



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS.

---

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS VIRUS DE BRONQUITIS  
INFECCIOSA AVIAR, LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE Y  
LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA EN GRANJAS DE GALLINAS  
PONEDORAS DE LA PROVINCIA DE TUNGURAHUA, ECUADOR”**

**AUTOR:** Revelo Cueva, María del Carmen

**DIRECTOR:** Dra. Echeverría, María Gabriela

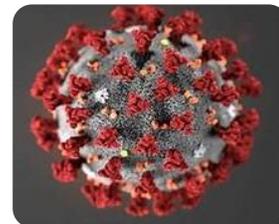
**CO-DIRECTOR:** Dr. Vinueza, Christian

**LUGAR DE TRABAJO:** Unidad de Investigación de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Resistencia a los Antimicrobianos (UNIETAR), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador.



**MIEMBROS DEL JURADO:**

Prof. Dra. Dolcini, Guillermina Laura  
Prof. Dr. Gornatti Churria, Carlos Daniel  
Dra. Pérez, Sandra Elizabeth



**2022**



*Ref. Expediente Nro.0600-7962/18-000 – Revelo Cueva, Ma. del Carmen  
Acta 234-2022*

Siendo las 12.57 horas del viernes 4 de noviembre del año 2022, comienza la defensa oral y pública del Trabajo de Tesis Doctoral de la MVZ. María del Carmen Revelo Cueva, titulado “Caracterización molecular de los virus de bronquitis infecciosa aviar, la enfermedad de newcastle y laringotraqueitis infecciosa en granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Tungurahua, Ecuador”, dirigido por la Dra. Gabriela Echeverría y codirigido por el Dr. Christian Vinueza.

Para ello se reúnen a través de videoconferencia (amparado por Resolución 667/20 y ampliatorias; y Ordenanza de Posgrado 261/19, artículo 54 y Resolución Ministerial 160/11, artículo 8), las Señoras Profesoras Doctoras Guillermina Dolcini (UNCPBA) y Sandra Elizabeth Pérez (UNCPBA) y el Señor Profesor Doctor Carlos Daniel Gomatti Churria (UNLP), integrantes del Jurado encargado de dictaminar sobre la aceptación o rechazo del mencionado Trabajo de Tesis.

Luego de deliberar sobre el trabajo presentado para acceder al título de Doctor en Ciencias Veterinarias, el Jurado resolvió:

El trabajo resultó original y constituye un aporte para la industria avícola en Ecuador y en la región en lo que respecta a las enfermedades infecciosas. Se destaca la puesta a punto de metodologías a ser transferidas a nivel del sector productivo y gubernamental, para el control de las enfermedades avícolas.

La presentación fue clara, amena, ordenada y muy ilustrativa, con recursos audiovisuales variados, y buen manejo de los tiempos. La tesista respondió con solvencia las preguntas del jurado, demostrando amplio conocimiento de la temática. Por todo lo expuesto, este jurado por unanimidad considera calificar el trabajo de tesis con una calificación de 10 (diez) sobresaliente y recomienda su publicación.

**Participación remota:**

*Doctora Guillermina Dolcini, Jurado*

*Doctora Sandra Elizabeth Pérez, Jurado*

*Doctor Carlos Daniel Gomatti Churria, Jurado*

*Doctora Gabriela Echeverría, Directora*

*Doctor Christian Vinueza, Codirector*

*MVZ. María del Carmen Revelo Cueva, Tesista*

**PERAL  
GARCÍA**  
Dra. Pilar Peral García  
Secretaría de Posgrado  
FCV - UNLP

Firmado digitalmente por PERAL GARCÍA Pilar  
Fecha: 2022.11.05 16:40:37 -03'00'

*Ref. Expediente Nro.0600-7962/18-000 – Revelo Cueva, Ma. del Carmen  
Acta 234-2022*

## DEDICATORIA

*“Yo le digo al SEÑOR: Tú eres mi refugio,  
mi fortaleza, el Dios en quien confío” Salmo 91:2.*

A Dios, que nunca ha soltado mi mano  
y ha caminado siempre junto mí.

Para mi viejita, mi abuelita, que se fue sin despedirse,  
pero que me dejó todo lo bueno que soy y puedo ser.

Para mi madre, mi amiga, que nunca pierde la fe en mí,  
por su confianza y cariño incondicionales.

Para mis tíos, tías, primo, primas que siempre me brindan sus oraciones,  
consejos y palabras de aliento.

Para mi compañera de vida por elección,  
que me hace ser mejor y dar lo mejor.

## AGRADECIMIENTOS

Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de desafíos como el desarrollo de una tesis de doctorado es indispensable recordar a todos aquellos que directa o indirectamente ayudaron en su elaboración. Aunque se requiere más que palabras para reconocer el apoyo brindado, es necesario expresar gratitud para todas esas personas e instituciones que facilitaron la culminación con éxito del trabajo planificado.

Entre los profesionales que colaboraron en la realización del presente proyecto doctoral destacan los doctores María Gabriela Echeverría y Christian Vinuesa. La doctora Echeverría, en su rol de directora de tesis, no sólo estuvo presta para orientar y corregir, sino también para dar una guía idónea y un acompañamiento efectivo en la solución de problemas, aún a expensas de su tiempo. Además, ofreció respaldo no sólo científico, sino emocional. El doctor Vinuesa quien, como codirector, brindó de manera permanentemente e incondicional el soporte técnico, económico y científico requerido durante la realización del proyecto.

El apoyo brindado por la Unidad de Investigación de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Resistencia a los Antimicrobianos (UNIETAR) fue indispensable. Por lo tanto, se agradece inmensamente las facilidades brindadas en cuanto al uso de reactivos, instalaciones y equipos. Además, la ayuda de los técnicos de la unidad, los médicos veterinarios Sofía De Janon y José Luis Medina, fue comprometida y desinteresada. De igual manera, se

quiere agradecer el tiempo y asesoramiento brindado por parte del personal que integra el Laboratorio de Virología (LAVIR) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata (UNLP), en especial a los doctores Javier Origlia, Soledad Serena y Germán Metz.

Lógicamente sin la materia prima de la cual obtener las muestras, el proyecto no se hubiera realizado. En consecuencia, se quiere presentar un sincero agradecimiento a los avicultores de la provincia del Tungurahua, de manera especial al Instituto Ecuatoriano del Huevo (INEH), que agremia a muchos de ellos. Igualmente, se agradece a los doctores Iván Pérez, Juan Valle y Richard Tuapanta; así como, al ingeniero Marcelo Viteri, quienes participaron de manera desinteresada. En este punto, también se desea reconocer el apoyo y compromiso de los estudiantes, Jessica Rosero y Ricardo Toapanta.

Además, sin duda alguna se debe reconocer la asistencia brindada por parte de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la persona del señor decano, doctor Eduardo Aragón. Finalmente, es imprescindible agradecer a la Universidad Central del Ecuador, que tuvo a bien otorgarme una beca para estudios doctorales y con el apoyo económico brindado, ha hecho posible que se ejecute y finalice el proyecto.

## CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

- Revelo M, Vinueza C, Echeverría MG. Diagnóstico molecular de Bronquitis infecciosa aviar en granjas de gallinas ponedoras de huevos comerciales de la provincia de Tungurahua, Ecuador. XXIII Reunión Científica Técnica y 1° Virtual de la Sociedad Argentina de Veterinarios de Laboratorios Diagnósticos – AAVLD. 2021, Resumen V-5, p. 131, Modalidad en Línea, Argentina.
- Revelo M. Epidemiología molecular de virus respiratorios aviares en Ecuador ¿Por qué se requiere monitorearlos?. I Congreso Ponedoras – Unión de Productores de Huevos. 2022, Ponencia, Ambato, Ecuador.
- Revelo-Cueva M, Vinueza C, Metz G, Toapanta R, Echeverría MG, Caracterización molecular del virus de bronquitis infecciosa aviar en granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Tungurahua, Ecuador. Aceptado para su publicación en ANALECTA Veterinaria julio 2022.

## INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA .....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS .....	V
INDICE DE CONTENIDOS.....	VI
INDICE DE TABLAS.....	XII
INDICE DE FIGURAS.....	XIV
INDICE DE IMÁGENES.....	XV
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	XVII
RESUMEN.....	XIX
ABSTRACT .....	XXI
CAPÍTULO 1.....	1
1.    INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2.....	6
2.    DISEÑO MUESTREAL, TOMA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	6
2.1.    Diseño Muestreal.....	7
2.2.    Obtención y Procesamiento de las Muestras .....	12
2.2.1.    Obtención de muestras.....	12
2.2.2.    Procesamiento de hisopados cloacales y laringotraqueales para detección de los virus de IBV y NDV.....	14
2.2.3.    Procesamiento de órganos para detección de los virus de IBV y NDV.....	15
2.2.4.    Procesamiento de tráqueas para detección del ILTV.....	16
2.2.5.    Extracción de ARN .....	16

2.2.6. Extracción de ADN .....	17
2.2.7. Transcripción reversa .....	18
2.2.8. Control interno de extracción y retrotranscripción mediante PCR para una región del exón 3 de la $\beta$ -actina aviar .....	18
<b>CAPITULO 3.....</b>	<b>21</b>
<b>3. BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR.....</b>	<b>21</b>
3.1. Revisión de Literatura.....	22
3.1.1. Etiología .....	22
3.1.2. Clasificación del IBV .....	24
3.1.3. Variabilidad del IBV .....	25
3.1.4. Incidencia y distribución de BIA.....	26
3.1.5. Hospedadores y transmisión del IBV .....	27
3.1.6. Signos clínicos y lesiones anatomo-patológicas de BIA .....	28
3.1.7. Prevención y control de BIA .....	29
3.1.8. Diagnóstico de BIA.....	31
3.2. Antecedentes del estudio de BIA en Ecuador.....	35
3.3. Materiales y Métodos para la caracterización molecular del IBV.....	37
3.3.1. Determinación de la presencia del IBV en muestras de gallinas ponedoras mediante PCR para la región 5'UTR del IBV.....	37
3.3.2. Análisis de la relación filogenética entre las secuencias obtenidas de las muestras de aves ponedoras y las secuencias de cepas de referencia para el virus del IBV .....	39
3.4. Resultados y discusiones sobre la caracterización molecular del IBV.....	45
3.4.1. PCR para la región 5'UTR del IBV.....	45
3.4.2. Detección del IBV mediante PCR para la región 5'UTR en muestras de campo y vacunas comerciales. ....	48

3.4.3. Análisis de la relación filogenética entre las secuencias obtenidas de las muestras de aves ponedoras y las secuencias de cepas de referencia del IBV .....	49
CAPÍTULO 4.....	71
4. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE.....	71
4.1. Revisión de Literatura .....	72
4.1.1. Etiología .....	72
4.1.2. Clasificación del NDV .....	74
4.1.3. Distribución geográfica de la EN.....	75
4.1.4. Hospedadores y transmisión del NDV .....	75
4.1.5. Patogenia, signos y lesiones anatómo-patológicas de la EN .....	76
4.1.6. Prevención y Control de la EN.....	78
4.1.7. Diagnóstico de la EN .....	80
4.2. Antecedentes del estudio de la Enfermedad de Newcastle en Ecuador .....	83
4.3. Materiales y Métodos para la caracterización molecular del NDV... 85	
4.3.1. Determinación de la presencia del NDV en muestras de gallinas ponedoras mediante PCR para el gen M .....	85
4.3.2. Análisis de la relación filogenética entre las secuencias obtenidas de las muestras de aves ponedoras y las secuencias de cepas de referencia para el virus del NDV .....	86
4.4. Resultados y discusiones de la caracterización molecular del NDV 92	
4.4.1. Determinación de la presencia del NDV en muestras de gallinas ponedoras mediante PCR para el gen M .....	92
4.4.2. Análisis de la relación filogenética entre las secuencias obtenidas de las muestras de aves ponedoras y las secuencias de cepas de referencia del NDV. ....	95

CAPÍTULO 5.....	106
5. LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA AVIAR .....	106
5.1. Revisión de Literatura .....	107
5.1.1. Etiología .....	107
5.1.2. Clasificación molecular .....	108
5.1.3. Incidencia y distribución.....	109
5.1.4. Hospedadores y transmisión .....	110
5.1.5. Patogenia, signos y lesiones anatomo-patológicas .....	110
5.1.6. Prevención y control .....	113
5.1.7. Diagnóstico.....	115
5.2. Antecedentes del estudio de la Laringotraqueitis infecciosa aviar en Ecuador .....	118
5.3. Materiales y Métodos para la caracterización molecular del ILTV. ....	121
5.3.1. Determinación de la presencia del ILTV en muestras de gallinas ponedoras a través de PCR para los genes ICP4 y TK.....	121
5.3.2. Secuenciación, alineamiento y análisis de similitud nucleotídica de las secuencias obtenidas para el gen TK.....	122
5.4. Resultados y discusiones de la caracterización molecular del ILTV.....	123
5.4.1. Determinación de la presencia del ILTV en muestras de gallinas ponedoras a través de PCR para los genes ICP4 y TK.....	123
5.4.2. Secuenciación, alineamiento y análisis de similitud nucleotídica de las secuencias obtenidas para la proteína TK del ILTV.....	127
CAPÍTULO 6.....	129
6. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES PARA LA INVESTIGACIÓN REALIZADA.....	129
CAPÍTULO 7.....	138
7. BIBLIOGRAFÍA.....	138

CAPÍTULO 8.....	163
8. ANEXOS.....	163
ANEXO 1.....	164
Consentimiento Informado.....	164
ANEXO 2.....	166
Formulario de Datos .....	166
ANEXO 3.....	168
Cebadores utilizados en las PCR punto final para $\beta$ -actina, región 5'UTR del IBV, gen M del NV y genes ICP4 y TK del ILTV.....	168
ANEXO 4.....	169
Resultados para $\beta$ -actina aviar, región 5'UTR del IBV y fragmento del gen M del NDV con muestras provenientes de gallinas ponedoras de la provincia de Tungurahua. ....	169
ANEXO 5.....	173
Programas vacunales contra IBV y NDV empleados en las granjas muestreadas de la provincia de Tungurahua .....	173
ANEXO 6.....	175
Algunas medidas de Bioseguridad implementadas en las granjas avícolas muestreadas en la provincia de Tungurahua .....	175
ANEXO 7.....	177
Alineamiento de secuencias para S1 parcial de cepas muestrales y referencia ubicadas en el grupo Q1 (Clustal Omega) .....	177
ANEXO 8.....	179
Cepas representativas para el virus del NDV.....	179
ANEXO 9.....	180
Alineamiento de 135 secuencias del virus del NDV y cebadores para región parcial de la proteína F .....	180
ANEXO 10.....	184
Solución de problemas para las reacciones fallidas de PCR de la proteína F del NDV .....	184

ANEXO 11 .....	185
Lesiones macroscópicas destacadas encontradas en las necropsias realizadas a las aves muestreadas de la provincia de Tungurahua .....	185
ANEXO 12 .....	185
Signos clínicos observados en las aves muestreadas de la provincia de Tungurahua .....	186
ANEXO 13 .....	187
Alineamiento de secuencias para F parcial combinada de vacunas contra NDV utilizadas en la zona de estudio y la cepa La Sota .....	187
ANEXO 14 .....	188
Ejemplos de cromatogramas de F parcial combinada con cebadores directos para secuencias muestrales .....	188
ANEXO 15 .....	190
Alineamiento entre secuencias muestrales y de referencia para ILTV ....	190

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. ....	9
Número de granjas muestreadas por clústeres para la caracterización molecular de los virus de IBV, NDV e ILTV en la provincia de Tungurahua ...	9
Tabla 2 .....	38
Vacunas vivas contra IBV comercializadas en la zona de estudio .....	38
Tabla 3 .....	42
Cepas prototipo de cada linaje según clasificación genotípica.....	42
Tabla 4 .....	43
Cepas representativas de IBV procedentes de América, Europa y China....	43
Tabla 5. ....	45
Protocolo de ciclado de las PCR para $\beta$ -actina aviar, región 5'UTR y gen M. ....	45
Tabla 6. ....	46
Condiciones empleadas para las PCR de $\beta$ -actina, 5' UTR y el gen M. ....	46
Tabla 7. ....	50
Protocolo para PCR punto final de la región de 783 pb del gen S1.....	50
Tabla 8. ....	52
Resultados de la PCR para la región 5'UTR y la región del gen S1 del IBV.	52
Tabla 9. ....	62
Similitud nucleotídica de S1 a nivel intra-linajes.....	62
Tabla 10. ....	64
Resultados del cálculo <i>p-distance</i> entre cepas muestrales y vacunas utilizadas en la zona de estudio.....	64
Tabla 11. ....	65
Sitios de glicosilación potenciales para la cepa Mass y las secuencias muestrales ubicadas en el linaje GI-1. ....	65

Tabla 12. ....	67
Sitios de glicosilación potenciales para la cepa 4/91 y las cepas muestrales ubicadas en el grupo GI-13.....	67
Tabla 13. ....	70
Sitios de glicosilación potenciales para cepas Q1 y las cepas muestrales ubicadas en este grupo.....	70
Tabla 14. ....	77
Resumen de signos clínicos de acuerdo con el patotipo de la EN. ....	77
Tabla 15. ....	86
Vacunas vivas contra NDV comercializadas en la zona de estudio. ....	86
Tabla 16. ....	87
Cebadores utilizados en las PCR para el gen F del NDV.....	87
Tabla 17. ....	96
Temperaturas de hibridación para cebadores utilizados para amplificar gen F. ....	96
Tabla 18. ....	112
Resumen de signos clínicos de acuerdo con la forma de presentación de la ILT. ....	112
Tabla 19. ....	122
Cepas representativas para ILTV .....	122
Tabla 20. ....	124
Protocolo para las PCR de los genes ICP4 y TK del ILTV. ....	124
Tabla 21. ....	124
Resultados para ICP4 y TK del ILTV con muestras provenientes de gallinas ponedoras de la provincia de Tungurahua.....	124
Tabla 22. ....	128
Resultados de <i>p-distance</i> entre cepas muestrales y cepas de referencia de ILTV.....	128

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clústeres para muestreo en la provincia de Tungurahua .....	8
Figura 2. Flujograma del procedimiento realizado para la caracterización molecular de los virus: IBV, NDV e ILTV.....	11
Figura 3. Virus de Bronquitis Infecciosa Aviar.....	23
Figura 4. Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV) .....	.73
Figura 5. Representación esquemática del ILTV .....	.108

## INDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. ....	13
Toma de muestras para estudio. ....	13
Imagen 2. ....	45
Electroforesis del perfil térmico para la región 5'UTR del IBV. ....	45
Imagen 4. ....	48
Electroforesis de PCR para $\beta$ -actina aviar y región 5'UTR con los diferentes tipos de muestras (a, b y c) provenientes muestras de granjas de la provincia de Tungurahua. ....	48
Imagen 5. ....	50
Electroforesis del perfil térmico para el segmento de 783 pb del gen S1. ....	50
Imagen 6. ....	51
Electroforesis relacionadas con la puesta a punto de la PCR para un fragmento de 783pb del gen S1. ....	51
Imagen 7. ....	54
Árbol consenso de S1 con secuencias muestrales, vacunales, secuencias de referencia (América, Europa y China) y prototipo de la clasificación genotípica. ....	54
Imagen 8. ....	65
Alineamiento entre cepa Mass y cepas muestrales del grupo GI-1. ....	65
Imagen 9. ....	68
Alineamiento entre cepa 4/91 y cepas muestrales del grupo GI-13. ....	68
Imagen 10. ....	69
Alineamiento de cepas Q1 china y chilena con cepas muestrales del grupo GI-16 (Clustal-Omega). ....	69
Imagen 11. ....	92
Electroforesis para el gradiente térmico probado para el gen M del NDV. ....	92

Imagen 12.....	94
Electroforesis relacionadas con la puesta a punto de la PCR para el gen M del NDV.....	94
Imagen 13.....	95
Electroforesis de PCR para el gen M con los tres tipos de muestras (a, b y c).....	95
Imagen 14.....	96
Electroforesis para el gradiente térmico probado para dos técnicas de PCR para gen F del NDV.....	96
Imagen 15.....	97
Electroforesis de PCR para F parcial combinado con vacunas comerciales contra el NDV empleadas en la zona de estudio.....	97
Imagen 16.....	100
Electroforesis del gen F parcial combinado con diferentes concentraciones de DMSO.....	100
Imagen 17.....	102
Fotos representativas de lesiones más comúnmente encontradas durante las necropsias realizadas a las aves muestreadas.....	102
Imagen 18.....	104
Electroforesis de PCR para el gen M y gen F parcial combinado empleando cosechas de líquido alantoideo de pasaje III.....	104
Imagen 19.....	123
Electroforesis de los perfiles térmicos probados para los genes ICP4 y TK.....	123
Imagen 20.....	126
Electroforesis de muestras positivas y especificidad de las PCR de los genes ICP4 y TK del ILTV.....	126

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A: Adenina

aa: Aminoácidos

Ac: Anticuerpo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

Ag: Antígeno

AGROCALIDAD: Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario

ARN: Ácido ribonucleico

BIA: Bronquitis Infecciosa Aviar

C: Citosina

°C: Grados centígrados

CONAVE: Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador.

