato doméstico.

## SUMMARY

**José Manuel Carranza Flores.** Kinetic of excretion of the virus of influenza in the duck. Under the direction Dr. Gary García Espinosa, Dra. Elizabeth Loza Rubio y el Dr. Luis Padilla Noriega.

The aim of this study was to evaluate the kinetics of excretion of low pathogenicity H5N2 avian influenza virus isolated from chicken in 2007 using the Pekin duck (*Anas platyrhynchos domesticus*). The biological samples consisted of larynx and cloacal swabs collected at 12, 24, 48, 72 hours and the first, second and third weeks postinfection.

A group of Leghorn chickens were established as a positive control of infection. The samples were analyzed by real time polymerase chain reaction technique and viral isolation in chicken embryos. In addition, serum was collected to quantify the production of antibodies weekly by hemagglutination inhibition test. Both groups of birds were inoculated with ten million infectious doses in chicken embryos at fifty percent. The quantification method used for the real time polymerase chain reaction technique corresponded to an absolute quantification and it was necessary to design a primer pair and probe for M gene avian influenza virus and a primer pair and probe for the actin beta gene as an internal control. The fluorescence signal was converted to a numeric value in units of nanograms/microliter. The results of this study showed that low pathogenic H5N2 virus isolated from chicken in 2007 is specific to chicken. The excretion kinetics by real time polymerase chain reaction technique detected the virus over the three weeks of monitoring on both species; however, the higher elimination rate in ducks occurred through cloacal during the first 72 hours, but this viral load was non infectious in chicken embryos, by contrast, the viral load in larynx was present in smaller quantities and was infectious only at 12 hours postinoculation. The positive control chickens' group showed an exponential viral load as well as isolation in chicken embryos, the larynx was the highest viral excretion site and infectious capability.

The study concludes that the Pekin duck was infected without showing any clinical signs and removes viruses in limiting quantities by cloacal and larynx. These results provide epidemiological data to understand the processes of spread of low pathogenic H5N2 virus resident in Mexico and indicate the importance of maintaining the monitoring of this disease in domestic birds

Key words: Kinetic of excretion, Pekin duck, H5N2, avian flu, real time polymerase chain reaction.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ARN: Ácido ribonucleíco  
HA: Hemaglutinina  
NA: Neuraminidasa  
IAAP: Influenza aviar de alta patogenicidad  
IABP: Influenza aviar de baja patogenicidad  
PB2: Polimerasa PB2  
ARNm: Ácido ribonucleíco mensajero  
PB1: Polimerasa PB1  
PA: Proteína ácida  
NP: Nucleoproteína  
NA: Neuraminidasa  
M1: Gen de matriz 1  
M2: Gen de matriz 2  
NS1: Proteína no estructural 1  
NS2: Proteína no estructural 2  
HA0 : Hemaglutinina cero  
HA1: Hemaglutinina 1  
HA2:Hemaglutinina 2  
ARN'sm: ARN's mensajeros  
ARNC: ARN complementario  
NOM: Norma Oficial Mexicana  
INIFAP: Instituto nacional de investigaciones forestales agrícolas y pecuarias  
D.F.: Distrito Federal  
H5N2: Hemaglutinina tipo 5, neuraminidasa tipo 2  
DPAA: Departamento de Producción Animal: Aves  
UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México  
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool  
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa-transcripción reversa  
RT: Transcripción reversa  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
RT-TAQ: Enzimas retrotranscriptasa reversa-Taq polimersa  
M: Gen M de Influenza aviar  
RRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa-transcripción reversa en tiempo real  
Gs: Guaninas  
Cs: Citocinas  
G-C: Guanina-citocina  
ALPES: Aves Libres de patógenos específicos, S.A.  
DLEP50%: Dosis letal en embrión de pollo al 50%  
MEM: Minimum Essential Medium  
AVMA: Asociación Americana de Medicina Veterinaria  
ADNc: Ácido deoxirribonucleíco complementario  
UDG: ADN uracil glicosilasa  
DEPC: Dietilpirocarbonato  
Pb: Pares de bases  
Tm: Temperatura de fusión

HI: Inhibición de la Hemoaglutinación  
PI: Postinfección  
Ct: Intensidad de fluorescencia  
IA: Influenza aviar  
T7: Promotor de la polimerasa T7  
NTC: Testigo sin cadena patrón  
TAE: Tris acetato EDTA

## ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.....	1
1.1. Generalidades.....	1
1.2. Características del virus de influenza.....	1
1.3. Ciclo viral.....	3
1.4. Ecología del virus de influenza en las aves acuáticas.....	4
1.5. Justificación.....	5
2. Hipótesis y Objetivos.....	6
2.1. Hipótesis.....	6
2.2. Objetivo general.....	6
2.3. Objetivos específicos.....	6
3. Material y metodología de la investigación.....	8
3.1. Primera etapa.....	8
3.1.1. Virus IABP H5N2.....	8
3.1.2. Diseño de iniciadores.....	8
3.1.3. Síntesis <i>in vitro</i> de los ARNm de los genes $\beta$ -actina y M de IABP... 11	
3.1.4. Diseño y validación de sondas e iniciadores para RRT-PCR.....	16
3.1.5. Estandarización de RRT-PCR.....	19
3.1.6. Extracción de ARN de muestras problema.....	22
3.2. Segunda etapa.....	23
3.2.1. Sistemas vivos: Incubación de huevo fértil y crianza de aves.....	23
3.2.2. Preparación y titulación del inóculo de IABP H5N2.....	24
3.2.3. Diseño experimental.....	24
3.2.4. Colecta de muestras.....	25
3.3. Tercera etapa.....	25
3.3.1. Titulación de IABP por DLEP 50% en embrión de pollo.....	25
3.3.2. Inhibición de la hemaglutinación.....	26
4. Resultados.....	27
4.1. Descripción de signos clínicos.....	27
4.2. Cinética de excreción del virus IABP H5N2 en patos y pollos.....	27
4.3. Inhibición de la hemoaglutinación.....	31
4.4. Titulación del virus IABP H5N2 excretado en embrión de pollo.....	32
5. Discusión.....	34
5.1. Conclusión.....	37

6. Bibliografía.....	38
7. Apéndice.....	42
7.1.1. Protocolo de extracción de ARN viral con Kit High Pure Viral Nucleic Acid (ROCHE, Philadelphia, PA, USA; N°Cat. 1185887 4001).....	42
7.1.2. Protocolo de extracción de ARN ( $\beta$ -actina) total de hígado y corazón de embrión de pato utilizando el kit Rneasy mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA; N°Cat. 74104).....	42
7.1.3. Purificación del producto de PCR con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA, Madison, WI, USA; N° Cat. A9281).....	43
7.1.4. Sistema de producción de ARN in vitro mediante el kit T7 RiboMAX™ (PROMEGA, Madison WI, USA; N°Cat. P1300).....	44
7.1.5. Purificación del ARN de síntesis in vitro con kit Rneasy (QIAGEN, Valencia, CA, USA; N°Cat. 74104).....	45
7.1.6. Método modificado de extracción de ácidos nucleicos virales mediante el kit Purelink viral RNA mini kit (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA; N°Cat. 12280-050).....	45
7.1.7. Protocolo de RRT-PCR usado el kit Express qPCR Supermixes and Two-step qRT-PCR (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA; N° Cat. 11783-200 y 11754-050).....	47
7.1.8. Protocolo de qPCR.....	47
7.1.9. Preparación de la curva estándar con diluciones logarítmicas en base diez.....	48
7.1.10. Protocolo de RRT-PCR usado el kit Express 1 Step SS qRT-PCR universal (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA; N° Cat. 11781-200).....	49
7.2. Graficas de amplificación de la RRT-PCR.....	50
7.3 Composición de medio de transporte viral D-MEM.....	52

## ÍNDICE DE CUADROS

**CUADRO 1.** Características de los iniciadores diseñados para síntesis in vitro de los genes  $\beta$ -actina y gen M de Influenza aviar.

**CUADRO 2.** Componentes de la reacción de RT-PCR para los genes  $\beta$ -actina y M.

**CUADRO 3.** Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos utilizados en la RT-PCR para los genes  $\beta$ -actina y M.

**CUADRO 4.** Componentes de la reacción de transcripción in vitro para los genes  $\beta$ -actina y M.

**CUADRO 5.** Condiciones de temperatura y tiempo utilizados en la transcripción in vitro para los genes  $\beta$ -actina y M.

**CUADRO 6.** Componentes de la reacción de RT-PCR a partir de la síntesis in vitro de los genes  $\beta$ -actina y M.

**CUADRO 7.** Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos utilizados en la RT-PCR de punto final para la síntesis in vitro de los genes  $\beta$ -actina y M.

**CUADRO 8.** Características de los iniciadores diseñados para RRT-PCR de los genes  $\beta$ -actina y gen M de Influenza aviar.

**CUADRO 9.** Características de las sondas diseñados para RRT-PCR de los genes  $\beta$ -actina y gen M de Influenza aviar.

**CUADRO 10.** Componentes de la reacción de la RT de los genes  $\beta$ -actina y M para estandarización.

**CUADRO 11.** Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos utilizados en la RT de los genes  $\beta$ -actina y M.

**CUADRO 12.** Componentes de la reacción de qPCR a partir de ADNc de los genes  $\beta$ -actina y M.

**CUADRO 13.** Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos utilizados en la RRT-PCR de los genes  $\beta$ -actina y M.

**CUADRO 14.** Signos clínicos presentados en aves inoculadas con el virus H5N2 de baja patogenicidad a dosis de 107 D<sub>50</sub> 50%.

**CUADRO 15.** Datos numéricos obtenidos de la cinética de excreción por RRT-PCR de patos y pollos de 3 semanas de edad inoculados con el virus de influenza aviar H5N2 BP, aislado en el 2007.

**CUADRO 16.** Media geométrica obtenida por inhibición de la hemoaglutinación de patos y pollos de 3 semanas de edad inoculados con el virus de influenza aviar H5N2 BP aislado en el 2007.

**CUADRO 17.** Titulación de virus de IABP H5N2 excretado en muestras problemas determinado por DLEP 50%.

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Fotografía de un gel de agarosa al 3% en TAE teñido con bromuro de etidio, donde se observa la purificación del ARN de  $\beta$ -actina y el ARN del gen M del virus de influenza aviar, a partir de hígado de embrión de pato y líquido alantoideo, usando los sistemas Rneasy mini Handbook de QIAGEN y RNA viral High Pure Viral Nucleic Acid Kit de ROCHE, respectivamente.

**Figura 2.** Fotografía de un gel de agarosa al 3% en TAE teñido con bromuro de etidio, donde se observa el producto de la RT-PCR en punto final para los genes  $\beta$ -actina y gen M del virus de influenza aviar a partir del RNA extraído de hígado de embrión de pato y líquido alantoideo, usando el kit SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq ADN Polymerase Invitrogen.

**Figura 3.** Fotografía de un gel de agarosa al 3% con formaldehído teñido con bromuro de etidio, donde se observa el producto de transcripción *in vitro* purificado y desnaturalizado para los genes  $\beta$ -actina y gen M del virus de influenza aviar a partir de la RT-PCR de los genes completos usando el kit ribomax™ large scale ARN production systems-Sp6 and T7, Promega.

**Figura 4.** Fotografía de un gel de agarosa al 3% en TAE teñido con bromuro de etidio, donde se observa el producto de la RT-PCR anidada para los genes  $\beta$ -actina y gen M del virus de influenza aviar usando el kit SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq ADN Polymerase Invitrogen, teniendo como molde inicial el RNA transcrito *in vitro*.

**Figura 5.** Resultados de la curva de calibración por RRT-PCR a partir ADNc del ARN generado por transcripción *in vitro* para el gen M del virus de influenza aviar tipo A subtipo H5N2, utilizando el kit Express Two-Step SuperScrip qRT-PCR Universal, Invitrogen.

**Figura 6.** Pendiente originada a partir de las curvas de calibración del gen M del virus de influenza aviar H5N2.

**Figura 7.** Resultados de la curva de calibración por RRT-PCR a partir ADNc del ARN generado por transcripción *in vitro* para el gen  $\beta$ -actina de pato, utilizando el kit Express Two-Step SuperScrip qRT-PCR Universal, Invitrogen.

**Figura 8.** Pendiente originada a partir de las curvas de calibración del gen  $\beta$ -actina.

**Figura 9.** Gráfica de cinética de excreción detectada por RRT-PCR en vía cloacal de patos de 3 semanas de edad. Los resultados se encuentran en unidades de ng/ $\mu$ l y corresponde al promedio de la concentración dada por el software versión 1.7 del rotor Gene.

**Figura 10.** Grafica de cinética de excreción obtenida por RRT-PCR en vía laríngea de patos de 3 semanas de edad. Los resultados se encuentran en unidades de ng/μl y corresponde al promedio de la concentración dada por el software versión 1.7 del rotor Gene.

**Figura 11.** Grafica de cinética de excreción obtenida por RRT-PCR en vía cloacal de pollos de 3 semanas de edad. Los resultados se encuentran en unidades de ng/μl y corresponde al promedio de la concentración dada por el software versión 1.7 del rotor Gene.

**Figura 12.** Grafica de cinética de excreción obtenida por RRT-PCR en vía laríngea de pollos de 3 semanas de edad. Los resultados se encuentran en unidades de ng/μl y corresponde al promedio de la concentración dada por el software versión 1.7 del rotor Gene.

**Figura 13.** Media geométrica de título de anticuerpos inducidos utilizando la técnica de inhibición de la hemaglutinación de patos y pollos de 3 semanas de edad inoculados con el virus de influenza aviar H5N2 BP aislado en el 2007.

**Figura 14.** Gráficas de amplificación con curva estándar para cuantificación de ARN viral de muestras de cloaca y faringe de patos y pollos inoculados con virus de influenza aviar H5N2 BP.

# 1.- Introducción

## 1.1 Generalidades

Existen más de doscientos virus distribuidos en veinte familias que causan enfermedades en las ocho principales especies domésticas, incluyendo las aves. Este número puede exceder de mil cuando consideramos otras especies (pavos, patos, animales de laboratorio y especies silvestres) y los diferentes tipos antigénicos (Bergman, 1999).

Un agente de importancia en medicina veterinaria es el virus de influenza tipo A, el cual está clasificado dentro de la familia *Orthomixoviridae*, junto con los tipos B y C. El virus de influenza tipo A ha sido aislado de muchas especies, incluyendo humanos, cerdos, caballos, visones, felinos, mamíferos marinos y un amplio número de gallináceas (Olsen, 2006). En éstas últimas, causa diversos cuadros clínicos que van desde una enfermedad subclínica, hasta una enfermedad respiratoria superior leve con disminución en los parámetros productivos; o bien, puede presentarse como una enfermedad generalizada, aguda y mortal, traducida en un impacto económico negativo de las producciones avícolas (Swayne, 1997).

Los virus de influenza aviar son clasificados con base a dos proteínas expresadas sobre la superficie de las partículas virales, se trata de las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). En las aves silvestres y pollos de todo el mundo, ha sido detectado subtipos antigénicos representados por dieciséis HA y nueve NA (Pillai, 2008). Debido a que el virus se puede recombinar, es posible que existan hasta 144 subtipos, con 2 patotipos, alta y baja patogenicidad, basado en la letalidad experimental en las aves domésticas o por la secuencia de nucleótidos que codifican el gen de la HA en el sitio de corte. En los aislamientos de alta patogenicidad se han detectado múltiples aminoácidos básicos contenidos en el sitio de corte proteolítico de la HA (Van Der Goot, 2003). Los virus de influenza con subtipos H5 y H7, pueden convertirse a altamente patógenos después de la introducción a las aves domésticas, causando un brote de influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP) [Okamatsu, 2007].

## 1.2 Características del virus de influenza A

En el aislamiento inicial los virus de influenza tipo A son partículas pleomórficas pequeñas (20-120 nm de diámetro) y más tarde son esféricas de simetría helicoidal. Poseen una envoltura lipídica de dos capas derivadas de la célula infectada. Su genoma consiste en ocho segmentos negativos de ácido ribonucleico (ARN), los cuales codifican para diez proteínas: las polimerasas PB1, PB2 y PA, así como las proteínas HA, NP, NA, M1, M2, NS1 y NS2 (Field, 1991).

