



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

**CARACTERIZACIÓN DE LOS VIRUS DE LARINGOTRAQUEÍTIS
INFECCIOSA AISLADOS EN MÉXICO ENTRE 2005 Y 2009
MEDIANTE PCR, RFLP's Y SECUENCIACIÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

NADIA ROMERO GALLEGOS

ASESOR: NESTOR LEDESMA MARTÍNEZ

COMITÉ TUTORAL: ALVARO AGUILAR SETIÉN
JOSE JUAN MARTÍNEZ MAYA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A Dios

A mis papás, Martha y Angel

A mis hermanas, Marissa y Denisse

A Paola, Cerebra[†] y Felipe[†]

Compartiendo con ustedes este logro...

Con todo mi amor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mi familia por mantenerme en pie.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A mi asesor, Dr. Nestor Ledesma Martínez, y al Dr. Miguel Angel Márquez por darme la oportunidad de realizar este trabajo.

A mi Comité Tutoral: Dr. Alvaro Aguilar Setién y Dr. José Juan Martínez Maya.

A mis jurados: Dr. Abel Ciprian, Dr. Iván Sanchez, Dr. Rogelio Alonso, Dr. Luis Padilla.

Al Dr. Fernando Layseca, Dr. Víctor Ruíz, Dr. Juan Carlos Valladares, MVZ Ephraim Verde, MVZ Ulises Escobedo y Dr. Angel Retana, por su participación en este proyecto al proporcionarnos las muestras.

Al Departamento de Genética Molecular de la FMVZ, especialmente al Dr. Rogelio Alonso, Amanda Gayosso y Emilio Venegas.

Al MC Félix D. Sánchez, José G. González y Alfredo Díaz.

A todo el personal del Departamento de Producción Animal: Aves.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada con número de registro 219082.

Al apoyo económico del Programa de Fomento a la Graduación de la Coordinación de Estudios de Posgrado.

A todos mis amigos y personas importantes en mi vida que me animaron y me han brindado su apoyo en esos momentos difíciles.

MUCHAS GRACIAS!!!!!!

CONTENIDO

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

SUMMARY

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

JUSTIFICACIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

METAS

MATERIAL Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Identificación y características de las muestras positivas a laringotraqueítis infecciosa en México entre los años 2005-2009.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ubicación geográfica de casos positivos a laringotraqueítis infecciosa en México entre los años 2005 y 2009.
- Figura 2. Casos positivos al virus de laringotraqueítis infecciosa mediante PCR del fragmento de 1847 pb, correspondiente a la región corta del genoma del virus de laringotraqueítis infecciosa.
- Figura 3. Casos positivos al virus de laringotraqueítis infecciosa mediante PCR anidada, fragmentos de 629 y 296 pb, correspondientes al gen de la glicoproteína E del virus de laringotraqueítis infecciosa.
- Figura 4. Casos positivos al virus de laringotraqueítis infecciosa mediante PCR del fragmento de 1847 pb posterior a la purificación de gel.
- Figura 5. Patrones de restricción para el fragmento de 1847 pb, correspondiente a la región corta del genoma del virus de laringotraqueítis infecciosa, con las enzimas *Dde* I y *Cfr* I (*Eae* I).
- Figura 6. Sitios de corte y fragmentos generados por las enzimas de restricción *Dde* I y *Cfr* I (*Eae* I) descritos por García *et. al*, 2001, sobre el fragmento de 1847 pb correspondiente a la región corta del genoma del virus de laringotraqueítis infecciosa.
- Figura 7. Sitios de corte y fragmentos generados por las enzimas de restricción *Dde* I y *Cfr* I (*Eae* I) sobre el fragmento de 1847 pb correspondiente a la región corta del genoma del virus de laringotraqueítis infecciosa.
- Figura 8. Patrones de restricción para el fragmento de 296 pb, correspondiente al gen de la glicoproteína E del virus de laringotraqueítis infecciosa, con las enzimas *Dde* I y *Cfr* I (*Eae* I).

- Figura 9 Sitios de corte y fragmentos generados por las enzimas de restricción *Dde* I y *Cfr* I (*Eae* I) descritos por Sellers *et. al*, 2004, sobre el fragmento de 296 pb correspondiente al gen de la glicoproteína E del virus de laringotraqueítis infecciosa.
- Figura 10 Sitios de corte y fragmentos generados por las enzimas de restricción *Dde* I y *Cfr* I (*Eae* I) sobre el fragmento de 296 pb correspondiente al gen de la glicoproteína E del virus de laringotraqueítis infecciosa.
- Figura 11 Casos positivos al virus de laringotraqueítis infecciosa mediante PCR del fragmento de 1847 pb, posterior a la purificación de gel.
- Figura 12 Filogenia de 10 aislados mexicanos del virus de la laringotraqueítis infecciosa, tomando en cuenta la secuencia de bases de un fragmento de 765 pb correspondientes a las posiciones 135,567 y 136,331 de la secuencia completa de referencia NC_006623 obtenida del GeneBank.
- Figura 13 Filogenia de 10 aislados mexicanos del virus de la laringotraqueítis infecciosa, tomando en cuenta la secuencia de aminoácidos de un fragmento de 765 pb correspondientes a las posiciones 135,567 y 136,331 de la secuencia completa de referencia NC_006623 obtenida del GeneBank.
- Figura 14 Filogenia de 15 aislados del virus de la laringotraqueítis infecciosa (10 mexicanos y 5 de GeneBank), tomando en cuenta la secuencia de bases de un fragmento de 765 pb correspondientes a las posiciones 135,567 y 136,331 de la secuencia completa de referencia NC_006623 obtenida del GeneBank.
- Figura 15 Filogenia de 15 aislados del virus de la laringotraqueítis infecciosa (10 mexicanos y 5 de GeneBank), tomando en cuenta la secuencia de aminoácidos de un fragmento de 765 pb correspondientes a las posiciones 135,567 y 136,331 de la secuencia completa de referencia NC_006623 obtenida del GeneBank.
- Figura 16 Alineamiento de bases de un fragmento de 765 pb del gen de la glicoproteína E de 10 aislados mexicanos del virus de la laringotraqueítis infecciosa.
- Figura 17 Alineamiento de aminoácidos de un fragmento de 765 pb del gen de la glicoproteína E de 10 aislados mexicanos del virus de la laringotraqueítis infecciosa.

- Figura 18 Alineamiento de bases de un fragmento de 765 pb del gen de la glicoproteína E de 15 aislados del virus de la laringotraqueítis infecciosa (10 mexicanos y 5 de GeneBank).
- Figura 19 Alineamiento de aminoácidos de un fragmento de 765 pb del gen de la glicoproteína E de 15 aislados del virus de la laringotraqueítis infecciosa(10 mexicanos y 5 de GeneBank).
- Figura 20 Filogenia de 8 aislados mexicanos del virus de la laringotraqueítis infecciosa, tomando en cuenta la secuencia de bases de un fragmento de 177 pb correspondientes a las posiciones 136,155 y 136,331 de la secuencia completa de referencia NC_006623 obtenida del GeneBank.
- Figura 21 Filogenia de 8 aislados mexicanos del virus de la laringotraqueítis infecciosa, tomando en cuenta la secuencia de aminoácidos de un fragmento de 177 pb correspondientes a las posiciones 136,155 y 136,331 de la secuencia completa de referencia NC_006623 obtenida del GeneBank.
- Figura 22 Filogenia de 21 aislados del virus de la laringotraqueítis infecciosa (8 mexicanos y 13 de GeneBank), tomando en cuenta la secuencia de bases de un fragmento de 177 pb correspondientes a las posiciones 136,155 y 136,331 de la secuencia completa de referencia NC_006623 obtenida del GeneBank.
- Figura 23 Filogenia de 21 aislados del virus de la laringotraqueítis infecciosa (8 mexicanos y 13 de GeneBank), tomando en cuenta la secuencia de aminoácidos de un fragmento de 177 pb correspondientes a las posiciones 136,155 y 136,331 de la secuencia completa de referencia NC_006623 obtenida del GeneBank.
- Figura 24 Alineamiento de bases de un fragmento de 177 pb del gen de la glicoproteína E de 8 aislados mexicanos del virus de la laringotraqueítis infecciosa.
- Figura 25 Alineamiento de aminoácidos de un fragmento de 177 pb del gen de la glicoproteína E de 8 aislados mexicanos del virus de la laringotraqueítis infecciosa.
- Figura 26 Alineamiento de bases de un fragmento de 177 pb del gen de la glicoproteína E de 21 aislados del virus de la laringotraqueítis infecciosa (8 mexicanos y 13 de GeneBank).

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CEO	Chicken embryo origin (Origen embrión de pollo)
dNTP	Dinucleotide triphosphate (Dinucleótido trifosfato)
EDTA	Etil-diamin-tetracetic acid (Ácido Etildiaminotetraacético)
H&E	Hematoxilina y Eosina
HVT	Herpesvirus turkey (Herpesvirus del pavo)
Kb	Kilobases
LTI	Laringotraqueítis infecciosa
MCA	Membrana corioalantoidea
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mL	Mililitros
µL	Microlitros
µg	Microgramos
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffer solution (Solución amortiguada de fosfatos)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción)
TCO	Tissue culture origin (Origen cultivo celular o de tejidos)
Tris-HCl	Tris-Ácido clorhídrico
UV	Ultravioleta
VLTl	Virus de la laringotraqueítis infecciosa

SUMMARY

ROMERO GALLEGOS NADIA. Characterization of infectious laryngotracheitis viruses isolated in Mexico between 2005 and 2009 by PCR, RFLP's and sequencing. Tutor: Dr. Nestor Ledesma Martínez. Tutoral Commite: Dr. Alvaro Aguilar Setién, Dr. José Juan Martínez Maya.

Avian Infectious laryngotracheitis has become in a important subject of the poultry in many countries. Mexico is not exception. First clinical report and viral isolation of this disease was done at 1960, during the first great epizooty that finished with the commercial poultry in Mexico Valley and other poultry areas. This way, the avian infectious laryngotracheitis virus acquired the endemic form in the Mexican poultry.

The present study was carried on the characterization by PCR, RFLP's and sequencing of infectious laryngotracheitis viruses isolated in Mexico between the years 2005 and 2009, considering that the yield isolates of outbreaks of layers and broilers are related with vaccine strains and American isolates.

From 36 positive samples of avian infectious laryngotracheitis, PCR was done of a fragment of 1847 bp, and other nested PCR of a fragment of 296 bp, both code the glycoprotein E gene. The PCR products were digested by enzymatic digestion with *Dde* I and *Cfr* I. Sequencing was done from the 1847 bp fragment.

More positives samples were obtained with nested PCR, but the fragment of 1847 bp provides more restriction sites and fragments with these restriction enzymes and more information to diference between vaccine and yield strains. The sequencing analysis, and the RFLP's analysis, suggest that evaluated viruses are related to the chicken embryo vaccine viruses, and the Mexican avian infectious laryngotracheitis viruses are not related with American viruses.

Keywords: Laryngotracheitis, birds, sequencing, glycoprotein E, herpesvirus.

RESUMEN

ROMERO GALLEGOS NADIA. Caracterización de los virus de laringotraqueítis infecciosa aislados en México entre 2005 y 2009 mediante PCR, RFLP's y secuenciación. Asesor: Dr. Nestor Ledesma Martínez. Comité tutorial: Dr. Alvaro Aguilar Setién, Dr. José Juan Martínez Maya.

La laringotraqueítis infecciosa aviar (LTI) se ha convertido en un tema importante en el ambiente avícola de muchos países del continente americano. México no es la excepción. El primer reporte clínico y aislamiento viral de esta enfermedad en México fue hecho en 1960, durante la primera gran epizootia que devastó a la avicultura comercial del Valle de México y de otras zonas avícolas del país. De esta manera, el virus de la laringotraqueítis infecciosa aviar (VLT) adquirió su carácter de endémico en la avicultura mexicana.

En el presente estudio se llevó a cabo la caracterización mediante PCR, RFLP's y secuenciación de virus de LTI aislados en México entre los años 2005 y 2009, considerando que los aislamientos de campo, a partir de brotes en aves de postura y pollo de engorda, están relacionados con cepas vacunales y aislamientos de procedencia estadounidense.

A partir de 36 muestras positivas a LTI se realizaron PCR de un fragmento de 1847 pb, y una PCR anidada para un fragmento de 296 pb que codifican el gen de la glicoproteína E. A partir de productos de PCR se llevó a cabo la digestión enzimática de los dos fragmentos con las enzimas *Dde* I y *Cfr* I (*Eae* I). La secuenciación se llevó a cabo a partir del fragmento de 1847 pb.

Se obtuvo mayor número de muestras positivas con la PCR anidada que con la del fragmento mayor, pero el fragmento de 1847 pb nos proporciona un mayor número de cortes con las enzimas de restricción y, por lo tanto, mayor información para diferenciar entre cepas vacunales y de campo. El análisis de secuenciación, junto con los RFLP's, sugiere que los virus estudiados están emparentados con virus vacunales de embrión de pollo y que los virus en México no tienen relación con los virus estadounidenses.

Palabras clave: Laringotraqueítis, aves, secuenciación, glicoproteína E, herpesvirus.

I. INTRODUCCIÓN

La laringotraqueítis infecciosa aviar (LTI) se ha convertido en un tema importante en el ambiente avícola de muchos países del continente americano. México no es la excepción. Después de muchos años de considerarse un padecimiento propio de gallinas ponedoras o reproductoras, es ahora una de las infecciones más temibles en las granjas de pollo de engorda.¹

Es una enfermedad viral de las vías respiratorias de pollos que puede resultar en pérdidas graves en la productividad debidas a mortalidad, menor producción de huevo o ambas.² Es una enfermedad aguda caracterizada por signos de depresión respiratoria, boqueo y expectoración de moco sanguinolento. La mucosa de la tráquea presenta edema, inflamación, erosión y hemorragias. Las inclusiones intranucleares están presentes en las etapas tempranas.^{2, 3}

HISTORIA

La enfermedad fue descrita por vez primera en 1925, pero algunos reportes indican que pudo haber existido con anterioridad. Ha sido identificada como laringotraqueítis, laringotraqueítis infecciosa y difteria aviar. Algunos de los primeros investigadores también se refirieron a la enfermedad como bronquitis infecciosa.^{2, 3} El término laringotraqueítis fue usado en 1930 y el nombre laringotraqueítis infecciosa fue adoptado en 1931 por el Comité Especial sobre Enfermedades Aviares de la Asociación Americana en Medicina Veterinaria.^{2, 4}

INCIDENCIA Y DISTRIBUCIÓN.

La LTI ha sido identificada en la mayoría de los países. Es una enfermedad seria (grave) de los pollos en áreas de gran concentración de aves en los EU, Europa y Australia. En los países en desarrollo, los virus de LTI han tendido a persistir como infecciones endémicas en parvadas de traspatio y en aves ornamentales.^{2, 4}

Aunque los brotes de LTI pueden iniciar en cualquier época del año, muchos de ellos tienden a ocurrir durante los meses de otoño e invierno.⁵

IMPORTANCIA

Esta enfermedad provoca pérdidas económicas por daños directos debido a mortalidad, bajo rendimiento, tratamientos paliativos y complicación con otros agentes virales o bacterianos. La concentración de granjas en una cierta zona geográfica parece ser un factor predisponente para la diseminación del virus². En áreas de producción avícola, la LTI es responsable por pérdidas debido a la disminución en la producción de huevo y mortalidad, además por el uso de vacunas de manera masiva en muchas empresas mexicanas donde ha sido diagnosticada.¹ El virus de la laringotraqueítis infecciosa (VLTi) tiende a persistir en aves recuperadas después del período de enfermedad y puede reactivarse a partir de éstas aves siendo el responsable de nuevos brotes de enfermedad.^{6, 7, 8, 9}

ETIOLOGIA

El virus de la laringotraqueítis infecciosa (VLTi) es clasificado, hasta ahora, como el único miembro del género *Iltovirus* de la subfamilia *Alfaherpesvirinae* de la familia *Herpesviridae*. De manera taxonómica se clasifica como *Gallid herpesvirus 1* (GaHV-1).^{2, 10, 11, 12}

Morfología

El VLTi tiene todas las características del grupo herpes. Contiene ADN en un núcleo dentro de una cápside icosaédrica rodeada por una capa de proteína y una envoltura externa con finas proyecciones que representan espículas de glicoproteína viral integrada en su superficie.^{2, 5} La partícula viral completa tiene un diámetro que varía entre 200 y 350 nm.¹⁰

Composición química

El ADN del VLTi tiene una proporción de guanina-citosina de 45%¹¹, el cual es menor que el de muchos otros herpesvirus animales.² Los análisis de restricción revelaron que el genoma del VLTi es de ADN lineal de doble cadena de 155 kb, y consiste de dos regiones únicas (U_L (largo), U_S (corto)) y de secuencias invertidas repetidas (IR, TR) al lado de la región U_S .^{2, 10, 11} Las glicoproteínas del virus, al igual que otros herpesvirus, originan las respuestas

humoral y mediada por células.² El genoma del VLTl contiene 76 marcos de lectura abiertos.¹¹ Once de estos marcos de lectura codifican glicoproteínas homólogas a las del Herpesvirus simple 1 (HVS-1), y son la gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL y gM.^{10, 11, 12}

Replicación viral

El ciclo de replicación se ha estudiado muy poco, pero parece ser similar al de los otros alfa herpesvirus parecidos al Herpesvirus simple 1 (HVS-1).¹² La primera progenie de virus infectantes es formada de 8 a 12h después de la infección, y alcanzan un máximo después de 24 a 30h.¹⁰

El virus se adhiere a los receptores celulares. Fusiona su envoltura con la membrana plasmática de la célula hospedadora. Dentro del núcleo celular se desarrolla la transcripción y replicación del ADN viral. Durante la transcripción, se producen casi 70 proteínas codificadas por el virus que regulan la replicación del ADN viral, pero gran parte son proteínas virales estructurales. Las nucleocápsides llenas de ADN adquieren la envoltura de la membrana nuclear. Las partículas envueltas migran a través del retículo endoplásmico y se acumulan en las vacuolas del citoplasma de donde los viriones envueltos se liberan mediante lisis celular o por medio de fusión y exocitosis.^{2, 10}

Resistencia a agentes físicos y químicos

El VLTl es sensible a los efectos y a los agentes lipolíticos como el cloroformo y otros. Sobrevive durante varios meses, cuando se le almacena a 4 °C en diluentes adecuados como el glicerol o el caldo nutritivo. Se inactiva rápidamente por medio de calor a 55 °C durante 15 minutos o a 38 °C por 48 horas.² Aunque el virus es fácilmente destruido mediante los desinfectantes comunes, la eficacia de estos se afecta con la presencia de materia orgánica en el laboratorio de pruebas.¹³

Clasificación de las cepas

Las cepas del VLTl que se desarrollan de manera natural, varían en su virulencia desde cepas de alta virulencia que originan gran morbilidad y mortalidad en los pollos expuestos, hasta cepas de virulencia baja que ocasionan infección leve a inaparente. Las cepas del VLTl parecen ser

antigénicamente homogéneas con base en pruebas de neutralización de virus, inmunofluorescencia y estudios de protección cruzada.²

La diferenciación de las cepas de VLTÍ de virulencia variable, en particular de los virus de tipo silvestre y los vacunales activos modificados, es un problema práctico importante. Se han identificado varios métodos para diferenciar al VLTÍ, incluyendo el análisis de la virulencia para embriones de pollo, análisis de patrones de restricción de ADN viral, y pruebas de hibridación de ADN. Se ha visto que mediante la separación electroforética de los fragmentos de ADN resultantes del tratamiento con endonucleasas de restricción, se distinguen diferentes cepas de VLTÍ. Éste método se ha utilizado de manera extensa en estudios epidemiológicos de brotes de campo, para diferenciar a los virus de tipo silvestre de los vacunales activos modificados.²