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, por sus siglas en inglés, Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

EN: Enfermedad de Newcastle

F: Proteína de fusión

FPCS: Sitio de clivaje en proteína F, por sus siglas en inglés Fusion Protein Cleavage Site.

G: Guanina

g: Gramo/s

HVR: Región Hipervariable, por sus siglas inglés Hypervariable Region.

INEH: Instituto Ecuatoriano del Huevo.

IBV: Virus de Bronquitis infecciosa aviar, del inglés Infectious Bronchitis Virus.

ILT: Laringotraqueitis infecciosa, del inglés Infectious laryngotracheitis.

ILTV: Virus de Laringotraqueitis infecciosa, del inglés Infectious Laryngotracheitis Virus.

mA: miliamperios.

M: Proteína de matriz.

MEM: Medio Esencial Mínimo, del inglés Minimum Essential Medium.

mg: Miligramo

mM: milimolar

min: Minuto/s

ml: Mililitro/s

NDV: Virus de la enfermedad Newcastle, del inglés Newcastle disease virus.

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal.

ORFs: Marcos de lectura abiertos, por sus siglas en inglés Open Reading Frames.

pb: Pares de bases

PBS: Buffer fosfato salino del inglés, Phosphate buffered saline

PCR: Reacción en cadena de Polimerasa, por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction.

qRT-PCR: Transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real, del inglés Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction.

rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Transcripción reversa seguida por amplificación mediante PCR.

S: Proteína de espícula

T: Timina

TAE: Tris-Acetate-EDTA

U: Uracilo

UI: Unidades internacionales

UNIETAR: Unidad de Investigación de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Resistencia a los Antimicrobianos.

UTR: Regiones no traducidas, por sus siglas en inglés Untranslated regions.

UV: ultravioleta

V: Voltios

$\mu$ L: microlitro

$\mu$ g: microgramo

## RESUMEN

### **Caracterización molecular de los virus de la Bronquitis infecciosa aviar, la enfermedad de Newcastle y Laringotraqueitis infecciosa en granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Tungurahua, Ecuador**

**Palabras clave:** variantes, secuencias, vacunas, PCR convencional.

Los virus de la Bronquitis infecciosa aviar (IBV), de la enfermedad de Newcastle (NDV) y de la Laringotraqueitis infecciosa (ILTV) causan tres enfermedades respiratorias comunes en las granjas de aves ponedoras comerciales. Para la prevención y el control efectivos de estas enfermedades es indispensable el conocimiento de las cepas presentes en una determinada zona. El objetivo de la investigación fue caracterizar molecularmente las cepas de estos virus que se encuentren circulando en las explotaciones de gallinas ponedoras de la provincia de Tungurahua. Se trabajó con muestras de hisopos (laringotraqueales y cloacales) y de órganos (tráquea, pulmón, oviducto y tonsilas cecales) de 47 granjas y con vacunas vivas: 17 contra IBV y seis contra NDV. Todas las vacunas vivas contra IBV y 16 granjas fueron positivas a IBV al amplificar la región 5'UTR y un segmento de S1. La construcción de un árbol filogenético con las secuencias parciales de S1 mostró que, existen tres tipos de cepas de IBV circulando en la provincia de Tungurahua, dos posiblemente vacunales y otra de origen desconocido. Con relación al NDV,

46 granjas resultaron positivas a la PCR del gen M, pero no se logró amplificar el gen F para ninguna de las muestras con ninguno de los siete juegos de cebadores probados; concluyéndose que cepas de NDV encontradas podrían presentar alguna variación genética que dificulta la hibridación de los cebadores. Finalmente, la detección molecular de los genes ICP4 y TK del ILTV en tres granjas podría ser indicativo de la presencia de cepas de campo o cepas vacunales vivas, teniendo en cuenta que la vacuna empleada en la zona de estudio es recombinante y sólo expresa la gB. El empleo de otras técnicas moleculares como NGS o secuenciación de genomas completos son necesarias para indagar con más profundidad en la epidemiología de estos patógenos.

## ABSTRACT

**Molecular characterization of Infectious Bronchitis virus, Newcastle disease virus and Avian Infectious Laryngotracheitis in laying hen's farms located in Tungurahua province, Ecuador.**

**Palabras clave:** variant, sequences, vaccines, conventional PCR

Infectious bronchitis virus (IBV), Newcastle disease virus (NDV) and Infectious laryngotracheitis virus (ILT) causes three respiratory diseases common in commercial farms' laying hens. The knowledge of strains which are circulating in a specific area is indispensable for the effective prevention and control of these diseases. The objective of this research was to develop a molecular characterization of these virus' strains that are circulating in the laying hens' farms located in Tungurahua province. We worked with swab samples (laryngotracheal and cloacal) and organ samples (trachea, lung, oviduct and cecal tonsils) from forty-seven farms and with live vaccines: seventeen against IBV and six against NDV. All the live IBV vaccines and the sixteen farms were positive for IBV because they amplified the 5'UTR region and an S1 segment. The construction of a phylogenetic tree with the partial sequences of S1 showed that there are three IBV strains circulating in Tungurahua province, two of them are possibly vaccine strains and the other has an unknown origin. Regarding to NDV, forty-six tested farms were positive for M gene PCR, but or

the F gene was not amplified in any of the samples after testing seven sets of primers; with this observation the conclusion was that NDV strains found at present research have some genetic variation which hinders the hybridization of the primers. Finally, the molecular detection of ILTV's ICP4 and TK genes in three farms could be indicative of the presence of field strains or live vaccine strains; considering that the vaccine used in the study area is recombinant and only expresses gB. The use of other molecular techniques such as NGS or whole genome sequencing are necessary to investigate more deeply the epidemiology of these pathogens.

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN



La industria avícola es el sector productivo de mayor crecimiento a nivel mundial, contribuyendo con la mejora de la nutrición humana y generando ingresos para las economías familiares (Farrell, 2013). En el Ecuador, el sector avícola tiene gran proyección económica, debido a que la carne de pollo y los huevos de gallinas son fuentes de nutrientes con precios accesibles en el mercado (Aillón, 2012; Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador (CONAVE), 2020a). El consumo de carne de pollo en el Ecuador se incrementó de 26,30 kg/persona/año en 2018 a 30,43 kg/persona/año en 2019 (Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador (CONAVE), 2020b). Por su parte, el consumo per cápita de huevos fue de 218 unidades en el año 2018 y subió a 226 huevos/persona/año durante el 2019 (CONAVE, 2020b).

Las actividades productivas que estructuran el sector avícola ecuatoriano son básicamente aquellas que incluyen a la crianza de aves reproductoras pesadas y livianas, incubación de huevos fértiles y la producción de pollos de engorde y huevos (Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD), 2013). Según el Censo Avícola de 2015, existían 1802 granjas avícolas a nivel nacional, incluyendo: 1434 granjas de pollos de engorde, 310 granjas de aves ponedoras comerciales, 54 de reproductoras pesadas y 4 de reproductoras livianas (Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), 2015). Las granjas de aves ponedoras comerciales se ubican mayoritariamente en la región centro del Ecuador (Pastaza, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo) y en la provincia de Manabí (INEC, 2015). No obstante, la provincia que contribuye a cubrir el 45% de la

demanda de huevos, es la provincia de Tungurahua (Maíz y Soya, 2017; Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), 2021).

El crecimiento de la avicultura ecuatoriana es resultado del trabajo conjunto de los diferentes eslabones de esta cadena productiva (AGROCALIDAD, 2013). Sin embargo, el progreso de la avicultura puede verse afectado por enfermedades que alteren el desempeño productivo de las aves (Bermudez, 2008). En particular, las infecciones del tracto respiratorio tienen un impacto económico significativo en la producción avícola (Cook y col., 2012). En los brotes de enfermedades respiratorias se presentan comúnmente signos clínicos, como estertores traqueales, secreción nasal y ocular e hinchazón de la cara (Seifi y Boroomand, 2015). Se ha demostrado que esta signología puede ser desarrollada por diferentes agentes virales y/o bacterianos; por lo que, se utiliza el término de "complejo respiratorio" para esta condición (Hadipour y col., 2011; Seifi y Boroomand, 2015). Dentro de los agentes virales del complejo respiratorio, los virus de la Bronquitis infecciosa aviar (IBV, por sus siglas en inglés), la enfermedad de Newcastle (NDV, por sus siglas en inglés) y Laringotraqueitis infecciosa (ILTV, por sus siglas en inglés) destacan por las grandes pérdidas económicas que pueden originar y por ser las enfermedades más comunes en las granjas de aves ponedoras (Alexander y Senne, 2008; Cavanagh y Gelb, 2008; Cook y col., 2012).

La Bronquitis infecciosa aviar (BIA) es una enfermedad que está presente en todos los países con avicultura industrializada. La bioseguridad estricta, los sistemas de crianza con una sola edad y la vacunación son

medidas de control indispensables contra la BIA. Sin embargo, la instauración de un programa vacunal efectivo constituye un verdadero desafío, debido a que existen diversos genotipos (Sjaak de Wit y col., 2011). Nuevas variantes del IBV surgen continuamente debido a las mutaciones espontáneas o a la recombinación del genoma viral (Jackwood, 2012; Sjaak de Wit y col., 2011). No obstante, en Ecuador no existen publicaciones científicas que permitan reconocer las cepas circulantes en las granjas avícolas.

Con relación a la enfermedad de Newcastle (EN) se debe señalar que se encuentra distribuida mundialmente (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2021a). En países de Sudamérica, como Venezuela, Colombia y Surinam, la EN es considerada endémica, mientras que, en otros países, como Argentina, Brasil, Chile y Uruguay, es reportada ocasionalmente (Diel y col., 2012). En el Ecuador, la EN es de declaración obligatoria a la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD). Sin embargo, existen escasas investigaciones relacionadas con NDV en el Ecuador.

Por su parte, laringotraqueitis infecciosa (ILT) es una enfermedad respiratoria que afecta a los pollos y gallinas (Jones 2004; Ou y Giambrone 2012). En el Ecuador se realizó el primer reporte confirmado de la enfermedad en el año 2011 (Ayala y col., 2014). A partir de lo cual, se autorizó la vacunación contra la enfermedad sólo con el uso de vacunas vectorizadas (AGROCALIDAD, 2012). No obstante, en la actualidad los gremios avícolas están interesados en conocer el estado de la enfermedad dado que no hay investigaciones recientes.

Por todo lo expuesto, el proyecto doctoral tuvo por objetivo principal caracterizar molecularmente las cepas de NDV e IBV que circulan en las explotaciones de gallinas ponedoras de la provincia de Tungurahua, principal contribuyente de la demanda de huevos de mesa en Ecuador. Para alcanzar este propósito se planteó en primer lugar determinar la presencia de los virus de NDV e IBV en muestras de aves ponedoras de la provincia de Tungurahua, mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) convencional o de punto final que amplifique segmentos del gen de matriz (M) y la región 5' UTR, respectivamente. Luego, a través de la obtención de secuencias parciales de los genes de la proteína de fusión (F) para el NDV y de espícula (S) para el IBV, establecer la relación filogenética entre las secuencias obtenidas de las muestras de aves ponedoras y las secuencias de cepas de referencia. Adicionalmente, dada la necesidad expresa del sector avícola se desarrolló un método de detección molecular para el ILTV a través de una prueba de PCR que amplificó segmentos del gen ICP4 (del inglés, *Infected Cell Protein 4*) y del gen timidina quinasa (TK) del virus.

## CAPÍTULO 2

### 2. DISEÑO MUESTREAL, TOMA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS



## 2.1. Diseño Muestreal

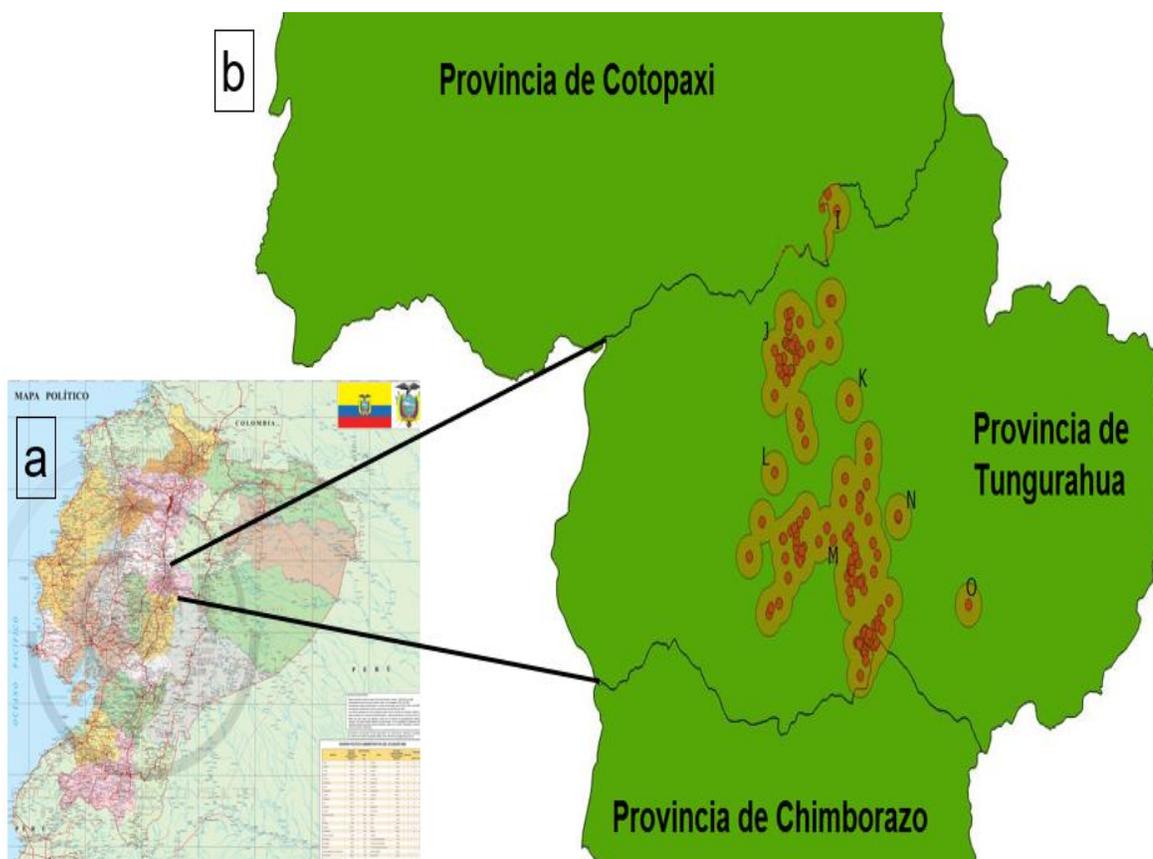
Según el Censo Avícola del año 2015, en la provincia de Tungurahua existían 149 granjas (INEC, 2015). A partir de este total se calculó el tamaño muestral. Se empleó el programa WinEpi 2.0 ([winepi.net/sp/indez.htm](http://winepi.net/sp/indez.htm)) para obtener el tamaño de la muestra. Con el programa se obtuvo un total de 47 granjas a ser muestreadas, empleando una probabilidad de 50% y un nivel de confianza de 90%.

Las granjas se seleccionaron al azar, pero para realizar un muestreo homogéneo se crearon grupos o clústeres exclusivos para muestreo. La creación de clústeres se realizó en el Sistema de Información Geográfica libre y de Código Abierto QGIS 3.18.1, donde a partir de las coordenadas geográficas de las granjas y tomando en cuenta una distancia fija se crearon zonas buffer.

Resulta importante señalar que, en Ecuador la distancia entre dos granjas de ponedoras de huevos comerciales debe ser de 3Km (Ministerio de agricultura y ganadería (MAG), 2011). Sin embargo, al aplicar en el análisis 3Km como atributo de la capa vectorial de distancia, se obtuvo una sola zona buffer. Por lo tanto, se cambió a una distancia de 2Km, considerando que se conoce que los vientos predominantes contribuyen a la propagación del IBV entre granjas que se encuentran separadas hasta 1.200 metros (Cumming, 1970; Mahgoub y col., 2010). Además, en el plan creado para implementar compartimentos para la EN se señala que una explotación avícola podrá ser declarada libre si se encuentra ubicada dentro de una zona de 2Km donde se

cumplan ciertos requerimientos de bioseguridad y vacunación contra NDV (AGROCALIDAD, 2021a). La aplicación de una zona buffer de 2Km originó siete zonas buffer. Las granjas en cada zona se consideraron como un grupo o clúster para muestreo. Cada clúster se identificó con una letra del alfabeto: I, J, K, L, M, N y O (Figura 1). Se contabilizaron el número de granjas en cada una de las zonas buffer y se tomó una muestra estratificada (Tabla 1).

**Figura 1.**  
Clústeres para muestreo en la provincia de Tungurahua.



a. Mapa político del Ecuador (Instituto Geográfico Militar, 2009). b. Imagen generada en QGIS 3.28.1 a partir de las coordenadas geográficas de las granjas avícolas de la provincia de Tungurahua que se identifican con círculos en color rojo. Se observan 7 clústeres en círculos e identificados con letras.

**Tabla 1.**

Número de granjas muestreadas por clústeres para la caracterización molecular de los virus de IBV, NDV e ILTV en la provincia de Tungurahua.

<b>Clústeres</b>	<b>Granjas existentes</b>	<b>Granjas muestreadas</b>
I	3	1
J	36	11
K	1	1
L	1	0
M	103	31
N	4	2
O	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>149</b>	<b>47</b>

Respetando el tiempo necesario para cumplir con normas de bioseguridad, se visitaron dos granjas por semana (lunes y jueves). El muestreo de las 47 granjas se realizó en un lapso de diez meses, desde noviembre de 2020 hasta agosto de 2021.

El contacto inicial con los avicultores se realizó vía telefónica o gracias a la ayuda de veterinarios de campo colaboradores y el apoyo del Instituto Ecuatoriano del Huevo (INEH). Previa la visita a la granja avícola se envió el consentimiento informado (Anexo 1) a los administradores de cada granja.

Al visitar las granjas, se cumplió con todas las normas de bioseguridad que la explotación avícola exigía. De no brindarse material de protección personal se usaron elementos propios llevados a la granja, mismos que fueron desechados en el lugar. Se seleccionó un galpón con aves entre 18 a 100 semanas de edad y se llenó el formulario de datos (Anexo 2). En el formulario

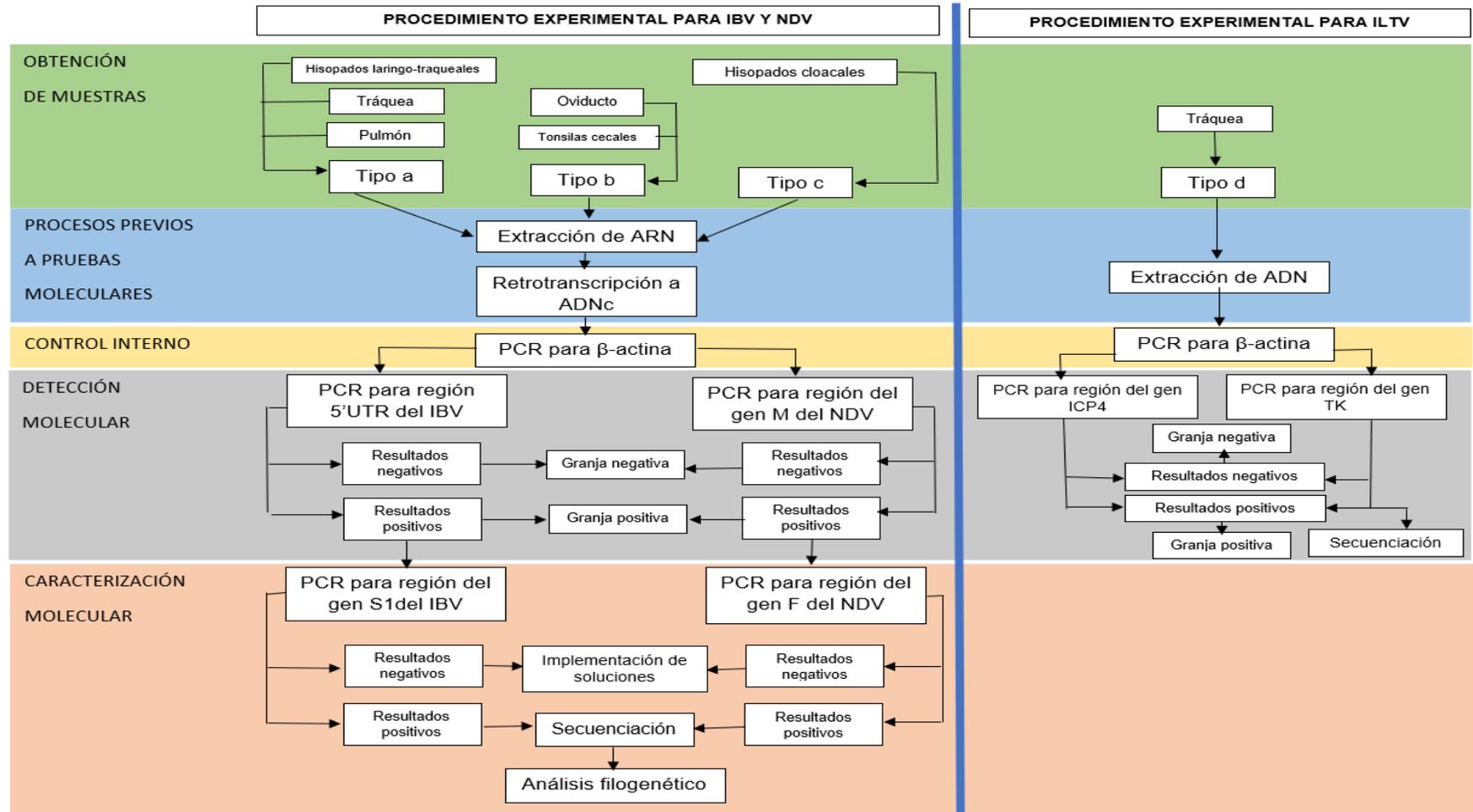
se incluyeron datos relacionados con bioseguridad, así como con el plan vacunal.

En el galpón se seleccionaron cinco aves al azar, mismas que fueron transportadas a la ciudad de Quito. La distancia mínima entre la ciudad capital y las granjas muestreadas es de 140 km (tres horas de viaje). Las aves se transportaron en cajas plásticas con una capacidad de 0,66cm<sup>2</sup>/ave, que contaban con agujeros de 1,5 cm de diámetro en los laterales y tapa, para garantizar la ventilación y bienestar durante el viaje.

El trabajo en laboratorio consistió en una secuencia de actividades que iniciaron con la obtención de muestras hasta llegar a la detección de la presencia de IBV, NDV e ILTV a través de técnicas de PCR para regiones conservadas de los virus (Figura 2). Posteriormente, para el caso del IBV y NDV se realizaron pruebas de PCR para regiones hipervariables a fin de obtener secuencias con las que se pudiera efectuar un análisis filogenético (Figura 2). Cuando no se logró amplificar las regiones hipervariables se implementaron diversas soluciones como la búsqueda de cebadores diferentes. Finalmente, se realizó un análisis de similitud nucleotídica, como un dato más de soporte para el análisis filogenético. Adicionalmente, en el caso del IBV también se predijo computacionalmente los potenciales sitios de glicosilación. Este análisis se hizo tomando en cuenta que, las mutaciones en ciertos sitios alteran la capacidad de unión del virus a los receptores; volviéndose un parámetro orientativo para la clasificación (Parsons y col., 2019).

**Figura 2.**

Flujograma del procedimiento realizado para la caracterización molecular de los virus: IBV, NDV e ILTV.



## **2.2. Obtención y Procesamiento de las Muestras**

### **2.2.1. Obtención de muestras.**

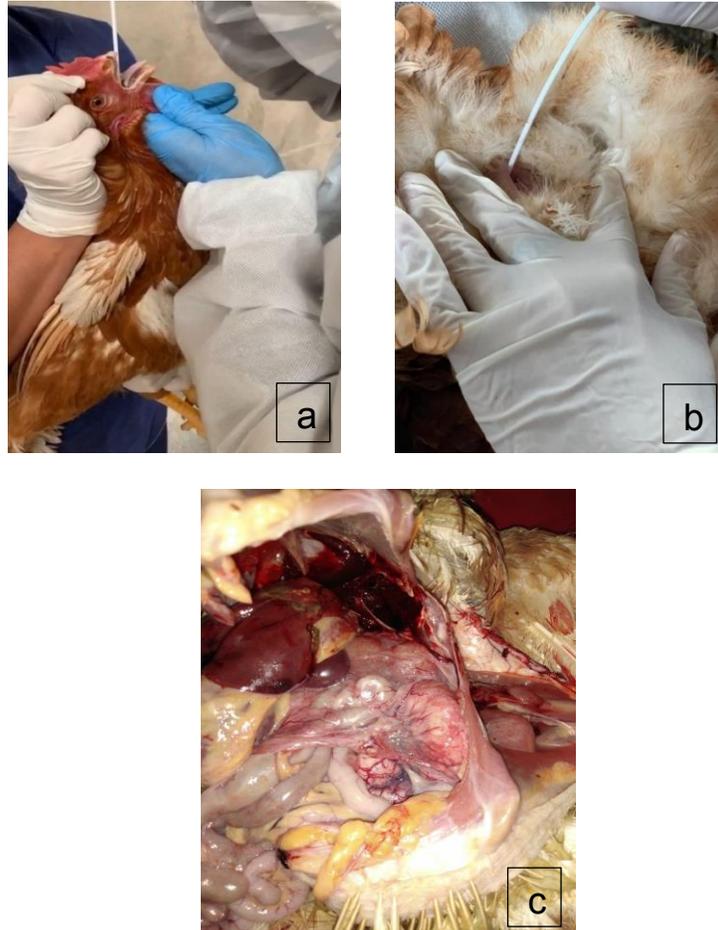
Las aves provenientes de cada una de las explotaciones avícolas se recibieron en el Laboratorio de Anatomía Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UCE. A cada granja se le asignó un código alfanumérico según el orden de ingreso al laboratorio.

A partir de las gallinas recibidas se tomaron hisopados cloacales y laringotraqueales con el uso de hisopos de rayón estériles de 15 cm (Puritan®, 25-8061PR) (Imagen 1). Los hisopos se colocaron en tubos Falcon de 15 ml que contenían 2,5 ml de medio MEM estéril (1X, Medio Esencial Mínimo con sales de Hanks, bicarbonato de sodio, L-glutamina, MP Biomedicals) con antibiótico (Penicilina 10.000UI/ ml, Estreptomicina 10.000µg/ ml, Eurobio). Los hisopados en el tubo Falcon con medio MEM se mantuvieron en refrigeración (4°C) hasta el final de la obtención de las muestras.

Después, se desinfectó la mesa de necropsias y se colocó un mechero, así como el instrumental necesario para la necropsia y toma de muestras. Luego, se sacrificaron las gallinas a través de electrocución de una sola aplicación. Enseguida, se mojaron los cadáveres con una solución jabonosa y se los colocó en posición de decúbito dorsal, con los miembros inferiores hacia el extremo libre del área de trabajo. Se desarticuló la articulación coxofemoral de ambas piernas y se procedió con la inspección externa del cadáver.

**Imagen 1.**

Toma de muestras para estudio.



a. Toma de hisopados laringotraqueales. b. Toma de hisopados cloacales. c. Exposición de cavidad celómica para toma de muestras de órganos (pulmón, oviducto y tonsilas cecales).

La toma de muestras de órganos inició con un corte en la piel desde la parte ventral del pico hasta la punta del esternón, por la línea media, exponiendo la tráquea, a fin de tomar una muestra de la porción distal de aproximadamente 2cm. Las muestras de tráquea se colocaron en un frasco con buffer fosfato salino (PBS) estéril con antibiótico (Penicilina 10 000UI/ ml,

Estreptomicina 10 000µg/ ml, Eurobio) y se identificó con el código asignado a la granja. Inmediatamente, se tomó la totalidad de la tráquea y se colocó en un recipiente plástico estéril.

A continuación, se incidió con tijeras la parte ventro-caudal desde la punta del esternón, hacia ambos lados de la pechuga en dirección caudo-craneal a través de las articulaciones costo-condrales y se desplazó la pechuga hacia arriba para exponer la cavidad celómica (Imagen 1). Entonces, se procedió a tomar muestras de pulmón, oviducto y tonsilas cecales. Las muestras de órganos se depositaron en frascos individuales con PBS estéril más antibiótico (Penicilina 10 000UI/ ml, Estreptomicina 10 000µg/ ml, Eurobio) rotulados con el tipo de órgano y el código correspondiente de la granja. Las muestras de hisopos y de órganos se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Después de la recolección de muestras se revisaron aparatos y sistemas de las aves para realizar el correspondiente informe de necropsia. Las carcasas de las aves fueron almacenadas a -20°C hasta su entrega a fundaciones de protección animal, disminuyendo la generación de desperdicios biológicos.

### ***2.2.2. Procesamiento de hisopados cloacales y laringotraqueales para detección de los virus de IBV y NDV.***

Las muestras de hisopos cloacales y laringotraqueales se descongelaron a 37°C en un baño María (Boeco, PWB-6). Se centrifugaron las

muestras a 4500 rpm por 30 minutos en centrífuga fría (Biobase, Low Speed Refrigerated Centrifuge) a 4°C. Se tomó 1,5 ml del sobrenadante para ser guardado en tubos Eppendorf a -80°C en un ultracongelador vertical (Daiman Scientific, WyseCryo WUF-D300).

### **2.2.3. Procesamiento de órganos para detección de los virus de IBV y NDV.**

En primer lugar, se descongelaron las muestras de tráqueas, pulmones, oviductos y tonsilas cecales en baño María (Boeco, PWB-6) a 37°C. Luego, las muestras de estos órganos fueron llevadas a un gabinete de seguridad biológica Tipo II (Biobase, A2) donde se cortaron en pedazos pequeños con ayuda de pinzas y tijeras estériles. Los pedazos de órganos fueron molidos con ayuda de morteros y arena estériles y se homogenizaron con medio MEM estéril (MP Biomedicals) para conseguir suspensiones de 20% (p/v). Las suspensiones de cada uno de los órganos se colocaron en tubos Falcon de 15ml y se centrifugaron a 4500rpm por 30 minutos a 4°C. Se tomó 1,5 ml del sobrenadante de cada órgano por separado en tubos Eppendorf de 2 ml para su almacenamiento a -80°C.

A fin de optimizar los procesos y recursos con los que se contaba, para el estudio de los virus de NDV e IBV se combinaron las seis muestras (dos hisopados y cuatro órganos) obtenidas en tres tipos de muestras:

- Muestra a.- hisopado laringotraqueal, suspensión de tráquea y pulmón.
- Muestra b.- suspensión de oviducto y tonsilas cecales.

- Muestra c.- hisopado cloacal.

Los tubos Eppendorf con las muestras a, b y c de cada una de las granjas se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

#### **2.2.4. *Procesamiento de tráqueas para detección del ILTV***

En primera instancia, se realizó un raspado de la mucosa traqueal con el uso de un cepillo citológico estéril. El material obtenido con el cepillo citológico se escurrió fuertemente contra las paredes de un tubo Falcon de 15 ml que contenía 2,5 ml de medio MEM (MP Biomedicals) estéril. Se centrifugó a 4500 rpm por 30 minutos a 4°C y se conservó el sobrenadante. Luego, las tráqueas congeladas fueron cortadas finamente y se procedió a moler los pedazos de tráquea y a homogenizarlos con medio MEM estéril (MP Biomedicals) para conseguir suspensiones de 20% (p/v). Las suspensiones se centrifugaron a 4500 rpm por 30 minutos a 4°C. Las dos muestras resultantes, sobrenadantes de hisopado y de molienda de tráquea, se juntaron en partes iguales (100 µl en total) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se identificaron estas muestras como tipo “d” y se almacenaron a -80°C hasta su procedimiento.

#### **2.2.5. *Extracción de ARN***

El ARN de las muestras para cada granja fue extraído con el uso del kit comercial QIAmp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904). Se utilizó para la extracción 140 µl del líquido sobrenadante de cada tipo de muestra (a, b y c) de cada granja. Como paso previo a la extracción, se añadió etanol absoluto

grado molecular (Sharlau) a las soluciones de lavado, en las cantidades señaladas por el fabricante. Luego se continuaron con los pasos mencionados en el instructivo, que incluían el uso de solución desnaturizante, etanol absoluto, buffer con un transportador de ARN, columnas de purificación y buffer de elución para un volumen final de 80  $\mu$ l.

Todo el proceso de extracción se realizó dentro de una cámara de flujo laminar tipo I (AirClean, 600) con pipetas, tips, centrífuga (Fisher Scientific, Marathon16KM) y vórtex (Boeco, V-1plus) de uso exclusivo para el área de extracción de ARN y retrotranscripción a ADNc.

#### **2.2.6. Extracción de ADN**

El proceso de extracción de ADN a partir de las muestras tipo d se realizó con el uso del kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega. Previamente fue necesario centrifugar las muestras a 13000 rpm por 10 minutos y luego continuar con el protocolo para extracción a partir de cultivo celular establecido por la casa fabricante. Se utilizaron en el proceso, solución de lisis nuclear, ribonucleasa (ARNasa), solución para precipitación de proteínas, isopropanol para precipitar el ADN y etanol 96% para lavados. Luego de la decantación y evaporación del etanol se procedió con la rehidratación del ADN con 100  $\mu$ l de la solución provista para el efecto por el kit, dejándose incubar a 4°C por toda la noche.

La extracción de ADN de todas las muestras se llevó a cabo en un gabinete de seguridad biológica Tipo II (Biobase, A2). Se utilizaron materiales

y equipos destinados de manera exclusiva a este procesamiento. Todas las extracciones se testearon con una PCR para para  $\beta$ -actina aviar, previa cuantificación del ADN a través del empleo del kit QuantiFluor® ONE dsDNA System (Promega, E4870).

### **2.2.7. Transcripción reversa**

A partir de los 80  $\mu$ l de ARN obtenido en el proceso de extracción de ARN se procedió con la transcripción reversa o retrotranscripción (RT) a ADNc. Se empleó para el efecto el kit comercial OneScript® Plus Reverse Transcriptase – OneScript Plus ADNc Synthesis Kit (abm, G236). Se siguió el protocolo establecido por la casa comercial, empleando 10  $\mu$ l del ARN extraído (25 ng/ $\mu$ l como concentración final mínima) y cebadores aleatorios. Se realizó todo el protocolo en una gradilla fría (4°C). Para la hibridación se utilizó una temperatura de 65°C (3 minutos) y para la síntesis de ADNc 55°C (50 minutos). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador SimpliAmp™ (Applied Biosystems). El ADNc resultante (20  $\mu$ l) se almacenó en un congelador a -20°C hasta su utilización en las técnicas de PCR correspondientes.

### **2.2.8. Control interno de extracción y retrotranscripción mediante PCR para una región del exón 3 de la $\beta$ -actina aviar**

Se utilizaron cebadores que amplifican una región de 152 pb del exón 3 del gen que codifica para  $\beta$ -actina aviar. El cebador directo (*primer forward*) denominado FW 685 (5'-GAGAAATTGTGCGTGACATCA-3') y el cebador

inverso (*primer reverse*) RV 818 (5'-CCTGAACCTCTCATTGCCA-3') fueron diseñados previamente por Marandino (2013). La prueba para  $\beta$ -actina se llevó a cabo con cada tipo de muestrea obtenida a partir de las 47 granjas de gallinas ponedoras.

Una observación importante es que, para realizar los ensayos de PCR no sólo para  $\beta$ -actina aviar sino las PCR para la detección y caracterización de IBV, NDV e ILTV se utilizaron de manera común: la enzima polimerasa GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, M9295), que viene acompañada con 5X *Green Buffer* y solución de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), además de mezcla de dNTPs (Promega, U1515) y agua libre de nucleasas (GeneLink).

Del mismo modo, para poner a punto las técnicas de PCR tanto de control interno como de detección de los virus estudiados, primero se realizó un perfil térmico para los cebadores con la utilización del termociclador Labnet, Multigene gradient (TC9600-G). Luego en cada una de las PCR se probaron diferentes concentraciones de  $MgCl_2$  (1 mM, 1,5 mM, 2 mM y 2,5 mM), así como distintas cantidades de la muestra o molde (1  $\mu$ l, 1,5  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 2,5  $\mu$ l y 3  $\mu$ l) en un volumen total de reacción de 15  $\mu$ l.

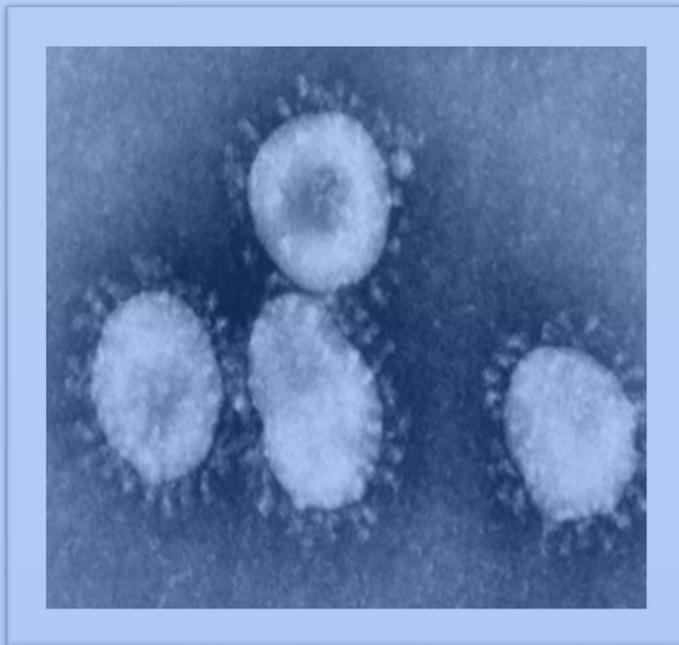
Adicionalmente, se determinó la sensibilidad analítica de las pruebas de PCR para detección del IBV y el NDV a través de diluciones en base 10 (1:10, 1:100 y 1:1000) de cada uno de los controles empleados y la medición con ayuda de un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo scientific, ND-ONE) de la concentración de ADNc. La especificidad analítica de las PCR para detección de los tres virus estudiados también se comprobó utilizando los

controles positivos de IBV, NDV e ILTV en cada una de las técnicas. Como control negativo en todas las técnicas se utilizó agua ultrapura (Nuclease Free Water, BioGENA).

Todas las pruebas de PCR, con excepción de aquellas relacionadas con la realización de un perfil térmico, se llevaron a cabo en el Termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Igualmente, todas las electroforesis de los amplicones obtenidos en las diferentes técnicas de PCR se hicieron en una cámara de electroforesis horizontal Enduro GelXL (Labnet). Para las electroforesis se utilizó TAE (40X, Tris base 40mM, ácido acético 20mM, EDTA 1mM pH 8,0, Promega, V4281), se empleó un voltaje 120V y un amperaje de 400mA por 45 a 60 minutos. Los resultados de la migración electroforética en geles de agarosa grado analítico (Promega, V3125) al 2% se observaron en un transiluminador UV (Labnet) y se registraron con el uso de una cámara fotográfica digital (Sony, Cyber-shot DSC-W800). El tamaño de las bandas de ADN se estimó comparándolas con el marcador de pares de bases 100pb Plus DNA (Bioneer, D1035).

## CAPITULO 3

### 3. BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR



Micrografía electrónica de transmisión del IBV (Cardoso, 020).

## 3.1. Revisión de Literatura



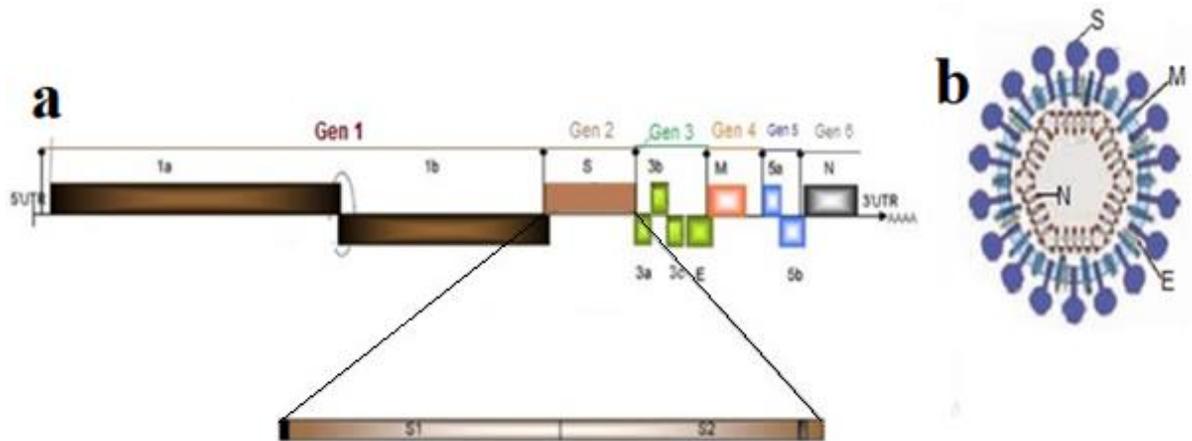
### 3.1.1. Etiología

El agente etiológico de la BIA es el coronavirus aviar, que pertenece al género *Gammacoronavirus*, subfamilia *Orthocoronavirinae*, familia *Coronaviridae* y orden *Nidovirales* (ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses, 2021). La característica morfológica más destacada del IBV es su forma semejante a una corona, derivada de la presencia de proyecciones, denominadas espículas, que se desprenden de su bicapa lipídica (Giner, 2011).