Los tres primeros segmentos genómicos del virus de influenza codifican al complejo de polimerasas para la transcripción y replicación. La polimerasa PB2 es codificada por el segmento 1 y posee actividad endonucleasa al usar el ARNm del hospedero para generar el iniciador con cap para la síntesis de los ARNm virales. La polimerasa PB1 es codificada por el segmento 2 y funciona como una ARN polimerasa, responsable de la elongación del ARN mensajero viral. La polimerasa PA es codificada por el segmento 3 y es conocida por su papel en la replicación y por su actividad helicasa. (Cheung *et al* 2007)

La hemoaglutinina (HA) codificada en el segmento 4, es una proteína integrada a la envoltura, es el principal antígeno de la superficie del virión al cual se unen anticuerpos neutralizantes. La HA es responsable de la unión de los viriones al receptor celular de superficie que contiene ácido siálico. (Van Regenmortel, *et al* 2005)

La nucleoproteína (NP) se codifica en el segmento 5. Esta proteína es transportada al núcleo de las células infectadas para proteger al ARN viral. (Cheung *et al* 2007)

La neuraminidasa (NA), se codifica en el segmento 6 del ARN viral, es también una glicoproteína integrada a la envoltura y corresponde al segundo antígeno mayor de la superficie del virión. Su función es la de liberar las partículas virales de los receptores celulares del hospedero, permitiendo que la progenie viral escape de la célula que los originó y en consecuencia facilitar la diseminación del virus. (Van Regenmortel, *et al* 2005)

El segmento 7 codifica para las proteínas de matriz M1 y M2. La proteína M1 es un producto transcripcional primario al segmento 7. En contraste, la proteína M2 es codificada por edición del ARNm del segmento 7. La proteína M1 une al ARN de forma inespecífica, inhibiendo la transcripción viral, regulando el transporte nuclear de la ribonucleoproteína, además de su tener efectos sobre el ensamble viral, maduración y morfología viral. La proteína M2 posee actividad de canal de iones para la regulación del pH. En el endosoma de células infectadas, la actividad del canal de iones de M2 permite la acidificación del interior al momento de la entrada de la partícula viral. Esta acidificación se cree que es necesaria para la replicación viral debido a que permite la entrada de la ribonucleoproteína viral. También se ha reportado que la actividad canal de M2 mantiene un pH alto en las vesículas de Golgi para estabilizar la conformación nativa de las HA sintetizadas durante el transporte intracelular para el ensamble viral. (Cheung *et al* 2007)

Las proteínas NS1 y NS2 son codificadas en el segmento 8 del virus. La proteína NS1 es un producto transcripcional primario al segmento 8. En contraste, la proteína NS2 es codificada por edición del ARNm del segmento 8. NS1 es una proteína no estructural con gran acumulación en el núcleo. Participa en la regulación de la expresión de proteínas celulares y virales por unión a diferentes moléculas de ARN. En un estudio *in vitro*, NS1 ha demostrado unirse a un amplio rango de moléculas de ARN, inhibe los

efectos de edición, la exportación nuclear de los ARNm de la célula y la poliadenilación de los ARNm por interacción con la maquinaria de procesamiento celular 3'. NS2 juega un papel promoviendo la replicación del genoma ARN por un mecanismo desconocido. Estudios subsecuentes han confirmado que esta proteína es esencial para la exportación nuclear de la ribonucleoproteína viral. (Cheung *et al* 2007)

### 1.3 Ciclo viral

El proceso de replicación del virus de IA requiere múltiples pasos. El primer paso involucra la unión de la HA al ácido siálico ( $\alpha$ -2,3-galactosa) ubicado sobre la superficie de células específicas. El virus ingresa como endosoma una vez que la fusión dependiente de pH ácido aparece entre el virus y la membrana. El proceso de endocitosis introduce al virus a la célula con su envoltura protectora, por lo que es necesario un mecanismo para exteriorizar el genoma del endosoma. La infectividad depende de la división de la HA del virión debido a la presencia de proteasas celulares, así mismo, esta fusión depende del número de aminoácidos básicos en el sitio de división, para producir una molécula de HA<sub>2</sub>. Las membranas plasmáticas de las células contienen canales, los cuales transportan protones fuera de la célula. Sin embargo, cuando el endosoma es formado, la membrana es invertida, de forma que los protones son bombeados al interior del endosoma. Esto ocasiona que el ambiente al interior del endosoma comience progresivamente a cambiar a ácido, y cuando el pH interno del endosoma es aproximadamente de 5.0, sucede un cambio conformacional en la hemoaglutinina presente, lo cual permite su fusión con el endosoma, liberando el genoma viral en el citoplasma. Una vez liberado al interior del citoplasma, los segmentos de ARN rápidamente entran al núcleo de la célula, siendo dirigidas por señales de localización nuclear presentes sobre las proteínas virales que se mantienen unidos a los segmentos de ARN. Es en el núcleo de la célula infectada donde la replicación del genoma viral se lleva a cabo. La polimerasa viral se activa y genera los ARNm virales. Para comenzar la síntesis de los ARNm la proteína viral PB2 corta el extremo 5' terminal de una molécula de ARNm celular presente en el núcleo de la célula y la ARN polimerasa PB1 usa ese fragmento de ARN para comenzar la síntesis de los ARNm virales. El cap de 10-13 nucleótidos de longitud cortado no únicamente provee un cap hecho y listo, sino que también ayuda para la producción de proteínas virales, por esta razón, las células infectadas mueren tan pronto suceda la liberación de virus, razón por la cual este tipo de virus se le denomina virus citolíticos. Los RNAm virales son poliadenilados en el extremo 3'. Algunos de los ARNm son traducidos en el citoplasma para hacer nuevas moléculas polimerasas virales, las cuales entran al núcleo y producen copias complementarias de los ARNs virales originales. Esta cadena positiva de ARN complementario (ARNc) es amplificada muchas veces por la polimerasa viral para hacer una cadena negativa que formará el genoma de los virus liberados. Estos nuevos segmentos de ARN viral son cubiertos con la nucleoproteína viral producida fuera del núcleo y adosados en el interior de la superficie de la membrana plasmática. Así, el complejo ARN se une a la superficie de la célula,

levantando un surco en la membrana celular, la cual forma una envoltura viral. Antes de unirse, varias proteínas virales sintetizadas en el citoplasma son insertadas en la membrana de la célula, así la envoltura viral contiene las proteínas virales además de los componentes normales de la membrana celular. Cuando los virus de influenza están listos para salir tienen que liberarse para infectar otras células. La célula infectada tiene receptores sobre su superficie que contienen moléculas de ácido siálico a la cual está unida la proteína HA del receptor viral, así el virus produce una proteína que es insertada al interior de la membrana celular, la neuraminidasa (NA), que funciona como enzima de corte del residuo de ácido siálico de la superficie de la célula infectada para liberar el virus (Van Regenmortel, *et al*, 2005).

#### **1.4 Ecología del virus de influenza en las aves acuáticas**

El virus de Influenza aviar de baja patogenicidad (IABP) ha sido aislado de al menos 195 especies de aves silvestres de 26 familias diferentes. Las aves acuáticas silvestres del orden Anseriformes (patos, gansos y cisnes) y caradriformes (gaviotas, golondrinas de mar y aves zancudas), se consideran el reservorio natural del virus de influenza tipo A, los cuales contribuyen en la propagación y ecología del virus. Este reservorio funciona como fuente primaria para la introducción de virus de influenza a las aves domésticas. La infección en anseriformes es normalmente asintomática, caracterizada por una replicación preferencial en el tracto intestinal con la subsecuente eliminación del virus a altas concentraciones a través de las heces. La transmisión en las poblaciones de aves acuáticas ocurre por la vía indirecta oral-fecal a través del agua contaminada con el virus (Sturm, 2005).

Dicha transmisión sucede a través de las migraciones estacionales. Muchos anseriformes y caradriformes son conocidos por llevar a cabo migraciones de larga distancia, y potencialmente distribuyen el virus de IABP entre ciudades vecinas. Las migraciones conectan muchas poblaciones de aves en tiempo y espacio, dando como resultado, que las aves infectadas del virus puedan transmitir sus patógenos a otras poblaciones que subsecuentemente pueden llevar el virus a nuevas áreas. La transmisión de virus y su diseminación geográfica es dependiente de la ecología de los hospederos migrantes. Algunas especies realizan descansos durante su migración y se congregan en sitios definidos, resultando en una alta densidad local y en sitios de importancia para la transmisión de virus de IABP entre aves silvestres y cautivas, así como entre las diferentes especies. *Anas platyrhynchos*, en un estudio extensivo de especies, ha sido encontrado el que más frecuentemente está infectado con virus de influenza aviar que otras especies. Diferencias en la prevalencia de virus entre especies de patos, son probablemente relacionados en parte con el ambiente, tal como la convivencia primaria de alimentación entre patos en la superficie del agua y el buceo. Este ambiente puede proveer una oportunidad al virus de influenza para ser transmitido entre las diferentes subpoblaciones de hospederos. La infección por virus de IABP, generalmente no causa signos clínicos mayores en los patos, y la infección

experimental indica que los animales únicamente estimulan una respuesta inmune humoral baja y transitoria, lo cual puede ser suficiente para proveer protección parcial contra una reinfección con virus de algún subtipo pero es poco probable que confiera protección contra subsecuentes infecciones heterólogas. La gran diversidad de subtipos virales de influenza, puede también resultar en la formación de mezclas genéticas durante coinfecciones (Olsen, 2006).

Webster *et al.*, (1978) manifestó que los virus de influenza replican preferencialmente en tracto gastrointestinal de patos silvestres y son excretados en altos niveles en la heces y transmitidos hacia las aves susceptibles a través de la vía oro-fecal.

Sturm-Ramirez, K, *et al* (2005), demostró que el virus H5N1 se replica y transmite eficientemente en patos. Adicionalmente, el virus mencionado exhibió diferentes grados de patogenicidad que se manifiestan desde la completa ausencia de enfermedad clínica hasta disfunción neurológica severa y muerte.

## 1.6 JUSTIFICACIÓN

En México está presente el subtipo H5N2 de baja patogenicidad en pollos, gallinas y gallos desde hace más de 10 años, pero se desconoce la participación de los patos como reservorios en la propagación del virus en campo. Además el subtipo H5 es causa de enfermedad y muerte en varias especies de aves silvestres. Debido a ello, se pretende estudiar el papel biológico del pato (*Anas platyrhynchos domesticus*) con un virus H5N2 para determinar su capacidad de replicación, excreción y sus consecuencias en la transmisión del virus a las especies domesticas. Dicha especie es el modelo más accesible y cercano a una especie silvestre para llevar a cabo un estudio de cinética de excreción bajo condiciones controladas.

## 2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

El pato Pekín (*Anas platyrhynchos domesticus*) es un reservorio para la cepa mexicana del virus de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad debido a que puede infectarse y eliminar virus sin producir enfermedad.

### 2.2 Objetivo general

Evaluar la cinética de excreción del virus de influenza aviar de baja patogenicidad H5N2 en las secreciones de laringe y cloaca a través de RT-PCR en tiempo real utilizando como modelo biológico al pato doméstico (*Anas platyrhynchos domesticus*).

### 2.3 Objetivos específicos

- 2.3.1 Diseñar y validar por RT-PCR en punto final los iniciadores necesarios en la transcripción *in vitro* de los genes completos de  $\beta$ -actina y M del virus de influenza aviar.
- 2.3.2 Realizar la síntesis *in vitro* los ARN mensajeros completos del gen  $\beta$ -actina y M del virus de influenza aviar utilizando el promotor de la polimerasa T7.
- 2.3.3 Diseñar y validar por RT-PCR en punto final los iniciadores de las secuencias parciales de los genes  $\beta$ -actina y M del virus de influenza aviar necesarios para la RT-PCR en tiempo real (RRT-PCR).
- 2.3.4 Establecer las condiciones de estandarización para la RRT-PCR de los genes  $\beta$ -actina y M del virus de influenza aviar a partir de la cadena molde originada en la síntesis *in vitro* utilizando un sistema de detección secuencia específica de sonda Taqman.
- 2.3.5 Inocular un grupo de patos y pollos de 3 semanas de edad con una cepa de virus de IABP subtipo H5N2 a dosis de  $10^7$  DIEP 50%, colectando hisopos laríngeos y cloacales durante a las 12, 24, 48, 72 horas; 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> semana postinoculación.
- 2.3.6 Evaluar presencia de signos clínicos *in vivo* en patos y pollos inoculados con el virus de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad.
- 2.3.7 Realizar la cuantificación absoluta por RRT-PCR a partir de hisopos cloacales y laríngeos.

- 2.3.8 Determinar el título viral por aislamiento viral *in ovo* a partir de hisopos cloacales y laríngeos.
- 2.3.9 Medir la producción de anticuerpos en suero por técnica de inhibición de la hemoaglutinación antes de la inoculación y después de la inoculación cada semana.

### **3. Material y metodología de la investigación**

#### **3.1 Primera etapa**

##### **3.1.1 Virus IABP H5N2**

El agente utilizado en este estudio corresponde al virus de influenza aviar tipo A. Como antecedente de la cepa solo se sabe que es un virus de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad aislado de aves domesticas en el año 2007 en México. La muestra original de virus de IABP procedente de liquido alantoideo de embrión de pollo infectado fue centrifugada a 200 x g por 10 minutos y filtrada con membrana de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ . Finalmente se distribuyo en alícuotas de 1 ml y fue conservada a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

##### **3.1.2 Diseño de iniciadores**

La síntesis *in vitro* es una reacción de transcripción de ARNm la cual tiene como objetivo generar material lo suficientemente puro y concentrado para ser usado como molde en las curvas de calibración de las reacciones de la reacción en cadena de la polimerasa-transcripción reversa en tiempo real RRT-PCR (por sus siglas en inglés RRT-PCR, real time reverse transcription polymerase chain reaction). El material generado por transcripción *in vitro* es un ARNm listo para usarse en sistemas de RRT-PCR en un solo paso, junto con el ARNm de las muestras problema, razón por la cual se decidió trabajar con esta metodología. Existen otros sistemas para obtener el ARN molde para curvas de calibración de las reacciones RRT-PCR, sin embargo la metodología con síntesis *in vitro* provee en nuestro caso el suficiente material para llevar a cabo la cuantificación de las muestras problema, siendo además, un método más rápido y práctico con la misma calidad y concentración suficiente.

La síntesis *in vitro* se diseñó tomando en cuenta el gen completo tanto de  $\beta$ -actina como M del virus de influenza aviar, esto permite simular un material idéntico al encontrado en las muestras problema que facilita programar las mismas condiciones de ciclado. Además, la secuencia completa facilita el diseño de iniciadores para las secuencias parciales seleccionadas para diagnostico y cuantificación.

Para alcanzar el objetivo de la síntesis *in vitro* de ARNm completos del gen  $\beta$ -actina y M del virus de influenza aviar para la curva de calibración en la RRT-PCR cuantitativa, se procedió al diseño de un grupo de iniciadores para cada gen, tomando en cuenta las características ideales conocidas para su diseño, tales como una longitud del iniciador de 18-30 bases,  $T_m$  de 55-60  $^{\circ}\text{C}$  con variaciones entre 2-3  $^{\circ}\text{C}$  entre iniciadores, tamaño del amplicón de 100 a 600 pb, evitar la formación estructuras secundarias como

heterodímeros, dímeros y asas de doble cadena, evitar repeticiones simples, repeticiones invertidas o más de 4 nucleótidos idénticos consecutivos, incluir "GC clamp" en el extremo 3', amplificación de objetivos con alto contenido de GC, así como revisar homologías cruzadas con un alineamiento basado en método de palabras BLAST-Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx>).

Los genes a utilizar en el presente trabajo fueron seleccionados con base en las siguientes características. Para el gen constitutivo se revisaron los testigos endógenos de amplificación utilizados para diagnóstico del virus de influenza aviar en aves. El artículo que proporcionó esta información fue del autor Van Borm, *et al* 2007, donde establece al gen  $\beta$ -actina como el mejor gen constitutivo a considerar en muestras tomadas con hisopos cloacales y laríngeos. Para el caso del virus de influenza aviar H5N2 se tomó al gen M como secuencia blanco debido a que es un gen conservado y con menos variación de su secuencia dentro del grupo de genes que conforman al virus de influenza, además corresponde al gen con mayor uso para diagnóstico por RRT-PCR.

El diseño de iniciadores se realizó tomando como referencia una secuencia consenso del GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para cada gen y posteriormente esta secuencia fue alineada usando el software WorkBench (<http://workbench.sdsc.edu/>) con un grupo de secuencias seleccionadas publicadas en el GeneBank con la finalidad de asegurar la especificidad de los iniciadores con su gen blanco. Para el gen constitutivo  $\beta$ -actina el número de acceso de la secuencia consenso fue EF667345, correspondiente al pato mallard (*Anas platyrhynchos*), mientras que las secuencias utilizadas para el alineamiento fueron los números de acceso NM\_205518 y M26111 correspondiente al gen  $\beta$ -actina de gallo y ganso respectivamente. Para el gen M del virus de influenza aviar H5N2 el número de acceso de la secuencia consenso fue ABI85129 correspondiente al virus H5N2 de baja patogenicidad aislado en Querétaro en 1995, esta secuencia eligió como consenso debido a que es una secuencia completa, el código se encuentra en ARN complementario (ARNc) y es de donde se sospecha que produce el aislamiento de la cepa del 2007 utilizada en este estudio. El alineamiento de las secuencias para el gen M incluyó todas las cepas mexicanas H5N2 publicadas en el GeneBank y también se consideraron virus H5N2 de origen americano y canadiense debido a que corresponden a países vecinos con los cuales podríamos estar intercambiando cepas virales de influenza. Las cepas mexicanas publicadas en el GeneBank fueron aisladas en pollos y poseen los siguientes números de acceso y origen: FJ610082 (Chiapas), FJ610088 (Hidalgo), FJ610116 (Querétaro) y FJ610109 (Jalisco). Las secuencias americanas y canadiense utilizadas para el alineamiento fueron los números de acceso: ACF22665, AX47287, AP57576, AAP57584, AAP57575, ACG59863, AC248009, ACX5577, ABB87043, ABB87043, ABB19897, ABI53532, ACF33663. Estas secuencias corresponden a cepas aisladas de patos, pollos, gaviota y aves de playa respectivamente.

