

Universidad Nacional Autónoma de México

Doctorado en Ciencias de la Salud y de la Producción Animal

**Caracterización molecular y de patogenicidad de los virus de
anemia infecciosa aislados en México**

Tesis

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias de la Producción y Salud Animal

Presenta:

Nestor Ledesma Martínez

Tutor: Dr. Rogelio Alonso Morales

**Comité Tutorial: Dr. Álvaro Aguilar Setien
Dr. Juan Antonio Montaña Hirose**

México DF

2006



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.

DEDICATORIA

A mis hijos Karen y Nestor

A mi esposa Elizabeth

A mis padres Emma y Nestor †

A mis hermanos Bety Edith y Edgar

A mi maestra Teresa Casaubon

Sigo siendo malo para las dedicatorias
.....pero ustedes saben bien lo que hay en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

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

Al Departamento de Producción Animal: Aves.

A mis maestros Dra. Teresa Casaubon, Dr Tamas Fehervari y Dr José Antonio Quintana por su amistad, paciencia y sabios consejos.

Al Dr Rogelio Alonso, por creer en mí y darme una oportunidad

A los miembros del comité tutorial, Dr Alejandro de la Peña M, Dr Juan Antonio Montaña H., Dr Luis Padilla Noriega, Dr, Alvaro Aguilar S, Dr Alfredo Sahagún por sus valiosas aportaciones y sugerencias.

A los Doctores Carlos López Coello, Luz María Charles, Odette Urquiza, Gary García, Reynaldo Moreno.

Al personal del Departamento de Aves por su amistad y compañerismo.

A la Biol. Amanda Gayoso del Departamento de Genética y Bioestadística.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) al haberme aceptado en el programa de becas-crédito CONCYT para estudios de Posgrado con número de registro 111809.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica PAPIIT IN204901.

INDICE

Declaración	I
Dedicatorias	II
Agradecimientos	III
Índice	IV
Índice de tablas	V
Índice de figuras	VI
Abreviaturas	VIII
Resumen	IX
Abstract	X
Introducción	1
Justificación	5
Objetivo general	6
Objetivos particulares	6
Metas	6
Hipótesis	6
Material y métodos	7
Resultados	11
Discusión	13
Conclusiones	16
Literatura citada	17

Índice de Tablas

Tabla 1. Características de los casos positivos a anemia infecciosa del pollo	22
Tabla 2. Patrones de restricción para el fragmento de 675 pb del virus de anemia infecciosa correspondiente a la VP1 con las enzimas <i>HaeIII</i> , <i>HinfI</i> y <i>HpaII</i>	23
Tabla 3. Distribución de aislamientos por grupo mediante las enzimas <i>HaeIII</i> , <i>HinfI</i> y <i>HpaII</i>	23
Tabla 4. Comparación de peso, hematocrito, ancho del timo y ancho de corteza tímica de pollos libres de patógenos específicos de 14 días, inoculados con tres virus de anemia infecciosa	24

Índice de figuras

Figura 1 Microfotografía de Cultivos MDCC-MSB1	25
Figura 2. Casos positivos a virus de anemia infecciosa. Gel de agarosa 1%.	26
Figura 3. Sitios de corte y fragmentos generados por la enzima <i>HaeIII</i> sobre el fragmento de 675 pares de bases del gen VP1 del virus de anemia infecciosa del pollo.	27
Figura 4. Sitios de corte y fragmentos generados por la enzima <i>HinfI</i> sobre el fragmento de 675 pares de bases del gen VP1 del virus de anemia infecciosa del pollo.	28
Figura 5. Sitios de corte y fragmentos generados por la enzima <i>HpaII</i> sobre el fragmento de 675 pares de bases del gen VP1 del virus de anemia infecciosa del pollo.	29
Figura 6. Patrones de restricción para el gen VP1 del virus de anemia infecciosa con la enzima <i>HaeIII</i> .	30
Figura 7. Patrones de restricción para el gen VP1 del virus de anemia infecciosa con la enzima <i>HinfI</i> .	30
Figura 8. Patrones de restricción para el gen VP1 del virus de anemia infecciosa con la enzima <i>HpaII</i> .	31
Figura 9 Filogenia de 12 aislados mexicanos del virus de anemia infecciosa del pollo tomando en cuenta la secuencia de un fragmento de 675 pares de bases correspondiente a las posiciones 844 a 1519 del genoma del virus Cux-1.	32
Figura 10. Filogenia de 12 aislados mexicanos del virus de anemia infecciosa del pollo tomando en cuenta la secuencia de aminoácidos de un fragmento de 675 pares de bases correspondiente a las posiciones 844 a 1519 del genoma del virus Cux-1.	33
Figura 11. Filogenia de 33 aislados del virus de anemia infecciosa tomando en cuenta la secuencia de bases a partir de un fragmento de 675 pares de bases correspondiente a las posiciones 844 a 1519 del genoma del virus Cux-1	34
Figura 12. Alineamiento de bases de un fragmento de 675 pb del gen VP1 de 12 aislados mexicanos del virus de anemia infecciosa del pollo	35
Figura 13 alineamiento de aminoácidos de un fragmento de 675 pb del gen	38

VP1 de 12 aislamientos mexicanos del virus de anemia infecciosa del pollo	
Figura 14. Alineamiento de bases de un fragmento de 675 pb del gen VP1 de 33 aislamientos del virus de anemia infecciosa	39
Figura 15. Médula ósea de aves libres de patógenos específicos desafiadas con tres virus de anemia infecciosa del pollo.	46
Figura 16. Timo de aves libres de patógenos específicos desafiadas con tres virus de anemia infecciosa	46
Figura 17. Microfotografía de médula ósea de aves libres de patógenos específicos desafiadas con virus de anemia infecciosa del pollo.	47
Figura 18. Microfotografía de timo de aves libres de patógenos específicos desafiadas con virus de anemia infecciosa del pollo	47

Abreviaturas

ADN	Acido desoxiribonucleico
AI	Anemia infecciosa
ARN	Acido ribonucleico
CAA	Chicken anemia agent
CAV	Chicken anemia virus
CVP	Circovirus porcino
DICC _{50/ml}	Dosis infectante en cultivo celular 50% por ml
ELISA	Inmunoensayo absorbente ligado a enzimas
H&E	Hematoxilina y eosina
kDA	Kilodaltones
MDCC-MSB1	Cultivo celular derivado de tumor de Marek
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Polimorfismo en la longitud en fragmentos de restricción
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
VEPPP	Virus de enfermedad del pico y las plumas de los psiácidos
VP1	Proteína viral 1
VP2	Proteína viral 2
VP3	Proteína viral 3

Resumen

El virus de anemia infecciosa del pollo es uno de los principales inmunodepresores para las aves domésticas. El objetivo del presente estudio, fue la caracterización de aislados mexicanos a través del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción, secuenciación del gen que codifica para la proteína VP1 y el desafío en aves libres de patógenos específicos. Mediante el polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción, 12 aislados mexicanos, pudieron ser clasificados en cuatro grupos virales previamente descritos, mientras que 18 formaron seis grupos más. A partir de 12 aislados, fue obtenida de la secuencia del gen que codifica para la proteína VP1. Las secuencias fueron alineadas y se elaboraron árboles filogenéticos entre las secuencias de virus mexicanos y de otras partes del mundo. La mayoría de los aislados mexicanos, son cercanos a aislados de Japón, Malasia, Australia y Estados Unidos. Un aislado fue cercano a virus empleados como vacuna. A partir de tres aislados que resultaron más alejados entre si en el análisis filogenético, se llevó a cabo un desafío en pollos libres de patógenos específicos de 1 día de edad. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos en peso, hematocrito, ancho del timo y de la corteza del timo. Los resultados indican que la variabilidad genética del virus de anemia infecciosa es amplia en la región que codifica para la proteína VP1. Este hallazgo, pudiera tener relación con las características de patogenicidad y virulencia.

Palabras clave: Anemia, pollos, México.

ABSTRACT

Chicken infectious anemia is the main immunosuppressive disease of poultry. Aims of this study were characterization of mexican isolates by RFLP, secuencing of VP1 gene and challenge of SFP birds. Thirty positive samples for chicken infectious anemia virus (CIAV) were identified by amplification of 675 bp of the amino-terminal end of the VP1 gene. Amplified fragments were characterized by restriction fragment length polymorphism, digesting with *Hae*III, *Hinf*I and *Hpa*II endonucleases. From the 30 samples, 12 could be classified in 4 previously described viral groups, whereas the 18 remaining samples formed 6 new groups. Twelve Mexican isolates of the infectious anemia virus were studied through sequencing of the gene that codifies the VP1 protein. The study permitted the determination of the phylogenetic relationships of the isolates, as well as the comparison with other viruses that have been previously described. Specific pathogen free birds were challenged with three isolates which were deemed to be the most distant within the phylogenetic analysis, resulting in differences of pathogenicity and virulence. These results suggest that the virus of the chicken infectious anemia in Mexico has a wide genetic variability including worldwide distributed variants and novel local varieties and on the other hand, it is possible that changes in sequence may influence the clinical observations and lesions found in the birds.

Key words Anemia, Chicken, México.

Caracterización molecular y de patogenicidad de los virus de anemia infecciosa del pollo aislados en México

II. INTRODUCCIÓN

La anemia infecciosa del pollo (AI) es una enfermedad infecciosa viral de transmisión vertical y horizontal que se caracteriza por producir anemia por atrofia de médula ósea e inmunodepresión por atrofia de timo en aves jóvenes. Es considerada una de las principales enfermedades inmunodepresoras de las aves domésticas.

Características del virus

El agente causal es un virus ADN desnudo. El primer aislamiento de este virus se realizó en Japón en 1978 a partir de una vacuna contra enfermedad de Marek contaminada con el virus de la reticuloendoteliosis y el virus de la anemia del pollo (1). Se le conoce como virus de la anemia del pollo, virus de la anemia infecciosa del pollo, agente de la anemia del pollo y CAA o CAV por sus siglas en inglés (chicken anemia agent o chicken anemia virus respectivamente) (2). Es un virus clasificado actualmente dentro de la familia *Circoviridae* a la que pertenecen también el circovirus porcino (CVP) y el virus de la enfermedad del pico y las plumas de los psitácidos (VEPPP) y el circovirus de palomas (3).

La familia *Circoviridae* se caracteriza por su genoma circular, de cadena sencilla. Sin embargo, el CVP, el VEPPP, el circovirus de las palomas y el virus de la anemia infecciosa del pollo, no presentan similitud en la secuencia de bases, ni comparten determinantes antigénicos y por otra parte, en la microscopía electrónica el CVP y VEPPP parecen 30% más pequeños (4). Por estas razones, la familia *Circoviridae* tiene dos géneros: el Gyrovirus en el cual el único miembro es el virus de la anemia infecciosa del pollo y el Circovirus en el cual se agrupan todos los demás.

Aparentemente, sólo existe un serotipo, dado que no se han encontrado diferencias antigénicas mediante la prueba de virus suero neutralización entre los diferentes aislados de varias partes del mundo usando anticuerpos policlonales. Sin embargo, con anticuerpos monoclonales se han encontrado algunas diferencias, no se conoce la repercusión de estas diferencias hasta el momento (2).

Los estudios de microscopía electrónica muestran que la partícula viral puede presentar diversos diámetros, desde 19.1 nm (5) hasta 26.5 nm (6). Es resistente a los solventes orgánicos como éter o cloroformo, temperaturas de 56°C a 70°C por 1 hora y desinfectantes comunes. También resiste el tratamiento con acetona al 90% por 24 horas, aunque puede ser inactivado si se expone al fenol al 50% por 5 minutos. Su densidad en cloruro de cesio es entre 1.36 y 1.37 g/ml (7,8).

El genoma consta de una sola cadena de ADN de sentido negativo, circular, de 2298 a 2319 bases. En cultivos celulares, se encuentra la forma replicativa de doble cadena (9,10) con 3 segmentos de lectura

abierta que codifican tres proteínas de 50.6 kDa (VP1 o cápside viral), 24 kDa (VP2) y 13.6 kDa (VP3 o apoptina) (9). Los segmentos de lectura 1 y 2 se encuentran parcialmente traslapados, mientras que el segmento 3 se encuentra dentro del segmento 2. En los genomas que se han secuenciado, se han descrito una región promotora y una señal de poliadenilación (4).

No se conoce con exactitud el ciclo de replicación, sin embargo, se ha propuesto que a partir de la cadena sencilla circular se genera una doble cadena llamada también forma replicativa, a partir de la cual se transcribe un ARN mensajero con tres marcos de lectura parcialmente traslapados. Se ha propuesto el modelo de replicación de "círculo rodando" descrito para el bacteriofago phiX174 (4). En células infectadas in vitro, el ARN se detecta a partir de las 8 horas posinfección alcanzando el máximo nivel a las 48 h. A través de anticuerpos monoclonales las proteínas VP2 y VP3 pueden ser detectadas a las 12 h mientras que la VP1 solo hasta las 30 h. VP1 forma la cápside, mientras que VP2 participa durante el ensamblaje de nuevos viriones pero no forma parte del virión. La VP3 produce apoptosis en células linfoides y precursoras hematopoyéticas (2).

Variabilidad del virus

Se ha establecido la secuencia del genoma completo de algunas cepas en el mundo (9,11,12,13,14), encontrándose diferencias entre los aislados mediante secuenciación (14) y patrones de restricción en segmentos amplificados por PCR para la proteína VP1 con las enzimas *HaeIII*, *HinfI* y *HpaII* (13). Con la enzima *HaeIII*, el segmento de 675 pares de bases que codifica para la proteína VP1, tiene 6 fragmentos de 38, 58, 67, 113, 161 y 238 pares de bases. La enzima *HinfI* produce 4 fragmentos de 60, 137, 227 y 251 pares de bases mientras que la enzima *HpaII* produce 4 fragmentos de 129, 148, 170 y 228 pb. Si bien se considera que existe un solo serotipo, las diferencias en los patrones de restricción han permitido separar los virus de anemia infecciosa en 7 grupos en donde aun entre aislamientos de un mismo país se encuentra diferencias, se ha visto por otra parte que brotes en regiones cercanas tienen mas similitud entre cepas (13).

Se piensa que las diferencias en la secuencia de bases podrían influir sobre la patogenicidad, virulencia y tropismo del virus. Ya que se ha visto que mientras algunos virus se replican bien en células de línea linfóide MDCC-MSB1 (Derivadas de tumor de Marek) otros no lo hacen y por otra parte, en casos de campo el comportamiento del cuadro clínico es variable, se ha propuesto que entre otros factores, estas diferencias podrían estar relacionada con las variaciones en la región que codifica para la proteína VP1, que es en donde mayores cambios se han encontrado. Ha sido descrita una región hipervariable en los aminoácidos 139 a 151 en los aislamientos Cux 1, Conn, CIA-1 y Lo28 (15).

Mediante pasajes en cultivo celular, se producen cambios en el genoma del virus que atenúan su patogenicidad para pollos de 1 día (16, 17). Los niveles anticuerpos contra el virus de anemia infecciosa son similares en aves inoculadas con cepas patógenas y con cepas atenuadas (18), por lo que la

importancia de las variaciones de patogenicidad radica en el uso potencial de cepas naturalmente apatógenas como vacunas.