El virus de BIA es pleomórfico y tiene un diámetro entre 60nm a 200nm (Acevedo-Beiras, 2010). El IBV posee ARN de cadena simple positiva con una longitud aproximada de 27,6 kilobases rodeado de una cápside de simetría helicoidal (Feng y col., 2017; Rafique y col., 2018). El material genético del virus incluye en sus extremos regiones no traducidas 5' y 3' UTR de baja variación y 10 marcos de lectura abiertos (ORFs, por sus siglas en inglés) que codifican proteínas estructurales y no estructurales (Figura 3) (Acevedo-Beiras, 2017; Montassier, 2010).

### Figura 3.

Virus de Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV).



a. Representación esquemática del genoma del IBV donde se muestra la organización general del IBV: 5'UTR, gen de la polimerasa (ORF1a y ORF1b), proteína S (subdividida en S1 y S2), proteínas no estructurales 3a, 3b, 3c, pequeña proteína de membrana (E), proteína de membrana (M), proteínas no estructurales 5a y 5b, nucleocápside (N) y 3'UTR. Tomado y modificado (Ammayappan y col., 2008). b. Representación esquemática de las proteínas estructurales en una partícula viral del IBV (Panisello y Giner, 2010).

El gen 1 consta de dos regiones superpuestas (ORF1a y ORF1b) que se traducen en proteínas asociadas con la replicación y transcripción viral (Ammayappan y col., 2008; Montassier, 2010). Los genes 2, 4, 6 y parte del 3 codifican para cuatro proteínas estructurales, la proteína de espiqueta (S), la glicoproteína de membrana (M), la proteína de la nucleocápside (N) y la pequeña proteína de membrana (E), respectivamente (Figura 3) (Abro, 2013; Marandino, 2013). El resto del genoma viral codifica para cinco pequeñas proteínas accesorias no estructurales (3a, 3b, 3c, 5a y 5b) que juegan un rol en la patogénesis viral (Acevedo-Beiras, 2017; Montassier, 2010).

La proteína S del IBV es codificada como un precursor proteico (S0) que consta de 1162 aminoácidos (Marandino, 2013). La proteína S posee un sitio de escisión postraducciona, generando dos subunidades, S1 y S2 (Abro, 2013; Liu y col., 2009a; Rafique y col., 2018). El sitio de clivaje de la proteína S comprende dos a cuatro aminoácidos que se escinden por la intervención de serina-proteasas de la célula huésped (Abro, 2013; Cavanagh y Gelb, 2008).

La entrada del IBV a la célula huésped se da gracias a la subunidad S1 y luego la fusión entre las membranas viral y del huésped se produce a través de la subunidad S2 (Shang y col., 2018). La antigenicidad del virus y la mayoría de las variaciones genéticas derivan de la modificación de la conformación de las regiones hipervariables (HVRs, por sus siglas inglés) de S1 (Acevedo-Beiras, 2010; Dolz y col., 2008; Rohaim y col., 2020; Montassier, 2010).

### **3.1.2. Clasificación del IBV**

La serotipificación del IBV se lleva a cabo mediante la prueba de virus neutralización o inhibición de la hemoaglutinación (HI) (Abro, 2013; Marandino, 2013). El serotipo de mayor prevalencia a nivel mundial es Massachusetts (de Witt, 2000; Sajak de Wit y col., 2011). Sin embargo, la aparición de un gran número de cepas variantes ha hecho que la serotipificación se vuelva menos común (Abro, 2013; Sjaak y col., 2011). Por lo tanto, actualmente, la

clasificación del IBV se enfoca en la genotipificación (Abro, 2013; Valastro y col., 2016).

La genotipificación del IBV se basa en la amplificación parcial o total del gen S, seguida de un proceso de secuenciación (Abro, 2013; de Wit, 2000). Hasta el año 2016 no existía un consenso sobre las designaciones de grupos genéticos. Por ello, Valastro y colaboradores (2016) propusieron un sistema de clasificación donde se incluyen seis genotipos, GI a GVI, subdivididos en 32 linajes (Valastro y col., 2016). El genotipo GI se destaca porque posee la mayor cantidad de linajes (27 linajes) y es donde se ubica la cepa Massachusetts (Valastro y col., 2016). El resto de los grupos, GII a GVI, sólo tienen un linaje y cada uno posee una cepa prototipo (Valastro y col., 2016).

### **3.1.3. Variabilidad del IBV**

La variación genética del IBV está asociada con su ARN, su transcripción discontinua y la generación de ARN mensajeros sub-genómicos (Acevedo-Beiras, 2010; Cavanagh y Gelb, 2008; Sjaak de Wit y col., 2011). Actualmente, se han detectado más de 50 genotipos del IBV distribuidos en todo el mundo (Marandino, 2013; Valastro y col., 2016).

Las mutaciones en el genoma del IBV pueden ser por deleciones o inserciones en la secuencia S1 (Acevedo-Beiras, 2010; Acevedo-Beiras, 2017; Cavanagh y Gelb, 2008). Las secuencias de aminoácidos de S1 entre diferentes cepas varía entre un 2 y 25% (Acevedo-Beiras 2017; Montassier 2010). Por otro lado, la recombinación suele suceder cuando en una célula

infectada por varias cepas de coronavirus, la ARN polimerasa genera ARN quiméricos y en consecuencia virus con genomas modificados (Acevedo-Beiras 2017; Montassier 2010). La tasa de recombinación genética de los coronavirus es elevada, alrededor del 25% (Acevedo-Beiras, 2017; Marandino, 2013; Simon-Loriere y Holmes, 2011).

#### **3.1.4. Incidencia y distribución de BIA**

BIA es una enfermedad de distribución mundial y se considera que es ubicuitaria en los países donde se crían aves de corral y ahí tiene una incidencia cercana al 100% (Bande y col., 2017; Ignjatovic y Sapats, 2000; Panisello y Giner, 2010; Sjaak de Wit y col., 2011). Sin embargo, algunas variantes del IBV están distribuidas en varios países, mientras que otras son exclusivas de determinadas regiones geográficas (Bande y col., 2017).

En Estados Unidos, en 1950 fue descrita por primera vez BIA con el serotipo Massachusetts y desde entonces se han identificado gran cantidad de variantes. En América del Norte circulan cepas, como Arkansas (Ark), Connecticut (Conn), Delaware (DE), Dautch (D 1466), Georgia (GA) y California (CAL) (Bande y col., 2017; Sjaak de Wit y col., 2011). Por otro parte, en América Latina desde 1970 se tienen reportes de la presencia de Mass, Ark y Conn. Además, circulan variantes europeas de la cepa 4/91 y varias investigaciones muestran que existen variantes propias, como las de Brasil, Argentina o Costa Rica (Acevedo-Beiras, 2017; Bande y col., 2017; Marandino, 2013; Sjaak de Wit y col., 2011; Villarreal y col., 2007).

En África, desde 1980 se tiene conocimiento de la presencia de la cepa “G”, pero se sabe que los genotipos, QX, Italy 02 y Ark circulan en el continente (Acevedo-Beiras, 2017; Bande y col., 2017). Además, en ciertos países de este continente, como Egipto, Marruecos, Argelia, Túnez y Sudán, se han reportado cepas propias (Acevedo-Beiras, 2017; Bande y col., 2017; Sjaak de Wit y col., 2011).

Finalmente, con relación a Asia, existen cepas particulares en países, como Tailandia (cepas THA), Malasia (cepa V9/04), Taiwán (varias cepas TW) y Corea del sur (diferentes cepas K). Sin embargo, en China han surgido variantes como la cepa QX, que se ha dispersado a otras partes del mundo (Bande y col., 2017; Sjaak de Wit y col., 2011).

### **3.1.5. Hospedadores y transmisión del IBV**

Se considera que el *Gallus domesticus* es el hospedador natural del IBV (Cavanagh y Gelb, 2008; Colvero y col., 2015). No obstante, se conoce que BIA también afecta a gansos y pavos (Bande y col., 2017; Cavanagh y Gelb, 2008).

El IBV se transmite de manera horizontal por contacto directo entre animales o por contacto con fómites contaminados, con aerosoles o heces provenientes de aves enfermas (Acevedo-Beiras, 2010). La transmisión vertical puede ocurrir, pero hasta el momento parece no ser relevante (Acevedo-Beiras, 2010; Pereira y col., 2016).

### **3.1.6. Signos clínicos y lesiones anatomo-patológicas de BIA**

El período de incubación del IBV está entre las 24 a 48 horas (Jackwood, 2012; Valencia, 2020). La morbilidad alcanza el 100%; mientras que la mortalidad es baja en general, pero puede llegar al 50% cuando se trata de cepas nefropatogénicas (Acevedo-Beiras, 2017; Valencia, 2020).

El IBV se multiplica inicialmente en el epitelio ciliado del tracto respiratorio, pero también tiene preferencia por los epitelios de la glándula de Harder, del riñón, del tracto gastrointestinal y del oviducto (Acevedo-Beiras, 2017; Roberts y Chousalkar, 2017). Las lesiones macroscópicas incluyen inflamación de la cavidad nasal, los senos paranasales y la tráquea, acompañado de la presencia de exudado catarral (Acevedo-Beiras, 2017; Chávez, 2014). En consecuencia, se presentan: estornudo, tos, jadeo, secreción nasal y/o descarga nasal, estertores traqueales y ojos acuosos (Acevedo-Beiras, 2017; Ricks y col., 1999; Wakanell, 2016).

Las cepas de IBV que se multiplican en el oviducto generan agenesia o hipoplasia (Chávez, 2014; Ricks y col., 1999). Con lo cual, las gallinas ponedoras experimentan caídas en la producción de huevos acompañadas de una reducción de la calidad de la cáscara y/o calidad de la albúmina (Chávez, 2014; Roberts y Chousalkar, 2017; Valencia, 2020; Wakanell, 2016).

Por otro lado, las cepas que afectan al riñón producen palidez, inflamación renal, síndrome de nefrosis/nefritis intersticial y gota visceral (Chávez, 2014; Ricks y col., 1999; Valencia, 2020). Los signos que acompañan a la

enfermedad renal incluyen: excrementos húmedos, empastamiento de la cloaca, polidipsia y depresión (de Wit, 2000; Jackwood, 2012; Valencia, 2020).

### **3.1.7. Prevención y control de BIA**

La manera más eficiente de prevenir y controlar BIA es la vacunación (Jackwood, 2012). No obstante, las normas de bioseguridad evitan la propagación del IBV (OIE, 2018). Entre las medidas que permiten controlar BIA destacan la regulación del flujo de personas, vehículos, suministros y desechos (de Wit y Cook, 2019; Legnardi y col., 2020; Servicio Agrícola Ganadero (SAG) de Chile, 2016). Además, el respetar las distancias sugeridas por los organismos de control entre las granjas ayuda con el control de BIA (AGROCALIDAD, 2013). En Ecuador se indica que debe existir entre granjas una distancia de 3 a 5 Km de acuerdo con el fin productivo avícola (MAG, 2011). Otras medidas de bioseguridad son los sistemas de una sólo edad y “todo dentro-todo fuera”; así como períodos de vacío sanitario superiores a 21 días entre cada crianza (AGROCALIDAD, 2013; Legnardi y col., 2020; SAG de Chile, 2016).

#### **3.1.7.1. Vacunación contra IBV**

Las vacunas empleadas contra IBV son vivas, inactivas y recombinantes. Las vacunas vivas son más efectivas y capaces de reducir el desafío de campo en comparación con las vacunas recombinantes y las vacunas inactivas (Bhuiyan y col., 2021). Las vacunas vivas se aplican en el

agua de bebida o por aspersión; mientras que, las vacunas inactivas se aplican por vía intramuscular (Bhuiyan y col., 2021; de Wit, 2000).

Las vacunas recombinantes reportadas en la literatura utilizan la cepa Beaudette apatógena con el ectodominio de la proteína (S) sustituido con las cepas patógenas M41 o 4/91 (Armesto y col., 2011; Hodgson y col., 2004). El intercambio del ectodominio de la proteína S, genera vacunas contra IBV efectivas y definidas genéticamente (Armesto y col., 2011). Además, se reporta experimentalmente la generación de una vacuna de IBV recombinante basada en la cepa H120, pero también expresa la proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) del NDV (Yang y col., 2016). El objetivo de las vacunas recombinantes señaladas es conferir protección cruzada entre los serotipos, aunque no siempre se tiene resultados efectivos (Keep y col., 2020).

Las aves de traspatio generalmente no se vacunan a menos que entren en contacto con aves de otras explotaciones (Bhuiyan y col., 2021; de Wit, 2000). Los pollos de engorde se vacunan al día de edad y en campo una o dos veces dependiendo de la edad de saque (Aston y col., 2019; Bhuiyan y col., 2021).

Las gallinas ponedoras requieren una combinación de vacunas vivas e inactivas durante su vida productiva (Bhuiyan y col., 2021). Durante la etapa de levante se colocan vacunas vivas de refuerzo cada 4 o 6 semanas de edad (Bhuiyan y col., 2021; Villegas, 2011). Antes que las aves comiencen a producir huevos se administran vacunas inactivas y luego se colocan vacunas vivas atenuadas cada 6 semanas (Bhuiyan y col., 2021; Villegas, 2011). No

obstante, los programas vacunales se deben establecer en base a un estudio epidemiológico que incluya la prevalencia del IBV en la zona y el desafío de campo con cepas variantes (Bhuiyan y col., 2021; de Wit, 2000).

### **3.1.8. Diagnóstico de BIA**

El diagnóstico de BIA se puede hacer a través de detección del IBV o mediante demostración de respuesta de anticuerpos contra el virus (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2018; Villarreal, 2010).

#### **3.1.8.1. Aislamiento viral**

Para que el diagnóstico de BIA con el uso del aislamiento viral resulte exitoso se requiere la toma de muestras durante el inicio temprano de la enfermedad (Bande y col., 2016; JackWood y de Wit, 2020). Las muestras pueden incluir hisopados laringotraqueales o tejidos, como tráquea, pulmón, riñón, proventrículo, tonsilas cecales y oviducto (Bande y col., 2016; JackWood y de Wit, 2020). Las muestras procesadas se pueden aislar en huevos de gallina embrionados libres de patógenos específicos (SPF, por sus siglas en inglés, *Specific Pathogen Free*) de 9 a 10 días de edad en embrion de pollo al inocularse en la cavidad alantoidea de (Bande y col., 2016; JackWood y de Wit, 2020). A partir del tercer pasaje en embriones, el IBV causa depósitos de uratos en mesonefros, enanismo o muerte embrionaria; no obstante, se requiere de un método confirmatorio (Legnardi y col., 2020). La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, por sus siglas en

inglés Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) es la técnica molecular más utilizada (Al-Jallad y col., 2020).

Igualmente, se ha realizado el aislamiento de IBV en cultivos celulares primarios (fibroblastos de embrión de pollo) y en células de línea (células Vero) (Bande y col., 2016). Las células infectadas en los cultivos se caracterizan por el desarrollo de sincitios, redondeamiento y posterior desprendimiento (Bande y col., 2016). Sin embargo, no todas las cepas del IBV se adaptan con facilidad a los cultivos celulares y se requieren varios pasajes (Bande y col., 2016). Por ello, se suele emplear los cultivos en órganos traqueales (TOC), que son más eficientes y en los que el IBV ocasiona ciliostasis o permiten la identificación del virus mediante inmunohistoquímica indirecta (Acevedo-Beiras, 2010; Legnardi y col., 2020).

### **3.1.8.2. Microscopia electrónica**

La microscopía electrónica permite identificar al IBV en muestras biológicas y cultivos celulares primarios (Bande y col., 2016). En ambos casos el diagnóstico se basa en la presencia de estructuras pleomórficas con proyecciones de espigas, después de tinción negativa con fosfotúngstico ácido (Bande y col., 2016).

### **3.1.8.3. Inmunohistoquímica**

La inmunoperoxidasa y la inmunofluorescencia indirecta se emplean para detectar al IBV en cortes histológicos de tejidos infectados (Bande y col., 2016; Dhama y col., 2014). De igual forma, la inmunohistoquímica se utiliza para identificar al IBV en membranas corioalantoideas infectadas (Acevedo-Beiras, 2010).

### **3.1.8.4. Serología**

Las pruebas de HI y virus neutralización (VN) se utilizan para identificar serotipos de IBV (Bande y col., 2016; Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2018). No obstante, estas pruebas de HI no son confiables para la serotipificación en aves reproductoras y ponedoras dado que, sus sueros poseen anticuerpos de reacción cruzada a las múltiples infecciones y vacunas (OIE, 2018). La prueba de precipitación en gel de agar permite respuestas rápidas, pero son sólo eficientes durante pocas semanas después de la infección (Legnardi y col., 2020).

Por otro lado, el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) se considera más sensible y se emplea para el monitoreo de la respuesta de anticuerpos después de la vacunación (Bande y col., 2016). Existen kits de ELISA comerciales que facilitan su utilización (Legnardi y col., 2020; OIE, 2018).

### 3.1.8.5. Pruebas moleculares

Actualmente, el uso de las pruebas moleculares tiene importancia para el diagnóstico rápido y la clasificación genotípica del IBV (Bhuiyan y col., 2021; Dhama y col., 2014). Los métodos moleculares empleados incluyen la RT-PCR, la RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR *Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction*) y el análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Bande y col., 2016; Legnardi y col., 2020).

Las técnicas de RT-PCR y qRT-PCR se han utilizado para detectar de manera precisa cualquier cepa de IBV a través de la amplificación de regiones conservadas como el gen N o la región 5'UTR (Callison y col., 2006; Hernández y col., 2012; Zwaagstra y col., 1992). Además, se emplean estas pruebas moleculares para la amplificación del gen S o un segmento de S1, como paso previo para la secuenciación y clasificación del IBV (Bande y col., 2016; Legnardi y col., 2020; Marandino, 2013; Villarreal y col., 2010). Por su parte, el RFLP es una alternativa al desarrollo de sondas específicas y secuenciación (Legnardi y col., 2020). No obstante, se requiere actualizar frecuentemente las enzimas de restricción a ser utilizadas y ciertas cepas son difíciles de identificar con esta técnica (Bande y col. 2016; Keeler y col. 1998; Legnardi y col. 2020).

### **3.2. Antecedentes del estudio de BIA en Ecuador**

La información científica sobre la BIA en el Ecuador se limita a escasas publicaciones y menciones en congresos nacionales de avicultura. Por ejemplo, en las Memorias del VII Congreso Nacional de Avicultura, se menciona el primer reporte del virus en 1978 a través de aislamiento viral y pruebas de neutralización viral con antisuero del tipo Massachussets (Valencia, 2007). En el mismo documento, se señala que, en el año 2000, el Ecuador envió a los Laboratorios Lohman en Alemania e Intervet de Holanda muestras de sueros de pollos con problemas respiratorios, obteniéndose títulos contra las cepas Massachussets, Connecticut, Arkansas, la variante holandesa D274 y para la variante 4/91 (Valencia, 2007).

Los trabajos científicos relacionados con la BIA en el Ecuador son tan sólo tres. El primero se realizó en el año 2006, donde se evaluó la prevalencia de agentes patógenos en diez explotaciones domésticas del noroeste del Ecuador, encontrándose a través de ELISA una seroprevalencia de 85% para el IBV (Hernandez-Divers y col., 2006). El segundo trabajo, corresponde a un estudio efectuado en la Isla Santa Cruz del Archipiélago de las Galápagos, en donde mediante el empleo de HI se detectó la seropositividad para el IBV en aves de traspatio (Soos y col., 2008). Finalmente, el tercer trabajo fue realizado estudiando aves de traspatio de la parroquia de Puéllaro. En dicha investigación, se analizaron hisopados laringotraqueales y cloacales;

encontrándose que el 65,71% de las explotaciones domésticas eran positivas a la enfermedad (García, 2016).

Las investigaciones mencionadas y las vacunas empleadas para controlar y prevenir BIA en las granjas avícolas del Ecuador demuestran la presencia del IBV. No obstante, no existen publicaciones científicas que demuestren de manera fehaciente la presencia de cepas variantes que pueden estar circulando en el Ecuador.

### 3.3. Materiales y Métodos para la caracterización molecular del IBV



#### 3.3.1. Determinación de la presencia del IBV en muestras de gallinas ponedoras mediante PCR para la región 5'UTR.

Los cebadores usados para amplificar un segmento de 143 pb de la región 5'UTR del IBV fueron los diseñados por Callison y col., (2006). El cebador directo fue el IBV5' GU391 (5'-GCTTTTGAGCCTAGCGTT-3') y el cebador inverso correspondió a IBV5' GL533 (5-GCCATGTTGTCACTGTCTATTG-3') (Anexo 3). Se emplearon como controles positivos dos vacunas vivas contra IBV. Igualmente, se utilizó cosecha de líquido alantoideo facilitado por Laboratorios Llaguno Cía. Ltda. del Ecuador como control positivo.

