

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



**Caracterización molecular de la fibra de Adenovirus aviar grupo I
aislado de explotaciones avícolas en Perú**

Tesis para optar por el título profesional de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Elizabeth Sianquez Bautista

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Lima, Perú

2022

A mis padres, por todo su amor y sacrificio

A mi hermano, por ser mi fortaleza

A Jose, por alentarme a seguir mis sueños

AGRADECIMIENTOS

Al FONDECYT y a QUIMTIA S.A. por el financiamiento de esta tesis mediante el proyecto "Desarrollo de una vacuna polivalente contra la hepatitis a cuerpos de inclusión en cultivos celulares usando cepas de adenovirus aisladas de explotaciones avícolas del Perú" **Contrato/ N° 033-2019-FONDECYT-BM-INC.INV.**

Al Dr. Luis Jara Salazar y a la MV. Melanie Caballero García, por ser mis asesores de tesis y apoyarme durante la realización de la misma. Al PhD Juan Carlos Rodriguez Lecompte, por guiarme con sus conocimientos y hacer crecer mi interés hacia la investigación.

A la Dra. Sandra Palma Albornoz, por brindarme su asistencia y paciencia, y sobre todo su amistad.

Al laboratorio de Investigación y Desarrollo Feed de Quimtia S.A., por abrirme sus puertas y permitirme el uso de sus instalaciones y equipos para ejecutar mi tesis; así como a todos sus colaboradores que me integraron a su equipo y me brindaron su ayuda durante todo el proceso.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	8
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Diseño del estudio.....	12
Recolección de muestras.....	12
Extracción de ADN genómico/viral (ADNg).....	12
Diseño de cebadores para la PCRm	13
Evaluación de la especificidad de los cebadores.....	13
<i>In silico</i>	13
<i>PCR convencional individual</i>	14
Optimización de la PCRm empleando ADN genómico/viral	14
<i>Adición de MgSO₄ a diferentes temperaturas de alineamiento</i>	14
<i>Tiempo de extensión y número de ciclos</i>	15
Detección de los productos amplificados.....	15
Desarrollo de controles positivos con ADN plasmídico (ADNp).....	16
<i>Purificación del ADN a partir del gel de agarosa</i>	16
<i>Clonación y transformación</i>	16
<i>Digestión con enzimas de restricción</i>	16
<i>Secuenciamiento por el método de Sanger</i>	17
Sensibilidad de la PCRm.....	17
Especificidad de la PCRm.....	17
Evaluación de las muestras de HCI mediante la PCRm.....	18
Análisis de los datos.....	18
RESULTADOS.....	19
Extracción de ADN genómico/viral.....	19
Diseño de cebadores para la PCRm	19
Evaluación de la especificidad de los cebadores.....	20
<i>In silico</i>	20
<i>PCR convencional individual</i>	20
Optimización de la PCRm empleando ADN genómico/viral	22
<i>Adición de MgSO₄ a diferentes temperaturas de alineamiento</i>	22
<i>Tiempo de extensión y número de ciclos</i>	23
Desarrollo de controles positivos con ADN plasmídico	24

<i>Purificación del ADN a partir del gel de agarosa</i>	24
<i>Clonación y Transformación</i>	24
<i>Digestión con enzimas de restricción</i>	25
<i>Secuenciamiento por el método de Sanger</i>	26
Sensibilidad de la PCRm.....	26
Especificidad de la PCRm.....	27
Evaluación de las muestras de HCI mediante la PCRm.....	27
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	35
RECOMENDACIONES	36
REFERENCIAS	37
ANEXOS	43
Anexo 1. Secuencias de genes de la fibra y fibra 1 usados para el diseño de los cebadores. .	43
Anexo 2. Primera condición de PCR convencional	47
Anexo 3. Segunda condición de PCR convencional	47
Anexo 4. Programación de PCR convencional en termociclador	48
Anexo 5. Primera condición de PCRm	49
Anexo 6. Primera programación de PCRm en termociclador	49
Anexo 7. Segunda condición de PCRm con la adición de MgSO ₄	50
Anexo 8. Segunda programación de PCRm en termociclador (gradiente de Ta)	50
Anexo 9. Condición de la reacción de PCRm optimizada	51
Anexo 10. Programación en termociclador de PCRm optimizada.....	51
Anexo 11. Parámetros optimizados de cada cebador	52

RESUMEN

El objetivo del estudio fue caracterizar molecularmente los serotipos 4, 8b y 11 de Adenovirus aviar grupo I (FAdV-I) aislados de explotaciones avícolas peruanas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple (PCRm) basada en el gen de la fibra adenoviral. Para ello, se diseñaron cebadores a partir de secuencias de oligonucleótidos específicas del gen de la fibra para FAdV-4, 8b y 11. Se caracterizaron 30 aislamientos recolectados entre 1998 al 2021 compatibles a Hepatitis por Cuerpos de Inclusión (HCI) por histopatología. Se optimizó la PCRm a través de distintas condiciones y se desarrollaron controles plasmídicos positivos mediante clonación de los productos amplificados en un sistema bacteriano del tipo *Escherichia coli*. La PCRm optimizada presentó una sensibilidad de hasta 0.1132 ng/uL y 0.1132 pg/uL usando como templado ADN viral y plasmídico, respectivamente. Del total de 30 muestras evaluadas se identificaron que 14 aislados (46.7%) fueron positivos a FAdV-4, 12 (40%) a FAdV-8b y, dos (6.7%) a FAdV-11. Asimismo, se evidenció coinfección de FAdV-4 y 11 en un aislado (3.3%). Los resultados del PCRm se compararon con el secuenciamiento en base al gen del hexón (prueba de referencia); siendo la sensibilidad de 100% para identificar FAdV-4, 92.3% para FAdV-8b y 100% para FAdV-11. Los hallazgos del presente estudio sostienen que la caracterización molecular de la fibra mediante la PCRm puede constituir una técnica importante y práctica para la detección y diferenciación de los serotipos de FAdV-I.

Palabras clave: Adenovirus Aviar, PCR múltiple, fibra, Perú

ABSTRACT

The objective of the study was to molecularly characterize Fowl adenovirus group I (FAdV-I) serotypes 4, 8b and 11 isolated from Peruvian poultry farms using the Multiple Polymerase Chain Reaction (mPCR) based on the adenoviral fiber gene. For this purpose, primers were designed from specific oligonucleotide sequences of the fiber gene for FAdV-4, 8b and 11. 30 samples collected between 1998 and 2021 compatibles with Inclusion Body Hepatitis (IBH) by histopathology were characterized. The mPCR was optimized through different conditions and the positive control plasmids were developed by cloning of amplified products in a bacterial system of *Escherichia coli* type. Optimized mPCR presented a sensitivity of up to 0.1132 ng/uL and 1132 pg/uL using viral and plasmid DNA as template, respectively. Of the total of 30 samples evaluated, it was identified that 14 samples (46.7%) were positive for FAdV-4, 12 (40%) for FAdV-8b and, two (6.7%) for FAdV-11. Additionally, FAdV-4 and 11 coinfection was evidenced in one sample (3.3%). mPCR results were compared with hexon gene-based sequencing (gold standard test); being the sensitivity of 100% to identify FAdV-4, 92.3% for FAdV-8b and 100% for FAdV-11. The findings of the present study support that the molecular characterization of the fiber by mPCR could constitute an important and practical technique for the detection and differentiation of FAdV-I serotypes.

Keywords: Fowl adenovirus, multiplex PCR, fiber, Perú

INTRODUCCIÓN

El Adenovirus aviar grupo I (FAdV-I) es un patógeno reportado en la industria avícola que afecta a pollos de engorde, gallinas ponedoras y reproductoras (Yasmeen *et al.*, 2017; Schachner *et al.*, 2018).

Los FAdV-I, son virus de doble cadena de ADN sin envoltura, de aproximadamente 43 - 45 kilo pares de bases (kbp) y 70 a 90 nm de diámetro (Hess *et al.*, 2000; Benko *et al.*, 2005). Su material genético está cubierto por una cápside icosaédrica de 252 capsómeros en total, 240 conocidos como hexones y 12 como bases de pentón. Éstos últimos se encuentran unidos a uno o dos fibras que sobresalen de él y cuya unión se denomina pentón (Gelderblom y Maichle 1982; Hess *et al.*, 1995). Además de su importancia estructural, el hexón, la base del pentón y la fibra, median la interacción con los receptores de la célula hospedera durante la infección viral (Russell *et al.*, 2009). Por otro lado, los FAdV-I se dividen en 5 especies que a su vez se agrupan en 12 serotipos: FAdV-A (FAdV-1), FAdV-B (FAdV-5), FAdV-C (FAdV-4 y 10), FAdV-D (FAdV-2, 3, 9 y 11) y FAdV-E (FAdV-6, 7, 8a y 8b) (Harrach *et al.*, 2012).

Este virus se transmite de forma vertical, de aves reproductoras a su progenie; así como también de forma horizontal, a través del contacto con aves infectadas mediante la cama, heces, agua o fómites. Entre las enfermedades clínicas causadas por este virus se encuentran la erosión de la molleja, la pancreatitis, el hidropericardio, y la hepatitis por cuerpos de inclusión (HCI). Ésta última se caracteriza por lesiones en el hígado; el cual puede hallarse hemorrágico, necrótico, pálido, e incluso presentar agrandamiento y textura friable. Las aves presentan letargia y depresión, siendo afectada su conversión alimenticia y ganancia de peso; lo cual termina disminuyendo la producción de las explotaciones (Hess, 2000). Esta patología puede manifestarse por un repentino aumento

de mortalidad cuyo pico se da a los tres a cuatro días post infección, cesando entre los cinco y seis días después. Sin embargo, en algunos brotes las muertes han continuado hasta las tres semanas representando entre el 10% y hasta 30% de mortalidad (Silvera *et al.*, 2016).

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha identificado a FAdV-I a partir de regiones específicas y conservadas del gen hexón. Asimismo, al complementar esta técnica con el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) o el secuenciamiento de nucleótidos, se ha logrado diferenciar sus 12 serotipos (Raue y Hess 1998; Meulemans *et al.*, 2001; Meulemans *et al.*, 2004).

