



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CARACTERIZACION MOLECULAR MEDIANTE
SECUENCIACION DEL GEN S1 DEL VIRUS DE LA
BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
ABRAHAM SELVAS GOMEZ

ASESORES: MVZ. DR. ROGELIO ALONSO MORALES
MVZ. MC NESTOR LEDESMA MARTINEZ



MEXICO, D. F.

2005

m. 344249



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística y al Departamento de Producción Animal Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme brindado la asesoría, el espacio y los recursos para cubrir las necesidades experimentales de mi proyecto.

Este trabajo fue parcialmente financiado por donativos de PAPIIT-UNAM proyecto No IN207502

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
HISTORIA	4
IMPORTANCIA	5
ETIOLOGÍA	6
CLASIFICACIÓN DE CEPAS DE VBI	8
MORBILIDAD Y MORTALIDAD	10
DIAGNÓSTICO	10
TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL	11
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y METODOS	15
VIRUS	15
SECUENCIACIÓN DEL GEN S1 DEL vBI	15
ANÁLISIS DE LA SECUENCIA	17
ANÁLISIS FILOGENÉTICO	18
RESULTADOS	20
AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN S1 DEL VBI	20
NIVELES DE IDENTIDAD Y RELACIONES GENÉTICAS ENTRE LOS AISLADOS	21
VIRALES MEXICANOS	
NIVELES DE IDENTIDAD Y RELACIONES GENÉTICAS ENTRE LOS AISLADOS	26
VIRALES MEXICANOS Y SECUENCIAS DE REFERENCIA	
DISCUSION	35

AMPLIFICACION DEL GEN S1	35
VARIABILIDAD DEL GEN S1	35
CONCLUSIONES	39
LITERATURA CITADA	40

	Página
ANEXOS	
ANEXO I	43
EXTRACCIÓN DE ARN DEL vBI	43
ANEXO II	
CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ARN TOTAL	44
ANEXO III	
AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR DEL GEN S1 DEL vBI	45
PCR DEL GEN S1 DEL vBI	46
ANEXO IV	
PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DEL GEN S1 DEL vBI A PARTIR DE GELES DE AGAROSA	48
ANEXO V	
CLONACIÓN DEL GEN S1 vBI EN pUC 19/Sma I TA	49
TRANSFORMACION BACTERIANA	49
MINIPREPARACION DE ADN DE PLASMIDO	50
ANEXO VI	
PCR PARA SECUENCIACION DEL GEN S1 DEL vBI	52
ANEXO VII	
INICIADORES	53
ANEXO VIII	
ALINEAMIENTO A NIVEL DE NUCLEÓTIDOS	54
ANEXO IX	
ALINEAMIENTO A NIVEL DE AMINOÁCIDOS	61

FIGURAS

FIGURA 1. PRODUCTO DE PCR DEL CDNA DEL GEN S1 DEL VBI.	20
FIGURA 2. SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DEL GEN S1 DEL VBI OBTENIDA DEL SECUENCIADOR AUTOMÁTICO Y OBSERVADA POR EL PROGRAMA CHROMAS.	21
FIGURA 3. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DE LOS 9 AISLAMIENTOS DE LA REGIÓN MAS INFORMATIVA DEL GEN S1 DEL VBI, LAS PARTES SOMBREADAS REPRESENTAN LAS BASES CON MAYOR NIVEL DE IDENTIDAD.	22
FIGURA 4. SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LOS 9 AISLAMIENTOS DEL VBI ALINEADAS Y COMPARADAS, LAS PARTES SOMBREADAS REPRESENTAN LOS AMINOÁCIDOS CON MAYOR NIVEL DE IDENTIDAD.	24
FIGURA 5. RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LOS 9 AISLAMIENTOS DEL VBI BASADO EN LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE UN SEGMENTO DEL GEN S1.	25
FIGURA 6. RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LOS 9 AISLAMIENTOS DEL VBI BASADO EN LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE UN SEGMENTO DEL GEN S1.	25
Figura 7. RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DEL SEGMENTO DEL GEN S1 ENTRE LOS 9 AISLAMIENTOS MEXICANOS Y 31 CEPAS DE REFERENCIA.	32
FIGURA 8. RELACIONES FILOGENÉTICAS EN BASE A LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DEL SEGMENTO DEL GEN S1 ENTRE LOS 9 AISLAMIENTOS MEXICANOS Y 31 CEPAS DE REFERENCIA.	33
Figura 9. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del segmento del gen S1 entre los 9 aislamientos mexicanos y 31 cepas de referencia.	54
Figura 10. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del segmento del gen S1 entre los 9 aislamientos mexicanos y 31 cepas de referencia.	61

	Página
CUADROS	
CUADRO 1. VALORES DE IDENTIDAD DE LAS 9 SECUENCIAS DEL GEN S1 DE LOS AISLADOS DEL VBI EN RELACIÓN A UNA CEPA DE REFERENCIA MASSACHUSSETS.	21
CUADRO 2. TAMAÑOS Y VALORES DE SIMILITUD DE AMINOÁCIDOS DE LAS 9 SECUENCIAS DEL GEN S1 DE LOS AISLADOS ESTUDIADOS EN RELACIÓN A UNA CEPA DE REFERENCIA MASSACHUSSETS.	26
Cuadro 3 SECUENCIAS RECUPERADAS DEL GEN BANK POR BLAST CON MAYOR GRADO DE IDENTIDAD PARA CADA AISLADO DE VBI ESTUDIADO.	27
Cuadro 4. CORRESPONDENCIA DE LA IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS ESTUDIADAS POR RFLP Y ANÁLISIS DE RELACIONES GENÉTICAS.	28
CUADRO 5. TAMAÑOS DE LAS REGIONES DE NUCLEÓTIDOS HOMÓLOGAS DEL GEN S1 Y VALORES DE IDENTIDAD ENTRE LAS 9 CEPAS MEXICANAS Y 31 CEPAS DE REFERENCIA EN RELACIÓN A LA CEPA MASS4. SE IDENTIFICAN SITIOS DE DELECIÓN, INSERCIÓN ASÍ COMO MUTACIONES PUNTUALES.	29
CUADRO 6. TAMAÑOS DE LAS REGIONES DE AMINOÁCIDOS HOMÓLOGAS DEL GEN S1 Y VALORES DE IDENTIDAD ENTRE LAS 9 CEPAS MEXICANAS Y 31 CEPAS DE REFERENCIA EN RELACIÓN A LA CEPA MASS4. SE IDENTIFICAN SITIOS DE DELECIÓN, INSERCIÓN ASÍ COMO MUTACIONES PUNTUALES.	30
CUADRO 7. PORCENTAJES DE IDENTIDAD Y SIMILITUD DE LOS AISLADOS MEXICANOS 3, 4 Y 5 CON LAS CEPAS DE REFERENCIA MASS 41, CONN, ARK DPI, FLA-18288, HOLTE, UK/5/91 Y BL-56.	34
CUADRO 8. PROTOCOLO RT-PCR DEL GEN S1 DEL VBI.	45
CUADRO 9. PROTOCOLO PCR DEL GEN S1 DEL VBI.	46
CUADRO 10. PROTOCOLO CLONACION DEL GEN S1 DEL VBI EN VECTOR T.	49
CUADRO 11. PROTOCOLO PCR PARA SECUENCIACION DEL GEN S1 DEL VBI.	52

RESUMEN

SELVAS GÓMEZ ABRAHAM. Caracterización molecular mediante secuenciación del gen S1 del virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar (bajo la dirección de: Rogelio Alejandro Alonso Morales y Nestor Ledesma Martínez)

Se estudiaron 9 aislamientos de campo del virus de bronquitis infecciosa (vBI) mediante la secuenciación de nucleótidos de un segmento de 690 pb de extremo 5' del gen que codifica para la proteína S1 (1720 pb) obtenido por medio de la técnica de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Todos los aislamientos estudiados provinieron de casos clínicos, 7 de 9 aislamientos habían sido previamente clasificados por polimorfismo en los patrones de corte con enzimas de restricción (RFLP). El análisis filogenético comparativo de secuencias reveló que la mayoría de los aislados se agruparon junto a secuencias del mismo genotipo identificados por RFLP; sin embargo un aislamiento clasificado como UNAM 2001-2 se ubicó lejano a cualquier genotipo descrito hasta el momento, el cual parece representar un genotipo nuevo en México. Por otro lado, un aislamiento no clasificado se ubicó entre las cepas Florida y Connecticut sin poder definir a que serogrupo pertenece. Aunque la secuenciación de nucleótidos del gen S1 nos da información sobre el grado de similitud o divergencia y origen de los aislados virales, es recomendable, para conocer a fondo su significado epidemiológico, emplear pruebas adicionales para evaluar sus características antigénicas como la seroneutralización y la inoculación experimental en aves.

INTRODUCCIÓN

La bronquitis infecciosa (BI) es una enfermedad respiratoria viral aguda altamente contagiosa de los pollos, caracterizada por estertores traquéales y estornudos; sin embargo la infección también pueden conducir a nefritis y en parvadas de ponedoras, por lo general, hay problemas con la producción y calidad del huevo;¹ dentro de las enfermedades aviares es la más común y difícil de controlar, con graves repercusiones económicas en la industria avícola intensiva actual.^{2, 3, 4}

La enfermedad es originada por un virus con genoma de ácido ribonucleico (ARN) del cual se reconoce su existencia en forma de numerosos tipos antigénicos o serotipos que afectan en mayor o menor grado a los aparatos respiratorio, reproductor y urinario de las aves. Los serotipos se congregan en dos grupos, los del grupo uno, que afectan el tracto respiratorio, son: Massachusetts, Connecticut, Arkansas, Georgia, JMK y Florida. Los serotipos del grupo dos son nefrotrópicos como Gray, Holte y la T australiana. Estos serotipos y variantes antigénicas surgen debido a que el virus de la Bronquitis Infecciosa aviar (vBI) sufre errores cuando la información genética es copiada durante su ciclo de vida,⁵ estos errores en la replicación del ARN del genoma viral conllevan a mutaciones que pueden modificar componentes antigénicos importantes, como la glicoproteína S1, que consiste de 520 aminoácidos, que el virus utiliza para fijarse a la célula huésped, los nuevos serotipos están sujetos a

selección inmunológica y son capaces de producir réplicas de sí mismos, con el potencial de causar enfermedad.²

Algunos de estos variantes del vBI podrían tener un serotipo nuevo y escapar a la inmunidad producida por las vacunas autorizadas oficialmente en México, que son vacunas tipo virus vivo, de las cepas Massachusetts y Connecticut.⁵ En muchas regiones es común encontrar presentes diferentes tipos antigénicos, requiriéndose la aplicación de vacunas polivalentes. Además, la glicoproteína S1 ha sido considerada fundamental para inducir inmunidad y sus epítopes antigénicos son determinantes en el serotipo del virus, por tal motivo, la clasificación de las cepas de vBI se basa principalmente en las características de esta proteína.^{6,7} Cambios del 3% en la secuencia deducida de aminoácidos en ésta proteína entre dos virus, pueden ser suficientes para determinar cambios antigénicos importantes.⁸ Sin embargo, hay evidencias de que el vBI puede sufrir una recombinación genética durante infecciones mixtas originando variación entre las cepas.^{9, 10} El método de ELISA es empleado rutinariamente con fines de vigilancia epidemiológica, así como para monitorear la respuesta a la vacunación, no obstante, esta prueba no es capaz de distinguir entre las diferentes variantes antigénicas y en ocasiones es insensible a ellas. Con todo, un problema creciente es encontrar la enfermedad en pollos que ya han sido vacunados. Recientemente, se ha identificado mediante análisis molecular (RT-PCR-RFLP del gen que codifica

para la proteína S1), 6 diferentes variantes, y de estas variantes, 4 parece que son exclusivas del país.^{2, 5, 11}

La caracterización molecular del vBI permite conocer los orígenes de los brotes, rastrear los caminos de las infecciones o determinar la aparición de nuevas cepas; además, esta información puede ser usada para desarrollar nuevas vacunas diseñadas más específicamente para resolver problemas locales y mejorar los programas de vacunación en determinadas áreas geográficas y así proveer mayor protección contra la enfermedad de Bronquitis Infecciosa Aviar.

Una necesidad de la industria avícola en México es desarrollar recursos de diagnóstico más eficientes, que incorporen la diversidad antigénica local, así como métodos de protección multivalentes que sean más seguros.

HISTORIA

La Bronquitis infecciosa fue observada por primera vez en Dakota del Norte en los Estados Unidos de Norte América en el año de 1930.¹ Precedentemente la Bronquitis Infecciosa fue reconocida como una enfermedad de pollos jóvenes; sin embargo, mas tarde fue observada en aves semimaduras y en gallinas de postura, declinando la producción de huevo en estas últimas. Durante la década de los años cuarenta la Bronquitis infecciosa provocaba una enfermedad respiratoria típica y en la década de los años sesenta se observaron las lesiones en riñón. El primer

reporte reconocido de Bronquitis infecciosa que describe los signos clínicos y patológicos con estudios preliminares de laboratorio de esos casos fue hecho por Schalk y Hawn en 1931.^{12, 13, 14} Posteriormente, Beach y Schalm en 1936 establecieron la etiología viral de la enfermedad,^{1, 15} los primeros en cultivar el virus en embrión de pollo fueron Beaudette y Hudson en 1937,^{13, 16} pero fue en 1956 con el trabajo de Jungherr y colaboradores, quienes diferenciaron la cepa Connecticut, reportada en 1951, con la cepa Massachusetts, reportada en 1941, el que dio la base para conocer que los brotes de Bronquitis Infecciosa eran causados por diferentes serotipos que producen enfermedades similares, pero que no existe protección cruzada entre ellas.^{13, 17, 18} A partir de estos hitos se han identificado numerosos serotipos tanto en EU, Europa, Australia y Asia como causantes de la enfermedad.