Adicionalmente, para contar con secuencias vacunales, se procuró conseguir la mayor cantidad de vacunas comerciales contra IBV empleadas en la zona de estudio. Se trabajó con 17 vacunas vivas que se obtuvieron directamente de los laboratorios fabricantes, importadores o comercios agropecuarios. Cada vacuna fue identificada con un código alfanumérico (Tabla 2). A partir de las vacunas reconstituidas se procedió con la extracción y retrotranscripción del material genético.

**Tabla 2**

Vacunas vivas contra IBV comercializadas en la zona de estudio

No.	Código	Cepa del IBV señalada por casa comercial
1	1B	Ma 5
2	2B	4/91
3	3B	B48
4	4B	Variante <sup>1</sup>
5	6B	H120
6	7B	H120
7	8B	Mass <sup>1</sup>
8	9B	H120
9	10B	Mass <sup>1</sup>
10	1NB <sup>2</sup>	H120
11	2NB <sup>2</sup>	Mass <sup>1</sup>
12	3NB <sup>2</sup>	Mass <sup>1</sup>
13	4NB <sup>2</sup>	Mass <sup>1</sup>
14	5NB <sup>2</sup>	Tipo Mass <sup>1</sup>
15	10NB <sup>2</sup>	Tipo Mass <sup>1</sup>
16	11NB <sup>2</sup>	Ma5
17	14NB <sup>2</sup>	Mass

<sup>1</sup> Descripción de casa comercial sólo menciona cepa Mass, tipo Mass o variante.

<sup>2</sup> Vacuna combinada con Newcastle.

Con cada tipo de muestra (a, b y c) y con las vacunas vivas se realizó la PCR para  $\beta$ -actina aviar. Luego se procedió a detectar la presencia del IBV en cada una de las vacunas y tipos de muestras a través de la prueba de PCR para la región 5'UTR.

### **3.3.2. Análisis de la relación filogenética entre las secuencias obtenidas de las muestras de aves ponedoras y las secuencias de cepas de referencia para el virus del IBV**

#### **3.3.2.1. Técnica de PCR para un segmento del gen S1 del IBV.**

Para la caracterización molecular del IBV en las muestras positivas a IBV se amplificó un segmento del gen S1. Los controles positivos usados fueron una vacuna viva contra IBV (1B), cosecha de líquido alantoideo facilitado por Laboratorios Llaguno Cía. Ltda. (IBV) y ADNc de IBV facilitado por AGROCALIDAD (A).

En primer lugar, se probaron los cebadores diseñados por Rimondi y col., (2009). Con el cebador directo C2U (5'-TGGTTGGCATTACAYGG-3') y el cebador inverso IBVrev (5'-CCATCTGAAAAATTACCAGT-3') se amplificó una región de 609pb del gen S1.

Posteriormente, se optó por trabajar con los cebadores previamente diseñados y utilizados para caracterizar cepas del IBV en Argentina y Uruguay (Marandino y col., 2015). El juego nuevo de cebadores amplificaba un fragmento de 783 pb de la región 5' de S1: IBV-S1 5'-ACTGAACAAAAGACAGACTT-3' e IBV-S2 5'-CCATCTGAAAAATTRCCAGT-3' (Marandino y col., 2015). A partir del promedio de las temperaturas de fusión de los cebadores se corrió un gradiente térmico.

La técnica de PCR se probó con diferentes concentraciones de cebadores (0,2 mM y 0,4 mM) y enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase

(1,25U, 1,50U y 1,75U). El volumen final de reacción fue de 45µl, donde se colocó 6µl de muestra.

### **3.3.2.2. PCR para el gen S1 del IBV en muestras de campo y vacunas comerciales.**

Se consideró como positiva para IBV aquella granja que tuviese al menos una muestra positiva a la amplificación del segmento de la región 5'UTR. Para la caracterización molecular sólo una muestra positiva a IBV por granja fue evaluada a través de la PCR para la región del gen S1. Las vacunas comerciales también se procesaron con la técnica molecular para la región de 783 pb del gen S1.

### **3.3.2.3. Secuenciación y análisis filogenético para el segmento S1 del IBV.**

Los amplicones tanto de las muestras de granjas como de las vacunas analizadas obtenidos a través de la PCR para la región de 783 pb del gen S1 del IBV fueron enviados para secuenciación (secuenciaci3nes cortas de Sanger) a Macrogen – Corea. Las secuencias de nucle3tidos (nt) fueron editadas y alineadas con ayuda del programa bioinform3tico MEGA-X 11.0.8. Las secuencias consenso de cada regi3n S1 se guardaron en formato Fasta. Previa a la construcci3n de un 3rbol filogen3tico se procedi3 a verificar que se tuvieran secuencias relacionadas con el virus del IBV a trav3s del empleo de Nucleotide-BLAST.

Posteriormente, se trabajó en el programa Geneious Prime 2021.2.2. Se creó un conjunto de datos que incluyó varias secuencias usando el algoritmo Clustal-Omega. Para el análisis filogenético se usaron secuencias parciales de S1 desde el codón de inicio ATG del gen S hasta el cebador reverso empleado en la técnica de PCR de la investigación. Las secuencias incluidas en el análisis filogenético fueron:

- Secuencias de muestras de campo de la provincia de Tungurahua (#16)
- Secuencias de vacunas vivas que se comercializan en la zona (#17).
- Secuencias que corresponden a las cepas prototipo de cada linaje (#32) según la clasificación de Valastro y col., (2016) (Tabla 3).
- Secuencias obtenidas del GenBank consideradas como representativas de América, Europa y China (#32) (Tabla 4).

La construcción de un árbol filogenético se realizó con el empleo del programa IQ-TREE (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/IQTREE/iqtree.html>). El programa realizó automáticamente los cálculos estadísticos y estimó el modelo de evolución a través de ModelFinder (Kalyaanamoorthy y col., 2017; Nguyen y col., 2015). Se construyó un árbol consenso de máxima similitud con 1000 ultra-bootstrap (Hoang y col., 2017). La edición del árbol para ingreso de metadatos se realizó con la herramienta en línea iTOL (<https://itol.embl.de/itol.cgi#>).

**Tabla 3**

Cepas prototipo de cada linaje según clasificación genotípica.

Número de acceso Genbank	Cepa prototipo	Código en árboles filogenéticos	País o procedencia	Linaje
M95169	BEAUDETTE	Beaudette_GI-1	Estados Unidos	GI-1
GU393336	HOLTE	Holte_GI-2	Estados Unidos	GI-2
L14069	GRAY	Gray_GI-3	Estados Unidos	GI-3
L18988	HOLTE	Holte_GI-4	Estados Unidos	GI-4
U29522	N1/62	N1/62_GI-5	Australia	GI-5
U29519	VicS	VicS_GI-6	Australia	GI-6
AY606320	TP/64	TP/64_GI-7	Taiwán	GI-7
JQ964061	L165	L165_GI-8	Estados Unidos	GI-8
M99482	ARK99	Ark99_GI-9	Estados Unidos	GI-9
AF151954	B	B_GI-10	Nueva Zelanda	GI-10
JX182775	UFMG/G	UFMG/G_GI-11	Brasil	GI-11
X52084	D3896	D3896_GI-12	Países Bajos	GI-12
EU914938	Moroccan-G/83	Moroccan-G/83_GI-13	Marruecos	GI-13
X87238	B1648	B1648_GI-14	Bélgica	GI-14
FJ807932	B4	B4_GI-15	Corea	GI-15
KJ941019	IZO28/86	IZO28/86_GI-16	Italia	GI-16
AF419315	CA/MACHADO/88	CA/Machado/88_GI-17	Estados Unidos	GI-17
AY296744	JP8127	JP8127_GI-18	Japón	GI-18
KC577395	58HEN-93II	58HEN-93II_GI-19	China	GI-19
AF349621	Qu_mv	Qu_mv_GI-20	Canadá	GI-20
DQ064806	SPAIN/97/314	España/97/314_GI-21	España	GI-21
KC577382	40GDGZ-971	40GDGZ-971_GI-22	China	GI-22
AF093796	VARIANT 2	Variant_2_GI-23	Israel	GI-23
KF757447	V13	V13_GI-24	India	GI-24
EU925393	CA/1737/04	CA/1737/04_GI-25	Estados Unidos	GI-25
FN182243	NGA/B401/2006	NGA/B401/2006_GI-26	Nigeria	GI-26
GU301925	GA08	GA08_GI-27	Estados Unidos	GI-27
M21971	D1466	D1466_GII-1	Países Bajos	GII-1
U29450	N1/88	N1/88_GIII-1	Australia	GIII-1
U77298	DE/072/92	DE/072/92_GIV-1	Estados Unidos	GIV-1
DQ059618	N4/02	N4/02_GV-1	Australia	GV-1
GQ265948	TC07-2	TC07-2_GVI-1	China	GVI-1

Tomado de Valastro y col., (2016).

**Tabla 4**

Cepas representativas de IBV procedentes de América, Europa y China.

Número de acceso Genbank	Código en árboles filogenéticos	País o procedencia
MG734788	CK/CH/GX/NN17-13	China
MG734786	CK/CH/GX/NN17-12	China
MG734775	CK/CH/CQ/17-2	China
MG734773	CK/CH/SC/DY17-1	China
KU736751	H120 cepa vacunal	Estados Unidos
KU736747	MA5 cepa vacunal	Estados Unidos
DQ064815	España/00/339	España
DQ064812	España/99/326	España
DQ064809	España/99/316	España
KM658255	AR/11/BA/28	Argentina
KM658253	AR/10/BA/30	Argentina
KM658252	AR/09/BA/39	Argentina
KM658251	AR/09/BA/38	Argentina
EU283081	Mass cepa vacunal	Estados Unidos
EU283060	Conn cepa vacunal	Estados Unidos
EU283053	Ark cepa vacunal	Estados Unidos
KM658245	UY/09/CA/01	Uruguay
KM658243	UY/12/CA/39	Uruguay
KM658241	UY/12/CA/33	Uruguay
KM658239	UY/12/CA/27	Uruguay
KY465751	IBV/Brasil/ROL/0115	Brasil
KY465748	IBV/Brasil/NUP/0516	Brasil
KY565555	IBV/Brasil/FRQ/0315	Brasil
KY565554	IBV/Brasil/FRQ/0116	Brasil
AF286302	Q1_China	China
AF093794	4/91 cepa vacunal	Estados Unidos
Z83979	UK/7/93	Reino Unido
HM132098	QX_UK	Reino Unido
MF043938	12.124_Chile	Chile
MF043935	Q1_Chile	Chile
MF043933	D100-273_Chile	Chile
GQ253482	QX_España	España

#### **3.3.2.4. Análisis de similitud nucleotídica para las secuencias parciales de S1**

Los cálculos de similitud nucleotídica se realizaron a través del modelo de sustitución *p-distance* del programa MEGA-X 11.0.8. Para el análisis de similitud intra-linajes se crearon 32 grupos equivalentes a los linajes de la clasificación de Valastro y col., (2016). Además, se estimó la similitud nucleotídica entre las secuencias muestrales y las vacunales analizadas en el estudio según su agrupación en el árbol filogenético obtenido con el programa IQ-TREE.

#### **3.3.2.5. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de S1 y sitios de glicosilación**

La traducción de las secuencias aminoacídicas para la región parcial de S1 se realizó mediante la herramienta ExPASy (<https://web.expasy.org/translate>). Las secuencias aminoacídicas de los tres grupos encontrados con el árbol de nucleótidos se alinearon con la cepa tipo respectiva: cepa Mass (EU283081), cepa 4/91 (AF093794) y cepa Q1 (AF286302, MF043935).

Se realizó un análisis de los sitios de glicosilación entre las cepas tipo de cada grupo filogenético formado y las secuencias muestrales ubicadas en ellos. La determinación de los sitios potenciales de glicosilación en cada conjunto de secuencias se hizo a través del programa NetNGlyc - 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>).

### 3.4. Resultados y discusiones sobre la caracterización molecular del IBV

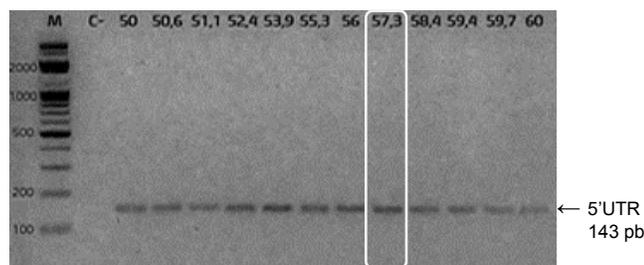


#### 3.4.1. PCR para la región 5'UTR del IBV.

La técnica de PCR para detección de IBV a través de la región 5'UTR trabajó con una temperatura de unión de cebadores de 57°C (Imagen 2). Resulta importante destacar que las PCR para detectar  $\beta$ -actina y NDV también usaron condiciones de ciclado similares que se detallan en la Tabla 5.

#### Imagen 2.

#### Electroforesis del perfil térmico para la región 5'UTR del IBV.



Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñidas con Sybr (Invitrogen) en la que se observa en cada carril diferentes temperaturas (°C). (M) marcador de pares de bases. (C-) control negativo. (C+) control positivo. En recuadro blanco se destaca la temperatura seleccionada.

#### Tabla 5.

Protocolo de ciclado de las PCR para  $\beta$ -actina aviar, región 5'UTR y gen M.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos: segundos)	No. Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3:00	1
Desnaturalización	94	0:15	
Hibridación	57	0:30	40
Extensión	72	0:15	
Extensión final	72	3:00	1

De igual forma, las técnicas de PCR para detectar  $\beta$ -actina, IBV y NDV se trabajaron con las mismas concentraciones de reactivos (Tabla 6). En particular, se optó por utilizar una concentración de 2,5 mM para el  $MgCl_2$  (Imagen 3a) y una cantidad de ADNc de 2  $\mu$ l/reacción (Imagen 3b). Las concentraciones de  $MgCl_2$  y cantidad de molde están dentro de los parámetros para la realización de una técnica de PCR punto final (Bolívar y col., 2014; Cornejo y col., 2014).

**Tabla 6.**

Condiciones empleadas para las PCR de  $\beta$ -actina, 5' UTR y el gen M.

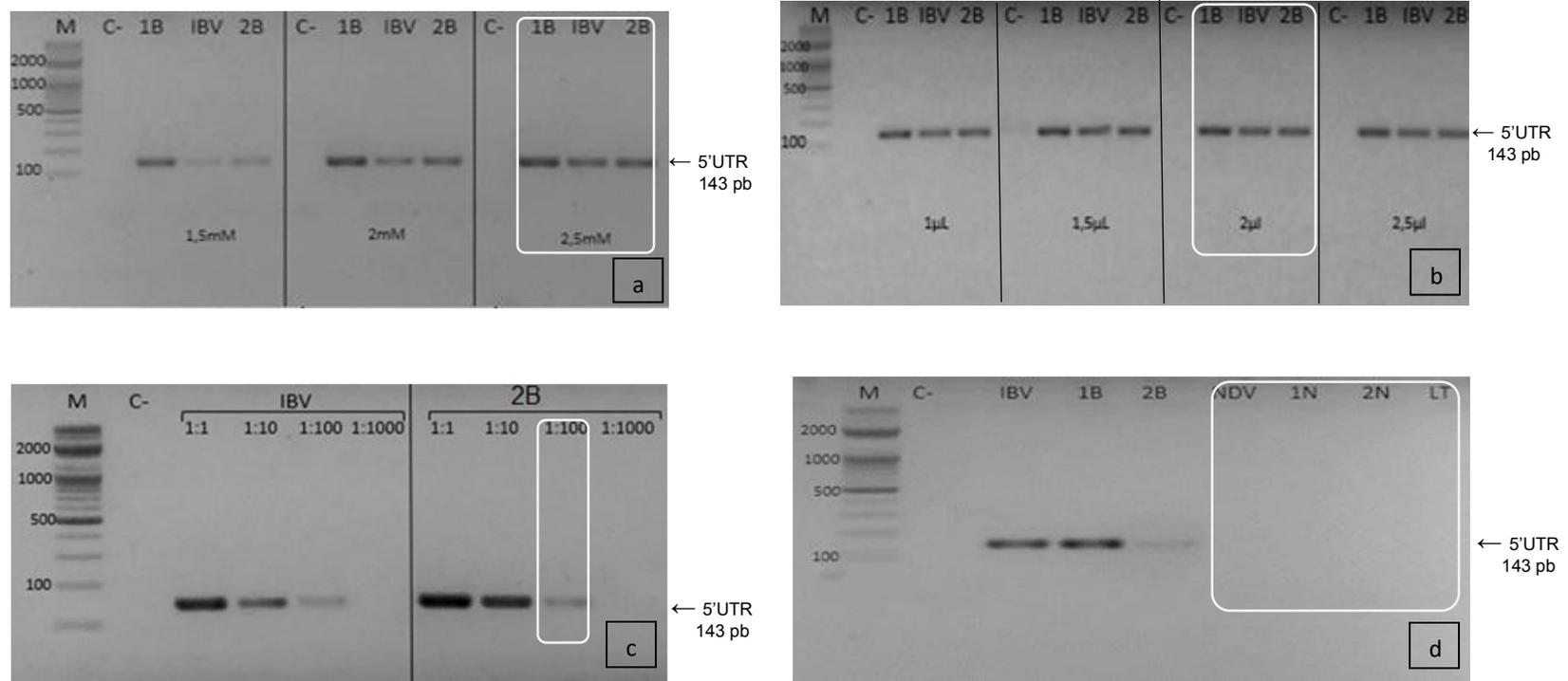
Reactivo	Concentración final	
	Cantidad	Unidad
Buffer	1	X
dNTPs Mix	0,2	Mm
$MgCl_2$	2,5	mM
Cebador forward	0,2	$\mu$ M
Cebador reverse	0,2	$\mu$ M
Enzima GoTaq®	1,25	U
Templado	2 <sup>1</sup>	$\mu$ l

<sup>1</sup> Cantidad por reacción a una concentración mínima de 12 ng/ $\mu$ l

Con relación a la sensibilidad analítica, la PCR para 5'UTR amplificó hasta la dilución 1:100. En esta dilución, la concentración mínima encontrada fue de 12 ng/ $\mu$ l de ADNc en la vacuna 2B (Imagen 3c). Además, la técnica fue específica para el virus de IBV dado que ninguno de los controles positivos del NDV, ni de ILTV amplificaron (Imagen 3d). Estos resultados coinciden con Callison y col., (2006), quienes mencionan que el uso de los cebadores empleados permite diferenciar BIA de otras enfermedades como, ILT y EN.

### Imagen 3

#### Electroforesis relacionadas con la puesta a punto de la PCR para la región 5'UTR del IBV.



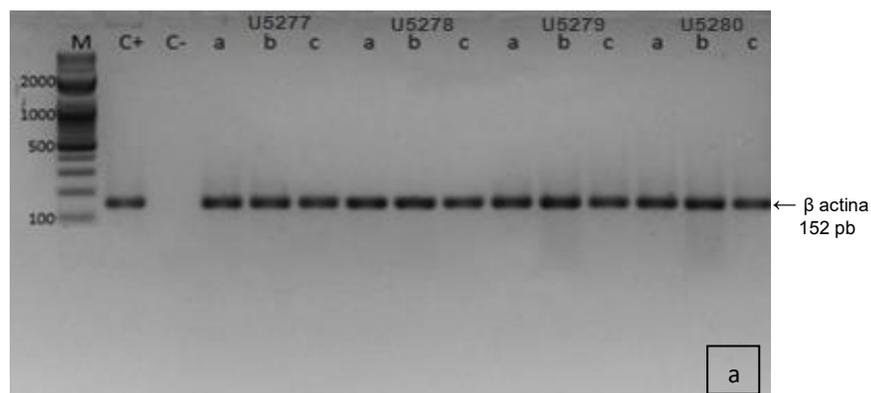
Geles de agarosa al 2% teñidos con SYBR safe DNA (Invitrogen) en los que se observa amplificación del segmento de la región 5'UTR con: a. diferentes concentraciones de  $MgCl_2$  (1,5 mM, 2 mM y 2,5 mM). b. diferentes cantidades de molde (1  $\mu$ l, 1,5  $\mu$ l, 2  $\mu$ l y 2,5  $\mu$ l). c. diferentes diluciones (1:1; 1:10; 1:100; 1:1000) de los controles positivos (IBV, 2B). d. ausencia de bandas para controles positivos del NDV (NDV, 1N, 2N) y de ILTV (LT). (M) marcador de pares de bases. (C-) control negativo. (C+) control positivo. En recuadros blancos se destacan las condiciones seleccionadas.