HOSPEDEROS NATURALES Y EXPERIMENTALES

El pollo y faisán son los hospederos naturales del VLTÍ.^{2, 10, 14} Aunque la enfermedad afecta a todas las edades, los signos más característicos se observan en aves adultas. La multiplicación viral se limita a los tejidos respiratorios con pequeña o ninguna evidencia de viremia.^{2, 3} A pesar de reconocerse su capacidad de multiplicarse en pavos y codornices, ésta enfermedad es exclusivamente un padecimiento de la gallina y pollo domésticos.^{1, 10}

TRANSMISIÓN

Las vías naturales de entrada para el VLTÍ son las vías respiratorias altas y la ocular. La ingestión también puede ser un modo de infección, aunque tal vez se requiera de la exposición del epitelio nasal luego de la ingestión. La transmisión se desarrolla con mayor facilidad a partir de aves infectadas de manera aguda, que a través del contacto con aves portadoras recuperadas clínicamente. La infección por VLTÍ de las vías respiratorias superiores de pollos susceptibles es seguida por una intensa replicación viral. Varios estudios han confirmado de manera independiente que el virus infectante suele encontrarse en tejidos y secreciones traqueales a los 6 a 8 días post-infección, y el virus puede

permanecer a muy bajas concentraciones hasta por 10 días post-infección. No existe evidencia de una fase virémica de la infección.²

INMUNIDAD

El principal mediador de la resistencia al VLTl es la respuesta inmunitaria mediada por células ubicadas en la tráquea. Los anticuerpos maternos al VLTl se transmiten a la progenie por medio del huevo, pero estos anticuerpos no confieren protección a la infección ni interfieren con la vacunación. Sin embargo, la respuesta humoral relacionada con la infección por el VLTl no es un mecanismo primario de protección y, por lo general, se encuentra una baja correlación entre los títulos de anticuerpos séricos y el estado inmunitario de las parvadas. Los pollos menores de 2 semanas de edad no responden tan bien a la vacunación como las aves de mayor edad, aunque pueden vacunarse con éxito al día de edad. En pollos mayores de 2 semanas, la vacunación o la exposición de campo al VLTl confieren protección contra el desafío, que resulta parcial a los 3 a 4 días posteriores a la vacunación y completa a los 6 a 8 días.²

PERIODO DE INCUBACIÓN

En promedio, varía de 6-12 días después de la infección natural por las vías ocular o respiratoria, y de 2-4 días después de la infección experimental intratraqueal.² La característica más relevante de éste virus es su capacidad de desarrollar un estado de portador crónico en las aves, después de una fase aguda de infección de 7 días, en el que el virus queda alojado en ganglio del nervio trigémino en un “estado latente”.^{1, 10}

Epidemiológicamente, esto es muy importante, ya que en aves que fueron vacunadas o que se han recuperado de la enfermedad, el virus puede ser reactivado espontáneamente o bajo condiciones de estrés, como el encasamiento o un periodo cercano a la postura. Ya reactivado, el virus puede causar enfermedad por medio de pases de ave a ave en poblaciones susceptibles, así como también incrementar su virulencia.^{7, 8, 9}

MORBILIDAD Y MORTALIDAD

Las formas epizoóticas graves de la enfermedad originan alta morbilidad (90 a 100%) y una mortalidad variable; por lo general, la mortalidad varía de 5 a 70% y promedia 10 a 20%.²

SIGNOS Y LESIONES

La severidad de los signos clínicos depende de la virulencia de la cepa, estado inmunitario del ave y complicaciones bacterianas.^{1, 10} En pollos origina una enfermedad respiratoria aguda. Los signos de la forma leve son descarga nasal, conjuntivitis, lagrimeo, inflamación de senos infraorbitarios, y producción de huevo reducida. Las formas severas se caracterizan por boqueo, expectoración mucosanguinolenta, y marcada disnea. Las lesiones se encuentran en la conjuntiva (blefaroconjuntivitis), laringe y tráquea (hemorragias en la capa mucosa) y, algunas veces, en los pulmones y sacos aéreos.^{2, 10} El curso de la infección varía de acuerdo con la gravedad de las lesiones. Por lo general, gran parte de los pollos se recuperan en 10 a 14 días, y en extremo de 1 hasta 4 semanas.²

Los cambios microscópicos varían según la etapa de la enfermedad. De modo inicial la mucosa de la tráquea presenta infiltración de células inflamatorias, pérdida de cilios y de las células caliciformes. En casos de intensa destrucción y descamación celulares puede desarrollarse hemorragia, debida a exposición y ruptura de los capilares sanguíneos. A los tres días de post-infección, en las células epiteliales se encuentran cuerpos de inclusión intranucleares. Dichos cuerpos suelen presentarse sólo en las etapas iniciales de la infección (1 a 5 días); según se desarrolla la infección, éstos desaparecen como resultado de la necrosis y descamación de las células epiteliales.²

DIAGNÓSTICO

Histopatología

La LTI se caracteriza por el desarrollo de cuerpos de inclusión intranucleares patognomónicos en las células del epitelio traqueal y de la conjuntiva con las tinciones de Giemsa y H&E. Se ha demostrado que el diagnóstico basado en la

demostración de cuerpos de inclusión, resulta menos sensible que el aislamiento del virus.^{2, 6}

Microscopía electrónica

El diagnóstico depende de la visualización e identificación morfológica del herpesvirus y, de este modo, sólo tiene éxito cuando se encuentran grandes cantidades de partículas virales en las muestras clínicas, como raspados traqueales.^{2, 6}

Aislamiento

Se lleva a cabo con la inoculación de suspensiones de exudado respiratorio, exudado de la conjuntiva o tejido por la vía de membrana coriolantoidea (MCA) de huevos de pollo embrionados de 9 a 12 días de edad, o en cultivos celulares susceptibles, como las células hepáticas de embrión de pollo (CHEPO) y las células renales de embrión de pollo (CREPO). Las muestras clínicas pueden incluir tráquea, laringe, pulmones, conjuntiva o exudados de estos mismos lugares, y deben recolectarse al empezar la infección, ya que estudios experimentales indican que no se detecta o se detecta de manera inconsistente al VILT después de seis días de infección.^{2, 6}

Serología

Se ha descrito una variedad de técnicas para la demostración de los anticuerpos contra VLTI en suero, incluyendo inmunodifusión en agar gel (IDAG), neutralización de virus (NV), prueba de anticuerpos fluorescentes indirecta (PAFI), y ELISA. Estos procedimientos también se pueden utilizar para identificar VLTI en cultivos celulares y MCA infectadas.²

Técnicas moleculares (PCR y RFLP's)

La combinación de las técnicas moleculares facilitan la diferenciación de los aislamientos del virus para estudios epidemiológicos y filogenéticos.¹⁰ Se puede hacer la comparación de los genomas de virus de campo y cepas vacunales amplificando secuencias de ADN de varios tamaños utilizando iniciadores específicos diseñados para evaluar secuencias del genoma viral.⁶ Algunas de las proteínas que se han usado son timidin kinasa, ICP4,

glicoproteína C y X mediante RFLP's y secuenciación¹⁰. Las técnicas moleculares son más sensibles que el aislamiento viral, ya que se demostró que podían identificar el VLTl en muestras que estaban contaminadas con otros microorganismos que evitaban el aislamiento del virus. También, la PCR es considerada una de las técnicas de diagnóstico que nos permite obtener resultados en menor tiempo que el aislamiento viral. Por otro lado, los RFLP's nos permiten realizar comparaciones de fragmentos de ADN, los cuales son cortados en regiones específicas por endonucleasas o enzimas de restricción, posteriormente ser visualizados en geles de poliacrilamida.²

TRATAMIENTO

No se ha demostrado que algún fármaco sea eficaz en reducir la intensidad de las lesiones o que alivie los signos de enfermedad. Si se logra un diagnóstico de LTI al inicio de un brote, la vacunación de las aves no afectadas puede inducir una protección adecuada antes de que se encuentren expuestas.

PREVENCIÓN Y CONTROL

- Bioseguridad

Los procedimientos básicos de bioseguridad son muy efectivos para prevenir la presentación de laringotraqueítis infecciosa y muchas enfermedades en una parvada, y evitar la diseminación del virus entre casetas.^{2, 5}

- Inmunización

La vacunación ha probado ser un método satisfactorio para desarrollar resistencia en las poblaciones de pollos susceptibles. Puesto que la vacunación puede resultar en aves portadoras infectadas de manera latente, sólo se recomienda utilizarla en zonas geográficas donde la enfermedad sea endémica. Existen tres tipos de vacuna:

- ◆ *Vacuna virus activo cultivado en embrión de pollo*

Esta vacuna activa atenuada mediante pases en embrión de pollo generalmente se desarrolló para producir inmunidad en pollos de más de 2 semanas de edad cuando se aplican por vía ocular. Sin embargo, estas

mismas se pueden aplicar en el agua de bebida y bajo ciertas condiciones también por aspersión.^{5, 15}

Las características de esta vacuna son que es altamente infecto-contagiosa, muy inmunogénica, se transmite de ave a ave, lo cual hace que revierte a su virulencia original. Las aves recuperadas quedan como portadoras de por vida y se provocan brotes de variable magnitud cuando se disemina a aves no vacunadas. Es más segura y efectiva aplicada por vía ocular.¹

◆ *Vacuna elaborada en cultivos celulares*

Vacuna activa atenuada mediante pases en cultivos celulares. Se utiliza cuando se manejan las aves en forma individual para la aplicación de otras vacunas, puesto que su aplicación sólo se recomienda por vía de gota en el ojo. Los virus contenidos en este tipo de vacunas son sumamente atenuados y no se consideran como transmisibles de ave a ave ni como origen de brotes.^{5, 15}

Este tipo de vacuna es producida en células hepáticas de embrión de pollo, caracterizada por ser menos inmunogénica, provoca una reacción muy suave, debe ser aplicada vía ocular, requiere estricta aplicación individual, no se propaga de ave a ave y no crea portadores asintomáticos, tampoco revierte a su virulencia original.¹

Estas vacunas atenuadas inducen protección, previenen los signos clínicos y mortalidad, y pueden persistir en aves aparentemente sanas pudiendo diseminarse de ave a ave.^{2, 7, 16, 17, 18}

◆ *Vacuna Recombinante Viruela-Laringotraqueítis (rViruela/LTI)*

El desarrollo de una vacuna recombinante Viruela-LTI ofrece la oportunidad de una aplicación a las 8 semanas de edad vía punción en la membrana del ala. Al mismo tiempo que se inmuniza contra Viruela Aviar y contra Encefalomielititis Aviar (EA). Esta última vacuna ofrece la gran ventaja de no producir aves portadoras, la fuente principal de brotes clínicos. Esta vacuna se puede aplicar a más temprana edad. La recomendación de la aplicación a las 8 semanas de edad es para aprovechar la oportunidad para inmunizar contra Encefalomielititis Aviar (EA) en ponedoras pero es probable que se pueda aplicar en pollos de carne a menor edad siempre y cuando no se hayan vacunados éstos previamente contra viruela.^{5, 15}

Ésta vacuna contiene una porción del genoma del virus de laringotraqueítis insertado en un virus de viruela aviar. No se propaga de ave a ave, no revierte a su virulencia original ni produce portadores asintomáticos. Es muy inmunogénica. Se aplica por punción en el ala y requiere ser la primera vacuna contra viruela aviar. A su vez, requiere una estricta aplicación individual.⁵

**Vacunación In-Ovo contra LTI*

Como resultado del alto número de casos de LTI internacionalmente, y con el consecuente aumento de la demanda del uso de vacunas de uso tradicional, inicialmente se generó una escasez de vacuna. Para tratar de proteger a las aves y buscando nuevos métodos de inmunizar en forma práctica, se intentó en el área de Delmarva, E.U.A, y en forma experimental, la vacunación contra LTI por el método *In-Ovo* utilizando la vacuna r-Viruela/LTI, y una vacuna experimental recombinante HVT/LTI (r-HVT/LTI). Los resultados del uso de éstas vacunas no han sido del todo satisfactorios debido a que causan lesiones, mortalidad en el embrión y baja protección al desafío a dosis normales (r-Viruela/ LTI), mortalidad y reacciones vacunales severas cuando se vacuna contra Newcastle y bronquitis infecciosa al día de edad. La vacuna experimental recombinante r-HVT/LTI mostró resultados prometedores al desafío post-vacunal.¹⁵

Es importante destacar que no se debe vacunar contra Newcastle o bronquitis infecciosa 8 días antes o después de vacunar contra LTI, ya que se produce interferencia. La inmunidad materna no protege a la descendencia.¹

LA ENFERMEDAD EN MÉXICO

El primer reporte clínico y aislamiento viral en México fue hecho por Cuadra y colaboradores¹⁹ en 1960, durante la primera gran epizootia que devastó a la avicultura comercial del Valle de México y de otras zonas avícolas del país. De esta manera, el VLTi adquirió su carácter de endémico en la avicultura mexicana, con un comportamiento cíclico errático estacional, caracterizados por periodos de baja virulencia durante algunos años, y otros periodos de alta actividad provocando numerosos brotes con alta mortalidad y enormes pérdidas económicas, durante otros años. Estos patrones epidemiológicos exigen a los productores vacunar obligadamente a sus parvadas.¹⁹

Las vacunas con virus activo, desarrolladas en las décadas de los años 40 y 50, fueron elaboradas en embrión de pollo, pero debido a que los virus de la familia *Herpesviridae* poseen la característica de hacer estados de latencia^{1,10}, en el campo puede ocurrir a menudo brotes post-vacunales en parvadas mal vacunadas. Con el objeto de intentar disminuir éstas reacciones post-vacunales indeseables (brotes ocasionales), virólogos e inmunólogos desarrollaron vacunas con virus activo más atenuadas, elaboradas en cultivo de tejidos. Dichos inmunógenos, en efecto, producen menos estados de latencia, sin embargo, son menos inmunogénicas.²⁰

JUSTIFICACIÓN

Aunque se describió desde 1925 y aún con buenas vacunas y programas de vacunación, la LTI sigue causando serios y numerosos problemas a la producción comercial de huevo y a la producción de pollo de engorda. A partir de 1995 y hasta recientemente, se han presentado casos clínicos de LTI en varias áreas avícolas de los Estados Unidos, así como en varios países latinoamericanos. Estudios epidemiológicos moleculares sugieren que la mayoría de los virus presentes en brotes de pollo de engorda en los Estados Unidos están cercanamente relacionados a las vacunas de origen de embrión de pollo, mientras que los brotes a partir de virus similares a los de cultivo celular son raros.^{21, 22, 23, 24, 25} En general se ve un persistente aumento en la presentación de LTI. El origen de estos brotes, se sospecha, es exposición de aves susceptibles a virus vacunal proveniente de aves previamente vacunadas. En muchos estados con gran población de ponedoras los casos de LTI se presentan continuamente, especialmente en las granjas con edades múltiples.¹⁵

A fines del año 2004, se observó una serie de brotes de LTI en parvadas de gallina de postura en el estado de Sonora. Dichos brotes fueron, paulatina e inadvertidamente diseminándose a los estados de Sinaloa y Nayarit. El VLTI afectó parvadas, tanto de gallina de postura como de pollo, en el estado de Nuevo León. A lo largo de 2005, se presentaron focos de esta enfermedad en el valle de México, Puebla y Veracruz.

A lo largo de 2006, la LTI se diseminó en el Bajío y Jalisco. La presencia de catarro de lenta diseminación y baja morbilidad, acompañado de una cierta cantidad de aves con conjuntivitis fueron los primeros signos en la mayoría de los brotes observados en México.¹ Además, aunque las vacunas son eficaces, muchas de ellas poseen una virulencia residual considerable, la cual puede aumentar incrementando el número de pases en el ave, por lo cual, muchos de los brotes de LTI han sido atribuidos a que las cepas vacunales pueden revertir su virulencia.¹⁰ Ante esta preocupante situación provocada por la reactivación del VLTI, después de algunos años de una relativa calma y baja actividad de este herpesvirus, surge el siguiente cuestionamiento: ¿Por qué los primeros

brotos se presentaron en Sonora y como llegó el virus a este estado, siendo una región limpia y poco poblada desde el punto de vista avícola?

HIPÓTESIS

Los aislamientos de campo del VLTl hechos en México entre los años 2005 y 2009, a partir de brotes en aves de postura y pollo de engorda, están relacionados con cepas vacunales y aislamientos de procedencia estadounidense.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar mediante polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP's) y secuenciación de nucleótidos del gen que codifica para la glicoproteína E los virus de LTI aislados en México entre los años 2005 y 2009.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Caracterizar mediante RFLP's y secuenciación de nucleótidos del gen que codifica para la glicoproteína E los virus de LTI aislados en México entre los años 2005 y 2009.
- II. Comparar los patrones de restricción y secuencias de nucleótidos del gen de la glicoproteína E con virus vacunales y virus descritos previamente.

METAS

1. Obtener aislamientos del VLTI de diferentes partes de México.
2. Ampliar mediante la técnica de PCR un fragmento de 1847 pb y otros de 629 y 296 pb para la PCR anidada, de cada uno de los aislamientos obtenidos.
3. Determinar el tamaño de los fragmentos de ADN mediante la técnica de RFLP's de los productos amplificados mediante las enzimas *Cfr I (Eae I)* y *Dde I*.
4. Hacer la comparación de los fragmentos obtenidos por RFLP's.
5. Secuenciar un virus representativo de cada grupo obtenido.
6. Realizar la comparación de las secuencias con cepas vacunales y procedentes de E.U. (GeneBank).

II. MATERIAL Y MÉTODOS

VIRUS

Se utilizaron 36 muestras correspondientes a aislados con diagnóstico positivo a LTI proporcionados por varios laboratorios de diagnóstico del país, los cuales se realizaron en el periodo comprendido entre los años 2005 y 2009 (**Cuadro 1**). Los laboratorios participantes se encuentran ubicados en los estados de Jalisco, Monterrey, Veracruz y Distrito Federal, y reciben muestras de diferentes regiones del país. Las muestras provienen de órganos, tales como laringe, tráquea y pulmón de aves de postura y engorda, de diferentes edades, y a partir de las cuales se realizan los aislamientos en embrión de pollo, dando el resultado positivo posterior al estudio histopatológico de las membranas corioalantoideas.

Cabe mencionar que las muestras enviadas de los laboratorios fueron inóculos de macerados de las membranas positivas a LTI homogenizadas en PBS. No se realizaron pases posteriores para propagación de virus en embrión de pollo de las muestras.

EXTRACCIÓN DE ADN

A partir de los inóculos de macerados de membrana corioalantoidea homogenizados en PBS, se realizó la extracción de ADN viral de acuerdo a la modificación del método descrito por Han *et al.*²⁶

Brevemente, a 250 µL del macerado se le añadieron 250 µL de solución de lisis conteniendo SDS (duodecil sulfato de sodio, concentración final 1%), 0.001M EDTA, 0.01M Tris-HCl pH 8.0, y 12.5 µL de proteinasa K (20 mg/mL), con el fin de romper la membrana celular y liberar al virus. Las muestras se incubaron a 37° C por 2h en baño María. Cada suspensión se trató con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y posteriormente con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) para disolver la cápside viral. El ADN fue precipitado con un volumen de alcohol isopropílico a -20° C durante 2h. El ADN se centrifugó a 12,500 rpm durante 10 minutos y se lavó con etanol 70%. Cada

muestra fue disuelta en 30 µL de agua destilada estéril y congelada a -20° C hasta su utilización.