IMPORTANCIA

La BI se encuentra en todo el mundo; prevalente en todos los países que albergan explotaciones avícolas de tipo intensivo.²⁰ En México la Industria Avícola constituye el 59.6% dentro de la actividad agropecuaria del país, produciendo 1, 800,000 toneladas de huevo y 1, 900,000 toneladas de carne de pollo al año; además de dar empleo a cerca de 1, 000,000 de personas, de las cuales 28, 284 son médicos veterinarios.^{19, 20}

La prevalencia e importancia económica de la enfermedad, originaron esfuerzos parcialmente exitosos iniciado en 1941 por Van Roekel y colaboradores para prevenir la BI,²¹ ya que la enfermedad ocasiona bajas en la ganancia de peso y en la eficiencia alimenticia; la severidad durante infecciones mixtas del vBI con otros patógenos de las vías respiratorias que pueden ocasionar aerosaculitis y así resultar en decomisos durante el procesamiento de pollos de engorda que ocasionan graves secuelas económicas.¹

ETIOLOGIA

El virus de la Bronquitis Infecciosa aviar se clasifica dentro de la familia Coronaviridae, que comprende dos géneros; el Coronavirus, con por lo menos nueve especies en mamíferos y dos en aves, junto con el coronavirus del pavo. El segundo género es el Torovirus que contiene dos virus en animales; no existen Torovirus aviares conocidos. El vBI difiere ampliamente respecto a la secuencia de proteínas y a la antigenicidad al coronavirus del pavo, el cual se relaciona de manera más estrecha con los coronavirus de los mamíferos.^{22, 23}

El virión del vBI muestra la característica morfológica del virus, es pleomórfico con proyecciones superficiales relativamente largas en forma de palo de golf llamadas espículas; la espícula se proyecta desde la envoltura del virus de aproximadamente 120 nm de diámetro. La corona se

forma con estas proyecciones de aproximadamente 17-20 nm de longitud.¹³ Las estructuras de la ribonucleoproteína de 1 a 2 nm de diámetro se pueden observar de las partículas rotas espontáneamente, mediante ensombrecimiento, pero no por tinción negativa.^{22, 23}

La estrategia de expresión del genoma de vBI es única y compleja; primero la molécula de ARN del virión se traduce directamente, con el ARNm se sintetiza un ARN-dependiente de ARN-polimerasa, dos grandes marcos abiertos de lectura con un total de 20 kb codifican las unidades que la polimerasa transcribe en el ribosoma.^{1, 24, 25} Esta enzima transcribe a su vez una copia de longitud completa de ARN de sentido negativo, a partir de la cual se transcribe una serie 3'-coterminial de ARNm subgenómico, esta serie comprende seis tipos solapados de ARNm que se extienden en longitudes diferentes a partir de un extremo 3' común; durante este mecanismo de transcripción discontinuo se pueden generar recombinantes. Tan solo se traduce la secuencia única próxima al extremo 5', que no es compartida con el siguiente ARNm de menor tamaño de la serie por lo que cada producto es una proteína única. Todo el ciclo replicativo se lleva acabo en el citoplasma. La envoltura se adquiere mediante la gemación a través de aquellas membranas que contienen la glucoproteína vírica, es decir, el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi, no en la superficie celular; la proteína S puede emigrar hacia la superficie de la célula a través del retículo, la proteína M no puede hacerlo.^{13, 24, 25, 26}

Los viriones se acumulan en vesículas y entonces son transportados hasta la membrana citoplasmática y liberados fuera de la célula, se desconoce el mecanismo de liberación. Después de la infección, en 3 a 4 horas comienzan a presentarse nuevos virus, alcanzando la producción máxima en 12 horas.^{13, 25}

CLASIFICACIÓN DE CEPAS DE VBI

Para clasificar los serotipos aislados de vBI se utilizan métodos moleculares; el análisis de secuenciación, reacción en cadena de la polimerasa y el análisis de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, permiten el estudio de la región hipervariable del gen S1 del vBI (esta región comprende del nucleótido 168 al 197), este gen se ha obtenido de por lo menos 20 aislamientos.^{27, 28, 29} La comparación de secuencias de aminoácidos revela que los serotipos difieren en un 20 a 25% y en ocasiones pueden ser suficientes del 2 al 3%;^{8, 30} estos hallazgos sugieren que solo unos cuantos epítopes de S1 inducen los principales anticuerpos virus-neutralizantes y de pocas mutaciones en estos epítopes podrían resultar en la modificación hacia un nuevo serotipo.^{4, 31}

Tradicionalmente la serotipificación se hace con pruebas de virus-neutralización, pero las relaciones establecidas por más de un grupo investigador al utilizar las pruebas de virus-neutralización no siempre concuerdan entre ellos o con el análisis de la secuencia.¹ Por lo que el

análisis de ácido nucleico es más útil en la clasificación de vBI, futuros estudios más detallados permitirán un conocimiento más exacto de las relaciones de los serotipos y una clasificación más precisa. Además, es posible que el número de estos 20 aislamientos se reduzca debido al descubrimiento de que algunos de los serotipos aislados por diferentes autores sean idénticos.²² Por otro lado la secuencia de otros genes de vBI han revelado que las cepas son casi idénticas pero con genes S1 extremadamente diferentes y viceversa, esto indica que algunas cepas han evolucionado mediante recombinación durante infecciones mixtas; por lo tanto no se debe suponer que si dos aislamientos son muy similares en su proteína S sean necesariamente muy similares en sus demás genes.⁹

Otros métodos utilizados en la clasificación de vBI se basan en el análisis con anticuerpos séricos o monoclonales. La clasificación sérica, puede ser altamente específica por cepa, diferenciando la cepa M41 con la cepa Holanda del mismo serotipo Mass. La especificidad de la respuesta temprana y la reactividad cruzada limitada son la base para un procedimiento de serotipificación de aislamientos por inhibición de la hemoaglutinación. Con el fin de designar a los nuevos aislamientos de campo a uno u otro serotipo clásico, se han utilizado anticuerpos monoclonales de virus-neutralización desarrollados contra varios serotipos de Norte América, Europa y Australia.¹

MORBILIDAD Y MORTALIDAD.

La mortalidad es variable depende de la virulencia del serotipo del vBI, edad, estado de inmunidad, nutrición, sexo y estrés, estos factores contribuyen a la gravedad de la enfermedad; además la enfermedad puede complicarse con infecciones bacterianas secundarias, por todo esto puede variar del 5 hasta el 75%. La morbilidad es de un 100%, todas las aves de parvadas susceptibles se infectan.^{13, 25}

DIAGNÓSTICO.

Los signos clínicos son indicativos, pero no diagnósticos de vBI, la confirmación requiere el aislamiento o la demostración directa de la presencia de virus de vBI, es posible establecer el diagnóstico de vBI basándose en la historia clínica, signos, lesiones, detección de antígenos a vBI, seroconversión, aislamiento viral²² y en años recientes con el advenimiento de las técnicas en Biología Molecular tales como RT-PCR (Transcriptasa Reversa -Reacción en Cadena de la Polimerasa), RFLP's (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) y secuenciación del ADN es posible tener un diagnóstico más específico para la identificación de las cepas del vBI.

Otro procedimiento diagnóstico confiable depende de la prueba biológica con pollitos susceptibles inoculados intratraquealmente, en donde el virus produce los estertores característicos en unas 18 a 36 horas;

como control de la prueba es conveniente inocular pavitos y pollos inmunes simultáneamente, ya que estos son resistentes a la infección.^{22, 30}

Otras enfermedades respiratorias agudas de las aves pueden confundirse con la BI, como son la enfermedad Newcastle (EN), la Laringotraqueítis (LT) y la Coriza Infecciosa (CI). En la EN pueden observarse signos nerviosos en las aves además de que el cuadro clínico es más severo que en BI. La LT se propaga con mayor lentitud en la parvada, pero los signos respiratorios son más severos que en BI. La CI tiende a producir hinchazón facial y aunque algunas veces también la desarrolla la BI es poco común.¹

TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL

Las posibilidades de una variación continua entre cepas de vBI y la notable diferenciación del virus impiden la profilaxis específica, por lo que no existe un tratamiento específico para BI. Algunas medidas en el manejo de la parvada permiten minimizar las pérdidas por BI como son proporcionar una fuente de calor a la parvada para evitar el estrés por frío, evitar el hacinamiento y procurar que no disminuya la ingesta de alimento. El iniciar un tratamiento con antibióticos reduce las pérdidas por aerosaculitis, administrar en el agua de bebida reemplazadores electrolíticos (75 miliequivalentes de sodio y/o potasio) para reestablecer la pérdida de sodio y potasio. El tratamiento ideal incluye cuarentena, después de la limpieza y desinfección de la caseta la repoblación con

pollitos de un día de edad y de ser posible ventilar las casetas con aire filtrado bajo presión positiva. En casetas con múltiples edades se ha requerido del uso de inmunización.¹

Actualmente existen vacunas de virus vivo, inactivado y experimentalmente virus recombinantes en sistemas de baculovirus. Las vacunas de tipo virus vivo son utilizadas preferentemente en pollos de engorda e inicialmente en ponedoras y reproductoras, las vacunas de tipo virus inactivado se utilizan preferentemente en reproductoras y ponedoras antes del inicio de la postura y las vacunas tipo virus recombinante se utilizan solo en experimentos para inducir la inmunidad en aves.^{1, 32}

HIPÓTESIS

El estudio de la secuencia de nucleótidos del gen S1 del vBI en aislados virales debe permitir la identificación de los serogrupos a los que estos pertenecen y determinar con mayor precisión sus orígenes así como sus relaciones genéticas.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Caracterización molecular de las variantes del vBI prevalentes en México mediante secuenciación de nucleótidos del gene que codifica para el antígeno S1.

Objetivos particulares

1 Amplificar mediante RT-PCR el fragmento correspondiente al gen S1 de varias cepas del vBI presentes en México.

2 Obtener la secuencia de nucleótidos de la región más polimórfica del gen S1 del vBI.

3 Establecer las relaciones genéticas de las distintas cepas al comparar sus secuencias con otras de cepas previamente descritas.

MATERIAL Y MÉTODOS

VIRUS

Se estudiaron nueve aislados del vBI, de los cuales siete ya habían sido previamente caracterizados en serogrupos mediante RFLP del gen que codifica para el antígeno S1 con las enzimas HaeIII, XcmI y BstYI. Estos aislamientos virales provenían de brotes clínicos remitidos al Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el periodo comprendido entre 1997 y 2000. Los aislamientos 1 y 3 tuvieron un patrón de corte identificado tentativamente como UNAM 2001-2, los aislamientos 6 y 8 presentaron un patrón semejante al serogrupo Connecticut, los aislamientos 7 y 9 mostraron un patrón de corte tipo Massachusetts y el aislamiento 5 presento un patrón de corte identificado como BL-56. Los aislamientos 2 y 4 no fueron caracterizados previamente.

SECUENCIACIÓN DEL GEN S1 DEL vBI.

A partir de líquido alantoideo de embriones de pollo LPE de 11-9 días de edad, infectados con los 9 casos sospechosos de BI se obtuvo el ARN total del vBI con la técnica descrita en el (Anexo I). La concentración del ARN total se determino en un espectrofotómetro siguiendo las instrucciones del proveedor (Anexo II).

Después de obtener el cDNA para el gen S1 de nueve aislamientos de vBI por Transcripción Reversa seguido de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) a partir de ARN purificado (Anexo III) con los iniciadores JK2, S1XbaF y S1pichiaR (Anexo VII); se purificaron los productos amplificados luego de electroforesis en geles de agarosa al 1% empleando como marcador molecular ADN λ /BstEI (100ng/ μ l) con el protocolo del (Anexo IV). Posteriormente el ADN purificado se clonó para su preservación y secuenciación, el vector fue digerido con Sma I y modificado con adición de Timidinas en los extremos 3' (Anexo V).

La secuenciación se efectuó con el sistema Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems) utilizando como molde el ADN purificado del plásmido de las clonas para el gen S1 o productos de PCR purificados en geles de agarosa. Se usaron iniciadores que permitieron leer las secuencias en dos direcciones (Anexos VI y VII). El iniciador WB fue diseñado para secuenciar un segmento de 690 pb. Los productos de la reacción de secuencia, se filtraron por sephadex G 50 y fueron leídos con un secuenciador automático (ABI PRIMS(r) 337, PE Applied Biosystems)

ANÁLISIS DE LA SECUENCIA

El análisis de la secuencia del gen S1 del vBI consistió en la comparación por alineamiento de las secuencias de los 9 aislamientos mexicanos con las cepas de referencia previamente reportadas en la base de datos.

Los resultados de la secuenciación automática fueron analizados inicialmente con el programa Chromas (versión 1.62, Technelysium) que permite analizar el electroferograma y resolver ambigüedades de interpretación del secuenciador automático.

A cada segmento de ADN se leyó la secuencia de nucleótidos de ambas cadenas y obteniéndose una secuencia consenso con la ayuda del programa Contig Manager del paquete DNASIS(r) For Windows(r) (versión 2.6 DNA and Protein Sequence Analysis System, Hitachi Software Engineering America LTD).

Cada secuencia consenso de cada aislado fue comparada con la base de datos Gen Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov) con la herramienta BLAST(r) (Basic Local Alignment Search Tool) donde se obtienen las secuencias del gen S1 del vBI reportadas previamente que guardan mayor similitud (la secuencia que tuvo el valor E más alto o igual a cero).

Posteriormente, se utilizó el programa Clone Manager 7 (versión 7.0, Scientific & Educational software) para el alineamiento de las secuencias consenso de cada aislado y con las secuencias de referencia.

A partir de la secuencia de nucleótidos se obtuvo la traducción deducida de aminoácidos encontrando solo un marco de lectura que se extendió a lo largo de toda la secuencia. Igualmente las secuencias de aminoácidos de los aislamientos estudiados fueron alineadas entre ellas y con las secuencias de referencia obtenidas en la base de datos del Gen Bank.

ANALISIS FILOGENÉTICO.

Con la finalidad de estudiar el origen, diversidad y las relaciones genéticas de los serotipos del vBI de los 9 aislamientos encontrados en campo en México se compararon con las 34 secuencias de referencia previamente reportados en el mundo disponibles en la base de datos del GenBank. Los números de acceso (indicados entre paréntesis) de las secuencias que se emplearon para el análisis son: Del serotipo Massachusetts (Mass) 41(M21883), Beaudette (Mass) 42 (M95169), Holte (L18988), Arkansas DPI (AF006624), Arkansas 99 (L10384), Georgia variant-92 (U16157), PP14 (M99483), Gray (L14069), JMK (L14070), SE17 (M99484), Florida (Fla) 18288 (AF027512), 98-07484 (AF288467) y Connecticut (Conn) (L18990). Se incorporaron secuencias del gen S1 Australianas N9/74 (AIU29452), N3/62 (AIU29453), N1/62 (AIU29522), Vic S (AUI29519), V5/90 (AUI29520) y N2/75 (AUI29523). Igualmente se emplearon secuencias Europeas B1648 (X87238), D3896 (X52084), 6/82 (X04723), D274 (X15832), UK/918/67 (X64737), UK/2/91 (Z83976), UK/5/91 (Z83978), H120 (M21970), 793/B (AF093794) y V1397

(M21968). Por ultimo las secuencias del gen S1 D41 (AF036937) de China, KB8523 (M21515) de Japón y de México BL-56 (AF352831), México/1765/99 (AF276300) y México/5697/99 (AF367772).

Para analizar las relaciones filogenéticas después de la alineación múltiple de las secuencias generadas y las secuencias antes mencionadas. Primeramente, el programa Clone Manager 7 calcula las distancias genéticas entre las diferentes secuencias por el modelo de algoritmo de Needleman-Wunsch (1970). Con los valores de distancias genéticas se construyeron dendrogramas por el método de "neighbor-joining" (Saitou and Nei, 1987) utilizando la subrutina NEIGHBOR.

RESULTADOS

AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN S1 DEL VBI

Los productos de amplificación del gen del antígeno S1 resultaron de acuerdo con el tamaño esperado de 1,720 pb como se muestran en la figura 1. En los carriles 1 y 2 se observan los productos amplificados del gen S1 separados por electroforesis en el gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz ultravioleta. En el carril 3 se muestra como marcador de peso molecular ADN de λ /BstEII.

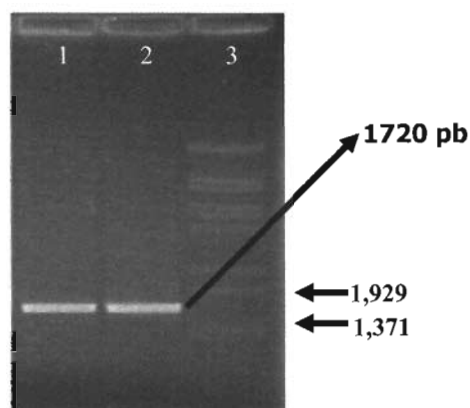


Figura 1. Producto de PCR del cDNA del gen S1 del vBI.

El segmento amplificado del gen S1 del vBI se empleó como molde para obtener la secuencia de nucleótidos de 690 pb en el extremo 5' del gen en los nueve aislamientos. Este segmento corresponde a la región más polimórfica. En la figura 2 se muestra un segmento de la secuencia de nucleótidos obtenida visualizada por el programa Chromas.

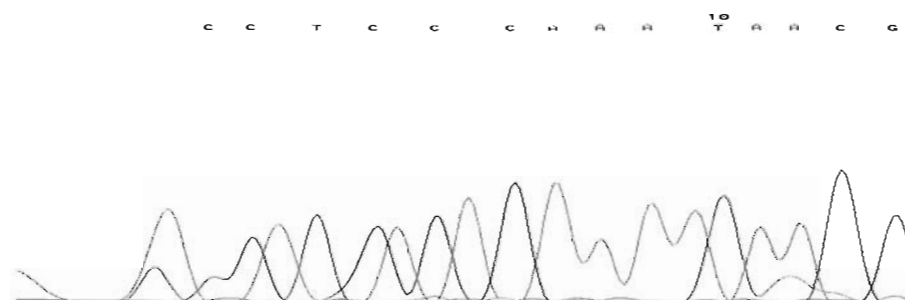


Figura 2. Secuencia de nucleótidos del gen S1 del vBI obtenida del secuenciador automático y observada por el programa Chromas.

NIVELES DE IDENTIDAD Y RELACIONES GENÉTICAS ENTRE LOS AISLADOS VIRALES MEXICANOS

En el cuadro 1 se presentan los tamaños resultantes y los valores de identidad de las secuencias de nucleótidos del segmento del gen S1 entre los aislados del vBI. Estos variaron en un rango de 72 a 98% respecto a la secuencia del serotipo de referencia Mass 41.

CUADRO 1. Valores de identidad de las 9 secuencias del gen S1 de los aislados del vBI en relación a una cepa de referencia Massachussets.

Secuencia	Tamaño	Identidad	No identidad	% de Identidad
MASS 41	652			
ASLAMIENTO 1	643	602	50	92
ASLAMIENTO 2	652	617	35	94
ASLAMIENTO 3	673	509	164	75
ASLAMIENTO 4	643	603	49	92
ASLAMIENTO 5	661	489	181	72
ASLAMIENTO 6	640	593	59	90
ASLAMIENTO 7	652	644	8	98
ASLAMIENTO 8	643	592	60	90
ASLAMIENTO 9	652	628	24	96

En las figuras 3 y 4 se muestra el alineamiento entre las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos entre los diferentes aislados. Las discrepancias entre las secuencias de nucleótidos del segmento del gen S1 se acentúan de la posición 320 a la 414 en nucleótidos y de la 157 a la 424 en aminoácidos. Las mutaciones y variaciones en la longitud que se presentan en las secuencias de nucleótidos han originado los siguientes cambios en la secuencia deducida de aminoácidos con respecto al serotipo de referencia Mass 41: el aislamiento 1 difiere por 31 aminoácidos y la pérdida de tres aminoácidos, el aislamiento 2 difiere por 20 aminoácidos, el aislamiento 3 difiere por 58 aminoácidos y la adición de siete aminoácidos, el aislamiento 4 difiere por 29 aminoácidos y la pérdida de tres aminoácidos, el aislamiento 5 difiere por 64 aminoácidos y la pérdida y adición de tres y seis aminoácidos respectivamente, el aislamiento 6 difiere por 36 aminoácidos y la pérdida de cuatro aminoácidos, el aislamiento 7 difiere por siete aminoácidos, el aislamiento 8 difiere por 37 aminoácidos y la pérdida de tres aminoácidos y el aislamiento 9 difiere por 17 aminoácidos.

```

AISLAMIENTO1      1  ttattagtgactcttttggcttgcaactatgtagtgtgcttttgatgacaatagttcttacctttactact
AISLAMIENTO4      1  ttattagtgactcttttggcttgcaactatgtagtgtgcttttgatgacaatagttcttacctttactact
AISLAMIENTO6      1  ttattagtgactcttttggcttgcaactatgtagtgtgcttttgatgacaatagttcttacctttactacc
AISLAMIENTO8      1  ttattagtgactcttttggcttgcaactatgtagtgtgcttttgatgacaatagttccgacgtttactact
AISLAMIENTO7      1  ttaatagtgactcttttggcttgcaactatgtagtgtgcttttgatgacagtagttcttacctgtactact
AISLAMIENTO2      1  ttactagtgctcaactttggtgctcaactaacagtgctgcttttgatgacagtagttcttacctgtactact
AISLAMIENTO9      1  ttaatagtgactcttttggcttgcaactatgtagtgtgcttttgatgacagtagttcttacctgtactact
AISLAMIENTO3      1  ttgttagtgactagttttggtgctcaactatgtagtgtcaactttgttgataagtagtactactactact
AISLAMIENTO5      1  ttactagtgactgttttggctgcaactatgtagtgtcaacttttgatgaca---attcttacctgtactact

AISLAMIENTO1      71  accaaagtgccttttagaccacctaatggttggcatttacacgggggtgcttatgcggtagttaatacttc
AISLAMIENTO4      71  accaaagtgccttttagaccacctaatggttggcatttacacgggggtgcttatgcggtagttaatacttc
AISLAMIENTO6      71  accgaagtgccttttagaccacataatggttggcatttacacgggggtgattatgcggtagttaatacttc
AISLAMIENTO8      71  acagaagtgccttttagaccacatgatggttggcatttacacgggggtgattatgcagtagttaatacttc
AISLAMIENTO7      71  accaaagtgccttttagaccaccttatggttggcatttacacgggggtgcttatgcggtagttaatacttc
AISLAMIENTO2      71  accaaagtgccttttagaccacctgatggttggcatttacatgggggtgcttatgcggtgtaataatcttc
AISLAMIENTO9      71  accaaagtgccttttagaccacctgatggttggcatttacatgggggtgcttatgcggtgtaataatcttc
AISLAMIENTO3      71  accaaagcgcttttagaccaggcgatggttggcattgcatgggtgcttatgcagtagttaatgcttc
AISLAMIENTO5      68  atcaagcgcttttagaccgcatggttgggttggcatttacagggggcatataaagtagttaatgcttc

AISLAMIENTO1      141 tatagaatctaataatttaaga-----gagtgtattgttggtattattgggtggtgatcggtg-tgt
AISLAMIENTO4      141 tatagaatctaataatttaaga-----gggtgtattgttggtattattgggtggtgatcggtg-tgt
AISLAMIENTO6      141 tata---tctaataatttaaga-----gagtgtattgttggtattattgggtggtgatcggtg-tgt
AISLAMIENTO8      141 tatagaatctaataatttaaga-----gagtgtattgttggtattattgggtggtgatcggtg-tgt
AISLAMIENTO7      141 tagggaatctaataatgcaggctcttcacctgggtgtattgttggtactatcatgggtggtcggtg-tgt
AISLAMIENTO2      141 taggaatctaataatgcaggctcttcacctgggtgtactgttggtattatttcatttttctcggtg-tgt
AISLAMIENTO9      141 tagtgaatctaataatgcaggctcttcacctgggtgtactgttggtattattcatgggtggtcggtg-tgt
AISLAMIENTO3      141 tacagaaagtaataatgcagggtgctgcttctacttgcatgctgggtgtattattg-gagtaagaattt
AISLAMIENTO5      138 taatgaacctaatt-----gccccgggtctacttgcatgctgggtgcatgtggtt-ttagcaagaactt

AISLAMIENTO1      201 taatgctctctctatagctatgacggcacccgcaaccagggtatggattggcttagcagcaggtttgtact
AISLAMIENTO4      201 taatgctctctctatagctatgacggcacccgcaaccagggtatggattggcttagcagcaggtttgtact
AISLAMIENTO6      198 taatgctctctctatagctatgacggcacccgcaaccagggtatggattggcttagcagcaggtttgtact
AISLAMIENTO8      201 taatgctctctctatagctatgacggcacccgcaaccagggtatggattggcttagcagcaggtttgtact
AISLAMIENTO7      210 taatgctctctctatagctatgacggcacccgcatcagggtatggcttggttagcagtcaggtttgtact
AISLAMIENTO2      210 taatgctctctctatagctatgacggcacccgcatcagggtatggcttggttagcagtcaggtttgtact
AISLAMIENTO9      210 taatgctctctctatagctatgacggcacccgcatcagggtatggcttggttagcagtcaggtttgtact
AISLAMIENTO3      210 tagtgcctctctctatagctatgactgcaccaggttcgggtatgtcatggctctgttagtcaattctgtacg
AISLAMIENTO5      210 tagtgcctctctctatagctatgactgcaccacatagtggtatgctgctgctgtcttcagcaattttgacg

AISLAMIENTO1      271 gcacactgtaacttttcagatattacagtggtttgttacacattggtataaaca-----taatgggtgtc
AISLAMIENTO4      271 gcacactgtaacttttcagatattacagtggtttgttacacattggtataaaca-----taatgggtgtc
AISLAMIENTO6      268 gcacactgtaacttttcagatattacagtggtttgttacacattggtataaaca-----taatgggtgtc
AISLAMIENTO8      271 gcacactgtaacttttcagatattacagtggtttgttacacattggtataaaca-----taatgggtgtc
AISLAMIENTO7      280 gcacactgtaacttttcagatactacagtggtttgttacacattggtataaata-----tgatgggtgtc
AISLAMIENTO2      280 gcatactgtaacttttcagatactacagtggtttgttacacattggtataaaca-----tgatgggtgtc
AISLAMIENTO9      280 gcatactgtaacttttcagatactacagtggtttgttacacattggtataaaca-----aggtgggtgtc
AISLAMIENTO3      280 gctcactgtaatttttagtgggtttacagtggtttgttacacattggtttaagaaagggtggtgaatgtc
AISLAMIENTO5      271 gctcactgtaattttacacttttacagtggtttgttacacattggtataagtcaggagctgctactgtc

AISLAMIENTO1      335 ctataactgggtccattccacagcattctatacgtgtttctgctatgaaaaaggccggctt-----
AISLAMIENTO4      335 ctataactgggtccattccacagcattctatacgtgtttctgctatgaaaaaggccggctt-----
AISLAMIENTO6      332 ctataactgggtccattccacagcattctatacgtgtttctgctatgaaaaaggccggctt-----
AISLAMIENTO8      335 ctataactgggtccattccacagcattctatacgtgtttctgctatgaaaaaggccggctt-----
AISLAMIENTO7      344 ctataactggcatgcttcaaaagaatttttacctgtttctgctatgaaaaatggccagctt-----
AISLAMIENTO2      344 ctataactggcatgcttcaacagcattctatacgtgtttctgctatgaaaaatggccagctt-----
AISLAMIENTO9      344 ctataactggcatgcttcaacagcattctatacgtgtttctgctatgaaaaatggccagctt-----
AISLAMIENTO3      350 ctctaacgggtcttattccgcaaaattatattcgcatcttcagctatgaagcaaggcgagatagtcctc
AISLAMIENTO5      341 ctttaacaggtcttattccagtgccatattcgcatcttctgctatga---gaagagtttaattggtcatca

AISLAMIENTO1      397 -----ttctataatttaacagtagtgtaataagtaacctacttttaaatcatttcagtggtgtaat
AISLAMIENTO4      397 -----ttctataatttaacagtagtgtaataagtaacctacttttaaatcatttcagtggtgtaat
AISLAMIENTO6      394 -----ttctataatttaacagtagtgtaataagtaacctacttttaaatcatttcagtggtgtaat
AISLAMIENTO8      397 -----ttctataatttaacagtagtgtaataagtaacctacttttaaatcatttcagtggtgtaat
AISLAMIENTO7      406 -----ttctataatttaacagtagtgtagtaagtaacctacttttaaatcatttcagtggtgtaat
AISLAMIENTO2      406 -----tttataatttaacagtagtgtagtaagtaacctacttttaaatcatttcagtggtgtaat

```

Figura 3. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los 9 aislamientos del la región mas informativa del gen S1 del vB1, las partes sombreadas representan las bases con mayor nivel de identidad.

```

AISLAMIENT09 406 -----ttctataatttaacagtttagttagctaagttacccctacttttaaatcatttcagtggttaatt
AISLAMIENT03 420 cgacttggtttataaatttaacggttcctgtgactaaatatcctcatttagatcacttcaatgtgttaatt
AISLAMIENT05 408 tgatattttttataaatttaacagtttctgtgactaattatcctacatttaagtcacttcaatgtgttaatt

AISLAMIENT01 460 aattttacatccgtatattttaaatgggtgatcttggtttacacctctaataagagaccacagatgttacatctg
AISLAMIENT04 460 aattttacatccgtatattttaaatgggtgatcttggtttacacctctaataagagaccacagatgttacatctg
AISLAMIENT06 457 aattttacatccgtatattttaaatgggtgatcttggtttacacctctaataagagaccacagatgttacatctg
AISLAMIENT08 460 aattttacatccgtatattttaaatgggtgatcttggtttacacctctaataagagaccacagatgttacatctg
AISLAMIENT07 469 aatttaacatccgtatattttaaatgggtgatcttggtttacacctctaataagagaccacagatgttacatctg
AISLAMIENT02 469 aatttaacatccgtatattttaaatgggtgatcttggtttacacctctaataagagaccacagatgttacatctg
AISLAMIENT09 469 aatttaacatccgtatattttaaatgggtgatcttggtttacacctctaataagagaccacagatgttacatctg
AISLAMIENT03 490 aatcaaacatctgtatattttaaatgggtgatcttggtttcacatccaatgagactacagatgttacagctg
AISLAMIENT05 478 aatcaaacgtctgtatattttaaatgggtgatcttggtttttcacatccaatgaaactatagctgttcaggtg

AISLAMIENT01 530 cagggtgtttattttaaatgctgggtggacctataaacttataaagtattagagagaagttaagccctggctta
AISLAMIENT04 530 cagggtgtttattttaaatgctgggtggacctataaacttataaagtattagagagaagttaagccctggctta
AISLAMIENT06 527 cagggtgtttattttaaatgctgggtggacctataaacttataaagtattagagagaagttaagccctggctta
AISLAMIENT08 530 cagggtgtttattttaaatgctgggtggacctataaacttataaagtattagagagaagttaagccctggctta
AISLAMIENT07 539 cagggtgtttattttaaaagctgggtggacctataaacttataaagtattagagagaagttaaacccctggctta
AISLAMIENT02 539 cagggtgtttattttaaaagctgggtggacctataaacttataaagtattagagagaagtttagagccctggctta
AISLAMIENT09 539 cagggtgtttattttaaaagctgggtggacctataaacttataaagtattagagagaagttaaacccctggctta
AISLAMIENT03 560 cagggtgtttattttaaaagcgggtggacctataaacttataaagtattagaggaaaccaaagctttggctta
AISLAMIENT05 548 cagggtgtttatttttagcagtaattggacctataaacttataaagtattagaggaaaccaaagctttggctta

AISLAMIENT01 600 ttttggttaatggtactgcacaagacggtatttttgggtgatggat
AISLAMIENT04 600 ttttggttaatggtactgcacaagacggtatttttgggtgatggat
AISLAMIENT06 597 ttttggttaatggtactgcacaagacggtatttttgggtgatggat
AISLAMIENT08 600 ttttggttaatggtactgcacaagacggtatttttgggtgatggat
AISLAMIENT07 609 ttttggttaatggtactgcacaagatcttatttttgggtgatggat
AISLAMIENT02 609 ttttggttaatggtactgcacaagatggtatttttgggtgatgggt
AISLAMIENT09 609 ttttggttaatggtactgcacaagatcttatttttgggtgatggat
AISLAMIENT03 630 ttttggttaatggtactgcacaagatggtatttcttgggatggta
AISLAMIENT05 618 ttttggttaatggtactgcacaagatggtatttcttgggatggta

```

Figura 3. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los 9 aislamientos del la región mas informativa del gen S1 del vBI, las partes sombreadas representan las bases con mayor nivel de identidad.

```

AISLAMIENTO1      1 llvtllfalcsaalydnssyvyvyyqsafrrpngwhlhggayavvntsiessnnlre---civgiiggdrvv
AISLAMIENTO6      1 llvtllfalcsaalydnssyvyvyyhrsafrrphngwhlhggdyavvntfi-snnlre---civgiiggdrvv
AISLAMIENTO8      1 llvtllfalcsaalydnssdvyyrfsaftphdgwhlhggdyavvntsiessnnlre---civgiiggdrvv
AISLAMIENTO4      1 llvtllfalcsaalydnssyvyvyyqsafrrpngwhlhggayavvntsiessnnlrg---civgiiggdrvv
AISLAMIENTO2      1 llvstlcaltsaalydsssyvyvyyqsafrrpdgwhlhggayavvnissessnagsssgctvgiihfrvv
AISLAMIENTO7      1 livtllcvclsaalydsssyvyvyyqsafrrppygwhlhggayavvnissresnagsspgcivgtihggrvv
AISLAMIENTO9      1 livtllcalcsaalydsssyvyvyyqsafrrpdgwhlhggayavvnissessnagsssgctvgiihggrvv
AISLAMIENTO3      1 llvivlcalcsanlfndntyvyvyyqsafrrpgghwhlhggayavvnvstesnnagaastctagviywsknf
AISLAMIENTO5      1 llvtvlcalcsatlydn-svyvyyqsafrrfggwhlqggaykvvnvsnnetnappg--stciagaigfksnl

AISLAMIENTO1      202 nassiamtapqpgmdwssrqfctahcnfsditvfvthcykhng--cpitgsipqhsirvsamkkgr---
AISLAMIENTO6      199 nassiamtapqpgmdwssrqfctahcnfsditvfvthcykhng--cpitgsipqhsirvsamkkgr---
AISLAMIENTO8      202 nassiamtapqpgmdwssrqfctahcnfsditvfvthcykhng--cpitgsipqhsirvsamkkgr---
AISLAMIENTO4      202 nassiamtapqpgmdwssrqfctahcnfsditvfvthcykhng--cpitgsipqhsirvsamkkgr---
AISLAMIENTO2      211 nassiamtapssgmawsssqfctaycnfsdttvfvthcykhvg--cpitgmllqghsirvsamkngq---
AISLAMIENTO7      211 nassiamtapssgmawsssqfctahcnfsdttvfvthcykydg--cpitgmllqknflrvsamkngq---
AISLAMIENTO9      211 nassiamtapssgmawsssqfctaycnfsdttvfvthcykqgg--cpitgmllqghsirvsamkngq---
AISLAMIENTO3      211 sassvamtapsgmswsvsqfctahcnfsdttvfvthcyksgagecpltgliipqnyirisamkqggsps
AISLAMIENTO5      202 saasvamtaphsgmswsvsqfctahcnfthftvfvthcyksaaycpltgliiprghirisamrrv-nghh

AISLAMIENTO1      394 -lfynltvsvnkyptfksfqcgvnnftsvylnngdlvytsnettdvtsagvyfnaggpitykvmrevkalay
AISLAMIENTO6      391 -lfynltvsvnkyptfksfqcgvnnftsvylnngdlvytsnettdvtsagvyfnaggpitykvmrevkalay
AISLAMIENTO8      394 -lfynltvsvnkyptfksfqcgvnnftsvylnngdlvytsnettdvtsagvyfnaggpitykvmrevkalay
AISLAMIENTO4      394 -lfynltvsvnkyptfksfqcgvnnftsvylnngdlvytsnettdvtsagvyfnaggpitykvmrevkalay
AISLAMIENTO2      403 -lfynltvsvakypptfksfqcgvnnftsvylnngdlvytsnettdvtsagvyfkaggpitykvmrevkalay
AISLAMIENTO7      403 -lfynltvsvakypptfksfqcgvnnftsvylnngdlvytsnettdvtsagvyfkaggpitykamrevkplay
AISLAMIENTO9      403 -lfynltvsvakypptfksfqcgvnnftsvylnngdlvytsnettdvtsagvyfkaggpitykamrevkplay
AISLAMIENTO3      421 dlfynltvpvtpkyptsfrslqcvnnqtsvylnngdlvftsnettdvtaagvyfkaggpitykvmketkalay
AISLAMIENTO5      409 difynltvsvtnyptfkslqcvnnqtsvylnngdlvssnetiavsgagvyfssngpitykvmketkalay

AISLAMIENTO1      601 fvnqtaqdvlcdg
AISLAMIENTO6      598 fvnqtaqdvlcdg
AISLAMIENTO8      601 fvnqtaqdvlcdg
AISLAMIENTO4      601 fvnqtaqdvlcdg
AISLAMIENTO2      610 fvnqtaqdvlcdg
AISLAMIENTO7      610 fvnqtaqdlilcdg
AISLAMIENTO9      610 fvnqtaqdlilcdg
AISLAMIENTO3      631 fvnqtaqdvlwdg
AISLAMIENTO5      619 fvnqtaqdvlwdg

```

Figura 4. Secuencias de aminoácidos de los 9 aislamientos del vB1 alineadas y comparadas, las partes sombreadas representan los aminoácidos con mayor nivel de identidad.

En la figura 5 y 6 se muestran dendrogramas donde se observan las relaciones genéticas entre los diferentes aislados a nivel de nucleótidos y a nivel de aminoácidos, respectivamente. En ambas figuras se observan dos grandes ramas, una representada por los aislamientos 3 y 5, y la otra por el resto de ellos.

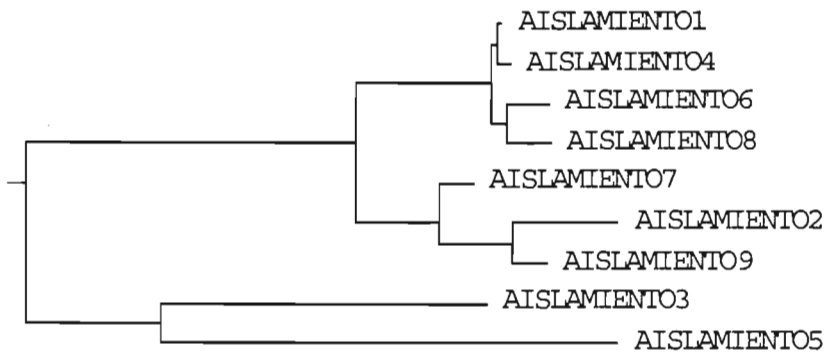


Figura 5. Relaciones filogenéticas de los 9 aislamientos del vB1 basado en la secuencia de nucleótidos de un segmento del gen S1.

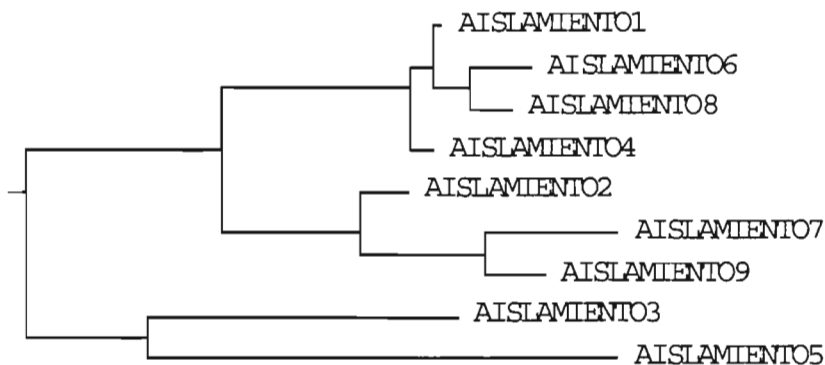


Figura 6. Relaciones filogenéticas de los 9 aislamientos del vB1 basado en la secuencia de aminoácidos de un segmento del gen S1.

En el cuadro 2 se presentan los tamaños y los porcentajes de similitud entre las secuencias de aminoácidos de los segmentos estudiados del gen S1. Este último valor varió en un rango de 67 a 96 % con respecto al serotipo de referencia Mass 41.

CUADRO 2. Tamaños y valores de similitud de aminoácidos de las 9 secuencias del gen S1 de los aislados estudiados en relación a una cepa de referencia Massachussets.

Secuencia	Tamaño	Identidad	No Identidad	% de Identidad
MASS 41	652			
AISLAMIENTO 1	643	183	34	84
AISLAMIENTO 2	652	197	20	90
AISLAMIENTO 3	673	159	65	70
AISLAMIENTO 4	643	185	32	85
AISLAMIENTO 5	661	150	73	67
AISLAMIENTO 6	640	177	40	81
AISLAMIENTO 7	652	210	7	96
AISLAMIENTO 8	643	177	40	81
AISLAMIENTO 9	652	200	17	92

NIVELES DE IDENTIDAD Y RELACIONES GENÉTICAS ENTRE LOS AISLADOS VIRALES MEXICANOS Y SECUENCIAS DE REFERENCIA

Los tamaños de las regiones homólogas, el número de mutaciones puntuales, el número de deleciones e inserciones (indeles), los sitios de indeles y de los valores de identidad de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del segmento del gen S1 estudiado de los aislados mexicanos y de las cepas de referencia se presentan en el cuadro 5 y 6 respectivamente. Estos valores fueron generados en relación a la cepa de referencia Mass 41; el grado de similitud a nivel de nucleótidos varió en un

rango de 98 a 59%, mientras que a nivel de aminoácidos tuvieron un rango de 96 a 46% (los valores que muestra la secuencia México/5697/99 no se toman ya que la secuencia esta incompleta). El alineamiento de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos entre las cepas mexicanas y las cepas de referencia se muestran en los (Anexos VIII y IX). En el cuadro 3 se observan las secuencias que se encontraron con mayor similitud por medio del análisis BLAST para cada aislamiento junto con su número de acceso y el porcentaje de identidad.

Cuadro 3 Secuencias recuperadas del Gen Bank por BLAST con mayor grado de identidad para cada aislado de vBI estudiado.

Aislamiento	Acceso	Cepa	% de identidad
1	AY561716	Connecticut	100
2	M21970	H120	98
3	AY296745	JP8443	81
4	AY561716	Connecticut	98
5	AF352831	BL-56	94
6	L18990	Connecticut	96
7	M21883	41	98
8	AY561716	Connecticut	97
9	AY561713	Massachusetts	98

En el cuadro 4 se muestra la correspondencia de la identidad de las cepas estudiadas por RFLP y por secuenciación de nucleótidos y relaciones genéticas (filogenia).

Cuadro 4. Correspondencia de la identificación de las cepas estudiadas por RFLP y análisis de relaciones genéticas.

AISLADO	RFLP	FILOGENIA
1	UNAM 2001-2,	Connecticut
3	UNAM 2001-2,	No descrito
6 y 8	Connecticut	Connecticut
7 y 9	Massachusetts	Massachusetts
5	BL-56	BL-56
2	No realizado	Massachusetts
4	No realizado	Connecticut

Cuadro 5. Tamaños de las regiones de nucleótidos homólogas del gen S1 y valores de identidad entre las 9 cepas mexicanas y 34 cepas de referencia en relación a la cepa Mass4, se identifican sitios de delección, inserción así como mutaciones puntuales.

	Tamaño	Identidad	No identidad	% de identidad	Número de Delecciones	Número de Inserciones	Mutaciones Puntuales
Mass 41	652						
Aislamiento 1	643	602	50	92	9	0	41
Aislamiento 2	652	617	35	94	0	0	35
Aislamiento 3	673	509	164	75	0	21	143
Aislamiento 4	643	603	49	92	9	0	40
Aislamiento 5	661	489	181	72	9	18	154
Aislamiento 6	640	593	59	90	12	0	47
Aislamiento 7	652	644	8	98	0	0	8
Aislamiento 8	643	592	60	90	9	0	51
Aislamiento 9	652	628	24	96	0	0	24
Beaudette	652	631	21	96	0	0	21
Holte	670	487	183	72	0	18	165
Ark DPI	673	491	182	72	0	21	161
Ark 99	673	484	189	71	0	21	168
Georgia	673	486	187	72	0	21	166
PP14	673	500	173	74	0	21	152
Gray	670	494	179	73	3	21	155
JMK	670	495	178	71	3	21	154
SE17	673	484	189	90	0	21	168
FLA-18288	631	588	64	91	21	0	43
Conn	640	598	54	74	12	0	42
N9/74	684	507	177	73	0	32	145
N3/62	684	500	184	74	0	32	152
N1/62	684	508	176	77	0	32	144
VIC	667	519	148	77	0	15	133
V5/90	667	517	150	78	0	15	135
N2/75	664	524	140	73	0	12	128
B1648	664	489	178	77	3	15	160
D3896	655	508	150	77	3	6	141
6/82	655	509	149	77	3	6	140
D274	655	508	150	74	3	6	141
UK/918/67	673	500	173	75	0	21	152
UK/2/91	658	498	160	76	0	6	154
UK/5/91	658	502	157	96	1	7	149
H120	652	629	23	59	0	0	23
V1397	646	403	274	96	31	25	218
D41	652	626	26	96	0	0	26
K88523	652	628	24	59	0	0	24
México5697/99	558	400	272	39	114	20	138
México1765/99	430	240	444	39	254	32	158
98-07484	645	385	305	61	45	38	222
793/B	658	512	151	75	5	11	135
BL-56	661	490	180	73	9	18	153

CUADRO 6. Tamaños de las regiones de aminoácidos homólogos del gen S1 y valores de identidad entre las 9 cepas mexicanas y 34 cepas de referencia en relación a la cepa Mass4, se identifican sitios de delección, inserción así como mutaciones puntuales.