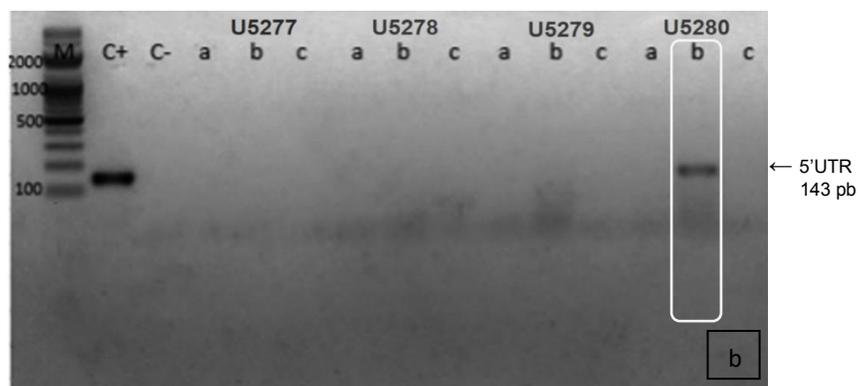
### 3.4.2. Detección del IBV mediante PCR para la región 5'UTR en muestras de campo y vacunas comerciales.

Debe destacarse que, todas las muestras resultaron positivas para  $\beta$ -actina aviar (Imagen 4a) (Anexo 4). Por otro lado, las 17 vacunas vivas contra IBV analizadas fueron positivas a IBV. Además, 16 (34,04%) granjas resultaron positivas a IBV al tener al menos una muestra que amplificó para la región 5'UTR (Imagen 4b). Sin embargo, los resultados positivos de las muestras de granjas sólo revelaron la presencia de virus circulante; pudiéndose tratar del virus de campo o del propio virus vacunal (Marandino, 2013).

#### Imagen 4

Electroforesis de PCR para  $\beta$ -actina aviar y región 5'UTR con los diferentes tipos de muestras (a, b y c) provenientes de granjas de la provincia de Tungurahua.





Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR safe DNA (Invitrogen) para: a. PCR para  $\beta$  actina aviar con muestras de granjas que amplifican el segmento de 152 pb. b. PCR para la región 5'UTR del IBV, donde se aprecia que sólo una muestra (U5280b) amplifica el segmento de 143 pb. (M) marcador de pares de bases. (C-) control negativo. (C+) control positivo.

### **3.4.3. Análisis de la relación filogenética entre las secuencias obtenidas de las muestras de aves ponedoras y las secuencias de cepas de referencia del IBV**

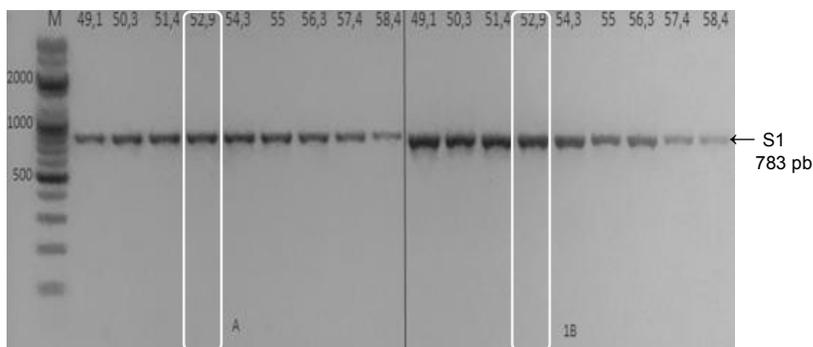
#### **3.4.3.1. Técnicas de PCR para un segmento del gen S1 del IBV.**

Inicialmente se trabajó una PCR punto final para cebadores diseñados por Rimondi y col., (2009). La temperatura de fusión encontrada para los cebadores fue de 49°C. La PCR para la región S1 de 609 pb se utilizó para las muestras que habían resultado positivas a la región 5'UTR; pero no se logró amplificación para ninguna muestra problema.

Por otra parte, para la técnica de PCR llevada a cabo con los cebadores diseñados por Marandino (2013) para amplificar un segmento de 783 pb del gen S1 la temperatura de hibridación fue 53°C (Imagen 5). Las condiciones para la PCR punto final para la región de 783 pb del gen S1 se detallan en la Tabla 7.

### Imagen 5.

Electroforesis del perfil térmico para el segmento de 783 pb del gen S1.



Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñidas con Sybr (Invitrogen) en la que se observa en cada carril diferentes temperaturas ( $^{\circ}\text{C}$ ). (M) Marcador de pares de bases. (A) ADNc positivo a IBV. (1B) vacuna viva contra IBV. En recuadros blancos se destacan las temperaturas seleccionadas.

### Tabla 7.

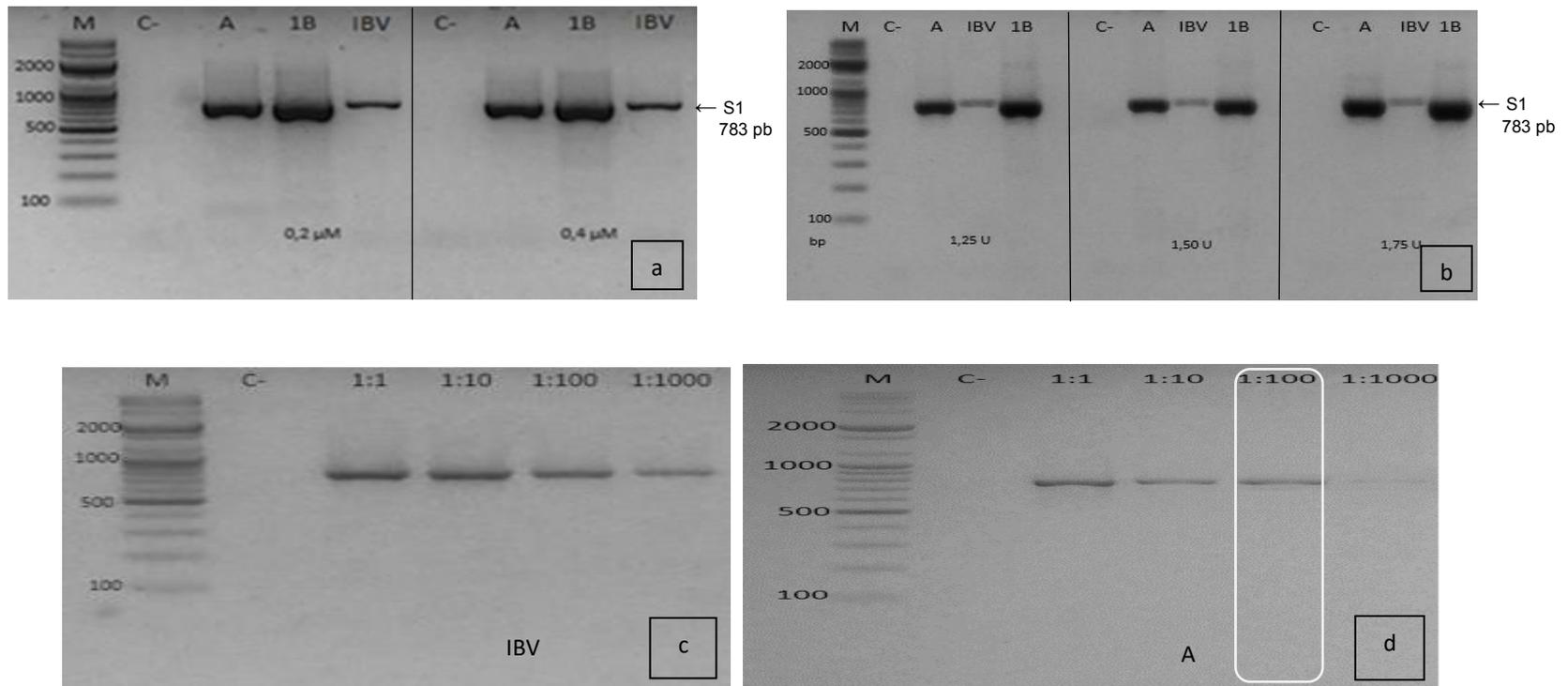
Protocolo para PCR punto final de la región de 783 pb del gen S1.

Proceso	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (minutos)	No. ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	
Hibridación	53	1	40
Extensión	72	1	
Extensión final	72	10	1

Dentro de la puesta a punto de la PCR para el fragmento de 783pb del gen S1 se establecieron concentraciones finales de reactivos similares a las empleadas en la PCR para la región 5'UTR; añadiéndose la optimización de las concentraciones de cebadores a 0,2 mM (Imagen 6a) y de polimerasa a 1,25 U (Imagen 6b). Además, se determinó que la técnica podía amplificar muestras con concentraciones mínimas de ADNc de 12 ng/ $\mu\text{l}$ , cantidad medida en la dilución 1:100 del ADNc positivo a IBV (Imagen 6d).

### Imagen 6.

Electroforesis relacionadas con la puesta a punto de la PCR para un fragmento de 783pb del gen S1.



Geles de agarosa al 2% teñidos con Sybr (Invitrogen) donde se observa la amplificación de un fragmento de 783pb del gen S1 con: a. diferentes concentraciones de cebadores (0.2μM y 0.4μM). b. diferentes concentraciones de enzima GoTaq® (1,25U, 1,50U y 1,75U). c y d. diferentes diluciones (1:1; 1:10; 1:100; 1:1000) de controles positivos del IBV, en recuadro blanco se destaca la máxima dilución para detección. (M) marcador de pares de bases. (C-) control negativo. (C+) Control positivo. (A) ADNc positivo al IBV. (1B) vacuna viva contra IBV. (IBV) cosecha de líquido alantoideo positivo a IBV.

Con relación al uso de la PCR para el fragmento de 783 pb con muestras de campo se encontró que todas las 16 muestras analizadas (Tabla 8) eran positivas al gen S1 del IBV.

**Tabla 8.**

Resultados de la PCR para la región 5'UTR y la región del gen S1 del IBV.

No.	Código de granja	Resultados por tipo de muestra					
		5'UTR			S1		
		a	b	c	a	b	c
1	U5240	+	+	+	NA	+	NA
2	U5241	+	+	+	NA	+	NA
3	U5247	-	+	+	NA	+	NA
4	U5250	+	-	-	+	NA	NA
5	U5256	-	+	-	NA	+	NA
6	U5261	-	+	-	NA	+	NA
7	U5262	-	+	-	NA	+	NA
8	U5263	-	+	-	NA	+	NA
9	U5264	-	+	+	NA	+	NA
10	U5268	+	+	+	NA	+	NA
11	U5270	-	-	+	NA	NA	+
12	U5271	+	+	+	NA	+	NA
13	U5272	+	-	-	+	NA	NA
14	U5280	-	+	-	NA	+	NA
15	U5281	-	+	-	NA	+	NA
16	U5284	-	+	+	NA	+	NA
	<b>Total</b>	6	13	8	2	13	1

+: Positivo

-: Negativo

NA: No analizado.

### 3.4.3.2. Análisis filogenético para el IBV a partir de las secuencias nucleotídicas de S1.

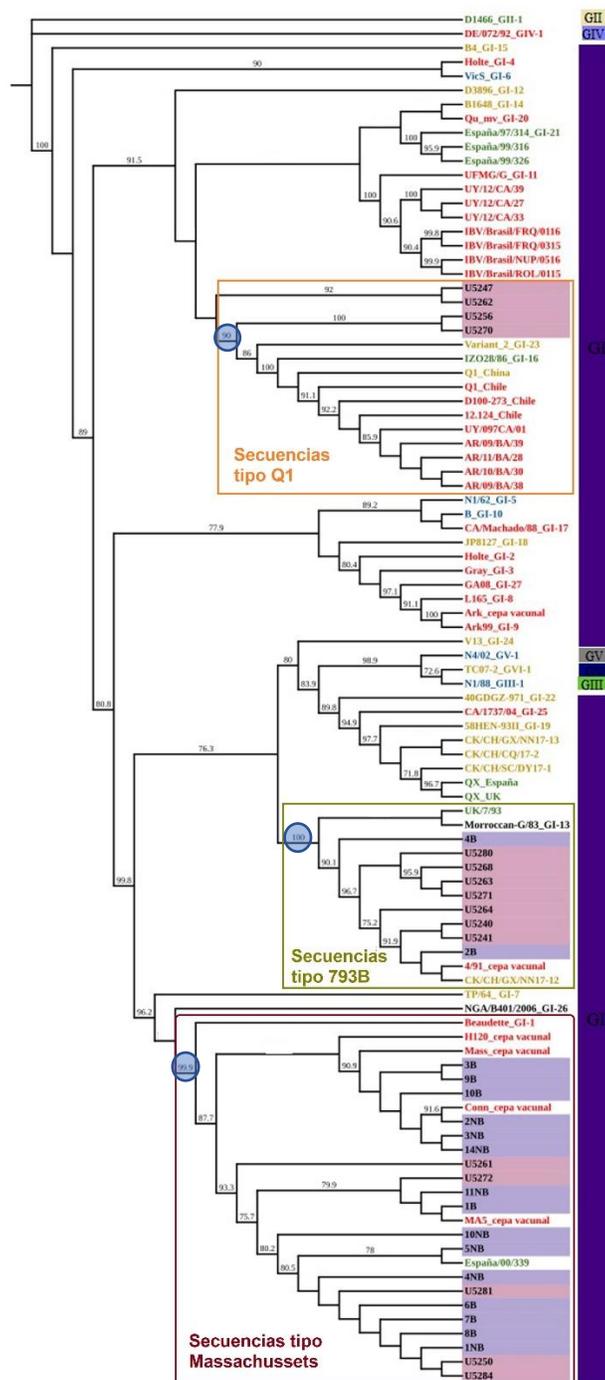
Con el servidor en línea gratuito IQ-TREE se obtuvo como mejor modelo: TPM3u+F+I+G4. A partir del árbol consenso creado se pudo determinar que, las 16 secuencias del IBV encontradas en la provincia de

Tungurahua pertenecían al genotipo GI. De estas, cinco (U5250, U5261, U5272, U5281, U5284) estaban en el mismo clado donde se ubica la secuencia prototipo del linaje GI-1 (Imagen 7). Junto con estas secuencias se presentan 15 de las vacunas comerciales analizadas (1B, 3B, 6B, 7B, 8B, 9B, 10B, 1NB, 2NB, 3NB, 4NB, 5NB, 10NB, 11NB y 14NB) con un soporte de ultra-bootstrap en el nodo principal para el ancestro común de 99,9% (Imagen 7). Sin embargo, las secuencias muestrales y vacunales agrupadas en el linaje GI-1 forman tres subgrupos.

En el primer subgrupo, las secuencias U5250, U5281 y U5284 se relacionan con la cepa España 00/339 (Imagen 7). Según Dolz y col., (2008) el aislado España/00/339 está agrupado con cepas vacunales H120 y proponen que el origen de esta cepa estaría relacionado con reordenaciones de las cepas vacunales Massachussets utilizadas en España. En el presente estudio se podría considerar que las tres secuencias de campo tienen un origen vacunal, pues se acompañan en el clado filogenético con siete vacunas comerciales que llevan una cepa tipo Massachussets (8B, 4NB, 5NB y 10NB) o la cepa H120 (6B, 7B y 1NB). Por otra parte, en el segundo subgrupo, las secuencias U5261 y U5272 están relacionadas con la cepa vacunal MA5. Esta cepa está incluida dentro de las principales vacunas tipo Massachussets disponibles en el mercado (Guzmán e Hidalgo, 2020). Las vacunas 1B y 11NB según las empresas fabricantes llevan la cepa MA5 y se ubican en el segundo subgrupo del genotipo GI-1. Por lo que, se podría inferir que las secuencias muestrales de este segundo subgrupo corresponderían al virus vacunal MA5.

## Imagen 7.

Árbol consenso de S1 con secuencias muestrales, vacunales, secuencias de referencia (América, Europa y China) y prototipo de la clasificación genotípica.



Árbol consenso con modelo *TPM3u+F+I+G4*. Los colores de letras hacen referencia a la procedencia: rojo para cepas de América, amarillo para cepas de Asia, verde para cepas de Europa, celeste para cepas de Oceanía y negro para cepas de África. Las cepas muestrales están escritas en color negro, pero destacadas en recuadros rosa. Las cepas de vacunas comerciales encontradas en Ecuador están escritas en color negro y enceradas en recuadros lila. Los números a lo largo de las ramas hacen referencia a los valores de ultra-bootstrap, los soportes de los nodos clave están encerrados en círculos azules.

Las vacunas 3B, 9B, 10B, 2NB, 3NB y 14NB están en el tercer subgrupo del genotipo GI-1. Se acompañan con las cepas vacunales, Massachusetts y H120, lo cual resulta importante mencionar debido a que, todas las granjas muestreadas reportaron el uso de la cepa Massachussets (40 granjas) o una cepa tipo Mass (H120 en seis granjas y M41 en una granja) en sus programas vacunales (Anexo 5). En estudios realizados en Argentina, Brasil y Colombia, donde al igual que en Ecuador la cepa Massachusetts estaba autorizada para vacunación durante el período de realización de dichos trabajos, se encontraron aislamientos que están estrechamente relacionados con esta cepa y concluyeron que podrían derivar de la cepa vacunal (Alvarado y col., 2005; Felipe y col., 2010; Rimondi y col., 2009). En Estados Unidos, Callison y col., (2006) amplificando la subunidad S1, mencionan que los aislamientos con los que trabajaban estaban altamente relacionados con la cepa Massachusetts y recalcaron que había la probabilidad de detección y aislamiento de esta cepa vacunal. Consecuentemente, en el presente trabajo dado el agrupamiento filogenético de las secuencias obtenidas para cinco granjas y 15 vacunas comerciales ubicadas en el linaje GI-1, se podría inferir que el virus circulante podría tratarse de la cepa Massachussets o cepas homólogas.

Cabe señalar que, no se descarta la existencia de cepas variantes no vacunales en Tungurahua. Efectivamente, Villarreal y col., 2007 destacan que aislamientos brasileños del 2002 al 2006 se ubicaron en un grupo filogénico exclusivo, cercano a la cepa D274. Estos autores consideran que el hallazgo de un genotipo de IBV diferente al de la única cepa vacunal aprobada (cepa Massachussets) en aves ponedoras vacunadas y no vacunadas, descartaba la posibilidad de detección del virus vacunal y confirmaba la existencia de cepas variantes en el país (Villarreal y col., 2007). Además, en un análisis realizado con aislamientos obtenidos en Uruguay entre 2009 y 2012 y en Argentina entre 2009-2011 se concluyó que las cepas no agrupaban con la cepa Massachussets y se constituían en cepas variantes. Hecho que se dio bajo la misma consideración de que en Argentina y Uruguay, durante el desarrollo del trabajo, la única cepa autorizada para vacunación también era la cepa Massachussets (Marandino, 2013).

Adicionalmente, siete de las secuencias recuperadas (U5240, U5241, U5263, U5264, U5268, U5271, U5280) en la investigación desarrollada en la provincia de Tungurahua se agruparon en el clado del linaje GI-13 de las cepas tipo 793B, con un soporte de ultra-boorstrap de 100% (Imagen 7). En el árbol filogenético se aprecia que las secuencias muestrales forman dos subgrupos. Las secuencias U5240, U5241 y 5264, junto con la cepa 4/91 y la vacuna comercial 2B, forman un subgrupo soportado por un valor de ultra-bootstrap de 91.9%. Mientras que las secuencias U5263, U5268, U5271 y U5280 forman el segundo subgrupo, junto con la secuencia de la vacuna 4B con un soporte

de 95.9%. Cabe señalar que las dos vacunas según las empresas comerciales corresponden a la cepa variante 4/91.

A pesar de la formación de estos dos subgrupos, las secuencias muestrales y vacunales agrupadas en el linaje GI-13 tienen un ancestro común relacionado directamente con la cepa Moroccan-G/83 y la cepa 793 de Reino Unido (UK/7/93). Según Valastro y col. (2016) la cepa Moroccan-G/83, aislada en Marruecos en 1983, sería la cepa progenitora del linaje GI-13, aunque la primera cepa conocida fue aislada en Europa. En Reino Unido, la cepa 4/91 fue descrita por primera vez en los años noventa y desde ahí se extendió y convirtió en una de las cepas más predominantes en Europa (Cavanagh y col., 2005; Dolz y col., 2008). En España, por ejemplo, según el trabajo de epidemiología molecular realizado con aislamientos de campo tomados de 1999 a 2005 se encontró que, 4/91 era uno de los genotipos más predominantes (Dolz y col., 2008). Sin embargo, el trabajo con estos aislamientos españoles mostró que la vacunación implementada contra la cepa 4/91 si bien por un lado había logrado un control efectivo; por otro lado, podría haber permitido la generación de un entorno en el que el genotipo Italia 02 se propagase más rápido en España (Dolz y col., 2008). Actualmente, las cepas del linaje GI-13 se encuentran presentes en muchas partes del mundo y persisten gracias a su utilización como cepa vacunal (Bande y col. 2017; Cavanagh y Gelb 2008). Así por ejemplo, en Egipto se han encontrado aislamientos de campo relacionados con la cepa vacunal 4/91 usada en las estrategias de vacunación en dicho país (Selim y col., 2013). Del mismo modo,

en América del Sur, las cepas de tipo 793B fueron introducidas como vacunas con la cepa 4/91 (Eldemery y col., 2017). Particularmente, en Chile la vacuna 4/91 se introdujo en el año 2015, aun cuando hasta ese año no se había descrito su presencia en el país (Guzmán y col., 2019). Los resultados de los estudios filogenéticos, serológicos y de desafío realizados por Guzmán y col., (2019) con los aislamientos chilenos demostraron que la introducción de la vacuna 4/91 estaba involucrada en la generación de cepas de campo; debiéndose considerar estudios previos antes de la instauración de programas de vacunación con nuevas cepas variantes.