Los iniciadores diseñados para la síntesis *in vitro* de los genes  $\beta$ -actina y gen M del virus de influenza aviar se resumen en el cuadro 1.

**Cuadro 1. Características de los iniciadores diseñados para síntesis *in vitro* de los genes  $\beta$ -actina y gen M de Influenza aviar.**

	<b><math>\beta</math>-Actina</b>	<b>Gen M IA</b>
Secuencia sentido	5' ATGGATGATGATATTGCTG 3'	5' GATGAGTCTTCTAACCGAG 3'
Secuencia antisentido	5' GTTTAGAAGCATTGCG 3'	5' TTA CTCCAGCTCTATGTTG 3'
Longitud sentido	19	19
Longitud antisentido	17	19
Tm sentido	51.5°C	49.5°C
Tm antisentido	50.1°C	48.6°C
Contenido de GC sentido	37%	53%
Contenido de GC antisentido	40%	50.9%
tamaño del amplicón generado	1129 pb	983 pb
Ubicación sentido	39 a 57	25 a 44
Ubicación antisentido	1375 a 1392	988 a 1007

Una vez diseñados los iniciadores sentido y antisentido de cada gen completo, se anexó solo al oligonucleótido sentido una secuencia adicional correspondiente a la secuencia promotora, la cual, es reconocida por la enzima de polimerasa T7 para la transcripción del ARNm.

El oligonucleótido conformado con la secuencia promotora para la ARN polimerasa T7 (bases subrayadas) y el iniciador sentido del gen M y  $\beta$ -actina (bases en negritas) fue el siguiente:

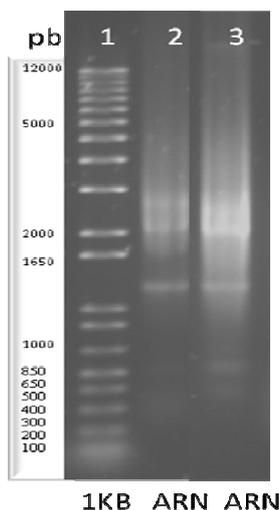
**$\beta$ -ACTINA:** CAATAATACGACTCACTATAGGG**GATGGATGATGATATTGCTG**

**GENE M:** CAATAATACGACTCACTATAGGG**ATGAGTCTTCTAACCGAG**

### 3.1.3 Síntesis *in vitro* de los ARNm de los genes $\beta$ -actina y M de IABP

Para realizar la síntesis *in vitro* se procedió a la obtención de ARNm utilizando el sistema RNeasy mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) de muestras de hígado y corazón de embrión de pato, así como el sistema de extracción de ARN viral High Pure Viral Nucleic Acid Kit (ROCHE, Philadelphia, PA, USA.) con alícuotas de líquido alantoideo con virus IABP.

La extracción del ARN se puede apreciar en la Figura 1. El ARN extraído de hígado de pato y líquido alantoideo de embrión de pollo inoculado con IABP H5N2 fue visto en un gel de agarosa al 3%. El gel muestra un barrido de ARN de buena calidad, sin contaminación, siendo el ARN de líquido alantoideo el que se obtuvo en mayor cantidad. El ARN fue eluido en agua libre de ARNsas y ADNAs y fue alícuotado en 8 tubos de 10  $\mu$ l los cuales fueron conservados a -70°C.



**Figura 1. Extracción de ARN de hígado y líquido alantoideo de pato. La fotografía corresponde al gel de agarosa al 3% en buffer donde se observa el ARN de hígado de embrión de pato y líquido alantoideo de embrión de pato extraídos con los sistemas Rneasy de QIAGEN y ARN viral High Pure Viral Nucleic Acido Kit de ROCHE, respectivamente. El carril 1 muestra el Marcador 1 Kb (invitrogen USD, 8  $\mu$ l), el carril 2 el ARN de hígado (10  $\mu$ l), y el carril 3 el ARN de líquido alantoideo de embrión de pollo infectado con IABP H5N2. (10  $\mu$ l).**

Una vez realizada la extracción del ARN molde se realizó la RT-PCR en punto final para generar el producto del gen problema (M) y gen constitutivo ( $\beta$ -actina) completos. Para ello, el ARN obtenido fue sometido a RT-PCR mediante el kit de SuperScript™ One-Step RT-PCR System con Platinum® Taq ADN Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) utilizando los iniciadores diseñados con el promotor T7 a utilizarse con el kit RiboMAX™ Large Scale ARN Production Systems SP6 and T7 (Promega, Madison WI,

USA). Los componentes de la reacciones y las condiciones de ciclado se describen en los cuadros 2 y 3.

**Cuadro 2. Componentes de la reacción de RT-PCR para los genes  $\beta$ -actina y M.**

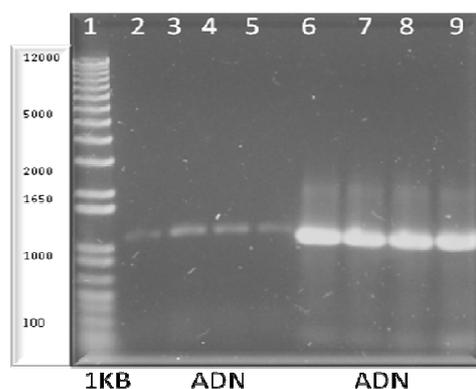
Mezcla reacción	Mezcla enzima
8 $\mu$ l agua milli Q	25 $\mu$ l Mezcla de rxn
6 $\mu$ l cadena molde de ARN	8 $\mu$ l MgSO <sub>4</sub> 5 mm
1 $\mu$ l Oligo 5' 10 $\mu$ m	1 $\mu$ l Mezcla de enzimas RT-Taq
1 $\mu$ l Oligo 3' 10 $\mu$ m	
Volumen final:	
16 $\mu$ l	34 $\mu$ l

**Cuadro 3. Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos utilizados en la RT-PCR para los genes  $\beta$ -actina y M.**

Gen	Etapa	Ciclo	Temperatura y tiempo	Número de ciclos	
$\beta$ -actina	RT	Linearización	94°C/2 min.	1	
		Transcripción	45°C/30 min.		
		Inactivación de RT	94°C/2 min.		
	PCR	Desnaturalización inicial	94°C/2 min.		1
		Desnaturalización	94°C/15 seg.		40
Hibridación		42°C/30 seg.			
Elongación		72°C/1min:15 seg.			
Elongación final		72°C/7 min.	1		
M	RT	Linearización	94°C/2 min.	1	
		Transcripción	45°C/30 min.		
		Inactivación de RT	94°C/2 min.		
	PCR	Desnaturalización inicial	94°C/2 min.	1	
		Desnaturalización	94°C/15 seg.	40	
		Hibridación	42°C/30 seg.		
		Elongación	72°C/1min.		
		Elongación final	72°C/7 min.	1	

La figura 2 muestra los DNAs correspondientes a los genes de  $\beta$ -actina y gen M los cuales fueron amplificados para alcanzar una concentración requerida de 1  $\mu$ g total de ADN molde para síntesis *in vitro* de ARN. Para lograr la concentración mencionada se realizaron 5 reacciones de RT-PCR de cada gen. De las reacciones obtenidas, las del gen M fueron las más robustas a comparación de las reacciones de  $\beta$ -actina. Debido a ello, se realizó un ensayo de otras 5 reacciones para  $\beta$ -actina. Los productos generados de las PCR de ambos genes fueron purificados con el sistema Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System (PROMEGA, Madison WI, USA) siguiendo las indicaciones del

fabricante ajustando la concentración a 1 µg de cadena molde de ADN para la síntesis *in vitro* de ARN. La cuantificación del ADN se realizó con espectrofotómetro Nanodrop ND-1000.



**Figura 2. Producción de cDNAs de los genes  $\beta$ -actina y M.** La fotografía corresponde al gel de agarosa al 3% en buffer teñido con bromuro de etidio, donde se observa el producto purificado de la RT-PCR en punto final para los genes  $\beta$ -actina y gen M IABP H5N2 a partir del ARN extraído de hígado de embrión de pato y líquido alantoideo, usando el kit SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq ADN Polymerase Invitrogen. El carril 1 muestra el marcador 1 Kb (Invitrogen USD, 8 µl), los carriles 2-5 corresponden al producto amplificado de 1129 pb de  $\beta$ -actina, 5 µl; los carriles 6-9 corresponden al producto amplificado 983 pb del gen M de influenza aviar, 5 µl.

Una vez obtenido el molde en concentración suficiente para ambos genes el paso siguiente fue la síntesis *in vitro* con la ARN polimerasa T7 siguiendo el protocolo establecido por el fabricante, el cual puede verse en el apéndice 7.4. La síntesis *in vitro* de los ARNm se realizó con los componentes y condiciones descritas en el cuadro 4 y 5.

**Cuadro 4. Componentes de la reacción de transcripción *in vitro* para los genes  $\beta$ -actina y M.**

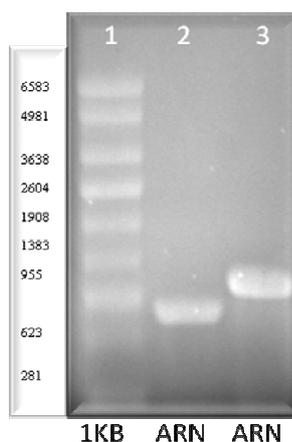
Componentes de la reacción	Reacción de muestra	Reacción testigo
Buffer 5X de transcripción T7	20 µl	4 µl
rNTP's ( 25 mM ATP, CTP, GTP, UTP)	30µl	6 µl
Molde de ADN (5-10 µg total)	40 µl	1 µl (testigo ADN)
Agua libre de nucleasas	-	7 µl
RNA polimerasa T7	10 µl	2 µl
Volumen final	100 µl	20 µl

**Cuadro 5. Condiciones de temperatura y tiempo utilizados en la transcripción *in vitro* para los genes  $\beta$ -actina y M**

Reacción	Temperatura incubación	Tiempo
Transcripción	37°C	4 horas
Tratamiento ADNsa	37 °C	15 minutos
Reacción de paro	65 °C	10 minutos

Al finalizar la síntesis *in vitro* el ARN obtenido fue purificado con sistema Rneasy mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), el protocolo de purificación puede verse en el apéndice 7.5.

El producto de la transcripción *in vitro* puede verse en la Figura 3, donde se aprecia una integridad en la síntesis de ARN para ambos genes. El ARN generado fue evaluado mediante un gel desnaturante cargado con ARN desnaturado en un buffer formaldehído/formamida (3/10), posteriormente fue cuantificado por espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 y finalmente se utilizó como molde para reacciones de RT-PCR en punto final antes de comenzar las reacciones de tiempo real. La cuantificación con espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 determinó una concentración de 839.38 ng/ $\mu$ l de ARN de  $\beta$ -actina sintetizado *in vitro*, mientras que para el gen M de influenza aviar se detectaron 2,416.32 ng/ $\mu$ l de ARN de síntesis *in vitro*.



**Figura 3. Producción del ARNm del gen M y de  $\beta$ -actina por transcripción *in vitro*. La fotografía corresponde al gel de agarosa al 3% con formaldehído teñido con bromuro de etidio, donde se observa el producto de transcripción *in vitro* purificado y desnaturado para los genes  $\beta$ -actina y M del virus de influenza aviar a partir de la RT-PCR de los genes completos usando el kit ribomax™ large scale ARN production systems-Sp6 and T7, Promega. El carril 1 muestra el marcador de ARN (Promega G319A) 3  $\mu$ l; en el carril 2 se observa el ARNm del gen M de influenza aviar de 983 pb, 2  $\mu$ l; el carril 3 se observa el ARN del gen  $\beta$ -actina de 1129 pb, 2  $\mu$ l.**

Para la evaluación de ARN generado con técnica de RT-PCR en punto final se utilizaron los oligos diseñados para las secuencias parciales utilizando las condiciones descritas en el cuadro 6 y 7.

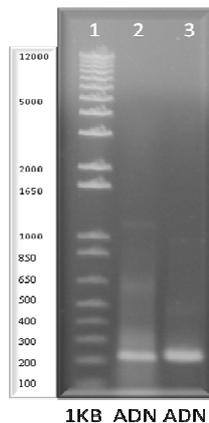
**Cuadro 6. Componentes de la reacción de RT-PCR en punto final a partir de la síntesis *in vitro* de los genes  $\beta$ -actina y M.**

Mezcla reacción	Mezcla enzima
13 $\mu$ l Agua milli Q	25 $\mu$ l de Mezcla de rxn
1 $\mu$ l Cadena molde de arn	8 $\mu$ l MgSO <sub>4</sub> 5 mm
1 $\mu$ l Oligo 5' 10 $\mu$ m	1 $\mu$ l Mezcla de enzimas RT-Taq
1 $\mu$ l Oligo 3' 10 $\mu$ m	
Volumen final:	
16 $\mu$ l	34 $\mu$ l

**Cuadro 7. Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos utilizados en la RT-PCR de punto final para la síntesis *in vitro* de los genes  $\beta$ -actina y M.**

Gen	Etapa	Ciclo	Temperatura y tiempo	Número de ciclos
$\beta$ -actina	RT	Linearización	94°C/2 min.	1
		Transcripción	45°C/30 min.	
		Inactivación de RT	94°C/2 min.	
	PCR	Desnaturalización inicial	94°C/2 min.	1
		Desnaturalización	94°C/15 seg.	40
		Hibridación	50°C/30 seg.	
		Elongación	72°C/15 seg.	
M	RT	Linearización	94°C/2 min.	1
		Transcripción	45°C/30 min.	
		Inactivación de RT	94°C/2 min.	
	PCR	Desnaturalización inicial	94°C/2 min.	1
		Desnaturalización	94°C/15 seg.	40
		Hibridación	57°C/45 seg.	
		Elongación	72°C/30 seg.	

La amplificación de estos productos puede observarse en la figura 4. Los amplicones generados demuestran la especificidad de los iniciadores diseñados hacia la cadena molde, y también demuestra la capacidad del ARN generado por transcripción *in vitro* para usarse como molde en las curvas de calibración para la cuantificación absoluta de las muestras problema.



**Figura 4. Amplificación de los fragmentos de los genes  $\beta$ -actina y M de IABP con iniciadores diseñados para la RRT-PCR. La fotografía corresponde a un gel de agarosa al 3% en buffer teñido con bromuro de etidio, donde se observa el producto de la RT-PCR anidada para los genes  $\beta$ -actina y gen M del virus de influenza aviar usando el kit SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq ADN Polymerase Invitrogen, teniendo como molde inicial el ARN transcrito *in vitro*. El carril 1 muestra el Marcador 1 Kb (Invitrogen USD, 5  $\mu$ l), el carril 2 corresponde al producto amplificado de 116 pb de  $\beta$ -actina, 10  $\mu$ l; el carril 3 corresponde al producto amplificado de 157 pb del gen M de influenza aviar, 10  $\mu$ l.**

Finalmente el ARN sintetizado fue almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  en viales en un volumen final de 20  $\mu$ l de agua destilada libre de ARNsas.

La extracción del ARNm a partir de hígado de embrión de pato y líquido alantoideo de embrión de pollo infectado con IABP H5N2, así como la síntesis *in vitro* y la RT-PCR en punto final fueron realizados en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

### **3.1.4 Diseño y validación de sondas e iniciadores para RRT-PCR**

Para realizar la técnica de RRT-PCR se diseñó un segundo juego de iniciadores utilizando un fragmento consenso del gen M y del gen de  $\beta$ -actina validado para patos y otras aves domésticas. El juego de iniciadores correspondiente al gen M del virus de influenza aviar fue utilizado para el diagnóstico, mientras que el juego de iniciadores para el gen  $\beta$ -actina fue utilizado como testigo interno o constitutivo (housekeeping) para ser amplificado en el mismo tubo de reacción. El diseño de estos iniciadores se basó en las características mencionadas por la guía del proveedor específica del equipo de RRT-PCR a utilizar (Rotor Gene 6000), así como de la edición de algunos autores (Dieffenbach, 2003). Estas características contemplan:

- Longitud de 18-30 bases
- Tm en rango de 58-60°C
- Contenido de GC en rango de 40-60%
- Amplicón de 80-150 pb
- Evitar más de 4 nucleótidos repetidos
- Los 5 últimos nucleótidos del 3' no deben tener más de dos bases de G ó C
- Evitar estructuras secundarias de iniciadores
- Revisar homologías cruzadas con un alineamiento basado en método de palabras como BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Los iniciadores y las sondas fueron diseñados a partir de la secuencia consenso reportada en el GeneBank, con número de acceso EF667345 para el gen  $\beta$ -actina correspondiente a la especie *Anas platyrhynchos*, mientras que para el gen M fue FJ610116 correspondiente a virus de influenza A (A/chicken/Querétaro/14588-19/1995(H5N2)).