	Tamaño	Identidad	No identidad	% de similitud proteica	Número de Delecciones	Número de Inserciones	Mutaciones Puntuales
Mass 41	217						
Aislamiento 1	214	183	34	84	3	0	31
Aislamiento 2	217	197	20	90	0	0	20
Aislamiento 3	224	159	65	70	0	7	58
Aislamiento 4	214	185	32	85	3	0	29
Aislamiento 5	220	150	73	67	3	6	64
Aislamiento 6	213	177	40	81	4	0	36
Aislamiento 7	217	210	7	96	0	0	7
Aislamiento 8	214	177	40	81	3	0	37
Aislamiento 9	217	200	17	92	0	0	17
Beaudette	217	200	17	92	0	0	17
Halte	223	148	75	66	0	6	69
Ark DPI	224	151	73	67	0	7	66
Ark 99	224	150	74	66	0	7	67
Georgia	224	144	80	64	0	7	73
PP14	224	153	71	68	0	7	64
Gray	223	151	72	67	0	6	66
JMK	223	151	72	67	0	6	66
SE17	224	151	73	67	0	7	66
FLA-18288	210	177	40	81	7	0	33
Conn	213	181	36	83	4	0	32
N9/74	228	151	77	66	0	11	66
N3/62	228	148	80	64	0	11	69
N1/62	228	157	71	68	0	11	60
VIC	222	156	66	70	0	5	61
V5/90	222	154	68	69	0	5	63
N2/75	221	154	68	69	1	5	62
B1648	221	149	73	67	1	5	67
D3896	218	157	62	71	1	2	59
6/82	218	156	63	71	1	2	60
D274	218	157	62	71	1	2	59
UK/918/67	224	156	68	69	0	7	61
UK/2/91	219	150	69	68	0	2	67
UK/5/91	219	150	69	68	0	2	67
H120	217	203	14	93	0	0	14
V1397	215	103	118	46	6	4	108
D41	217	201	16	92	0	0	16
K88523	217	203	14	93	0	0	14
México5697/99	186	122	102	54	38	7	57
México1765/99	143	63	161	28	81	7	73
98-07484	215	104	120	46	9	7	104
793/B	219	150	69	68	0	2	67
BL-56	220	155	68	69	3	6	59

En la figura 7 se muestra un dendrograma en donde se representan las relaciones genéticas basadas en diferencias de nucleótidos de los aislados mexicanos con respecto a varias cepas de referencia. Se observa que se agrupan los aislamientos 1, 6, 8 y 4 con las secuencias de cepas Connecticut y Florida; los aislamientos 7, 9 y 2 se agrupan con las cepas Massachusetts, H120, D41 y KB8523; el aislamiento 5 se agrupa con las cepas mexicanas México/5697/99 y BL-56; mientras que el aislamiento 3 no se agrupa con ninguna cepa de referencia.

En la figura 8 se muestra un dendrograma en donde se representan las relaciones genéticas basadas en diferencias de aminoácidos de los aislados mexicanos con respecto a cepas de referencia. Al igual que en la figura 8 los aislados 1, 6, 8 y 4 se agrupan con las cepas Connecticut y Florida; los aislamientos 7, 9 y 2 se agrupan con las cepas Massachusetts, H120, D41 y KB8523; el aislamiento 5 se agrupa junto con las cepas de mexicanas México/5697/99 y BL-56; mientras que el aislamiento 3 no se agrupa con alguna cepa de referencia.

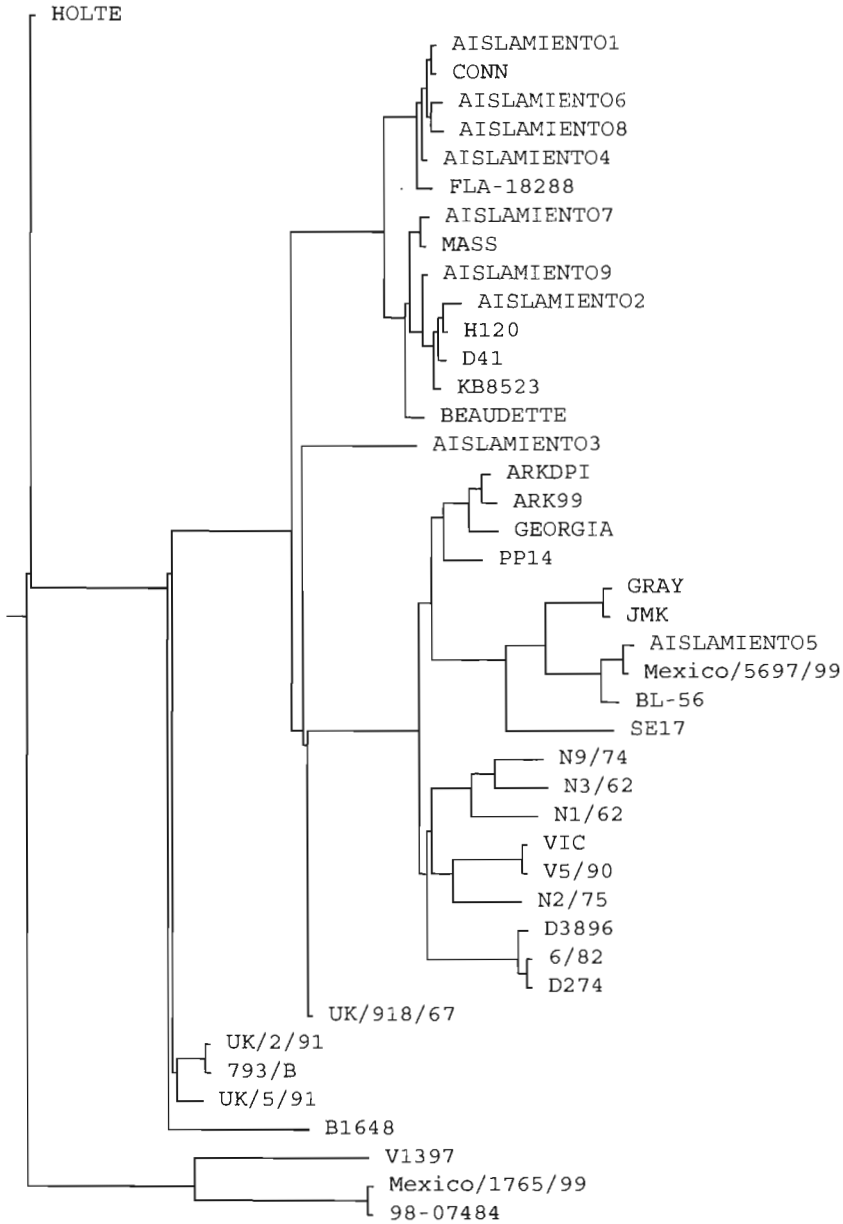


Figura 7. Relaciones filogenéticas de las secuencias de nucleótidos del segmento del gen S1 entre los 9 aislamientos mexicanos y 34 cepas de referencia.

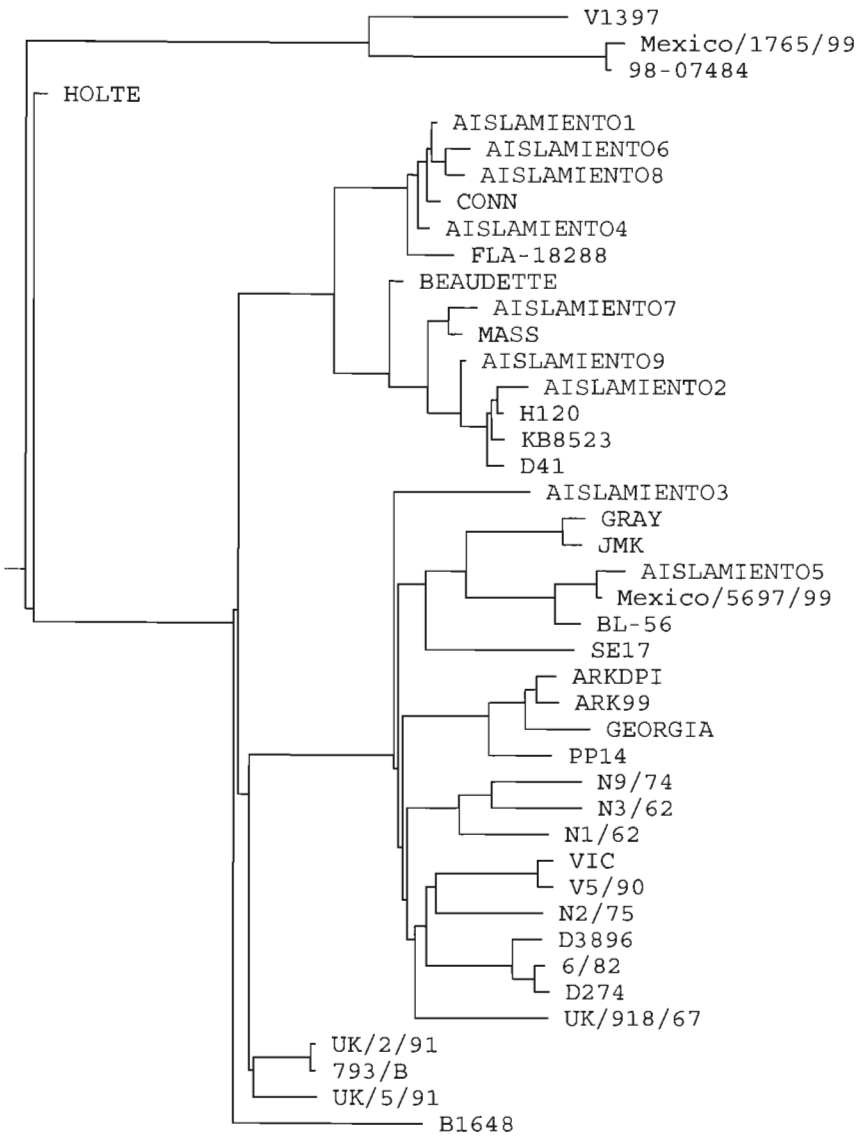


Figura 8. Relaciones filogenéticas en base a las secuencias de aminoácidos del segmento del gen S1 entre los 9 aislamientos mexicanos y 34 cepas de referencia.

El aislamiento 4 no había sido caracterizado previamente por RFLP, es difícil precisar a que grupo corresponde. Además el aislamiento 3 no se agrupó con ninguna secuencia conocida y el aislamiento 5 se encuentra agrupado junto con la secuencia de referencia llamada México/5697/99, con el afán de analizar la identidad y relaciones de los aislamientos 1, 4 y 5 se compararon el % de identidad a nivel de nucleótidos y de aminoácidos con las cepas de referencia Mass 41, Conn, Ark DPI, Fla-18288, BL-56, Holte y UK/5/91. Estos valores se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Porcentajes de identidad y similitud de los aislados mexicanos 3, 4 y 5 con las cepas de referencia Mass 41, Conn, Ark DPI, Fla-18288, Holte, UK/5/91 y BL-56.

%de identidad nucleotídica	% de similitud proteica									
	Aislamiento3	Aislamiento4	Aislamiento5	Mass 41	Conn	Ark DPI	Fla-18288	Holte	UK/5/91	BL-56
	Aislamiento3	71	75	70	70	76	69	72	74	74
	Aislamiento4	74	68	85	97	68	93	67	67	69
	Aislamiento5	80	72	67	67	73	66	67	70	94
	Mass 41	75	92	72	83	67	81	66	68	69
	Conn	73	98	72	91	67	93	67	67	69
	Ark DPI	78	71	77	72	70	66	73	69	73
	Fla-18288	73	96	71	90	96	70	65	66	67
	Holte	77	72	76	72	76	70	64	68	
	UK/5/91	74	74	73	76	73	73	72	70	
	BL-56	79	73	96	73	77	71	74	72	

DISCUSIÓN:

AMPLIFICACION DEL GEN S1

Los fragmentos amplificados del gen S1 del vBI mediante la técnica de RT-PCR de aproximadamente 1720 pb corresponden al tamaño obtenido en trabajos anteriores.^{11, 27, 33} El análisis de secuencia a nivel de nucleótidos del gen S1 del vBI revela regiones altamente conservadas para varios serotipos, dos de estas regiones fueron tomadas para el diseño de los iniciadores en trabajos anteriores.¹⁸ Nuestros ensayos muestran que los iniciadores utilizados (anexo VII) permiten amplificar una amplia variedad de serotipos del vBI.

VARIABILIDAD DEL GEN S1

La diversidad antigénica del vBI le confiere una gran importancia epidemiológica por la aparición de nuevos serotipos que dificultan el control de la enfermedad en fechas recientes; la variabilidad genética que se observa en el gen S1, representa un mecanismo adaptativo del virus a la presión selectiva inmune.¹⁸ Los cambios se deben a la alta tasa de mutación y recombinación que presentan los coronavirus durante la replicación,^{34,35} esto sugiere que la variación antigénica ocurre como resultado de las mutaciones. El análisis comparativo de las secuencias a nivel de nucleótidos de los aislados mexicanos en comparación con la secuencia de referencia Mass 41 muestra una amplia diversidad genética

en cuanto a longitud de las secuencias; los aislamientos 1, 4 y 8 tienen una longitud de 643 bases, los aislamientos 7, 2 y 9 presentan 652 bases y los aislamientos 6, 3 y 5 presentan 640, 673 y 661 bases respectivamente, esta divergencia en la longitud de las secuencias se debe a indeles; además de presentar múltiples mutaciones puntuales que muchas veces se asocian a cambios en la secuencia deducida de aminoácidos de la región hipervariable 1 del gen S1 del vBI datos que concuerdan con los trabajos realizados por Jia W y colaboradores,⁹ Kwon WM y colaboradores,²⁷ Moore KM y colaboradores³⁶ y Wang CH y colaboradores.²⁸

En el alineamiento de las 9 secuencias de nucleótidos de los aislados mexicanos estudiados se detectan 267 sitios polimorficos, de los cuales 231 corresponden a sustituciones de nucleótidos y 46 a indeles.

De igual forma si comparamos las secuencias de aminoácidos de los 9 aislados entre si se detectan 102 sitios polimorficos, de los cuales 95 corresponden a sustituciones de nucleótidos y 11 a indeles. Cabe señalar que de los 267 sitios polimorficos a nivel de nucleótidos y de los 102 sitios polimorficos a nivel de aminoácidos 10 y 4 de ellos respectivamente, presentan tanto indeles como mutaciones puntuales.

Solo la cepa 1 no tuvo una correlación entre secuencia y RFLP, por lo que el patrón de RFLP deberá ser corroborado ya que en trabajos anteriores se encuentra una alta correlación entre serotipo y genotipo²⁸.

Podemos observar en los dendrogramas que los aislados virales forman dos ramas bien diferenciadas. Una corresponde a las cepas con signos clínicos respiratorios, mientras que otra rama agrupa a las cepas nefrotrópicas. En esta última se encuentran las cepas Mexicanas BL56 y UNAM2001-2 (figuras 7 y 8).

El aislamiento 3 presento por RFLP el patrón UNAM 2001-2, el cual es un patrón nuevo,¹¹ este corresponde igualmente con una secuencia de nucleótidos novedosa, alejada de cualquier otra variedad conocida. Esta claro que el aislamiento 3 llamado tentativamente UNAM 2001-2, que fue estudiada por Olivares³⁷ quien encontró al inocular aves, que las lesiones eran como las de los serotipos con un tropismo por aparato urinario, es una variedad restringida a México ya que en la base de datos Gen Bank la secuencia con mayor identidad es la cepa JP8443 de Taiwán, con un 81% de identidad. El control de esta variante del vBI puede requerir la preparación de una nueva vacuna preparada con la cepa de campo.

El aislamiento 4, aunque parece ser una variedad del serotipo Conn por los porcentajes de identidad nucleotídica y de aminoácidos (cuadro 7), también se encuentra muy relacionado al serotipo Florida (figuras 7 y 8) seria necesario efectuar pruebas de antigenicidad para comprobar a que serotipo corresponde. Hay que enfatizar la necesidad de combinar las pruebas de técnicas moleculares con análisis como VN para determinar la verdadera identidad de los aislamientos. Aquí vemos las limitaciones del

análisis molecular, ya que este no puede predecir del todo en que punto cambia el serotipo, de forma que el estudio antigénico es requerido para determinar definitivamente a que serotipo corresponde.

La selección de las vacunas que deben ser usadas para el control de la bronquitis infecciosa en el país, debe de tomar en cuenta el surgimiento de nuevas variedades virales. Así como los laboratorios deben de realizar pruebas con las vacunas autorizadas en México(Conn y Mass) para establecer los niveles de inmunidad con las nuevas variantes,⁴ además de evaluar vacunas experimentales diseñadas específicamente para estas nuevas variantes.

Actualmente en México se encontró evidencia serologica que demuestra la presencia de la cepa 793/B⁵ y que existen variedades como la BL-56, UNAM 97 y la tentativamente llamada UNAM 2001-2, que no han sido reconocidas oficialmente y para las cuales no existen vacunas disponibles.

CONCLUSIONES

La naturaleza de los coronavirus aviares de poseer una gran diversidad antigénica junto con la aparición de múltiples serotipos exige que la determinación rápida y exacta de los serotipos en las cepas de campo sea un factor importante para la prevención y la aplicación de adecuados programas de vacunación.

Parece que el aislamiento 3 clasificado como UNAM 2001-2 es un genotipo único no reportado anteriormente y posiblemente representa un serotipo autóctono de México. El aislamiento 5 corresponde también a una estirpe autóctona previamente descrita como BL-56.

Sin embargo, no se han efectuado estudios de protección cruzada entre estas cepas autóctonas y las vacunas oficiales, ni se han efectuado estudios de seroneutralización entre ellas.

Es importante una vigilancia epidemiológica sistemática en todo el país para conocer la prevalencia de las diferentes variantes y el estudio integral de estas, para determinar la necesidad de desarrollar oportunamente vacunas multivalentes específicas y aplicarlas adecuadamente en las diferentes áreas geográficas de México. Esta estrategia es la que se aplica en los países que están teniendo éxito en el control de la enfermedad de la Bronquitis Infecciosa Aviar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cavanagh D, Naqi AS. Infectious Bronchitis. In: Calnek BW. Diseases of Poultry. México, D.F. ED. Manual moderno. 1997. 101-119
2. Jack Gelb Jr, Brian S Ladman, Bruce F Kingham, Calvin L Keeler. El virus de la bronquitis infecciosa en México, 1998-1999. JCM 200140:96-98.
3. Escorcia M, Petrone VM, Nazario F, Calindo F, Andrade M, Téllez G. Lesiones histológicas en traquea y pulmón ocasionadas por la infección controlada con la cepa variante UNAM-97 de bronquitis infecciosa aviar, aislamiento mexicano. Memorias Convención Anual ANECA; 2000 mayo 3-6; Cancún Quintana Roo. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas; 2000: 85-87
4. J Gelb Jr, BS Ladman, M Tamayo, M González, V Sivanandan. Novel Infectious Bronchitis Virus S1 Genotypes in México 1988-1999. Avian Dis. 2001; 44:3-45
5. Escorcia M, Jackwood MW, Lucio B, Petrone VM, López C, Fehervari T, Téllez G. Characterization of Mexican Strains of Avian Infectious Bronchitis Isolated During 1997. 2000; 44:944-947.
6. Ignjatovic J, Galli L. Immune responses to structural proteins of avian infectious bronchitis virus. Avian Pathology 1995; 24: 313-332.
7. Ignjatovic J, Galli L. The S1 Glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in a vaccinated chickens. Arch Virol 1994; 138: 117-134.
8. Jia W, Mondal SP, Naqi SA. Genetic and Antigenic Diversity in Avian Infectious Bronchitis Virus Isolates of the 1940s. Avian Diseases 2000; 46(2): 437-441.
9. Jia W, Karaca CR, Parrish CR, Naqui SA. A novel variant of infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. Arch Virol 1995; 140: 259-271.
10. Kusters JG, Jager EJ, Niesters HGM, van der Zeijst BAM. Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. Vaccine 1990; 8: 605-608.
11. Huerta LBJ, Merino R, Escorcia M, Téllez IG, Ledesma MN, Alonso MRA. Caracterización molecular de cepas del virus de bronquitis infecciosa aviar. Memorias del 2º Congreso Internacional de Epidemiología; 2001 octubre 4-6; Veracruz (Veracruz) México. 2001: 386- 388.
12. Salem M. Control de Bronquitis Infecciosa; un reto para el futuro. Memorias del 1º Precongreso científico avícola IASA; 2001 abril 25 Puebla (Puebla) Investigación Aplicada S.A., 2001
13. McMartin DA. Infectious Bronchitis. In: Horzinek CM. Virus Infections of Vertebrates. In: Mc Ferran JB, Mc Nulty MS. Virus Infections of Birds. ED. El server Science Publishers. Netherlands, Amsterdam. 1993:249-281.

14. Schalk AF, Hawn MC. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J Am Vet Med Assoc* 1931; 78: 413-422.
15. Beach JR, Schalm OW. A filterable virus, distinct from that of laryngotracheitis, the cause of a respiratory disease in chicks. *Poult Sci* 1936; 15: 199-206.
16. Beaudette FR, Hudson CB. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J Am Vet Med Assoc* 1937; 90: 51-60.
17. Jungherr EL, Chomiak TW, Luginbuhl RE. Immunologic differences in strains of infectious bronchitis. *Proc 60th Annu Meet US Livestock Saint Assoc.* 1956; pp. 203-209.
18. Keeler CL, Reed KL, Nix WA, Gelb J. Serotype Identification of Avian Infectious Bronchitis Virus by RT-PCR of the Peplomer (S1) Gene. *Avian Diseases.* 1998; 42: 275-284.
19. Union Nacional de Avicultores. *Avicultura mexicana: Monografía.* Disponible en: URL:<http://www.una.com.mx/content/indicadores/indi05.htm>
20. OIE. *Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals.* Available from: URL:http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00092.htm
21. Van Roekel MK, Clarke KL, Bullis OM, Olesiuk, Sperling FG. Infectious Bronchitis. *Am J Vet Res* 1951; 12: 140-146.
22. Larski Z. *Virología para Veterinarios.* ED La Prensa Médica Mexicana. México, D.F. 1988:456-459.
23. Boursnell MEG, Brown TDK, Foulds IJ, Green PF, Tomley FM, Binns MM. Completion of the Sequence of the Genome of the Coronavirus Avian Infectious Bronchitis Virus. *J Gen Virol* 1987; 68: 57-77.
24. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. *Veterinary Virology.* ED Academic Press. London NW, Oval Road. 1999:505-508.
25. Fenner F, Bachman PA, Gibbs PJ, Murphy FA, Studdert MJ, White DO. *Virología Veterinaria.* ED Acribia. España, Zaragoza. 1992:523-536.
26. Casais R, Thiel V, Siddell SG, Cavanagh D, Britton P. Reverse Genetic System for the Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus. *Journal of Virology* 2001; 75: 12359-12369.
27. Kwon HM, Jackwood MW, Gelb J. Differentiation of Infectious Bronchitis Virus Serotypes Using Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Avian Diseases* 1993; 37: 194-202.
28. Wang CH, Huang YC. Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of S1 gene of infectious bronchitis virus. *Arch Virol* 2000; 145: 291-300.
29. Parr RL, Collisson EW. Epitopes on the spike protein of a nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus. *Arch Virol* 1993; 133: 369-383.
30. Mohanty BS, Dotta SK. *Virología Veterinaria.* ED. Interamericana. México, D.F. 1983:261-267.

31. Cardoso TC, Mouro-Sousa RL, Stringhini COG, Pinto AA. A Liquid phase blocking ELISA for the detection of antibodies against infectious bronchitis virus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1999; 32: 747-752.
32. Song CS, Lee YJ, Lee CW, Sung HW, Kim JH, Mo IP, Izumiya Y, Jang HK, Mikami T. Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus. *Journal of General Virology* 1998; 79: 719-723.
33. Jackwood MW, Kwon HM, Hilt DA. Infectious Bronchitis Virus Detection in Allantoic Fluid using the Polymerase Chain Reaction and DNA Probe. *Avian Diseases* 1992; 36: 403-409.
34. Drake WJ, Holland JJ. Mutation rates among RNA viruses. *PNAS*. 1999; 96: 13910-13913.
35. Holland J, Spindler K, Horodisky F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. Rapid Evolution of RNA genomes. *Science*. 1982, 215: 1577-85.
36. Moore KM, Jackwood MW, Hilt DA. Identification of amino acids involved in a serotype and neutralization specific epitope within the S1 subunit of avian infectious bronchitis virus. *Arch Virol*. 1997; 142: 2249-2256.
37. Olivares HT. Evaluación de lesiones y respuesta inmunitaria humoral en aves libres de patógenos específicos de 4 semanas por la infección controlada con la cepa variante UNAM 2001-2 del virus de la bronquitis infecciosa. (Tesis de licenciatura en veterinaria). Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Mexico. Noviembre 2003.
38. Boyle JS and Lew AM. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in genetics* 1995; 11: 1-8

ANEXOS

ANEXO I

EXTRACCIÓN DE ARN DEL vBI.

Después de inocular embriones de pollo libres de patógenos específicos (ALPES) con los nueve aislamientos se obtuvo líquido alantoideo infectante, a partir de 500µl homogeneizados con 1000µl de Trizol (solución comercial monofásica de isotiosinato de guanidina y fenol) (GIBCO BRL). Se incubó durante 5min. a 4°C. Se adicionaron 200µl de Cloroformo 100% frío. Se agitó vigorosamente en vortex durante 15 segundos y se incubó 5 min. a 4°C. Se procedió a centrifugar a 12,500 rpm por 15 min. a 4°C. La fase acuosa se recuperó y se mezcló con un volumen de Isopropanol 100% frío. Las muestras se incubaron a -20°C durante una hora y posteriormente se centrifugaron a 12,500 rpm por 10 min. a 4°C para obtener la pastilla de ARN. Los tubos se decantaron para eliminar los restos de Isopropanol y la pastilla fue lavada con 1000µl etanol al 70%-H₂O DEPC. Se centrifugó por 5 minutos a 12,500 rpm a 4°C. Se decantó todo el etanol y la pastilla se secó por centrifugación al vacío. La pastilla se resuspendió en 50µl de H₂O DEPC. El ARN se conservó a -70°C hasta su posterior utilización.

ANEXO II

CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ARN TOTAL

Se tomó una muestra de 2µl de ARN total de cada una de las nueve muestras y se realizó una dilución 1:100 con H₂O DEPC. Se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro.

La cantidad total de ARN recuperada se calculo con la siguiente formula:

$$\text{ARN total } \mu\text{l/ml} = (A_{260 \text{ nm}})(40)(\text{FD})$$

A₂₆₀= Absorbancia 260 nm

40= Factor de conversión

FD= Factor de dilución=100

Cociente A₂₆₀/A₂₈₀ = Cociente entre las lecturas del espectrofotómetro a 260 y 280 nm. Este valor da una estimación de la pureza del ARN, considerándose preparaciones adecuadas las que presentan una relación 260/280 entre 1.9-2.0.

ANEXO III

AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR DEL GEN S1 DEL vBI.

Para obtener el cDNA del gen S1 del vBI se realizó una RT-PCR (Reverso Transcriptasa Reacción en Cadena de la Polimerasa) en un termociclador Perkin Elmer (GENE AMP, PCR System 2400) a partir de ARN total de los nueve aislamientos obtenidos con las siguientes condiciones del cuadro 8.

Cuadro 8. Protocolo RT-PCR DEL GEN S1 DEL vBI.

Reactivo	[Stock]	[Final]
ARN	-	5 µl
dNTP's	10 mM	0.5 mM
Iniciador JK2	250ng/µl	2 µl
Agua	-	Cpb 20 µl

- Primer Ciclo: ARN 5 µg, dNTP's 0.5 mM (BIOTECSA), Iniciador JK2 500ng, H₂O DEPC cbp 20µl. Se incubó 65°C/5 min y 4°C/5 min

Reactivo	[Stock]	[Final]
Amortiguador	5x	1x
DTT	0.1M	0.005M
RNA out	20 U/µl	20 U

- Segundo Ciclo: Amortiguador Comercial (GIBCO BRL) 1x, Dtt .005 M (GIBCO BRL), RNAsin (GIBCO BRL) 20 U. Se incubó 42°C/2 min. y 4°C/5 min.

Reactivo	[Stock]	[Final]
RT	200 U/µl	1 µl

- Tercer Ciclo: 1 µl de SuperScript II Reverso Transcriptasa (GIBCO BRL) 200 U/µl. Se incubó 42°C/50 min - 70°C/15 min.

PCR DEL GEN S1 DEL vBI.

La amplificación del gen S1 del vBI se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del cDNA obtenido, en un termociclador Techne (Techgene) se obtuvo un fragmento de 1.7 Kb correspondiente al gen S1 de la cápside viral.

Con el protocolo del cuadro 9.

Cuadro 9. Protocolo PCR DEL GEN S1 DEL vBI.

