



DIAGNOSTICO DEL VIRUS INFLUENZA AVIAR TIPO "A" MEDIANTE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPCION REVERSA EN TIEMPO REAL (RRT-PCR) Y COMPARACION CON EL AISLAMIENTO VIRAL MEDIANTE LA INOCULACION EN HUEVOS EMBRIONADOS SPF.

DIAGNOSIS OF AVIAN INFLUENZA VIRUS TYPE "A" BY REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTASE PCR (RRT-PCR) AND COMPARISON WITH VIRUS ISOLATION BY INOCULATION OF EMBRYONATED SPF EGGS.

Alvaro Labra M. (1) Christian Mathieu B., Alfonso García P., Valentina Moreno B., (1)catovet@vtr.net, Unidad de Virología, Subdepartamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias Pecuarias del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), complejo Lo Aguirre, virologia.pecuaria@sag.gob.cl

INTRODUCCION: La Influenza Aviar (IA) es una enfermedad viral altamente contagiosa que afecta a todas las especies aviares, es de curso muy rápido y su único diagnóstico confirmatorio es el Aislamiento Viral mediante la Inoculación en Huevos Embrionados SPF, técnica que demora aproximadamente 2 semanas en obtener resultados.

En este estudio se describe el montaje, la implementación, y la aplicación de un RT-PCR de tiempo real (RRT-PCR), para el diagnóstico del virus Influenza Aviar tipo "A" basado en el gen matrix y su subtipificación mediante hemoaglutininas en subtipos H5 y H7. Además su desempeño fue comparado con el Aislamiento Viral mediante la Inoculación en Huevos embrionados SPF (AV) y subtipificación de hemoaglutininas.

MATERIALES Y METODOS: Este estudio fue realizado durante el año 2002 usando la información y muestras recopiladas por el SAG durante el brote chileno de Influenza Aviar. Se analizaron 1249 muestras de tórculas cloacales y traqueales en total mediante las técnicas diagnósticas de RRT-PCR gen Matrix y AV. La extracción de ARN fue llevada a cabo con el mini kit RNeasy de Qiagen y la RT-PCR en un solo paso con el kit OneStep? RT-PCR de Qiagen. Las muestras positivas mediante RRT-PCR gen Matrix, se analizaron por RRT-PCR subtipo H7 y/o subtipo H5 usando una serie de sondas de hidrólisis y partidores específicos diseñados por el Southeast Poultry Research Laboratory (S.E.P.R.L.) USDA ARS utilizando el equipo SmartCycler. En el AV se usaron huevos embrionados de 9 a 11 días de incubación. Las muestras positivas al AV fueron subtipificadas mediante las técnicas de inhibición de la hemoaglutinina y de la neuroaminidasa en los laboratorios de referencia DVL, NVSL, USDA, USA y CVL, Weybridge, UK. Los análisis de los resultados comparativos se obtuvieron mediante el Test de McNemar como método estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSION: Los principales resultados obtenidos pueden resumirse en la tabla N° 1.

Comparación de resultados		Aislamiento Viral		
		Positivo	Negativo	Total
RRT-PCR	Positivo	62	6	68
	Negativo	0	1181	1181
	Total	62	1187	1249

El número total de muestras fue de 1249 y en los resultados se ve una concordancia de 1243 muestras (99,5%) y una discordancia de 6 muestras (0,48%) entre las técnicas analizadas. De las 6 muestras con resultados diferentes en los ensayos, las 6 fueron positivas al RRT-PCR y negativas al aislamiento viral. Estas diferencias podrían ser explicadas al menos en parte, debido a que el aislamiento viral detecta sólo virus vivo, y no virus que haya sido inactivado durante la toma de muestra, transporte y/o por la acción de desinfectantes (lo cual es más o menos frecuente en muestras del medio ambiente), mientras que la RRT-PCR podría potencialmente detectarlas. Además, no todos los virus influenza se adaptan inmediatamente para un crecimiento de títulos detectables en dos pasajes de huevos embrionados.

Con los resultados obtenidos se calculó: Sensibilidad=100%, Especificidad=99,5%, Valor predictivo positivos=99,17%, Valor predictivo negativos=100% y el valor resultante del Test de Mc Nemar, con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ fue de $\chi^2=4,16667$, lo que indica que ambas técnicas están asociadas.

Los resultados de la subtipificación obtenidos mediante la RRT-PCR en Chile corresponden en un 100% a los obtenidos en los laboratorios de referencia en el extranjero.

CONCLUSIONES: Los resultados obtenidos en este estudio indican que existe una alta asociación entre ambas técnicas en el diagnóstico del virus Influenza Aviar tipo "A", siendo el ensayo de RRT-PCR una prueba altamente sensible y específica. Por lo tanto, es una excelente alternativa diagnóstica al aislamiento viral, pudiendo ser aplicada velozmente y a gran escala.

Hubo una buena correlación entre los ensayos RRT-PCR subtipos H7 y H5, sin embargo, sería recomendable analizar un

mayor número de muestras para obtener una mayor confiabilidad de los resultados.

Este estudio de RRT-PCR fue desarrollado como una herramienta preliminar para obtener información rápida y de calidad para ser usada como screening de Influenza Aviar en plántulas comerciales y para aves vivas de mercado.

Además, la RRT-PCR es una técnica diagnóstica que podría emplearse para pruebas de control de calidad e inocuidad de productos biológicos aviares como vacunas importadas que potencialmente puedan estar contaminados con virus Influenza.

REFERENCIAS:

SPACKMAN ERICA. 2002. "Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for the Detection of Type A Influenza and the Avian H5 and H7 HA Subtypes". Southeast Poultry Research Lab, U.S. Dept. of Agriculture, Agricultural Research Service. Athens.

SPACKMAN ERICA, SENNE D. A., MYERS T. J., BULAGA L.L., GARBER P.L., PERDUE M.L., COHMAN K., DAUN L.T. AND SUARAZ D.L. 2002. "Development Of A Real-Time RT-PCR Assay For Type A Influenza And The Avian H5 And H7 Hemagglutinin Subtypes". Southeast Poultry Research Lab, U.S. Dept. of Agriculture, Agricultural Research Service. Athens. Journal of Clinical Microbiology vol 40, pág 3256 – 3260.

[Portada/](#) [Indice Posters/](#) [Contacto/](#) [Imprimir](#)

SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO / DIVISION DE PROTECCION PECUARIA / BOLETIN VETERINARIO OFICIAL / SALUD E INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS