

Mejoramiento en la detección y cuantificación del adenovirus aviar de tipo 4 en tejido de hígado de pollo mediante la optimización de la PCR Improved Detection and Quantification of Fowl Adenovirus Type 4 in Chicken Liver Tissue through PCR Optimization

Víctor Chávez-Montenegro^{1,2,3}, Vladimir Longa-Bobadilla¹, Luis Tataje-Lavanda^{1,5}, Manolo Fernández-Díaz¹

¹Laboratorios de Investigación y Desarrollo de Farmacológicos Veterinarios (FARVET) S.A.C., Chincha Alta, Ica, Perú.

²Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional del Callao, Callao, Perú

³Unidad Médico Legal II – Instituto de Medicina Legal de Lima Norte, Lima, Perú.

⁴Escuela Profesional de Medicina Humana, Universidad Privada San Juan Bautista, Lima, Perú- Filial Ica. Ica, Perú.

RESUMEN

El adenovirus aviar de tipo 4 (FAdV-4) es un patógeno muy prevalente que afecta a las aves de corral en todo el mundo y causa importantes pérdidas económicas en la industria. En este estudio, nos propusimos detectar y cuantificar el FAdV-4 en muestras de tejido hepático de pollo mediante una técnica optimizada de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Mediante el análisis de 962 muestras recogidas entre 2016 y 2018, determinamos una tasa de prevalencia superior al 58% de FAdV-4 en la población estudiada. Además, el análisis de secuenciación reveló una alta similitud (99,43%) de las muestras positivas con la cepa HLJDAd15. Nuestros hallazgos enfatizan la importancia de implementar medidas estrictas para controlar y prevenir la diseminación del FAdV-4, dado su significativo impacto en la salud y producción avícola. La técnica qPCR optimizada proporciona un medio fiable y eficiente para la detección y cuantificación del FAdV-4, permitiendo un diagnóstico precoz y estrategias de gestión adecuadas. Estos resultados contribuyen a la comprensión de la epidemiología del FAdV-4 y ponen de relieve la necesidad de mantener las medidas de vigilancia y control en los sistemas de cría de aves de corral.

Palabras clave: Optimización de la PCR, FAdV-4, detección, hígado de pollo, tejido, técnica molecular, prevalencia, secuenciación

ABSTRACT

Fowl adenovirus type 4 (FAdV-4) is a highly prevalent pathogen affecting poultry worldwide, causing significant economic losses in the industry. In this study, we aimed to detect and quantify FAdV-4 in chicken liver tissue samples using an optimized quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technique. Through the analysis of 962 samples collected between 2016 and 2018, we determined a prevalence rate exceeding 58% of FAdV-4 in the studied population. Additionally, sequencing analysis revealed a high similarity (99.43%) of the positive samples to the HLJDAd15 strain. Our findings emphasize the importance of implementing stringent measures to control and prevent the spread of FAdV-4, given its significant impact on poultry health and production. The optimized qPCR technique provides a reliable and efficient means for the detection and quantification of FAdV-4, enabling early diagnosis and appropriate management strategies. These results contribute to the understanding of FAdV-4 epidemiology and highlight the need for continued surveillance and control measures in poultry farming systems.

Key words: PCR optimization, FAdV-4, detection, chicken liver, tissue, molecular technique, prevalence, sequencing

INTRODUCCIÓN

La especie de adenovirus aviar tipo 4 (FAdV-4) pertenece taxonómicamente al género Adenovirus, familia Adenoviridae (Zhao et al., 2015), y también se encuentra en el grupo C de adenovirus aviar (Zeng et al., 2016), según criterios moleculares y pruebas de neutralización cruzada en suero (Marek et al., 2010). Los adenovirus aviarios son virus no envueltos con un genoma de ADN de doble cadena que varía en tamaño de 43 Kb a 45 Kb, compuesto por aproximadamente 23.3% de Adenina (A), 27.7% de Citosina (C), 26.9% de Guanina (G) y 22.1% de Timina (T), con un contenido de G+C del 54.6% (Chiocca et al., 1996; Guan et al., 2018). El genoma de FAdV-4 codifica varias proteínas no estructurales y tres proteínas estructurales (Meulemans et al., 2004). Las proteínas estructurales incluyen hexón, fibra (fiber-1, fiber-2), base de pentón, proteína terminal y las proteínas V, VI, VII, VIII, IIIa y X (Li et al., 2017), mientras que las proteínas no estructurales consisten en 100K, U exon, 22K, 52K, pIVaII, DBP, pol, 33, entre otras (Liao et al., 2021). La síntesis de la proteína 52K es mediada por el gen 52K, que juega un papel en la encapsulación del ADN viral (Davison et al., 2003) y sirve para la clasificación de los adenovirus aviarios (FAdVs) (Günes et al., 2013).