Reactivo	[Stock]	[Final]
cADN	50 ng / µl	100 ng
Iniciadores S1XbaF y S1pichiaR	10 µM	0.2 µM
dNTP's	2 mM	0.2 mM
Amortiguador D	10x	1x
BSA	3 mg / ml	0.15 mg / ml
Tritón	2 %	0.1 %
Taq. Polimerasa	5 U/ µl	1 µl
Agua	—	62 µl

- cDNA (2µl), Iniciadores S1XbaF y S1pichiaR 0.2 µM(Anexo III), Buffer D 1x (BIOTECSA), BSA 0.15 mg/ml, Tritón 0.1%, dNTP's (BIOTECSA) 0.2mM, Taq Polimerasa (BIOTECSA) 5U, H₂O cbp 100µl.
- Las condiciones de la reacción fueron: 1 ciclo 94°C/ 3 min. 30 ciclos 94°C/30 seg., 60°C/30 seg, 72°C/2 min 1 ciclo 72°C/3 min

Una vez realizada la PCR, se tomaron 5 μ l de la reacción y se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% TAE 1X aplicando un voltaje de 80 V durante 50 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio (5 μ g/ml) y fue visualizado en un fotodocumentador White UV Transilluminator (Modelo GDS7500 UVP Upland, CA) con luz ultravioleta para obtener un registro fotográfico.

ANEXO IV

PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DEL GEN S1 DEL vBI A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

El producto de amplificación del cDNA del gen S1 del vBI se purificó a partir de un gel de agarosa mediante ioduro de sodio (NaI) y perlas de sílica.³⁸ La técnica está basada en una matriz de sílica con capacidad de unión a DNA. Fue recortada la banda y estimado el peso del gel, al tarar el tubo eppendorf de 1.5 ml que lo contiene y fueron adicionados tres volúmenes de NaI. Se incubaron a 55°C durante 5 a 10 min. , hasta disolverse la agarosa. Posteriormente se adicionaron y homogeneizaron en vortex 12 µl de la suspensión de sílica e incubados en hielo de 30-60 min. Al termino de este tiempo se centrifugaron a 12,000 rpm. por 4 min. a 4°C. Se añadieron y homogeneizaron a la pastilla 250 µl de Amortiguador de Lavado. Se centrifugó a 12,000 rpm por 3 min. Este lavado se realizó por 2 veces. Se decanto el Amortiguador de lavado y se seco la pastilla por incubación a 55°C. La pastilla se resuspendió en 25 µl de H₂O dd estéril. Se incubo durante 5 min. a 55°C. Se centrifugo a 12,000 rpm por 4 min. y se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio. Por ultimo se verificó la calidad del producto por electrofóresis en geles de agar al 1% y se cuantificó su concentración por fluorometría. Del producto de purificación se ligaron 10ng en 100 ng del vector pUC19/*Sma*I mediante T4 DNA Ligasa (New England BIOLABS®) durante 16 hrs. a 4 °C.

ANEXO V

CLONACIÓN DEL GEN S1 vBI EN pUC 19/Sma I TA.

El ADN purificado se clonó para su preservación y secuenciación, el vector de clonación utilizado fue pUC 19 digerido con *Sma I* y modificado con adición de Timidinas en los extremos 3'. El producto de PCR del gen S1 del vBI requiere una extensión final de 15 minutos a 72°C para adicionarle un extremo de Adenina y así hacerlo complementario al vector.

El protocolo de ligación se describe en el cuadro 10.

Cuadro 10. Protocolo CLONACION DEL GEN S1 DEL vBI EN VECTOR T.

MEZCLA DE REACCION	STOCK	FINAL
pUC19/SmaI/TA	[50 ng / µl]	100 ng
Inserto S1	[10 ng / µl]	30 ng
Amortiguador de ligación	[10 X]	1 X
Enzima T4 DNA ligasa	[1 U / µl]	1 U / rx
PEG	40%	2.50%
H ₂ O cbp		20 µl

TRANSFORMACION BACTERIANA

Para recuperar en *E. coli* los plásmidos recombinantes se utilizaron 100µl de células competentes DH10b las cuales fueron adicionadas con 30 ng de pUC19/*Sma I* del producto de ligación en incubando 30 min. a 4 °C.

Posteriormente fueron adicionados 900 µl de medio Luria e incubados 1h / 37°C. Del producto de la transformación 500µl fueron espatulados en placas LB agar, Ampicilina (100 µg/ml), X-gal (266 µg/ml), IPTG (266 µg/ml).

Fueron incubadas 12-16 hrs a 37°C. Fue verificado el crecimiento bacteriano y se obtuvieron las colonias blancas como posibles recombinantes; transfiriéndolas a placas LB agar con Ampicilina (100 µg/ml). Parte de estas colonias fueron desnaturalizadas a 90°C/ 10 min. en 50µl de H₂O dd para obtener el DNA y verificarlas mediante PCR, con los iniciadores M13F y M13R(Anexo III). Cuando se han comprobado las clonas recombinantes estas fueron preservadas en LB Ampicilina (100 µg/ml), glicerol 16% a -70°C.

MINIPREPARACION DE ADN DE PLASMIDO*

A partir de las colonias fue obtenida una mayor cantidad de DNA plasmídico recombinante de acuerdo al método descrito por Silhavy T.J. y colaboradores, para realizar la secuenciación del gen que codifica para la glicoproteína S1 del vBI.

Fue cultivada la cepa en 6 ml de LB-Ampicilina (100µg/ml) durante toda la noche a 37°C en agitación constante. Al día siguiente fueron utilizados 3 ml de la cepa centrifugados a 3,500 rpm. / 6 min. El producto fue decantado a la pastilla adicionados 200 µl de solución de lisis(8% de Sacarosa, 5% Tritón X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8), resuspendida con vortex e incubada 10 min. / TA, y fue adicionando 1.25µg/ml final de Lisozima e

**Silhavy T.J., Berman M.L. and Enquist L.W. 1984: Experiments with gene fusion. Cold Spring Harbor Laboratory.*

incubado 10min/TA; fue hervido en baño de agua por 1 min y centrifugado 10 min. / 12,000 rpm. Fue recuperado el sobrenadante y el DNA fue tratado con RNAsa (15 µg / ml final) e incubado 30 min. , fue agregada Proteinasa K. (50 µg / ml final) e incubado a 50°C por 30 minutos; adicionados 2 volúmenes de etanol absoluto frío e incubados 30 min. a -70 °C ó 2 horas a -20 °C; centrifugado 10 min. / 14,000 rpm., fue decantada y lavada 2 veces la pastilla con etanol al 70% (5min/10,000 rpm.). Fue secada la pastilla y resuspendida en 50 µl de agua destilada estéril. Fue realizada una electroforesis en un gel de agarosa al 1% con 5 µl y guardado el DNA restante a -20°C.

ANEXO VI

PCR PARA SECUENCIACION DEL GEN S1 DEL vBI.

Purificado y clonado el gen que codifica para la glicoproteína S1 del vBI, la estrategia de secuenciación consistió en utilizar los oligonucleótidos S1pichiaF y en reversa el WB(Anexo III). Con el protocolo del cuadro 11.

La reacción de secuencia se realizó mediante el ensayo comercial Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems). Contiene nucleótidos finalizadores marcados con los siguientes aceptadores de dRhodamina: Adenina dR6G (verde), Citosina dROX (rojo), Guanina dR110 (azul), Timina dTAMRA (negro).

- El protocolo de la reacción de secuencia fue el siguiente: Mezcla de reacción Big Dye™ 4µl, DNA de Plásmido recombinante 150 ng, Iniciador (Se utilizaron JK2 y WB) 2 pmol, H₂O cbp 20 µl
- Las condiciones de la reacción fueron 96°C/10 seg, 50°C/5 seg, 60°C/4 min. por 30 ciclos.

Cuadro 11. Protocolo PCR PARA SECUENCIACION DEL GEN S1 DEL vBI.

Reactivo	[Stock]	[Final]
Plásmido		150 ng / rx
Iniciador	2 pM / µl	1 µl
Amortiguador		4 µl
Agua		Cpb 20 µl

ANEXO VII

INICIADORES

La secuencia del iniciador JK2 fue obtenido del trabajo de Gelb y colaboradores, los iniciadores S1pichiaF, S1XbaF y WB fueron diseñados sobre la base de la secuencia del gen S1 del vBI.

Secuencia de los Oligonucleotidos utilizados.

JK2	5'-ATTTTCAGTAAYAGAACGTCTA-3'
S1XbaF	5'- GCTCTAGAATGTTGGTRAMRYCWCT-3'
S1pichiaR	5'-GCTCTAGACGTCTARAACGAYGTGTTG -3'
WB	5'- CATGCTAACAAARCCTCTAGGTG -3'

SECUENCIA DE LOS INICIADORES M13

M13 F	5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'
M13R	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'

ANEXO VIII

Alineamiento de las 9 secuencias generadas junto con las 34 secuencias de referencia, las áreas sombreadas indican el mayor grado de no identidad.

HOLTE	1	tt	tagtgac	ttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
AISLAMIENTO1	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgct	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
CONN	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgct	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
AISLAMIENTO6	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgct	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
AISLAMIENTO8	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgct	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
AISLAMIENTO4	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgct	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
FLA-18288	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgct	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
AISLAMIENTO7	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgct	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
MASS	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgct	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
AISLAMIENTO9	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgct	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
AISLAMIENTO2	1	tta	tagtg	ct	cttt	gt	cacta	agt	tgct	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta
H120	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgct	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
D41	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgct	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
KB8523	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgct	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
BEAUDETTE	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgct	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
AISLAMIENTO3	1	tt	tagtg	ct	cttt	gt	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
ARKDPI	1	tt	tagtgac	ct	cttt	gt	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctct		
ARK99	1	tt	tagtgac	ct	cttt	gt	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctct		
GEORGIA	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctct		
PP14	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
GRAY	1	tt	tagtgac	ct	cttt	gt	cacta	gtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta	
JMK	1	tt	tagtgac	ct	cttt	gt	cacta	gtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta	
AISLAMIENTOS	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
Mexico/5697/															
BL-56	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
SE17	1	tt	tagtgac	ct	cttt	gt	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
N9/74	1	tt	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
N3/62	1	tt	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
N1/62	1	tt	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
VIC	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
V5/90	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
N2/75	1	tt	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
D3896	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
6/82	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
D274	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
UK/918/67	1	tt	tagtgac	ct	cttt	gt	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
UK/2/91	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
793/B	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
UK/5/91	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
B1648	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
V1397	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
Mexico/1765/															
98-07484	1	tta	tagtgact	cttt	gt	tg	cactatgtagtgcta	ttt	gatga	aa	ta	tt	ctcta		
HOLTE	60	gt	tactacta	ca	aagtc	tt	cag	cc	tt	gggtggca	tt	catg	gggggtgc		
AISLAMIENTO1	60	cgt	tactacta	ca	aagtc	ctt	agaccac	ctt	atgggtggc	atttaca	gggggtgc				
CONN	60	cgt	tactacta	ca	aagtc	ctt	agaccac	ctt	atgggtggc	atttaca	gggggtgc				
AISLAMIENTO6	60	cgt	tactacta	ca	aagtc	ctt	agaccac	ctt	atgggtggc	atttaca	gggggtgc				
AISLAMIENTO8	60	cgt	tactacta	ca	aagtc	ctt	agaccac	ctt	atgggtggc	atttaca	gggggtgc				

Figura 9. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del segmento del gen S1 entre los 9 aislamientos mexicanos y 34 cepas de referencia.

JMK	120	ttat	agtagt	taatgt	ttct	gaat	taataat	gc	----	g	c	---
AIISLAMIENTO5	117	ttat	agtagt	taatgt	ttct	gaat	taataat	gc	----	g	c	---
Mexico/5697/	12	ttat	agtagt	taatgt	ttct	gaat	taataat	gc	----	g	c	---
BL-56	117	ttat	agtagt	taatgt	ttct	gaat	taataat	gc	----	g	c	---
SE17	120	ttat	agtagt	taatgt	ttct	gaat	taataat	gc	----	g	c	---
N9/74	120	ttat	gcagtagt	taata	ttct	gaat	taataat	gcag	----	g	c	---
N3/62	120	ttat	gcagtagt	taata	ttct	gaat	taataat	gcag	----	g	c	---
N1/62	120	ttat	gcagtagt	taata	ttct	gaat	taataat	gcag	----	g	c	---
VIC	120	ttat	gcagtagt	taata	ttct	gaat	taataat	gcag	----	g	c	---
V5/90	120	ttat	gcagtagt	taata	ttct	gaat	taataat	gcag	----	g	c	---
N2/75	120	ttat	gcagtagt	taata	ttct	gaat	taataat	gcag	----	g	c	---
D3896	120	ttat	gcagtagt	taata	ttct	gaat	taataat	gcag	----	g	c	---
6/82	120	ttat	gcagtagt	taata	ttct	gaat	taataat	gcag	----	g	c	---
D274	120	ttat	gcagtagt	taata	ttct	gaat	taataat	gcag	----	g	c	---
UK/918/67	120	ttat	gcagtagt	taata	ttct	gaat	taataat	gcag	----	g	c	---
UK/2/91	120	ttat	gcagtagt	taata	ttct	gaat	taataat	gcag	----	g	c	---
793/B	120	ttat	gcagtagt	taata	ttct	gaat	taataat	gcag	----	g	c	---
UK/5/91	120	ttat	gcagtagt	taata	ttct	gaat	taataat	gcag	----	g	c	---
B1648	117	ttat	agtagt	taatgt	ttct	gaat	taataat	gc	----	g	c	---
V1397	117	ttat	agtagt	taatgt	ttct	gaat	taataat	gc	----	g	c	---
Mexico/1765/	1	ttat	agtagt	taatgt	ttct	gaat	taataat	gc	----	g	c	---
98-07484	117	ttat	agtagt	taatgt	ttct	gaat	taataat	gc	----	g	c	---
HOLTE	174	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
AIISLAMIENTO1	163	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
CONN	160	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
AIISLAMIENTO6	160	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
AIISLAMIENTO8	163	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
AIISLAMIENTO4	163	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
FLA-18288	157	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
AIISLAMIENTO7	171	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
MASS	171	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
AIISLAMIENTO9	171	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
AIISLAMIENTO2	171	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
H120	171	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
D41	171	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
KB8523	171	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
BEAUDETTE	171	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
AIISLAMIENTO3	171	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
ARKDPI	172	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
ARK99	172	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
GEORGIA	172	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
PP14	172	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
GRAY	174	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
JMK	174	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
AIISLAMIENTO5	165	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
Mexico/5697/	60	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
BL-56	165	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
SE17	171	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
N9/74	175	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
N3/62	175	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
N1/62	175	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
VIC	175	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
V5/90	175	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
N2/75	175	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
D3896	168	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
6/82	168	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
D274	168	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
UK/918/67	171	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat
UK/2/91	171	ttat	gtagt	ctggt	ctatt	ttg	agtaa	aat	tt	tgct	cttct	gttagctat

Figura 9. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del segmento del gen S1 entre los 9 aislamientos mexicanos y 34 cepas de referencia.