En Perú, se han caracterizado los serotipos 4, 8 y 11 del FAdV-I de muestras recolectadas en diferentes zonas entre el 2009 y el 2011, mediante PCR-RFLP basado en el gen del hexón (Chumbe *et al.*, 2012). Posteriormente, Rodríguez *et al.* (2014) por medio del análisis de una región del hexón, determinaron que 47 muestras de HCI aisladas en el país pertenecían al serotipo 4 del grupo FAdV-C; mientras que Silvera *et al.* (2016) identificaron en un brote de HCI la presencia de los serotipos 4 y 8b, de los cuales 18 (27.3%) pertenecieron al FAdV-4 y 48 (72.7%) a FAdV-8b. Por otro lado, a través del secuenciamiento del genoma completo de una cepa aislada en Arequipa, se identificó que ésta pertenecía al serotipo 8b (Izquierdo *et al.*, 2016). Asimismo, Gómez-Sánchez *et al.* (2010) reportaron la presencia de FAdV-5 valiéndose de la técnica de PCR-RFLP basado en el hexón.

De igual forma, la fibra constituye una proteína importante para el diagnóstico debido a la variabilidad de secuencias entre los serotipos de FAdV-I. El papel principal de esta proteína es el reconocimiento de los receptores celulares del huésped, lo que permite el ingreso del virus y afianza su tropismo celular. Siendo éstas las características que la

relacionan con la infectividad y patogenicidad de FAdV-I (Hess *et al.*, 1995; Guardado *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2018).

La fibra es variable entre las especies de adenovirus, siendo una fibra sencilla para FAdV-B (FAdV-5), FAdV-D (FAdV-2, 3, 9 y 11) y FAdV-E (6, 7, 8a y 8b) y doble (fibra 1 y fibra 2) para FAdV-A (FAdV-1) y FAdV-C (FAdV-4 y 10). Su composición de aminoácidos (aa) varía según el serotipo, así la fibra 1 de FAdV-4 posee 431 aa y la fibra 2 posee 479 aa (Marek *et al.*, 2012). Mientras, la única fibra de FAdV-8b contiene 523 aa y la fibra de FAdV-11 contiene 572 aa (Grgic *et al.*, 2014). Inicialmente, mediante el análisis filogenético, secuenciamiento, y la técnica de PCR-RFLP del gen de la fibra se han identificado cepas que pertenecen a un mismo serotipo pero que se han diferenciado en patogenicidad (Pallister *et al.*, 1996; Okuda *et al.*, 2006; Mase *et al.*, 2010). Recientemente se ha reconocido que la fibra 2 participa como un determinante de patogenicidad (Zhang *et al.*, 2018); mientras que la fibra 1 de FAdV-4 se encuentra directamente ligada a la infección viral a través de los dominios de su eje y cabeza (Wang *et al.*, 2020). Asimismo, la fibra 1 puede inducir protección contra cepas hipervirulentas y participar en la unión al receptor adenoviral y coxsackie (coxsackie and adenovirus receptor, “CAR”), importante para la infección de FAdV-4 (Wang *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

Si bien la PCR basada en el hexón seguida de la digestión enzimática o secuenciamiento puede identificar especies y serotipos de FAdV-I, los avances en biología molecular han ampliado la posibilidad de un diagnóstico más rápido y efectivo como la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCRm) (Bolívar *et al.*, 2014). Esta técnica tiene la ventaja de detectar y distinguir múltiples agentes patógenos usando una mezcla de diferentes sets de cebadores en una sola reacción, en lugar de correr varias PCR en forma

independiente (Elnifro *et al.*, 2000). En la industria avícola solo se han desarrollado PCRm capaces de diferenciar entre distintos patógenos incluyendo al FAdV-I, aunque no entre sus serotipos (Caterina *et al.*, 2004; Freick *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2019). Considerando lo mencionado, la PCRm facilitaría el diagnóstico de este virus en Perú, mas aun cuando no se cuenta con registros epidemiológicos de los serotipos circulantes desde el año 2016. De acuerdo a lo descrito, la PCRm constituye una técnica efectiva para un diagnóstico rápido; por lo que el objetivo del presente estudio fue caracterizar la presencia del gen de la fibra de los serotipos de FAdV-4, 8b y 11 en aislados provenientes de explotaciones avícolas peruanas mediante la optimización de la técnica de PCRm.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio observacional descriptivo. Con el fin de identificar molecularmente el gen de la fibra para los serotipos FAdV-4, 8b y 11 de FAdV-I en muestras positivas a HCI, se estandarizó la técnica de PCRm a partir del diseño de cebadores específicos para cada serotipo.

Recolección de muestras

Se trabajaron 30 muestras de hígados de embrión de pollo con diagnóstico compatible a HCI. Las muestras estuvieron almacenadas a -20°C y provinieron de un criobanco del laboratorio de Investigación y Desarrollo de Quimtia S.A. Se obtuvieron después de pasajes en huevos libres de patógenos específicos (SPF) a partir de aislados de hígado de pollo con diagnóstico a HCI (mediante histopatología), los cuales fueron recolectados entre 1998 al 2021 procedentes de diferentes zonas de Perú. Las aves reportaron depresión severa, pérdida de peso, disminución de la conversión alimenticia; además de presentar hepatomegalia y petequias distribuidas en el hígado durante la necropsia.

Para la optimización de la PCRm se utilizaron tres muestras previamente identificadas como FAdV-4, 8b y 11 mediante secuenciamiento en base al gen del hexón en el *Poultry Diagnostic and Research Center* (PDRC) de la Universidad de Georgia en EEUU.

Extracción de ADN genómico/viral (ADNg)

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de 0.25 mg de muestras de hígado de embrión de pollo utilizando el kit de extracción comercial *PureLink Genomic DNA mini kit* (Invitrogen-Thermo Scientific, EEUU) y siguiendo las recomendaciones del

fabricante. La concentración de ADN y pureza se determinó por espectrofotometría usando el *NanoDrop One C* (*Thermo Scientific*, EEUU). Las muestras fueron dispuestas en alícuotas y conservadas a -20°C hasta su uso.

Diseño de cebadores para la PCRm

In silico, mediante el programa informático *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) se seleccionaron las secuencias idénticas a la secuencia problema (*query sequence*) de la fibra y fibra 1 de FAdV. Se recopiló en formato FASTA la información de 83 secuencias, siendo 49 secuencias de la fibra 1 para FAdV-4, 18 y 16 secuencias de la fibra para los serotipos FAdV-8b y FAdV-11, respectivamente (Anexo 1). Las secuencias se sometieron a un alineamiento múltiple mediante el programa *Clustal Omega* (v. 2.0.12) para diseñar los cebadores (sentido y antisentido) de regiones variables entre los serotipos FAdV-4, 8b y 11, aunque de regiones conservadas para su serotipo diana. Se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: número de nucleótidos o longitud (20 a 25), temperatura de Fusión (TF) (50-60°C), porcentaje de nucleótidos Guanina y Citosina (GC%) (40-60%). Además, con el programa *Oligo Calc* (*Oligonucleotide Properties Calculator*) se evaluó la auto complementariedad y formación de estructuras secundarias de los cebadores. Finalmente, las secuencias de los cebadores se enviaron a sintetizar a un laboratorio externo (*Integrated DNA Laboratory*, EEUU).

Evaluación de la especificidad de los cebadores

In silico

Cada par de cebadores diseñados fueron sometidos a un análisis por BLAST nucleótidos (Rodríguez *et al.*,2018) para evaluar el porcentaje de identidad del serotipo al que pertenecen dentro de la base de datos del NCBI.

PCR convencional individual

A partir de las muestras de ADN identificadas previamente por secuenciamiento como serotipos FAdV-4, 8b y 11 se evaluó la especificidad de los cebadores sintetizados mediante la amplificación de los fragmentos esperados para cada serotipo. Para optimizar las condiciones de la PCR, se realizaron dos reacciones usando el PCR Master Mix 2x (*Promega corporation*, EEUU); la primera con 7.14 μM de concentración final de cebadores a dos distintas temperaturas de alineamiento (T_a) a 52 y 54°C (debido a la temperatura de fusión o melting más baja de los cebadores menos 5°C), y la segunda condición con 0.7 μM de concentración final de cebadores a una T_a de 54°C (Anexo 2, 3). Ambas reacciones se trabajaron con 40 ciclos en las condiciones del termociclador (Anexo 4). Luego, cada juego de cebadores se enfrentó a las tres muestras pertenecientes a cada serotipo para evaluar su especificidad, tomando en cuenta las condiciones de PCR del Anexo 3 y 4 (54°C de T_a). Las reacciones se realizaron en el termociclador T100 (*Bio Rad*, EEUU). Un control negativo se colocó en cada ensayo conteniendo agua ultrapura o libre de nucleasas en lugar de ADN.

Optimización de la PCRm empleando ADN genómico/viral

Se sometieron las condiciones optimizadas de la PCR convencional empleando los tres juegos de cebadores y los tres ADN templados (FAdV-4, 8b y 11) en una sola reacción. Para ello, se incrementó el volumen de PCR Master Mix 2x debido a la adición de componentes (Anexo 5). Se siguió la programación de termociclador del Anexo 6.

Adición de MgSO_4 a diferentes temperaturas de alineamiento

Para obtener mejor eficiencia de la reacción se adicionó 3.77 μM de MgSO_4 (Anexo 7) y; se realizó una gradiente de la temperatura alineamiento en la programación del

termociclador (Anexo 8) debido a las diferentes temperaturas de fusión de los juegos de cebadores detallados en el Anexo 11.

Tiempo de extensión y número de ciclos

Con el fin de eliminar la presencia de bandas inespecíficas y dímeros, se disminuyó el tiempo de extensión a 1 minuto y 30 segundos (tiempo promedio de extensión de acuerdo al tamaño de los fragmentos de la fibra) y, se redujo el número de ciclos a 20. De esta manera, las condiciones estandarizadas para la reacción de PCRm de una sola muestra de ADN se muestran en el Anexo 9, mientras que las condiciones del termociclador se describen en el Anexo 10.