PCR

A las 36 muestras se les realizó la técnica de PCR para un fragmento de 1847 pb. Se utilizaron los iniciadores descritos²⁷ 5'-GGCTGACCAGGATAGTGAAC-3' (sentido) y 5'-GGTAAGATTTCCCGATTCTC-3' (reversa), los cuales codifican una porción de la región corta del genoma del VLTI, que amplifica un fragmento de 1847 pb entre las posiciones 134,920 y 136,787 del genoma descrito para el VLTI (GeneBank NC_006623). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (PCR Express Thermo Hybaid, Hybaid Limited 24913), con un volumen de reacción de 20 µL, e incluyeron: 2.5 mM MgCl₂ (Biogenica 30 mM), 200 µM dNTP Mix (Fermentas 10 mM, #R0192), 0.5 µM de cada iniciador, 2.5 U *Taq* DNA polimerasa (Amplificasa Biogenica 5U/ µL), 1X amortiguador PCR (Biogenica 10X) y 5 µL de muestra de ADN. Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 94° C por 5 minutos, 35 ciclos de 94° C por 15 segundos (desnaturalización), 50° C por 45 segundos (alineamiento), 72° C por 1 minuto (extensión), y una extensión final a 72° C por 10 minutos.

Así también se realizó una PCR anidada utilizando los iniciadores descritos²⁸ 5'-GCTGGGTTCTGGGCTACACAAC-3' (sentido) y 5'-TGCGCGTGACTIONCGGAGAG-3' (reversa) que amplifican un fragmento de 626 pb codificando una porción de la región única corta del genoma del VLTI, así como 5'-GACACCATCAAGCCGTCAGAG-3' (sentido) y 5'-CCCAAGAATTCCGCCATCA-3' (reversa) que amplifican un fragmento de 296 pb y codifican el gen para la glicoproteína E del virus.

Las reacciones y el volumen de reacción se llevaron a cabo del mismo modo que en la PCR de 1847 pb. Las condiciones de amplificación para esta PCR anidada fueron las mismas para los dos iniciadores y consistieron en una desnaturalización inicial a 94° C por 4 minutos, 35 ciclos de 94° C por 20 segundos (desnaturalización), 68° C por 40 segundos (alineamiento), 72° C por 1 minuto (extensión), y una extensión final a 72° C por 5 minutos.

En las dos reacciones se utilizó como testigo positivo una vacuna comercial contra laringotraqueítis infecciosa, y como testigo negativo sólo la mezcla para la reacción.

Geles de agarosa

Posterior a cada proceso de PCR, muestras de 5 µL de los productos fueron separadas por electroforesis en geles de agarosa TAE (Tris-ácido acético-EDTA) al 1% a 100 voltios durante 30 a 45 minutos en una cámara de electroforesis horizontal, y teñidas con bromuro de etidio (1 µg/mL). Las bandas de ADN fueron visualizadas en un transiluminador de rayos UV. Se utilizó un marcador de tamaño molecular de 1Kb (Fermentas GeneRuler 1Kb DNA Ladder #SM0313).

Purificación de geles de agarosa para RFLP's y secuenciación

Se cortaron las bandas positivas en los geles de agarosa 1% de los fragmentos de 1847 y 296 pb y se purificaron con el juego de reactivos comercial de Qiagen® (QIAquick Gel Extraction Kit, #Cat. 28704) que funciona mediante separación del ADN a través de membranas de gel de sílica y posterior elución con agua.

RFLP's

Las muestras purificadas de los productos de PCR de 1847 y 269 pb del gen de la glicoproteína E fueron tratados por separado con las enzimas de restricción *Cfr* I (*Eae* I) (Fermentas #ER0161) y *Dde* I (Fermentas #ER1881). Las reacciones incluyeron 15 µL de producto de PCR, 2 µL de amortiguador de reacción, 1 µL de la enzima (10U/µL) y agua estéril cbp 31 µL. Las muestras fueron incubadas en baño María a 37° C durante 2 horas.

Geles de poliacrilamida para la digestión del fragmento de 296 pb

Los productos de digestión con las enzimas de restricción fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%.²⁹ Después de la electroforesis vertical a 130 voltios por 1 hora, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1 µg/mL) y visualizados con un transiluminador de rayos UV. Se utilizó el marcador de tamaño molecular pBR322 *Msp* I (Biogenica 0.05 µg/ µL)

Geles de agarosa TAE 3% para la digestión del fragmento de 1847 pb

Los productos de digestión con las enzimas de restricción fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 3%. Después de la electroforesis horizontal a 100 voltios por 50 minutos, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1 µg/mL) y visualizados con un transiluminador de rayos UV. Se utilizaron los marcadores de tamaño molecular pBR322 *Msp* I (Biogenica 0.05 µg/ µL) y 1 Kb (Fermentas GeneRuler 1Kb DNA Ladder #SM0313).

Patrones de restricción

El tamaño de los fragmentos producidos por la digestión de los productos de PCR mediante las enzimas *Cfr* I y *Dde* I fue calculado mediante el análisis de regresión de los fragmentos del marcador de tamaño molecular pBR322 *Msp* I y posteriormente la sustitución del valor de X en la recta por la distancia en centímetros recorrida por cada fragmento de restricción. Posteriormente, se llevó a cabo la determinación de las bandas de digestión parcial mediante la suma del tamaño de las bandas y la comparación con de los sitios de corte y tamaño de fragmentos previamente descritos.^{20, 27}

SECUENCIACIÓN

A partir de 10 muestras positivas al fragmento de 1847 pb, se llevó a cabo la secuenciación. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1% y fueron cortadas las bandas para purificación de ADN mediante el juego de reactivos comercial de Qiagen® (QIAquick Gel Extraction Kit, #Cat. 28704). Después de la purificación e hidratación de cada muestra en 30 µL de agua estéril, se tomaron 5 µL de muestra de ADN para visualizar la presencia de este nuevamente en un gel de agarosa 1%. Al observarse las bandas positivas al fragmento, el ADN restante de cada muestra fue cuantificado por espectrofotometría para obtener la cantidad requerida del mismo, ajustándolo a una concentración de 70 ng/µL.

En las reacciones de secuenciación se utilizó un juego de reactivos comercial (BigDye Applied Biosystems Terminator v3.1®³⁰) utilizando el iniciador 5'-GCTGGGTTCTGGGCTACACAAC-3' que amplifica un fragmento de 629 pb a una concentración de 3.2 pMol/µL y el ADN a una concentración final de 150 ng/µL de acuerdo al protocolo de secuenciación de Applied Biosystems®³⁰. Las reacciones se colocaron en un termociclador (PCR Express Thermo Hybaid, Hybaid Limited 24913) con las siguientes condiciones: 25 ciclos de 96° C por 10 segundos (desnaturalización), 50° C por 5 segundos (hibridación), y 60° C por 4 minutos (extensión). Finalizado el proceso, los productos de secuenciación fueron purificados mediante la técnica de precipitación con etanol³⁰ y enviados al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM para posteriormente evaluar la lectura mediante un secuenciador automatizado (Applied Biosystems Prism 310). Se utilizaron los programas de cómputo Chromas Pro 1.49 Beta (Technelysium Pty Ltd) para la evaluación en la calidad de las secuencias obtenidas y el

programa Clone Manager Suite 7.0 (Sci Ed Software) para la edición de las mismas.

En forma adicional a la secuencia de referencia completa (NC_006623, E. U.), se obtuvieron del GeneBank 12 secuencias de la misma región para el gen de la glicoproteína E del genoma del virus de la laringotraqueítis infecciosa de China (DQ825435, DQ862820 y EU675324), Brasil (EU076284, EU076285, EU076286, EU076287, EU076288, EU076289 y EU076290) y E.U. (ILU28832 y DQ223072).

Las secuencias de las muestras se compararon entre sí y contra las secuencias obtenidas del GeneBank.

III. RESULTADOS

VIRUS

Las muestras enviadas por los diferentes laboratorios incluidos en este estudio fueron previamente positivas al aislamiento en embrión de pollo e histopatología de membranas corioalantoideas.

Por otro lado, cabe mencionar que el mayor número de muestras fueron aisladas en el año 2006 (13 muestras), seguido por el 2008 (12 muestras), 2007 (6 muestras) y finalmente por los años 2005 y 2009 (2 muestras, respectivamente). Así también, el mayor número de aislados son provenientes de aves de engorda (**Cuadro 1**).

La mayor frecuencia de casos se presentó en los estados de Jalisco (8 casos), Distrito Federal (6 casos) y Estado de México (8 casos), siguiendo con los estados de Monterrey (7 casos), Morelos y Puebla (2 casos), y finalmente Veracruz y Zacatecas (1 caso) (**Figura 1**).

PCR

PCR para fragmento de 1847 pb

Las 36 muestras fueron evaluadas con la PCR para el fragmento de 1847 pb. Sólo 10 muestras resultaron positivas y fueron las siguientes: 1, 2, 3, 6, 8, 9, 10, 17, 26 y 32. La **figura 2** muestra los geles de agarosa con los casos positivos a este fragmento de 1847 pb.

PCR anidada para fragmentos de 629 y 296 pb

De las 36 muestras evaluadas con la PCR anidada, sólo se obtuvieron resultados positivos en sólo 10 muestras al fragmento de 629 pb (muestras 1 a 9). En cuanto al fragmento 296 todas las muestras resultaron positivas. La **figura 3** muestra los geles de agarosa con los casos positivos.

RFLP's

RFLP's del fragmento de 1847 pb

Se evaluaron mediante RFLP's solamente 6 de las 10 muestras positivas al fragmento 1847 pb, siendo las muestras 1, 6, 8, 9, 10, 17. Se purificaron para realizar la digestión con las enzimas *Cfr* I y *Dde* I. Previo a la digestión enzimática, se evaluó la presencia del ADN posterior a la purificación mediante un gel de agarosa al 1%. En la **Figura 4** se observan las bandas positivas al fragmento de 1847 pb.

Después de la digestión con las enzimas, se realizó la separación de fragmentos mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3%. Posteriormente, el gel fue teñido en bromuro de etidio para visualizarse en un transiluminador de rayos UV. La **Figura 5** muestra los patrones de corte generados con cada enzima.

La **figura 6** muestra de un modo esquemático la evaluación de los patrones de corte y fragmentos generados por las enzimas de restricción *Dde* I y *Cfr* I sobre el fragmento de 1847 pb previamente descritos, tomándolo como base para realizar la comparación con los obtenidos en este estudio, en donde se encontraron 3 patrones de corte con la enzima *Dde* I. El patrón A produjo 4 fragmentos de 161, 144, 348 y 1163 pb. El patrón B produjo 3 fragmentos de 348, 362 y 1163 pb. El patrón C produjo 3 fragmentos de 144, 348 y 1163 pb. El fragmento que debería ser de 1163 pb resultó con un tamaño entre 1000 y 1096 pb. No fue posible determinar en qué extremo se produjo un corte extra ni el tamaño exacto del fragmento. Con la enzima *Cfr* I se encontraron 2 patrones: el patrón α produjo 3 fragmentos de 264, 458 y 1096 pb. El patrón β produjo 4 fragmentos de 264, 384, 458 y 711 pb. La **Figura 7** muestra esta comparación.

De acuerdo a esto, ninguno de los patrones obtenidos con la enzima *Dde* I en las muestras evaluadas en este estudio corresponde a los descritos previamente y mostrados en la **figura 6**. Por otro lado, con la enzima *Cfr*

I, el patrón α corresponde al mostrado en la **figura 6**, denominado como patrón CEO (Origen de embrión de pollo), y el patrón β corresponde al denominado TCO (Origen de cultivo celular).

En base a éstos resultados se obtuvieron, de las muestras evaluadas, 4 grupos diferentes de virus, donde:

- Grupo 1 ($A\alpha$): muestras 1, 6 y 8. (Patrón similar a vacuna embrión de pollo de acuerdo a la comparación con la figura 6)
- Grupo 2 ($B\alpha$): muestra 9. (Patrón similar a vacuna embrión de pollo de acuerdo a la comparación con la figura 6)
- Grupo 3 ($C\alpha$): muestra 10. (Patrón similar a vacuna embrión de pollo de acuerdo a la comparación con la figura 6)
- Grupo 4 ($A\beta$): muestra 17. (Patrón similar a vacuna cultivo celular de acuerdo a la comparación con la figura 6)

Se puede observar que 3 de 5 aislados que tienen un patrón similar al de vacuna de embrión de pollo provienen de pollo de engorda y que solamente un aislado es proveniente de gallina de postura (muestra 6). Sólo la muestra 17 presenta patrón de vacuna de cultivo celular y proviene de pollo de engorda. En conclusión, la mayoría de los aislados provienen de pollo de engorda y tienen patrón de vacuna de embrión de pollo.

RFLP's del fragmento de 296 pb

Debido a que no todos los virus amplificaron para el fragmento de 1847 pb, fueron seleccionados 10 virus a partir de los cuales se llevó a cabo un PCR para el fragmento de 296 pb, siendo las muestras 1-10. Los productos de PCR resultantes se purificaron para realizar la digestión con las enzimas *Cfr I* y *Dde I*. Posteriormente, se realizó la electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%, el cual se tiñó en bromuro de etidio para visualizarse en un transiluminador de rayos UV. La **Figura 8** muestra los patrones de corte generados con cada enzima.

La **figura 9** muestra de un modo esquemático la evaluación de los patrones de corte y fragmentos generados por las enzimas de restricción *Dde I* y *Cfr I* sobre el fragmento de 296 pb previamente descritos, tomándolo como base para realizar la comparación con los obtenidos en este estudio, en donde se encontraron 3 patrones de corte con la enzima *DdeI* que produjeron fragmentos de 196 y 100 pb, y en algunos casos no hubo sitio de corte; mientras que con la enzima *CfrI* se encontraron dos patrones de corte, uno con un solo sitio de restricción que produjo un fragmento de 200 pb, no descrito con anterioridad, en solamente 1 caso; en los demás casos no hubo sitio de corte. Con ésta enzima, no es posible diferenciar entre patrones vacunales de embrión de pollo y cultivo celular, dado que el fragmento es muy pequeño. La **Figura 10** muestra esta comparación.

De acuerdo a esto, los 3 patrones obtenidos con la enzima *Dde I* en las muestras evaluadas en este estudio corresponden a los descritos previamente y mostrados en la **figura 9**. Ya no se había descrito corte con la enzima *CfrI*, se considera un hallazgo importante la presencia de una región de corte en el patrón ii, presente en sólo una de las muestras (muestra 2).

Basándose en éstos resultados, se obtuvieron los siguientes grupos a partir de las muestras evaluadas:

- Grupo 1 (Ii): muestras 1, 3, 6, 8 y 9. (Patrón similar al vacunal de acuerdo a la comparación con la figura 9)
- Grupo 2 (IIi): muestras 4, 5 y 7. (Patrón similar al vacunal de acuerdo a la comparación con la figura 9)
- Grupo 3 (IIIi): muestra 10. (Patrón similar al vacunal de acuerdo a la comparación con la figura 9)
- Grupo 4 (Iii): muestra 2. (Patrón similar a virus de campo de acuerdo a la comparación con la figura 9)

Se puede observar que 9 de 10 aislados tuvieron patrón de vacuna, de los cuales 5 provienen de pollo de engorda y 4 de gallina de postura. Sólo 1 tuvo patrón diferente al de vacunas, lo cual sugiere que se trata de un virus de campo, y proviene de pollo de engorda.

Con la variación de cortes en los diferentes fragmentos, se observa que el fragmento de 1847 pb proporciona más información por el mayor número de cortes realizados por las enzimas, sin embargo, dado que no todas las muestras pudieron ser amplificadas, no todos los virus pueden ser clasificados utilizando este fragmento.

Por otro lado, aún y cuando con la PCR anidada se obtuvieron más muestras positivas, los RFLP's del fragmento de 296 pb son poco informativos, dado que se presentan pocos sitios de corte.

Se puede considerar que los RFLP's no son concluyentes, dado que no todos los virus pueden ser amplificados con el fragmento grande y el fragmento pequeño no permite diferenciar los virus vacunales.

SECUENCIACIÓN

A partir de los 10 productos de PCR positivos al fragmento de 1847 pb se realizó el corte de bandas y la purificación de ADN. Después de evaluar la presencia del ADN posterior a la purificación (**Figura 11**), cuantificar el ADN restante y secuenciar las muestras, para cada virus analizado se obtuvo una secuencia de 765 pb entre las posiciones 135, 514 y 136,436 pb de la secuencia completa descrita (número de acceso GeneBank NC_006623).

Utilizando el programa Clone Manager Suite 7.0 (Sci Ed Software) se editaron las secuencias recortando 150 pb en los extremos por no tener la calidad suficiente de acuerdo a la evaluación con el programa Chromas Pro 1.49

Beta (Technelysium Pty Ltd), y se dejó un fragmento final de 765 pb. Con las secuencias así editadas, se llevaron a cabo alineamientos de bases y aminoácidos y se elaboraron los dendogramas correspondientes.

Las secuencias de las muestras y la secuencia completa de referencia fueron editadas para obtener fragmentos de igual tamaño de las secuencias obtenidas del GeneBank. Todas las secuencias fueron alineadas mediante el programa Clone Manager Suite 7.0 obteniendo los árboles filogenéticos.

En base a los alineamientos se obtuvieron dos evaluaciones: la primera consistió en evaluar el fragmento editado de 765 pb. Para ello se hizo el alineamiento de la secuencia de referencia (NC_006623), 4 de las secuencias obtenidas del GeneBank (ILU28832, DQ825435, DQ862820 y EU675324) y todas las secuencias de las muestras evaluadas. Las **figuras 12, 13, 14 y 15** presentan los árboles filogenéticos de bases y aminoácidos a partir de la secuencia de 765 pb; la **figura 16** presenta el alineamiento de bases y la **figura 17** el alineamiento de aminoácidos de los 10 aislados mexicanos secuenciados. Las **figuras 18 y 19** presentan el alineamiento de bases y aminoácidos, respectivamente, de las 15 secuencias de virus de laringotraqueítis infecciosa, los 10 mexicanos y los encontrados en el GeneBank.

En el análisis filogenético de bases de este fragmento de 765 pb, se pueden observar tres familias, posiblemente procedentes de un ancestro común. La primera familia se encuentra más alejada de las secuencias obtenidas del GeneBank. Este grupo está comprendido por las muestras 1 (Tepatitlán, Jalisco), 9 (Distrito Federal) y 8 (Capilla de Guadalupe, Jalisco). La segunda familia comprende la secuencia de referencia y las 4 del GeneBank (no incluye secuencias de Brasil). La tercer familia se encuentra intermedia, pero la muestra 3 (Tepatitlán, Jalisco) está más alejada de la secuencia de referencia y de la mayoría de las muestras. Por el contrario, con el análisis por aminoácidos sólo se observan dos familias, la primera incluye a las secuencias del GeneBank y la muestra 26 (Morelos). La segunda familia la conforman las

muestras restantes, siendo la muestra 8 (Capilla de Guadalupe, Jalisco) la más alejada de la secuencia de referencia.