Los iniciadores para la RRT-PCR se diseñaron para amplificar una secuencia parcial o fragmento de menos de 150 pb del gen  $\beta$ -actina y gen M de IABP H5N2 en las muestras problemas. Tal diseño cumplió con las especificaciones ideales de un ensayo de RRT-PCR y fueron evaluados en primer instancia por una reacción de RT-PCR en punto final. Finalmente se diseñó una sonda secuencia específica de cada gen para utilizarse como sistema de detección en la RRT-PCR marcadas con dos diferentes fluoróforos para su detección en la misma reacción.

Los iniciadores diseñados para la RRT-PCR tuvieron las características descritas en el cuadro 8.

**CUADRO 8. Características de los iniciadores diseñados para RRT-PCR de los genes  $\beta$ -actina y gen M de Influenza aviar.**

	$\beta$ -Actina	Gen M IA
Secuencia sentido	5'CCTCATGAAGATCCTGACAGA3'	5'AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG3'
Secuencia antisentido	5'TCTCCTGCTCGAAATCCA3'	5'AGGATTGGTCTTGTCTTTAGCCAT3'
Longitud sentido	21	24
Longitud antisentido	18	24
Tm sentido	57.8 °C	62.3 °C
Tm antisentido	57.9°C	61.5°C
Contenido GC sentido	55.6%	59.6%

Contenido GC antisentido	52.6%	56.2%
Longitud de amplicón generado	116 pb	157 pb
Ubicación sentido	718 a 739	24 a 47
Ubicación antisentido	836 a 854	156 a 180

El sistema de detección empleado en la RRT-PCR cuantitativa fue mediante el sistema secuencia-específica de sondas de hibridación (TaqMan). Estas sondas son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador mientras ambas moléculas se encuentren espacialmente próximas. Sin embargo, durante la amplificación del ADN blanco, la enzima ADN polimerasa que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Debido a la separación del donador y receptor, la fluorescencia emitida por el donador puede ahora ser captada por el lector del equipo. Para el diseño de sonda se consideró:

- Longitud de 18 a 30 bases
- Contenido de GC entre 30 y 80%
- Tm alrededor de 8 a 10 °C, mayor que la Tm de los iniciadores,
- Seleccionar aquella secuencia con mayor número de Cs que de Gs,
- El extremo 5' debe estar lo más cerca posible a los iniciadores sin que sobrelape con los mismos
- Evitar complementaridad entre los iniciadores, nucleótidos que no hibriden con el objetivo así como repeticiones de 4 o más bases de guaninas
- No incluir un nucleótido guanina o citocina en el extremo 5'.

El diseño de las sondas para la RRT-PCR tuvo lugar dentro del amplicón diseñado anteriormente con las especificaciones para reacciones de RRT-PCR. Las características de esta química de detección basada en secuencia específica de sondas Taqman se encuentra descrita en el cuadro 9.

**CUADRO 9. Características de las sondas diseñados para RRT-PCR de los genes  $\beta$ -actina y gen M de Influenza aviar.**

	$\beta$ -Actina	Gen M IA
Secuencia	5'CGTGACATCAAGGAGAAGCTGTG3'	5' TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA3'
Longitud	23	20
Tm	57.9°C	63.9 °C
Número de Cs vs Gs	4:8	9:4
Contenido de GC	52.2%	65%
Marcaje 5' (reportero)	Cy5	6-FAM
Marcaje 3' (apagador)	3' Black Hole Quencher®-2	3' Black Hole Quencher®-1
Ubicación	793 a 816	74 a 94

Estos iniciadores y sondas fueron evaluados con el producto obtenido en la síntesis *in vitro* descrito en el punto anterior. El producto de los primers en PCR en punto final puede verse en la figura 4. Mientras que el producto del conjunto de primers y sondas puede verse a continuación en el punto de la estandarización.

Cada iniciador y sonda fue llevado a una concentración 10  $\mu$ M para su posterior uso.

### 3.1.5. Estandarización de RRT-PCR

Los objetivos que implicaron el uso de herramientas moleculares fueron realizados tuvo lugar en el laboratorio de ecomedicina del Departamento de Producción Animal Aves (DPAA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El kit utilizado para la estandarización en la técnica de RRT-PCR en dos pasos fue el Express Two-Step SuperScrip qRT-PCR Universal (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

La reacción de RT se llevo a cabo utilizando el sistema Super-script VILO ADNc síntesis Kit, (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Los componentes y condiciones de ciclado se describen en los cuadros 10 y 11.

**Cuadro 10. Componentes de la reacción de la RT de los genes  $\beta$ -actina y M para estandarización.**

Reactivo	Volumen
Mezcla de reacción VILO 5X	4 $\mu$ l
Mezcla de enzimas SuperScript 10X	2 $\mu$ l
Oligo 5' 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Oligo 3' 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l
ARN (hasta 2.5 $\mu$ g en 20 $\mu$ l de reacción)	X $\mu$ l
Agua tratada con DEPC	Para 20 $\mu$ l

**Cuadro 11. Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos utilizados en la RT de los genes  $\beta$ -actina y M.**

Etapa	Ciclo	Temperatura y tiempo	Número de ciclos
RT	Linearización	94°C/2 min.	1
	Transcripción	42°C/120 min.	
	Inactivación de RT	85°C/5 min.	1

Una vez realizada la reacción RT, se realizaron diluciones décuples del ADNc a partir de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$  con un intervalo de detección de seis a siete logaritmos, realizadas a partir de 1000 ng/microlitro de ARN de síntesis *in vitro* de ambos genes. Enseguida se procedió a la reacción de PCR en tiempo real, las proporciones de los reactivos y las condiciones de ciclado se describen el cuadro 12 y 13.

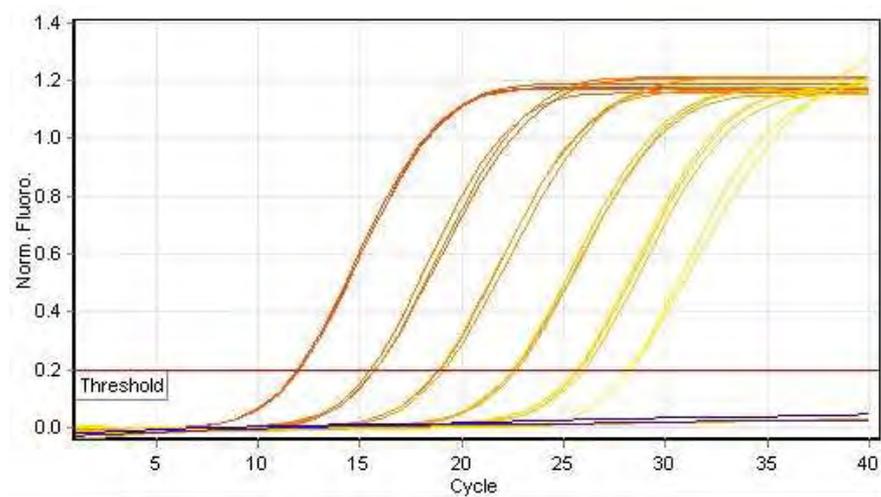
**Cuadro 12. Componentes de la reacción de qPCR a partir de ADNc de los genes  $\beta$ -actina y M.**

Reactivo	Volumen
Super Mezcla universal Express qPCR	10 $\mu$ l
Oligos 5' y 3' beta actina 10 $\mu$ M	2 $\mu$ l (1 $\mu$ l C/1)
Oligos 5' y 3' gen M 10 $\mu$ M	2 $\mu$ l (1 $\mu$ l C/1)
Sondas $\beta$ -actina y gen M 5 $\mu$ M	1 $\mu$ l c/1
ADNc	2 $\mu$ l
Agua tratada con DEPC	2 $\mu$ l
Volumen final	20 $\mu$ l rxn

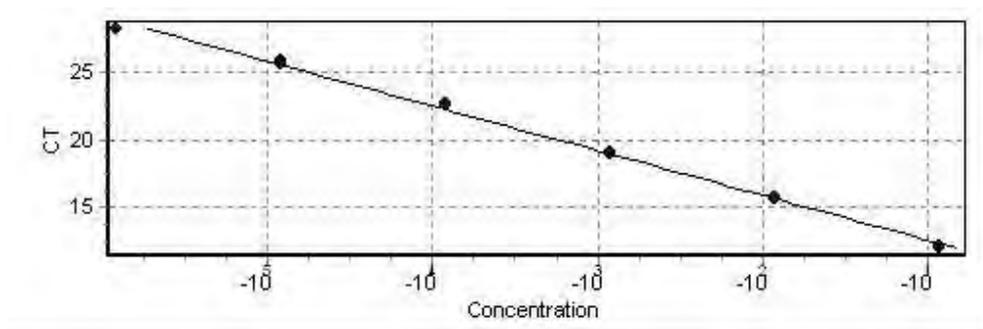
**Cuadro 13. Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos utilizados en la RRT-PCR de los genes  $\beta$ -actina y M.**

Etapa	Ciclo	Temperatura y tiempo	Número de ciclos
RT	UDG	50°C/2 min.	1
	Linearización	94°C/15 seg.	1
	Transcripción	45°C/30 min.	
PCR	Desnaturalización	94°C/15 seg.	40
	Hibridación	59°C/45 seg.	
	Elongación	72°C/30 seg.	
	Hibridación	57°C/45 seg.	

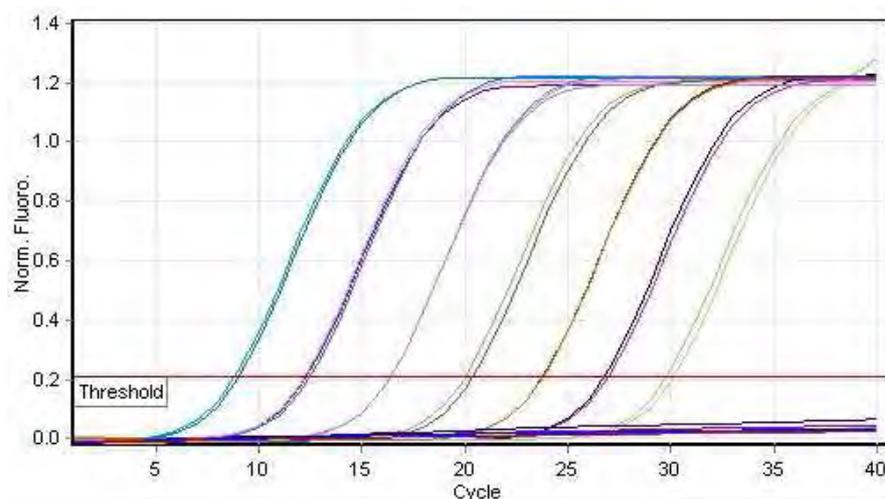
Las pendientes originadas a partir de las curvas de calibración pueden observarse en la Fig. 5, 6, 7 y 8. La eficiencia de la reacción calculada en 99% para el gen M y  $\beta$ -actina a partir de la pendiente de las curvas estándar fue aceptable para el ensayo de diagnóstico. Las curvas obtenidas presentan una eficiencia del 0.99 y un valor de pendiente de -3.2, lo cual garantiza una óptima eficiencia de reacción.



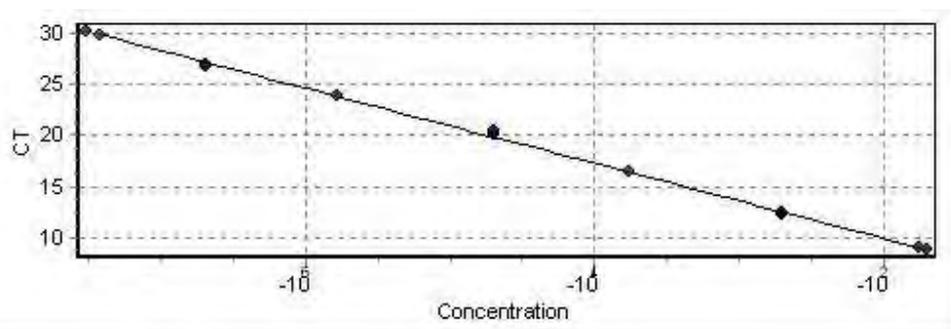
**Figura 5. Resultados de la curva de calibración por RRT-PCR a partir ADNc del ARN generado por transcripción *in vitro* para el gen M del virus de influenza aviar tipo A subtipo H5N2, utilizando el kit Express Two-Step SuperScrip qRT-PCR Universal, Invitrogen. El rango dinámico se obtuvo en ciclos recomendados y con buena distribución entre cada una de las diluciones.**



**Figura 6. Pendiente originada a partir de las curvas de calibración del gen M del virus de influenza aviar H5N2. La eficiencia obtenida resultó ser de de 0.99 y valor de la pendiente de -3.3.**



**Figura 7. Resultados de la curva de calibración por RRT-PCR a partir ADNc del ARN generado por transcripción *in vitro* para el gen  $\beta$ -actina de pato, utilizando el kit Express Two-Step SuperScrip qRT-PCR Universal, Invitrogen. El rango dinámico se obtuvo en ciclos recomendados y con buena distribución entre cada una de las diluciones.**



**Figura 8. Pendiente originada a partir de las curvas de calibración del gen  $\beta$ -actina. La eficiencia obtenida resultó ser de 0.99 y valor de la pendiente de -3.3.**

Una vez estandarizado la concentración de reactivos y rango dinámico se procedió a utilizar las muestras problema para realizar la cuantificación absoluta utilizando el kit OneStep RT III, (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) utilizando las condiciones arriba mencionadas. El líquido alantoideo de embriones infectados con el virus H5N2 fue utilizado como testigo positivo, mientras que hisopos de cloaca y faringe de aves no inoculadas fueron usados como testigos negativos.

### 3.1.6. Extracción de ARN de muestras problema

La muestra tomada de las aves fue descongelada para realizar la extracción del ARN del gen M y  $\beta$ -actina. El kit utilizado para este procedimiento fue el Purelink™ Viral ARN Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Algunos parámetros del procedimiento

recomendado por el fabricante fueron modificados para obtener ARN eluído con la menor presencia de proteínas. Para trabajar la técnica de extracción las muestras fueron descongeladas y se utilizaron 200 microlitros de la muestra problema para iniciar la extracción. El protocolo de extracción se puede visualizar el apéndice 7.6.

Una vez realizada la extracción se procedió a la técnica de RRT-PCR. Las muestras problema fueron pareadas, de tal forma que se juntaron dos extracciones considerando ser de la misma especie, sitio anatómico y hora postinoculación. Los resultados numéricos originados por el software versión 1.7 del RotorGene fueron exportados a excel para determinar promedio del grupo de nuestras afines. Finalmente estos resultados fueron graficados para visualizar su comportamiento en el transcurso del tiempo.

## **3.2 Segunda etapa**

### **3.2.1 Sistemas vivos: Incubación de huevo fértil y crianza de aves**

Las aves fueron conseguidas de la siguiente forma: se compró en una granja de patos de Cuernavaca Morelos huevo fértil almacenado en condiciones de temperatura y humedad específicas (13°C y 70-80% humedad). El huevo fértil fue llevado a una incubadora privada en Tepetzotlán Estado de México donde se recogieron los nacimientos al día de edad. Los patos fueron criados por dos semanas y media en las unidades de aislamiento del departamento de Producción Animal Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. El sistema de crianza fue sobre piso de rejilla, calefacción artificial a 37°C, se proporcionó alimento comercial no medicado para pato, agua *ad libitum* y cada ave fue identificada con anillos de cinchos colocados en las patas. Una vez terminada la crianza, fueron alojados en las unidades de aislamiento de alta seguridad del INIFAP Palo Alto en Cuajimalpa, México D.F., bajo condiciones de sistemas de filtración a presión negativa, filtros absolutos, cortina de luz ultravioleta y tapetes sanitarios, para evitar el escape del virus. Como testigo de la infección y patogenicidad del virus de IABP H5N2 se adquirieron embriones de pollo SPF ALPES II (Grupo IDISA en Tehuacán Puebla) de 9 días de edad para continuar su incubación hasta su nacimiento en incubadora Jamesway (Lawing Incubator Co, Marion, North Carolina, USA) ubicada en el INIFAP Palo Alto, mantenida en condiciones de temperatura a 37 °C, humedad 40-60%, ventilación y volteo de 1 vez cada hora. Los nacimientos entre patos y pollos se coordinaron para proveer de aves con edades muy cercanas a las 3 semanas al momento de la inoculación con el virus.

### 3.2.2 Preparación y titulación del inóculo de IABP H5N2

Los objetivos que implicaron el manejo del virus activo de IABP subtipo H5N2 en aves vivas fueron realizados en el laboratorio y unidades de aislamiento de alta seguridad CENID-Microbiología, INIFAP, ubicadas en el Km 15.5 de la Carretera Federal México-Toluca, Palo Alto, Cuajimalpa, México D.F.

La preparación del inóculo tuvo el siguiente procedimiento: se inició con un pase inoculando 0.2 ml con jeringa de insulina a 10 embriones SPF ALPES II (ALPES, Grupo IDISA) de 9-11 días de edad por cavidad alantoidea siguiendo los procedimientos estandarizados internacionales (Beard, 1989). Los embriones fueron incubados a 37.7 °C (incubadora Jamesway), revisando la mortalidad embrionaria diariamente a través de un ovoscopio. Los embriones que murieron en las primeras 24 horas fueron eliminados por ser atribuida a contaminación o mal manejo de la técnica. A partir de las 48 horas fueron colectados 0.1 ml de líquido alantoideo de 3 embriones inoculados al azar, para realizar la prueba de hemoaglutinación rápida en placa e inhibición de la hemoaglutinación con antisuero específico para el virus de influenza aviar de baja patogenicidad H5N2 proveído por la Comisión México Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA). Los embriones restantes fueron incubados para cosechar el líquido alantoideo a las 72 horas verificando la hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación con antisuero específico. Los embriones no muertos durante las primeras 72 horas fueron sacrificados colocándolos a 4°C durante 12 horas. La titulación del virus fue realizada haciendo una dilución décuple seriada a partir de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-15}$ . Fueron utilizados 8 embriones por dilución, inoculados como fue descrito anteriormente. La titulación del virus fue realizada con base a la dosis letal en embrión de pollo al 50% (DLEP<sup>50</sup>) por el método de Reed y Muench (1938).

Previo a la inoculación con el virus, todos los patos fueron sometidos a aislamiento bacteriológico general a partir de hisopos de cloaca y laringe para descartar la presencia de bacterias involucradas en las enfermedades respiratorias como *Salmonella sp* y *Pasterella sp*, con ello se pretende que la signología observada en las aves sea únicamente por la presencia del virus y su microbiota normal.

### 3.2.3 Diseño experimental

Para el ensayo *in vivo*, se formaron cuatro grupos de aves, dos de ellos fueron los grupos testigo negativo, uno estuvo formado por 4 pollos Leghorn (*Gallus domesticus*) SPF de 3 semanas de edad y el otro por 4 patos de 3 semanas de edad, se administró 1 ml de líquido alantoideo sin virus por vía intranasal a todas las aves de estos 2 grupos. Un tercer grupo fue el testigo positivo para la excreción del virus y para la detección de anticuerpos en suero de sangre periférica, y estuvo conformado por 4

pollos Leghorn SFP de 3 semanas de edad. El grupo objetivo fue formado por 8 patos (*Anas platyrhynchos domesticus*) de 3 semanas de edad. Al momento de la inoculación con el virus, las aves del grupo testigo positivo y del grupo objetivo fueron infectados con un inoculo con titulo de  $10^7$  DLEP50% en un volumen de 1 ml, repartido de la siguiente forma: 0.6 ml vía laringe, 0.1 ml en cada ojo, y 0.1 ml en cada narina.

### **3.2.4 Colecta de muestras**

El medio de transporte viral utilizado fue medio D-MEM preparado acorde a las instrucciones del proveedor suplementado con antibiótico marca GIBCO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, Cat. 15240-096) a concentración de 10,000  $\mu\text{g}$  de estreptomicina y 25  $\mu\text{g}$  de anfotericina B; utilizándolo a razón de 0.1 ml por cada mililitro de medio D-MEM. Los componentes del medio D-MEM pueden visualizarse en el apéndice 7.3. Los hisopos fueron colocados dentro del tubo identificado con 3 ml de medio de transporte. Durante la colección de las muestras los tubos se mantuvieron en presencia de refrigerantes y antes de ser conservadas a  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ , se homogenizó el tubo con un agitador, luego se retiró el hisopo y finalmente se centrifugo a  $2,000 \times g$ . La toma de muestras de hisopos de faringe/laringe y cloaca fueron a las 12, 24, 48, 72 horas; 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> semana postinoculación, cada una de ellas por duplicado. Durante el desarrollo experimental las aves fueron evaluadas diariamente para detectar la presencia de signos clínicos de enfermedad. El peso de todas las aves fue monitoreado cada semana. La eutanasia de los patos y pollos se llevó a cabo conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995 y Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA, 2001). Las aves fueron anestesiadas con una dosis de 20 mg/Kg de Ketamina y 1 mg/Kg de Xilacina administrados por vía intramuscular hasta lograr el plano profundo (Carpenter, 2005). El sexo de los patos fue determinado en la eutanasia

## **3.3 Tercera etapa**

### **3.3.1 Titulación de IABP por DLEP 50% en embrión de pollo**

Para la titulación viral se utilizaron embriones pollo SPF ALPES II (ALPES, Grupo IDISA) de 9-11 días de edad. Las muestras biológicas con virus fueron descongeladas, pareadas, centrifugadas y filtradas con membrana de poro de  $0.2\ \mu\text{m}$  estériles. Las muestras problema fueron pareadas de tal forma que se juntaron dos muestras considerando ser de la misma especie, sitio anatómico y hora postinoculación. Para la titulación de la muestra se realizó una dilución decuple seriada a partir de  $10^0$  hasta  $10^{-3}$  con volumen final de 150 microlitros, utilizando 5 embriones por dilución. Los embriones fueron inoculados en cámara alantoidea con 0.2 ml de la dilución preparada y

mantenidos en incubadora Jamesway a 37.7 °C. La mortalidad fue revisada diariamente con uso de un ovoscopio y aquella presentada durante las primeras 24 horas fue atribuida por contaminación o mal manejo de la técnica. A partir de las 48 horas fue colectado 0.1 ml de líquido alantoideo de cada dilución para realizar la prueba de hemoaglutinación sobre una placa de acrílico utilizando una solución de glóbulos rojos al 1%. Las muestras positivas a la hemoaglutinación fueron registradas y el líquido alantoideo fue cosechado en los embriones inoculados con la dilución  $10^{-0}$ . Las muestras negativas fueron llevadas a un segundo pase para descartar replicación viral, visualizando mortalidad a las 24 horas, con verificación de la hemoaglutinación a las 48 horas. Finalmente, fue cosechado el líquido alantoideo de la dilución  $10^{-0}$  del segundo pase de todas las muestras resultantes como negativas. Los líquidos alantoideo cosechados fueron conservados a -70°C en alícuotas de 1 ml. Los embriones no muertos durante las primeras 48 horas fueron sacrificados colocándolos a 4°C durante 12 horas. Las muestras positivas a la hemoaglutinación se titularon con base a la dosis letal en embrión de pollo al 50% (DLEP<sub>50</sub>) por el método de Reed y Muench (1938).

### **3.3.2 Inhibición de la hemaglutinación**

La colección de sangre para la detección de anticuerpos fue tomada los días 1, 7, 14 y 21 posteriores a la inoculación, así como una semana antes de iniciar dicha práctica para confirmar ausencia de anticuerpos por exposición previa al virus. Todos los sueros fueron almacenados a -20 °C. Para el análisis de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación los títulos se graficaron utilizando la fórmula de media geométrica del programa Excel por cada grupo de títulos obtenidos. La titulación de anticuerpos por inhibición de la hemoaglutinación se realizó de acuerdo la modificación de la NOM-044-ZOO-1995, utilizando el virus de IABP H5N2 inactivado con 0.1% de formalina. Se utilizó un suero testigo negativo y uno positivo proveído por el INIFAP para validar la prueba. Los anticuerpos presentes en el suero del pato fueron diluidos con PBS a partir de una dilución doble de 1:2 hasta 1:1024 utilizando 25 microlitros de suero en placas de poliestireno de 96 pozos. Posteriormente se agregaron 4 unidades hemoaglutinantes del virus de IABP H5N2, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se adicionaron glóbulos rojos de gallina al 1% incubando por 30 minutos a temperatura ambiente; finalmente se evaluó la inhibición de la hemoaglutinación. Los sueros de pollo infectados con el virus de IABP H5N2 fueron utilizados como testigos positivos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Descripción de signos clínicos

Los patos y pollos inoculados con el virus de IABP a dosis de  $10^7$  DIEP 50% fueron evaluados clínicamente para determinar la ausencia de signos clínicos en patos y la presencia de estos en pollos los cuales fueron utilizados como testigo positivo de la infección. Los signos clínicos pueden apreciarse en el cuadro 14. Los 4 pollos inoculados de 3 semanas de edad con la cepa H5N2 de baja patogenicidad aislada en el 2007, manifestaron un cuadro clínico correspondiente a una infección del aparato respiratorio superior junto con depresión, estornudo, secreción transparente de narinas, disminución del consumo de alimento, plumas erizado y mucosa conjuntival hiperémica. Estos signos clínicos se presentaron a partir de las 48 horas postinoculación y se mantuvieron presentes hasta la primera semana posterior a la inoculación. Los patos de tres semanas de edad, presentaron una hiperemia bilateral o unilateral con un aparente aumento de la irrigación de la conjuntiva palpebral a las 72 horas postinfección. Los grupos de aves testigos negativos de patos y pollos no presentaron ningún signo sugestivo de una infección por el virus. Así mismo, en ningún grupo, se presentó muerte por causa del virus o por infecciones de bacterias oportunistas.

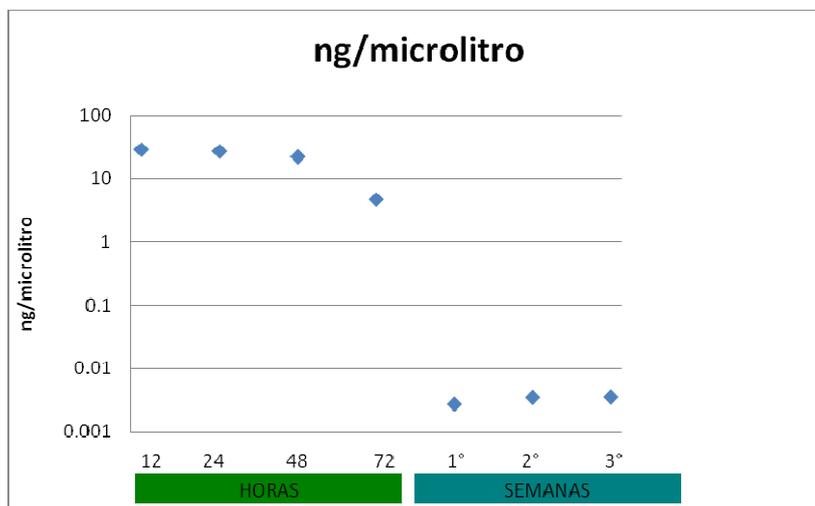
**Cuadro 14. Signos clínicos presentados en aves inoculadas con el virus H5N2 de baja patogenicidad a dosis de  $10^7$  DIEP 50%.**

Signo clínico/Intensidad	Pato			Pollo		
	ligero	moderado	severo	ligero	moderado	severo
Depresión	-	-	-	-	X	-
Estornudo	-	-	-	-	-	X
Secreción de narinas claro	-	-	-	-	-	X
Disminución del consumo de alimento	-	-	-	-	X	-
Plumas erizadas	-	-	-	-	-	X
Mucosa conjuntival hiperémica	-	X	-	-	X	-
Diarrea	-	-	-	-	-	-

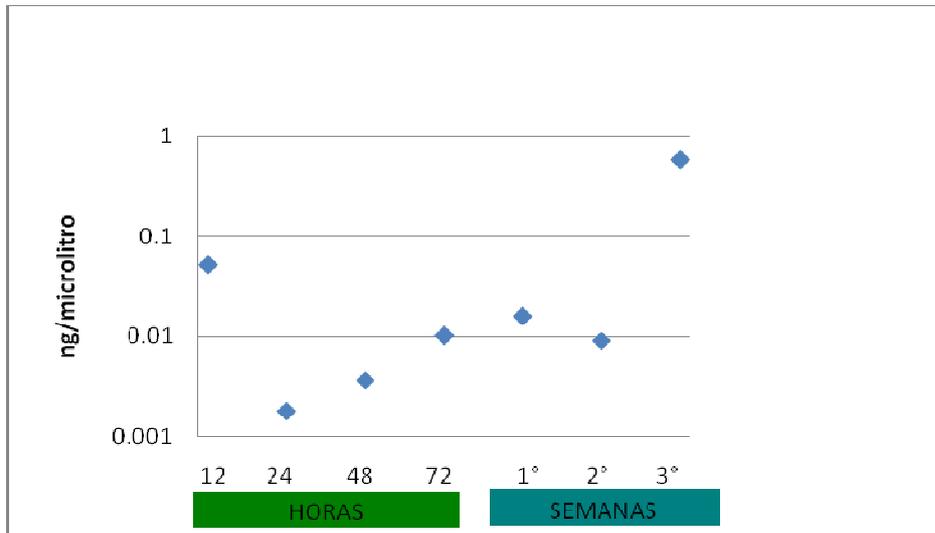
### 4.2 Cinética de excreción del virus IABP H5N2 en patos y pollos

La cinética de excreción del virus de influenza en la aves problemas fue determinado por técnica de RRT-PCR con el objetivo de obtener la cuantificación absoluta de la eliminación viral de cloaca y laringe de patos y pollos para aceptar o refutar nuestra hipótesis de que el pato es un reservorio natural del virus de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad.

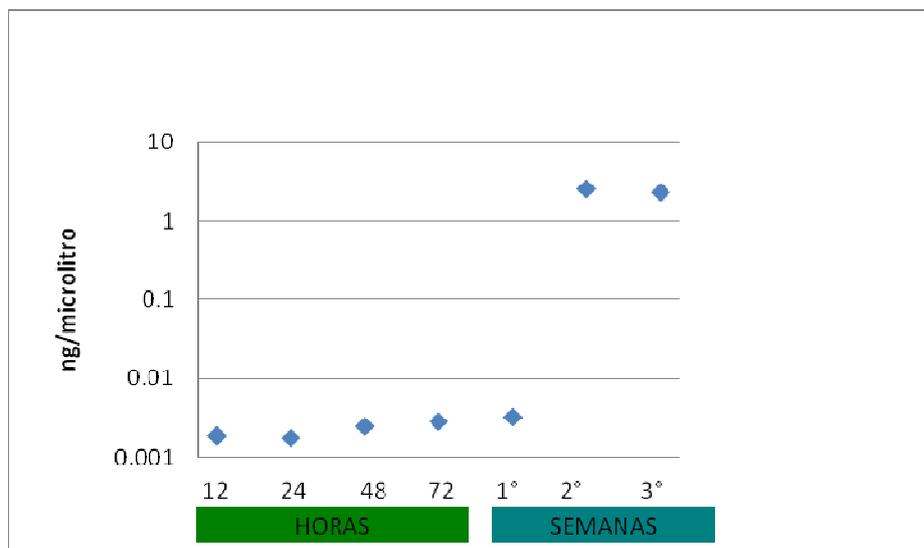
Los resultados de este estudio en cloaca de patos inoculados mostraron una importante eliminación de partículas virales durante las primeras 12, 48 y 72 horas (28.21, 26.52, 21.83 ng/μl), posteriormente disminuyó considerablemente la cantidad de nanogramos excretados (Figura 9); por el contrario, en pollos, la vía cloacal tuvo una eliminación muy escasa pero sostenida en las primeras horas, pero despuntó hacia la segunda y tercer semana postinoculación con valores de 2.55 y 2.31 ng/μl respectivamente (Figura 11). La cinética de la vía laríngea de patos mantuvo una excreción baja pero ascendente con valor inicial de  $5.25 \times 10^{-2}$  ng/μl, valores intermedios de  $1.02 \times 10^{-2}$  ng/μl y finalmente ascendió a  $5.80 \times 10^{-2}$  ng/μl (Figura 10). Por el contrario, los pollos manifestaron una mayor excreción en nanogramos y además presentaron dos picos de eliminación importantes, uno a las 48 horas con 2.68 ng/μl y otro entre la segunda y tercer semana postinoculación con 2.22 y 2.27 ng/μl (Figura 12). Los resultados numéricos de excreción viral por las vías cloacal y laríngea de patos y pollos se resumen en el cuadro 15.



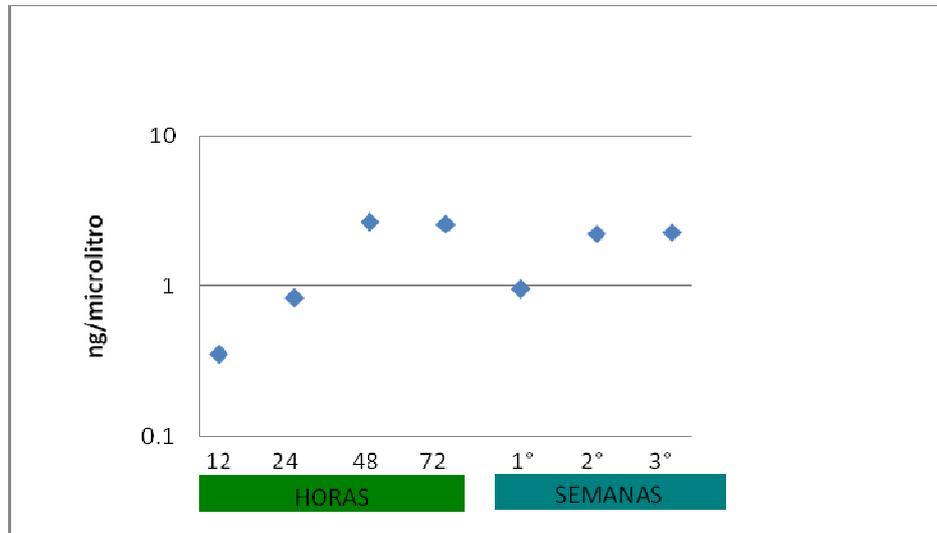
**Figura 9. Grafica de cinética de excreción del ARN viral detectado por RRT-PCR en vía cloacal de patos de 3 semanas de edad inoculados con virus de IABP H5N2. Los resultados se muestran en promedio del ARN viral excretado y en unidades de ng/μl.**



**Figura 10.** Grafica de cinética de excreción de ARN viral obtenida por RRT-PCR en vía laríngea de patos de 3 semanas de edad inoculados con virus de IAB H5N2. Los resultados se muestran en promedio del ARN viral excretado y en unidades de ng/μl.