FAdV-4 es un patógeno que causa el Síndrome de Hepatitis-Hidropericardio (HHS) en aves de corral, siendo los pollos de engorde los más afectados desde los 21 días hasta las 6 semanas (Balamurungan & Kataria, 2004), lo que resulta en tasas de mortalidad que varían del 30% al 80% (Günes et al., 2013). Los principales síntomas clínicos externos incluyen plumas erizadas, postración, somnolencia y pérdida de apetito, mientras que el examen anatomopatológico revela la acumulación de un líquido transparente amarillento en el saco pericárdico, riñones alargados, pálidos y friables, y daño hepático (Asthana et al., 2013). También se han observado lesiones en riñones, pulmones e hígado. Estudios histológicos han mostrado la presencia de lesiones necróticas multifocales e infiltración de células mononucleares en los hígados de los pollos infectados (Niu et al., 2017). El HHS fue reportado por primera vez en Pakistán, inicialmente referido como "Enfermedad Angara" debido a su ubicación (Anjum et al., 1989). Actualmente, esta enfermedad ha sido reportada en varios países de todo el mundo, como Estados Unidos (Mendelson et al., 1995), Japón, India (Mase et al., 2010), China (Zhang et al., 2016), Chile (Toro et al., 1999), entre otros, causando altas tasas de mortalidad del 30% al 90% debido a una nueva cepa hipervirulenta de FAdV-4 en granjas comerciales de pollos, lo que resulta en pérdidas económicas en la industria avícola.

La transmisión horizontal del virus FAdV-4 ocurre cuando las heces infectadas se propagan en el entorno, como en la casa avícola, lo que lleva a una infección oro-fecal-oral. La transmisión vertical, por otro lado, ocurre cuando el virus infecta el tracto reproductivo, contaminando los huevos. Al incubar, el embrión se infecta y poco después, los pollitos desarrollan hepatitis, que persiste en aves inmunocomprometidas (Grgić et al., 2006). Las tasas de mortalidad varían del 30% durante la cuarta semana de vida (Pereira et al., 2014) al 100% (Li et al., 2021).

La transmisión del virus FAdV-4 dentro de las casas avícolas es inevitable, por lo que se utilizan diversas pruebas presuntivas como ELISA y la prueba de inhibición de hemaglutinación para el diagnóstico (Pan et al., 2020). Aunque se emplean criterios anatomopatológicos para confirmar la presencia del virus mediante la observación microscópica de cuerpos de inclusión intranucleares en hepatocitos durante la necropsia (Hess, 2000), estas pruebas pueden arrojar resultados falsos positivos. Actualmente, el estándar de oro para detectar este patógeno es la técnica molecular PCR.

El objetivo de este estudio fue detectar y cuantificar FAdV-4 en muestras de hígado de pollo utilizando la técnica molecular de PCR cuantitativa optimizada (qPCR), con el fin de determinar la prevalencia del patógeno en el sector avícola peruano desde 2016 hasta 2018. Además, esta técnica molecular optimizada permitirá la detección de cantidades mínimas del patógeno en muestras de tejido hepático aviar, mitigando así pérdidas económicas significativas a nivel nacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Un par de primers fue evaluado *in silico* utilizando el software de bioinformática Snap Gene Viewer v. 3.3.3 (GSL Biotech, EE. UU.). Los primers fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT, EE. UU.). Para obtener una concentración inicial de 100 $\mu\text{mol/L}$ (primers de stock), se añadieron 322 μL de agua libre de nucleasas al tubo que contenía el contenido liofilizado. Se prepararon primers de trabajo con una concentración de 10 $\mu\text{mol/L}$ a partir de esta concentración. Luego, se preparó el Master Mix de acuerdo con las instrucciones del kit de PCR Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (NEB, EE. UU.), utilizando los primers que pasaron las pruebas de selección (Chávez-Montenegro et al., 2021).

El primer, llamado HHS*-3, tiene una secuencia de "atg gck cag atg gcy aag g" para el primer directo y "agc gcc tgg gtc aaa ccg a" para el reverso. El contenido de G + C del primer es del 57.9%, y la temperatura de fusión (T_m) es de 57.8°C para el primer directo y 63.2°C para el reverso. El tamaño del amplicón generado por el par de primers es de 157 pares de bases. Es importante señalar que los valores de T_m fueron calculados utilizando el sintetizador de IDT.

Extracción de ADN

La cepa de FAdV-4 fue obtenida de la colección de FARVET SAC (Ica, Perú), la cual fue extraída de medios especializados y posteriormente purificada siguiendo las especificaciones del Kit de Precipitación de Virus PEG (ab102538). El virus purificado se alicuotó en porciones de 0.5 ml en tubos de 2 ml.

Para la extracción de ADN, se utilizó el kit QIAamp MinElute Virus Spin (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se calculó la relación de pureza (260/280nm) del ADN obtenido (Warburg, 1942). La cuantificación del ADN viral se realizó utilizando el software de fluorómetro (Life Technologies, EE. UU.). El número de copias virales se determinó utilizando el software Calculadora de Número de Copias para PCR en tiempo real proporcionado por Scienceprimer.com. El cálculo utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de copias virales} = (X \text{ ng} * 6.0221 * 10^{23} \text{ moléculas/mol}) / ((N * 660 \text{ g/mol}) * 10^9 \text{ ng/g})$$

En la fórmula, X representa la cantidad promedio de amplicón en microgramos por mililitro, y N representa la longitud del amplicón. Una vez obtenidos los datos relevantes, se alicuotaron 7 μL de ADN en tubos de 200 μL y se almacenaron a -80°C. Este ADN viral fue denominado material de referencia interno (IRM).