En la segunda evaluación se estudió un fragmento más pequeño de 177 pb, ya que 8 de las secuencias obtenidas del GeneBank sólo presentaban este tamaño, por lo cual, todas las secuencias, incluidas las de las muestras, se editaron a este tamaño. Se hizo el alineamiento de la secuencia de referencia (NC_006623), las 12 secuencias obtenidas del GeneBank (ILU28832, DQ825435, DQ862820, EU675324, EU076284, EU076285, EU076286, EU076287, EU076288, EU076289, EU076290 y DQ223072) y 8 de las secuencias de las muestras evaluadas, ya que las 2 faltantes no tenían la zona de alineamiento. Las **figuras 20, 21, 22 y 23** presentan los árboles filogenéticos a partir de las secuencias del fragmento de 177 pb; la **figura 24** presenta el alineamiento de bases de los 8 virus mexicanos secuenciados y la **figura 25** el alineamiento de aminoácidos. Las **figuras 26 y 27** presentan el alineamiento de bases y aminoácidos, respectivamente, de las 21 secuencias de virus de laringotraqueítis infecciosa, los 8 mexicanos y los obtenidos del GeneBank.

En este análisis de bases de una secuencia más corta, podemos encontrar cuatro familias, donde la primera comprende a 3 secuencias de Brasil más alejadas de la secuencia de referencia. Cercano a esta familia, se encuentran por separado dos muestras de Brasil que pueden observarse más alejadas a la secuencia de referencia. La segunda familia la conforman la secuencia de referencia junto con la otra secuencia de E. U., y la muestra 8 (Capilla de Guadalupe, Jalisco). La tercera familia comprende 7 de las muestras evaluadas y la secuencia de referencia, ubicándose más alejada a ella la muestra 3 (Tepatitlán, Jalisco). La última familia se encuentra intermedia, compuesta por 3 secuencias de China y 3 de Brasil. En el análisis por aminoácidos se observan sólo tres familias del ancestro común. La primera formada por la secuencia de referencia junto con 4 secuencias de Brasil, la secuencia de E. U., las 3 de China y la muestra 8 (Capilla de Guadalupe, Jalisco). La segunda

familia la componen las muestras 9 (D.F.) y 32 (Salinas, Monterrey), y cercana a ellas sin unirse a la familia está la muestra 26. La tercer familia corresponde a las muestras 1 y 3 (las dos de Tepatitlán, Jalisco) alejándose de ellas la muestra 10 (vacuna) y 4 muestras de Brasil. La muestra 17 (Chalco, Edo. Méx.) no se encuentra unida a alguna familia, y se observa alejada de la secuencia de referencia.

IV. DISCUSION

Los aislados mexicanos del presente estudio provienen de las zonas avícolas más importantes del país.³¹ No se obtuvieron aislados de la península de Yucatán y sureste de México, ya que esta zona, por su ubicación geográfica se encuentran aisladas y, en el caso del norte del país, estados como Baja California, Sonora, Sinaloa, Durango, Chihuahua no son zonas con una densidad avícola alta, por lo que la probabilidad de encontrar brotes de laringotraqueítis, e incluso otras enfermedades, es muy baja. Por otra parte, en este estudio, fueron utilizados los aislados de aquellas regiones que efectivamente tuvieron brotes y proporcionaron la muestra. Por ello, estados como Guanajuato, Querétaro, y la zona de Coahuila y Durango que conforman la Comarca Lagunera, que también son importantes en producción avícola, no están incluidos en este estudio, ya que las 3 empresas avícolas más importantes del país se encuentran en éstos estados, y cuentan con laboratorios privados para el diagnóstico, considerando esa información como confidencial.

Desde hace años se había considerado que la laringotraqueítis era una enfermedad que se presentaba preferentemente en aves de larga vida, como reproductoras y gallina de postura^{2, 3}, lo cual no concuerda con los resultados del presente estudio, ya que el 47% de los aislados (17 de 36) provienen de pollo de engorda. Este fenómeno pudiera tener su origen en la práctica indebida de vacunar al pollo de engorda con vacunas contra laringotraqueítis elaboradas en embrión de pollo, ya que son las más propensas a revertir virulencia.^{7, 8, 9} Hay que tener en cuenta que los virus vacunales de embrión de pollo al producir reacciones fuertes y revertir a su virulencia original, las aves vacunadas quedan como portadoras del virus.² Por ello, deben preferirse virus vacunales que no se propaguen de ave a ave ni reviertan a su virulencia original como el elaborado en cultivos celulares. En la mayoría de los casos se ha optado por el uso de las vacunas de cultivos celulares por su efectividad e inocuidad, no obstante, existen granjas donde se ha preferido el uso de de la

vacuna elaborada de embrión de pollo por considerar que su inmunidad es más rápida y duradera.¹

Las técnicas modernas de diagnóstico indican que la reacción en cadena de la polimerasa es una buena técnica por su especificidad y rapidez, sin embargo, en el caso del virus de laringotraqueítis, algunos autores indican poca sensibilidad para esta técnica comparada con el aislamiento viral.^{32, 33, 34} En el trabajo de Abbas *et al.*³³ lograron un 33% de positividad con PCR y por aislamiento un 50%, mientras que con Alexander y Nagy³⁴ un 60% por PCR y un 80% con aislamiento viral en embrión de pollo. Esto se pudo corroborar en este estudio, donde solamente 10 de 36 muestras (27%) resultaron positivas al fragmento de 1847 pb. Cabe aclarar que las muestras obtenidas de los diferentes laboratorios del país lograron el aislamiento en embrión de pollo. Por lo tanto, se puede inferir que en caso de virus de laringotraqueítis, la PCR no sustituye al aislamiento virológico clásico en cuanto a sensibilidad para este fragmento. Es importante considerar que la PCR, aunque es rápida y específica, no es tan sensible y eficiente como el aislamiento viral en la identificación de etapas tempranas de infección, aunque después de la infección, la PCR presenta más casos positivos que el aislamiento viral, esto pudiera deberse a que la PCR, al no ser tan sensible, requiere de cierta cantidad de ADN viral, el cual no se obtiene en las primeras etapas de infección.^{32, 34}

En otro estudio, realizado por Abbas y Alexander³², y de acuerdo con la hipótesis que la PCR es menos sensible que el aislamiento, se sugiere que posiblemente puede haber pérdida de ADN durante la extracción a partir de tráqueas infectadas, y que las muestras que resultaron negativas por PCR pudieron contener poca cantidad de ADN. También se sugiere que factores asociados a la inflamación pudieron destruir el ADN viral, aunado a esto, proponen que el exudado o sangre pudieran contener inhibidores de la *Taq* polimerasa, dando así falsos negativos.

Por el contrario, se puede aumentar la sensibilidad de la técnica de PCR utilizando un PCR anidado²⁸, como el que se utilizó en este estudio, en donde todas las muestras resultaron positivas a un fragmento más pequeño de 296 pb. Este resultado se puede constatar también por lo descrito en el trabajo de Chacón y Ferreira³⁶, donde desarrollan una PCR anidada para la región de la glicoproteína E, considerando que puede ser una alternativa rápida y más sensible para el diagnóstico de la laringotraqueítis clínica y subclínica con resultados en menos de 24 horas, mientras que el aislamiento viral, aunque es utilizado ampliamente y provee resultados satisfactorios, el procedimiento requiere de mayor tiempo para el diagnóstico de la enfermedad.

Estrategias basadas en PCR han sido empleadas para caracterización molecular y estudios epidemiológicos de la enfermedad.³³ Los análisis de RFLP de genes virales han sido descritos, pero los resultados varían en grado de éxito.^{26, 27, 37}

El objetivo de clasificar los virus de laringotraqueítis infecciosa, es poder diferenciar entre virus vacunales y de campo, ya que algunos virus vacunales pueden revertir en virulencia y ocasionar brotes severos en aves.^{17, 18}

La reversión a virulencia después de pases de ave a ave se ha reportado y en el caso de las vacunas de embrión de pollo, estas causan enfermedades respiratorias graves y mortalidad; en el caso de las de cultivo celular, estas solo causan una enfermedad respiratoria leve.^{17, 18}

El uso de vacunas CEO durante un brote en pollo de engorda provee una fuente continua de virus que potencialmente infecta a aves no vacunadas muy cercanas a las vacunadas. La aplicación de este tipo de vacunas de manera masiva, por ejemplo en aerosol o agua de bebida, también puede llevar a un incremento en la virulencia del virus vacunal mediante pases de ave a ave, especialmente si las vacunas no son aplicadas adecuadamente, presentando falla en la inmunidad de todas las aves.^{5, 17}

En el presente estudio, los virus que pudieron ser clasificados mediante RFLP's presentaron patrones de corte similares a virus vacunales de embrión de pollo, lo que sugiere que los brotes de campo observados en México pudieran derivar de vacunas, sin embargo, dado que no todos los virus pudieron ser clasificados por éste método, no hay evidencia para afirmar que los virus que no amplificaron el fragmento de 1847 pb son provenientes de vacunas de embrión de pollo. La mayor parte de los aislados de este estudio (22 de 36) provienen de pollo de engorda. El aumento inusual de casos de laringotraqueítis en pollo de engorda pudiera tener relación con el hecho de que la mayoría de los virus clasificados con el fragmento de 1847 provienen de virus de embrión de pollo.

Aunque la vacuna de origen embrión de pollo es la única vacuna que de manera práctica y económica puede ser utilizada frente un brote en pollo de engorda porque es la única que puede ser aplicada de manera masiva, se ha reportado que tienen el potencial de incrementar su virulencia por contacto de ave a ave. El pollo de engorda vacunado con CEO son portadores y pueden re-excretar el virus bajo condiciones de estrés.^{2, 5, 7, 16, 17, 18}

Por ello, se sugiere la vacunación de pollo de engorda con vacuna proveniente de cultivo celular.¹ Esta recomendación puede apoyarse con los resultados de este estudio. Sólo la muestra 17 presentó patrón de vacuna de cultivo celular (TCO). Brotes a partir de virus similares a los de cultivo celular son raros^{21, 22, 23, 24, 25} y está documentado^{5, 15} que esta vacuna no se propaga de ave a ave, por lo que es posible que este aislamiento se haya llevado a cabo en fecha posterior a la vacunación. Ya que como se sugiere, este tipo de vacuna es la más recomendada para la aplicación en el pollo de engorda¹, pero ya que sólo puede aplicarse por vía ocular, esta práctica no se ha llevado a cabo por su alto costo de mano de obra.⁵

Como ya se describió, en el presente estudio, el 100% de las muestras fueron positivas a un fragmento de 296 pb, aun cuando sólo 10 muestras habían sido positivas a un fragmento de 629 pb. Este resultado muestra que la PCR anidada tiene una mayor sensibilidad^{28, 36}, pero el fragmento amplificado no proporciona mucha información para poder clasificar los virus.

Los patrones de corte resultaron similares a los de vacunas, exceptuando un caso en donde se encontró un sitio de corte no descrito con anterioridad y que sugiere que el fragmento amplificado proviene de un virus de campo. A pesar de que más muestras resultan positivas con esta PCR anidada, la información con RFLP's para el fragmento de 296 pb es limitada, ya que no es posible diferenciar entre virus vacunales de embrión de pollo y cultivo celular.

En el presente estudio, las limitantes que presentan los RFLP's en el fragmento grande y en el fragmento pequeño no llevan a una evaluación concluyente. En el estudio de Garcia y Riblet²⁷, sólo utilizaron cepas estandarizadas de vacuna pero no virus de campo, y en el estudio de Sellers *et al.*²⁰ utilizaron virus de campo pero la enzima utilizada no permite diferenciar entre cepas vacunales. Por otra parte, en el estudio de Kirkpatrick *et al.*³⁸ sí utilizaron virus vacunales y de campo de Australia, pero la enzima *Cfr I (Eae I)* no pudo distinguir entre estos virus utilizando el fragmento de 1847 pb, lo cual difiere con los resultados de este estudio. Kirkpatrick propone que para poder clasificar los virus se deben emplear otras regiones tales como: la glicoproteína G, el gen ICP18 y el gen de la timidin kinasa (TK), así mismo, Han y Kim²⁶ utilizan estas mismas regiones pero para la evaluación de aislados de Korea, y por otro lado Chang³⁷ utiliza el gen de la timidin kinasa, las glicoproteínas C y X, y el gen ICP4 en aislados de Taiwán. Sin embargo, en este estudio no se utilizaron esas regiones para poder equiparar los resultados con estudios hechos en Estados Unidos^{20, 27}, donde previamente se había utilizado la glicoproteína E. Desde el punto de vista epidemiológico, la probabilidad de compartir virus es mayor con los Estados Unidos, por ubicación geográfica y comercio, que con Australia, Korea y Taiwán, con los que no se tiene algún tipo de comercio avícola.

En la evaluación de secuencias, para poder comparar con otros virus del mundo, se obtuvieron dos fragmentos. Un fragmento de 765 pb, del cual sólo fue posible obtener 4 secuencias del GeneBank provenientes de Estados Unidos y China. Para el otro fragmento de 177 pb sólo fue posible obtener 12 secuencias de Estados Unidos, China y Brasil, esto permitió tener más puntos de comparación pero en un fragmento de menor tamaño, inclusive que el de 296 pb utilizado en el RFLP.

El análisis de bases del fragmento de 765 pb se muestra que los aislamientos mexicanos estuvieron más cercanos entre sí, pero en una familia diferente que los virus de Estados Unidos, lo cual sugiere que los brotes observados en México no tienen relación con los brotes presentes en los Estados Unidos, así mismo sugiere que 3 aislamientos (muestras 1, 8 y 9) tienen menos relación con virus vacunales, sin embargo, en el análisis tomando en cuenta la secuencia de aminoácidos, se encuentra que una de las muestras (muestra 26) sí tiene relación con virus de Estados Unidos, y el resto de las muestras están más cercanas con los virus vacunales, inclusive la muestra 2 que en los RFLP's fue clasificada como virus de campo es la más cercana a los virus vacunales, esta discrepancia pudiera tener su origen en que la sustitución de bases no necesariamente implica un cambio en la secuencia de aminoácidos, ya que diferentes codones pueden codificar para un mismo aminoácido³⁹. Por otra parte, las inserciones o deleciones son capaces de modificar el patrón de lectura, la mayoría de los aislados mexicanos presentaron inserciones o deleciones con respecto de la secuencia de referencia NC_006623 de procedencia estadounidense. Los cambios en la secuencia de aminoácidos conllevan cambios en la estructura de la proteína, pudiendo entonces, comportarse de manera diferente. Por otra parte, la muestra 2, que en el examen de RFLP's fue clasificada como virus de campo, en el análisis filogenético por aminoácidos resultó más cercana a los virus vacunales. Esto pudiera tener su explicación en que la sustitución de una base por otra no necesariamente cambia el aminoácido, pero sí puede cambiar el sitio de restricción. De este modo, dos virus que filogenéticamente se encuentren más

emparentados pudieran resultar diferentes en el análisis por RFLP's, esto porque pueden existir otros sitios de corte en la misma región amplificada con otras enzimas. Aunado a esto, los cortes virtuales realizados con el programa Clone Manager Suite 7.0, con otras enzimas diferentes a las empleadas en este estudio, mostraron mayor variabilidad en los resultados.

En los aislados mexicanos, los sitios con mayor variabilidad resultaron entre las posiciones 15-56, y 684-730 pb, en donde se aprecia intercambio de bases, así como inserciones y deleciones. La muestra 2 resultó la de mayor divergencia con un 12% de diferencia con respecto a la secuencia de referencia, el resto de los virus presentan entre 2-4% de diferencia, sin embargo, debe considerarse más importante la posición del cambio de bases que el número de cambios.

En la evaluación del fragmento de 177 pares de bases, si bien se pudo disponer de un mayor número de referencias del GeneBank, el fragmento resulta muy corto. Los resultados son similares a los obtenidos con el fragmento de 765 pb, en donde los virus estadounidenses se encuentran más alejados de los aislados mexicanos. Llama la atención que en el análisis por bases, los virus de China y Brasil están en una familia diferente que los virus de Estados Unidos, pero en el análisis por aminoácidos quedan en la misma familia, exceptuando 4 virus brasileños que se agrupan con los virus vacunales mexicanos. Este fenómeno tiene la misma explicación que en el fragmento de 765 pb.

No existen disponibles muchas secuencias en el mundo para la región de la glicoproteína E del virus de laringotraqueítis. La información del presente estudio, aunada al estudio de otras glicoproteínas de virus mexicanos, pudiera ser la base para un mejor entendimiento de la enfermedad en México.

V. CONCLUSIONES

1. La mayor frecuencia de brotes de laringotraqueítis en México en los últimos años se presenta en pollos de engorda.
2. De acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere que los virus estudiados entre 2005-2009 están emparentados con virus vacunales de embrión de pollo.
3. De acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere que los virus en México no tienen relación con los virus estadounidenses.
4. Las técnicas de PCR y RFLP's presentan algunas limitantes para la evaluación de la glicoproteína E en los virus de laringotraqueítis, por lo que se sugiere explorar otras porciones del genoma e incluir enzimas adicionales a las utilizadas en este estudio.
5. La limitada cantidad de secuencias de laringotraqueítis para la glicoproteína E encontradas en el GeneBank no permite realizar una comparación exhaustiva mediante secuenciación con virus de otras partes del mundo.

VI. LITERATURA CITADA

1. Mosqueda TA. Criterios actuales en la prevención y control de la laringotraqueítis infecciosa aviaria. Memorias de la XXXII Convención Anual ANECA; 2007 Abril 25-28; Acapulco (Guerrero) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2007.
2. Guy JS; Bagust TJ. Laryngotracheitis. En: Saif YM. Diseases of poultry. 11ª ed. E.U: Blackwell Publishing Company, 2003: 121-134.
3. Jordan FTW. Laringotraqueítis infecciosa. En: Jordan FTW, Pattinson M. Enfermedades de las aves. 3ª ed. México, DF: El Manual Moderno, S.A. de C. V., 1998: 167-170.
4. López MR. Laringotraqueítis infecciosa: Aspectos clínicos. Memorias de la XXXII Convención Anual ANECA; 2007 Abril 25-28; Acapulco (Guerrero) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2007.
5. Dufour-Zavala L. Epizootiology of infectious laryngotracheitis and presentation of an industry control program. Avian dis 2008; 52:1-7.
6. Triphany DN. Infectious laryngotracheitis. En: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4a ed. E.U: The american association of avian pathologists, 1998:
7. Bagust TJ. Laryngotracheitis (Gallid-1) herpesvirus infection in the chicken. 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILTV virus. Avian Pathol 1986; 15:581-595.
8. Hugues CS, Williams RA, Gaskell RM, Jordan FTW, Bradbury JM. Demostration in live chickens of the carrier state in infectious laryngotracheitis. Res Vet Sci 1987; 42:407-410.
9. Williams RA, Al-Alfaleq AI, Jordan FTW, Bradbury JM, Gaskell RM, Bennet M, Jones RC. Pathogenicity of latent infections laryngotracheitis virus in chickens. Avian Pathol 1992; 21:287-294.