En Ecuador no se han encontrado estudios publicados que respalden la presencia de cepas variantes, pero están registradas para uso comercial cepas vacunales, como Arkansas, 4/91 y QX ([Listado cepas vacunales](#) - AGROCALIDAD, 2022). En consecuencia, las siete secuencias ubicadas en el grupo GI-13 del presente estudio podrían tener un origen vacunal, más aún cuando dos (2B y 4B) de las vacunas analizadas también se encuentran en este clado. Además, se debe hacer notar que, de las granjas consideradas dentro de este grupo, cinco (U5263, U5264, U5268, U5271, U5280) tenían otra explotación avícola localizada a menos de 1 Km de distancia (Anexo 6) y el IBV se puede propagar con ayuda del viento entre granjas ubicadas a una distancia de 1,2 Km (Cumming 1970; Mahgoub y col. 2010). Debe destacarse que todas las granjas positivas a IBV se ubicaron en el clúster de muestreo M, donde se tuvo mayor cantidad de granjas y cercanía entre ellas. Entonces, el hallazgo de secuencias tipo 793B en las granjas muestreadas podría estar

vinculado a su utilización en granjas cercanas, sumado al hecho de que las cepas emergentes del IBV son el producto de la recombinación entre cepas de campo y cepas utilizadas en la vacunación (Quinteros y col., 2016).

Finalmente, cuatro secuencias (U5247, U5256, U5262, U5270) de las granjas estudiadas se agruparon en un clado exclusivo. No obstante, se aprecia una relación filogenética con un soporte de ultra-bootstrap de 90% con cepas tanto asiáticas como latinoamericanas del tipo Q1 del linaje GI-16 (Imagen 7). Las cepas tipo Q1 habían sido aisladas inicialmente en Asia (Liu y col., 2009b; Yu y col., 2001). No obstante, luego se pudo evidenciar su presencia en América del Sur (de Wit y col., 2017; Marandino y col., 2015). Por ejemplo, en el análisis filogenético basado en la región S1 y realizado a partir de aislamientos chilenos de los años 2008 y 2009 se encontraron cepas de genotipo Q1 (de Wit y col., 2017). En consecuencia, la introducción de la cepa asiática podría haber tomado una ruta indirecta desde mercados latinoamericanos, dado que el Ecuador no tiene comercio de importación directo con Asia. Además, debe recordarse que nuevas cepas de IBV pueden surgir también como producto del proceso replicativo característico de los coronavirus (Jackwood, 2012; Sjaak de Wit y col., 2011).

Entonces, acorde al árbol filogenético realizado con las secuencias obtenidas de la provincia de Tungurahua, se tendrían dos cepas de tipo vacunal (Massachussets y 4/91) o sus homólogas y una cepa de tipo Q1 cuyo origen de introducción se desconoce. En este punto, es pertinente destacar que mientras que algunas cepas de IBV surgen y se propagan rápidamente a

otras áreas geográficas, otras permanecen restringidas a la región de origen (Dolz y col., 2008). Para el caso de las cepas que se infiere se encuentra circulando en la provincia de Tungurahua, las tres han sido reportadas en diferentes zonas geográficas (Alvarado y col., 2005; Dolz y col., 2008; Felipe y col., 2010; Guzmán y col., 2019; Rimondi y col., 2009; Villarreal y col., 2007). Sin embargo, las cepas Massachussets y 4/91 se aislan particularmente en los estudios filogenéticos realizados en países donde se las utilizan para los procesos de inmunización (Guzmán y col., 2019; Selim y col., 2013).

#### **3.4.3.3. Análisis de similitud nucleotídica de las secuencias parciales de S1.**

El análisis de similitud nucleotídica intra-linajes no fue posible de estimar en ciertos linajes donde sólo se tenía una secuencia (Tabla 9). De los linajes donde se agruparon las cepas muestrales y vacunales del estudio (GI-1, GI-13 y G16), el GI-1 fue el que presentó mayor homología entre sus secuencias, 97,71% (Tabla 9). Se consideró que al estar incluidas en este análisis de similitud nucleotídica cepas tipo Massachussets, como Mass, MA5, H120 y España/00/339, el porcentaje de similitud reforzaba la afirmación de que cinco secuencias muestrales (U5250, U5261, U5272, U5281 y U5284) ubicadas en el linaje GI-1 eran homólogas a las cepas vacunales tipo Massachussets. Resulta pertinente señalar que, aunque se utilicen vacunas con cepas tipo Massachussets en los programas de inmunización contra IBV, los aislamientos pueden o no estar relacionados con esta cepa.

En el estudio realizado en Siria entre 2018 y 2019, se encontró una identidad promedio de nucleótidos del 81,5% entre los aislamientos de campo y la cepa vacunal Mass (Al-Jallad y col., 2020). Con lo cual los autores consideran que la baja correlación con la cepa vacunal tipo Mass, podría explicar el fracaso de los programas de vacunación para controlar el IBV (Al-Jallad y col., 2020). Por su parte, el porcentaje de similitud nucleotídica encontrado por Marandino (2013) con aislamientos de Argentina y Uruguay fue de 78,6 a 80,3%; con estos porcentajes concluyó que había una baja similitud entre la cepa vacunal Massachusetts y los genotipos analizados y que no estaban relacionados entre sí. Villarreal y col., (2007) reportaron un promedio de identidad de aminoácidos de 68,93% entre las cepas aisladas por ellos en Brasil y la cepa Massachussets; estimando que todos los aislamientos eran distintos a la cepa vacunal Massachussets. En contraparte, en Colombia aislamientos del 2003 estaban estrechamente relacionados a nivel de aminoácidos (93,9% a 94%,) con la cepa vacunal Massachusetts 41 (Alvarado y col., 2005). Felipe y col., (2010) mencionan que la mayoría de aislamientos brasileños encontrados entre 2003 a 2009 tenían como posible origen la cepa vacunal Massachussets aún con similitud intra-linaje de 69% a 77,3%.

Dentro del linaje GI-13, siete secuencias muestrales (U5240, U5241, U5263, U5264, U5268, U5271, U5280) presentaron una similitud nucleotídica de 94,91% con relación a las cepas 4/91, UK/7/93 y Moroccan-G/83. Con lo que se podría considerar que efectivamente estas siete secuencias están relacionadas con cepas tipo 793B. En el trabajo realizado por Selim y col.,

(2013) se reportaron aislamientos que tenían una estrecha relación con la cepa 4/91 al presentarse una identidad del 96%.

**Tabla 9.**

Similitud nucleotídica de S1 a nivel intra-linajes.

Linajes	Similitud nucleotídica (%)
GI-1 <sup>1</sup>	97,71
GI-2 a GI-12	n/c
GI-13 <sup>1</sup>	94,91
GI-14 y GI-15	n/c
GI-16 <sup>1</sup>	88,15
GI-17 y GI-18	n/c
GI-19	94,82
GI-20	87,25
GI-21	97,74
GI-22 a GI-27	n/c
GII-1	n/c
GIII-1	n/c
GVI-1	n/c
GV-1	n/c
GVI-1	n/c

n/c Casos en los que no fue posible estimar porcentaje de similitud

<sup>1</sup> Linajes donde se agruparon cepas muestrales y vacunales del estudio

El menor porcentaje de similitud (88,15%), para los linajes donde se agruparon las secuencias estudiadas, se observó en el linaje GI-16 donde se ubican las cepas tipo Q1 (Tabla 9). En el trabajo realizado por de Witt y col., (2017) se menciona que los aislamientos chilenos de su estudio tenían alrededor del 97,6-98,8% de similitud de nucleótidos con la cepa Q1 china y con ello consideraron que estaban genéticamente relacionadas. En el presente

estudio con un porcentaje menor de similitud, se infirió que las cuatro secuencias (U5247, U5256, U5262, U5270) estaban relacionadas con la secuencia de Q1 porque en la clasificación de Valastro y col., (2016) los linajes diferentes exhiben distancias por pares para secuencias de nucleótidos de hasta 13%.

Cabe señalar que, en el trabajo realizado en la provincia de Tungurahua los tres grupos a los cuales se asignó las secuencias estudiadas presentaron valores para *p-distance* inferiores a 13%. Consecuentemente, se estimó que todas las secuencias muestrales y vacunales podrían pertenecer a los linajes mencionados. A pesar de ello debe recordarse que, la distancia por pares sólo es un dato más de soporte para la clasificación, debido a que la evolución de los virus normalmente no se produce dentro de límites discretos (Valastro y col., 2016).

Por otro lado, dentro del linaje GI-1 se encontró una homología de 97,75% entre las secuencias muestrales del estudio y las vacunas comerciales tipo Massachussets. Igualmente, dentro del grupo G1-13 o tipo 793B, se determinó un porcentaje de similitud nucleotídica de 95,2% entre las secuencias muestrales y vacunales analizadas en el estudio. Los valores se estimaron a partir de los resultados obtenidos con el cálculo de *p-distance* (Tabla 10) y soportan el supuesto de que el 75% (#12) de las secuencias encontradas en la provincia de Tungurahua correspondían a cepas vacunales o sus homólogas. Situación que resultaría lógica, pues se ha demostrado que las cepas vacunales tienen un papel importante en la aparición de nuevas

cepas de IBV e inclusive la vacunación es la responsable de la propagación del virus hacia zonas libres de BIA (Farsang y col., 2002; Mo y col., 2013).

**Tabla 10.**

Resultados del cálculo *p-distance* entre cepas muestrales y vacunas utilizadas en la zona de estudio.

Cepas muestrales Vacunales	GI-1	GI-13
GI-1	0,0205	0,2447
GI-13	0,2443	0,048

#### **3.4.3.4. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de S1 y sitios de glicosilación**

Se puede apreciar en el alineamiento entre la cepa Mass y las secuencias agrupadas en el grupo GI-1 que hay pocos cambios a nivel de aminoácidos (Imagen 8). Además, los sitios potenciales de glicosilación encontrados en las posiciones 51 y 144 son los mismos en todas las secuencias (Tabla 11).

**Tabla 11.**

Sitios de glicosilación potenciales para la cepa Mass y las secuencias muestrales ubicadas en el linaje GI-1.

Posición	Secuencias					
	Mass	U5250	U5261	U5272	U5281	U5284
51 NISS	SI	SI	SI	SI	SI	SI
144 NLTV	SI	SI	SI	SI	SI	SI

Resultados obtenidos en el NetNGlyc - 1.0

**Imagen 8.**

Alineamiento entre cepa Mass y cepas muestrales del grupo GI-1

```

5261 MLVTPLLLVTLLCALCSAALYDSSSYVYYYHSAFRPPDGWHLHGGAYAVV[REDACTED]ISSESNNAG 60
Mass MLVTPLLLVTLLCALCSAVLYDSSSYVYYYQSAFRPPNGWHLHGGAYAVV[REDACTED]ISSESNNAG 60
5250 MLVTPLLLVTLLCALCSAALYDSSSYVYYYQSAFRPPDGWHLHGGAYAVV[REDACTED]ISSESNNAG 60
5281 MLVTPLLLVTLLCALCSAALYDSSSYVYYYQSAFRPPDGWHLHGGAYAVV[REDACTED]ISSESNNAG 60
5284 MLVTPLLLVTLLCALCSAALYDSSSYVYYYQSAFRPPDGWHLHGGAYAVV[REDACTED]ISSESNNAG 60
5272 MLVTPLLLVTLLCALCSAALYDSSSYVYYYQSAFRPPDGWHLHGGAYAVV[REDACTED]ISSESNNAG 60
***** .*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

5261 SSPVCTVGI IHGGHKFNASSIAMTAPSSGMAWSSRQFCTAHCNFSDTTFVTHCYKSDGC 120
Mass SSSGCTVGTI HGDRVFNASSIAMTAPSSGMAWSSSQFCTAHCNFPDITTFVTHCYKHGGC 120
5250 SSSGCTVGI IHGGRVFNASSIAMTAPSSGMAWSSSQFCTAYCNFSDTTFVTHCYKHVGC 120
5281 SSSGCTVGI IHGGRVFNASSIAMTAPSSGMAWSSSQFCTAYCNFSDTTFVTHCYKHVGC 120
5284 SSSGCTVGI IHGGRVFNASSIAMTAPSSGMAWSSSQFCTAYCNFSDTTFVTHCYKHVGC 120
5272 SSSGCTVGI IHGGRVFNASSIAMTAPSSGMAWSSRQFCTAYCNFSDTTFVTHCYKHGGC 120
** **** *. : .***** *****. *****:*** ***** **

5261 PITGMIQQNSIRVSAMKDGQLFY[REDACTED]LTVSVDNYPTFKSFQCVNNLTSVYLNGLVYTSNET 180
Mass PITGMLQQHFIRVSAMKNGQLFY[REDACTED]LTVSVAKYPTFKSFQCVNNLTSVYLNGLVYTSNET 180
5250 PITGMLQQHSIRVSAMKNGQLFY[REDACTED]LTVSVAKYPTFKSFQCVNNLTSVYLNGLVYTSNET 180
5281 PITGMLQQHSIRVSAMKNGQLFY[REDACTED]LTVSVAKYPTFKSFQCVNNLTSVYLNGLVYTSNET 180
5284 PITGMLQQHSIRVSAMKNGQLFY[REDACTED]LTVSVAKYPTFKSFQCVNNLTSVYLNGLVYTSNET 180
5272 PITGMLQQHSIRVSAMKNGQLFY[REDACTED]LTVSVAKYPTFKSFQCVNNLTSVYLNGLVYTSNET 180
*****:***: *****:***.***** :*****.*****.*****:***** *

5261 TDVTAAGVYFKSGGPITYKVMRE 203
Mass TDVTSAGVYFKAGGPITYKVMRE 203
5250 TDVTSAGVYFKAGGPITYKVMRE 203
5281 TDVTSAGVYFKAGGPITYKVMRE 203
5284 TDVTSAGVYFKAGGPITYKVMRE 203
5272 TDVTSAGVYFKAGGPITYKVMRE 203
*****:*****:*****

```

Con color rojo se resalta la ubicación de los potenciales sitios de glicosilación.

Según Zheng y col., (2018), la proteína S del IBV contiene 29 sitios de glicosilación supuestamente ligados a la asparagina (N); entre estos sitios están los encontrados en el presente estudio. Marandino (2013) encontró que los aislamientos de Argentina y Uruguay diferían en 3 y 4 sitios potenciales de glicosilación comparadas con la cepa vacunal Massachussets. Dentro de los sitios comunes entre los aislamientos y la vacuna se encontraba el ubicado en la posición 51 (Marandino, 2013).

Las mutaciones introducidas en el sitio ubicado en la posición 51 parecen no tener impacto significativo en el proceso de fusión célula-célula mediada por la proteína S, pero una reducción significativa se produce cuando existen mutaciones en el sitio 144 (Zheng y col., 2018). En consecuencia, dado que los sitios de glicosilación en la proteína S están altamente conservados dentro de cada genotipo viral, se pudo inferir que las secuencias muestrales U5250, U5261, U5272, U5281 y U5284 son del mismo genotipo al que pertenece la cepa Massachussets (Parsons y col., 2019).

Con relación a las secuencias agrupadas en el linaje GI-13 se encontró que U5240 y U5241 presentaban los mismos sitios potenciales de glicosilación que la cepa 4/91 en las posiciones 54, 75 y 146 (Imagen 9). Mientras que U5263, U5268, U5271 no cuentan con el sitio en la posición 54. Por su parte, las secuencias U5264, U5268 y U5280 presentan un sitio adicional de posible glicosilación en la posición 23 (Imagen 9) (Tabla 12). No obstante, todas las secuencias estudiadas y la cepa 4/91 tenían los mismos potenciales sitios de glicosilación en las posiciones 75 y 146. Por ello, se infirió que las secuencias

estudiadas son homólogas a la cepa vacunal 4/91, al encontrarse que tenían los mismos potenciales sitios de glicosilación en las posiciones donde las mutaciones tienen un mayor impacto para cambiar el proceso de fusión célula-célula mediada por la proteína S (Zheng y col., 2018). Este análisis se hace considerando los potenciales sitios de glicosilación en la cepa M41, al no haberse encontrado hasta la fecha estudios en otras cepas.

**Tabla 12.**

Sitios de glicosilación potenciales para la cepa 4/91 y las cepas muestrales ubicadas en el grupo GI-13.

Posición	CEPAS							
	4/91	U5240	U5241	U5263	U5264	U5268	U5271	U5280
23 NNTY	NO	NO	NO	NO	SI	SI	NO	SI
54 NK(G)TN	SI	SI	SI	NO	SI	NO	NO	SI
75 NI(F)SA	SI							
146 NLTV	SI							