Optimización de qPCR

Programación del termociclador

Para la amplificación de nuestro ADN, se empleó el termociclador Light Cycler®480 (Roche, EE. UU.) con SYBR®Green I, utilizando el kit Kapa Sybr Fast One-step para LightCycler 480 Mix (Kapa Biosystems, EE. UU.). Se siguieron las instrucciones del fabricante trabajando a diferentes concentraciones de primers (de 1 µM hasta 0.20 µM). La amplificación se inició con una temperatura inicial de 95°C durante 5 minutos; se programaron 40 ciclos comenzando con una temperatura de 95°C durante 10 segundos, 60°C durante 20 segundos, una extensión a 72°C durante 30 segundos, y una extensión final a 95°C durante 5 segundos. Posteriormente, se realizó una curva de desnaturalización a una temperatura de 65°C, variando de 50°C a 90°C con un incremento de 0.11°C/segundo y 5 lecturas/°C.

Diluciones seriadas y cálculos estadísticos

Para determinar el límite de detección y cuantificación del virus patógeno, se utilizó el banco de ADN viral del material de referencia interno (MRI). Esto implicó realizar una serie de ocho diluciones consecutivas, que iban desde 46.3 ng/µl hasta 1 fg/µl (Tabla 1). Cada dilución fue amplificada en triplicado durante tres días, resultando en un total de nueve puntos de datos para cada dilución. Se monitorizó el coeficiente de variación para asegurar que permaneciera por debajo del 5%, evaluando así la sensibilidad de la dilución anterior. Para calcular el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) (Armbruster & Pry, 2008), se emplearon las siguientes fórmulas:

Límite de vacío (LoB): $LoB = \text{media de las muestras en blanco} + (1.645 * \text{desviación estándar de las muestras en blanco})$

Límite de detección (LoD): $LoD = LoB + (1.645 * \text{desviación estándar de las muestras en blanco})$

Límite de cuantificación (LoQ): $LoQ = 10/3 * LoD$

Para evaluar la especificidad, se incluyó una variedad de muestras de diferentes bacterias y virus en la industria avícola (Figura 1). La eficiencia del primer se determinó utilizando la siguiente fórmula:

Eficiencia = $10^{-(1/m)}$, donde "m" es un componente de la fórmula de la ecuación lineal: $y = mX + b$, con $Ct = m * \log_{10}[ADN] + b$.

Detección de FAdV-4 en tejido de *Gallus gallus*

Una vez optimizada la qPCR para la detección y cuantificación de FAdV-4, se analizaron muestras de *Gallus gallus*. Los criterios de inclusión para el análisis molecular fueron los siguientes: muestras de hígado de la especie aviar mencionada, recibidas en tubos Eppendorf de plástico bajo condiciones de cadena de frío e impregnadas en tarjetas FTA® (Flinders Technology Associates) de granjas nacionales. Para las muestras de tejido, se realizó la extracción de ADN viral siguiendo las especificaciones del manual del kit QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue (Qiagen, Alemania). La carga viral de FAdV-4 fue detectada y cuantificada, y la prevalencia del patógeno se calculó a partir de un total de 962 muestras de hígado (muestras en tubos Eppendorf o impregnadas en tarjetas FTA®) recolectadas durante tres años consecutivos (2016 a 2018). Los productos de amplificación de las muestras positivas fueron confirmados por secuenciación Sanger (Macrogen, Corea) y analizados utilizando el programa BLAST (Altschul et al., 1990)

RESULTADOS

La cantidad promedio de ADN viral obtenida fue de 46.3 ng/µl, calculada promediando la cantidad de amplificación en el ADN extraído y el número de veces que se cuantificó. La relación de absorbancia de ADN viral a 260 nm/280 nm fue de 1.91, lo que indica una relación de proteínas a ácidos nucleicos de 40:60. El número de copias virales se calculó en aproximadamente 9.66×10^7 .

El primer HHS-3 (gen 52k) obtuvo un Límite de Blanco (LoB) de 0.04 fg/µl, un Límite de Detección (LoD) (HHS*-3) de 0.22 fg/µl, y un Límite de Cuantificación (LoQ) (HHS*-3) de 0.75 fg/µl, con una especificidad del 100%. El porcentaje de precisión promedio desde 107 (10 ng/µl) hasta 100 (1 fg/µl) fue del 99.97%. El LoD y LoQ del virus patógeno fue hasta $Ct < 39$ (Tabla 1). La eficiencia de las ejecuciones basada en Ct se detalla en la Figura 1, y la especificidad en la Figura 2. El cálculo de la concentración exacta del ADN viral patógeno se obtuvo de $10^{(Ct-b)/m}$. Las diluciones desde 107 hasta 100 se consideran para la detección y cuantificación del adenovirus aviar-4, y ahora se denominan estándares HHS7 a HHS0. El límite de detección según la fórmula mencionada fue de 0.6261 fg/µl, mientras que el límite de cuantificación fue de 1.3066707 copias virales/µl.

Tabla 1. Cálculo teórico y obtenido de las diluciones seriadas obtenidas de HHS⁷ a HHS⁰.