Importancia

Esta enfermedad es importante principalmente desde tres puntos de vista.

a) Inmunológico, por inducir inmunodepresión que predispone a la parvada a la infección por otros agentes como virus respiratorios tales como coronavirus de la bronquitis infecciosa o paramixovirus de la enfermedad de Newcastle y otros virus inmunodepresores como virus de infección de la bolsa de Fabricio. También predispone a infecciones bacterianas por *E. coli* o *Clostridium* sp. Por otra parte se reporta una respuesta deficiente ante las vacunaciones, quizá este efecto sea el más importante para la industria avícola.

b) Económico, ya que en casos de infección subclínica, las pérdidas por bajo rendimiento de la parvada (pollos con diferentes pesos, mal emplume y pigmentación, conversión alimenticia baja) alcanzan hasta un 13%. En estos casos las aves no muestran signos de enfermedad, pero los parámetros productivos se ven alterados (19).

c) Cuando se presenta en forma clínica ocasiona mortalidad en aves menores de 6 semanas. Se han reportado mortalidades entre 10 y 20% y en algunas ocasiones hasta el 60%, sobre todo en asociación con otras enfermedades (20).

Aislamiento

Durante muchos años, la enfermedad fue desconocida, dado que el virus no es fácil de aislar. No produce lesiones en los embriones de pollo y no se multiplica en los cultivos celulares de monocapa tradicionales, únicamente puede ser aislado por inoculación en pollitos libres de patógenos específicos de un día de edad o en cultivos de líneas linfoides como MDCC-MSB1 (derivada de tumor de Marek), en ambos casos, el proceso es lento, ya que la observación de los pollitos inoculados, en espera de la reproducción del cuadro clínico y lesiones características debe ser por lo menos de 14 días y en el caso de los cultivos celulares se requieren varios pases ciegos cada 2 o 3 días, lo cual puede demorar el aislamiento hasta 4 o 5 semanas (21).

Patogénesis.

Los viriones probablemente penetran a las células por adsorción y absorción convencional, si bien es posible encontrar viriones completos a partir de 48 horas, en células infectadas *in vitro*, en células *in vivo* no se aprecian lesiones durante los primeros días de infección. Las células blanco del virus son de línea linfoide, en particular el linfocito TCD4+ y las células precursoras hematopoyéticas de médula ósea. En timo y médula las células mueren por un proceso de apoptosis que se desarrolla en 7 a 8 días, tiempo en el cual es posible encontrar lesiones con ausencia de proceso inflamatorio. Se ha propuesto que la VP3

tiene afinidad por las histonas del ADN de la célula infectada y esta unión favorece el rompimiento de la estructura helicoidal y fragmentación de ADN desencadenando el mecanismo de apoptosis. La inmunodepresión es resultado de la falta de células linfoides mientras que la anemia de la ausencia de células hematopoyéticas (4, 7).

Anatomía patológica

En infecciones experimentales, la anemia (con hematocrito entre 6 y 27%) y lesiones se presentan entre los 8 y 14 días postinoculación y la mortalidad entre 12 y 14 días. En ausencia de infecciones secundarias, los pollos se recuperan en tres o cuatro semanas. Bajo condiciones de campo, no se conoce el período de incubación y los signos y lesiones pueden notarse desde los 12 días de edad, aunque son más aparentes en aves de tres y cuatro semanas.

A la necropsia, las aves afectadas tienen timos pequeños, médula ósea de color rosa o amarillo, bolsa de Fabricio pequeña y translúcida. Han sido descritas también hemorragias en hígado, mucosa del proventrículo y tejido subcutáneo.

La histopatología refleja los hallazgos de necropsia: se presenta atrofia de corteza de timo; bolsa de Fabricio con folículos linfoides pequeños, focos de necrosis dispersos, depleción linfoide e hiperplasia de células reticulares en la zona medular. En médula ósea, atrofia con focos de necrosis dispersos y sustitución por tejido adiposo. Después de 4 semanas postinoculación, se presentan áreas de eritropoyesis y granulopoyesis. Se han reportado cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos en células de médula ósea y linfocitos de timo a los 8 días postinoculación (22, 23, 24).

El hematocrito y las lesiones a la necropsia e histopatología orientan el diagnóstico, sin embargo dado que la asociación con otros agentes es frecuente, se requiere la confirmación final por aislamiento.

Serología

Se pueden detectar anticuerpos contra el virus de la anemia infecciosa en suero o yema mediante neutralización viral, inmunofluorescencia indirecta y ELISA. La neutralización viral tiene la desventaja de que es muy lenta, porque se realiza en pollitos o en cultivo celular, ya se mencionó que el efecto del virus se manifiesta hasta después de dos semanas en los pollitos y 4 o 5 semanas en los cultivos, por lo que se prefiere la inmunofluorescencia o ELISA, esta última tiene gran aceptación por el tiempo en que obtiene resultados. (25,26).

Prevención y control

A la fecha no existe tratamiento contra esta enfermedad, por lo que se realiza la prevención y control mediante medidas sanitarias y vacunas (20).

Se han desarrollado vacunas a virus activo atenuado para aplicación en las reproductoras entre las 13 y 15 semanas de edad, estas vacunas nunca deben ser aplicadas en aves en producción por el riesgo de la

transmisión vertical (7). La transmisión vertical, se define como el proceso en el cual la gallina se infecta en la etapa en que pone huevos y el virus es transmitido al huevo, de manera que los pollitos resultantes de estos huevos, nacen infectados. En condiciones de campo, después de un período de 6 a 9 semanas, la gallina es capaz de controlar la infección y desarrollar inmunidad, de manera que ya no elimina virus a través del huevo y transmite anticuerpos a través del vitelo. Por otra parte se han desarrollado algunas vacunas inactivadas que no se han mantenido a nivel comercial por tener resultados poco consistentes (27). Si las reproductoras resultan seropositivas antes de las 15 semanas, algunos avicultores omiten la vacuna, ya que muestra exposición natural, sin embargo la protección transferida a la progenie no es muy estable. En México, hasta 1999 no estuvieron disponibles las vacunas, por lo que al igual que en otras partes del mundo, algunos productores han proporcionado material de cama de reproductoras adultas a las pollas durante la crianza, este método si bien ha asegurado que las aves se expongan de manera natural al virus y éste ya no se elimine en producción, es riesgoso pues no sólo el virus de anemia puede infectar a las pollas. En otros lugares del mundo, se han administrado macerados de hígado, con el mismo efecto y los mismos riesgos sanitarios (2,7,20).

La enfermedad en México

En México, Valle y Lucio en 1993 (28) lograron dos aislados que compartieron características fisicoquímicas y serológicas descritas para el virus de anemia infecciosa y demostraron anticuerpos en reproductoras y pollos de engorda en los estados de Querétaro, Puebla, Hidalgo, Veracruz, Estado de México y Morelos. En estudios realizados en el Departamento de Producción Animal Aves la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, en conjunto con el laboratorio de biología de Investigación aplicada S.A., se logró el aislamiento del virus a partir de reproductoras semipesadas y pollos de engorda, la replicación del cuadro clínico a partir de las cepas aisladas, así como la demostración del virus por microscopía electrónica e inmunoperoxidasa indirecta (29).

En una encuesta serológica a partir de los sueros remitidos para diagnóstico al laboratorio de patología aviar de la FMVZ de la UNAM, se demostraron anticuerpos contra el virus de anemia infecciosa en todos los estados con avicultura comercial (30).

Por otra parte en estudios realizados en el Departamento de Producción Animal Aves la FMVZ de la UNAM se han visto diferentes comportamientos del virus en desafíos en aves libres de patógenos específicos (31). Además, en estudios de asociación con otros virus como enfermedad de Newcastle e Infección de la bolsa de Fabricio, se han reportado diferencias de patogenicidad (32), por lo que es probable que las observaciones de campo en cuanto a presentación, morbilidad y mortalidad, tengan relación con estas diferencias.

JUSTIFICACIÓN

La anemia infecciosa es una de las enfermedades virales más importantes para la industria avícola en el mundo. Los virus de anemia infecciosa aislados en México, presentan diferentes comportamientos en sus niveles de patogenicidad *in vitro* e *in vivo*, sin embargo, se desconocen las bases moleculares de estas diferencias. Por otra parte, es importante reconocer las variantes genéticas de los virus existentes en México, sus orígenes, su relación con su localización geográfica ya que esto permitirá conocer más acerca de la epizootiología y las vías de infección para las aves en México. Esto es importante para el desarrollo de sistemas de diagnóstico apropiados, así como el diseño de vacunas y medios de control de la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Establecer el nivel de la diversidad genética de los virus de anemia infecciosa del pollo aislados en México y estudiar sus diferencias en los niveles de patogenicidad y virulencia.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.-Caracterizar molecularmente aislados mexicanos del virus de anemia infecciosa a través del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción y secuenciación del gen de la proteína VP1.
- 2.-Estudiar las relaciones genéticas de los virus mexicanos a través del análisis filogenético de las secuencias.
- 3.-Determinar si existen diferencias en la patogenicidad y virulencia de los aislamientos mexicanos a través del desafío en aves libres de patógenos específicos.

METAS

- 1.-Obtener 30 aislados del virus de anemia infecciosa de varias partes de la República Mexicana.
- 2.-Amplificar el segmento del genoma del virus de anemia infecciosa que codifica para la proteína VP1 mediante reacción en cadena de la polimerasa.
- 3.-Determinar los patrones de restricción del segmento amplificado de la proteína VP1 mediante las enzimas *Hae*III, *Hinf*I y *Hpa*I.
- 4.-Evaluar los niveles de variación mediante la secuenciación de los productos de PCR.
- 5.-Establecer las relaciones genéticas y los orígenes de los virus de anemia infecciosa mexicanos.
- 6.-Evaluar los niveles de patogenicidad y virulencia de tres aislados que resulten diferentes en el análisis filogenético, mediante desafíos en aves libres de patógenos específicos.

HIPÓTESIS

En México existen variantes del virus de anemia infecciosa del pollo, que presentan diferencias de patogenicidad y virulencia.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Virus

Fueron estudiados 38 casos para virus de anemia infecciosa, 2 de los cuales correspondieron a vacunas comerciales. El criterio para seleccionar los casos a estudiar fue principalmente la historia clínica, hallazgos a la necropsia o petición del propietario.

Aislamiento viral.

A partir de timos, médula ósea, hígado o pulmón, de 28 casos de aves remitidas para diagnóstico al laboratorio de patología aviar de la FMVZ UNAM, se prepararon suspensiones al 20% en solución amortiguada de fosfatos, clarificadas por centrifugación a 3000 Xg. Los sobrenadantes fueron tratados con cloroformo y calor mediante técnicas previamente descritas (21) y fueron congelados a -85° C hasta su utilización.

Adicionalmente se trabajó con 2 muestras de virus empleados como vacuna y en 8 casos no fue posible llevar a cabo el aislamiento en células.

Los 30 sobrenadantes, en lo sucesivo llamados inóculos, tratados con calor y cloroformo fueron inoculados en cultivos MDCC-MSB1 a razón de 100 µl por cada 3×10^5 células, se incubaron a 40° C durante 72 horas al término de las cuales se llevó a cabo un pase transfiriendo 200 µl de suspensión de células en 1 ml de medio nuevo. Las células fueron pasadas al menos 14 veces en cultivo celular MDCC-MSB1 hasta la demostración de efecto citopático y muerte del cultivo.

Extracción de ADN.

A partir de macerados de timos, médula ósea, hígado o pulmón de 36 casos de aves remitidas para diagnóstico y 2 vacunas, fue extraído el ADN total mediante la técnica previamente descrita (13), brevemente: se mezclaron volúmenes iguales de macerado o vacuna con solución de lisis conteniendo proteinasa K (1 mg/ml), 0.001M EDTA, 0.01M Tris HCl pH 8.0 y 1% de SDS. Las muestras se incubaron en baño María a 37° C durante dos horas y el ADN fue extraído mediante fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitación con etanol. El ADN fue suspendido en un volumen de 100 µl de agua, cuantificado por espectrofotometría y congelado a -85° C hasta su utilización.

PCR

En las 38 muestras se llevaron a cabo reacciones de PCR. Se utilizaron los iniciadores 5'-GAC TGT AAG ATG GCA AGA CGA GCT C-3' (sentido) y 5'-GGC TGA AGG ATC CCT CAT TC-3' (reversa) que amplifican

un fragmento de 675 pares de bases que codifica el gen para la proteína VP1 (cápside del virus, posición 844 a 1519 del genoma del virus Cux-1) (13, 34) y 5´-GGA TTG GTA TCG CTG GAA TT-3´ (sentido) y 5´-AGT CTT CTC TCC CAG GGA GA-3´ (reversa) que amplifican un fragmento de 930 pb (posiciones 714 al 1644 del genoma del virus Cux-1).

Para determinar si la muestra fue positiva o negativa, la reacción se llevó a cabo en 20 µl. Para obtener productos de PCR para RFLP´s y secuenciación, las reacciones se llevaron a cabo en 100 µl.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador de tapa caliente (Perkin Elmer Gene Amp 2400). En el caso de volumen de reacción con 20 µl incluyeron: 2 µl de muestra de ADN (200 ng/µl) , 1.5 mM de MgCl₂ (Gibco BRL 11615-010), 0.2 mM de dNTP mix (Biogénica 200 µM) 2.5 U de Taq DNA polimerasa (5U/ µl) (Amplificasa Biogénica EA 500), 0.5 µM del iniciador sentido, 0.5 µM del iniciador reversa, 1X Amortiguador de PCR 10X (Biogénica EA 500), H₂O cbp 20 µl. En el caso de volumen de reacción de 100 µl incluyeron: 5 µl de muestra de ADN (200 ng/µl) y las mismas concentraciones de reactivos que en la reacción de 20 µl. Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 95° C por 5 minutos, 30 ciclos de 95° C por 30 segundos, 65° C 30 segundos y 72° C por 1 minuto, con una extensión final a 72° C por 5 minutos.

Geles de agarosa.

Posterior al proceso de PCR, muestras de 5 µl de los productos fueron separadas por electroforesis en geles de agarosa al 1% (Gibco BRL 15510-027) a 100 voltios por 1 hora en una cámara de electroforesis horizontal (Horizon 58 Life Technologies) y teñidas con bromuro de etidio (1 µg/ml). Las bandas de ADN fueron visualizadas en un transiluminador UV. Se utilizó un marcador de tamaño molecular pBR322 DNA Msp I (Gibco BRL 15612-013).

Purificación de productos de PCR para RFLP´s

En 30 casos positivos, los productos de PCR de 675 pb fueron separados en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ml), visualizados en luz ultravioleta, purificados mediante perlas de sílica utilizando un juego de reactivos comercial (DNA extraction kit K0513 Fermentas) y resuspendidos en un volumen de 50 µl.

Enzimas de restricción

Los productos de PCR de 675 pb purificados mediante perlas de sílica fueron tratados por separado con las enzimas de restricción *Hae*III (Gibco BRL 15205-081), *Hinf*I (Gibco BRL 15223-019) y *Hpa*II (Gibco BRL 15209-067) las reacciones incluyeron 15 µl de producto de PCR 3 µl de amortiguador de reacción, 1 µl de enzima (100U/µl) y H₂O cbp 30 µl. Las muestras fueron incubadas a 37° C en baño María durante 4 horas.

Geles de poliacrilamida

Los productos de digestión con enzimas de restricción fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% mediante la técnica descrita previamente (34). Después de la electroforesis vertical a 130 voltios por 1 hora los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g/ml}$) y visualizados con un transiluminador UV. Se utilizó el marcador pBR322 DNA MspI (Gibco BRL 15611-015).