Detección de los productos amplificados

Los productos fueron separados por electroforesis en 0.9% de gel de Agarosa (*Cleaver Scientific*, Reino Unido) sumergido en buffer *Tris-acetate-EDTA (TAE)* (*Cleaver Scientific*, Reino Unido) a una concentración de 1X a 120 voltios por 70 minutos. Se empleó el colorante *SYBR Safe DNA gel stain* (*Invitrogen-Thermo Scientific*, EEUU) en una proporción 1:10000 en el gel, mientras que el colorante de carga *6X TriTrack DNA Loading Dye* (*Invitrogen-Thermo Scientific*, EEUU) se empleó a una relación de 1:5 con cada producto de PCR. Se utilizó como marcador de peso molecular al *1Kb Opti-DNA Marker* (*Applied Biological Materials Inc.*, Canadá). Transcurrido el tiempo mencionado se visualizó en el transiluminador la positividad del gen amplificado mediante la presencia de una banda brillante del tamaño que le correspondiera según el serotipo.

Desarrollo de controles positivos con ADN plasmídico (ADNp)

Purificación del ADN a partir del gel de agarosa

Los productos de ADN obtenidos para cada serotipo se extrajeron y purificaron a partir del gel de agarosa mediante el kit *Zymoclean Gel DNA Recovery* (*Zymo Research*, EEUU), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Clonación y transformación

Con la finalidad de tener a disposición constante las secuencias de cada serotipo viral amplificado, se procedió al clonamiento de éstas en un sistema bacteriano. Se utilizó el vector *TOPO TA cloning kit for subcloning* (*Invitrogen-Thermo Scientific*, EEUU), siguiendo las sugerencias del fabricante. Seguidamente, se realizó el proceso de transformación por choque térmico con las células competentes de *Escherichia coli* DH5 alfa (*Invitrogen-Thermo Scientific*, EEUU). Las bacterias se sembraron en agar LB (*Sigma-Aldrich*, EEUU) conteniendo ampicilina, IPTG y X-gal para realizar la técnica de cribado azul/blanco (visualización de colonias blancas con inserto de secuencias amplificadas, y colonias azules sin inserto). Se seleccionaron las colonias blancas conteniendo a los clones de ADN plasmídico (ADNp) para elaborar la *MASTER PLATE* (placa maestra con clones de trabajo). Posteriormente, mediante el kit *GenElute Plasmid Miniprep* (*Sigma-Aldrich*, EEUU) se purificó el ADNp, verificando su correcta extracción al visualizar las diferentes formas del plásmido (superenrollado, circular, linear) en electroforesis. en una electroforesis.

Digestión con enzimas de restricción

Para corroborar que los insertos esperados de las secuencias de FAdV 4, 8b y 11 se encuentren integrados en los plásmidos obtenidos, se empleó la enzima *ECO RI* (*Thermo Scientific*, EEUU) según las indicaciones del fabricante. Al término del procedimiento se

realizó una electroforesis de los plásmidos digeridos en donde se evaluó la presencia de dos bandas, una del tamaño del vector (3.9 kbp) y la otra correspondiente al tamaño del inserto de la fibra según el serotipo.

Secuenciamiento por el método de Sanger

Los ADN plasmídicos provenientes de la clonación de productos de PCR, se secuenciaron en la empresa Macrogen (Seúl, Corea). Mediante BLAST nucleótidos se verificó el porcentaje de identidad del fragmento amplificado frente a las secuencias del serotipo al que pertenecen dentro de la base de datos del NCBI.

Sensibilidad de la PCRm

Para conocer el límite de detección de la PCRm, se realizaron diluciones seriadas (1:10) de las tres muestras de ADN genómico trabajadas, y de las tres muestras de ADN plasmídico desarrolladas. Bajo las condiciones del Anexo 7, se preparó la primera reacción con una concentración final de cada ADN de 11.32 ng/uL y, posteriormente se realizaron 8 diluciones seriadas hasta alcanzar una concentración final para cada ADN de 11.32×10^{-8} ng/uL. Las condiciones del termociclador se encuentran descritos en el Anexo 10.

Especificidad de la PCRm

Para conocer la capacidad de la PCRm de solo detectar y diferenciar FAdV-4, 8b y 11, se prepararon reacciones empleando el ADN de otros virus aviares: virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus de la bursitis infecciosa (IBDV), virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILTV), Adenovirus aviar grupo III (FAdV-III), y los serotipos FAdV-7 y 9 de FAdV-I. Se utilizó como control positivo el ADNp obtenido de cada serotipo.

Evaluación de las muestras de HCI mediante la PCRm

Se realizó una reacción de la PCRm optimizada para cada muestra de ADNg; mientras que la reacción del control positivo empleó los tres ADNp desarrollados en simultáneo. Las condiciones de la PCRm y termociclador se describen en los Anexos 9 y 10. La concentración final de cada ADNg estuvo dentro del rango de 7.54-15.09 ng/ μ L y, la concentración empleada para cada ADNp fue de 11.32×10^{-3} ng/ μ L o 11.32 pg/ μ L.

Por otro lado, los 30 aislados diagnosticados por histopatología como HCI fueron enviados a secuenciamiento en base al gen del hexón (prueba de referencia) en el PDRC para la identificación de su serotipo.

Análisis de los datos

Cada producto amplificado de las muestras del criobanco se compararon con los controles plasmídicos para identificar a qué serotipo de FAdV-I pertenecieron. Asimismo; se compararon estos resultados con los obtenidos por secuenciamiento del hexón, determinándose en una tabla la sensibilidad de la técnica optimizada (PCRm basado en la fibra) frente a la prueba de referencia (secuenciamiento basado en el hexón).

RESULTADOS

Extracción de ADN genómico/viral

Las concentraciones de ADNg dieron entre 200 a 500 ng/μL por espectrofotometría, confirmando su pureza con una relación de absorbancia A260/280 entre 1,8-2,0. Para su uso en las reacciones de PCR se llevaron a una concentración dentro del rango de 100 a 200 ng/uL.

Diseño de cebadores para la PCRm

In silico se obtuvieron las secuencias de los cebadores sentido y antisentido para cada serotipo de FAdV-I (Cuadro 1). Los parámetros de cada cebador según el laboratorio de origen se muestran en el Anexo 10.

Cuadro 1. Cebadores diseñados para la identificación de los serotipos de FAdV-I

Serotipo	Gen	Nombre	Secuencias	Posición	Producto(pb ³)	
FAdV-4	Fibra 1	Ad4S ¹	5'GTACCTTTGGAG GGTGCGA 3'	87-107	1186	
		Ad4A ²	5'CGTTGGGGGAGT AGACGTAACCCT 3'	1253-1276		
		Ad8bS ¹	5'GTTGATGATGTC GACTGGGAGTTA 3'	460-484		978
		Ad8bA ²	5'TGCGGAAGGTCC CTTGTATCTC 3'	1416-1438		

FAdV- 11	Fibra	Ad8bS ¹	5'ATGGGACAGCAC	31-53	1655
			TCCAGCCGAA 3'		
		Ad8bA ²	5'ACAGGAGTAGAA	1663-1686	
			AAGGGTCCGAT 3'		

¹ sentido

²antisentido

³pares de bases

Evaluación de la especificidad de los cebadores

In silico

Mediante el análisis por BLAST de nucleótidos, se verificó la especificidad de cada juego de cebadores con sus correspondientes secuencias dianas. Se obtuvo un porcentaje de identidad entre 90-100% entre serotipos de su misma especie, sin interferencia con otras especies de Adenovirus aviar u otros virus aviares.

PCR convencional individual

La primera reacción de PCR con una concentración final de cebadores de 7.14 µM y a dos distintas Ta (52°C y 54°C), mostró por electroforesis la amplificación de los fragmentos esperados para cada serotipo (Figura 1). No se observó diferencias entre las Ta, por lo que la segunda reacción se trabajó con una Ta a 54°C debido a ser la temperatura más cercana a la temperatura de fusión de los cebadores de FAdV 4 y 11. Asimismo, al disminuir la concentración final de los cebadores de 7.14 µM a 0.7 µM, se observó una mejor eficiencia de los productos amplificados y una disminución en la cantidad de dímeros (Figura 2). Finalmente, con las condiciones de la segunda reacción, se evaluó la especificidad de los cebadores para cada serotipo (Figura 3). La electroforesis

reveló los productos esperados para cada serotipo, los cebadores Ad4S y Ad4A amplificaron un producto de 1186 pb perteneciente a FAdV-4, pero no amplificaron los productos para las muestras de los serotipos FAdV-8b y 11. El par de cebadores Ad8bS y Ad8bA amplificaron un producto de 978 pb aproximadamente para FAdV-8b y no amplificaron para FAdV-4 y 11. Por último, el par de cebadores Ad11S y Ad11A amplificaron un producto de 1655 pb para la muestra FAdV-11 pero no para FAdV-4 y 8b. Los resultados obtenidos determinaron que los cebadores diseñados fueron específicos para cada serotipo.

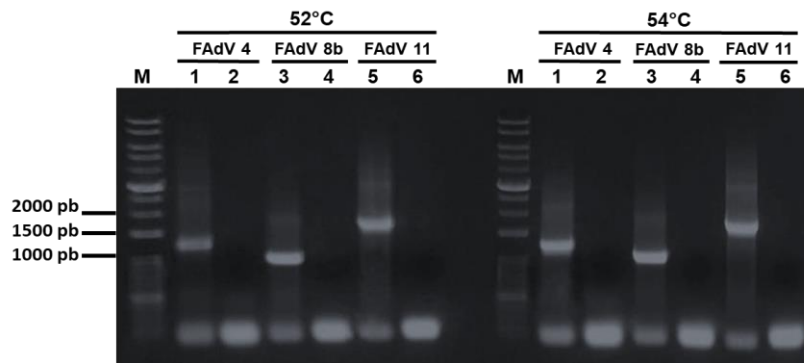


Figura 1. Electroforesis de la PCR con Ta de 52 y 54°C, concentración final de cebadores a 7.14 μ M. M: marcador; carril 1: muestra FAdV-4; carril 2: control sin ADN; carril 3: muestra FAdV-8b; carril 4: control sin ADN; carril 5: muestra FAdV-11; carril 6: control sin ADN.