**Figura 11.** Grafica de cinética de excreción de ARN viral obtenida por RRT-PCR en vía cloacal de pollos de 3 semanas de edad inoculados con virus de IABP H5N2. Los resultados se muestran en promedio del ARN viral excretado y en unidades de ng/μl.



**Figura 12.** Grafica de cinética de excreción de ARN viral obtenida por RRT-PCR en vía laríngea de pollos de 3 semanas de edad inoculados con virus de IABP H5N2. Los resultados se muestran en promedio del ARN viral excretado y en unidades de ng/μl.

**CUADRO 15.** Datos numéricos obtenidos de la excreción de ARN viral de patos y pollos de 3 semanas de edad inoculados con el virus de influenza aviar H5N2 BP. Los datos corresponden al promedio en ng/μl de RNA/ μl excretado por cada uno de los grupos de aves inoculados. (NA= No amplificación).

ESPECIE	GRUPO	VIA	ng/μL de ARN						
			12 HRS	24 HRS	48 HRS	72 HRS	1° SEM.	2° SEM.	3° SEM.
PATOS	INCLADOS	CLOACA	28.21	26.52	21.83	4.63	$2.73 \times 10^{-3}$	$3.48 \times 10^{-3}$	$3.52 \times 10^{-3}$
		LARÍNGE	$5.25 \times 10^{-2}$	$1.81 \times 10^{-3}$	$3.64 \times 10^{-3}$	$1.02 \times 10^{-2}$	$1.60 \times 10^{-2}$	$9.05 \times 10^{-3}$	$5.80 \times 10^{-1}$
	TESTIGOS	CLOACA	N/A						
		LARÍNGE	N/A						
POLLOS	INOCULADOS	CLOACA	$1.87 \times 10^{-3}$	$1.76 \times 10^{-3}$	$2.47 \times 10^{-3}$	$2.84 \times 10^{-3}$	$3.27 \times 10^{-3}$	2.55	2.31
		LARÍNGE	$3.56 \times 10^{-1}$	$8.39 \times 10^{-1}$	2.68	2.58	$9.58 \times 10^{-1}$	2.22	2.27
	TESTIGOS	CLOACA	N/A						
		LARÍNGE	N/A						

### 4.3 Inhibición de la hemoaglutinación

La evaluación de los anticuerpos específicos contra el virus de influenza H5N2 en patos y pollos inoculados se realizó por técnica de inhibición de la hemaglutinación. Con ello se pretende evaluar la producción de anticuerpos resultado de la respuesta inmune específica hacia el virus H5N2 de baja patogenicidad.

Los resultados del estudio serológico en media geométrica de los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación de cada grupo de aves inoculados con IABP H5N2 se muestran gráficamente en la figura 13, mientras que los datos numéricos se concentran en el cuadro 16. Los títulos serológicos de los pollos muestran un incremento exponencial semana tras semana después de la inoculación, iniciando en la primera semana con un título de 1/16 a 1/64, la segunda semana los títulos se ubicaron en 1/32 a 1/128 y finalmente en la tercera semana fueron de 1/64 a 1/128. Este comportamiento no se observó en los patos donde se presentó un incremento de anticuerpos en la primera semana con título máximo de 1/32 y posteriormente declinó durante la segunda y tercera semana.

**CUADRO 16. Media geométrica obtenida por inhibición de la hemoaglutinación de patos y pollos de 3 semanas de edad inoculados con el virus de influenza aviar H5N2 BP aislado en el 2007.**

ESPECIE	GRUPO	TITULO IH		
		1° SEM.	2° SEM.	3° SEM.
POLLOS	INOCULADOS	32.00	64.00	76.11
	TESTIGOS	0	0	0
PATOS	INOCULADOS	17.96	6.35	3.62
	TESTIGOS	0	0	0

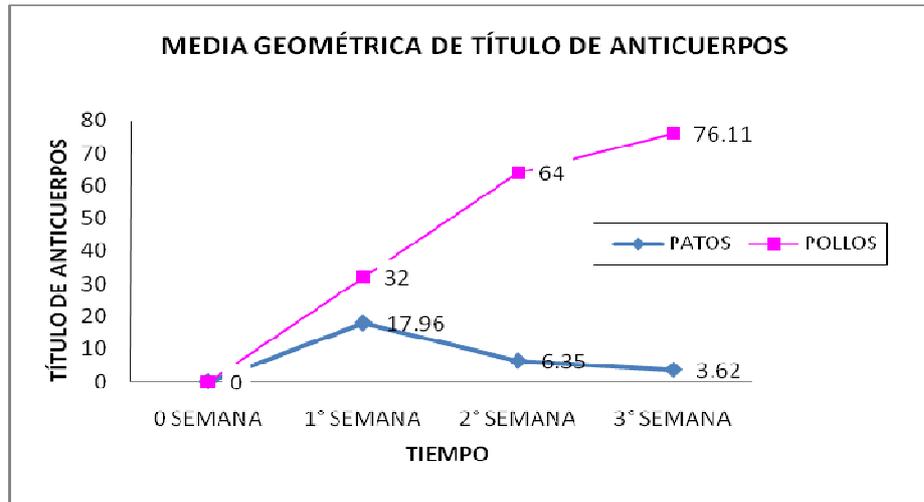


Figura 13. Media geométrica de título de anticuerpos inducidos utilizando la técnica de inhibición de la hemaglutinación de patos y pollos de 3 semanas de edad inoculados con el virus de influenza aviar H5N2 BP aislado en el 2007. La producción de anticuerpos en pollos es exponencial semana a semana, mientras que en patos el pico de anticuerpos aumenta solo en la primera semana y posteriormente cae su producción hacia la segunda y tercer semana. Estos resultados indican que el virus es específico del pollo por la producción continua de anticuerpos sugerentes de una infección.

#### 4.4. Titulación del virus IABP H5N2 excretado en embrión de pollo

Este objetivo específico se desarrolló para determinar la infectividad en dosis infecciosas al 50% en embrión de pollo del virus de influenza excretado a partir de cloaca y laringe de patos y pollos inoculados con IABP H5N2. Con ello, se pretende evaluar la importancia de los virus excretados como posible fuente de infección ante un hospedero susceptible.

Los títulos de virus excretados en DLEP al 50% pueden verse en la cuadro 17, mientras que los resultados gráficos pueden observarse en la figura 14. Estos resultados mostraron ser diferentes a los obtenidos por la técnica de RRT-PCR. En el caso de los pollos, la laringe fue la principal vía de eliminación del virus pudiéndose detectar a partir de las 12 horas hasta las 72 horas, mientras que los patos solo resultó ser positivo a las 12 horas postinoculación. Por vía cloacal solo resultó ser positiva en pollos a las 48 horas, mientras que en patos fue negativa en todos los muestreos.

**CUADRO 17. Titulación de virus de IABP H5N2 excretado en muestras problemas determinado por DLEP 50%.**

ESPECIE	SITIO ANATÓMICO	TITULO DLEP 50%/ml				1° SEM.	2° SEM.	3° SEM.
		12 HRS	24 HRS	48 HRS	72 HRS			
<b>PATO</b>	LARÍNGE	$10^{1.6}$	0	0	0	0	0	0
	CLOACA	0	0	0	0	0	0	0
<b>POLLO</b>	LARÍNGE	$10^{1.3}$	$10^{1.4}-10^2$	$10^{1.4}-10^2$	$10^{2.45}-10^{3.3}$	$10^{1.45}$	0	0
	CLOACA	0	0	$10^{3.14}$	0	0	0	0

## 5.0 Discusión

Los datos de este estudio indican que el virus de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad utilizado en este estudio y bajo estas condiciones controladas, fue capaz de detectarse por técnica de RRT-PCR cuantitativa y por aislamiento viral en faringe y cloaca de patos y pollos después de la inoculación a  $10^7$  DLEP<sub>50</sub> por las vías oral, ocular y nariñas. Así mismo, manifiesta una enfermedad clínica en los pollos por la evidente presencia de signos clínicos, contrario a los patos que resultaron ser infectados sin mostrar algún signo clínico.

Los resultados por RRT-PCR sugieren que en patos, la vía cloacal es el sitio más importante de eliminación durante las primeras 72 horas postinoculación aunque no manifiesta potencial infeccioso en embrión de pollo. Estos resultados coinciden con lo publicado con otros autores. De la misma forma Mundt *et al.*, 2009, encontró que en patos la vía cloacal resultó ser negativa en todos los muestreos utilizando aislamiento en embrión de pollo. El virus utilizado en nuestro estudio tampoco manifestó una capacidad infecciosa en las muestras de cloaca de pollos en embrión de pollo; excepto a las 48 horas PI, sin embargo fue detectado por RRT-PCR durante todo el estudio. Estos resultados podrían deberse a la presencia de virus defectivos tal y como lo observo Preben von Magnus (1954) con un virus de influenza A en embriones de pollo. Sus resultados mostraron que bajo ciertas condiciones (concentración del inóculo, periodo de incubación y sitio de inoculación) los virus incompletos son formados, los cuales son capaces de reaccionar con antisuero específico pero no producen infección en el embrión de pollo. Queda por demostrar que en nuestros resultados exista la presencia de estas partículas incompletas debido a la falta de adaptación del virus al pato, o bien, al desconocimiento del manejo previo de la alícuota proporcionada para nuestro estudio, sin embargo no se descarta su presencia y una posible causa de observar estos resultados.

Es importante considerar que la prueba de RRT-PCR cuantitativa en tiempo real y el aislamiento viral en nuestro estudio persiguen diferentes objetivos, tal como lo describen algunos autores (Spackman *et al.*, 2003). Ambas pruebas detectan al virus pero en diferente condición. Con el aislamiento viral es posible detectar partículas virales viables, mientras que en la técnica de RRT-PCR detecta ARN viral intacto, incluyendo aquellos ARN's procedentes de virus defectuosos que ya no replicarían en un hospedero o aquellos que han sido inactivados por el manejo.

Por otro lado, la vía laríngea en patos fue un sitio de anatómico de eliminación menor y sostenida por RRT-PCR pero con capacidad infecciosa durante las primeras 12 horas PI demostrado en embrión de pollo. Estos resultados coinciden con lo publicado por Pillai *et al.*, 2008 quien utilizó un virus H5N2 de linaje mexicano inoculado en patos Pekín doméstico y pollos con  $10^6$  DIEP<sub>50</sub>. Sus resultados mostraron que en patos la vía laríngea fue el principal sitio de eliminación desde las 48 horas y hasta las 96 horas postinoculación, de forma similar Mundt *et al.*, 2009, solo detectó el virus en laringe hasta los dos días postinoculación en patos. En vía laríngea de pollos Pillai encontró

una eliminación desde las 48 horas hasta la 1° semana postinoculación; estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro estudio y demuestran que el virus H5N2 de baja patogenicidad utilizado es un virus altamente adaptado, capaz de infectar y replicar en los pollos, lo cual explica la detección prolongada y el aumento en su detección en faringe, la cual siempre fue superior en nanogramos a la detectada en los patos por RRT-PCR.

Okamatsu *et al.*, 2007, estudio un virus de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad con características similares a los virus mexicanos. De la misma forma encontró que el virus fue altamente adaptado en pollos. Los resultados de Okamatsu mostraron un aislamiento efectivo por vía laríngea hasta los 5 días PI, un dato muy parecido a nuestros resultados, mientras que por cloaca solo fue detectado al quinto día PI, mientras que en nuestro estudio solo se detectó a las 48 horas PI. Nuevamente el aislamiento a partir de hisopos traqueales fue más evidente que en hisopos cloacales.

Es interesante mencionar que los resultados observados en cloaca de patos parecen mostrar una típica curva de disminución de carga viral, sin embargo el comportamiento de la cinética de excreción por vía laríngea persiste aparentando un proceso de adaptación con replicación escasa, lo cual epidemiológicamente puede resultar importante para la transmisión del virus entre individuos.

Finalmente, los resultados de la inducción de anticuerpos coincide con el cuadro clínico observado, ya que en pollos la producción de anticuerpos es exponencial a lo largo del estudio, lo cual es un indicio de un proceso de infección y defensa del organismo, mientras que en patos, solo se produjo un pico con títulos discretos detectados en la primera semana postinoculación. La baja respuesta inmune específica de los patos puede ser atribuida a la naturaleza de la HA tal y como lo menciona Gambaryan *et al.*, 2003, quien determinó que los virus de pollos no se unen a gangliosidos cortos, los cuales se encuentran presentes en patos. Por tal razón, es posible que los mecanismos de defensa inespecíficos sean los más importantes para controlar la infección en patos, lo cual explica la baja y corta producción de anticuerpos en el pato a diferencia del pollo quien enfrenta una infección clínica de moderada capaz de estimular la producción de anticuerpos como sistema de defensa específico.

Los resultados observados en nuestro estudio pueden contribuir a mantener la presencia del virus H5N2 en nuestro país, ya que diferentes especies pueden servir como puente para los virus de influenza aviar de baja patogenicidad provenientes de aves acuáticas sean alojados en pollos y otras especies de gallináceas domésticas tal y como lo demuestra Swayne *et al.*, 2008.

La hipótesis de nuestro estudio queda entendida en el contexto de que el pato doméstico puede funcionar como un reservorio limitante de la cepa mexicana H5N2 debido a que el pato es infectado y puede mantener el virus por al menos 3 semanas demostrado en nuestro estudio por RRT-PCR. Sin embargo, son necesarios estudios de

transmisión entre patos y pollos para mostrar si el virus detectado por RRT-PCR puede infectar con el tiempo a los pollos.

## **5.1 Conclusión**

El pato Pekín bajo condiciones controladas y con este virus aislado de pollo es un reservorio limitado al virus H5N2 de BP, siendo la vía laríngea el sitio de mayor importancia en la eliminación por la capacidad infecciosa demostrada en embrión de pollo.

## 6.0 Bibliografía

1. Agüero, M. A fully Automated Procedure for the High-Throughput Detection of Avian Influenza Virus by Real-Time Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction. *Avian Diseases* 2007; 51:235–241.
2. Beard, C.W. Serological procedures. In: H.G. Purchase, L.H. Arp, S.B. Hitchner, C.H. Domermuth, J.E. Pearson (Eds.), *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, American Association of Avian Pathologists, College Station. 1989.
3. Bergman, J. *Creation Ex Nihilo Technical Journal* 1999; 13:1-9.
4. Branson, R. *Avian Viruses, function and testigo*. 1º edition Florida. Wingers Publishing Inc. 1995.
5. Bravo, A. IL2 e IFN $\gamma$ : Determinación de su expresión mediante la técnica de RRT-PCR en pollos estimulados con el factor de transferencia específico para influenza aviar (Tesis de licenciatura) México, D.F., UNAM, 2007.
6. Brown J. Persistence of H5 and H7 Avian influenza viruses in water. *Avian Diseases* 2007; 51:285–289.
7. Calnek, B. *Enfermedades de las aves*. 1º edición. México D.F. Ed. Manual moderno. 1995.
8. Carpenter, J. *Exotic animal formulary*. 3º edition. Ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005.
9. Chen, W., He, B., Li, C., Zhang, X., Wu, W., Yin, X., *et al.* Real-time RRT-PCR for H5N1 avian influenza A virus detection. *Journal of Medical Microbiology* 2007; 56:603–607.
10. Chew, T; Poon, L. Biology of influenza a virus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007; 1102:1-25.
11. Del Castillo, E. *Manual de laboratorio: Prácticas de virología*. D.F., FMVZ, 2000.
12. Dieffenbach, C. Dueksler, G. *PCR primer a laboratory manual*. 2ª edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A, 2003.
13. Dybkær K., Munch, M., Handberg K., Jorgensen, P. Application and evaluation of RRT-PCR–ELISA for the nucleoprotein and RRT-PCR for detection of low-pathogenic H5 and H7 subtypes of avian influenza virus. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16:51–56.
14. Field, B. *Fundamental virology*. 2º edition. New York: Ranven Press, 1991.
15. Fouchier, R., Bestebroer, T., Herfst, S., Van Der Kemp, L., Rimmelzwaan, G., Osterhaus, A. Detection of Influenza A Viruses from Different Species by PCR Amplification of Conserved Sequences in the Matrix Gene. *Journal Of Clinical Microbiology* 2000; 38:4096–4101.
16. Gambaryan, A; Tuzikov, A; Bovin, N; Yamnikova, S; Lvov, D; Webster, R; Matrosovich, M. Differences between influenza virus receptors on target cells of duck and chicken and receptor specificity of the 1997 H5N1 chicken and human influenza viruses from Hong Kong. *Avian Diseases* 2003; 47:1154–1160.
17. Gardner, E. *Principles of genetics*. 4º edición. México D.F. Ed. Limusa Wiley, 2005.

18. Gómez, P. Influenza Virus Matrix Protein is the major driving force in virus budding. *Journal of Virology* 2000; 74: 11538–11547.
19. Hawkins, M.; Crossley, B.; Osofsky, A.; Webby, R.; Lee, C.; Suarez, D.; Hietala, S. Avian influenza A virus subtype H5N2 in a red-lored Amazon parrot. *J Am Vet Med Assoc* 2006; 228: 236-41.
20. Heine, L. Trinidad, Selleck, P, Lowther S. Rapid Detection of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus by Taq Man Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction. *Avian Diseases* 2007, 51:370–372.
21. Hernández, A. Estudio de la patogenia del virus del Influenza Aviar (H5N2) altamente patógeno mediante inmunohistoquímica (Tesis de maestría). Mex. D.F. UNAM, 1998.
22. Hernández, M. Contribución al estudio de la patogenia del virus de IA H5N2 altamente patógeno: Encéfalo (Tesis de licenciatura) FES Cuautitlán, México, D.F. UNAM. 2000.
23. Hoffmann, J. Stech, Y. Guan, R. G. Webster, D. R. Pérez. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses, *Arch Virol*. 2001; 146: 2275–2289.
24. Katz, J. The Impact of Avian Influenza Viruses on Public Health. *Avian Diseases* 2003; 47:914–920.
25. Kubista, M. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspect of medicine* 2006; 27: 95-125.
26. Lee, C., Lee J., Swayne, D., Senne, C., Linares, D., Suárez, D. Assessing potential pathogenicity of avian influenza virus: current and experimental system. *Avian Diseases* 2007; 51:260–263.
27. Löndt, B., Nunez, A., Banks, J., Nili, H., Johnson, L.; Alexander, D. Pathogenesis of highly pathogenic avian influenza A/turkey/Turkey/1/2005 H5N1 in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) infected experimentally, *Avian Pathology* 2008, 37: 619 - 627.
28. Mc Ferran, J. Virus Infections of birds. Northlands: Elsevier Science Publishers B.V. 1993.
29. Mo IP, Brugh M, Fletcher OJ, Rowland GN, Swayne DE. Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. *Avian Diseases* 1997, 41:125-136.
30. Mundt E, Gay L, Jones L. Replication and pathogenesis associated with H5N1, H5N2, and H5N3 low pathogenic avian influenza virus infection in chickens and ducks. *Arch. Virol* 2009, 154:1241-1248.
31. Nili, H. Asasi, K., Dadras, H, Ebrahimi, M. research note pathobiology of H9N2 avian influenza virus japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Avian Diseases* 2007; 51:390–392.
32. Okamoto M, Saito T, Yamamoto Y, Mase M, Tsuduku S, Nakamura K, Tsukamoto K, Yamaguchi S. Low pathogenicity H5N2 avian influenza outbreak in Japan during the 2005-2006. *Veterinary Microbiology*, 2007; 124:35-46.
33. Olsen, B. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science* 2006; 312: 321-484.

34. Padilla, R. Avian influenza: histopathology and viral detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by RRT-PCR. *Revista veterinaria México* 2004 35: 1-19.
35. Pantin-Jackwood, M, Swayne, D. Pathobiology of Asian Highly Pathogenic Avian H5N1 Virus Infections in Ducks. *Avian Diseases* 2007, 51:250–259.
36. Pasick, J. Relationship between H5N2 avian Influenza Viruses isolated from wild and domestic ducks in British Columbia, Canada. *Avian Diseases* 2007; 51:429-431.
37. Pillai SPS, Suarez DL, Pantin-Jackwood M, Lee CW. Pathogenicity and transmisión of H5N2 parrot avian influenza of Mexican lineage in different poultry species. *Vet Microbiol* 2008, 129:48-57.
38. Qiagen L. Sensitive and specific detection of influenza virus A subtype H5 with Real-Time PCR. *Avian Diseases* 2007; 51:387–389.
39. Ramírez, G. Hamatological and histological findings in birds experimentally infected with highly pathogenic H5N2 avian influenza virus. *Acta veterinaria hungarica* 2005; 53:493-499.
40. Reed, L.J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene* 1938; 27, 493-497.
41. Redrobe, S. Avian influenza H5N1: a review of the current situation and relevance to zoos. *Int. Zoo Yb* 2007; 41: 96–109.
42. Sambrook, J. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2° Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
43. Sangsiriwut, K. Surveillance for reassortant virus by multiplex reverse Transcription-PCR specific for eight genomic segments of avian influenza A H5N1 Viruses. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45:1637–1639.
44. Schnebel, B. Investigations on Infection Status with H5 and H7 Avian Influenza Virus in Short-Distance and Long-Distance Migrant Birds in 2001. *Avian Diseases* 2007; 51:432–433.
45. Selvey, E. W. Thompson, K. Matthaei, Lea, R, Irving, M, Griffiths, L.  $\beta$ -Actin an unsuitable internal testigo for RRT-PCR. *Molecular and Cellular Probes* 2001; 15:307–311.
46. Spackman, E.; Pantin-Jackwood, M.; Swayne, D.; Suarez, D. An evaluation of avian influenza diagnostic methods with domestic duck specimens. *Avian Diseases* 2009; 53: 276-80.
47. Spackman, E.; Senne, D.; Bulaga, L.; Myers, T.; Perdue, M.; Garber, L.; Lohman, K.; Daum, L.; Suarez, D. Development of real-time RT-PCR for the detection of avian influenza virus. *Avian Diseases* 2003; 47: 1079-82.
48. Spackman, E.; Senne, D.; Bulaga, L.; Trock, S.; Suarez; D. Development of multiplex real-time RT-PCR as a diagnostic tool for avian influenza. *Avian Diseases*, 2003; 47: 1087-1090.
49. Sturm-Ramirez, K. Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia?. *Journal Virology* 2005; 79: 11269-11279.
50. Suárez D., Das A., Ellis, E. Review of Rapid Molecular Diagnostic Tools for Avian Influenza Virus. *Avian Diseases* 2007; 51:201–208.

51. Swayne, D. Pathobiology of H5N2 Mexican Avian Influenza virus infections of chickens. *Veterinary pathology* 1997; 34:557-567.
52. Swayne, D. Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian Diseases* 2007; 51:242-249.
53. Swayne, D.; Perkins L. Pathobiology of Aichiken/Hong Kong/220/97 (H5N1) Avian influenza in seven gallinaceous species. *Vet. Pathol.* 2001; 38:149-164.
54. Swayne D.; Perdue, M.; Garcia M.; Rivera G.; Brugh M. Pathogenicity and diagnosis of H5N2 mexican avian influenza virases in chickens. *Avian Diseases* 1997, 41:335-346.
55. Swayne, D.; Slemons, R. Using mean infectious dose of high- and low-pathogenicity avian influenza viruses originating from wild duck and poultry as one measure of infectivity and adaptation to poultry. *Avian Diseases* 2008; 52: 455-60.
56. Uribe, S. Inducción de la expresión de citocinas por el factor de transferencia aviar en células mononucleares de sangre periférica de gallinas domésticas (Tesis de licenciatura) México. D.F. UNAM, 2007.
57. Van Born S., Steensels M., Ferreira H. L., Boschman M., De Viriese J., Lambrecht B. and Van den Berg T. A universal avian endogenous real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction testigo and its application to avian influenza diagnosis and quantification. *Avian Diseases* 2007; 51:213-220.
58. Van der Goot, J.; de Jong, M.; Koch, G.; Van Boven, M. Comparison of the transmission characteristics of low and high pathogenicity avian influenza A virus (H5N2). *Epidemiol Infect*, 2003; 13|: 1003-13.
59. Van Regenmortel, H.; Bishop, D.; Van Regenmortel, M.; Fauquet, C. (Eds). *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* London: Elsevier/Academic Press; 2005.
60. Von Magnus, P. Propagation of the PR8 strain of influenza A virus in chick embryos. IV. Studies on the factors involved in the formation of incomplete virus upon serial passage of undiluted virus. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1952; 30: 311-35.
61. Webster, R.; Yakhno, M.; Hinshaw, V.; Bean, W.; Murti, G.. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 1978, 84: 268-78.
62. Widjaja, L. Matrix Gene of Influenza A Viruses Isolated from Wild Aquatic Birds: Ecology and Emergence of Influenza A Viruses. *Journal of Virology* 2004, 78: 8771–8779.
63. Yamamoto, Y., Nakamura, K., Kitagawa K., Ikenaga, N. Yamada, M., Narita, M. Nonpurulent Encephalitis with Mortality and Feather Lesions in all Ducks (*Anas platyrhyncha* var. domestic) Inoculated Intravenously with H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus. *Avian Diseases* 2007; 51:52–57.

## 7.0 Apéndice

### 7.1 protocolos

#### **7.1.1 Protocolo de extracción de ARN viral con Kit High Pure Viral Nucleic Acid (ROCHE, Philadelphia, PA, USA; N° Cat. 1185887 4001)**

- 1.- En un microtubo de 1.5 ml, libre de nucleasas agregar 200 µl de líquido alantoideo, posteriormente agregar 200 µl de solución de trabajo “working” (suplementado con poly A, preparada recientemente).
- 2.- Finalmente Agregar 50 µl de solución proteinasa K, y mezclar inmediatamente.
- 3.- Incubar por 10 min a 72°C.
- 4.- Agregar 100 µl de buffer de unión “binding” y mezclar.
- 5.- Insertar una columna en un tubo colector y transferir la muestra a la columna.
- 6.- Centrifugar por 1 min a 8 mil x g.
- 7.- Cambiar el tubo colector.
- 8.- Agregar 500 µl de buffer eliminador de inhibidores “inhibitor removal” a la columna.
- 9.- Centrifugar 1 min a 8,000 x g.
- 10.- Cambiar el tubo colector.
- 11.- Agregar 450 µl de buffer de lavado al tubo filtrador
- 12.- Centrifugar por 1 min a 8,000 x g y descartar el sobrenadante
- 13.- Cambiar el tubo colector.
- 14.- Agregar 450 µl de buffer lavado “Wash”.
- 15.- Centrifugar 1 min a 8,000 x g y descartar el sobrenadante.
- 16.- Centrifugar por 10 segundos a máxima velocidad (aprox. 13,000 x g) para retirar algún residuo de buffer.
- 17.- Descartar el tubo colector e insertar la columna en un tubo de centrifuga de 1.5 ml estéril libre de nucleasas.
- 18.- Agregar 50 µl de buffer de elución.
- 19.- Centrifugar el tubo ensamblado por 1 min a 8,000 x g.
- 20.- El microtubo ahora contiene el ácido nucleico viral eluido. Congelar el ARN eluido a -70°C.

#### **7.1.2 Protocolo de extracción de ARN (β-actina) total de hígado y corazón de embrión de pato utilizando el kit Rneasy mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA; N° Cat. 74104)**

- 1.- Usar 0.01– 0.2 cm<sup>3</sup> de tejido (hígado y corazón).
- 2.- Agregar el apropiado volumen de buffer RLT y homogenizar inmediatamente hasta obtener un lisado homogéneo completo (típicamente 20-40 segundos). La ruptura del

tejido y homogenización del tejido fresco se lleva acabo utilizando el buffer RLT y un homogenizador de rotor.

<b>Material de inicio</b>	<b>Volumen del buffer RLT</b>
Arriba de 20 mg	350 $\mu$ l
20-30 mg o si el tejido es difícil para lisar	600 $\mu$ l

- 3.- Centrifugar el lisado por 3 minutos a velocidad máxima en una microcentrifuga y usar solamente el sobrenadante en pasos subsecuentes.
- 4.- Agregar un volumen de etanol al 70% para limpiar el lisado y mezclar con pipeta. No centrifugar.
- 5.- Aplicar 700  $\mu$ l de muestra incluyendo algo de precipitado, a una mini columna Rneasy asentada en un tubo de 2 ml. Centrifugar por 15 segundos a  $\geq 8$  mil x g.
- 6.- Aplicar con pipeta 700  $\mu$ l de buffer RW1 sobre la columna Rneasy, y centrifugar por 15 seg a  $\geq 8$  mil x g para lavar.
- 7.- Transferir la columna Rneasy a un nuevo tubo de 2 ml. Poner con pipeta 500  $\mu$ l de buffer RPE sobre la columna Rneasy, y centrifugar por 15 segundos a  $\geq 8$  mil x g para lavar.
- 8.- Colocar con pipeta 500  $\mu$ l de buffer RPE sobre la columna Rneasy, y centrifugar por 2 minutos a máxima velocidad para lavar la membrana Rneasy.
- 9.- Transferir la columna de Rneasy en un nuevo tubo de 1.5 ml y poner con pipeta de 30-50  $\mu$ l de agua libre de ARNsas directamente sobre la membrana Rneasy. Centrifugar por un minuto a  $\geq 8$  mil x g para eluir. Repetir si la producción de ARN esperado es  $>$  a 30  $\mu$ g.
- 10.- Volumen obtenido: 50 $\mu$ l.
- 11.- Almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$

### **7.1.3 Purificación del producto de PCR con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA, Madison, WI, USA; N° Cat. A9281 ).**

- 1.- Preparar la solución de lavado de membrana agregando 75 ml de etanol al 95%.
- 2.- Agregar un volumen igual a la reacción de solución de unión a la membrana.
- 3.- Colocar una microcolumna en el tubo colector.
- 4.- Transferir el producto de PCR a la microcolumna e incubar por un minuto a temperatura ambiente.
- 5.- Centrifugar la microcolumna a 16,000 x g (14, 000 rpm).
- 6.- Retirar la microcolumna y descartar el líquido del tubo colector. Regresar la columna al tubo colector.
- 7.- Lavar la columna por adición de 700  $\mu$ l de solución de lavado de membrana a la microcolumna, previamente diluido en etanol al 95%.

- 8.- Centrifugar la microcolumna ensamblada por un minuto a 16,000 x g (14,000 rpm).
- 9.- Eliminar el contenido del tubo colector y regresar la microcolumna al tubo colector.
- 10.- Repetir el lavado con 500 µl de solución de lavado de membrana y centrifugar la microcolumna por 5 minutos a 16,000 x g.
- 11.- Retirar la microcolumna ensamblada, teniendo cuidado de no mojar el botón de la columna con el líquido del tubo colector.
- 12.- Vaciar el tubo colector y centrifugar nuevamente la columna por un minuto con la pestaña destapada para permitir la evaporación del etanol residual.
- 13.- Transferir la microcolumna a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.
- 14.- Aplicar 50 µl de agua libre de ARNsas directamente al centro de la columna sin tocar la membrana con la pipeta.
- 15.- Incubar a temperatura ambiente por un minuto.
- 16.- Centrifugar por un minuto a 16,000 x g.
- 17.- Descartar la microcolumna.
- 18.- Realizar la lectura de ADN con ND-1000 y almacenar el ADN eluido a 4°C o -20°C.

#### 7.1.4 Sistema de producción de ARN *in vitro* mediante el kit T7 RiboMAX™ (PROMEGA, Madison WI, USA; N° Cat. P1300)

1.- El ADN a trabajar debe estar libre ARNsas (si se sospecha de ello, tratar el ADN con proteinasa K a 100 µg/ml y SDS al 0.5% en 50nM Tris-HCl con pH 7.5 y 5 mM de CaCl<sub>2</sub> por 30 min a 37 °C). Realizar la reacción a temperatura ambiente agregando los componentes de la reacción en el siguiente orden:

Reactivo	Reacción de la muestra	Reacción testigo
Buffer RiboMax Express T7 2X*	10 µl	10
rNTPs (ATP, CTP, GTP, UTP) 25 mM	4	4
Cadena molde de ADN lineal (1 µg total)	1-8 µl	-
Cadena molde del testigo positivo Express Pgem (1 mg/ml)	-	1 µl
Agua libre de nucleasa	0-7 µl	7 µl
Mezcla de enzimas Express T7	2 µl	2 µl
VOLUMEN FINAL	20 µl	20 µl

\*Disolver perfectamente el buffer de enzimas calentando el buffer a 37°C y mezclar perfectamente.

2.- Mezclar gentilmente e incubar a 37°C por 30 minutos.

3.- Retirar el molde de ADN por digestión de ADNsa después de la reacción de transcripción utilizando el kit RQ1 libre de ARNsas, (Promega Madison, WI, USA) Agregando RQ1 ADNsa libre de ARNsas a una concentración de 1 unidad por microgramo de cadena molde de ADN.