Patrones de restricción

Fue calculado el tamaño de los fragmentos producidos mediante el análisis de regresión del marcador de tamaño molecular pBR322 MspI y la sustitución del valor de X en la recta por la distancia en centímetros recorrida por cada banda. Posteriormente, se llevo a cabo la determinación de bandas de digestión parcial mediante la suma de bandas y determinación de los sitios de corte previamente descritos. Los patrones de corte fueron comparados con los descritos previamente (13).

Secuenciación.

A partir de 12 ADNs incluyendo los de dos virus empleados como vacuna, se llevaron a cabo reacciones de PCR en 100 μl para amplificar dos segmentos de 675 y 930 pares de bases conteniendo el gen de la proteína VP1. Las reacciones de amplificación se efectuaron con los mismos iniciadores descritos para PCR a una concentración de 10 μM , 0.2mM de dNTP's, 1.5 mM de MgCl_2 , 2.5 U de Taq polimerasa, y 1X de amortiguador de Taq polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron una desnaturalización inicial a 95° C por 5 minutos, 30 ciclos de 95° C por 30 segundos, 65° C 30 segundos y 72° C por 1 minuto, con una extensión final de 5 minutos. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio en luz ultravioleta y purificados mediante perlas de sílica. El ADN recuperado se cuantificó por espectrofotometría y se ajusto a una concentración de 25 ng/ μl . En las reacciones de secuenciación, se empleó un juego de reactivos comercial (BigDye Applied Biosystems Terminador v3.1) utilizando por separado los mismos iniciadores que se emplearon en la obtención de productos amplificados a una concentración de 2 pmol/ μl y el DNA a 10 ng/ μl . Las condiciones de secuenciación fueron: 96° C por 10 segundos, 50° C por 5 segundos y 60° C por 4 minutos con 25 ciclos. Los productos de secuenciación fueron purificados por exclusión molecular en columnas de Sephadex G50 y fueron leídos en un secuenciador automatizado (Applied Biosystems Prism 310) en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Para cada virus analizado se obtuvo una secuencia de 675 pb entre las posiciones 844 y 1519 de la secuencia descrita para la cepa Cux-1 (número de acceso GeneBank Nc_001427).

A partir de las lecturas de cada fragmento en ambas cadenas se obtuvo una secuencia consenso para cada aislamiento utilizando el programa Clone Manager Suite 7.0 (Sci Ed Software) y se elaboraron dendogramas tomando en cuenta el alineamiento de bases y aminoácidos. Por otra parte, fueron obtenidas del GeneBank 21 secuencias de la misma región del genoma del virus de anemia infecciosa del

pollo de diferentes partes del mundo. Las 33 secuencias disponibles fueron alineadas mediante el programa Clone Manager Suite 7.0 obteniéndose un árbol filogenético.

Titulación de virus

A partir de tres inóculos que mostraron secuencias de nucleótidos más alejadas entre sí y efecto citopático durante el aislamiento en cultivo celular denominados como: A (vacuna 1), B (290) y C (366), se procedió a la titulación viral mediante la técnica de Yuasa *et al* (33) con las siguientes modificaciones: A partir del inóculo original al 20 % se llevaron a cabo diluciones décuples seriadas hasta 10^{-11} en medio RPMI. Con cada dilución fueron inoculados cultivos celulares MDCC-MSB1 en microplaca de 96 pozos, a razón de 100 μ l por pozo, en cada pozo fueron depositados además 100 μ l de una suspensión de células MSB1 a 0.5×10^6 células/ml. Fueron usados 5 pozos por dilución y se dejaron 3 pozos sin inocular como testigos negativos. Los cultivos así inoculados fueron incubados a 40° C con 5 % de CO₂. Se llevaron a cabo pases cada 48 horas transfiriendo 100 μ l de cada pozo a 100 μ l de medio RPMI fresco. El número total de pases fue de 14. Se consideró como positivos aquellos pozos en los que se observó efecto citopático y las células perdieron la capacidad de seguirse multiplicando con un color rosa en el medio de cultivo y negativos aquellos pozos con células sanas y un medio color amarillo. Posteriormente, el título fue calculado mediante la técnica de Reed&Muench y expresado como DICC₅₀/ml. Los tres inóculos fueron ajustados a una concentración de 10^4 DICC₅₀/ml y congelados -85° C hasta su utilización.

Desafío en aves.

A partir de los tres inóculos que fueron titulados, se llevó a cabo un desafío en aves libres de patógenos específicos*. 40 pollitos libres de patógenos específicos de 1 día de edad, fueron separados en 4 grupos de 10 aves cada uno, que fueron alojados por separado en unidades de aislamiento. Recibieron agua y alimento a libre acceso. Al día de edad fueron inoculados por vía intramuscular con 200 μ l del inóculo a una concentración de 10^4 DICC₅₀/ml. Un grupo de aves no fue inoculado como testigo negativo. Las aves fueron observadas durante 14 días, al término de los cuales se evaluaron signos clínicos, se pesaron y se obtuvieron muestras de sangre para determinación de hematocrito. Las aves fueron sacrificadas mediante sobredosis de pentobarbital sódico (35) y fueron obtenidos los timos. El ancho de los timos fue medido con un vernier y se registró la presencia de médulas óseas pálidas en tibiotarso así como la presencia de hemorragias en músculos. Los timos fueron fijados en formalina amortiguada al 10% durante 24 horas para su posterior proceso por la técnica de inclusión en parafina y tinción de H&E (36). Mediante una microescala ocular en un microscopio de luz, fue medido el espesor de la corteza de timo, el resultado fue expresado en micrómetros.

El peso, hematocrito, ancho del timo y espesor de la corteza de timo, fue comparado entre los grupos utilizando análisis de varianza con significancia $P < 0.05$ utilizando un paquete estadístico (37).

*Aves libres de patógenos específicos S.A. 7 Norte 416 Tehuacán Puebla México.

RESULTADOS

Virus

De los 38 casos estudiados 31 resultaron positivos y 7 negativos a la presencia del virus de anemia infecciosa del pollo (las características de los casos positivos así como el tejido a partir del cual se llevó a cabo el estudio son presentados en la tabla 1). Solamente en 12 casos el clínico de campo solicitó el estudio específico de anemia infecciosa, la mayoría de los casos fueron remitidos por otras causas entre las que se incluyen aislamientos de virus de Enfermedad de Newcastle, Bronquitis infecciosa e Infección de la bolsa de Fabricio. El 78% fue a partir de pollos de engorda, 15% de reproductoras pesadas y 7% gallinas de postura, la mayoría de las aves tuvo entre 5 y 6 semanas de edad.

Aislamiento viral

De los 30 aislamientos llevados a cabo en células MDCC-MSB1, 22 resultaron positivos y 8 negativos. En el caso 431, el virus no se adaptó al cultivo celular aun después de 18 pases por lo que se consideró negativo al aislamiento en células, pero fue positivo a través de la reacción en cadena de la polimerasa. En los aislamientos positivos, el efecto citopático se manifestó en general desde el 8º pase, siendo franco en la mayoría de los casos en el pase 11 o 12. No se encontraron diferencias entre el efecto citopático ocasionado por los diferentes virus. La tabla 1 muestra el número de pase en el cual fue detectado el efecto citopático. La figura 1 muestra la diferencia entre células con y sin efecto citopático.

PCR

La amplificación por PCR del segmento del gen VP1, generó bandas de 675 pb en 31 de los 38 casos estudiados. La figura 2 muestra un gel de agarosa al 1% con casos positivos.

RFLP's

Con la digestión de la enzima *HaeIII* los productos de PCR de 675 pares de bases pudieron ser separados en 10 grupos diferentes, 4 de ellos no descritos con anterioridad en cepas europeas o japonesas. Por otra parte, 7 productos, mostraron un patrón similar al descrito para las cepas Cux-1 y Gifu-1, pero sólo 5 de ellos correspondieron cuando fueron analizados con las siguientes enzimas.

Con la enzima *Hinf I* también pudieron ser diferenciados 4 grupos, uno de ellos no descrito previamente. En 17 casos el patrón fue similar al descrito para las cepas Cux-1 y Gifu-1, sin embargo sólo 5 de ellos tuvieron el patrón mediante la enzima *HaeIII*.

En el caso de la Enzima *HpaII* los productos solo se agruparon en dos categorías, una de ellas no descrita con anterioridad y que correspondió a un virus empleado como vacuna atenuada.

Las tablas 2 y 3 presentan los sitios de corte y grupos obtenidos, mientras que las figuras 3, 4 y 5 presentan los sitios de corte, tamaño y ubicación de los fragmentos. Las figuras 6, 7 y 8 presentan geles de poliacrilamida con algunos patrones de corte.

Considerando las tres enzimas los 30 productos pudieron ser separados en 13 grupos. En los grupos que tuvieron dos o más virus, algunos casos fueron emparentados, es decir provinieron de la misma zona geográfica o de diferente zona pero de la misma empresa.

Las enzimas *HaeIII* e *HinfI* fueron las más útiles mientras que la enzima *HpaII* aportó poca información.

Secuenciación

Fueron obtenidas las secuencias de 12 fragmentos de 675 pares de bases, con las cuales fueron elaborados tres árboles filogenéticos tomando en cuenta la secuencia de bases y aminoácidos y por otra parte fueron alineadas con las 21 secuencias del Gene Bank. Las figuras 9, 10 y 11 presentan los árboles filogenéticos mientras que la figura 12 presenta el alineamiento de bases de los 12 virus secuenciados, la figura 13 muestra el alineamiento de aminoácidos de los 12 virus secuenciados y la figura 14 presenta el alineamiento de 33 secuencias de virus de anemia infecciosa.

Entre los datos más relevantes, el virus 366 resultó más alejado del resto de los aislamientos mexicanos. Y por otra parte, un virus que en el análisis de RFLP resultó compatible con la cepa de referencia Cux-1, resultó más alejado de esta en el análisis filogenético.

Desafío en aves

En el desafío de aves, no se presentó mortalidad por anemia infecciosa en ninguno de los grupos, sólo las aves del grupo C (366) presentaron palidez. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos en

peso, hematocrito, ancho del timo y de la corteza del timo. Los grupos A (Vacuna INTE 1) y C (366) presentaron médulas óseas amarillas y atrofia severa de timo, mientras que el grupo B (290) únicamente médula ósea pálida. Las figuras 15 y 16 presentan timo y médulas óseas de los animales inoculados, así como las figuras 17 y 18 el aspecto histológico de los mismos. El grupo testigo negativo, no tuvo cambios patológicos aparentes. Los resultados de peso, hematocrito, ancho del timo y de la corteza de timo se presentan en la tabla 4.

DISCUSIÓN

La técnica de PCR permitió un diagnóstico preciso y en menos tiempo de los casos estudiados, el hecho de que 31 de 38 casos sean positivos, no resulta extraño, ya que la infección por virus de anemia infecciosa se encuentra muy difundida en el campo en donde todas las parvadas de pollo de engorda y la mayoría de las reproductoras pesadas son positivas en la semana 6 de vida. Si bien los reportes previos de PCR de anemia infecciosa señalan al timo y médula ósea como los mejores órganos para aislamiento de ADN viral (2,7,8) otros órganos como el hígado y pulmón deben ser considerados también como fuente de ADN viral, ya que en los 26 casos en los cuales no se solicitó estudio específico de anemia infecciosa hubo algunos en los que no se dispuso de timo y médula, resultando positivos a partir de otros órganos.

La técnica de PCR resultó más eficiente que el aislamiento en cultivo celular y en pollos libres de patógenos específicos ya que una vez estandarizada la técnica permitió obtener el resultado en dos días en comparación con el cultivo que demora 1 mes o la inoculación en pollos que demora 22 días como mínimo (21). Se deben considerar también aquellos casos en los cuales el virus no se adapta al cultivo (5,15, 20).

Si bien la mayoría de los casos corresponden a pollo de engorda, es posible que la infección también se presente de manera importante en reproductoras pesadas y gallinas de postura pero dado el tiempo productivo de cada estirpe es probable que en el pollo de engorda las consecuencias de la infección sean más notorias ya que la ganancia de peso se encuentra dentro de los parámetros más importantes.

De las tres enzimas utilizadas en los RFLP's dos aportaron información relevante para la clasificación de virus, estos hallazgos concuerdan con lo descrito por Todd y colaboradores en donde 14 aislados pudieron ser separados en 7 grupos de acuerdo a los patrones de restricción (13). Llama la atención que 5 de los aislados tuvieron un patrón similar al descrito para las cepas Cux-1 y Gifu-1 que son cepas muy conocidas en Estados Unidos, Europa y Japón y 2 aislamientos tuvieron un patrón similar a la cepa TK5803 también de Japón, esta cepa fue de las primeras que se estudiaron. 4 aislados correspondieron con cepas australianas y uno con la cepa norteamericana EF 8878. Dado que no se tienen importaciones de productos avícolas con países orientales o europeos pero sí con los Estados Unidos es posible que los virus en México tengan su origen a partir de virus norteamericanos. Por otra parte, en el presente estudio, el resto de los aislados no tuvo similitudes con cepas europeas previamente descritas, por lo que

peso, hematocrito, ancho del timo y de la corteza del timo. Los grupos A (Vacuna INTE 1) y C (366) presentaron médulas óseas amarillas y atrofia severa de timo, mientras que el grupo B (290) únicamente médula ósea pálida. Las figuras 15 y 16 presentan timo y médulas óseas de los animales inoculados, así como las figuras 17 y 18 el aspecto histológico de los mismos. El grupo testigo negativo, no tuvo cambios patológicos aparentes. Los resultados de peso, hematocrito, ancho del timo y de la corteza de timo se presentan en la tabla 4.

DISCUSIÓN

La técnica de PCR permitió un diagnóstico preciso y en menos tiempo de los casos estudiados, el hecho de que 31 de 38 casos sean positivos, no resulta extraño, ya que la infección por virus de anemia infecciosa se encuentra muy difundida en el campo en donde todas las parvadas de pollo de engorda y la mayoría de las reproductoras pesadas son positivas en la semana 6 de vida. Si bien los reportes previos de PCR de anemia infecciosa señalan al timo y médula ósea como los mejores órganos para aislamiento de ADN viral (2,7,8) otros órganos como el hígado y pulmón deben ser considerados también como fuente de ADN viral, ya que en los 26 casos en los cuales no se solicitó estudio específico de anemia infecciosa hubo algunos en los que no se dispuso de timo y médula, resultando positivos a partir de otros órganos.

La técnica de PCR resultó más eficiente que el aislamiento en cultivo celular y en pollos libres de patógenos específicos ya que una vez estandarizada la técnica permitió obtener el resultado en dos días en comparación con el cultivo que demora 1 mes o la inoculación en pollos que demora 22 días como mínimo (21). Se deben considerar también aquellos casos en los cuales el virus no se adapta al cultivo (5,15, 20).

Si bien la mayoría de los casos corresponden a pollo de engorda, es posible que la infección también se presente de manera importante en reproductoras pesadas y gallinas de postura pero dado el tiempo productivo de cada estirpe es probable que en el pollo de engorda las consecuencias de la infección sean más notorias ya que la ganancia de peso se encuentra dentro de los parámetros más importantes.