10. Fuchs W, Veits J, Helferich D, Granzow H, Teifke JP, Mettenleiter TC. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. *Vet Res* 2007; 38:261-279.
11. Thureen DR, Keeler, CL. Psittacid herpesvirus 1 and infectious laryngotracheitis virus: comparative genome sequence analysis of two avian alphaherpesviruses. *J Virol* 2006; 80:7863-7872.
12. Wang N, Baldi PF, Gaut BS. Phylogenetic analysis, genome evolution and the rate of gene gain in the *Herpesviridae*. *Mol Phylogenetics Evol* 2007; 43:1066-1075.
13. Ruano M, El-Attrache J, Villegas P. Efficacy comparisons of disinfectants used by the commercial poultry industry. *Avian Dis* 2001; 45:972-977.
14. Crawshaw GJ, Boycott BR. Infectious laryngotracheitis in peafowl and pheasants. *Avian Dis* 1982; 26:397-401.
15. Salem M. Laringotraqueítis infecciosa: vacunas y vacunación. Memorias de la XXXII Convención Anual ANECA; 2007 Abril 25-28; Acapulco (Guerrero) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2007.
16. Andreasen JR, Glisson R, Goodwin MA, Resurreccion RS, Villegas P, Brown J. Studies of infectious laryngotracheitis vaccines: immunity in layers. *Avian Dis* 1989; 33:524-530.
17. Guy JS, Barnes HJ, Smith L. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage. *Avian Dis* 1991; 35:348-355.
18. Rodríguez AA, Oldoni I, Riblet S, García M. Replication and transmission of live attenuated infectious laryngotracheitis virus (ILTIV) vaccines. *Avian Dis* 2007, 51:905-911.
19. Cuadra, Alejandro. Comunicación personal. México, D.F., 10 junio, 2006.
20. Sellers HS, García M, Glisson TPB, Sanders JS, Guy JS. Mild infectious laryngotracheitis in broilers in Southeast. *Avian Dis* 2004; 48:430-436.
21. Guy JS, Barnes HJ, Munger L, Rose L. Restriction endonuclease analysis of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine and North Carolina field isolates. *Avian Dis* 1988; 316-323.

22. Keeler CL, Hazel JW, Hastings JE, Rosenberg JK. Restriction endonuclease analysis of Delmarva field isolates of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Dis* 1993; 37:418-426.
23. Keller LH, Benson CE, Davidson S, Eckroade RJ. Differences among restriction endonucleases DNA fingerprints of Pennsylvania field isolates, vaccine strains, and challenge strains of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Dis* 1992; 36:575-581.
24. Oldoni I, García M. Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates from United States by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of multiple genome regions. *Avian Pathol* 2007; 36:167-176.
25. Andreasen JR, Glisson JR, Villegas P. Differentiation of vaccine strains and Georgia field isolates of infectious laryngotracheitis virus by their restriction endonuclease fragment patterns. *Avian Dis* 1990; 34:646-656.
26. Han MG, Kim SJ. Análisis of Korean strains of infectious laryngotracheitis virus by nucleotide sequences and restriction fragments length polymorphism. *Vet Microbiol* 2001; 83:321-331.
27. García M, Riblet SM. Characterization of Infectious Laryngotracheitis Virus isolates: Demostration of viral subpopulations within vaccine preparations. *Avian Dis* 2001; 45:538-566.
28. Humberd J, García M, Riblet SM, Resurreccion RS, Brown TP. Detection of infectious laryngotracheitis virus in formalin-fixed, paraffin embedded tissues by nested polymerase chain reaction. *Avian Dis* 2002; 46:64-74.
29. Becker, JM, Caldwell GA, Zachgo EA. En: *Biotechnology: A laboratory Course*. 2nd ed. E. U. Academic Press, 1996: 149-155.
30. Applied Biosystems. BigDye® Terminator v3.1 and v1.1. Cycle Sequencing Kits Protocol. Copyright 2002. Pp. 2-6, 3-1 to 3-7.
31. <http://www.una.org.mx>
32. Key DW. Development and evaluation of a non-isotopically labeled DNA probe for the diagnosis of infectious laryngotracheitis. *Avian Dis* 1994; 38:467-474.

33. Abbas F, Andreasen JR, Jackwood MW. Development of a polymerase chain reaction and a nonradioactive DNA probe for infectious laryngotracheitis virus. *Avian Dis* 1996; 40:56-62.
34. Alexander HS, Nagy E. Polymerase chain reaction to detect infectious laryngotracheitis virus in conjunctival swabs from experimentally infected chickens. *Avian Dis* 1997; 41:646-653.
35. Abbas F, Andreasen JR. Comparison of diagnostic test for infectious laryngotracheitis. *Avian Dis* 1996; 40:290-295.
36. Chacón JL, Ferreira AJP. Development and validation of nested-PCR for the diagnosis of clinical and subclinical infectious laryngotracheitis. *J Virol M* 2008; 151:188-193.
37. Chang PC, Lee YL, Shien JH, Shieh HK. Rapid differentiation of vaccine strains and field isolates of infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism of PCR products. *J Virol Met* 1997; 66:179-186.
38. Kirkpatrick NC, Mahmoudian A, O'Rourke D, Noormohammandi AH. Diferenciation of infectious laryngotracheitis virus isolates by restriction length polymorphic analysis of polymerase chain reaction products amplified from multiple genes. *Avian Dis* 2006; 50:28-34.
39. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Elucidation of the genetic code. En: *Recombinant DNA*. 2^a ed. E.U. Scientific American Books, 1992: 33-48.

Cuadro 1. Identificación y características de las muestras positivas a laringotraqueítis infecciosa en México entre los años 2005-2009.

Muestra	Identificación del laboratorio	Año de aislamiento	Tipo de muestra	Procedencia	Fin zootécnico
1	05-08964	2005	Inóculo*	Tepatitlán, Jal	Postura 11 sem
2	06-05875	2006	Inóculo	Zacatecas	Engorda 7 sem
3	07-02454	2007	Inóculo	Tepatitlán, Jal	Postura 16 sem
4	07-02005	2007	Inóculo	Tepatitlán, Jal	Engorda 5.5 sem
5	07-03113	2007	Inóculo	Tepatitlán, Jal	Engorda
6	07-02612	2007	Inóculo	Acatic, Jal	Postura 12 sem
7	06-02637	2006	Inóculo	Guadalajara, Jal	Postura 18 sem
8	07-02866	2007	Membrana corioalantoidea	Capilla de Gpe, Jal	Engorda 5.5 sem
9	07-02873	2007	Membrana corioalantoidea	México	Engorda 6 sem
10	Vacuna	-	Liofilizada	DF	-
11	05-5387	2005	Inóculo	-	-
12	06-45	2006	Inóculo	DF	-
13	06-4682 (1)	2006	Inóculo	Chalco, EdoMex	Engorda 55 días
14	06-4682 (2)	2006	Inóculo	Chalco, EdoMex	Engorda 55 días
15	06-4683 (1)	2006	Inóculo	Chalco, EdoMex	Engorda 58 días
16	06-4683 (2)	2006	Inóculo	Chalco, EdoMex	Engorda 58 días
17	06-4683 (3)	2006	Inóculo	Chalco, EdoMex	Engorda 58 días
18	06-4683 (4)	2006	Inóculo	Chalco, EdoMex	Engorda 58 días
19	06-1292 (3)	2006	Inóculo	Villa de Ayala, Mor	Postura 67 sem
20	06-119	2006	Inóculo	Teoloyucan, EdoMex	Engorda 8 sem
21	06-2267	2006	Inóculo	Etzalan, Jal	Engorda 5 sem
22	06-5159	2006	Inóculo	Edo. Mex.	-
23	G. Sn Ignacio	2008	Inóculo	Tecamachalco, Pue	Engorda 3.5 sem
24	G. Reciba 2	2008	Inóculo	Tecamachalco, Pue	Postura 56 sem
25	Cordobés	2008	Inóculo	Córdoba, Ver	-
26	A. Retana	2008	Inóculo	Morelos	Engorda
27	2008-1252	2008	Inóculo	Y2, Monterrey, N.L	Engorda 3.6 sem
28	2008-1275	2008	Inóculo	Andrea, Monterrey, N.L	Engorda 4.1 sem
29	2008-1289	2008	Inóculo	Brenda, Monterrey, N.L	Engorda 5.0 sem
30	2008-1365	2008	Inóculo	San Pablo, Monterrey, N.L	Engorda 5.0 sem
31	2008-1518	2008	Inóculo	15 de abril, Monterrey, N.L	Engorda 6.5 sem
32	2008-1520	2008	Inóculo	Salinas, Monterrey, N.L	Engorda 7.2 sem
33	2008-1528	2008	Inóculo	Victoria, Monterrey, N.L	Engorda 4.6 sem
34	08-571	2008	Inóculo	DF	-
35	09-036 I P	2009	Inóculo	DF	-
36	09-036 II LT	2009	Inóculo	DF	-

* Se entiende por inóculo un macerado de pulmón y tráquea al 20% en solución amortiguada de fosfatos, clarificado por centrifugación y filtrado a través de una membrana de 0.45 µm.

- Significa que no se tiene el dato.



Figura 1. Ubicación geográfica de casos positivos a laringotraqueítis infecciosa en México entre los años 2005 y 2009.

Jalisco 8 casos, Distrito Federal 6 casos, Estado de México 8 casos, Monterrey 7 casos, Morelos y Puebla 2 casos, Veracruz y Zacatecas 1 caso.

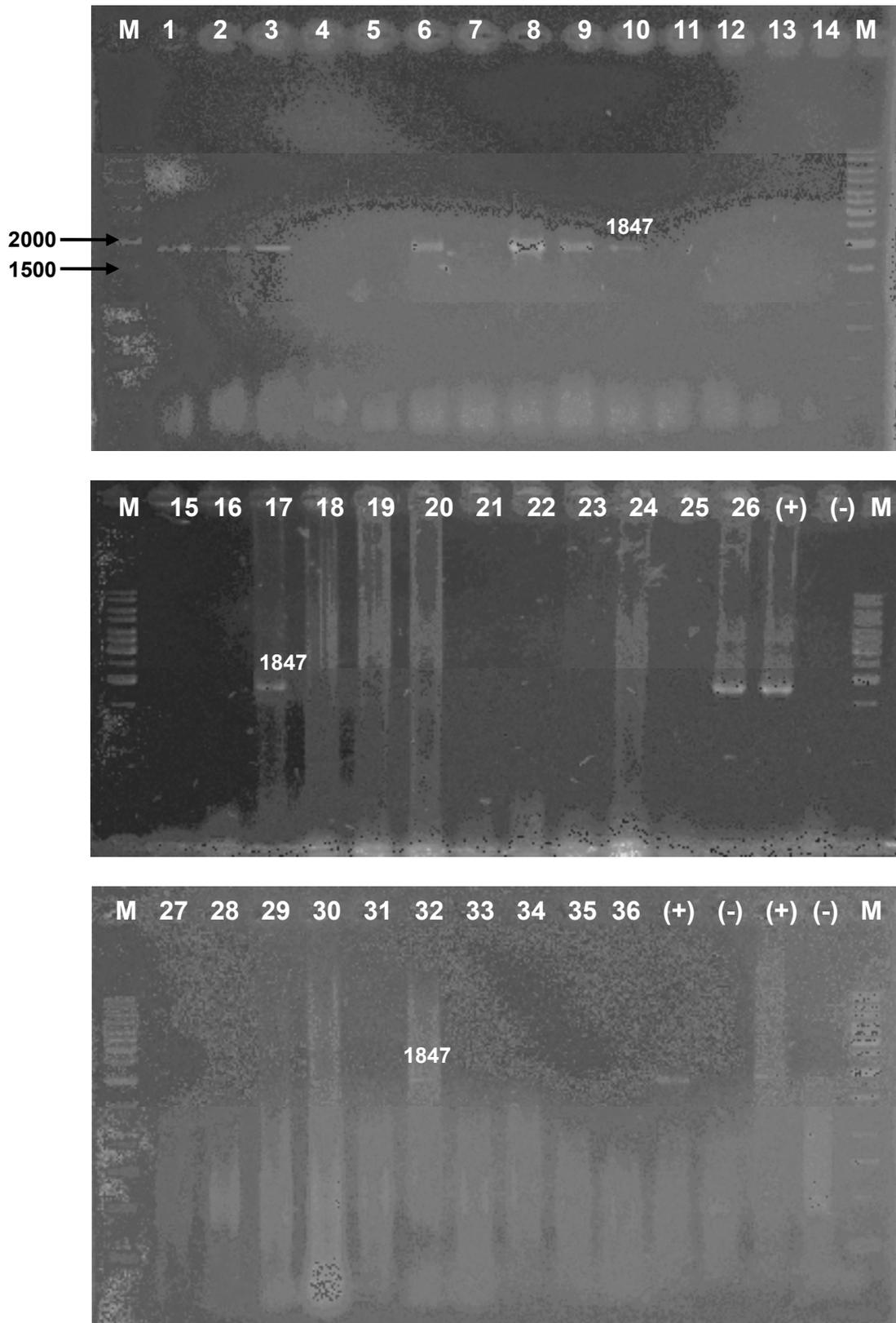


Figura 2. Casos positivos al virus de laringotraqueítis infecciosa mediante PCR. Se observan bandas positivas al fragmento de 1847 pb correspondiente a la región corta del genoma del virus de laringotraqueítis infecciosa. M: Marcador 1Kb. (-): Testigo negativo. (+): Testigo positivo. La numeración de los pozos corresponde al número de identificación de la muestra. Muestra 10: Vacuna. Geles de agarosa 1%.

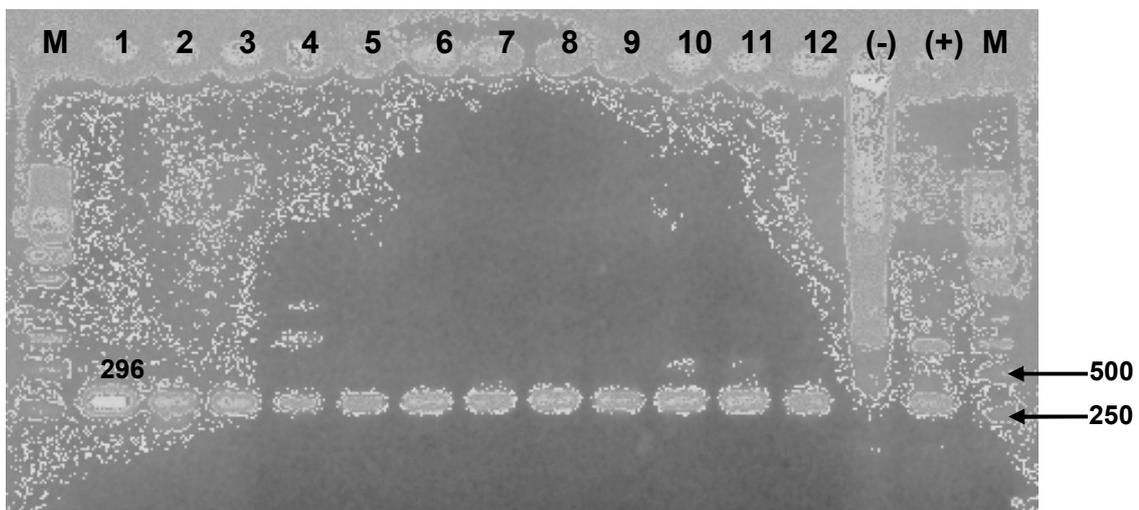
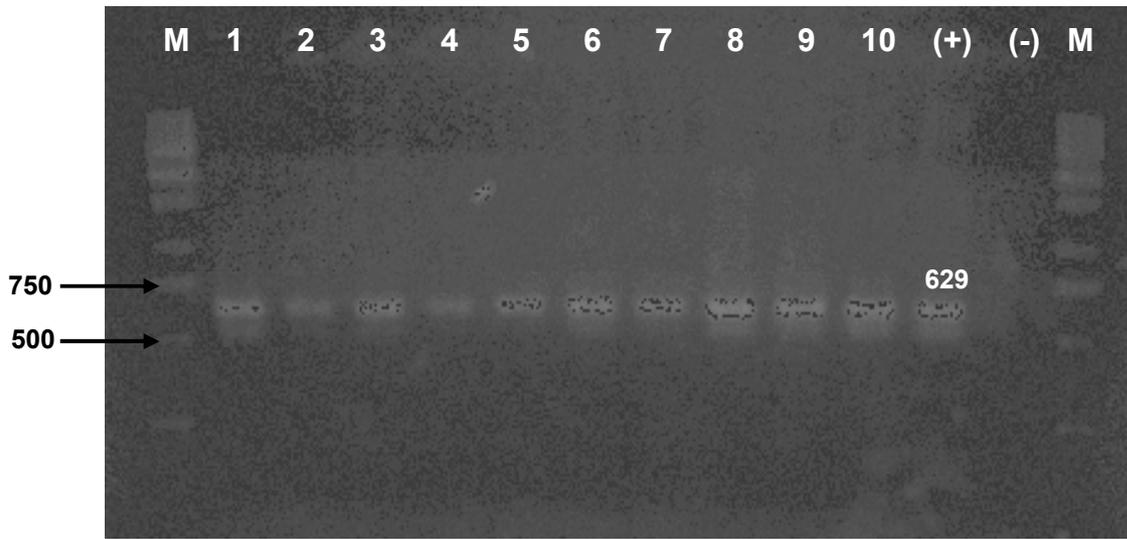


Figura 3. Casos positivos al virus de laringotraqueítis infecciosa mediante PCR anidado. Se observan bandas positivas al fragmento de 629 y 296 pb correspondientes al gen de la glicoproteína E del virus de laringotraqueítis infecciosa. M: Marcador 1Kb. (-): Testigo negativo. (+): Testigo positivo. La numeración de los pozos corresponde al número de identificación de la muestra. Muestra 10: Vacuna. Geles de agarosa 1%.

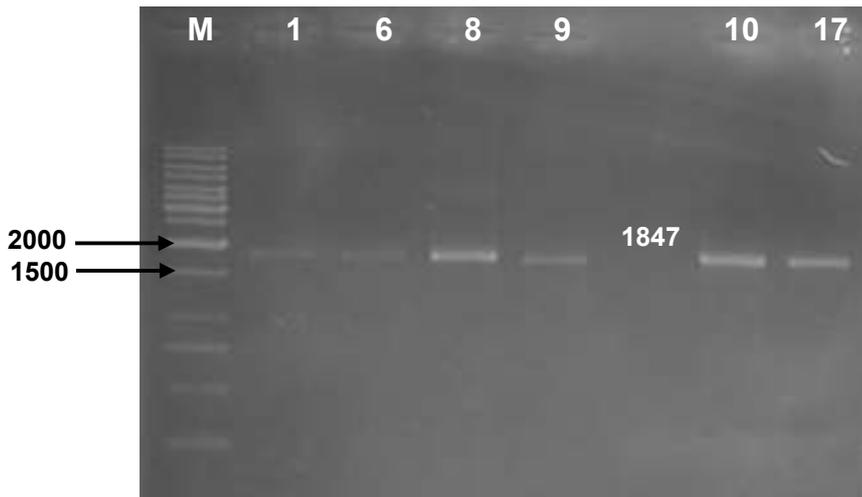
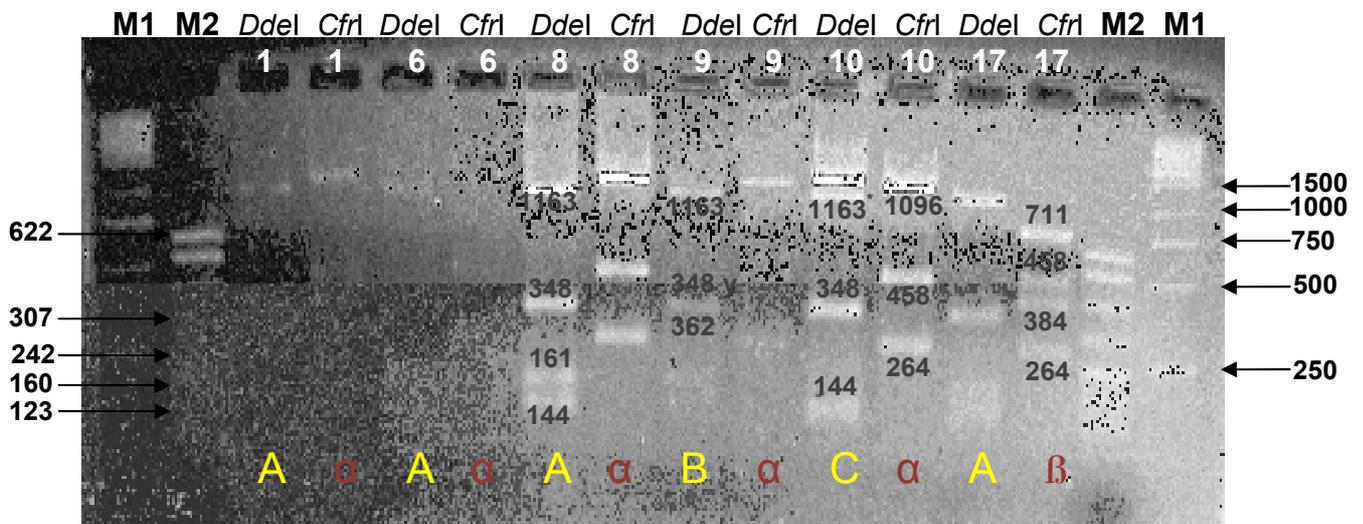


Figura 4. Casos positivos al virus de laringotraqueítis infecciosa mediante PCR 1847 posterior a la purificación de gel. Se observan bandas positivas al fragmento de 1847. Marcador 1Kb. La numeración de los pozos corresponde al número de identificación de la muestra. Muestra 10: Vacuna. Gel de agarosa 1%.