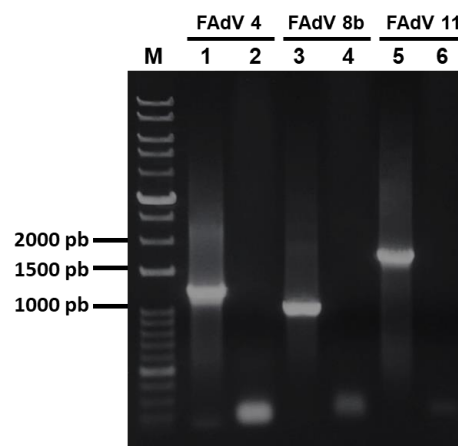


Figura 2. Electroforesis de la PCR con Ta de 54°C, concentración final de cebadores a 0.7 µM. M: marcador; carril 1: muestra FAdV-4; carril 2: control sin ADN; carril 3: muestra FAdV-8b; carril 4: control sin ADN; carril 5: muestra FAdV-11; carril 6: control sin ADN.

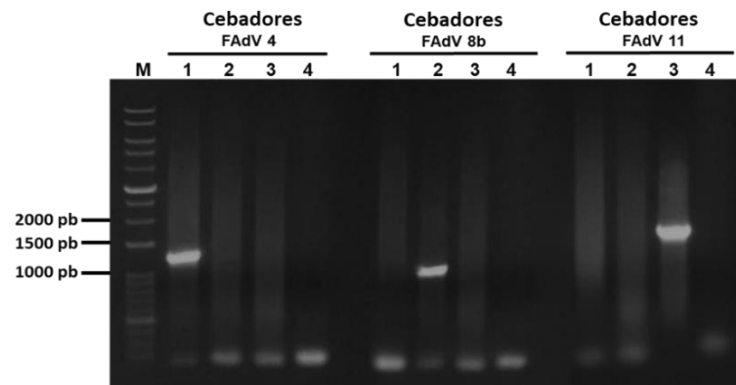


Figura 3. Electroforesis de la PCR para evaluar especificidad de los cebadores. M: marcador; FAdV-4: PCR con cebadores de FAdV-4; FAdV-8b: PCR con cebadores de FAdV-8b; FAdV-11: PCR con cebadores de FAdV-11. Carril 1: muestra FAdV-4; carril 2: muestra FAdV-8b; carril 3: muestra FAdV-11; carril 4: control sin ADN.

Optimización de la PCRm empleando ADN genómico/viral

Al emplear las condiciones del Anexo 5 y 6, en la Figura 4a se visualizó dos amplicones intensos pertenecientes a FAdV-4 y 11. Sin embargo, no se logró observar el tercer amplicón correspondiente al FAdV-8b a la temperatura de alineamiento a 54°C.

Adición de MgSO₄ a diferentes temperaturas de alineamiento

Al adicionar MgSO₄ se mejoró la visualización de los amplicones, siendo estos más definidos y sin presencia de barrido. A la Ta de 51°C se logró observar los tres amplicones esperados intensos y definidos, aunque aparecieron bandas inespecíficas entre los 400 y

600 pb (Figura 4b). En la PCRm con 54°C de Ta se observó amplicones definidos e intensos de FAdV-4 y 11, mientras que el amplicón de FAdV-8b se presentó tenue. Nuevamente, se observa una banda inespecífica de 400 pb (Figura 4c). A una Ta de 57°C solo se observó los amplicones pertenecientes a FAdV-4 y 11, mientras que la banda inespecífica se presentó tenue (Figura 4d). Estos resultados mostraron que a Ta de 51°C se obtuvo los tres amplicones más definidos comparados a las otras dos Ta. Aunque, con presencia de bandas inespecíficas y dímeros.

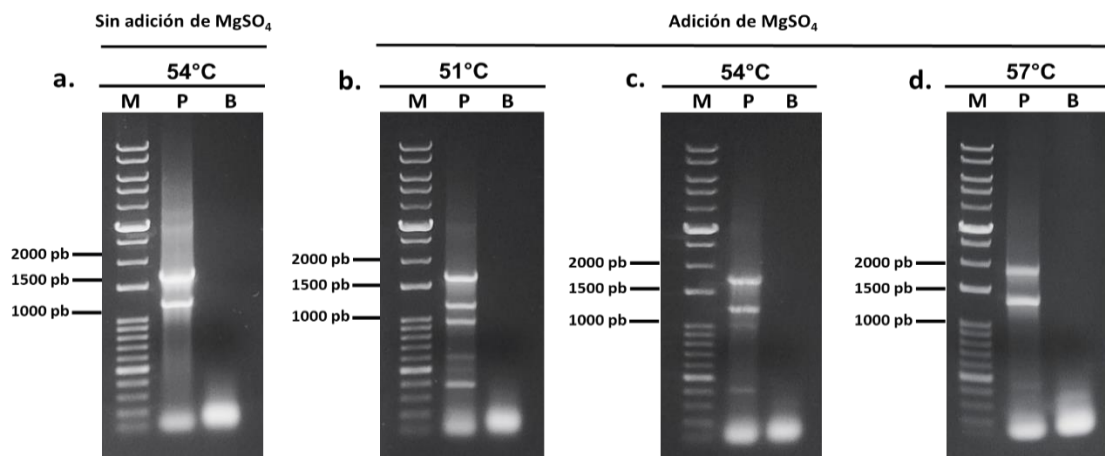


Figura 4. Electroforesis de la PCRm sin adición de $MgSO_4$ y con adición de $MgSO_4$ a diferentes temperaturas de alineamiento. M: marcador; P: PCRm con tres templates (FAdV-4, 8b y 11); B: control sin ADN.

Tiempo de extensión y número de ciclos

Para eliminar las bandas inespecíficas y los dímeros se disminuyó el tiempo de extensión y el número de ciclos manteniendo la Ta de 51°C. Bajo estas condiciones se observó la desaparición de las bandas inespecíficas entre los 400-600 pb, y una evidente disminución de la cantidad de dímeros (Figura 5).

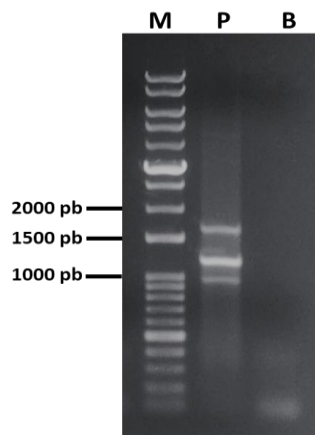


Figura 5. Electroforesis de la PCRm a menor tiempo de extensión y menor número de ciclos. M: marcador; P: PCRm con tres templados (FAdV-4, 8b y 11); B: control sin ADN.

Desarrollo de controles positivos con ADN plasmídico

Purificación del ADN a partir del gel de agarosa

A partir de la electroforesis de la Figura 3, se obtuvieron los amplicones para FAdV-4, 8b y 11, los cuales se extrajeron del gel para su purificación.

Clonación y Transformación

Luego del proceso clonación/transformación se diferenció colonias blancas de clones con vector, a partir de las cuales se realizó un banco maestro de clones que se conservaron a -20°C . A partir de éstos, se extrajeron los ADNp de cada serotipo verificando su correcta purificación al visualizar las distintas formas del plásmido en la electroforesis (Figura 6).

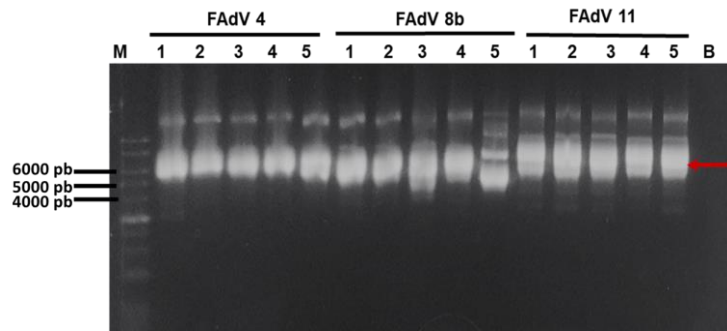


Figura 6. Electroforesis de plásmidos purificados con el inserto amplificado según cada serotipo. M: marcador; FAdV-4: plásmidos de FAdV-4; FAdV-8b: plásmidos de FAdV-8b; FAdV-11: plásmidos de FAdV-11. B: control sin ADN. Flecha roja: formas del plásmido.

Digestión con enzimas de restricción

Mediante la digestión de los plásmidos con la enzima *ECO RI*, se comprobó la presencia de los insertos del fragmento de la fibra y la banda perteneciente al resto del vector (Figura 7). La enzima cortó a los extremos del inserto en el vector TOPO TA (3.9 kb) brindando dos fragmentos: uno correspondiente al tamaño del inserto (FAdV-4: 1186, 8b: 976 y 11: 1655) y otro correspondiente al tamaño del resto de bp del vector.

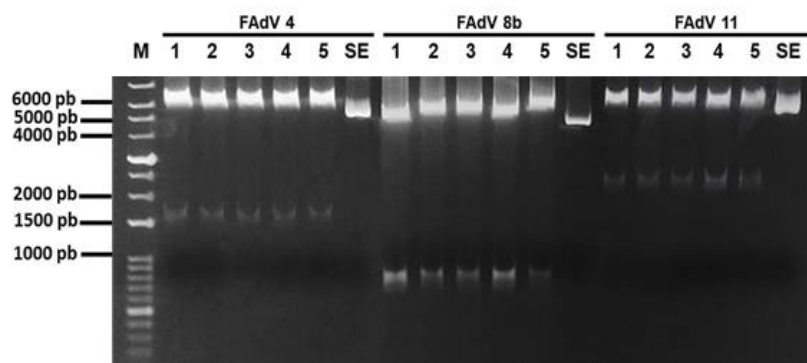


Figura 7. Electroforesis de la digestión enzimática de los plásmidos conteniendo la secuencia de FAdV según cada serotipo. M: marcador; FAdV-4: plásmidos de FAdV-4;

FAdV-8b: plásmidos de FAdV-8b; FAdV-11: plásmidos de FAdV-11. SE: control negativo (plásmido sin enzima).

Secuenciamiento por el método de Sanger

Los productos de la fibra y fibra 1 clonados y secuenciados a partir de los plásmidos de cada serotipo (FAdV-4, 8 y 11) se analizaron mediante BLAST nucleótidos. Los resultados mostraron un porcentaje de identidad de hasta 99.7% con secuencias del fragmento de la fibra anotadas en el NCBI para FAdV-4, 98% para FAdV-8b y 97.3% para FAdV-11, corroborando que cada inserto corresponde a su serotipo y especie específica.