Diluciones sucesivas	Cantidad de amplicón	Viral copies/µl	Average Ct Value*	Log Std Ct Value	[DNA] Viral copies	Accuracy (%)
	46.3 ng/ µl	9.662×10^7				
10⁷	10 ng/ µl	2.087×10^7	15.34	15.38	10271086.92	99.75
10⁶	1 ng/ µl	2.087×10^6	18.66	18.71	1029736.037	99.77
10⁵	10 ² pg/ µl	2.087×10^5	21.96	22.03	104435.5243	99.72
10⁴	10 pg/ µl	2.087×10^4	25.23	25.35	10872.59003	99.52
10³	1 pg/ µl	2.087×10^3	28.57	28.68	1077.530785	99.62

10²	10 ² fg/ μl	2.087 x 10 ²	32.91	32.00	53.18035799	102.85
10¹	10 fg/ μl	2.087 x 10 ¹	35.14	35.33	11.36848515	99.48
10⁰	1 fg/ μl	2.087 x 10 ⁰	38.29	38.65	1.279205842	99.08
Average						99.97384264

Nota: El "Valor Ct Promedio" representa el valor promedio del umbral de ciclo a través de todas las diluciones. El "Valor Std Ct Log" indica la desviación estándar logarítmica de los valores Ct. La columna "[Copias de ADN Viral]" muestra el número estimado de copias virales basado en la serie de diluciones. La "Precisión" indica el porcentaje de precisión de los resultados de qPCR en comparación con los valores esperados.

*El término "Valor Ct Promedio" se utiliza para referirse al valor promedio del umbral de ciclo (Ct) en el contexto de este estudio.

El coeficiente de determinación (R²) se determinó en 99.77%, lo que indica una relación fuerte y confiable entre las variables. Este hallazgo se alinea con el alto resultado de eficiencia del 99.88%, confirmando aún más la solidez de nuestros hallazgos. El cálculo de la eficiencia se basó en datos obtenidos de la misma ecuación lineal, asegurando consistencia y precisión.

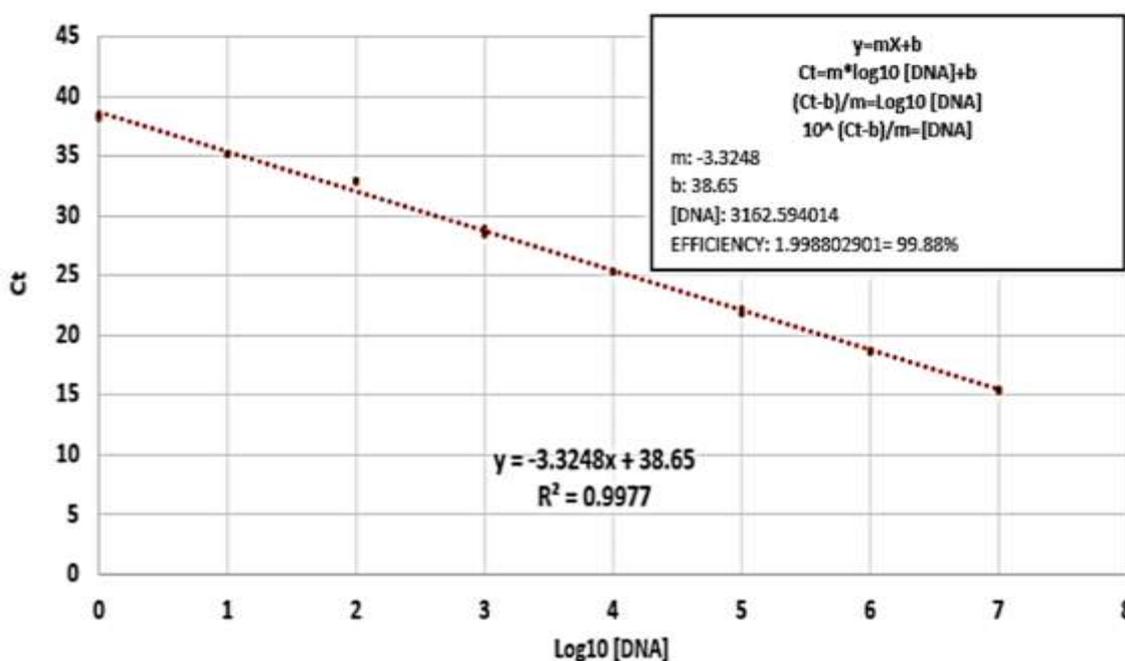


Figura 1. Ecuación de regresión lineal que muestra la relación entre Log₁₀ [ADN] en el eje x y Ct en el eje y.

En la Figura 2, no se observó amplificación en las curvas de fusión de los controles negativos (CN) y los virus y bacterias patogénicos (Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV), Virus de Laringotraqueitis Infecciosa (ILTV), Metapneumovirus Aviar (MPV), Virus de la Enfermedad de la Bolsa Infecciosa (IBDV), Virus de la Anemia Aviar (CAV), Síndrome de Caída de Huevos (EDS), Virus de Bronquitis Infecciosa (IBV), ADN puro de células de fibroblastos de pollo (DF1), Pasteurella spp, Salmonella gallinarum, Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae y agua libre de nucleasas), representados por la línea amarilla durante la prueba de especificidad. Los estándares HHS7 a HHS4 se muestran en azul, HHS3 a HHS1 en rojo y HHS0 en verde claro. El análisis de qPCR se realizó utilizando los primers HHS*-3. La temperatura de fusión promedio (T_m) en las diluciones de 10⁷ a 10⁰ fue de 87.87.