AISLAMIENTO9	291	ttttcagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
AISLAMIENTO2	291	ttttcagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
H120	291	ttttcagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
D41	291	ttttcagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
KB8523	291	ttttcagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
BEAUDETTE	291	ttttcagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
AISLAMIENTO3	291	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
ARKDPI	291	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
ARK99	291	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
GEORGIA	291	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
PP14	291	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
GRAY	291	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
JMK	291	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
AISLAMIENTO5	282	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
Mexico/5697/	177	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
BL-56	282	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
SE17	291	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
N9/74	291	ttttcagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
N3/62	291	ttttcagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
N1/62	291	ttttcagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
VIC	291	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
V5/90	291	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
N2/75	291	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
D3896	288	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
6/82	288	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
D274	288	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
UK/918/67	291	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
UK/2/91	291	ttttcagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
793/B	291	ttttcagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
UK/5/91	291	ttttcagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
B1648	288	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
V1397	276	ttttcagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
Mexico/1765/	156	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
98-07484	276	ttttacagat	tacagtgtttgttacacattgttataa	aa	ga	gt	gt	gtgcc
HOLTE	345	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
AISLAMIENTO1	336	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
CONN	333	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
AISLAMIENTO6	333	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
AISLAMIENTO8	336	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
AISLAMIENTO4	336	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
FLA-18288	330	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
AISLAMIENTO7	345	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
MASS	345	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
AISLAMIENTO9	345	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
AISLAMIENTO2	345	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
H120	345	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
D41	345	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
KB8523	345	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
BEAUDETTE	345	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
AISLAMIENTO3	351	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
ARKDPI	351	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
ARK99	351	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
GEORGIA	351	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
PP14	351	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
GRAY	351	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
JMK	351	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
AISLAMIENTO5	342	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
Mexico/5697/	237	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	
BL-56	342	tttaacaggt	tattcc-----acag	att	tat	cgt	ttctcgtatgaaaaa---	

Figura 9. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del segmento del gen S1 entre los 9 aislamientos mexicanos y 34 cepas de referencia.

Figura 9. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del segmento del gen S1 entre los

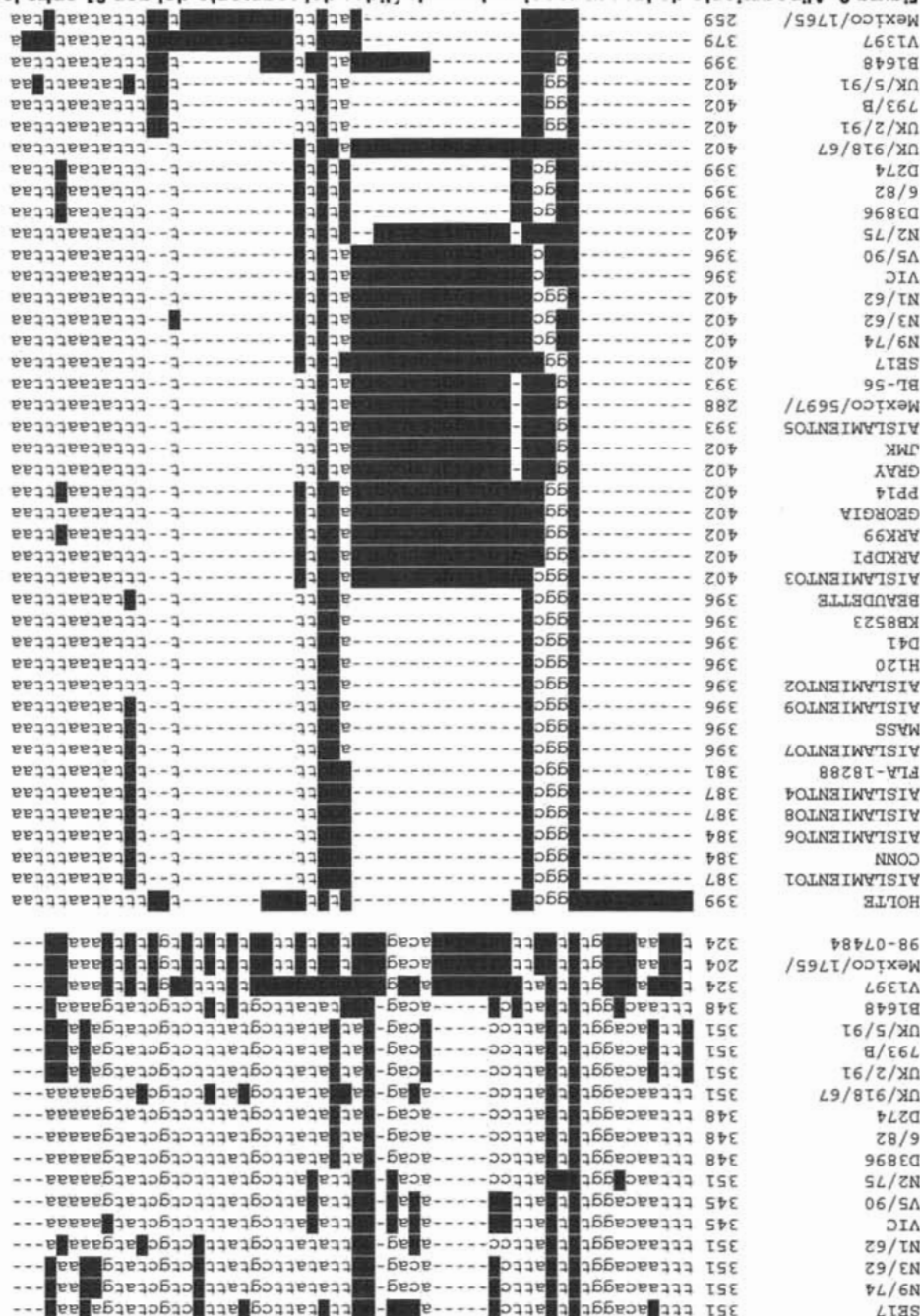


Figura 9. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del segmento del gen S1 entre los 9 aislamientos mexicanos y 34 cepas de referencia.

Figura 9. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del segmento del gen 5' entre los 9 aislamientos mexicanos y 34 cepas de referencia.

497	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	ATSLMIEN03
497	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	ARKKPI
497	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	ARK99
497	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	GEORGIA
497	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	PP14
497	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	GRAY
494	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	JMK
485	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	ATSLMIEN05
380	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	Mexico/5697/
485	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	BL-56
485	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	SE17
497	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	N9/74
497	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	N3/62
497	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	N1/62
497	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	VIC
491	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	V5/90
488	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	N2/75
488	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	D3896
479	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	6/82
479	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	D274
497	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	UK/918/67
482	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	UK/2/91
482	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	793/B
482	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	UK/5/91
488	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	B1648
470	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	V1397
350	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	Mexico/1765/
470	catcgtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	98-07484
554	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	HOLTE
527	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	ATSLMIEN01
524	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	CONN
524	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	ATSLMIEN06
527	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	ATSLMIEN08
527	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	ATSLMIEN04
527	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	FLA-18288
521	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	ATSLMIEN07
536	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	MASS
536	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	ATSLMIEN09
536	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	ATSLMIEN02
536	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	H120
536	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	D41
536	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	KB8523
536	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	BEAUBETTE
557	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	ATSLMIEN03
557	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	ARKKPI
557	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	ARK99
557	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	GEORGIA
557	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	PP14
557	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	GRAY
554	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	JMK
554	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	ATSLMIEN05
440	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	Mexico/5697/
545	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	BL-56
557	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	SE17
557	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	N9/74
557	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	N3/62
557	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	N1/62
551	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	VIC
551	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	V5/90
548	cgcagggtcatatcaaatggtgactcgtgttcaac	N2/75

669	-----	COLLE
669	-----	ALISLAMIEN101
642	-----	CONN
639	-----	ALISLAMIEN106
639	-----	ALISLAMIEN108

79

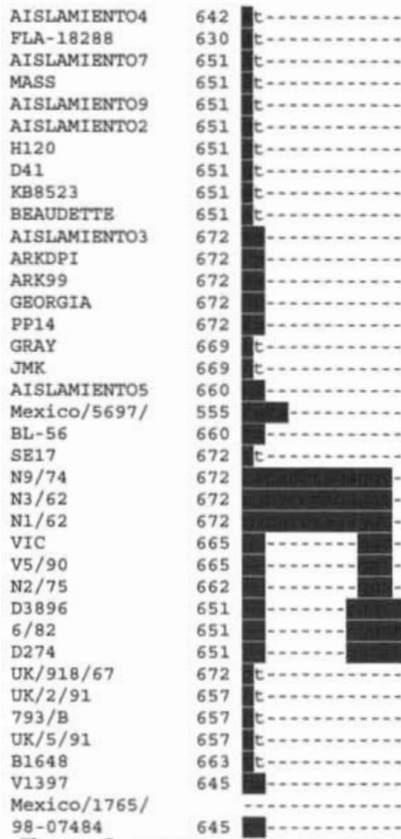


Figura 9. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del segmento del gen S1 entre los 9 aislamientos mexicanos y 34 cepas de referencia.

ANEXO IX

Alineamiento de las nueve secuencias generadas a nivel de aminoácidos junto con las 34 secuencias de referencia, las zonas sombreadas indican el mayor grado de no similitud proteica.

V1397	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
Mexico/1765/	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
98-07484	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
HOLTE	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
AISLAMIENTO1	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
AISLAMIENTO6	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
AISLAMIENTO8	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
CONN	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
AISLAMIENTO4	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
FLA-18288	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
BEAUDETTE	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
AISLAMIENTO7	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
MASS	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
AISLAMIENTO9	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
AISLAMIENTO2	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
H120	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
KB8523	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
D41	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
AISLAMIENTO3	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
GRAY	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
JMK	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
AISLAMIENTO5	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
Mexico/5697/	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
BL-56	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
SE17	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
ARKDPI	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
ARK99	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
GEORGIA	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
PP14	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
N9/74	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
N3/62	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
N1/62	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
VIC	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
V5/90	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
N2/75	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
D3896	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
6/82	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
D274	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
UK/918/67	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
UK/2/91	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
793/B	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
UK/5/91	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act
B1648	1	llvtllal	lydn	syvyyqsafrp	gwhlhggayavvn	seinnag	act

V1397	57	gll	ssv	mtap	gmsws	qfctahcnfsd	tfvthcyk	cp	tg
Mexico/1765/	17	gll	ssv	mtap	gmsws	qfctahcnfsd	tfvthcyk	cp	tg
98-07484	57	gll	ssv	mtap	gmsws	qfctahcnfsd	tfvthcyk	cp	tg
HOLTE	61	gll	ssv	mtap	gmsws	qfctahcnfsd	tfvthcyk	cp	tg
AISLAMIENTO1	58	gll	ssv	mtap	gmsws	qfctahcnfsd	tfvthcyk	cp	tg
AISLAMIENTO6	57	gll	ssv	mtap	gmsws	qfctahcnfsd	tfvthcyk	cp	tg
AISLAMIENTO8	58	gll	ssv	mtap	gmsws	qfctahcnfsd	tfvthcyk	cp	tg
CONN	57	gll	ssv	mtap	gmsws	qfctahcnfsd	tfvthcyk	cp	tg

GEORGIA	121	lipgirisamk- - - - - g l f n l t - s v t - k y p f - f s l q c v n n t s v y l n g d l v f t s
PP14	121	lipgirisamk- - - - - g l f n l t v s v t - k y p f - f s l q c v n n t s v y l n g d l v f t s
N9/74	121	lipgirisamk- - - - - g l f n l t v - v t - k y p f - f s l q c v n n t s v y l n g d l v f t s
N3/62	121	lipgirisamk- - - - - g l f n l t v - v t - k y p f - f s l q c v n n t s v y l n g d l v f t s
N1/62	121	lipgirisamk- - - - - g l f n l t v - v t - k y p f - f s l q c v n n t s v y l n g d l v f t s
VIC	119	lipgirisamk- - - - - g l f n l t v - v t - k y p f - f s l q c v n n t s v y l n g d l v f t s
V5/90	119	lipgirisamk- - - - - g l f n l t v - v t - k y p f - f s l q c v n n t s v y l n g d l v f t s
N2/75	121	lipgirisamk- - - - - g l f n l t v - v t - k y p f - f s l q c v n n t s v y l n g d l v f t s
D3896	120	lipgirisamk- - - - - g l f n l t v - v t - k y p f k s l q c v n n t s v y l n g d l v f t s
6/82	120	lipgirisamk- - - - - g l f n l t v - v t - k y p f k s l q c v n n t s v y l n g d l v f t s
D274	120	lipgirisamk- - - - - g l f n l t v - v t - k y p f k s l q c v n n t s v y l n g d l v f t s
UK/918/67	121	lipgirisamk- - - - - g l f n l t v s v t - k y p f - f s l q c v n n t s v y l n g d l v f t s
UK/2/91	121	lipgirisamk- - - - - g l f n l t v s v t - k y p f k s l q c v n n t s v y l n g d l v f t s
793/B	121	lipgirisamk- - - - - g l f n l t v s v t - k y p f k s l q c v n n t s v y l n g d l v f t s
UK/5/91	121	lipgirisamk- - - - - g l f n l t v s v t - k y p f k s l q c v n n t s v y l n g d l v f t s
B1648	120	lipgirisamk- - - - - g l f n l t - t - k y p f - f s l q c v n n t s v y l n g d l v f t s
V1397	170	netdvgagvyk - - - - - m - - - - - l a y f v n g t a - d v i l c d - - - -
Mexico/1765/	130	netdvgagvyk - - - - - m - - - - - l a y f v n g t a - d v i l c d - - - -
98-07484	170	netdvgagvyk - - - - - m - - - - - l a y f n g t a - d v i l c d - - - -
HOLTE	178	netdvgagvyfkaggpitykvmr - - - - - k l a y f v n g t a - d v i l c d g - - - -
AISLAMIENTO1	169	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
AISLAMIENTO6	168	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
AISLAMIENTO8	169	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
CONN	168	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
AISLAMIENTO4	169	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
FLA-18288	167	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
BEAUDETTE	172	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
AISLAMIENTO7	172	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
MASS	172	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
AISLAMIENTO9	172	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
AISLAMIENTO2	172	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
H120	172	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
KB8523	172	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
D41	172	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
AISLAMIENTO3	179	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
GRAY	178	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
JMK	178	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
AISLAMIENTO5	175	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
Mexico/5697/	140	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
BL-56	175	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
SE17	179	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
ARKDPI	179	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
ARK99	179	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
GEORGIA	179	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
PP14	179	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
N9/74	179	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
N3/62	179	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
N1/62	179	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
VIC	177	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
V5/90	177	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
N2/75	176	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
D3896	173	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
6/82	173	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
D274	173	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
UK/918/67	179	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
UK/2/91	174	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
793/B	174	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
UK/5/91	174	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -
B1648	176	netdvgagvyfkaggpitykvmrevkalayfvngtaqdvilcdg - - - -

Figura 10. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del segmento del gen S1 entre los 9 aislamientos mexicanos y 34 cepas de referencia.