Sensibilidad de la PCRm

En la Figura 8 se observó que el límite de detección de ADNg y ADNp de cada serotipo a partir de 11.32 ng/uL, fue a la dilución de 10^{-2} y 10^{-5} respectivamente. Según lo obtenido, se puede emplear el control positivo hasta una concentración de 11.32×10^{-5} ng/uL o 0.1132 pg/uL de cada plásmido; mientras que el ADN genómico se puede emplear hasta una concentración de 11.32×10^{-2} ng/uL o 0.1132 ng/uL de cada serotipo.

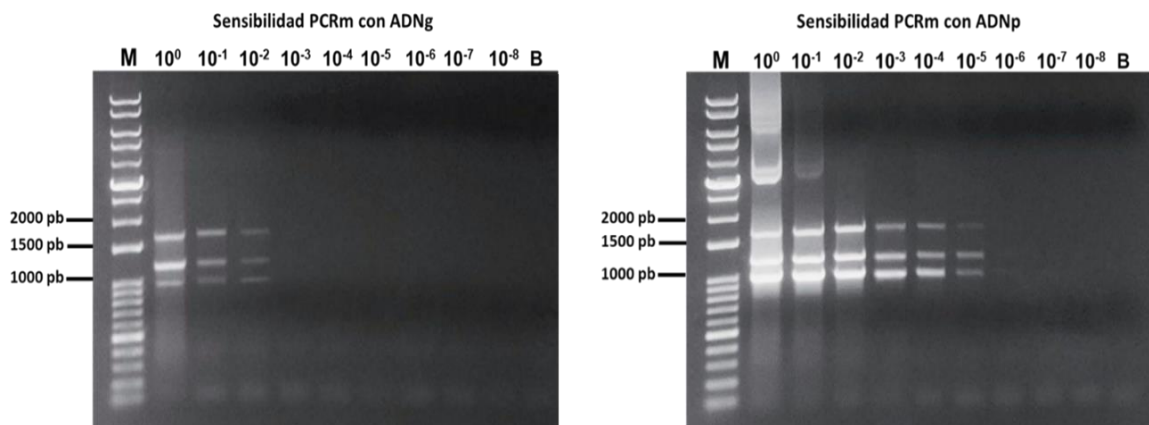


Figura 8. Electroforesis para evaluar la sensibilidad de la PCRm con ADN genómico y ADN plasmídico. M: marcador; 10^0 - 10^{-8} : PCRm a distintas diluciones a partir de 11.32 ng/uL; B: PCRm control sin ADN.

Especificidad de la PCRm

En la Figura 9 se comprueba que la PCRm no es capaz de amplificar NDV, IBDV, ILTV, FAdV-III, ni a los serotipos 7 y 9 de FAdV-I. Por lo tanto, la técnica optimizada es específica para los serotipos FAdV-4, 8b y 11 de FAdV-I.

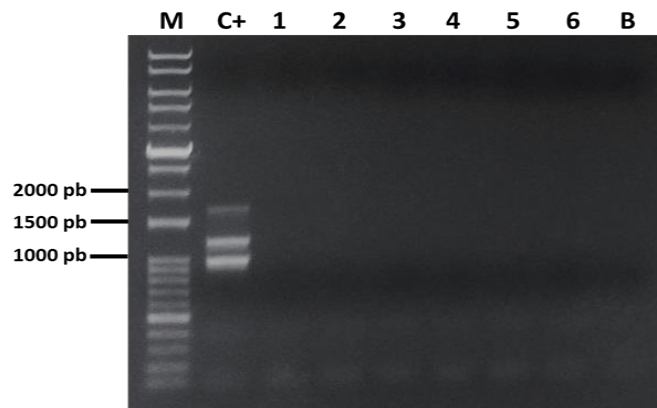


Figura 9. Electroforesis para evaluar la especificidad de la PCRm. M: marcador; C+: control positivo de ADNp, 1: NDV, 2: IBDV, 3: ILTV, 4: FAdV-III, 5: FAdV-7, 6: FAdV-9, B: PCRm control sin ADN.

Evaluación de las muestras de HCI mediante la PCRm

Se corrió los productos de PCRm de todas las muestras positivas a HCI, así como el control plasmídico (Figura 10).

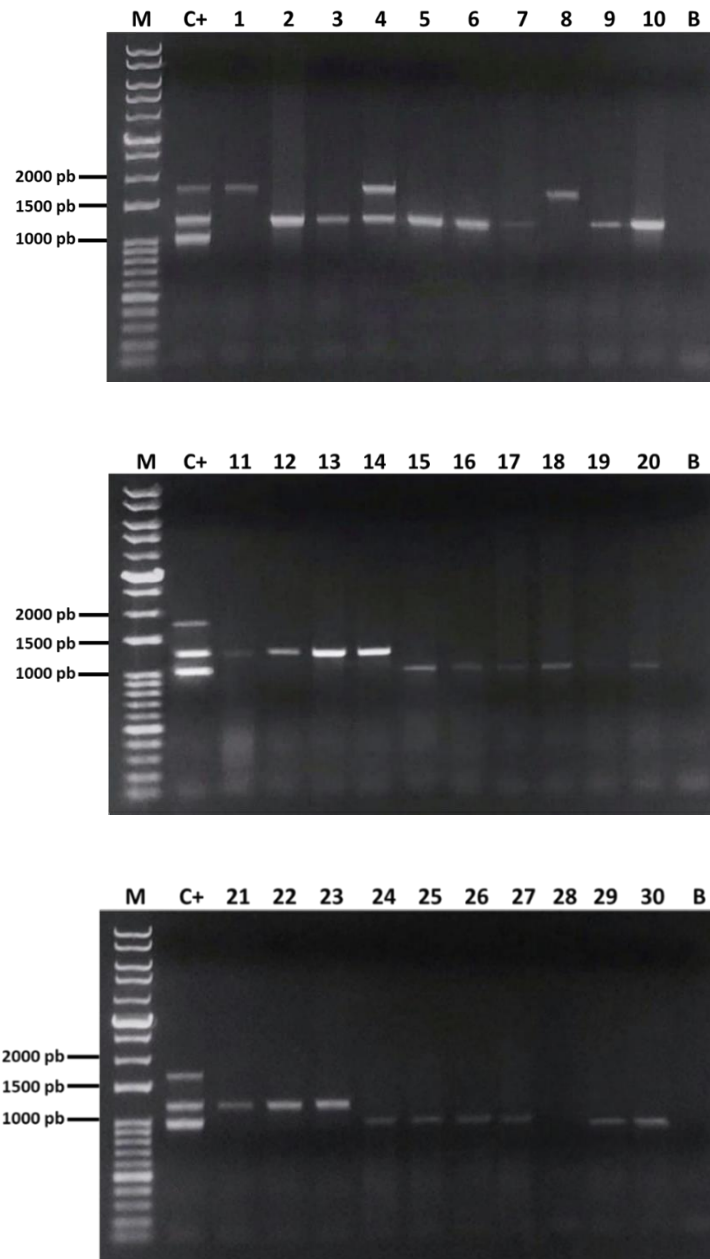


Figura 10. Electroforesis de los productos de la PCR múltiple de las 30 muestras de FAdV-I. M: marcador; C+: control positivo de ADNp; carril 1 al 30: muestras; B: control sin ADN.

Se logró caracterizar los serotipos 4, 8b y 11; de los cuales 14 muestras (46.7%) fueron positivas a FAdV-4, 12 (40%) a FAdV-8b y, dos (6.7%) a FAdV-11. Asimismo, se

observó la presencia de una coinfección entre FAdV-4 y FAdV-11 (3.3%); mientras que una muestra (3.3%) dio resultado negativo.

Posteriormente, para determinar la sensibilidad de la PCRm frente al secuenciamiento en base al hexón se compararon los resultados obtenidos de ambas pruebas diagnósticas (Cuadro 2). La muestra de coinfección entre FAdV-4 y 11 fue tomada como positiva para ambos serotipos.

Cuadro 2. Sensibilidad de la PCR multiplex frente al secuenciamiento.

Serotipos	Secuenciamiento	PCR Multiplex	Sensibilidad
	Gen hexón	Gen fibra	del PCRm (%)
FAdV-4 ¹	15	15	100%
FAdV-8b	13	12	92.3%
FAdV-11	2	3	100%

¹Detección del fragmento de la fibra 1 para el caso de FAdV-4

DISCUSIÓN

Los serotipos FAdV-4, 8b y 11 son de importancia avícola en Perú debido a la mayor presencia de éstos en las granjas avícolas, por lo que urge la necesidad de su detección temprana y específica. Las técnicas como agar doble difusión, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), inmunofluorescencia, neutralización viral y PCR son capaces de diagnosticar FAdV-I (Saifuddin *et al.*, 1990; Hess *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2003). Por otro lado, la PCR convencional complementada por RFLP o secuenciamiento a partir de regiones del hexón permiten la identificación de sus serotipos (Meulemans *et al.*, 2001; Steer *et al.*, 2009; Günes *et al.*, 2012). En la investigación desarrollada, se caracterizó molecularmente la fibra de FAdV-4, 8b y 11 a través de la optimización de una PCRm; como alternativa de prueba diagnóstica específica, sensible, práctica y económicamente viable para la detección temprana de FAdV-I.

El diseño de los cebadores y su especificidad fueron factores claves para lograr una PCRm exitosa, porque al emplear más de un par de cebadores se puede causar interferencias e incrementar la obtención de productos inespecíficos (Bolívar *et al.*, 2013; Elnifro *et al.*, 2000). Los cebadores serotipo-específicos para la fibra 1 (FAdV-4) y la fibra (FAdV-8b y 11) diseñados en este estudio, se sometieron a una búsqueda de BLAST que garantizó la exclusividad para sus secuencias dianas. Mediante este mismo método, Oni *et al.* (2017) demostraron que el diseño de sus cebadores fue único para la detección de rotavirus aviares. Adicionalmente, se realizó PCR para cada cebador frente a los tres serotipos estudiados y se confirmó que solo amplificaron sus secuencias dianas sin la amplificación de productos inespecíficos o reacciones cruzadas.

Por otro lado, el resultado de la concentración final de cebadores en la PCRm fue de 0.37 uM, valor dentro del rango de 0.1-10 uM empleado en otros reportes. Freick *et al.* (2008) emplearon una concentración final de 0.2 uM para la detección de Adenovirus aviar grupo I, mientras que Caterina *et al.* (2004) emplearon una concentración de 10.5 uM para la optimización de PCRm en FAdV-I y otros virus aviares.

Otros factores involucrados en la eficiencia de una PCR múltiple fueron la combinación adecuada entre los componentes de la reacción, la temperatura de alineamiento y el número de ciclos (Bolívar *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2019).

Uno de los componentes fundamentales es el magnesio (Mg^{2+}), cofactor de la *Taq polimerasa*. Su adecuada concentración mejora la eficiencia de la reacción; si ésta es insuficiente se observa un bajo rendimiento, mientras que en exceso aparecen productos inespecíficos (Bolívar *et al.*, 2000). Henegariu *et al.* (1997) recomiendan que al aumentar gradualmente la concentración de Mg^{2+} desde rangos de 1.8 mM hasta 10.8 mM en una PCRm se observan efectos positivos como la desaparición de bandas inespecíficas y mayor intensidad de los productos amplificados. En la optimización del PCRm, al emplear 1.53 mM de Mg^{2+} solo se obtuvo los productos amplificados de FAdV-4 y 11; al adicionar este componente hasta una concentración final de 5.18 mM se logró detectar el amplicón de FAdV-8b. Este valor de concentración empleado fue similar a la concentración de 4 mM utilizada por Yao *et al.* (2019) para la optimización de una PCRm para la identificación de FAdV-I y de otros virus aviares en patos.

La temperatura de alineamiento es determinante para la eficiencia de la amplificación. Altas temperaturas dan una amplificación más específica; aunque en este caso condujo a una pérdida de amplificación de las secuencias dianas y disminución del rendimiento de la reacción (Zangerberg *et al.*, 1999, Bolivar *et al.*, 2014). La eficiencia mejoró reducir el

número de ciclos y al disminuir el tiempo de extensión a 1 minuto 30 segundos, promedio requerido según el tamaño de cada amplicón (1 minuto por cada 1000 bp) (Bolívar *et al.*, 2014). A 40 ciclos se obtuvieron bandas intensas y gruesas, así como bandas inespecíficas por debajo de los amplicones esperados; mientras que a 20 ciclos desaparecieron las bandas inespecíficas y los dímeros. Este número de ciclos se encuentra en el rango de ciclos empleados (35 ciclos) en diferentes optimizaciones de PCRm en adenovirus aviares como lo describen Caterina *et al.* (2004), De la Torre *et al.* (2018b), y Yao *et al.* (2019).

La obtención de los plásmidos mediante el clonado de productos de PCR con el vector TOPO TA brindó la ventaja de producir controles positivos de cada serotipo necesarios para la interpretación de resultados. De la misma forma, Freick *et al.* (2008) emplearon el vector mencionado para generar controles plasmídicos para una PCRm capaz de detectar patógenos que afectan a aves. Bajo esta metodología se acortó el tiempo de desarrollo de controles, además de generar menores costos a comparación de aislar y producir cada cepa viral por pasaje en huevos embrionados.

Determinar la sensibilidad de la PCRm facilitó conocer el rango de concentración de ADNg o ADNp que se puede emplear para obtener una reacción eficiente. Además de ello, se verificó su capacidad de amplificación frente a otros virus aviares determinándose la especificidad de la técnica solo para FAdV-4, 8b y 11. Por consiguiente, la técnica no amplificaría a FAdV-5 hallado anteriormente en el país (Gómez-Sánchez *et al.*, 2010); y no sería capaz de caracterizar un aislado perteneciente a dicho serotipo.

La detección molecular de los serotipos de FAdV-I son generalmente realizados por PCR-RFLP y el análisis de secuenciamiento a partir de cebadores específicos de regiones del hexón (Raue y Hess 1998; Meulemans *et al.*, 2001; Steer *et al.*, 2009), debido principalmente a la disposición de cebadores diseñados y por ser técnicas con protocolos

establecidos. No obstante, conllevan mayor tiempo de procesamiento y entrega de resultados, requiriendo un analista con experticia para evitar confusiones y contaminaciones.

La presente investigación, describe por primera vez el desarrollo de una PCR múltiple capaz de detectar y diferenciar entre los tres serotipos de FAdV-I (FAdV-4, 8b y 11) más frecuentes en Perú. A diferencia de las técnicas mencionadas, la PCRm se basa en el diseño de cebadores a partir de fragmentos específicos del gen que codifica para la fibra, proteína relacionada con la adherencia y patogenicidad (Hess *et al.*,1995; Zhang *et al.*,2018; Pan *et al.*,2020). La PCRm brinda un diagnóstico más rápido, y efectivo permitiendo distinguir en simultáneo los tres serotipos señalados usando una sola mezcla de reacción (Elnifro *et al.*,2000; Bolívar *et al.*,2014). Debido a ello, se reduce el tiempo de trabajo y el tiempo de entrega de resultados; lo cual conlleva a un menor uso de materiales, y en consecuencia menores costos de laboratorio.

Son pocos los trabajos que reportan la detección de virus aviares por PCRm incluyendo FAdV-I. Estos estudios reportan la detección de adenovirus basados en la identificación por el hexón pero no distinguen serotipos. Entre ellos, se encuentra el trabajo de Caterina *et al.* (2004) donde identificaron por PCRm la presencia de varios virus en simultáneo como: FAdV-I, Reovirus Aviar, Virus de la enfermedad de la Bursa Infecciosa y el virus de la Anemia en pollos. De igual forma, Freick *et al.* (2008) identificaron FAdV-I, herpesvirus y circovirus en palomas; y recientemente, Yao *et al.* (2019) desarrollaron una PCRm capaz de detectar simultáneamente 7 virus de patos entre ellos el FAdV-I.

En Perú no se cuenta con registros de estudios epidemiológicos de brotes de HCI desde el año 2016, los cuales han señalado principalmente a los serotipos FAdV- 4, 8b y 11, como los causantes de pérdidas económicas en la industria avícola (Izquierdo *et al.*, 2016;

Silvera *et al.*, 2016). Anteriormente, estos tres serotipos fueron caracterizados en Perú (Chumbe *et al.*, 2012; Rodriguez *et al.*, 2014; Silvera *et al.*, 2016); al igual que en países vecinos. En Chile, se halló la presencia de FAdV-4 (Toro *et al.*, 1999); mientras que en pollos de engorde de Brasil se detectaron los serotipos FAdV-8b y 11 (De la Torre *et al.*, 2018a); y en Ecuador, se identificó a FAdV-11 (De la Torre *et al.*, 2018b). Adicionalmente, se han reportado brotes de HCI coinfectados con otros tipos de virus aviares tales como Gumboro, el virus de la Anemia Infecciosa, coriza infección y virus de leucosis aviar (Meng *et al.*, 2018; Silvera *et al.*, 2016; Yasmeen *et al.*, 2017; Mei *et al.*, 2020). Mediante la PCR múltiple optimizada se evidenció coinfección entre los serotipos 4 y 11 de FAdV-I en Perú. La coinfección también se presentó en el estudio de Yasmeen *et al.* (2017), quienes documentaron la presencia de FAdV-4 y 8 en una sola muestra aislada de pollos comerciales de Pakistán.

Finalmente, se demostró una alta sensibilidad diagnóstica de la PCRm en función del gen de la fibra frente al secuenciamiento basado en el gen del hexón (prueba de referencia). Los resultados del estudio comprobarían que la caracterización de la fibra podría constituir un blanco importante para la detección y diagnóstico de los de los serotipos FAdV-4, 8b y 11. Debido a ello, la técnica podría ser considerada para futuras investigaciones o como línea base para la vigilancia epidemiológica a través del diagnóstico molecular de serotipos de HCI, lo cual facilitaría implementar programas específicos de vacunación para un mejor control de la enfermedad. Asimismo, la PCRm permitiría la identificación de inóculos virales para la producción de vacunas de HCI, y por lo tanto ser parte del control de calidad en plantas de producción de vacunas.

CONCLUSIONES

- Primer estudio de caracterización molecular de FAdV-I mediante el desarrollo de una PCR múltiple.
- Se detectó mayor presencia del serotipo FAdV-4 entre los años 1998-2021.
- Se evidenció coinfección entre los serotipos FAdV-4 y 11 por primera vez en Perú.
- La PCRm fue sensible y específica para la identificación y caracterización de los serotipos FAdV-4, 8b y 11.

RECOMENDACIONES

- Realizar la PCRm empleando como templado a más serotipos de FAdV-I, para así comprobar empíricamente la especificidad solo para FAdV-4, 8b y 11.
- Emplear la PCRm para el monitoreo de HCI en diferentes regiones del país.

REFERENCIAS

- Benko M, Harrach B, Both G, Russell W, *et al.* .2005. Family Adenoviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., *et al.*, editors. Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: Elsevier Academic Press, pp. 213–228.
- Bolivar A, Rojas A, Garcia-Lugo P. 2014. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avan Biomed* 3(1): 25-33.
- Caterina KM, Frasca S, Girshick T, Khan MI. 2004. Development of a multiplex PCR for detection of avian adenovirus, avian reovirus, infectious bursal disease virus, and chicken anemia virus. *Mol Cell Probes*, 18(5): 293-298.
- Chumbe A, Tataje L, Izquierdo R, Best I, Saravia L, Zavaleta M, *et al.* 2012. Presencia de las especies C, D y E de Fowl adenovirus (FAdV) en el Perú identificadas por PCR-RFLP y filogenias moleculares durante el periodo 2009-2011. En: XXIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Cartagena de Indias, Colombia
- De la Torre DI, Nuñez LFN, Santander SH, Astolfi-Ferreira CS, Piantino AJ. 2018. Molecular characterization of fowl adenovirus group I in commercial broiler chickens in Brazil. *Virus Disease* 29(1):83–88.
- De la Torre DI, Mafla EC, Puga BH, Piantino AJ 2018. Molecular characterization of fowl adenovirus in commercial chickens flocks in Ecuador. *La Granja. Revista de Ciencias de la Vida* 2(28):84-91.
- Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ Klapper PE. 2000. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 13(4):559-570.