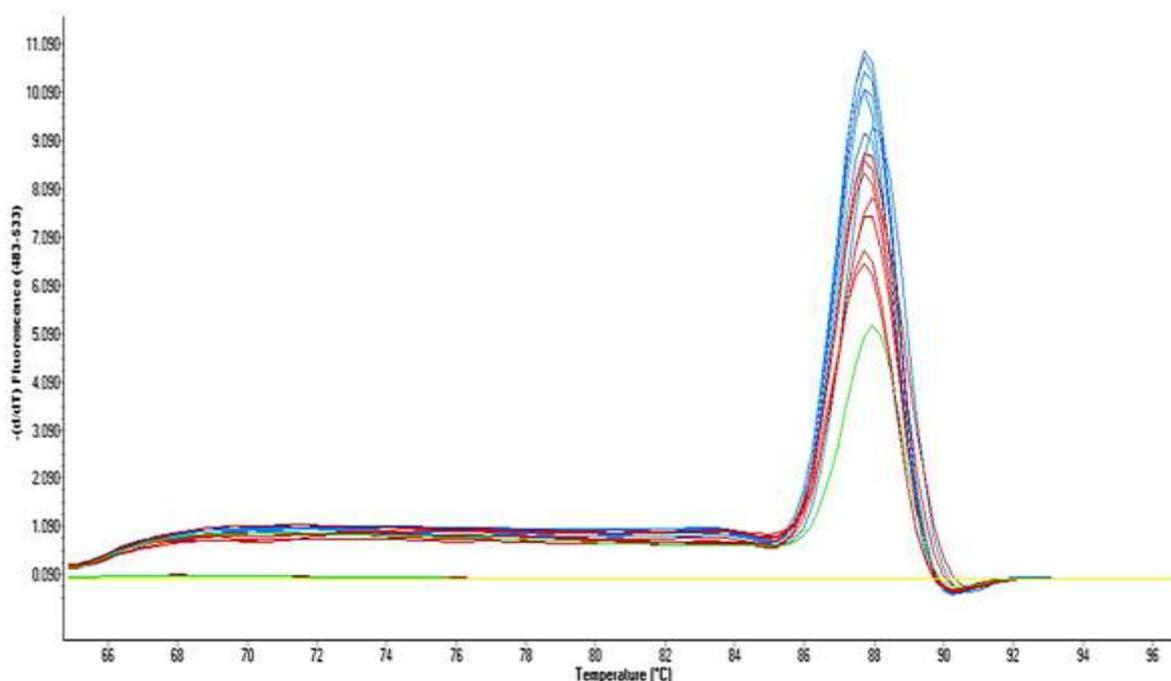


Figura 2: qPCR para los primers HHS*-3. Curvas de disociación (fusión) de los productos obtenidos con diferentes concentraciones de virus desde HHS7 (10 ng/μl) hasta HHS0 (1 fg/μl). La temperatura media de fusión (Tm) desde HHS7 hasta HHS0 es de 87.87.

Para evaluar la prevalencia de FAdV-4, se dividió el número de casos positivos por el total de muestras analizadas durante el período de 2016 a 2018. Este cálculo reveló una prevalencia del 58.73% (Tabla 2) entre el total de muestras.

Tabla 2. Prevalencia y análisis de muestras de FAdV-4 por tipo de soporte en diferentes años.

Año	Support Type	Muestras positivas	Muestras negativas	Total de Muestras analizadas	Total Samples	Prevalence (%)
2016	Eppendorf Tubes	306	225	531	553	56.24
	FTA® Cards	5	17	22		
2017	Eppendorf Tubes	79	23	102	131	74.81
	FTA® Cards	19	10	29		
2018	Eppendorf Tubes	135	105	240	278	56.12
	FTA® Cards	21	17	38		
TOTAL	Liquefied Tissue	520	353	873	962	58.73
	FTA® Cards	45	44	89		

Nota: Los valores de prevalencia se expresan como porcentajes. La columna "Total de Muestras Analizadas" representa el número total de muestras analizadas para cada tipo de soporte y año.

La Tabla 3 muestra el porcentaje de muestras positivas en relación con los estándares y los valores de Ct, revelando que el 27% de todas las muestras procesadas durante el período de 2016 a 2018 tenían concentraciones de ADN equivalentes al estándar HHS7, mientras que el 8% de las muestras totales superaron este estándar.

Tabla 3. Porcentaje de Muestras Positivas en Relación con los Valores de Ct y el Estándar

Standards	Ct	2016 (%)	2017 (%)	2018 (%)	Average (%)
> HHS ⁷	< 14	3	12	9	8
HHS ⁷	15.38	28	25	28	27
HHS ⁶	18.70	20	10	18	16
HHS ⁵	22.03	9	8	12	9.67
HHS ⁴	25.35	10	17	14	13.67
HHS ³	28.68	17	20	10	15.67
HHS ²	32.00	8	4	7	6.33
HHS ¹	35.33	4	1	1	2
HHS ⁰	38.65	1	3	1	1.67
Total		100	100	100	