Patrones con Ddel: A (4 sitios de corte), B (2 sitios de corte), C (3 sitios de corte)
 Patrones con CfrI: α (3 sitios de corte), β (4 sitios de corte)

*El fragmento que debería ser 1163 resultó con un tamaño entre 1000 y 1096 pb. No es posible determinar en qué extremo se produjo un corte extra.

Figura 5. Patrones de restricción para el fragmento de 1847 pb, correspondiente a la región corta del genoma del virus de laringotraqueítis infecciosa, con las enzimas *Dde* I y *Cfr* I (*Eae* I). M: Marcador 1Kb, M2: Marcador pBR322. La numeración de los pozos corresponde al número de identificación de la muestra. Muestra 10: Vacuna. Gel de agarosa 3%.

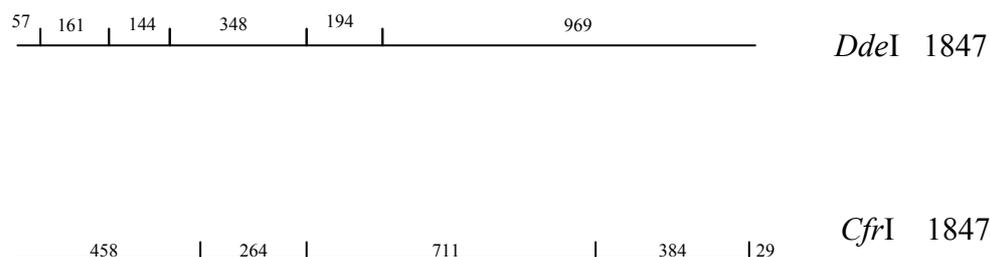


Figura 6. Sitios de corte y fragmentos generados por las enzimas de restricción *Dde I* y *Cfr I* (*Eae I*) descritos por García *et. al*, 2001 sobre el fragmento de 1847 pb correspondiente a la región corta del genoma del virus de laringotraqueítis infecciosa.

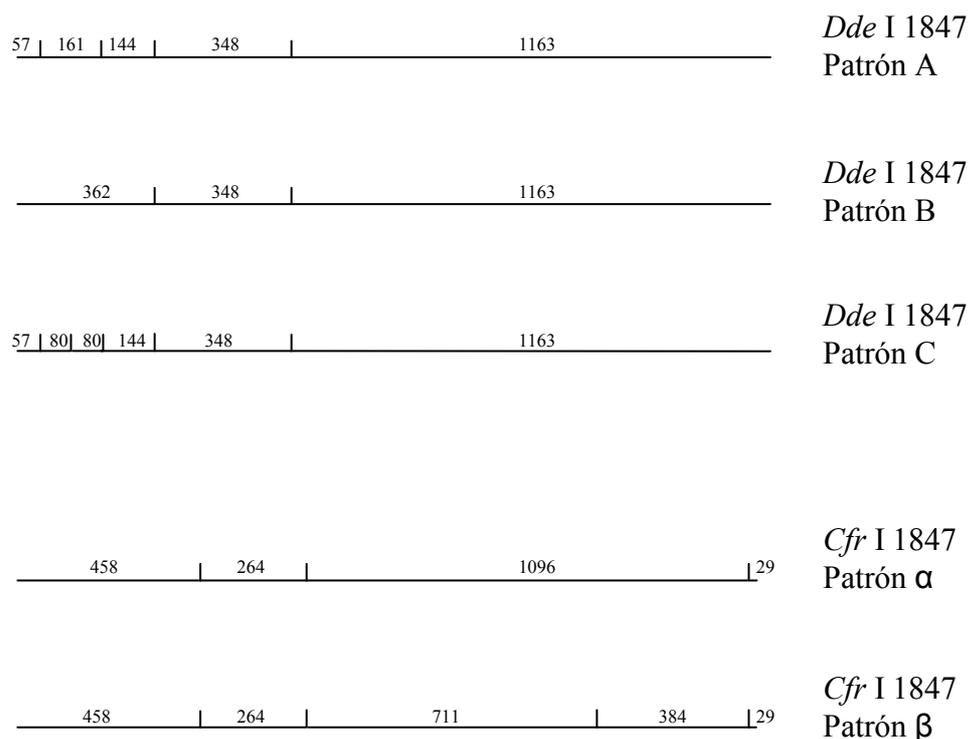
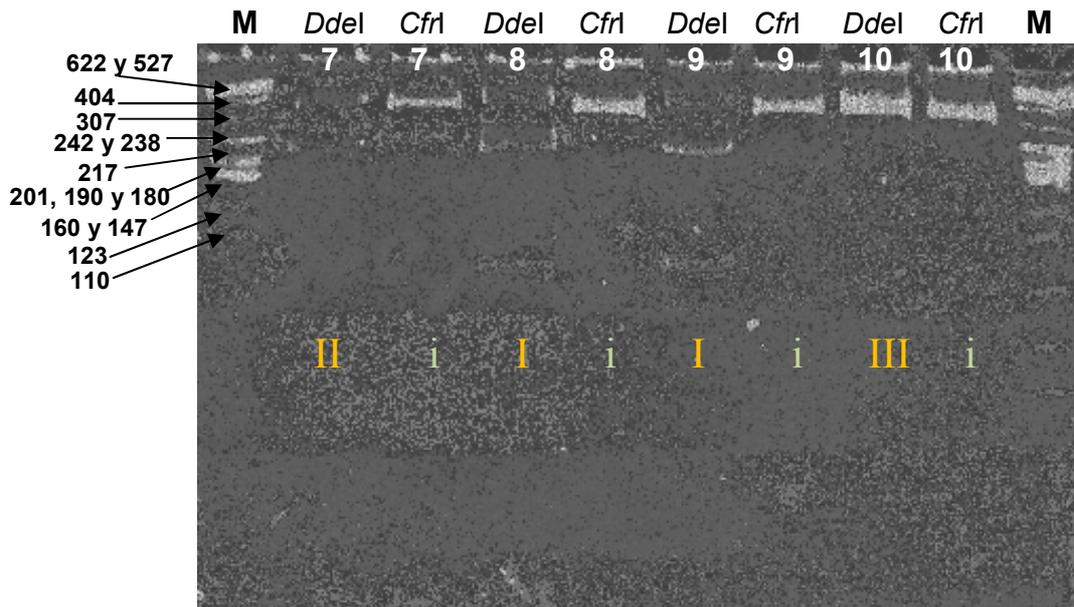


Figura 7. Sitios de corte y fragmentos generados por las enzimas de restricción *Dde I* y *Cfr I* (*Eae I*) sobre el fragmento de 1847 pb correspondiente a la región corta del genoma del virus de laringotraqueítis infecciosa. Patrón A: muestras 1, 6, 8 y 17; Patrón B: muestra 9; Patrón C: muestra 10; Patrón α : muestras 1, 6, 8, 9 y 10; Patrón β : muestra 17.



M: Marcador de tamaño molecular pBR322. Líneas 2 y 3: muestra 1; líneas 4 y 5: muestra 2; líneas 6 y 7: muestra 3; líneas 8 y 9: muestra 4; líneas 10 y 11: muestra 5; líneas 12 y 13: muestra 6.



M: Marcador de tamaño molecular pBR322. Líneas 2 y 3: muestra 7; líneas 4 y 5: muestra 8; líneas 6 y 7: muestra 9; líneas 8 y 9: muestra 10.

Patrones con Ddel: I (2 sitios de corte), II (1 sitio de corte), III (sin corte)
 Patrones con CfrI: i (sin corte), ii (1 sitio de corte)

Figura 8. Patrones de restricción para el fragmento de 296 pb, correspondiente al gen de la glicoproteína E del virus de laringotraqueítis infecciosa, con las enzimas *Dde* I y *Cfr* I (*Eae* I). M: Marcador pBR322. La numeración de los pozos corresponde al número de identificación de la muestra. Muestra 10: Vacuna. Gel de poliacrilamida 10%.

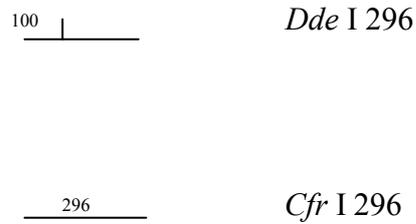


Figura 9. Sitios de corte y fragmentos generados por las enzimas de restricción *Dde* I y *Cfr* I (*Eae* I) descritos por Sellers *et. al*, 2004 sobre el fragmento de 296 pb al gen de la glicoproteína E del virus de laringotraqueítis infecciosa.

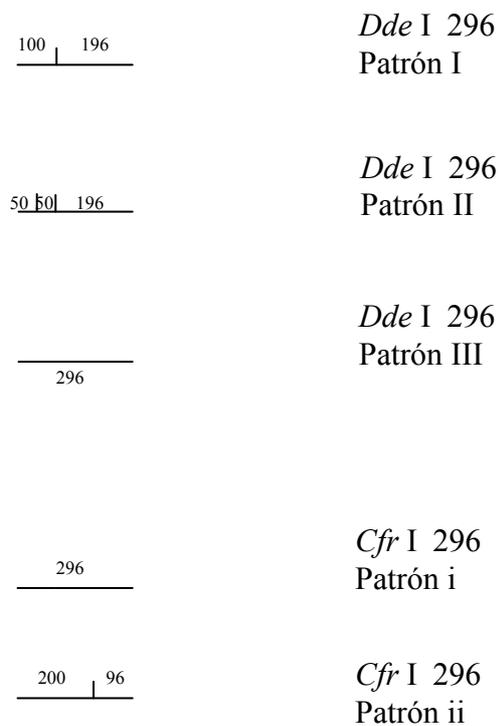


Figura 10. Sitios de corte y fragmentos generados por las enzimas de restricción *Dde* I y *Cfr* I (*Eae* I) sobre el fragmento de 296 pb correspondiente al gen de la glicoproteína E del virus de laringotraqueítis infecciosa. Patrón I: muestras 1, 2, 3, 6, 8 y 9; Patrón II: muestras 4, 5 y 7; Patrón III: muestras 10; Patrón i: muestras 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 19; Patrón ii: muestra 2.

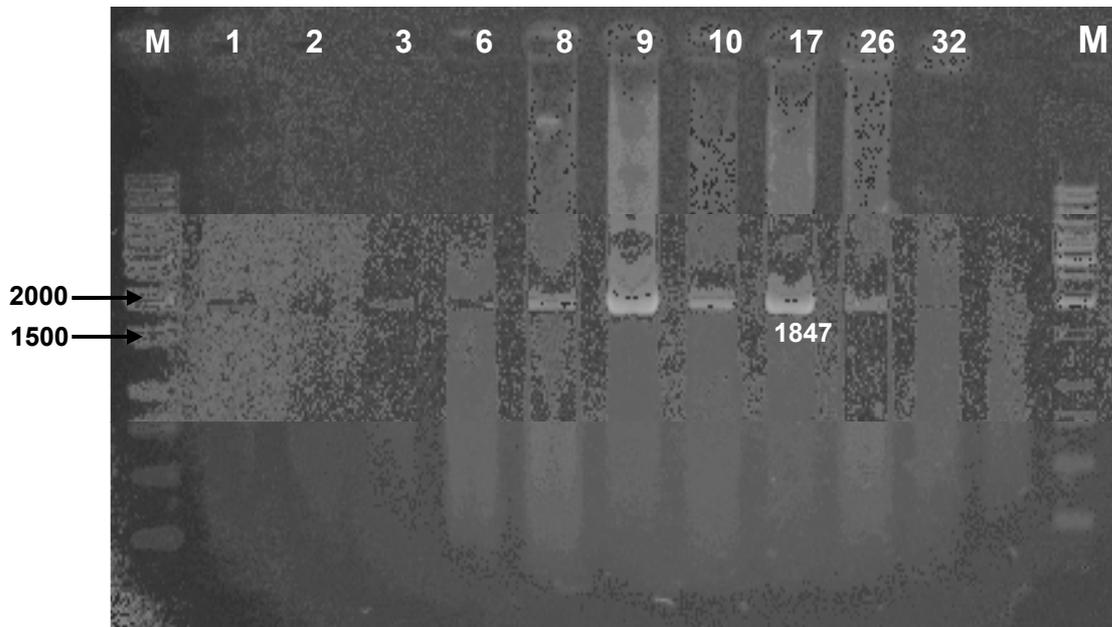


Figura 11. Casos positivos al virus de laringotraqueítis infecciosa mediante PCR 1847 posterior a la purificación de gel. Se observan bandas positivas al fragmento de 1847. Marcador 1Kb. La numeración de los pozos corresponde al número de identificación de la muestra. Muestra 10: Vacuna. Gel de agarosa 1%.

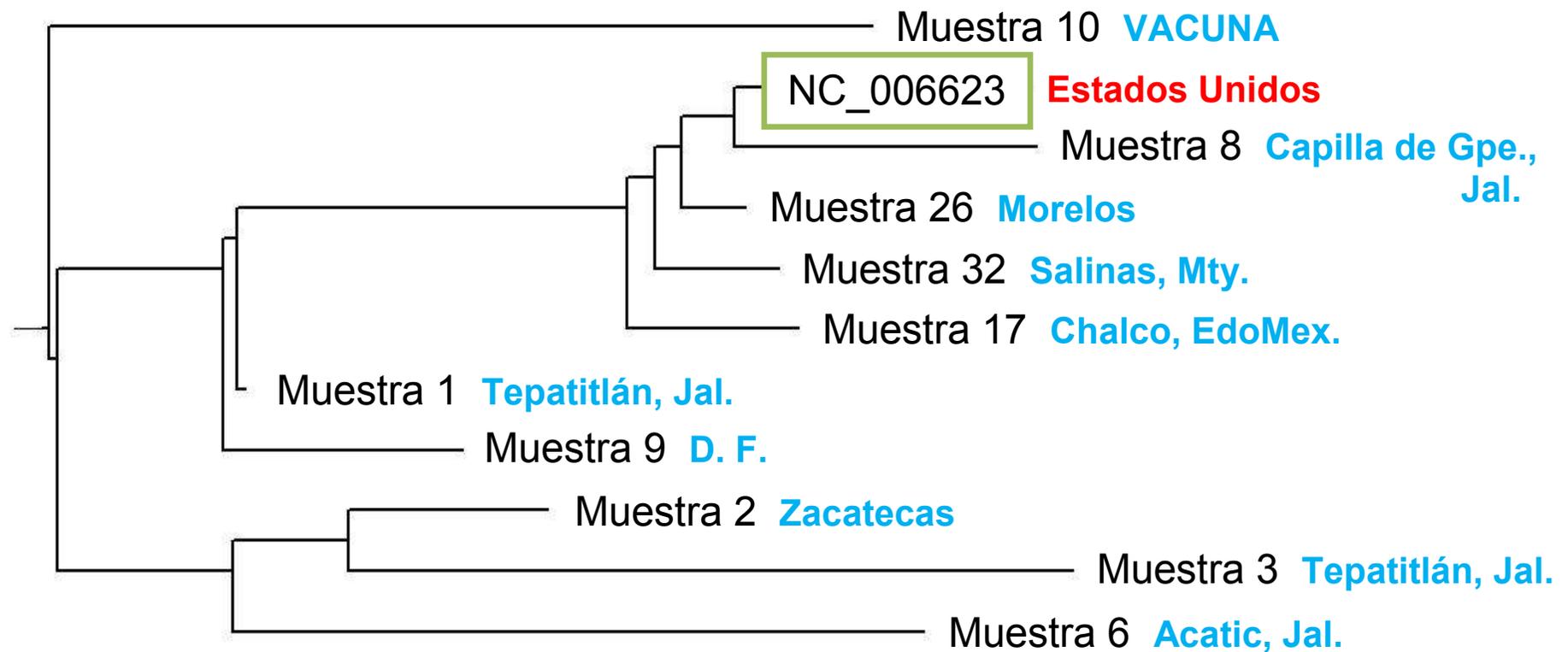


Figura 12. Filogenia de 10 aislados mexicanos del virus de la laringotraqueítis infecciosa, tomando en cuenta la secuencia de bases de un fragmento de 765 pb correspondientes a las posiciones 135,567 y 136,331 de la secuencia completa de referencia NC_006623 obtenida del GeneBank. Elaborado con el programa Clone Manager Suite 7.0