- Freick M, Müller H, Raue R. 2008. Rapid detection of pigeon herpesvirus, fowl adenovirus and pigeon circovirus in young racing pigeons by multiplex PCR. *J Virol Methods* 148(1-2): 226-231
- Gelderblom H, Maichle-Lauppe I. 1982. The fibers of fowl adenoviruses. *Arch. Virol.* 72(4), 289–298.
- Gómez-Sánchez M, Hung A, Ritchie A, Jara LM, Vallenás G. 2010. Caracterización Molecular de Adenovirus Aviar presente en casos de Hepatitis a Cuerpos de Inclusión (HCI). En: XXII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Lima, Perú.
- Guardado-Calvo P, Llamas-Saiz AL, Fox GC, Langlois P, van Raaij MJ. 2007. Structure of the C-terminal head domain of the fowl adenovirus type 1 long fiber. *J Gen Virol* 88(9):2407–2416
- Grgic H, Krell PJ, Nagy E. 2014. Comparison of fiber gene sequences of inclusion body hepatitis (IBH) and non-IBH strains of serotype 8 and 11 fowl adenoviruses. *Virus Genes* 48(1): 74-80.
- Harrach B, Benkö M, Both GW, Brown M, Davison AJ, Echavarría M, *et al.* 2012. Family Adenoviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (Eds.), *Virus Taxonomy*. 9th ed. San Diego: Elsevier Academic Press. p 125–141
- Henegariu, O, Heerema, NA, Dlouhy, SR, Vance, GH, Vogt, PH. 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*, 23(3): 504–511.
- Hess M. 2000. Detection and differentiation of avian adenoviruses: A review, *Avian Pathol*, 29(3): 195-206.
- Hess M, Cuzange A, Ruigrok RWH, Chroboczek J, Jacrot B. 1995. The Avian Adenovirus Penton: Two Fibers and One Base. *J Mol Biol* 252(4):379–385

- Izquierdo R, Calderón K, Chumbe A, Montesinos R, Montalván Á, González AE, *et al.* 2016. Complete genome sequence of fowl aviadenovirus serotype 8b isolated in South America. *Genome Announc* 4(5).
- Kumar R, Chandra R, Shukla SK. 2003. Isolation of etiological agent of hydropericardium syndrome in chicken embryo liver cell culture and its serological characterization. *Indian J Exp Biol* 41(8):821-6
- Marek A, Nolte V, Schachner A, Berger E, Schlötterer C, Hess M. 2012. Two fiber genes of nearly equal lengths are a common and distinctive feature of Fowl adenovirus C members. *Vet Microbiol* 156(3-4):411–417
- Mase M, Nakamura K, Imada T. 2010. Characterization of Fowl adenovirus serotype 4 isolated from chickens with hydropericardium syndrome based on analysis of the short fiber protein gene. *J Vet Diagnostic Investig* 22(2):218–223.
- Meulemans G, Boschmans M, Van den Berg TP, Decaesstecker M. 2001. Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses. *Avian Pathol* 30(6):655–660.
- Meulemans G, Couvreur B, Decaesstecker M, Boschmans M, van den Berg TP. 2004. Phylogenetic analysis of fowl adenoviruses. *Avian Pathol*: 33(2), 164–170.
- Mei C, Xian H, Blackall PJ, Hu W, Zhang X, Wang H. 2020. Concurrent infection of *Avibacterium paragallinarum* and fowl adenovirus in layer chickens. *Poult. Sci.* 99(12):6525-6532.
- Meng F, Dong G, Zhang Y, *et al.* 2018. Co-infection of fowl adenovirus with different immunosuppressive viruses in a chicken Flock. *Poult. Sci.* 97(5): 1699-1705

- Okuda Y, Ono M, Shibata I, Sato S, Akashi H. 2006. Comparison of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism pattern of the fiber gene and pathogenicity of serotype-1 fowl adenovirus isolates from gizzard erosions and from feces of clinically healthy chickens in Japan. *J Vet Diagnostic Investig* 18(2):162–167
- Oni OO, Owoade AA, Adeyefa C. 2017. Design and evaluation of primer pairs for efficient detection of avian rotavirus. *Trop Anim Health Prod*, 50(2):267–273.
- Pallister J, Wright PJ, Sheppard M. 1996. A single gene encoding the fiber is responsible for variations in virulence in the fowl adenoviruses. *J Virol* 70(8):5115–5122
- Pan Q, Wang J, Gao Y, Wang Q, Cui H, *et al.* 2020. Identification of chicken CAR homology as a cellular receptor for the emerging highly pathogenic fowl adenovirus 4 via unique binding mechanism. *Emerg Microbes Infect* 9(1): 586-596.
- Russel W. 2009. Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol* 90(1):1-20.
- Raue R, Hess M. 1998. Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of fowl adenoviruses and egg drop syndrome virus. *J Virol Methods* 73(2):211–217.
- Rodríguez J, Koga Y, Alvarado A, Tinoco R. 2014. Molecular Characterization of Peruvian Fowl Adenovirus (FAdV) Isolates. *Adv Microbiol* 4(10):595–603.
- Rodríguez I. 2018. Analisis in silico e in vitro de un conjunto de primers para suapliación en PCR múltiple real time. Tesis para obtener el título de licenciado en Bioquímica. Montevideo: Universidad de la República. 15 p.
- Saifuddin M and Wilks C. 1990. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect and Quantify Adenovirus in Chicken Tissues. *Avian Dis* 34(2): 239-245.

Schachner A, Marek A, Jaskulska B, Bilic I, Hess M. 2014. Recombinant FAdV-4 fiber-2 protein protects chickens against hepatitis-hydropericardium syndrome (HHS). *Vaccine* 32(9):1086–1092

Schachner A, Matos M, Grafl B, Hess M. 2018. Fowl adenovirus induced diseases and strategies for their control – a review on the current global situation, *Avian Pathol*, 47(2): 111-126.

Silvera M, Rodriguez J, Alvarado A, Koga Y, Tinoco R. 2016. Estudio de brotes de HCI en pollos de carne y la presencia de serotipos involucrados en el cuadro clínico durante el segundo semestre del 2015 y primer semestre del 2016. Artículo técnico. Bioservice SRL.

Steer PA, Kirpatrick NC, O'Rourke D, Noormohammadi AH. 2009. Classification of Fowl Adenovirus Serotypes by Use of High-Resolution Melting-Curve Analysis of the Hexon Gene Region. *J Clin Microbiol* 47(2): 311-321

Toro H, Prusas C, Raue R, Cerda L, Geisse C, González C, Hess M. 1999. Characterization of fowl adenoviruses from outbreaks of inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome in Chile. *Avian Dis* 43(2): 262-70.

Wang X, Tang Q, Chu Z, Wang P, Luo C, Zhang, *et al.* 2018. Immune protection efficacy of FAdV-4 surface proteins fiber-1, fiber-2, hexon and penton base. *Virus Res*, 245:1–6.

Wang W, Liu Q, Li T, Geng T, Chen H, Xie Q, *et al.* 2020. Fiber-1, Not Fiber-2, Directly Mediates the Infection of the Pathogenic Serotype 4 Fowl Adenovirus via Its Shaft and Knob Domains. *J Virol* 94(17): e00954-20.

Xie Z, Fadl A, Girshick T, Khan M. 1999. Detection of Avian Adenovirus by Polymerase Chain Reaction. *Avian Dis* 43: 98-105.

Yao M, Zhang X, Gao Y, *et al.* 2019. Development and application of multiplex PCR method for simultaneous detection of seven viruses in ducks. *BMC Vet Res* 15(1)

Yasmeen S, Siddique N, Athar Abbas M, Ali A, Rafique S, *et al.* 2017. Fiber gene based molecular and biological characterization of hydropericardium-hepatitis syndrome associated avian adenoviruses. *Iran J Vet Res* 18(3): 190–196.

Zangenberg G, Saiki R, Reynolds R. 1999. Multiplex PCR: Optimization guidelines. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, editors. *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics*. 1st ed. USA: Academic Press. p 73-74.

Zhang Y, Liu R, Tian K, Wang Z, Yang X, Gao D, *et al.* 2018. Fiber2 and hexon genes are closely associated with the virulence of the emerging and highly pathogenic fowl adenovirus 4. *Emerg Microbes Infect* 7(1):1–10.

ANEXOS

Anexo 1. Secuencias de genes de la fibra y fibra 1 usados para el diseño de los cebadores.

N°	Especie	Serotipo	Cepa	Número de Acceso	Referencia
1	C	4	KR5	HE608152.1	Marek <i>et al.</i> ,2012
2	C	4	AG234	HE608153.1	Marek <i>et al.</i> ,2012
3	C	4	ON1	GU188428.1	Griffin <i>et al.</i> ,2011
4	C	NF	AG234-CORR	MK572849.1	Schachner <i>et al.</i> ,2019
6	C	4	B1-7	KU342001.1	Appaiahgari <i>et al.</i> ,2015
7	C	4	MX-SHP95	KP295475.1	Vera-Hernandez <i>et al.</i> ,2014
8	C	4	SDSX1	KY636400.1	Chen <i>et al.</i> ,2017
9	C	4	GDMZ	MG856954.1	Chen <i>et al.</i> ,2018
10	C		CH/GDYF/201706	MK387062.1	Chen <i>et al.</i> ,2019
11	C	4	SD1601	MH006602.1	Ma <i>et al.</i> ,2018
12	C	4	GX-1	MH454598.1	Ren <i>et al.</i> ,2018
13	C	NF	JSJ13	KM096544.1	Zhao <i>et al.</i> ,2015
14	C	4	CH/AHMC/2015	MG148335.1	Zhao <i>et al.</i> ,2017
15	C	4	CH/AHWH/2018	MN606302.1	Zhao <i>et al.</i> ,2019
16	C	4	CH/AHMG/2018	MN606303.1	Zhao <i>et al.</i> ,2019
17	C	4	SD1511	MF496037.1	Mo <i>et al.</i> ,2017
18	C	4	SCnj1601	KY927938.1	Guan <i>et al.</i> ,2018