Las muestras positivas de FAdV-4 se sometieron a un análisis de secuenciación, que reveló una similitud del 99% con la cepa HLJDA15, previamente identificada y estudiada en China (Pan et al., 2017). La clasificación de la cepa se determinó utilizando el gen 52K, comúnmente utilizado para el agrupamiento de especies de FAdV (Günes et al., 2013). Los resultados de las secuencias consultadas y el análisis BLASTn, realizados con parámetros personalizados, se muestran a continuación:

Secuencia de consulta:

```
atggcgagatggccaaggccaggaattttctaccgggtgatgcagggcgtgctggactgggggtgcagttaggcgtgtacaacaacaggccgtaaccttcgcaga
agcggatgagcgagattccgcagatgactgacgccgagtacatgttcggttgaccaggcgct
```

Los resultados demostraron (Tabla 4) un alto nivel de similitud con varias cepas, destacando la cepa HLJDA15, que exhibió un 100% de cobertura de consulta y una similitud del 99.43%.

Tabla 4. Identificación de secuencias obtenidas y genes (blastn y blastx) en muestras positivas.

Chromatogram (.ab1)	Nt	Gene	Species	Strain	Identity (%)
Sample_10_52k-Fw	176	52k	C (tipo 4)	HLJDA15	99.43
Sample_10_52k-Rw		(100%)			

DISCUSIÓN

En este estudio, logramos detectar y cuantificar con éxito el adenovirus aviar tipo 4 (FAdV-4) en tejido hepático de Gallus gallus utilizando la técnica optimizada de qPCR. La selección de los primers se basó en un análisis in silico, y el conjunto de primers elegido ha demostrado previamente una sensibilidad y especificidad superiores al 99% en PCR convencional, al ser probado contra varios virus y bacterias (controles negativos) en la industria avícola (Chávez-Montenegro et al., 2021). De acuerdo con nuestros hallazgos, los controles negativos no mostraron amplificación durante la ejecución de la qPCR, como se indica por la ausencia de curvas detectables en cualquier valor de Ct y sus correspondientes valores de Tm (Figura 2).

La técnica de qPCR empleada en este estudio demostró un porcentaje de precisión promedio superior al 99% para los valores "cp" que oscilan entre HHS7 (10 ng/μl) y HHS0 (1 fg/μl). Este alto nivel de precisión resalta la fiabilidad y utilidad del método qPCR para confirmar el diagnóstico y la cuantificación de FAdV-4 en muestras de hígado de pollo. Se ha establecido que los valores de Ct entre 15 y 30 pueden medirse con confianza (Schmittgen et al., 2000), mientras que los valores de Ct ≥ 40 se consideran indetectables. Nuestros hallazgos indican que un valor de Ct de <39 sirve como el umbral máximo para detectar y cuantificar FAdV-4. El límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) se determinaron en 0.6261 fg/μl y 1.3066707 copias virales/μl, respectivamente, siguiendo la metodología descrita (Forootan et al., 2017). Sin embargo, nuestros resultados demuestran un límite de cuantificación de 1.279205842 copias virales/μl (Tabla 1), que corresponde al 98% del valor calculado y se considera aceptable. Todas nuestras diluciones de concentración de ADN viral exhibieron valores de Ct por debajo de 39, lo que indica condiciones óptimas para la cuantificación (Karlen et al., 2007).

Durante el período de 2016 a 2018, se observó que más del 51% del total de muestras analizadas tenía un valor de Ct <19, lo que indica una concentración de ADN igual o mayor que el estándar HHS6. Además, un mínimo del 1.67% de las muestras totales eran detectables y cuantificables dentro del límite establecido. Para mejorar la curva de amplificación, se realizó una optimización de la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) utilizando SYBR Green I como colorante intercalante. Aunque SYBR Green I se une al ADN, su unión no es específica. Por lo tanto, se realizaron pruebas adicionales, como el análisis de la curva de fusión del ADN, para validar la generación de amplificación específica. La utilización del análisis de curva de fusión elimina la necesidad de electroforesis en gel de agarosa, ya que la temperatura de fusión (Tm) del amplicón específico corresponde a la detección de una banda electroforética (Giglio et al., 2003). En nuestro estudio, la Tm promedio se determinó en 87.87 °C (Figura 2) en el rango de HHS7 a HHS0, lo que indica una

curva de fusión ideal al utilizar SYBR Green como agente fluorescente. Por lo tanto, esta técnica se puede emplear para confirmar verdaderos positivos de manera simple y rentable en comparación con otros métodos (Giglio et al., 2003).

A principios de la década de 1990, varios países, incluidos México, Brasil, Ecuador, Perú y Chile, experimentaron brotes significativos de HHS en aves de corral (Schachner et al., 2018). Las técnicas moleculares y el análisis de secuenciación revelaron que el serotipo 4 de FAdV-C fue identificado como el principal agente causante de estos brotes (King et al., 2012). Las tasas de mortalidad registradas en aves de veintidós días a cinco semanas oscilaron entre el 30% y el 100%, con una tasa de morbilidad del 35% y una tasa de mortalidad del 15% (Li et al., 2021; Pan et al., 2017). Nuestras muestras positivas demostraron una similitud del 99.43% con la cepa HLJDA15 (Tabla 4). La prevalencia general de las muestras analizadas durante el período de 2016 a 2018 superó el 58% (Spronk et al., 2019). Estas muestras fueron obtenidas de granjas domésticas y son consistentes con hallazgos de otros estudios realizados en China (Yu et al., 2019). Estos hallazgos enfatizan la importancia crítica de implementar medidas estrictas para prevenir la propagación de HHS y mitigar las pérdidas económicas. La utilización de técnicas moleculares optimizadas como la qPCR permite la detección y cuantificación eficiente y fiable de cantidades mínimas de partículas virales en las muestras, asegurando una vigilancia y control precisos.