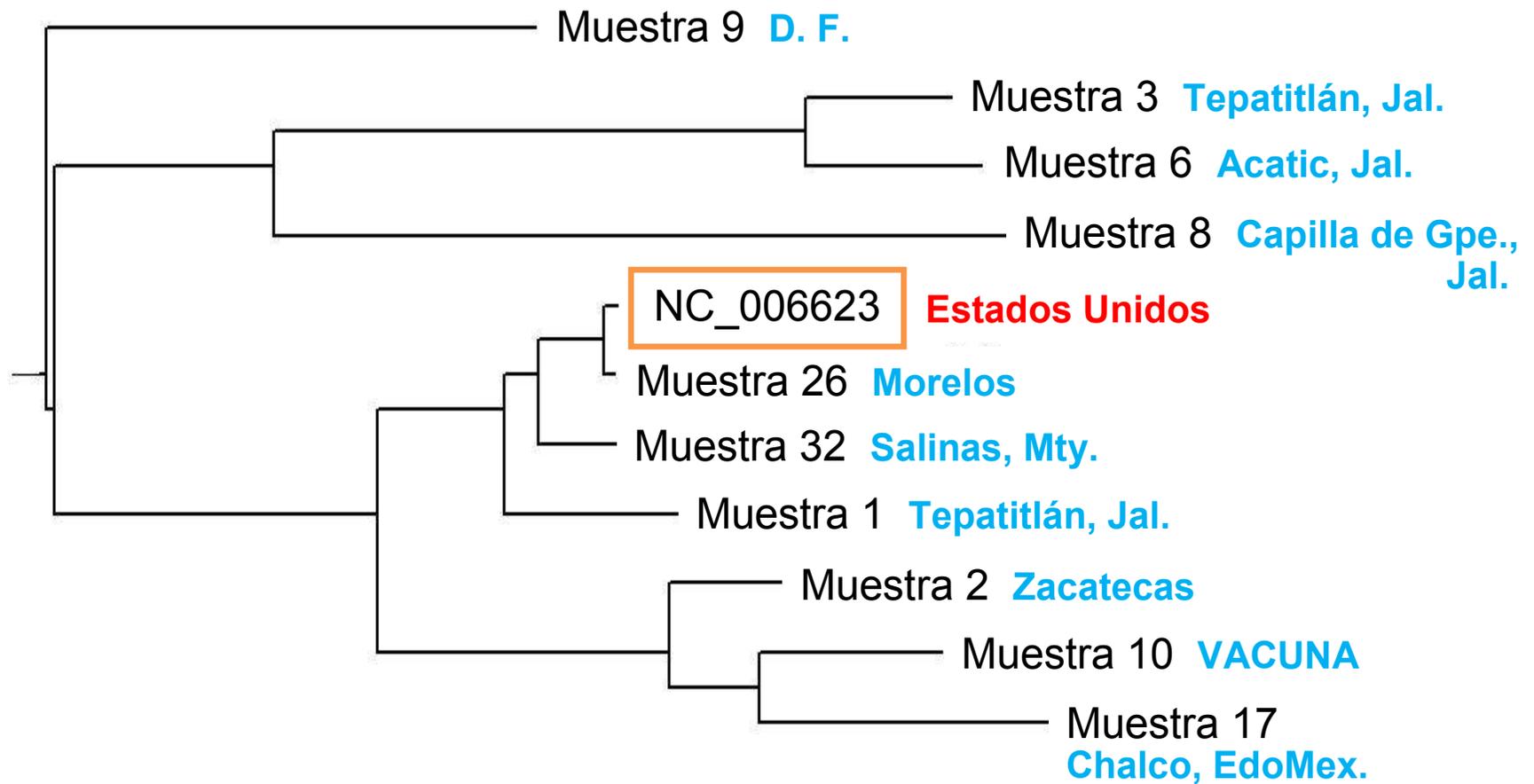


Figura 13. Filogenia de 10 aislados mexicanos del virus de la laringotraqueítis infecciosa, tomando en cuenta la secuencia de aminoácidos de un fragmento de 765 pb correspondientes a las posiciones 135,567 y 136,331 de la secuencia completa de referencia NC_006623 obtenida del GeneBank. Elaborado con el programa Clone Manager Suite 7.0

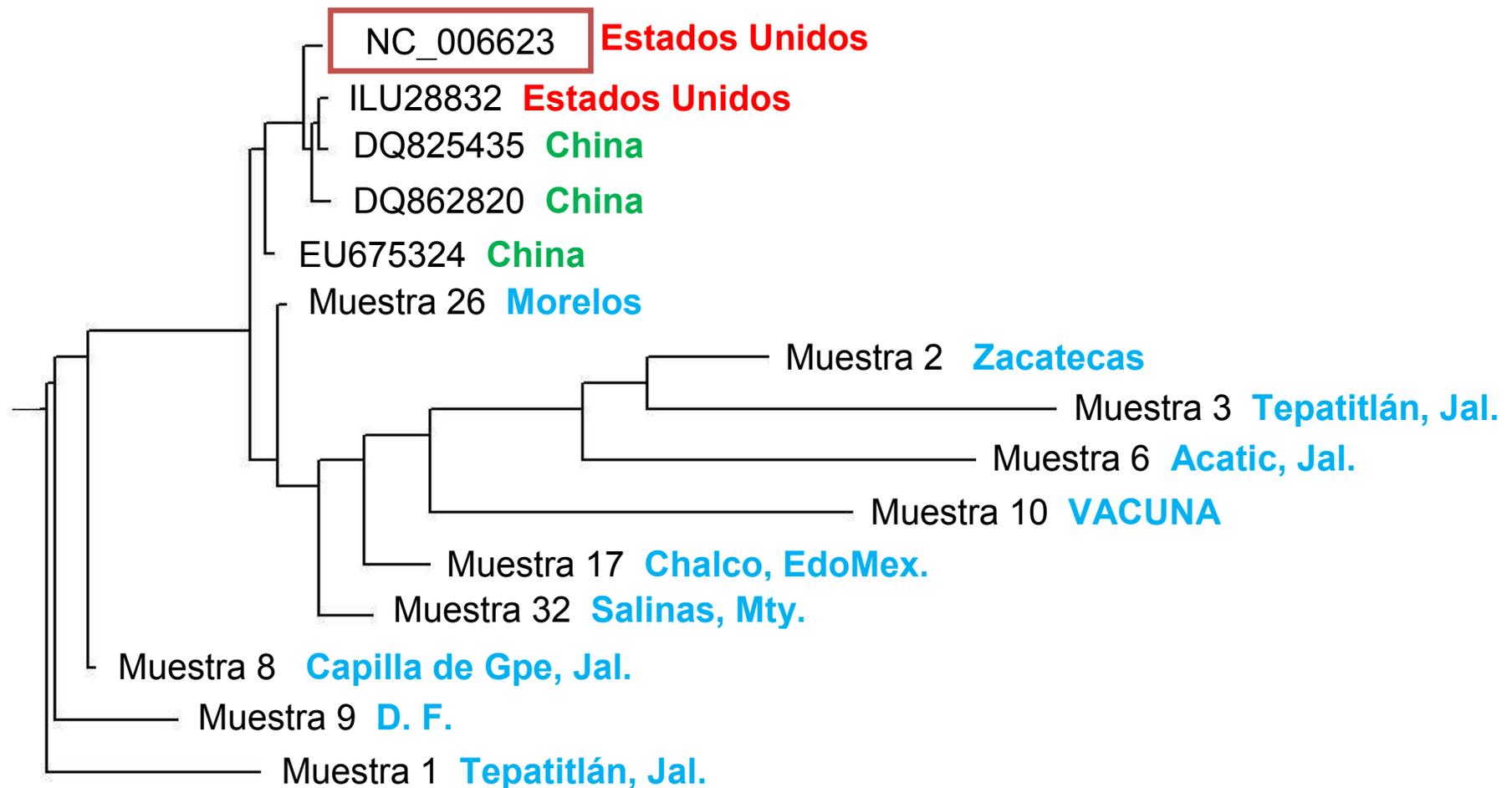


Figura 14. Filogenia de 15 aislados del virus de la laringotraqueítis infecciosa (10 mexicanos y 5 de GeneBank), tomando en cuenta la secuencia de bases de un fragmento de 765 pb correspondientes a las posiciones 135,567 y 136,331 de la secuencia completa de referencia NC_006623 obtenida del GeneBank. Elaborado con el programa Clone Manager Suite 7.0

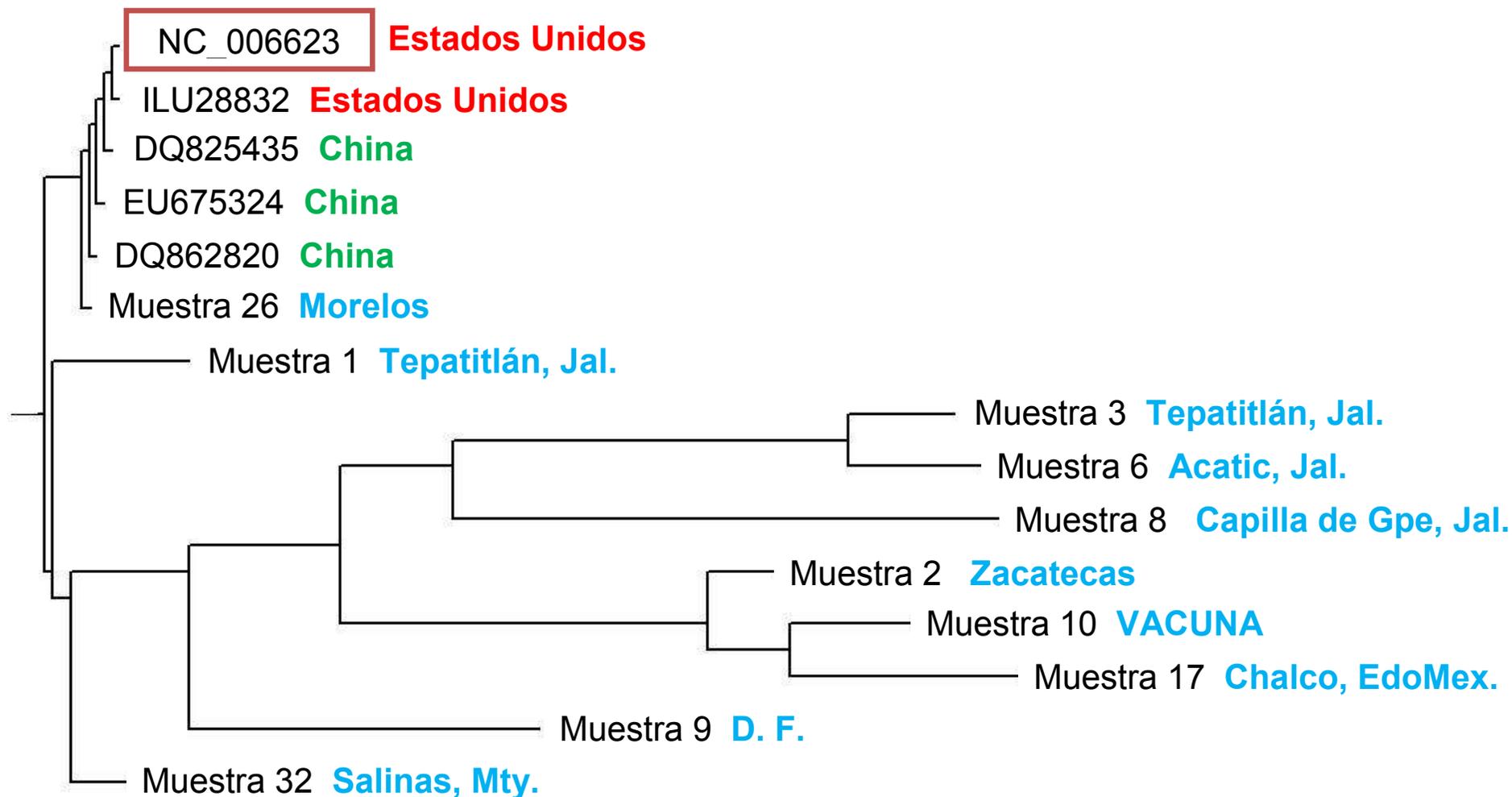


Figura 15. Filogenia de 15 aislados del virus de la laringotraqueítis infecciosa (10 mexicanos y 5 de GeneBank), tomando en cuenta la secuencia de aminoácidos de un fragmento de 765 pb correspondientes a las posiciones 135,567 y 136,331 de la secuencia completa de referencia NC_006623 obtenida del GeneBank. Elaborado con el programa Clone Manager Suite 7.0

NC_006623	293	acgttacgtatttcgtggtatggg-tttgatgtcaaagaggagtgcgaagaagtgaaactgttcgagccgtgcgtataaccatcctacagacggcaaa-tgt
Muestra 1.ab	293-.....-.....a
Muestra 2.ab	293-.....-.....
Muestra 3.ab	294-.....-.....
Muestra 6.ab	294-.....-.....
Muestra 8.ab	292-.....-.....
Muestra 9.ab	293-.....-.....
Muestra 10.a	293t.....g.....
Muestra 17.a	293g.....-.....
Muestra 26.a	293-.....-.....
Muestra 32.a	293-.....-.....

NC_006623	391	cagtttcccgcgaaccaaccagagatgcctcataggatctgtcttgatggcggaattcttggggcgagg-cctctttgctgg-attgttcccgcgatactct
Muestra 1.ab	391-.....-.....
Muestra 2.ab	392-.....-.....
Muestra 3.ab	392-.....g.....
Muestra 6.ab	392g.....-.....
Muestra 8.ab	390-.....-.....
Muestra 9.ab	391-.....-.....
Muestra 10.a	392-.....-.....
Muestra 17.a	392-.....-.....
Muestra 26.a	391-.....-.....
Muestra 32.a	391-.....-.....

NC_006623	489	agaagactgccacgaaaatcgcgtgccgaacctacggttcgattcgcgactct-ccgagtcacgcgcaggcctggtgatcagtcctcttatagcc-atcc
Muestra 1.ab	489-.....-.....
Muestra 2.ab	490t.....tg.....c
Muestra 3.ab	491-.....tg.....-.....
Muestra 6.ab	491-.....-.....c.....
Muestra 8.ab	488-.....-.....
Muestra 9.ab	489-.....-.....
Muestra 10.a	490-.....-.....
Muestra 17.a	490-.....-.....
Muestra 26.a	489-.....-.....
Muestra 32.a	489-.....-.....


```

NC_006623      631 ws-----yvtvlg--krnspr-----vvv--et-h---mp-----sk-----v-----pm-nkvv-----igs-pgpmde
Muestra 1.ab   631 me-----lh.---a.gnvt-----ra**skp-----..-----..-----..-----..-----
Muestra 2.ab   517 ---e.t-----rf--a.--l.-----h-----a-----qaw-----vn.-----
Muestra 3.ab   634 ga-----t....---qs.-----a--a--c-----f-----g-----d*t.-----
Muestra 6.ab   469 .i-----vpail--*ktatk-----iac--r--ygsirds.-----h-----aqaw*svll*.i-p..l-----dy.-rf-rr.
Muestra 8.ab   649 gn-----v..ra**s..tc..rsr*tk**la.-pd-q---wt-----kr-----ti-kc-----
Muestra 9.ab   631 ..-----r-----le-----g-----d-egss-----nwav.dql..
Muestra 10.a   628 m.-----cs.-nvq.-.-----r-t---w-----r-grmt-----vww-qsdh.d
Muestra 17.a   577 y.hpqsfd.srfr--r.h---fgm--l-.-garet*qsga**..-----r-----tc-prrsr*tk*ywq-srt...
Muestra 26.a   631 ..-----..-----..-----..-----..-----..-----..-----..-----..-----
Muestra 32.a   631 ..-----..-----..-----..-----..-----..-----rsr*tk**la.-.-----d...

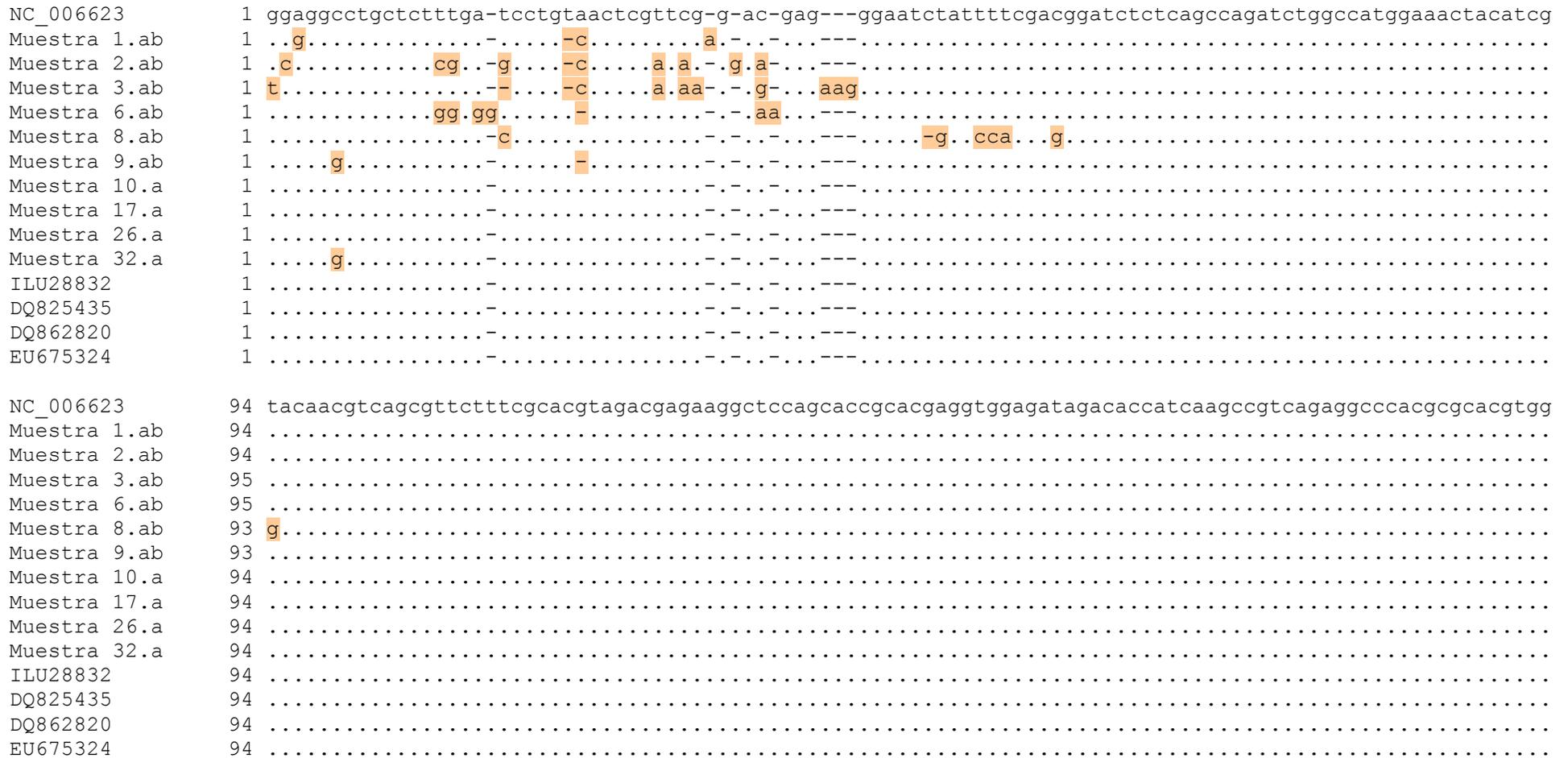
```

```

NC_006623      748 tgn--ykm-----
Muestra 1.ab   -----
Muestra 2.ab   -----
Muestra 3.ab   -----
Muestra 6.ab   625 .qs--fgl*svpt
Muestra 8.ab   -----
Muestra 9.ab   751 ...--**n---
Muestra 10.a   730 v---l.l-----
Muestra 17.a   748 .vl*n-----
Muestra 26.a   748 ..t--i.l-----
Muestra 32.a   745 rvl*n-----

```

Figura 18. Alineamiento de bases de un fragmento de 765 pb del gen de la glicoproteína E de 15 aislados del virus de la laringotraqueítis infecciosa (10 mexicanos y 5 de GeneBank).