De las tres enzimas utilizadas en los RFLP's dos aportaron información relevante para la clasificación de virus, estos hallazgos concuerdan con lo descrito por Todd y colaboradores en donde 14 aislados pudieron ser separados en 7 grupos de acuerdo a los patrones de restricción (13). Llama la atención que 5 de los aislados tuvieron un patrón similar al descrito para las cepas Cux-1 y Gifu-1 que son cepas muy conocidas en Estados Unidos, Europa y Japón y 2 aislamientos tuvieron un patrón similar a la cepa TK5803 también de Japón, esta cepa fue de las primeras que se estudiaron. 4 aislados correspondieron con cepas australianas y uno con la cepa norteamericana EF 8878. Dado que no se tienen importaciones de productos avícolas con países orientales o europeos pero sí con los Estados Unidos es posible que los virus en México tengan su origen a partir de virus norteamericanos. Por otra parte, en el presente estudio, el resto de los aislados no tuvo similitudes con cepas europeas previamente descritas, por lo que

probablemente se trata de cepas autóctonas en México. Esta hipótesis se sustenta por otra parte en el hecho de haber encontrado sitios de corte nuevos para las enzimas *HaeIII* y *HpaII*.

La clasificación de aislados mediante RFLPs puede ser de utilidad en los estudios epidemiológicos del virus para un mejor empleo de aislados locales como vacunas. En campo son frecuentes los reportes de fallas en la vacunación de reproductoras, en las cuales la progenie de reproductoras vacunadas presentan infección por virus de campo, cabe citar que de las cuatro vacunas disponibles en México dos son elaboradas con cepas europeas y en el presente estudio mediante RFLP ningún aislamiento compartió características con cepas europeas descritas.

Por otra parte, otro de los virus que no pudo ser agrupado tiene la característica de no propagarse en cultivo celular, estos hechos aunados a la región hipervariable descrita para el fragmento de 675 pares de bases de este estudio, sugieren que las diferencias en la región estudiada pudieran influir en la patogenicidad y virulencia del virus ya que el resto de los virus si pudieron ser propagados en cultivo celular.

Si bien los patrones de restricción proporcionan una base para la clasificación de aislamientos, la estimación del tamaño de los fragmentos presenta limitantes en cuanto a la densidad de las bandas o corrimiento en el gel por lo que se requiere del análisis de secuenciación de ADN para establecer diferencias o similitudes más precisas.

El análisis de secuenciación proporcionó información mas detallada, ya que dos virus ubicados en el mismo grupo con anterioridad, (366 y 90) estuvieron separados en el árbol filogenético y otros que no pudieron ser agrupados estuvieron cercanos entre si (Vacuna 1 y 279/1). Por otra parte algunos de los virus que resultaron en grupos diferentes mediante RFLP, resultaron ser cercanos en el análisis filogenético, sin embargo, dado que la substitución de una base por otra puede cambiar el sitio de restricción, dos virus que se encuentren más emparentados, pudieran resultar con patrón de corte diferente, tal es el caso de los aislamientos 279 y 431 de este estudio.

Por otra parte, un virus que en el análisis de RFLP resultó compatible con la cepa de referencia Cux-1, resultó más alejado de esta en el análisis filogenético.

En un análisis de secuencias entre la cepa Cux-1 y un aislamiento norteamericano¹, de los 56 cambios observados en todo el genoma, 19 fueron en la región amplificada en este estudio. Los sitios con mayor variabilidad en el fragmento de 675 bases correspondieron a las posiciones 230 a 246, 321 a 330, 424 a 439 y 564 a 570 en los cuales se aprecia intercambio de bases al menos en el 60 % de las muestras. Estos datos coinciden con lo descrito por Renshaw (15), pero difieren con los de Yamaguchi (38) en el cual propone que la región variable se ubica en el otro extremo de la proteína VP1. Los cambios en la secuencia de bases, ocasionaron cambios en la secuencia de aminoácidos, en donde se observa que entre las posiciones 424 a 439 al menos el 60% de los aislamientos son diferentes, sin embargo, en las otras regiones de mayor variabilidad tomando en cuenta las bases, son menos evidentes los cambios de aminoácidos, por lo que es probable la región entre las bases 424 y 439 tenga un papel más importante en las diferencias entre los virus de anemia infecciosa.

El virus con mayor divergencia de nucleótidos con respecto de la cepa Cux-1 resultó un 92% compatible (8% de diferencia) mientras que los más cercanos se ubicaron en 98 %. Sin embargo, debe considerarse que es más importante la posición del cambio que el número de cambios ya que varios codones pueden codificar para un mismo aminoácido.

Dos virus, utilizados como vacuna de origen holandés, resultaron cercanos entre si y con respecto de un aislamiento mexicano. Es posible que este aislamiento mexicano derive de estas vacunas, dado que la vacunación en el país emplea virus activo atenuado y una vez que este se establece en la caseta, recibe muchos pases en las aves. Durante los pases, son posibles las mutaciones, que originan nuevas variantes del virus.

En el alineamiento de los aislamientos mexicanos con respecto de aislamientos de otras partes del mundo, es posible ubicar que la mayoría de los aislamientos mexicanos guardan relación con aislamientos de Japón y Malasia mientras que los aislamientos de Alemania forman un grupo en el cual no entró ningún virus mexicano.

La mayoría de los aislamientos mexicanos derivan de una rama común de la que derivan los aislamientos de Asia y Australia.

El desafío en aves libres de patógenos específicos, bajo las mismas condiciones y dosis, mostró que existen diferencias de patogenicidad y virulencia, como lo muestra el hecho de que el inóculo 366 produjo el mayor grado de atrofia de timo y anemia, en comparación con el inóculo Vacuna 1 que resultó moderadamente patógeno o el grupo 290 en el cual la anemia no se presentó y la atrofia de timo sólo pudo ser evidente a través del examen histopatológico. En forma adicional, solo el virus 366 produjo hemorragias en músculos. Por otra parte en estudios previos (31) llevados a cabo con el virus 366, se ha descrito que este virus tuvo un comportamiento más virulento en los pollos cuando fue administrado en la misma dosis y bajo las mismas condiciones en pollos libres de patógenos específicos. Ha sido descrito que la afinidad del virus por determinadas líneas celulares guarda relación con los cambios en la proteína VP1 (15) por lo que es posible que este hecho no sólo guarde relación con las células de línea linfóide sino también con el resto de los tejidos, los hallazgos del presente estudio llevan a la hipótesis de que las diferencias encontradas entre los tres virus inoculados, particularmente entre las posiciones 424 y 439 pudieran influir en las diferencias observadas durante la inoculación.

Los resultados de este estudio indican que la variabilidad genética del virus de anemia infecciosa es amplia en la región que codifica para la proteína VP1 y que pudiera tener relación con las características de patogenicidad y virulencia del virus.

CONCLUSIONES

1.- La variabilidad genética del virus de anemia infecciosa del pollo en la región que codifica para la proteína VP1 es amplia.

2.- Los cambios en la secuencia de la región estudiada llevan a la hipótesis de que pudieran influir en las características de patogenicidad y virulencia del virus principalmente en las posiciones 424 a 439.

3.- En México existen variantes genéticas del virus que no se han descrito en otros países.

4.- El uso de vacunas con virus activo atenuado puede propiciar la aparición de virus con características diferentes que derivan a través de los países que reciben en los pollos.

5.- La reacción en cadena de la polimerasa es la una técnica más rápida y confiable que el aislamiento en cultivo celular para el diagnóstico de anemia infecciosa del pollo.

6.- Los RFLP del fragmento de 675 pares de bases del gen VP1 pueden ser usados en estudios epidemiológicos del virus de anemia infecciosa.

IV LITERATURA CITADA

- 1.-Yuasa N, Taniguchi T and Yoshida I. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. *Avian Dis* 1979; 23: 366-385.
- 2.-McNulty MS. Chicken anaemia agent: a review. *Avian Pathol* 1991; 20: 187-203.
- 3.-Studert MJ. Circoviridae: new viruses for pigs, parrots and chickens. *Aust Vet J* 1993; 70: 121-122.
- 4.-Noteborn MH and Koch G. Chicken anemia virus infection: molecular basis of pathogenicity. *Avian Pathol* 1995; 24: 11-31.
- 5.-Goyro M, Suwa T, Matsumoto S, Umemura T and Itakura C. Serial propagation and purification of chicken anaemia agent in MDCC-MSB1 cell line. *Avian Pathol* 1987; 16: 149-163.
- 6.-McNulty MS, Curran WL, Todd D and Mackie DP. Chicken anemia agent: an electron microscopic study. *Avian Dis* 1990; 34: 736-743.
- 7.-Bülow VV and Schat K. Infectious anemia. *In: Calnek BW, Hoffstad S, Barnes HN, Reid WN and Yoder HW, editors. Diseases of poultry 10th ed. Ames Iowa: Iowa State University Press, 1997: 739-756.*
- 8.-Todd D, Creelan JL, Mackie DP, Rixon F and McNulty MS. Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent. *J Gen Virol* 1990; 71: 819-823.
- 9.-Noteborn MH, Boer GF, Roozelaar DJ, Karreman C, Kranenburg O, Vos JG, Jeurisen SH, Hoeben RC, Zantema A, Koch G, Ormond H and Eb AJ. Characterization of cloned Chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *J Virol* 1991; 65:3131-3139.
- 10.-Meehan BM, Todd D, Creelan JL, Earle JA, Hoey EM and McNulty MS. Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anaemia agent: sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments. *Arch Virol* 1992; 124:301-319.
- 11.-Claessens JA, Schirier CC, Mockett AP, Jagt EH and Sondermeijer PJ. Molecular cloning and sequence analysis of the genome of chicken anaemia agent. *J Gen Virol* 1991; 72: 2003-2006.
- 12.-Kato A, Fujino M, Nakamura A, Ishihama A, Otaki Y. Gene Organization of chicken anemia virus. *Virology* 1995; 209:480-488.
- 13.-Todd D, Mawhinney KA and McNulty MS. Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1661-1666.
- 14.-Farkas T, Tanaka A, Kai K and Kanoe M. Cloning and sequencing of the genome of chicken anaemia virus (CAV) TK-5803 strain and comparison with other CAV strain. *J Vet Med Sci* 1996; 58: 681-684.
- 15.-Renshaw RW, Soiné C, Weinkle T, O`Connell PH, Ohashi K, Watson S, Lucio B, Harrington S and Schat K. A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. *J Virol* 1996; 70: 8872-8878.
- 16.-Todd D, Connor TJ, Calvert VM, Creelan JL, Meehan BM and McNulty MS. Molecular cloning of an attenuated chicken anemia virus isolate following repeated cell culture passage. *Avian Pathol* 1995; 24: 171-187.

- 17.-Scott ANJ, Connor TJ, Creelan JL, McNulty MS and Todd D. Antigenicity and pathogenicity characteristics of molecularly cloned chicken anemia virus obtained following multiple cell culture passage. *Arch Virol* 1999; 144:1961-1975.
- 18.- Todd D, Connor TJ, Creelan JL, Borgmans BJ, Calvert VM and McNulty MS. Effects of multiple cell culture passages on the biological behaviour of chicken anemia virus. *Avian Pathol* 1998; 27: 74-79.
- 19.-McNulty MS, McIlroy SG, Bruce DW and Todd D. Economic effects of subclinical chicken anemia agent infection in broiler chickens. *Avian Dis* 1991; 35: 263-268.
- 20.-Lucio B. Anemia infecciosa aviar. Memorias del VIII Seminario internacional de patología aviar. 1994 junio 6-10; Athens, (Georgia), EUA: Universidad de Georgia, 1994: 486-506.
- 21.-McNulty MS. Chicken anemia agent. *In*: Chairman HG, Arp LH, Domermuth CH and Pearson JE, editors. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 2nd ed. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologist, 1989: 108-109.
- 22.-Chapa BJ y Lucio DE. Descripción de lesiones macroscópicas y microscópicas en aves libres de patógenos específicos inoculadas con el virus de la anemia infecciosa. Memorias de la XVIII Convención Nacional ANECA; 1993 mayo 5-9; Cancun, (Quintana Roo), México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 1993: 49-56.
- 23.-Goyro M, Suwa T, Umemura T, Itakura C and Yamashiro S. Histopathology of chicks inoculated with chicken anaemia agent (MSB1-TK5803 strain). *Avian Pathol* 1989; 18: 73-89.
- 24.-Toro H, Ramirez A and Larenas J. Pathogenicity of chicken anaemia virus (isolate 10343) for young and older chickens. *Avian Pathol* 1997; 26: 485-499.
- 25.-Todd D, Mawhinney KA, Graham DA and Scott AN. Development of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of chicken anaemia virus. *J Virol Methods* 1999; 82:177-184.
- 26.-Michalski W, O'Rourke D and Bagust T. Chicken anaemia virus antibody ELISA: problems with non-specific reactions. *Avian Pathol* 1996; 25: 245-254.
- 27.-Pages-Manté A, Saubi N, artigas C and Espuña E. Experimental evaluation of an inactivated vaccine against chicken anaemia virus. *Avian Pathol* 1997; 26: 721-729.
- 28.-Valle VMN y Lucio DE. Demostración de la presencia de anticuerpos y del virus de la anemia infecciosa en México por medio de la prueba de inmunoperoxidasa indirecta. Memorias de la XVIII Convención Nacional ANECA; 1993 mayo 5-9; Cancún, (Quintana Roo), México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 1993: 328-335.
- 29.-Ledesma N, Fehervari T, Casaubon MT, Lucio DE and Ratz F. Identification of chicken infectious anemia virus in Mexico, reproduction of disease and serology survey in commercial flocks. *Avian dis* 2001 4: 788-796.
- 30.-Ledesma MN, Fehervari T, Casaubon HMT y Lucio DE. Aislamiento del virus de anemia infecciosa del pollo en México reproducción del cuadro clínico y lesiones a partir de casos de campo. Memorias de la XXIII Convención ANECA 1998 mayo 6-9; Pto. Vallarta (Jalisco), México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas 1998: 124-126.

- 31.- Ledesma MN, Fehervari T, Casaubon HMT y Lucio DE. Reproducción de lesiones y cuadro clínico característico de la anemia infecciosa del pollo en México a partir de casos de campo. Memorias de VII Congreso Nacional de Patología Veterinaria SMPV 1998 junio 3-6; Manzanillo (Colima) México (DF): SMPV 1998: 10-11.
- 32.- Ledesma MN, Fehervari T, Casaubon HMT y Lucio DE. Efecto del virus de anaemia infecciosa del pollo aislado en México, sobre la vacunación y desafío con virus de ENC e IBF. Memorias de la XXIV Convención ANECA 1999 mayo 5-8; León (Guanajuato), México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas 1999: 177-182.
- 33.-Yuasa N Propagation and infectivity Titration of the Gifu-1 Strain of Chicken anemia agent in a Cell Line (MDCC-MSB1(Derived from Marek's Disease Lymphoma. Nat. Inst. Anm Heal Q 1983; 23: 3-30
- 34.- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. DNA Secuencing. In Molecular cloning a laboratory manual second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 13.1-13.104.
- 35.- Andrews EJ, Bennet BT, Clark JD, Hawpt KA, Pascoe GW and Bayce JR. Report of the AUMA. Panel of euthanasia veterinary medical. JAVMA. 1993: 235-239.
- 36.-Estrada FE, Peralta ZL y Rivas MP. Manual de técnicas histológicas. México: AGT Editor SA, 1982
- 37.-Olivares SE Paquete de diseños experimentales UANL. Versión 2.5 Facultad de agronomía UANL 1994.
- 38.- Yamaguchi S, Imada T, Kaki N, Mase M, Tsakamoto K, Tanimura N and Yuasa. Identification of a genetic determinat of pathogenicity in chicken anaemia virus, J Gen Virol 2001; 82: 1233-1238.

Tabla No. 1 Características de los casos positivos a anemia infecciosa

Caso Identificación Procedencia Estirpe* Edad Muestras estudiadas PCR Aislamiento en cultivo celular

Caso	Identificación	Procedencia	Estirpe*	Edad	Muestras estudiadas	PCR	Aislamiento en cultivo celular
1	3	Estado de México Toluca.	PE	5 sem	Timo, hígado y médula ósea	+	+8° pase
2	22	Estado de México	PE	3 sem	Timo, hígado y médula ósea	+	+8° pase
3	90	Guerrero Campo Rojo	PE	3 sem	Hígado	+	+9° pase
4	103	Estado de México Tenancingo	PE	5 sem	Timo, hígado, pulmón y médula ósea	+	+8° pase
5	115	Jalisco	PE	4 sem	Pulmón y tráquea	+	NR
6	116	Jalisco	PE	4 sem	Pulmón y tráquea	+	NR
7	117	Jalisco	PE	5 sem	Pulmón y tráquea	+	NR
8	118	Jalisco	PE	5 sem	Pulmón y tráquea	+	NR
9	119	Jalisco	PE	6 sem	Pulmón y tráquea	+	NR
10	120	Jalisco	PE	6 sem	Pulmón y tráquea	+	NR
11	121	Jalisco	PE	7 sem	Pulmón y tráquea	+	NR
12	122	Jalisco	PE	7 sem	Pulmón y tráquea	+	NR
13	141	Morelos Miacatlán	GP	7.4 sem	Timo, hígado, médula ósea y bolsa de Fabricio	+	+8° pase
14	160	Guerrero Texca	PE	1 sem	Timo, hígado y médula ósea	+	+10° pase
15	161	Morelos Cuautla	PE	1 sem	Timo, hígado, médula ósea y bolsa de Fabricio	+	+8° pase
16	169	Morelos Cuautla	PE	2 sem	Timo, hígado, médula ósea y bolsa de Fabricio	+	+7° pase
17	183	Hidalgo	PE	8 sem	Timo, hígado y médula ósea	+	+8° pase
18	184	Hidalgo	PE	8 sem	Timo, hígado y médula ósea	+	+8° pase
19	229	Guerrero	PE	5 sem	Timo, hígado y médula ósea	+	+9° pase
20	353	Estado de México Zumpango	RP	10 sem	Timo, hígado, médula ósea y bolsa de Fabricio	+	+8° pase
21	357	Hidalgo Mexitlán	RP	10 sem	Timo, hígado, médula ósea y bolsa de Fabricio	+	+8° pase
22 ^c	366	Estado de México Xilotepec	PE	6 sem	Timo, hígado y médula ósea	+	+ 6° pase
23	373	Estado de México Xilotepec	PE	6.2 sem	Timo, hígado y médula ósea	+	+8° pase
24	374	Querétaro Querétaro	PE	6.2 sem	Timo, hígado y médula ósea	+	+8° pase
25 ^d	431	Estado de México Amecameca	RP	8 sem	Timo, hígado y médula ósea	+	-18° pase
26	441	Morelos Tezoyuca	GP	4.5 sem	Timo, hígado y médula ósea	+	+10° pase
27	279/1	Querétaro Querétaro	PE	4 sem	Pulmón y tráquea	+	+8° pase
28	279/A	Querétaro Querétaro	PE	4 sem	Pulmón y tráquea	+	+8° pase
29 ^b	290	Veracruz	PE	6 sem	Timo, hígado y médula ósea	+	+9° pase
30 ^a	Vacuna 1	DF	Vac		Titulación de vacuna	+	+8° pase
31	Vacuna 2	DF	Vac		Titulación de vacuna	+	+8° pase

a, b y c son los virus utilizados en el desafío de aves libres de patógenos específicos

d es el virus que no se adaptó al cultivo celular

*PE (Pollo de engorda), GP (Gallina de postura), RP (Reproductoras pesadas), Vac (Vacunas de anemia infecciosa)

Tabla 2. Grupos de corte de los patrones de restricción para el fragmento de 675 pb correspondiente al gen VP1 del virus de anemia infecciosa con las enzimas *Hae*III, *Hin*fI y *Hpa*I

Sitios de corte para <i>Hae</i> III									Sitios de corte para <i>Hin</i> fI					Sitios de corte para <i>Hpa</i> I				Grupo de corte
1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	1	2	3	4	
+	+	+	+	+					+	+	+			+	+	+		1
+	+	+	+	+					+	+	+	+		+	+	+		2
	+	+	+						+	+	+			+	+	+		5
	+	+	+						+	+	+	+		+	+	+		8
+	+	+	+						+	+	+			+	+	+		9
+	+	+	+						+	+	+	+		+	+	+		6
	+	+	+	+					+	+	+	+		+	+	+		10
+	+	+	+				+		+	+	+			+	+	+		11
+	+	+	+					+		+	+			+	+	+		12
+	+		+	+					+	+	+			+	+	+	+	13

Tabla 3 Distribución de aislados por grupo de corte mediante las enzimas *Hae*III, *Hin*fI y *Hpa*I.

Grupo	Cepa de referencia	Aislados
1 AAA	Cux-1 o Gifu-1	90, 115, 121, 353, 366
2 ABA	TK5830	3, 290
3 BBA	87/10/44	
4 CCB	NI-CAV-1	
5 DAA	EF 88/78/2763	279/1
6 EBA	89/3711	103, 118, 184, 229
7 FBA	IMP704	
8 DBA		279/A
9 EAA		022, 119, 122, 141, 169, 183, 357, 373, 374, 441
10 GBA		116, 117
11 HBA		120, 160, 161
12 IDA		431
13 JAC		INTE 1

Tabla 4. Comparación de peso, hematocrito, ancho del timo y ancho de corteza tímica de pollos libres de patógenos específicos de 14 días, inoculados con tres virus de anemia infecciosa.

Grupo	Peso (g)	Hematocrito (%)	Ancho del timo (cm)	Ancho de corteza tímica (μm)
Testigo	75.49 a*	37.76 a*	0.442 a*	204.6 a*
A (Vac)	72.13 a	26.55 b	0.296 c	81.6 c
B (290)	64.86 b	34.3 a	0.377 b	153.0 b
C (366)	62.45 b	14.52 c	0.148 d	0 d

*literales diferentes en una misma columna indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$

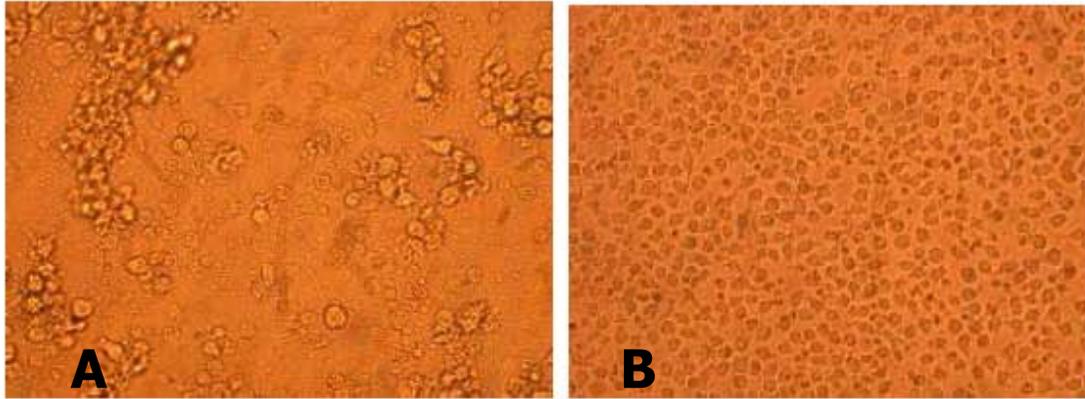


Figura 1. Microfotografía de cultivos celulares MDCC-MSB1. **A** Células infectadas mostrando efecto citopático por virus de anemia infecciosa del pollo después de 72 horas posinoculación. **B** células sanas. (70X).

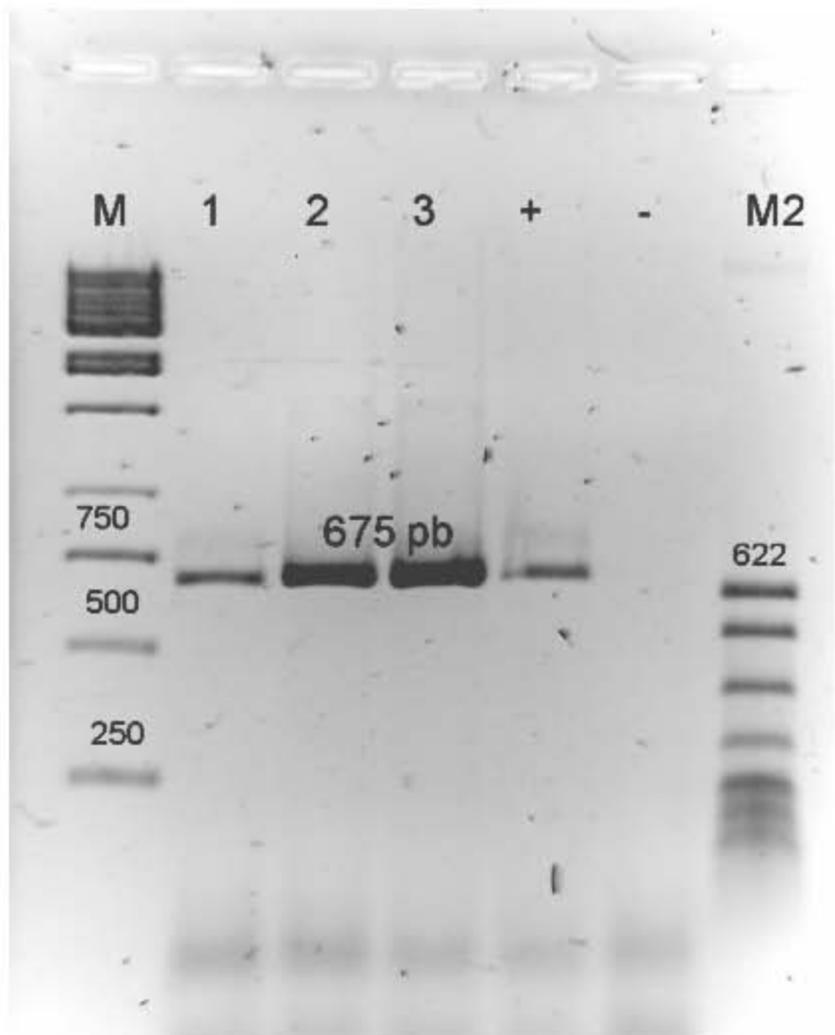
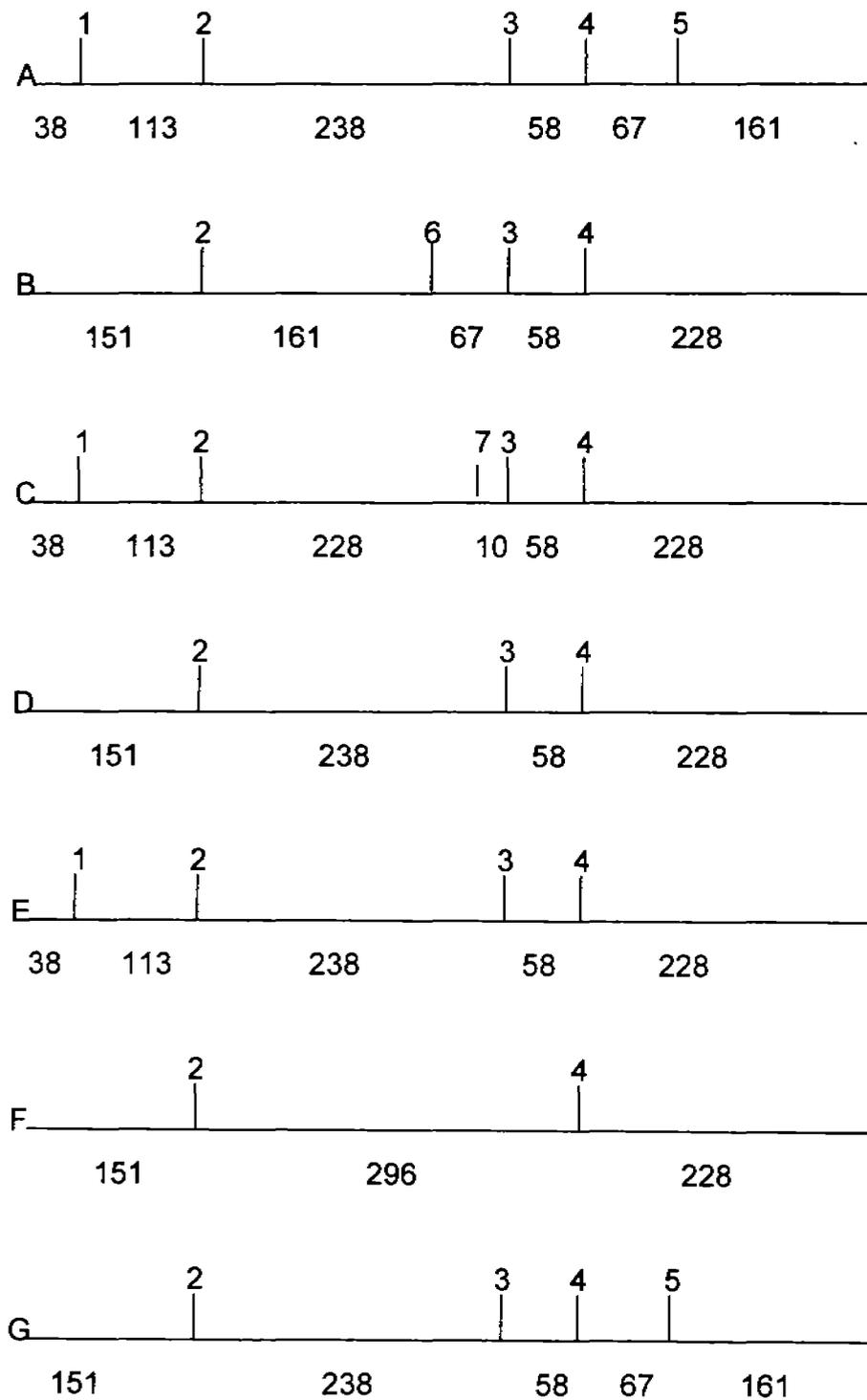
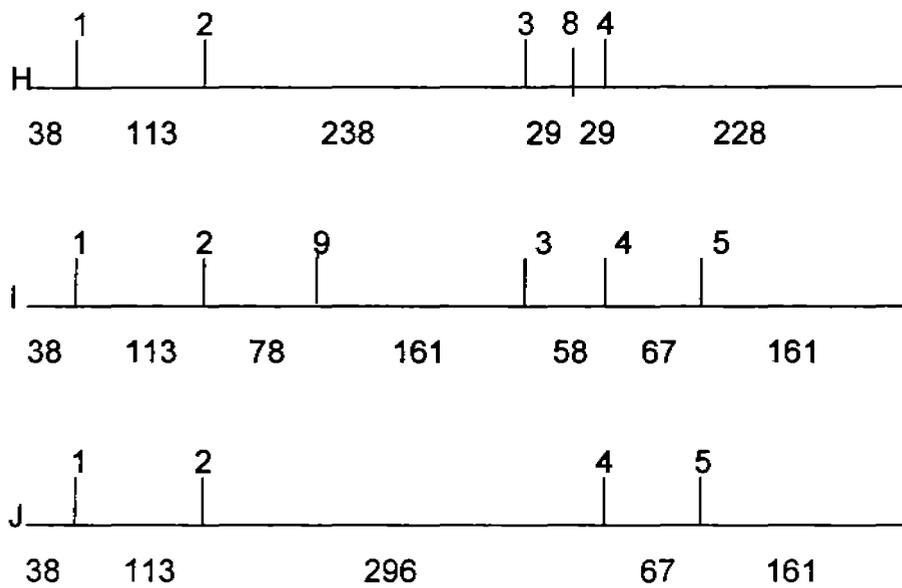


Figura 2. Casos positivos al virus de anemia infecciosa mediante PCR. Se muestran bandas de 675 pares de bases. **M** Marcador 1 kb, **1** Caso 357, **2** Caso 366, **3** vacuna 2, **+** Testigo positivo, **-** Testigo Negativo, **M2** Marcador pBR 322 *Msp* I. Gel de agarosa 1%.

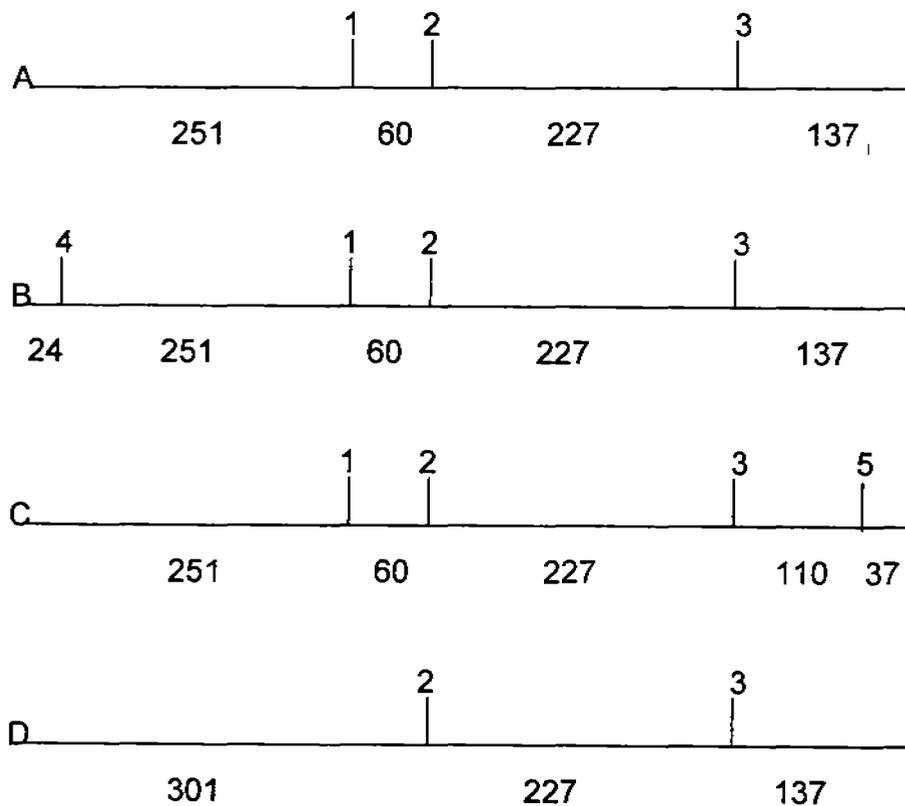
Figura 3. Sitios de corte y fragmentos generados por la enzima *Hae*III sobre el fragmento de 675 pb del gen VP1 del virus de anemia infecciosa del pollo





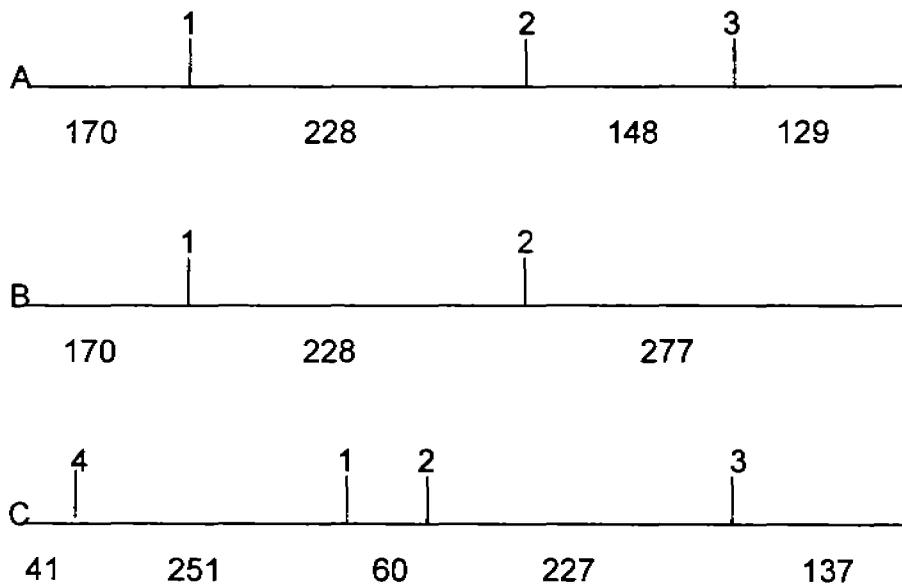
Los patrones son indicados con una letra. g, h i y j no habían sido descritos con anterioridad

Figura 4. Sitios de corte y fragmentos generados por la enzima *Hin*I sobre el fragmento de 675 pb del gen VP1 del virus de anemia infecciosa del pollo



El patrón D no había sido descrito con anterioridad

Figura 5. Sitios de corte y fragmentos generados por la enzima *Hpa*II sobre el fragmento de 675 pb del gen VP1 del virus de anemia infecciosa del pollo



El patrón C no había sido descrito con anterioridad

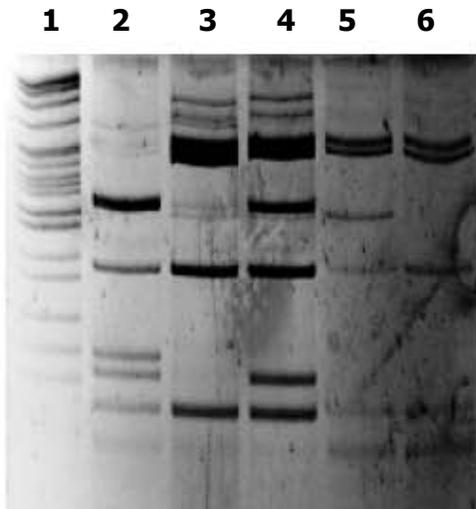


Figura 6. Patrones de restricción para el gen VP1 del virus de anemia infecciosa con la enzima *HaeIII*. **1** Marcador pbR322 DNA *MspI*, **2** Patrón I (Caso 431), **3** Patrón E (Caso 229), **4** Patrón A (Caso 290), **5** Patrón E (Caso 441), **6** Patrón H (Caso 160). Gel de acrilamida al 10%.

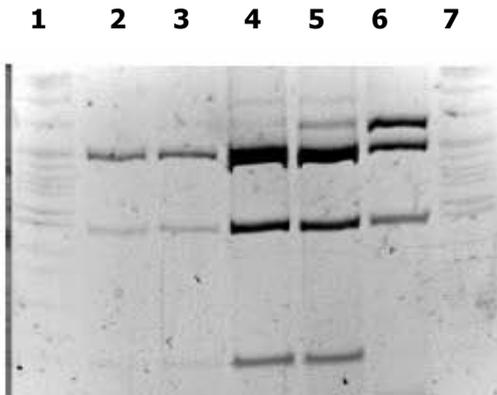


Figura 7. Patrones de restricción para el gen VP1 del virus de anemia infecciosa con la enzima *HinfI*. **1** y **7** Marcador pbR322 DNA *MspI*, **2** Patrón B (Caso 160), **3** Patrón B (Caso 229), **4** Patrón A (Caso 290), **5** Patrón A (Caso 441), **6** Patrón D (Caso 431). Gel de acrilamida al 10%.

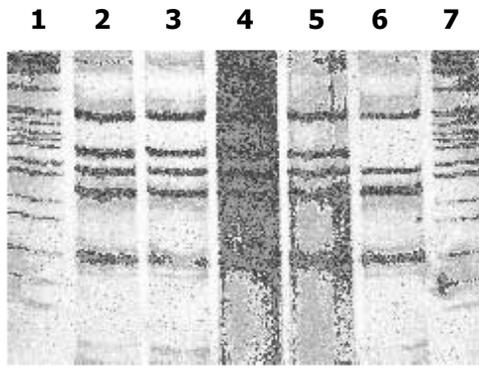


Figura 8. Patrones de restricción para el gen VP1 del virus de anemia infecciosa con la enzima *Hpa*II. **1** y **7** Marcador pbR322 DNA MspI, **2** Patrón A (Caso 431), **3** Patrón A (Caso 229), **4** Patrón A (Caso 290), **5** Patrón A (Caso 441), **6** Patrón C (Caso Vacuna 1). Gel de acrilamida al 10%.

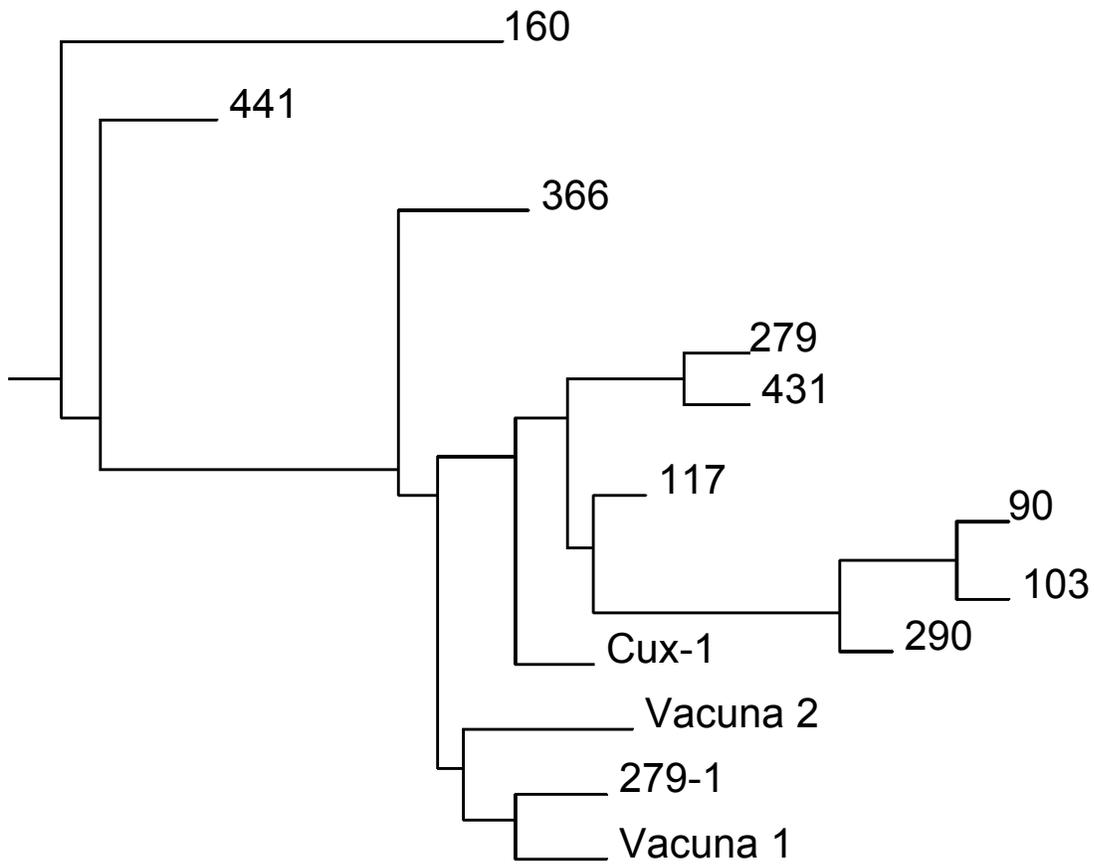


Figura 9 Filogenia de 12 aislados mexicanos del virus de anemia infecciosa del pollo tomando en cuenta la secuencia de un fragmento de 675 pares de bases correspondiente a las posiciones 844 a 1519 del genoma del virus Cux-1. Elaborado con el programa Clone Manager Suite 7.0

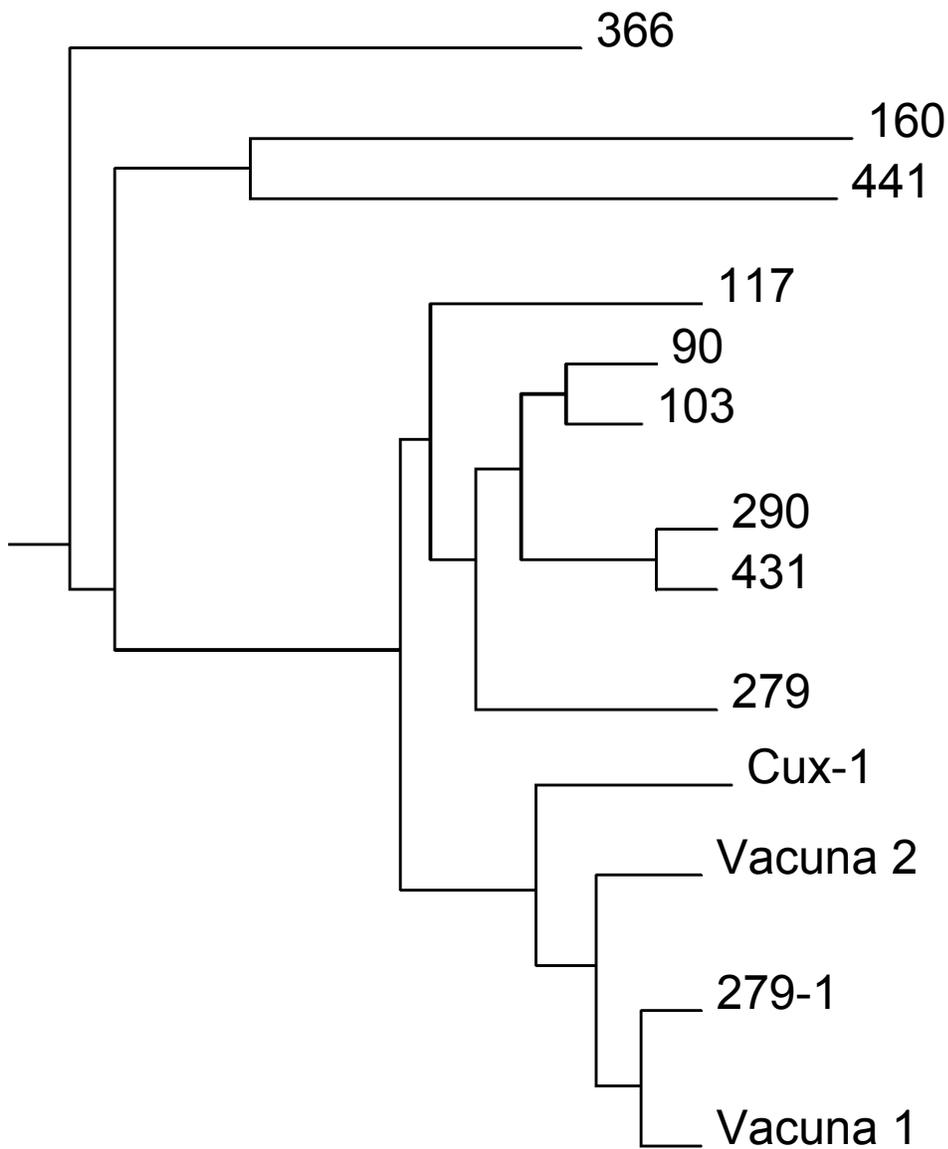


Figura 10. Filogenia de 12 aislados mexicanos del virus de anemia infecciosa del pollo tomando en cuenta la secuencia de aminoácidos de un fragmento de 675 pares de bases correspondiente a las posiciones 844 a 1519 del genoma del virus Cux-1. Elaborado con el programa Clone Manager Suite 7.0

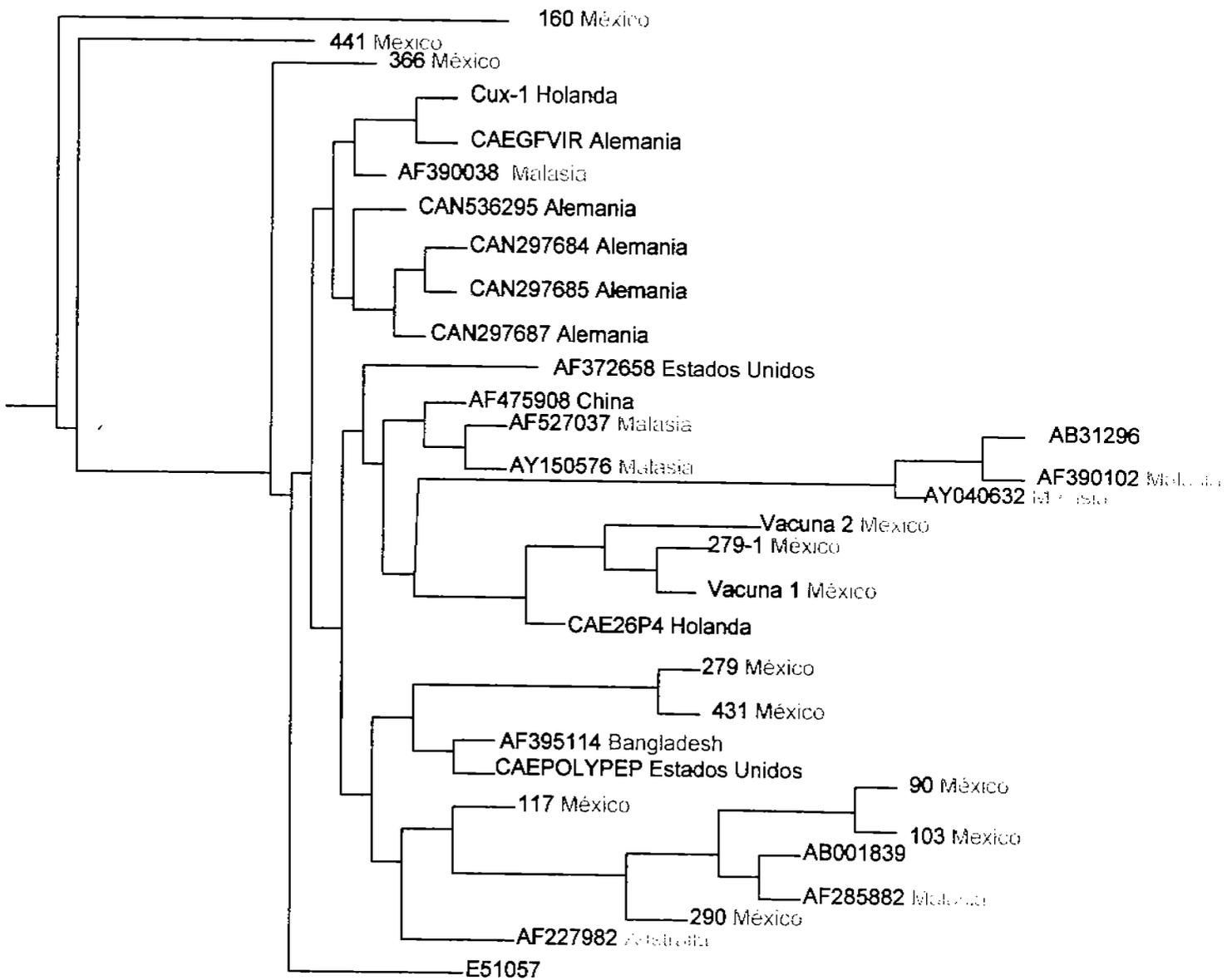


Figura 11. Filogenia de 33 aislados del virus de anemia infecciosa tomando en cuenta la secuencia de bases a partir de un fragmento de 675 pares de bases correspondiente a las posiciones 844 a 1519 del genoma del virus Cux-1. Elaborado con Clone Manager Suite 7.0

Figura 12. Alineamiento de bases de un fragmento de 675 pb del gen VP1 de 12 aislados mexicanos del virus de anemia infecciosa del pollo

```

441      1 gactgtaagatggcaagacgagctcgcagaccgagaggccgattttacgccttcagaagaggacggtggcaccacctcaagcgacttcgtcgaagatata
Vacuna 2 1 .....g.....a.....
90      1 .....g.....a.....
103     1 .....g.....a.....
117     1 .....a.....a.....a.....
160     1 .....c.....a.....a.....
279     1 .....g.....a.....a.....a.....
279-1   1 .....g.....a.....a.....
290     1 .....a.....a.....
366     1 .....a.....
431     1 .....a.....
Vacuna 1 1 .....g.....a.....

```

35

```

441      101 aatttcgacatcggaggagacagcggatcgtagacgagcttttaggaaggcctttcacaacccccgccccggtacgtatagtgtgaggctgccgaacc
Vacuna 2 101 .....a.....
90      101 .....a.....
103     101 .....a.....
117     101 .....c.....t.....
160     101 .....c.....t.....
279     101 .....
279-1   101 .....
290     101 .....
366     101 .....
431     101 .....
Vacuna 1 101 .....

```

```

441      201 ccaatctactatgactatccgcttccaaggaatcatctttcttaccgaaggactcattctgcctaaaaacagcacagggggggctatgcataccacatg
Vacuna 2 201 .....a.....g.....c.g.....c.....a.....g.....
90      201 a.g.a.g.....t.....t.....c.....g.....c.....
103     201 ..g.a.g.....t.....t.....c.....g.....c.....

```

117 201t.....c.....gg.....c.a
 160 201a.....g.tcat...t...g.....t.....g.....
 279 201g.....c.g.....c.....g.....t..
 279-1 201a.....g.....c.g.....c.....a.....g.....
 290 201t.....c.....g.....c..
 366 201g.....c.g.....c.....g.....t..
 431 201g.....c.g.....c.....g.....t..
 Vacuna 1 201a.....g.....c.....a.....g.....

441 301 tacggggcgagaatcgccaaagactttttaaacctggaagagttcctgctagccgtaatgaaactgacatacttgagcaaaatcggaggcccttcgccc
 Vacuna 2 301g.....gat..c.g.....a.....gtc.....c.....g.....a...a...g
 90 301g.....gat..cag.g.....a.....c.....gtc.....c.....g.....a.....a...g
 103 301g.....gat..cag.g.....a.....c.....gtc.....c.....g.....a.....a...g
 117 301g.....gat..cag.g.....a.....c.....gtc.....c.c.....g.....a...g
 160 301gc.....ga.t..cc.g.....a..g.....tc..aa..c.....c.t..c.....a..t..
 279 301g.....gat..ccg.g.....a.....gtc.....c.....g.....a...g
 279-1 301g.....gat..c.g.....a.....gtc.....c.....g.....a...g
 290 301g.....gat..cag.g.....a.....c.....gtc.....c.....g.....a...g
 366 301g.....gat..c.g.....a.g.....gtc.....c.....g.....t.....a...g
 431 301g.g.....gat..ccg.g.....a.....gtc.....c.....g.....a...g
 Vacuna 1 301g.....gat..c.g.....a.....gtc.....c.....g.....a...g

441 401 ggggtgttgattgcgaacggctctaaattccaaagcccgagaactggcctaattgctggctaccgctagataataacgtgccctccgctacaccatcggc
 Vacuna 2 401 .t.a.....g...g...c..aca..gc.g.cga..t.....gg.cg.ta.a.....a...t...g.....
 90 401 .t.a.....g...g...c..aca..gcag..c...t.....g.....
 103 401 .t.a.....g...g...c..ca..gcag..c...t.....g.....
 117 401 .t.a.....ggac.g...c..ca..gc.g.cca..t.....g..t.....t.....
 160 401 .taa.....gcg...g...at...cc.g...a..t..c..c.....c.cg..t...a.....at.g...
 279 401 .t.a.....g...g...c..ct..gc.g..c.....g.....
 279-1 401 .t.a.....g...g...c..ca..gc.g...t.....g.....a.....g.....
 290 401 .t.a.....g...g...c..ca..gc.g..c.....g.....
 366 401 .t.a.....g...g...c..ct..gc.g...t.....g.....
 431 401 .t.a.....g...g...c..ct..gc.g..c.....g.....g.....
 Vacuna 1 401 .t.a.....g...g...c..ca..gc.g..c...t.....g.....a.....g.....

Figura 13 alineamiento de aminoácidos de un fragmento de 675 pb del gen VP1 de 12 aislamientos mexicanos del virus de anemia infecciosa

```

441      1 dckmarrarrprgrfyafrrgrwhhllkrlrrrykfrhrrrrqyrrrafrkafhnrprpgtysvrlpnpqstmtirfqqiiflteglilpknstgggyayhm
Vacuna 2 1 .....v.....a.d.d..
90      1 .....q.....a....d.l
103     1 .....q.....a....d.l
117     1 .....t.....n.....a....d.l
160     1 .....t.....t.....c.....vh.f.....v....d..
279     1 ..e...t.....n.....a....d.l
279-1   1 .....v.....a.d.d..
290     1 .....a....d.l
366     1 .....v.....a....d..
431     1 .....a....d.l
Vacuna 1 1 .....v.....a.d.d..

441     301 ygariakdfnlieefllavmkltylskiggpfarvliangskfqspenwpcwlpldnnvpsatpsawrrwalmmmqptdscrffnhpkqmtlqdmgrmf
Vacuna 2 301 ...v.isv.k...s.n..v....i.ge...d...s.arg.....avk..m.....v
90      301 ...v.isv.k...s.n..v....i.ge...d..qt.aaq.....
103     301 ...v.isv.k...s.n..v....i.ge...d..qs.aaq.....
117     301 ...v.isv.k...s.n..v....i.ge...gr.qs.aap.....f....ge.....l.....
160     301 ...a.n...kg...skn...q...iv.k.gd...y.pa..c...cp..e.....iw..ggg...v.p.ef.....
279     301 ...v.isv.k...s.n..v....i.ge...d..qs.aaq.....
279-1   301 ...v.isv.k...s.n..v....i.ge...d...s.aa.....m.....
290     301 ...v.isv.k...s.n..v....i.ge...d..qs.aaq.....
366     301 ...v.isv.k...s.n..v..f..i.ge...d...s.aa.....g.....
431     301 ...v.isv.k...s.n..v....i.ge...d..qs.aaq.....
Vacuna 1 301 ...v.isv.k...s.n..v....i.ge...d...s.aaq.....m.....

441     601 ggwhlfrhietpfqlatknegsfs
Vacuna 2 601 .....v..r.....
90      601 .....r.....
103     601 .....r.hv.....
117     601 .....r.....
160     601 .....r.....
279     601 .....r.....
279-1   601 .....l..r....ne.....
290     601 .....r.....h.....
366     601 .....v.n.es.g.....
431     601 .....r....p.....
Vacuna 1 601 .....v..r.....

```

38

Figura 14. Alineamiento de bases de un fragmento de 675 pb del gen VP1 de 33 aislamientos del virus de anemia infecciosa del pollo.

39

```

CAEGFVIR      1 gactgtaagatggcaagacgagctcgagaccgagaggccgattttacgccttcagaagaggacggtggcaccacctcaagcgacttcgacgaaaatata
Cux 1         1 .....t.....g.....
E51057        1 .....g.....
CAN536295     1 .....g.....
AY150576     1 .....g.....
AF527037     1 .....g.....
AY040632     1 .....g.....
AF390102     1 .....g.....
AF395114     1 .....g.....
AF390038     1 .....g.....
AF475908     1 .....g.....
CAN297685     1 .....g.....
CAN297684     1 .....g.g.....
AF285882     1 .....g.g.....
AF227982     1 .....a.....g.....
CAN297687     1 .....g.....
AF372658     1 .....g.g.....
AB031296     1 .....g.....
CAEPOLYPEP   1 .....a.....g.....
CAE26P4      1 .....g.g.....
AB001893     1 .....a.....g.....
Vacuna 1 México 1 .....g.....g.....
90 México    1 .....g.....g.....
103 México   1 .....a.g.....g.....
117 México   1 .....a.....a.....g.....
160 México   1 .....c.....a.....g.....
279-1 México 1 .....g.....a.....g.....
279 México   1 .....g.....a.....a.....g.....
290 México   1 .....a.....g.....g.....
366 México   1 .....a.....g.....g.....
431 México   1 .....a.....g.....g.....
441 México   1 .....t.....g.....g.....
Vacuna 2 México 1 .....g.....g.....

```

CAEGFVIR	101	aatttcgacatcggaggagacagcggatcgtagacgagccttttaggaaggcctttcacaacccccgccccgtacgtatagtgaggctgccgaaccc
Cux 1	101
E51057	101
CAN536295	101
AY150576	101
AF527037	101
AY040632	101g.....
AF390102	101
AF395114	101
AF390038	101
AF475908	101
CAN297685	101
CAN297684	101
AF285882	101a.....
AF227982	101a.....
CAN297687	101t.....
AF372658	101
AB031296	101
CAEPOLYPEP	101
CAE26P4	101
AB001893	101a.....
Vacuna 1 Mexico	101
90 Mexico	101a.....
103 Mexico	101a.....
117 Mexico	101
160 Mexico	101c.....t.....
279-1 Mexico	101
279 Mexico	101
290 Mexico	101
366 Mexico	101
431 Mexico	101
441 Mexico	101
Vacuna 2 Mexico	101
CAEGFVIR	201	ccaatctactatgactatccgcttccaaggggtcatctttctcacggaaggactcattctgcctaaaaacagcacagcggggggctatgcagaccacatg
Cux -1	201a.....a.....
E51057	201a.....a.....
CAN536295	201
AY150576	201a.....a.....

AF527037	201a.....
AY040632	201c.....a.....
AF390102	201c.....a.....c.....
AF395114	201aa.....t.....
AF390038	201
AF475908	201a.....a.....
CAN297685	201a.....g.....
CAN297684	201a.....
AF285882	201	..g..a..g.....t...aa...t...t.c.....a.....t...aa...g...c..
AF227982	201	..g..c..g.....a.....c.....a.....t...aa...g.....
CAN297687	201a.....g.....
AF372658	201a.....
AB031296	201c.....a.....
CAEPOLYPEP	201aa...a.....t.....
CAE26P4	201a.....a.....
AB001893	201	..g..a..g.....t...aa...t...t.c.....a.....t...a.....c.c
Vacuna 1 Mexico	201a.....a.....t.c.....a.....
90 Mexico	201	a..g..a..g.....t...aa...t...t.c.....c..
103 Mexico	201	..g..a..g.....t...aa...t...t.c.....c..
117 Mexico	201aa...t...t.c.....g...c.a
160 Mexico	201a.....a.tcat..t.t.....t.....
279-1 Mexico	201a.....a.....a.....
279 Mexico	201a.....t.....
290 Mexico	201aa...t...t.c.....c..
366 Mexico	201a.....
431 Mexico	201a.....t.....
441 Mexico	201aa...t...c.....g...t.....
Vacuna 2 Mexico	201a.....a.....a.....