El ensayo de qPCR demostró una alta eficiencia del 99.88% para la cuantificación y detección de FAdV-4 en hígado de pollo. El límite de cuantificación (LoQ) para el virus patógeno se determinó en hasta 1,279,205,842 [ADN] copias virales, mientras que el límite de detección (LoD) fue equivalente a 0.61294 fg/μl con un Ct <39.

En conclusión, nuestro estudio demostró una alta tasa de prevalencia de FAdV-4 en muestras de tejido hepático de pollo, superando el 58% durante el período de 2016 a 2018. Además, a través del análisis de secuenciación, identificamos una similitud del 99.43% entre nuestras muestras positivas y la cepa HLJDA15. Estos hallazgos proporcionan valiosas ideas sobre la epidemiología y las características genéticas de FAdV-4 en poblaciones avícolas. Se requiere una mayor investigación y la implementación de medidas preventivas para una gestión y control efectivos de esta infección viral, a fin de mitigar su impacto en la industria avícola.

CONCLUSIONES

Este estudio evidencia una prevalencia superior al 58% de adenovirus aviar tipo 4 (FAdV-4) en tejido hepático de Gallus gallus entre 2016 y 2018, utilizando qPCR optimizada con alta precisión y un límite de cuantificación de 1,279,205,842 copias virales por ml.

Los resultados, que muestran una similitud del 99.43% con la cepa HLJDA15, resaltan la necesidad de implementar medidas preventivas y estrategias de control efectivas para mitigar el impacto del virus en la industria avícola, así mismo el uso de técnicas moleculares avanzadas es fundamental para asegurar una vigilancia adecuada y una respuesta rápida ante futuros brotes.

LITERATURA CITADA

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anjum, A. D., Sabri, M. A., & Iqbal, Z. (1989). Hydropericarditis syndrome in broiler chickens in Pakistan. *The Veterinary Record*, 124(10), 247–248. <https://doi.org/10.1136/VR.124.10.247>
- Armbruster, D. a., & Pry, T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 29 Suppl 1(August), S49-52. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2556583&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Asthana, M., Chandra, R., & Kumar, R. (2013). Hydropericardium syndrome: current state and future developments. *Archives of Virology*, 158(5), 921–931. <https://doi.org/10.1007/S00705-012-1570-X>
- Balamurungan, V., & Kataria, J. M. (2004). The hydropericardium syndrome in poultry--a current scenario. *Veterinary Research Communications*, 28(2), 127–148. <https://doi.org/10.1023/B:VERC.0000012115.86894.1E>
- Chávez-Montenegro, V., Longa-Bobadilla, V., Ormeño-Vásquez, P., Tataje Lavanda, L., & Fernández Díaz, M. (2021). Desarrollo de una técnica de PCR para la detección de Fowl adenovirus 4 (FAdV-4) en muestras de tejidos. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 32(2), e18110. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i2.18110>
- Chiocca, S., Kurzbaue, R., Schaffner, G., Baker, A., Mautner, V., And, †, & Cotten, M. (1996). The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CELO. *Journal of Virology*, 70(5), 2939. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.5.2939-2949.1996>
- Davison, A. J., Benko, M., & Harrach, B. (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *The Journal of General Virology*, 84(Pt 11), 2895–2908. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.19497-0>
- Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., & Kubista, M. (2017). Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*, 12, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.04.001>
- Giglio, S., Monis, P. T., & Saint, C. P. (2003). Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Research*, 31(22), e136. <https://doi.org/10.1093/NAR/GNG135>