NC_006623	194	aattacaaatgctgccgtttcatgaactcaacgacaacagccccacctatgtgacccctggtt-cttagagtcttcccaccgaccgagcagcgtaaaattta
Muestra 1.ab	194t.....-
Muestra 2.ab	194-
Muestra 3.ab	195-
Muestra 6.ab	195-
Muestra 8.ab	193-
Muestra 9.ab	193t.....
Muestra 10.a	194a.....
Muestra 17.a	194-
Muestra 26.a	194-
Muestra 32.a	194-
ILU28832	194-
DQ825435	194-
DQ862820	194a.....
EU675324	194-

NC_006623	293	acgttacgtatttcgtggtatggg-tttgatgtcaaagaggagtgcgaagaagtgaaactgttcgagccgtgCGTataccatcctacagacggcaaa-tgt
Muestra 1.ab	293-.....a.....
Muestra 2.ab	293-
Muestra 3.ab	294-
Muestra 6.ab	294-
Muestra 8.ab	292-
Muestra 9.ab	293-
Muestra 10.a	293tgg.....
Muestra 17.a	293gg.....
Muestra 26.a	293-
Muestra 32.a	293-
ILU28832	293-
DQ825435	293-
DQ862820	293-
EU675324	293t.....-

NC_006623	391	cagtttcccgcaaccaaccagagatgcctcataggatctgtcttgatggcggaattcttgggcgcg-g-cctctttgctgg-attggtcccgataactct
Muestra 1.ab	391-.....-
Muestra 2.ab	392-.....-
Muestra 3.ab	392g.....
Muestra 6.ab	392g.....
Muestra 8.ab	390-.....-
Muestra 9.ab	391-.....-
Muestra 10.a	392-.....-
Muestra 17.a	392-.....-
Muestra 26.a	391-.....-
Muestra 32.a	391-.....-
ILU28832	391-.....-
DQ825435	391-.....-
DQ862820	391-.....-
EU675324	391c.....-

NC_006623	489	agaagactgccacgaaaatcgcggtgccgaacctacggttcgattcgcgactct-ccgagtcacgcgcaggcctggatcagtcctcttatagcc-atcc
Muestra 1.ab	489-.....-
Muestra 2.ab	490t.....-.....-.....-.....-
Muestra 3.ab	491tg.....-.....-
Muestra 6.ab	491-.....c.....-
Muestra 8.ab	488-.....-
Muestra 9.ab	489-.....-
Muestra 10.a	490-.....-.....-
Muestra 17.a	490-.....-
Muestra 26.a	489-.....-
Muestra 32.a	489-.....-
ILU28832	489-.....-
DQ825435	489-.....-
DQ862820	489-.....-
EU675324	489-.....-


```

Muestra 9.ab 415 -----
Muestra 10.a 430 ----- d.gi -grg.f.glfpry .rlprksrae--tv..at--l. ....trhf--
Muestra 17.a 430 ----- d.gi.grgl.a.-----fprysr.l.r-----k. ----e.tv rfa-t .rvtrrp.q-ss
Muestra 26.a 415 -----
Muestra 32.a 415 -----
ILU28832 415 -----
DQ825435 415 -----
DQ862820 415 -----
EU675324 415 -----a.-----

```

```

NC_006623 631 ws-----ytlvg--knspr-----vzv--et-h-----mp-----sk-----v-----pm-nkvv-----igs-pgpmde
Muestra 1.ab 631 me-----lh. a.gnvt-----ra**skp-----
Muestra 2.ab 517 -----e.t rf a - l . h a -----qaw vn.
Muestra 3.ab 634 ga-----t....qs. .a .a .c . f . h a -----d*t.
Muestra 6.ab 469 .i-----vpail--*ktatk-----iac r.ygsirds. .h aqaw*svll*.i.p.l dy.-rf-rr.
Muestra 8.ab 649 gn-----v..ra**s..tc..rsr*tk**la. pd q wt kr -----ti kc-----
Muestra 9.ab 631 -----r. . . . . le g -----d eqss nwav.dql..
Muestra 10.a 628 m.-----cs. nvq.-. . . . r t w- -- --.r grmt vvw-qsdh.d
Muestra 17.a 577 y.hpqsfd.srfr r.h--- fgm .l . garet*qsga** . r -----tc prrsr*tk*ywq-srt...
Muestra 26.a 631 -----
Muestra 32.a 631 -----rsr*tk**la. - - - - - - - - - -d...
ILU28832 631 -----
DQ825435 631 -----
DQ862820 631 -----
EU675324 631 -----

```

```

NC_006623 748 tgn--ykm-----
Muestra 1.ab -----
Muestra 2.ab -----
Muestra 3.ab -----
Muestra 6.ab 625 .qs--fgl*svpt
Muestra 8.ab -----
Muestra 9.ab 751 . . . --**n--
Muestra 10.a 730 v--l.l-----
Muestra 17.a 748 .vl*n-----
Muestra 26.a 748 ..t--i.l-----
Muestra 32.a 745 rvl*n-----
ILU28832 748 -----
DQ825435 748 -----
DQ862820 748 -----
EU675324 748 -----

```

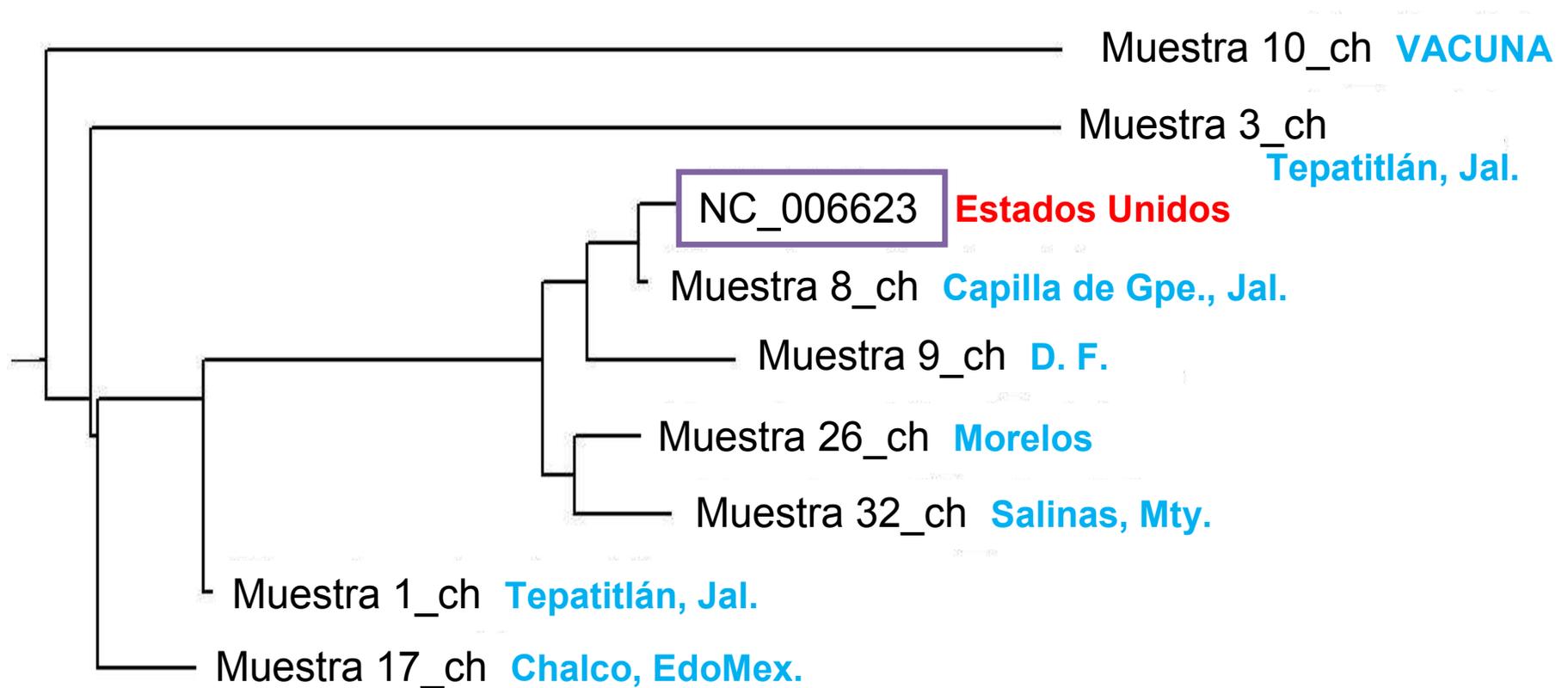


Figura 20. Filogenia de 8 aislados mexicanos del virus de la laringotraqueítis infecciosa, tomando en cuenta la secuencia de bases de un fragmento de 177 pb correspondientes a las posiciones 136,155 y 136,331 de la secuencia completa de referencia NC_006623 obtenida del GeneBank. Elaborado con el programa Clone Manager Suite 7.0

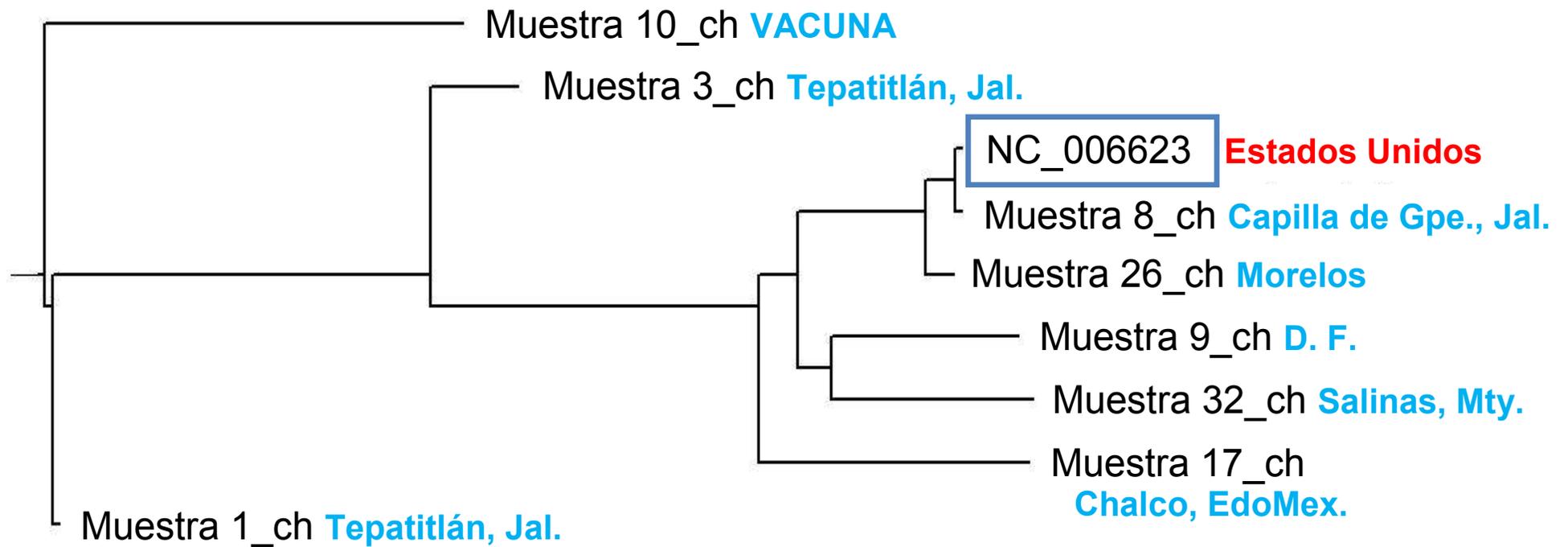


Figura 21. Filogenia de 8 aislados mexicanos del virus de la laringotraqueítis infecciosa, tomando en cuenta la secuencia de aminoácidos de un fragmento de 177 pb correspondientes a las posiciones 136,155 y 136,331 de la secuencia completa de referencia NC_006623 obtenida del GeneBank. Elaborado con el programa Clone Manager Suite 7.0



Figura 22. Filogenia de 21 aislados del virus de la laringotraqueítis infecciosa (8 mexicanos y 13 de GeneBank), tomando en cuenta la secuencia de bases de un fragmento de 177 pb correspondientes a las posiciones 136,155 y 136,331 de la secuencia completa de referencia NC_006623 obtenida del GeneBank. Elaborado con el programa Clone Manager Suite 7.0

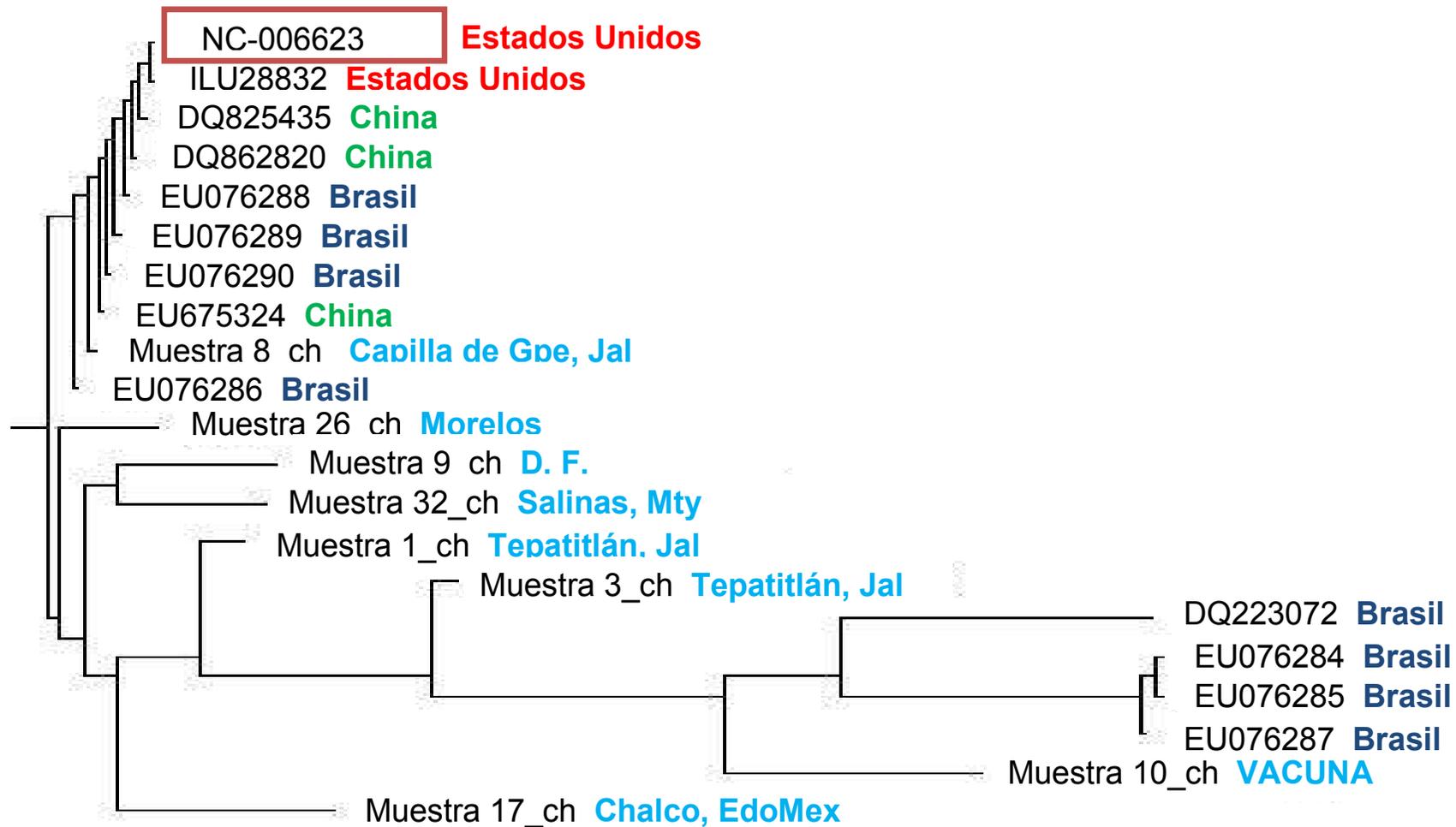


Figura 23. Filogenia de 21 aislados del virus de la laringotraqueítis infecciosa (8 mexicanos y 13 de GeneBank), tomando en cuenta la secuencia de aminoácidos de un fragmento de 177 pb correspondientes a las posiciones 136,155 y 136,331 de la secuencia completa de referencia NC_006623 obtenida del GeneBank. Elaborado con el programa Clone Manager Suite 7.0

Figura 25. Alineamiento de aminoácidos de un fragmento de 177 pb del gen de la glicoproteína E de 8 aislados mexicanos del virus de la laringotraqueítis infecciosa.

```

NC_006623      1 kvliivvsdgdilgwsytlgkrnsp-rvvv---ethmpsk-----vpmnkvvigs-pgpmdetgn--ykm--
Muestra 1_ch   1 .....rrrhf.me--lh.a.gnv-t.ra**skp.....t-----
Muestra 3_ch   1 .....rrh.....h--.a.et*p--.a---rssrngt-----l.lqrsrlnq-v-----
Muestra 8_ch   1 .....
Muestra 9_ch   1 .....r-----le-----g.deqssnwav.dql.....--**n
Muestra 10_c  1 .....trh-f.m...cs.nvq.-...rtw---...-rgrmtvvw-qsdh.dv---l.l--
Muestra 17_c  1 .....arss---rnahale-----g.deqss...qwtkr-y...--
Muestra 26_c  1 .....t---i.l--
Muestra 32_c  1 .....rsr*tk**la..-----d...rvl*n-----

```


Figura 27. Alineamiento de aminoácidos de un fragmento de 177 pb del gen de la glicoproteína E de 21 aislados del virus de la laringotraqueítis infecciosa (8 mexicanos y 13 de GeneBank).

```

NC_006623      1 ---kvli----ivvsdgdilgwsytvlg---krnsp-r-----vqv---et---hmprsk-----vp----mknkvvigs-pgpmdetgn-
Muestra 1_ch   1 ----...-----...rrrh-f.me--lh---a.gnv-t-----ra**skp-----...t-----
Muestra 3_ch   1 ----...-----...rrh-.....h-----a.et*p------a--rs---srngt-----l-----lqsrlnq-v-----
Muestra 8_ch   1 ----...-----...-----r-----le-----g-----deqssnwav.dql.....
Muestra 9_ch   1 ----...-----...trh-f.m..cs---nvq-.-.....r---tw---g-----rgrmtvvw-qsdh.dv---
Muestra 10_c   1 ----...-----...-----a-----rss-rn---ahale-----g-----deqss.....qwtkr-y
Muestra 17_c   1 ----...-----...-----r-----r-----g-----deqss.....qwtkr-y
Muestra 26_c   1 ----...-----...-----r-----r-----g-----deqss.....qwtkr-y
Muestra 32_c   1 ----...-----...-----r-----r-----g-----deqss.....qwtkr-y
ILU28832      1 ----...-----...-----r-----r-----g-----deqss.....qwtkr-y
DQ223072      1 ---**v---...ps.q-*.dgat-----c.g-n-----t---ra*yrnah...r*tk**lqsrtn.r-n-----
DQ825435      1 ----...-----...-----r-----r-----g-----deqss.....qwtkr-y
DQ862820      1 ----...-----...-----r-----r-----g-----deqss.....qwtkr-y
EU076284      1 li*sfpt---etfw..atrcsgnv..ra**s..tc.-.rsr*tk**la.-pd---qwtkr-----t---ikc-----
EU076285      1 li*sfpt---etfw..atrcsgnv..ra**s..tc.-.rsr*tk**la.-pd---qwtkr-----t---ikc-----
EU076286      1 ---...-----...-----r-----r-----g-----deqss.....qwtkr-y
EU076287      1 ---...*sfptetfw..atrcsgnv..ra**s..tc.-.rsr*tk**la.-pd---qwtkr-----t---ikc-----
EU076288      1 ----...-----...-----r-----r-----g-----deqss.....qwtkr-y
EU076289      1 ----...-----...-----r-----r-----g-----deqss.....qwtkr-y
EU076290      1 ----...-----...-----r-----r-----g-----deqss.....qwtkr-y
EU675324      1 ----...-----...-----r-----r-----g-----deqss.....qwtkr-y

NC_006623      169 -ykm---
Muestra 1_ch   -----
Muestra 3_ch   -----
Muestra 8_ch   169 -...---
Muestra 9_ch   172 ---**n-
Muestra 10_c   145 -l.l---
Muestra 17_c   166 -...---
Muestra 26_c   169 -i.l---
Muestra 32_c   169 n---

```

ILU28832	169	-...---
DQ223072	154	---*1*c
DQ825435	169	-...---
DQ862820	169	-...---
EU076284		-----
EU076285		-----
EU076286	163	-...---
EU076287		-----
EU076288	169	-...---
EU076289	169	-...---
EU076290	169	-...---
EU675324	169	-...---

Clone Manager Suite 7.0