19	C	NF	CH/JS/TCZHP/2015	MG824745.1	Luo <i>et al.</i> ,2018
20	C	4	HN/151025	KU245540.1	Li <i>et al.</i> ,2015
21	C	4	HB1510	KU587519.1	Li <i>et al.</i> ,2016
22	C	4	HN/151029	KX090424.1	Li <i>et al.</i> ,2016
23	C	4	HLJ/151118	KX061750.1	Li <i>et al.</i> ,2016
24	C	4	HLJ/160826	KY569422.1	Li <i>et al.</i> ,2017
25	C	4	ZJ2015	MF521611.1	Zheng <i>et al.</i> ,2017
26	C	4	NIVD2	MG547384.1	Zou <i>et al.</i> ,2017
27	C	NF	HB1502	KX421401.2	Ma,J. <i>et al.</i> ,2016
28	C	NF	HN1501	KX421403.2	Ma,J. <i>et al.</i> ,2016
29	C	NF	SD1501	KX421404.2	Ma,J. <i>et al.</i> ,2016
30	C	4	CH/HNJZ/2015	KU558760.1	Gao <i>et al.</i> ,2016
31	C	4	CH/SXCZ/2015	KU558762.1	Gao <i>et al.</i> ,2016
32	C	4	CH/JSXZ/2015	KU569296.1	Gao <i>et al.</i> ,2016
33	C	4	HN	KY379035.1	Wang <i>et al.</i> ,2016
34	C	4	JS7	KY436519.1	Wang <i>et al.</i> ,2017
35	C	4	AQ	KY436520.1	Wang <i>et al.</i> ,2017
36	C	4	AH726	KY436521.1	Wang <i>et al.</i> ,2017
37	C	4	AH712	KY436522.1	Wang <i>et al.</i> ,2017
38	C	4	CH/SDDZ/2015	KU558761.1	Gao <i>et al.</i> ,2016
39	C	4	CH/AHBZ/2015	KU569295.1	Gao <i>et al.</i> ,2016
40	C	4	HLJDA15	KX538980.1	Pan <i>et al.</i> ,2016
41	C	4	HLJFA15	KU991797.1	Pan <i>et al.</i> ,2016
42	C	4	SX17	MF595801.1	Feng <i>et al.</i> ,2018

43	C	4	SCDY	MK629523.1	Zhai, X., 2019
44	C	4	ZZ	MN337322.1	Jin <i>et al.</i> ,2019
45	C	4	AH-F18	MN781665.1	Xiong X., 2019
46	C	NF	FAdV-n22	MT119964.1	Su <i>et al.</i> ,2020
47	C	4	AH-F19	MN781666.1	Yin <i>et al.</i> ,2020
48	C	4	C	MK926458.1	Arshad <i>et al.</i> ,2019
49	C	NF	09/584	FR872907.1	Marek <i>et al.</i> ,2012
50	E	NF	HG	GU734104.1	Grgic <i>et al.</i> ,2011
51	E	8b	Vac-2005	KT037704.1	Steer <i>et al.</i> ,2015
52	E	8b	VIC-2/430-06	KT037705.1	Steer <i>et al.</i> ,2015
53	E	8b	NSW-3/100755	KT037706.1	Steer <i>et al.</i> ,2015
54	E	8b	VIC-8/100719	KT037707.1	Steer <i>et al.</i> ,2015
55	E	8b	NSW-5/100931	KT037708.1	Steer <i>et al.</i> ,2015
56	E	8b	NZ-1/101151-1	KT037709.1	Steer <i>et al.</i> ,2015
57	E	8b	FJ-1/100842-C	KT037710.1	Steer <i>et al.</i> ,2015
58	E	8b	764	KT862811.1	Marek <i>et al.</i> ,2017
59	E	8b	B3-A	MK572852.1	Schachner <i>et al.</i> ,2016
60	E	NF	13-18153	LN907567.1	Schachner <i>et al.</i> ,2016
61	E	NF	13-18153	MK572862.1	Schachner <i>et al.</i> ,2019
62	E	8b	B3-A	LN907580.1	Schachner <i>et al.</i> ,2020

63	E	NF	FV211-16	KX258422.1	Izquierdo <i>et al.</i> ,2016
64	E	8b	UPM04217	KU517714.1	Juliana <i>et al.</i> ,2016
65	E	8b	QD2016	MF577036.1	Hu <i>et al.</i> ,2017
66	E	8b	SD1356	MG712775.1	Huang <i>et al.</i> ,2018
67	E	NF	JP/Oita/2018IBH	LC548735.1	Mase <i>et al.</i> ,2020
68	D	11	05-50052-2924-1	JQ034217.1	Grgic <i>et al.</i> ,2014
69	D	11	05-50052-3181	JQ034218.1	Grgic <i>et al.</i> ,2014
70	D	11	06-25854-1	JQ034219.1	Grgic <i>et al.</i> ,2014
71	D	11	05-17766	JQ034220.1	Grgic <i>et al.</i> ,2014
72	D	11	VIC-3/778-06	KT037712.1	Steer <i>et al.</i> ,2015
73	D	11	WA-1/100966-2	KT037713.1	Steer <i>et al.</i> ,2015
74	D	11	NSW-7/101247-2	KT037714.1	Steer <i>et al.</i> ,2015
75	D	11	UF71	KT037715.1	Steer <i>et al.</i> ,2015
76	D	11	380	LN907574.1	Schachner <i>et al.</i> ,2016
77	D	11	MX95-S11	KU746335.1	Absalon <i>et al.</i> ,2016
78	D	11	ON P2	KU310942.1	Slaine <i>et al.</i> ,2016
79	D	NF	LN/1507	KU497449.1	Wang <i>et al.</i> ,2016
80	D	NF	Iran/UT-Kiaee/2018	MK757569.1	Hosseini <i>et al.</i> ,2019
81	D	11	PKFAd18	MN428137.1	Wang <i>et al.</i> ,2019
82	D	11	Fowl aviadenovirus D	MN509168.1	Asif <i>et al.</i> ,2020
83	D	11	GA/1358/1995	MN711789.1	Goraichuk <i>et al.</i> ,2021

NF: no referencia

Anexo 2. Primera condición de PCR convencional

Componentes	Concentración final	Volumen (μL)
PCR Master Mix 2x	1x	
Taq ADN Polimerasa	0.025 μL	7
dNTPs	200 μM c/u	
MgCl ₂	1.5 mM	
Cebador Forward	7.14 μM	1
Cebador Reverse	7.14 μM	1
ADN	14.28-28.57 ng/μL	2
Agua	-	3
Volumen Final	-	14

Anexo 3. Segunda condición de PCR convencional

Componentes	Concentración final	Volumen (μL)
--------------------	----------------------------	---------------------

PCR Master Mix 2x	1x	
Taq ADN Polimerasa	0.025 U/ μ L	7
dNTPs	200 μ M c/u	
MgCl ₂	1.5 mM	
Cebador Forward	0.7 μ M	1
Cebador Reverse	0.7 μ M	1
ADN	14.28-28.57 ng/ μ L	2
Agua	-	3
Volumen Final		14

Anexo 4. Programación de PCR convencional en termociclador

Pasos	Tiempo	Temperatura	
Desnaturalización inicial	3 min	95°C	
Desnaturalización	1 min	95°C	} 40 ciclos
Alineamiento	1 min	52°C / 54°C	
Extensión	2 min	72°C	
Extensión Final	10 min	72°C	

Anexo 5. Primera condición de PCRM

Componentes	Concentración final	PCRM (uL)
PCR Master Mix 2x	1.02x	
Taq ADN Polimerasa	0.026 U/ μ L	12.5
dNTPs	204 μ M c/u	
MgCl ₂	1.53 mM	
Cebador Forward	0.4 μ M c/u	3 (1 c/s ¹)
Cebador Reverse	0.4 μ M c/u	3 (1 c/s ¹)
ADN	8.16-16.32 ng/ μ L	6 (2 c/s ¹)
Volumen Final	-	24.5

¹ cada serotipo

Anexo 6. Primera programación de PCRM en termociclador

Pasos	Tiempo	Temperatura	
Desnaturalización inicial	3 min	95°C	
Desnaturalización	1 min	95°C	} 40 ciclos
Alineamiento	1 min	54°C	
Extensión	2 min	72°C	
Extensión Final	10 min	72°C	

Anexo 7. Segunda condición de PCRm con la adición de MgSO₄

Componentes	Concentración final	PCRm(μL)
PCR Master Mix 2x	0.94x	
Taq ADN Polimerasa	0.024 U/μL	12.5
dNTPs	188.7 μM c/u	
MgCl ₂	1.41 mM	
MgSO₄	3.77 mM	2
Cebador Forward	0.37 μM c/u	3 (1 c/s ¹)
Cebador Reverse	0.37 μM c/u	3 (1 c/s ¹)
ADNg /ADNp	7.54-15.09 ng/uL	6 (2 c/s ¹)
Volumen Final	-	26.5

¹cada serotipo

Anexo 8. Segunda programación de PCRm en termociclador (gradiente de Ta)

Pasos	Tiempo	Temperatura	
Desnaturalización inicial	3 min	95°C	} 40 ciclos
Desnaturalización	1 min	95°C	
Alineamiento	1 min	51°C / 54°C/ 57°C	
Extensión	2 min	72°C	
Extensión Final	10 min	72°C	

Anexo 9. Condición de la reacción de PCRm optimizada

Componentes	Concentración final	PCRm(μL)
PCR Master Mix 2x	0.94x	
Taq ADN Polimerasa	0.024 U/ μ L	12.5
dNTPs	188.7 μ M c/u	
MgCl ₂	1.41 mM	
MgSO₄	3.77 mM	2
Cebador Forward	0.37 μ M c/u	3 (1 c/s ¹)
Cebador Reverse	0.37 μ M c/u	3 (1 c/s ¹)
ADNg	7.54-15.09 ng/uL	2
ADNp²	11.32 pg/ μ L	6 (2 c/s ¹)
Agua	-	4
Volumen Final	-	26.5

¹cada serotipo

²solo emplear para la reacción del control positivo

Anexo 10. Programación en termociclador de PCRm optimizada

Pasos	Tiempo	Temperatura	
Desnaturalización inicial	3 min	95°C	
Desnaturalización	1 min	95°C	} 20 ciclos
Alineamiento	1 min	54°C	
Extensión	1 min 30 s	72°C	
Extensión Final	10 min	72°C	

Anexo 11. Parámetros optimizados de cada cebador

Serotipo	Nombre	Longitud	TF	GC %
FAdV-4	Ad4S	21	58.6° C	57.1 %
	Ad4A	24	62° C	58.3 %
FAdV-8b	Ad8bS	24	56.4° C	45.8 %
	Ad8bA	23	61° C	56.5 %
FAdV-11	Ad11S	22	63.2° C	59.1 %
	Ad11A	24	57.7° C	45.8 %