11. Grgić, H., Philippe, C., Ojkić, D., & Nagy, É. (2006). Study of vertical transmission of fowl adenoviruses. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 70(3), 230.
12. Guan, R., Tian, Y., Han, X., Yang, X., & Wang, H. (2018). Complete genome sequence and pathogenicity of fowl adenovirus serotype 4 involved in hydropericardium syndrome in Southwest China. *Microbial Pathogenesis*, 117, 290–298. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2018.02.012>
13. Günes, A., Marek, A., & Hess, M. (2013). Species determination of fowl adenoviruses based on the 52K gene region. *Avian Diseases*, 57(2), 290–294. <https://doi.org/10.1637/10323-081012-RESNOTE.1>
14. Hess, M. (2000). Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A*, 29(3). <https://doi.org/10.1080/03079450050045440>
15. Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., & Mermod, N. (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-131>
16. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., editors. *Virus Taxonomy – Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press; London: 2011.
17. Li, M., Raheem, M. A., Han, C., Yu, F., Dai, Y., Imran, M., Hong, Q., Zhang, J., Tan, Y., Zha, L., & Chen, F. (2021). The fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) induce cellular pathway in chickens to produce interferon and antigen-presented molecules (MHCII). *Poultry Science*, 100(10), 101406. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101406>
18. Li, P. H., Zheng, P. P., Zhang, T. F., Wen, G. Y., Shao, H. B., & Luo, Q. P. (2017). Fowl adenovirus serotype 4: Epidemiology, pathogenesis, diagnostic detection, and vaccine strategies. *Poultry Science*, 96(8), 2630–2640. <https://doi.org/10.3382/PS/PEX087>
19. Liao, Y., Lupiani, B., & Reddy, S. M. (2021). Latest Insights into Unique Open Reading Frames Encoded by Unique Long (UL) and Short (US) Regions of Marek's Disease Virus. *Viruses* 2021, Vol. 13, Page 974, 13(6), 974. <https://doi.org/10.3390/V13060974>
20. Marek, A., Günes, A., Schulz, E., & Hess, M. (2010). Classification of fowl adenoviruses by use of phylogenetic analysis and high-resolution melting-curve analysis of the hexon L1 gene region. *Journal of Virological Methods*, 170(1–2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2010.09.019>
21. 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. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 22(2), 218–223. <https://doi.org/10.1177/104063871002200207>
22. Mendelson, C., Monreal, G., & Nothelfer, H. B. (1995). Identification and characterization of an avian adenovirus isolated from a 'spiking mortality syndrome' field outbreak in broilers on the Delmarva Peninsula, USA. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A*, 24(4), 693–706. <https://doi.org/10.1080/03079459508419108>
23. Meulemans, G., Couvreur, B., Decaesstecker, M., Boschmans, M., & Van Den Berg, T. P. (2004). Phylogenetic analysis of fowl adenoviruses. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A*, 33(2), 164–170. <https://doi.org/10.1080/03079450310001652086>
24. Niu, Y., Sun, Q., Zhang, G., Sun, W., Liu, X., Xiao, Y., Shang, Y., & Liu, S. (2017). Pathogenicity and immunosuppressive potential of fowl adenovirus in specific pathogen free chickens. *Poultry Science*, 96(11), 3885–3892. <https://doi.org/10.3382/ps/pex206>
25. Pan, Q., Wang, J., Gao, Y., Cui, H., Liu, C., Qi, X., Zhang, Y., Wang, Y., Li, K., Gao, L., & Wang, X. (2020). Development and application of a novel ELISA for detecting antibodies against group I fowl adenoviruses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(2), 853. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-10208-3>
26. Pan, Q., Yang, Y., Shi, Z., Liu, L., Gao, Y., Qi, X., Liu, C., Zhang, Y., Cui, H., & Wang, X. (2017). Different Dynamic Distribution in Chickens and Ducks of the Hypervirulent, Novel Genotype Fowl Adenovirus Serotype 4 Recently Emerged in China. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01005>
27. Pereira, C. G., Marin, S. Y., Santos, B. M., Resende, J. S., Resende, M., Gomes, A. M., & Martins, N. R. S. (2014). Occurrence of Aviadnavirus in chickens from the poultry industry of Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 66(3), 801–808. <https://doi.org/10.1590/1678-41625899>
28. 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 Pathology: Journal of the W.V.P.A*, 47(2), 111–126. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1385724>
29. Schmittgen, T. D., Zakrajsek, B. A., Mills, A. G., Gorn, V., Singer, M. J., & Reed, M. W. (2000). Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Analytical Biochemistry*, 285(2), 194–204. <https://doi.org/10.1006/ABIO.2000.4753>
30. Spronk, I., Korevaar, J. C., Poos, R., Davids, R., Hilderink, H., Schellevis, F. G., Verheij, R. A., & Nielen, M. M. J. (2019). Calculating incidence rates and prevalence proportions: not as simple as it seems. *BMC Public Health*, 19(1), 512. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-6820-3>
31. 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. *Undefined*, 43(2), 262–270. <https://doi.org/10.2307/1592616>
32. Warburg, O.a.W.C. (1942). Isolation and crystallization of enolase. *Biochemische Zeitschrift* 310, 384-421.

33. Yu, G., Lin, Y., Dou, Y., Tang, Y., & Diao, Y. (2019). Prevalence of Fowl Adenovirus Serotype 4 and Co-Infection by Immunosuppressive Viruses in Fowl with Hydropericardium Hepatitis Syndrome in Shandong Province, China. *Viruses*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/V11060517>
34. Zeng, Z., Zhang, J., Jing, S., Cheng, Z., Bofill-Mas, S., de Motes, C. M., Hundesa, A., Girones, R., Seto, D., & Zhang, Q. (2016). Genome Sequence of a *Cynomolgus* Macaque Adenovirus (CynAdV-1) Isolate from a Primate Colony in the United Kingdom. *Genome Announcements*, 4(6). <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.01193-16>
35. Zhang, T., Jin, Q., Ding, P., Wang, Y., Chai, Y., Li, Y., Liu, X., Luo, J., & Zhang, G. (2016). Molecular epidemiology of hydropericardium syndrome outbreak-associated serotype 4 fowl adenovirus isolates in central China. *Virology Journal*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0644-x>
36. Zhao, J., Zhong, Q., Zhao, Y., Hu, Y. X., & Zhang, G. Z. (2015). Pathogenicity and Complete Genome Characterization of Fowl Adenoviruses Isolated from Chickens Associated with Inclusion Body Hepatitis and Hydropericardium Syndrome in China. *PLOS ONE*, 10(7), e0133073. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0133073>