Reactivo	Volumen
ARN en agua o buffer TE	1–8µl
Buffer de reacción RQ1 ARNse-Free ADNse 10X	1µl
ADNse RQ1 ARNse-Free (1u/µl)	1u/µg ARN
Agua libre de nucleasas	10µl

4. Incubar a 37°C por 30 minutos.
5. Agregar 1µl de solución de paro RQ1 ADNsa.
6. Incubar a 65°C por 10 minutos para inactivar las ADNsas.

#### **7.1.5 Purificación del ARN de síntesis *in vitro* con kit Rneasy (QIAGEN, Valencia, CA, USA; N° Cat. 74104)**

- 1.- Agregar a la columna Rneasy ensamblada en un tubo de 2 ml la mezcla con ADNsas.
- 2.- Aplicar 350 de buffer RW1 sobre la columna Rneasy, y centrifugar por 15 segundos a  $\geq 8$  mil x g para lavar. Descartar lo colectado.
- 3.- Poner con pipeta 500 µl de buffer RPE sobre la columna Rneasy, y centrifugar a 15 segundos a  $\geq 8$  mil x g para lavar.
- 4.- Agregar 500 µl de buffer RPE sobre la columna Rneasy, y centrifugar por 2 minutos a máxima velocidad para lavar la membrana Rneasy.
- 5.- Retirar el líquido colectado y centrifugar por un minuto a máxima velocidad.
- 6.- Transferir la columna de Rneasy en un nuevo tubo de 1.5 ml.
- 7.- Agregar de 30-50 µl de agua libre de ARNsa directamente sobre la membrana Rneasy.
- 8.- Centrifugar por un minuto a  $\geq 8$  mil x g para eluir.
- 9.- Repetir el paso 8.
- 10.- Alicuotar y colocar en hielo
- 11.- Almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **7.1.6 Método modificado de extracción de ácidos nucleícos virales mediante el kit Purelink viral RNA mini kit (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA; N° Cat. 12280-050)**

- 1.- Determinar el número exacto de muestras a trabajar.

- 2.- Multiplicar el número de muestras por 0.21, para determinar los mililitros de buffer de lisis a usar. Conservar este número.
- 3.- El resultado de la multiplicación anterior usarlo para multiplicar por 28. Con ello se calcula los microlitros del acarreador a usar del stock reconstituido y alicuotado conforme a las instrucciones del fabricante.
- 4.- En un tubo de centrifuga de 15 ml libre de ADNAs y ARNsas, agrega la cantidad de buffer de lisis calculado en el paso 2 y los microlitros de acarreador calculados en el paso 3. Mezclar con vortex unos segundos e identificar el tubo. Calcular el volumen final en microlitros del tubo y dividirlo entre el número de muestras a trabajar (la cantidad aproximada es de 210 microlitros/muestra).
- 5.- En un microtubo proveído en el kit (si no lo hubiese, usar un tubo de 1.5 mililitros) agregar 30 microlitros de proteinasa K proveído en el kit + 210 microlitros la mezcla preparada en el paso cuatro + 200 microlitros de la muestra problema. Cerrar perfectamente el vial y mezclar en el vortex por 15 segundos.
- 6.- Incubar la mezcla anterior a 56°C por 25 minutos.
- 7.- Centrifugar brevemente.
- 8.- Agregar 250 microlitros de etanol al 100% al microtubo incubado. Mezclar en el vortex por 15 segundos.
- 9.- Incubar por 5 minutos y luego centrifugar brevemente.
- 10.- Transferir el volumen del tubo (aproximadamente 675 microlitros) a una columna identificada y ensamblada en un tubo colector.
- 11.- Centrifugar a 6,800 x g por un minuto.
- 12.- Desechar el tubo colector y reemplazarlo por uno nuevo.
- 13.- Agregar 500 microlitros de buffer de lavado W5 reconstituido con etanol previamente.
- 14.- Centrifugar a 6,800 x g por un minuto. En caso de no realizarse el vaciado completo del buffer W5 de la columna, centrifugar a máxima velocidad por un minuto.
- 15.- Descartar el contenido del tubo colector y agregar nuevamente 500 microlitros de buffer de lavado W5
- 16.- Centrifugar a 6,800 x g por un minuto.
- 17.- Descartar el contenido del tubo colector y centrifugar por 1 minuto a máxima velocidad para remover cualquier excedente retenido en la columna.
- 18.- Colocar la columna en un nuevo tubo colector.
- 19.- Agregar de 10-50 microlitros de agua libre de ARNsas proveído en el kit.
- 20.- Incubar por un minuto.
- 21.- Centrifugar a máxima velocidad por un minuto.
- 22.- Alicuotar el líquido eluído con el ARN viral en microtubos de 0.6 ml identificados libres de ARNsas.
- 23.- Colocar los tubos en hielo a 4°C para cuantificar en espectrofotómetro Nanodrop ND-1000, y posteriormente almacenar a -70°C para su uso posterior.

### 7.1.7 Protocolo de RRT-PCR usando el kit Express qPCR Supermixes and Two-step qRT-PCR (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA; N° Cat. 11783-200 y 11754-050)

#### 7.7.1 Transcriptasa reversa con sistema VILO

- 1.- Cuantificar el ARN por espectrofotómetro Nanodrop 1000.
- 2.- Preparar una master mix sin ARN con los componentes a continuación mencionados:

Reactivo	Rxn
Buffer	4 µl
Enzima	2 µl
Iniciador 5'	1 µl
Iniciador 3'	1 µl
ARN	Hasta 2.5 µg
Agua libre de ARNsas y ADNsas	Ajustar a los 20 µl
Volumen final	20µl

- 3.- Mezclar con vortex y centrifugar brevemente
- 4.- Realizar la siguiente incubación:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	25 °C	10 min.
1	42 °C	120 min.
1	85°C	5 min.

### 7.1.8 Protocolo de qPCR

- 1.- Determinar el número de reacciones a trabajar y sumar a ese resultado 2 reacciones más. Es importante considerar que cada muestra se realizará por triplicado, incluyendo la curva estándar, los testigos negativos, positivos y NTC.
- 2.- Realizar la mezcla maestra con los componentes de la PCR en tubos separados según el número de genes a trabajar, considerando el número total de reacciones a ejecutar y las reacciones extras.

Reactivo	1 Rxn
Master mix	10 µl
Primer virus 5' [ 10 µM ]	1 µl
Primer virus 3' [ 10 µM ]	1 µl
Sonda virus [ 5 µM ]	1 µl
Primer gen constitutivo 5' [ 10 µM ]	1 µl

Primer gen constitutivo 3' [ 10 $\mu$ M ]	1 $\mu$ l
Sonda gen constitutivo[ 5 $\mu$ M ]	1 $\mu$ l
Agua libre de ARNsas y ADNsas	1 $\mu$ l
Molde de ADNc	3 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

- 3.- Agregar a cada tubo 17  $\mu$ l de la mezcla preparada y enseguida agregar 3  $\mu$ l de la reacción de RT.
- 4.- Tapar cada tubo con su tapa identificada y enseguida colocar los tubos en el carrusel correspondiente.
- 5.- Programar el termociclador con las siguientes condiciones:

Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	2 min.	50°C
1	2 min.	95°C
45	15 seg.	94°C
	30 seg.	60°C
	20 seg.	72°C

### 7.1.9 Preparación de la curva estándar con diluciones decuples

El siguiente protocolo está basado utilizando como material de inicio ARN producido por síntesis *in vitro*, o bien ADNc de retrotranscripción reversa.

- 1.- El tubo con cADN o ARN stock será identificado como tubo uno.
- 2.- A continuación se marcarán otros 8 tubos de 0.6 ml con los números consecutivos de 2 a 9.
- 3.- Colocar con una pipeta digital, 9  $\mu$ l de agua libre de ARNsas y ADNsas a los 8 tubos enumerados en el paso 2.
- 4.- Dependiendo de la concentración del material de inicio del ARN o ADNc, tomar 1000 ng/microlitro y agregarlo al tubo marcado con el número 2, para realizar una dilución 1:10.
- 5.- Vortexear por unos segundos.
- 6.- Realizar un breve paso de centrifugación por si quedo líquido retenido en las paredes del tubo.
- 7.- Con una punta nueva tomar 1  $\mu$ l del tubo 2 y agregarlo al tubo 3.
- 8.- Vortexear por unos segundos.
- 9.- Repetir los pasos 4 y 5 hasta completar la serie de diluciones requeridas.
- 10.- Registrar las concentraciones de cada dilución. Por ejemplo si la alicuota de ARN eluido con el que se inicio la RT tiene una concentración de 1105 ng/ $\mu$ l, la concentración de los tubos quedará de la siguiente forma:

curva estándar	ng/ $\mu$ l
Tubo 1 (alícuota)	1105
Tubo 2	110.5
Tubo 3	11.05
Tubo 4	1.105
Tubo 5	0.1105
Tubo 6	0.01105
Tubo 7	0.001105
Tubo 8	0.0001105
Tubo 9	0.00001105

### 7.1.10 Protocolo de RRT-PCR usado el kit Express 1 Step SS qRT-PCR universal (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA; N° Cat. 1 1781-200)

- 1.- Determinar el número de muestras a trabajar y sumar a ese resultado máximo 2 reacciones más. Es importante considerar que cada muestra se correrá por triplicado, incluyendo la curva estándar, los testigos negativos y positivos.
- 2.- Realizar la mezcla maestra con los componentes de la RT-PCR comunes, en tubos separados según el número de genes a trabajar, considerando el número total de reacciones a ejecutar y las reacciones extras.

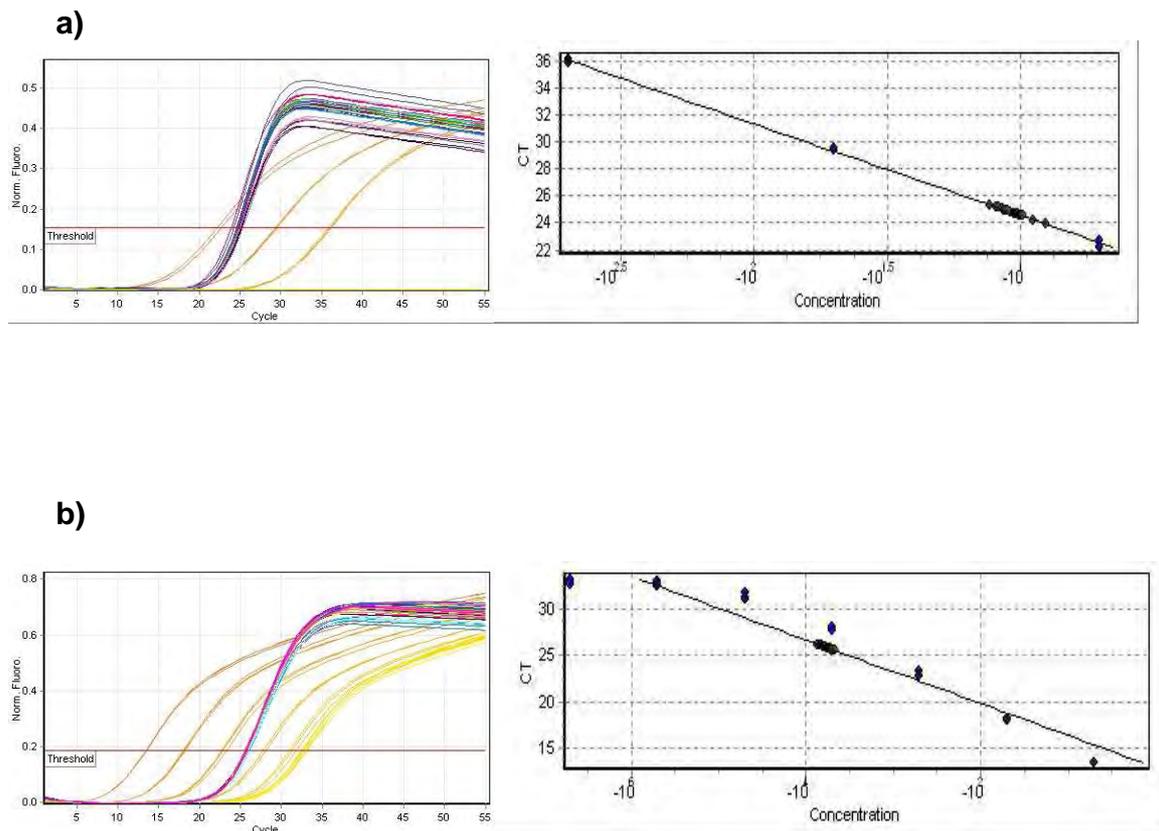
Componente	1 Rxn
Master mix	10 $\mu$ l
Primer virus 5' [ 10 $\mu$ M ]	1 $\mu$ l
Primer virus 3' [ 10 $\mu$ M ]	1 $\mu$ l
Sonda virus [ 5 $\mu$ M ]	1 $\mu$ l
Primer gen constitutivo 5' [ 10 $\mu$ M ]	1 $\mu$ l
Primer gen constitutivo 3' [ 10 $\mu$ M ]	1 $\mu$ l
Sonda gen constitutivo [ 5 $\mu$ M ]	1 $\mu$ l
Agua libre de ARNs y ADNsas	1 $\mu$ l
Molde de ARN	3 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

- 3.- Homogenizar el coctel en vortex y centrifugar brevemente.
- 4.- Agregar a cada tubo 17  $\mu$ l de la mezcla preparada y enseguida agregar 3  $\mu$ l de ARN cuantificado correspondiente por triplicado.
- 5.- Tapar cada tubo con su tapa identificada y enseguida colocar los tubos en el carrusel correspondiente.
- 6.- Programar el termociclador con las siguientes condiciones:

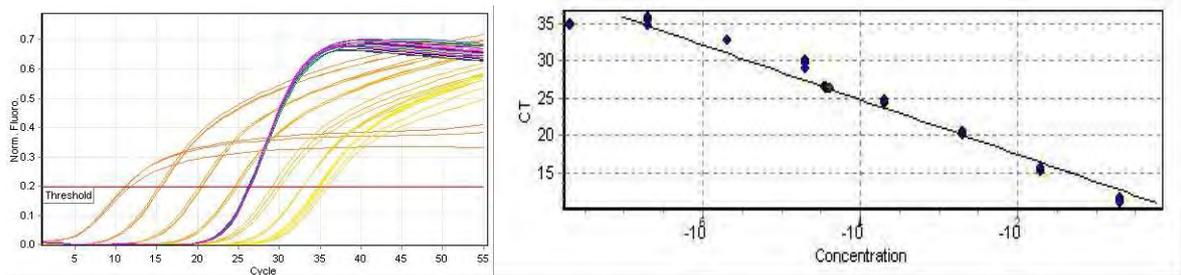
Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	15	50°C
1	2 min.	95°C
40	15 seg.	95°C
	30 seg.	60°C
	20 seg.	72°C

## 7.2 Graficas de amplificación de la RRT-PCR

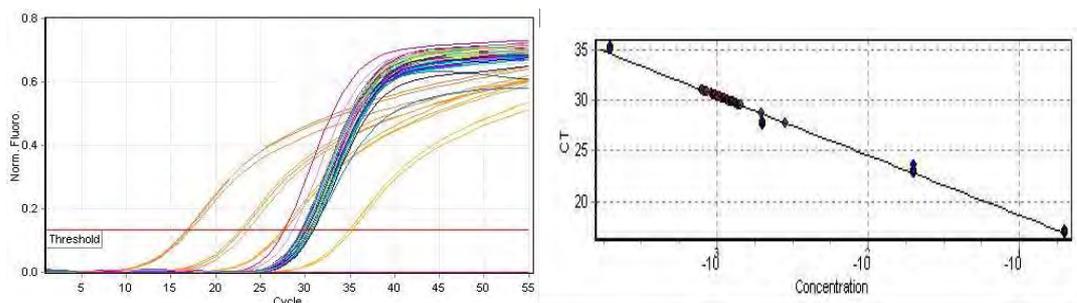
**Figura 14.** Gráficas de amplificación con curva estándar para cuantificación de ARN viral de muestras de cloaca y faringe de patos y pollos inoculados con virus de influenza aviar H5N2 BP.



c)



d)



### 7.3 Composición de medio de transporte viral D-MEM.

INGREDIENTE	CONCENTRACIÓN EN mg/L
Argina	84
Asparagina	-
Aspártico	-
Cisterna	56.8
Glutámico	-
Glutamina	584
Glicina	30
Histidina	42
Hidroxiprolina	-
Isoleucina	104.8
Leucina	104.8
Lisina	146.2
Metionina	30
Fenilalanina	66
Prolina	-
Serina	42
Treonina	95.2
Triptofano	16
Tirosina	72
Valina	93.6
Biotina	-
Pantotenato	4
Colina	4
Fólico	4
Inositol	7
Nicotinamida	4
Aminobenzoico	4
Riboflavina	0.4
Tiamina	4
Vitamina B12	-
Ca(NO3)2	264
KCl	400
MgSO4	200
CINa	6,400
Fosfatos	141.3
Glucosa	4.500
Piruvato	110
Glutation	-
Rojo fenol	15

Una vez reconstituido se esteriliza en autoclave a 124°C por 20 min. Finalmente se agrega bicarbonato sódico (15-20 mM) para alcanzar un pH de 7.2, más antibiótico Marca Gibco® a 0.1 ml por ml.