CAEGFVIR	301	tacggggcgagagtgccaagatctctgtgaacctgaaagagttcctgctagcctcaatgaacctgacatacgtgagcaaaatcggaggcccatcgccg
Cux- 1	301
E51057	301a.....g.....g.....a.....c.....
CAN536295	301c.....
AY150576	301a.....t...tg.....
AF527037	301a.....g.....
AY040632	301g.....
AF390102	301g.....
AF395114	301c.....g.....
AF390038	301g.....

AF475908	301a.....g.....
CAN297685	301c.g.....
CAN297684	301c.g.....
AF285882	301a.a.....c.g.....a.a.....
AF227982	301a.....c.a.....g.a.....
CAN297687	301c.....
AF372658	301a.....a.g.....
AB031296	301g.....
CAEPOLYPEP	301g.....
CAE26P4	301a.....g.....
AB001893	301a.....c.g.....a.....
Vacuna 1 Mexico	301a.....g.....
90 Mexico	301a.....c.g.....a.....
103 Mexico	301a.....c.g.....a.....
117 Mexico	301a.....c.g.....a.....
160 Mexico	301c.....at.tcc.....g.....aa.....c.t.c.....t.c
279-1 Mexico	301a.....g.....
279 Mexico	301c.....g.....
290 Mexico	301a.....c.g.....
366 Mexico	301a.....g.....g.....t.....
431 Mexico	301g.....c.....g.....g.....
441 Mexico	301a.....aga.t.t.a.....g.....gt.....a.....t.....t.....c
Vacuna 2 Mexico	301a.....g.....g.....a.....

42

CAEGFVIR	401	gtgagttgattgcggaacgggtctaaatcacaagccgcgacaattggcctaattgctggctgccgctagataataacgtgccctccgctacaccatcggc
Cux-1	401g.g.....g.c.....g.....
E51057	401t.....g.....
CAN536295	401g.....a.a.....g.....
AY150576	401g.....a.....g.....
AF527037	401g.....g.....a.....g.....
AY040632	401g.....g.....a.....g.....
AF390102	401g.....g.....a.....
AF395114	401ac.....c.g.c.....c.....a.....
AF390038	401g.....c.....a.....
AF475908	401g.....g.....g.....
CAN297685	401t.....g.....g.....
CAN297684	401t.....g.....g.....
AF285882	401c.....c.g.....
AF227982	401g.....g.c.....a.....t.....

CAN297687 401t.....g.....
 AF372658 401g.....g.....g.....
 AB031296 401g.....g.....a.....
 CAEPOLYPEP 401c.....c.g.c.....g.....
 CAE26P4 401g.....a.....g.....
 AB001893 401c.....c.g.....
 Vacuna 1 México 401c.g.....a.....g.....
 90 México 401c.a.....a.c.g.....
 103 México 401c.....a.c.g.....
 117 México 401gac.....c.cca.....t.....t.....
 160 México 401 ..a.....gc.....at.c.....a.c.c.....c.c.t.....a.....at.g...
 279-1 México 401g.....a.....g.....
 279 México 401c.t.....c.g.c.....
 290 México 401c.....c.g.c.....
 366 México 401t.....g.....a.....g.....
 431 México 401c.t.....c.g.c.....g.g.....
 441 México 401 .g.t.....a.c.....tc.ag.c.g.c.....a.....
 Vacuna 2 México 401cgc.ga.....g.cg.ta.a.....a.t.g.....

43

CAEGFVIR 501 atgggtggagatgggccttaatgatgatgcagcccaaggactcttgccggttctttaatcacc-aaagcagatgaccctgcaagacatgggtcgcgatgtt
 Cux- 1 501-.....
 E51057 501-t.....a.....
 CAN536295 501-.....
 AY150576 501-t.....a.....t.....
 AF527037 501-t.....a.....
 AY040632 501-t.....t.....
 AF390102 501-t.....t.....
 AF395114 501-t.....
 AF390038 501-.....
 AF475908 501t.....-t.....a.....
 CAN297685 501-.....
 CAN297684 501-.....
 AF285882 501t.....t.....-t.a.a.....g.....
 AF227982 501t.....a.c.....t.....-t.a.....g.....
 CAN297687 501-.....
 AF372658 501tc.c.....-t.....
 AB031296 501-t.....t.....
 CAEPOLYPEP 501c.....-t.....
 CAE26P4 501-t.....

AB001893	501t.....t.....a.....g.....
Vacuna 1 Mexico	501-t.....g.....
90 Mexico	501t.....-t.a.....g.....
103 Mexico	501t.....-t.a.a.....g.....
117 Mexico	501	...g.ga.....t.....a.....t-a.a.....g.....
160 Mexico	501	...g.g.g.....g.t...c.....a.t.....-.....g.....
279-1 Mexico	501-t.....g.....
279 Mexico	501-t.....a.....g.....
290 Mexico	501t.....-t.a.a.....g.....
366 Mexico	501gg.....-t.....a.....g.....
431 Mexico	501-t.....a.....g.....
441 Mexico	501-t.....a.....g.....
Vacuna 2 Mexico	501-t.....g.....g.....

CAEGFVIR	600	tgggggctggcacctgttccgacacattgaaacccgctttcagctccttgccactaagaatgagggatccttcagcc-
Cux- 1	600-
E51057	600-
CAN536295	600-
AY150576	600-
AF527037	600g.....c.....-
AY040632	600a.....-
AF390102	600a.....-
AF395114	600-
AF390038	600t.c.....-
AF475908	600-
CAN297685	600	...a.....-
CAN297684	600-
AF285882	600-
AF227982	600t.....-
CAN297687	600-
AF372658	600-
AB031296	600a.....-
CAEPOLYPEP	600g.....-
CAE26P4	600-
AB001893	601-
Vacuna 1 Mexico	600g.....-
90 Mexico	600-
103 Mexico	600cg.....-
117 Mexico	600t.....-

160 México	600	-
270-1 México	600t.....c.....a.g.....	-
270 México	600	-
290 México	600ca.....	-
360 México	600g.....a.c.....g.tc.....g.....	-
430 México	600c.....	-
440 México	600cg.....	-
Vacuna 2 México	600g.....	-

Clone Manager Suite 7

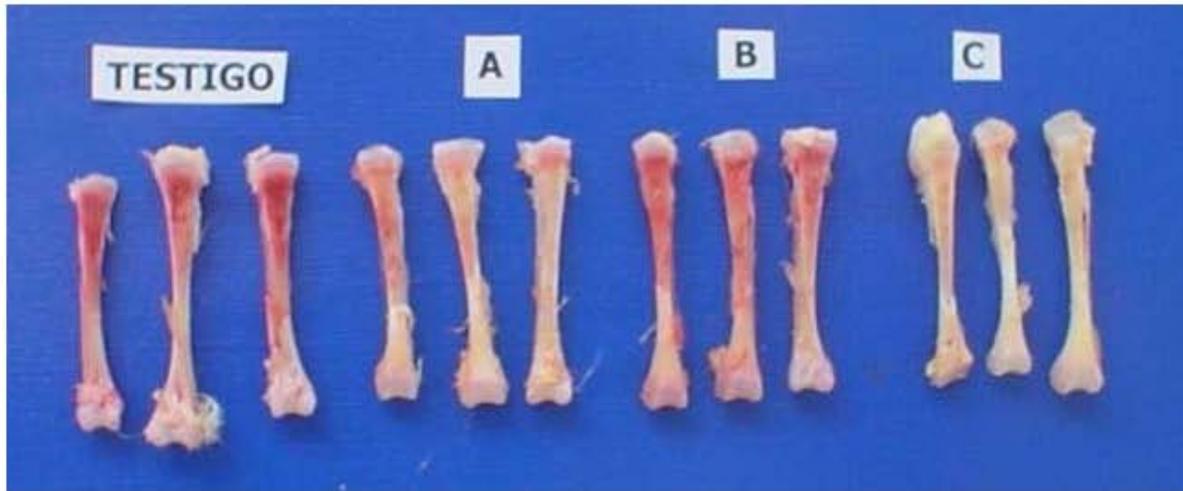


Figura 15. Médula ósea de aves libres de patógenos específicos desafiadas con tres virus de anemia infecciosa del pollo A (Vacuna 1), B (290 México), C (366 México). Se muestran diferentes grados de atrofia.

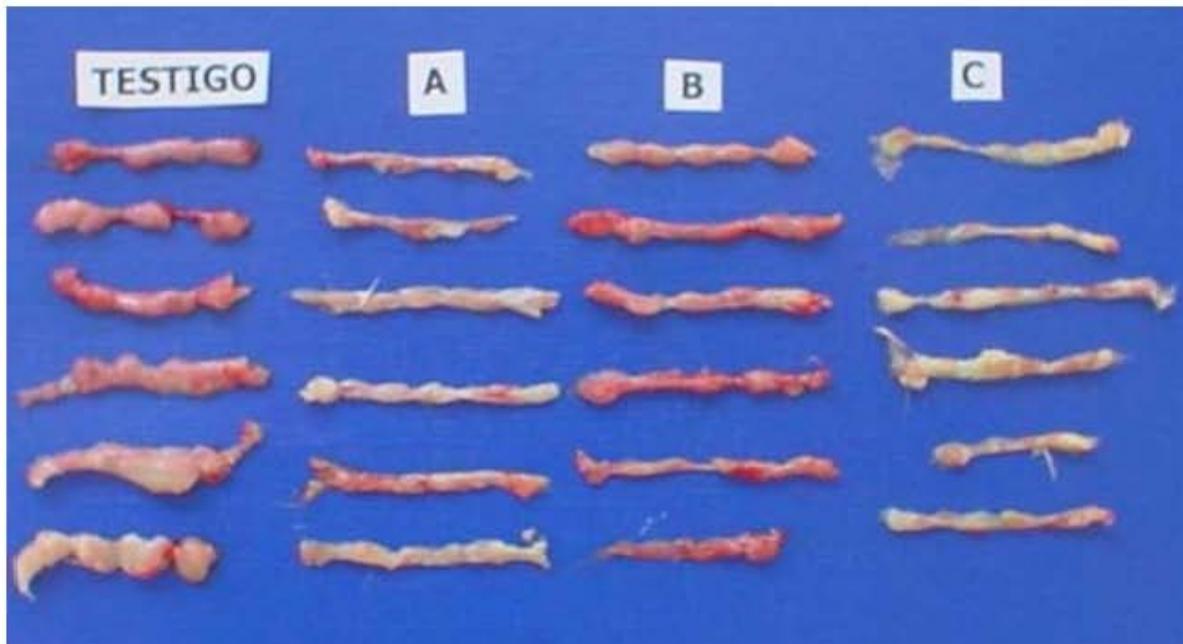


Figura 16 Timo de aves libres de patógenos específicos desafiadas con tres virus de anemia infecciosa del pollo. A (Vacuna 1), B (290 México), C (366 México). Se muestran diferentes grados de atrofia.

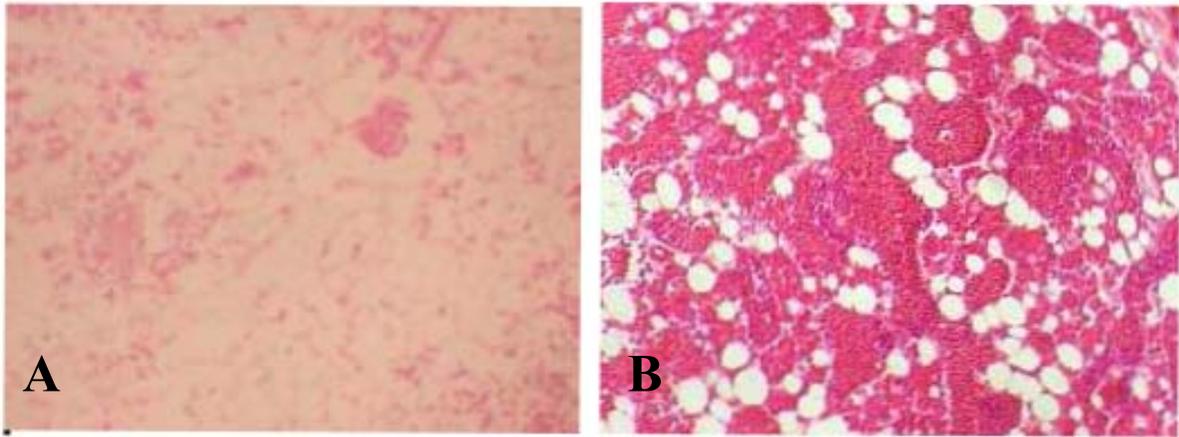


Figura 17. Microfotografía de médula ósea de aves libres de patógenos específicos desafiadas con virus de anemia infecciosa del pollo. A ave inoculada con el virus 366 mostrando atrofia severa con metaplasma adiposa (H&E 100X). B aves testigo negativo mostrando médula ósea sin cambios patológicos aparentes (H&E 100 X)

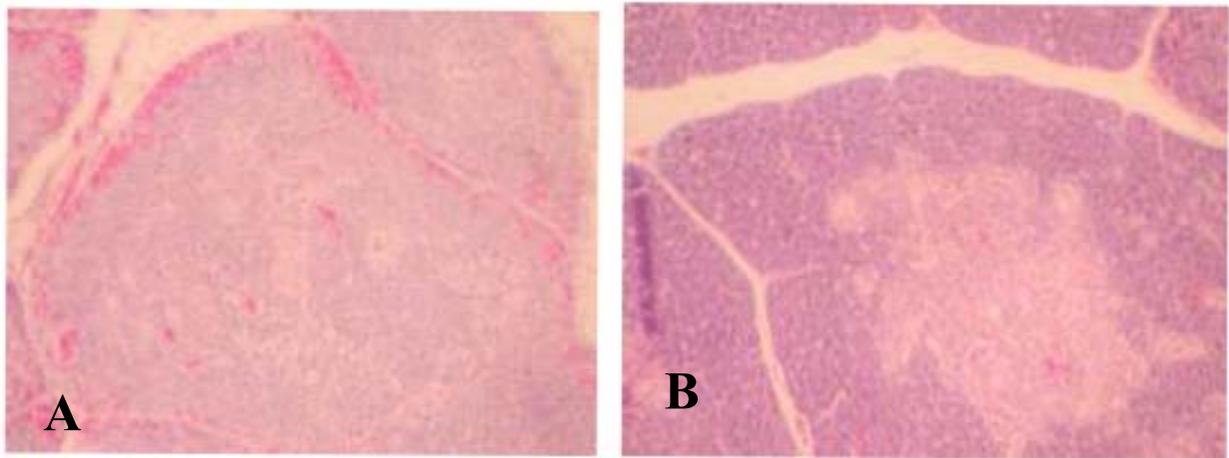


Figura 18. Microfotografía de timo de aves libres de patógenos específicos desafiadas con virus de anemia infecciosa del pollo. A ave inoculada con el virus 366 mostrando atrofia severa de corteza (H&E 150X). B ave testigo negativo mostrando timo sin cambios patológicos aparentes (H&E 100 X).