Resultados obtenidos en el NetNGlyc - 1.0

## Imagen 9.

Alineamiento entre cepa 4/91 y cepas muestrales del grupo GI-13.

```

U5280  MLGRPLLLVTLWYALCSALLYDNTYVYYYQSAFRPGSGWHLHGGAYAVDKVFNLTNNAG 60
U5264  MLGKPLLLVTLWYALCSALLYDNTYVYYYQSAFRPGQGWHLHGGAYAVDKVFNKTNNAG 60
4/91   MLGKPLLLVTLWYALCSALLYDKNTYVYYYQSAFRPGQGWHLHGGAYAVDKVFNGTNNAV 60
U5240  MLGKPLLLVTLWYALCSALLYDKNTYVYYYQSAFRPGQGWHLHGGAYAVDKVFNGTNNAV 60
U5241  MLGKPLLLVTLWYALCSALLYDKNTYVYYYQSAFRPGQGWHLHGGAYAVDKVFNGTNNAV 60
U5271  MLGKPLLLVTLWYALCSALLYDENTYVYYYQSAFRPSSGWHLHGGAYAVDKFFKVTNNAG 60
U5263  MLGKPLLLVTLWYALCSALLYDKNTYVYYYQSAFRPSSGWHLHGGAYAVDKVFNETNNAG 60
U5268  MLGKPLLLVTLWYALCSALLYDNTYVYYYQSAFRPGSGWHLHGGAYAVDRVFRTRNNAG 60
      ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

U5280  SVSACTAGTFYESYNFSAASVAMTAPPVGMSSVLAQFCTAHCNFSDFTVFVTHCFKSQQG 120
U5264  SASACTAGTFYESYNISAASVAMTAPPVGMSSVLAQFCTAHCNFSDFTVFVTHCFKNQEG 120
4/91   SVSDCTAGTFYESYNISAASVAMTAPPVGMSSVLAQFCTAHCNFSDFTVFVTHCFKSQQG 120
U5240  SVSDCTAGTFYESYNISAASVAMTAPPVGMSSVLAQFCTAHCNFSDFTVFVTHCFKSQQG 120
U5241  SVSDCTAGTFYESYNISAASVAMTAPPVGMSSVLAQFCTAHCNFSDFTVFVTHCFKSQQG 120
U5271  NAPNCTAGTFYESYNFSAASVAMTAPPVGMSSVLAQFCTAHCNFSDFTVFVTHCFNQVG 120
U5263  NVPDCTAGTFYESYNISAASVAMTAPPVGMSSVLAQFCTAHCNFSDFTVFVTHCFKNQAG 120
U5268  NAHDCTAGTFYESYNISAASVAMTAPPVGMSSVLAQFCTAHCNFSDFTVFVTHCFKSQAG 120
      .. *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

U5280  SCPLTGMIPQNYIRISAMRSGFLFYNTVSVSKYKFKSLQCVGNSTSVYLNGLDLVFTSN 180
U5264  SCPLTGMIPQNHIRISAMRSGLLFHNLTVSVSKYKFKSLQCVGNFTSVYLNGLDLVFTSN 180
4/91   SCPLTGMIPQNHIRISAMRSGFLFYNTVSVSKYKFKSLQCVGNSTSVYLNGLDLVFTSN 180
U5240  SCPLTGMIPQNHIRISAMRSGFLFYNTVSVSKYKFKSLQCVGNSTSVYLNGLDLVFTSN 180
U5241  SCPLTGMIPQNHIRISAMRSGFLFYNTVSVSKYKFKSLQCVGNSTSVYLNGLDLVFTSN 180
U5271  SCPLTGMIPQNHIRISAMRSGLLFYNTVSVSKYKFKSLQCVGNSTSVYLNGLDLVFTSN 180
U5263  SCPLTGMIPQNHIRISAMRSGFLFYNTVSVSKYKFKSLQCVGNSTSVYLNGLDLVFTSN 180
U5268  SCPLTGMIPQNYIRISAMRSGFLFYNTVSVSKYKFKSLQCVGNSTSVYLNGLDLVFTSN 180
      *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

U5280  ETTHTGAGVYFKSGGPVYKVMKE 205
U5264  ETTHTGAGVYFKSGGPVYKVMKE 205
4/91   ETTHTGAGVYFKSGGPVYKVMKE 205
U5240  ETTHTGAGVYFKSGGPVYKVMKE 205
U5241  ETTHTGAGVYFKSGGPVYKVMKE 205
U5271  KTTHTGAGVYFKSGGPVYKVMKE 205
U5263  ETTHTGAGVYFKSGGPVYKVMKE 205
U5268  ETTHTGAGVYFKSGGPVYKVMKE 205
      :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

Con color rojo se resalta la ubicación de los potenciales sitios de glicosilación.

Para las secuencias agrupadas con las cepas tipo Q1, se encontró sólo un sitio de glicosilación común en la posición 51 (Imagen 10). Este sitio de glicosilación también estuvo presente en todas las cepas estudiadas por Marandino (2013). Sin embargo, se presentaron variaciones en la ubicación del último sitio potencial de glicosilación (desde 146 a 151) (Tabla 13) (Imagen



**Tabla 13.**

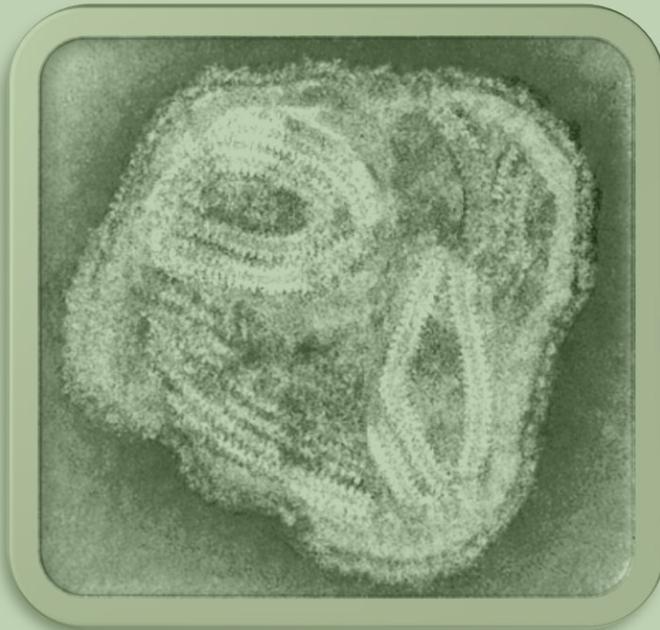
Sitios de glicosilación potenciales para cepas Q1 y las cepas muestrales ubicadas en este grupo.

Posición	CEPAS					
	Q1 China	Q1 Chile	U5247	U5256	U5262	U5270
23 NNTY	NO	NO	NO	NO	SI	NO
51 NVSL	SI	SI	SI	SI	SI	SI
146 NLTV	NO	NO	NO	SI	NO	NO
147 NLTL	NO	NO	NO	NO	SI	NO
148 NLTV	SI	SI	NO	NO	NO	NO
149 NLTV	NO	NO	SI	NO	NO	NO
151 NLTV	NO	NO	NO	NO	NO	SI

Resultados obtenidos en el NetNGlyc - 1.0

## CAPÍTULO 4

### 4. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE



Partícula de paramixovirus (Stannard, 1995)

## 4.1. Revisión de Literatura



### 4.1.1. Etiología

El virus causante de la EN es el *Avian orthoavulavirus aviar 1*, que pertenece al orden *Mononegavirales*, la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Avulavirinae* y al género *Orthoavulavirus* (ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses, 2021).

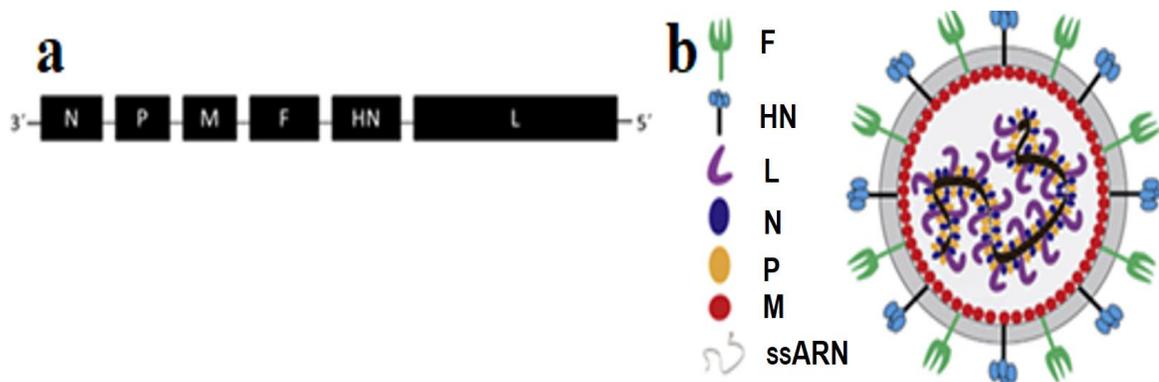
El *Avian orthoavulavirus 1* es un virus pleomórfico envuelto por una bicapa lipídica, con un diámetro de 200 a 300nm (Ganar y col., 2014). El virus posee una nucleocápside helicoidal que envuelve ARN monocatenario, no segmentado, de sentido negativo (Alexander y Senne, 2008; Ganar y col., 2014). El genoma del NDV está integrado por 15.186 a 15.198 nucleótidos que codifican para seis proteínas estructurales: proteína de nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), proteína de fusión (F), proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y ARN polimerasa (L) dependiente de ARN (Figura 5) (Choi, 2017; S. H. Kim y Samal, 2016).

El ARN genómico en asociación con las proteínas N, P y L forma el complejo ribonucleoproteico (RNP), que resulta esencial para la replicación y transcripción del virus (Choi, 2017; Ganar y col., 2014). La proteína M está involucrada con el control de la síntesis de ARN viral y con el ensamblaje del virión con la membrana celular durante la brotación del virus (Choi, 2017;

Ganar y col., 2014). Las proteínas F y HN son proteínas que integran la membrana del virus (Choi, 2017; Kim y Samal, 2016).

#### Figura 4.

*Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV).*



a. Organización del genoma del NDV del extremo 3' a 5': proteína de nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), proteína de fusión (F), proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y ARN polimerasa dependiente de ARN (L) (Kim y Samal 2016).

b. Diagrama esquemático de la estructura del NDV (Ganar y col., 2014).

La HN tiene dos regiones, la sección de hemaglutinina es responsable de la unión del virión con los receptores de la célula huésped, y la sección de la neuraminidasa ayuda en la liberación del virus (Ganar y col., 2014; Grimes, 2002; Kim y Samal, 2016). Por su parte, la proteína F media la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula huésped (Ganar y col., 2014). La proteína F se sintetiza como un precursor (F<sub>0</sub>) que es escindido por proteasas de la célula huésped en dos subunidades F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> (Kim y Samal, 2016). La secuencia de los aminoácidos en el sitio de escisión determina el

rango de proteasas que pueden actuar y por lo tanto, esta secuencia determina la virulencia (Ganar y col. 2014; Grimes, 2002; Kim y Samal 2016).

#### **4.1.2. Clasificación del NDV**

Las cepas del NDV se agrupan en cinco patotipos: cepas altamente virulentas o velogénicas viscerotrópicas, cepas velogénicas neurotrópicas, cepas mesogénicas o moderadamente virulentas, cepas lentogénicas o avirulentas y cepas subclínicas (Alexander y Senne, 2008; OIE, 2021b; Seal y col., 1995). El establecimiento del patotipo del NDV se realizaba mediante la inoculación en huevos embrionados a fin de determinar el índice de patogenicidad intracerebral (ICPI) (Kang y col., 2016; Seal y col., 1995). La OIE clasifica como cepas virulentas de NDV aquellas que tienen un ICPI de 0,7 y un sitio de escisión en la proteína F con múltiples aminoácidos básicos (OIE, 2021c). El ICPI se utiliza solo cuando otros métodos, como la secuenciación génica y los datos clínicos, aportan resultados anómalos; de allí la importancia de la clasificación genética (OIE, 2021c).

Las cepas del NDV se dividen en dos grupos genéticos, clase I y clase II (Diel y col., 2012; Dimitrov y col., 2019). La clase I incluye un solo genotipo con cepas de baja virulencia distribuidas en todo el mundo que fueron aisladas principalmente de aves acuáticas (Diel y col., 2012; Kang y col., 2016). La clase II comprende cepas virulentas y no virulentas aisladas de aves de corral y aves silvestres que se subdividen en 20 genotipos (Dimitrov y col., 2019; OIE, 2021a; OIE, 2021b).

#### **4.1.3. Distribución geográfica de la EN**

La EN se considera endémica o que causa eventos epizooticos en todo el mundo (Miller y col., 2010). Las cepas velogénicas son endémicas en Asia, Medio Oriente, África y América Central (OIE, 2022; The Center for Food Security and Public Health, 2010). En particular en países de Sudamérica puede ser endémica o de presentación ocasional (Diel y col., 2012).

Las cepas lentogénicas se encuentran en aves de corral a nivel mundial; mientras que, las cepas mesogénicas también pueden encontrarse en las explotaciones comerciales, pero se encuentran más frecuentemente en las palomas (OIE, 2022; The Center for Food Security and Public Health, 2010).

#### **4.1.4. Hospedadores y transmisión del NDV**

El NDV puede infectar a los seres humanos, siendo las aves el hospedador natural del NDV. Se han reportado infecciones naturales y experimentales en más de 241 especies de aves (MacLachlan y Dubovi, 2017; OIE, 2021b). Destacan como especies afectadas por la EN, las gallináceas, las palomas y los patos (Brown y Bevins 2017; MacLachlan y Dubovi, 2017). Aunque las aves acuáticas migratorias actúan como reservorios, la introducción del NDV en un país suele ser el resultado del contrabando de aves exóticas o de aves de corral (MacLachlan y Dubovi, 2017).

La mayor propagación del NDV se realiza mediante la transferencia mecánica de material infeccioso en fómites (Brown y Bevins 2017; MacLachlan y Dubovi, 2017). La transmisión vertical se ha reportado, pero se considera

que su ocurrencia es mínima (MacLachlan y Dubovi, 2017; Roy y Venugopalan, 2005).

#### **4.1.5. Patogenia, signos y lesiones anatomo-patológicas de la EN**

El período de incubación de la EN es de 2 a 15 días, pero las cepas velogénicas pueden alcanzar un período de incubación de 25 días (Brown y Bevins, 2017; The Center for Food Security and Public Health, 2010). El NDV se replica inicialmente en el epitelio de la mucosa de las vías respiratorias superiores (MacLachlan y Dubovi, 2017; Moreno, 1994). Luego el virus se propaga por la sangre hasta el bazo y la médula ósea; produciéndose una viremia y un segundo ciclo de replicación en otros órganos (Brown y Bevins, 2017; Moreno, 1994; The Center for Food Security and Public Health, 2010).

En cuanto a las lesiones se debe señalar que, las aves infectadas con cepas velogénicas presentan lesiones significativas, aunque estas lesiones pueden estar ausentes si las aves sufrieron de muerte súbita (OIE, 2022; The Center for Food Security and Public Health 2010). Por su parte, las cepas velogénicas viscerotrópicas desarrollan hinchazón en la región periorbital, congestión o hemorragias en la parte caudal de la faringe y tráquea (The Center for Food Security and Public Health 2010). Además, estas cepas producen hemorragias, úlceras y edema en el proventrículo, el intestino y las tonsilas cecales (Brown and Bevins 2017; Moreno 1994; The Center for Food Security and Public Health 2010). Las cepas mesogénicas causan traqueítis catarral aguda asociada a signos respiratorios y neurológicos con mortalidades

bajas (Brown and Bevins 2017; Moreno 1994; OIE, 2022). Finalmente, las cepas lentogénicas producen una débil inflamación catarral de la mucosa traqueal (MacLachlan and Dubovi 2017; OIE, 2022; The Center for Food Security and Public Health, 2010). Por otro lado, los signos clínicos varían ampliamente y dependen mayormente de la cepa viral implicada en la infección (Tabla 14) (Moreno, 1994).

**Tabla 14.**

Resumen de signos clínicos de acuerdo con el patotipo de la EN.

SIGNOS	PATOTIPO			
	Velogénico viscerotrópico	Velogénico neurotrópico	Mesogénico	Lentogénico
Tos, estornudo, secreción nasal, estertores traqueales	SI	SI	SI	SI
Disminución de producción de huevos	SI	SI	SI	NO
Alteraciones en calidad de cáscara de huevo <sup>1</sup>	SI	SI	NO	NO
Huevos con albúmina acuosa <sup>1</sup>	SI	SI	NO	NO
Letargia	SI	SI	NO	NO
Inapetencia	SI	SI	NO	NO
Plumaje erizado	SI	SI	NO	NO
Diarrea acuosa verde o blanca	SI	NO	NO	NO
Temblores	NO	SI	NO	NO
Espasmos clónicos	NO	SI	NO	NO
Ataxia	NO	SI	NO	NO
Tortícolis	NO	SI	NO	NO
Paresia de las alas o las piernas	NO	SI	NO	NO
Marcha en círculos	NO	SI	NO	NO
Muerte súbita	SI	SI	NO	NO

<sup>1</sup> Sólo en aves reproductoras y ponedoras

(Brown and Bevins 2017; Moreno 1994; The Center for Food Security and Public Health 2010).

#### **4.1.6. Prevención y Control de la EN**

Al ser la EN una enfermedad de declaración obligatoria, las medidas legislativas constituyen la base para su control (MacLachlan y Dubovi, 2017). El sacrificio de aves infectadas combinado con protocolos de vacunación agresivos son las medidas más adecuadas para controlar los brotes de la EN (Absalón y col., 2019). Luego de la despoblación se debe realizar una limpieza y desinfección con clorhexidina, hipoclorito de sodio (6%), fenólicos o agentes oxidantes (The Center for Food Security and Public Health, 2010). Sin embargo, el problema para el control de la enfermedad está ligado a la existencia de reservorios del virus (Absalón y col., 2019). Consecuentemente, las medidas de bioseguridad deben contemplar la protección de los galpones contra aves diferentes a las de la explotación (The Center for Food Security and Public Health, 2010).

Las medidas de bioseguridad que ayudan en el control y prevención de la EN también incluyen: cría todo adentro/todo afuera, desinfección de vehículos y equipos, control de insectos y ratones, ropa exclusiva para el personal y períodos de vacío sanitario superiores a 21 días (Absalón y col., 2019; AGROCALIDAD, 2013; The Center for Food Security and Public Health, 2010). Los programas de bioseguridad también deben evitar que las aves se expongan a agentes inmunosupresores y situaciones estresantes de crianza (Absalón y col., 2019; The Center for Food Security and Public Health, 2010).

#### **4.1.6.1. Vacunación contra el NDV**

Las vacunas vivas atenuadas, las vacunas inactivas y las de tipo recombinante se emplean en la prevención de la EN (Bello y col., 2018; MacLachlan y Dubovi 2017; OIE, 2021c). Las vacunas vivas atenuadas tienen las ventajas de que se aplican de forma masiva a través del agua de bebida o por aspersión y estimulan una respuesta inmune que protege contra la enfermedad clínica (Bello y col., 2018; MacLachlan y Dubovi 2017). No obstante, este tipo de vacunas tiene como desventajas que, tienen el potencial de volverse virulentas y ciertas cepas como, La Sota, ocasionan reacciones respiratorias posteriores a la vacunación (Bello y col., 2018; Brown y Bevins 2017; Roy, 2012). Además de La Sota, las cepas lentogénicas B1, VG/GA, Ulster y Clone 30 se emplean en los calendarios de vacunación contra NDV (Absalón y col., 2019; Bello y col., 2018).

Las vacunas inactivas se administran individualmente por vía intramuscular o por vía subcutánea (Bello y col., 2018; Brown y Bevins 2017). Aunque las vacunas inactivas no presentan riesgo de reversión a la virulencia, tienen menos capacidad para inducir respuesta inmune celular (Bello y col., 2018).

Los pollos de engorde se vacunan al menos dos veces y dependiendo de la incidencia del virus, se pueden utilizar hasta cinco vacunas durante su vida productiva (Absalón y col., 2019; MacLachlan y Dubovi, 2017). En las aves de postura se aplica la primera vacuna contra NDV a los 5-7 días de edad, seguida de revacunaciones al agua de bebida (Roy, 2012). Luego se

aplica una vacuna inactiva antes del inicio de postura y durante la postura se administran vacunas vivas cada 4, 6, 10 o 12 semanas, dependiendo del desafío de la zona (Absalón y col., 2019; Roy, 2012). Estos programas de vacunación múltiples son eficaces, pero no impiden la excreción de partículas virales, contaminando el medio de manera continua (Bello y col., 2018; Brown y Bevins 2017).

Por lo expresado, se desarrollaron las vacunas recombinantes que no se excretan, ni generan reacciones post-vacunales (Bello y col., 2018; Brown y Bevins 2017; The Center for Food Security and Public Health 2010). En avicultura, se emplean a los virus de viruela aviar y herpes de los pavos (HVT) como vectores (Bello y col., 2018). Este tipo de vacunas son altamente inmunogénicas y se administran vía parenteral (MacLachlan y Dubovi, 2017). No obstante, el éxito de la vacunación contra NDV depende de varios factores como, la dosis, la vía de administración, la edad de las aves, los intervalos entre vacunaciones y la presencia de agentes inmunosupresores (Absalón y col., 2019; Roy, 2012).

#### **4.1.7. Diagnóstico de la EN**

En la actualidad el diagnóstico definitivo de la EN se realiza mediante el aislamiento del virus, detección de virus mediante técnicas moleculares o serológicas (MacLachlan y Dubovi, 2017).

#### **4.1.7.1. Aislamiento viral**

El aislamiento del NDV puede realizarse en huevos embrionados SPF o en cultivos celulares (OIE, 2021b). Las muestras requeridas a partir de aves vivas incluyen hisopos cloacales y orofaríngeos (Bello y col., 2018; MacLachlan y Dubovi 2017). Cuando se tienen aves muertas, las muestras pueden ser pulmones, riñones, hígado, intestino, bazo, cerebro y/o tonsilas cecales (Bello y col., 2018). La inoculación se realiza en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de 9 a 11 días de edad (Bello y col., 2018; OIE, 2021c). La prueba de hemaglutinación se utiliza para detectar la presencia del NDV en el líquido alantoideo obtenido desde los huevos inoculados; sin embargo, es necesario realizar otras pruebas como HI o RT-PCR (Bello y col., 2018; OIE, 2021c).

En el caso de cultivos celulares el aislamiento de NDV se realiza en cultivos primarios con fibroblastos de embrión de pollo, células de riñón de embrión de pollo, células hígado de embrión de pollo o mieloblastos aviares. Los cultivos infectados presentan células redondeadas, formación de sincitios y muerte celular (Bello y col., 2018).

#### **4.1.7.2. Pruebas moleculares**

La prueba de RT-PCR, qRT-PCR, la secuenciación de genes, RLFP y otras técnicas moleculares se emplean para el diagnóstico, caracterización genética y determinación del patotipo viral (Cattoli y col., 2011; Liu y col., 2016; The Center for Food Security and Public Health 2010). En particular, la técnica

qRT-PCR dirigida al gen M se utiliza como prueba de screening diagnóstico y ha sido validada para los virus de NDV clase II (Liu y col., 2016; Kim y col., 2007; OIE, 2004; Wise y col., 2004). Para la identificación de los virus de clase I se desarrolló una RT-PCR para el gen L (Kim y col., 2008).

Por otro lado, para determinar el patotipo del NDV se emplean ensayos qRT-PCR dirigidos al gen F seguidos del análisis de la composición de aminoácidos en el sitio de escisión (Bello y col., 2018; Liu y col., 2016). No obstante, la amplia diversidad genética del NDV hace que aislamientos con mutaciones en los sitios de unión de la sonda escapen a la detección utilizando ciertos ensayos de qRT-PCR (Bello y col., 2018). Por esta razón, los cebadores y sondas empleadas en las qRT-PCR deben actualizarse (Kim y col., 2006).

#### **4.1.7.3. Serología**

Las pruebas serológicas más comúnmente utilizadas para la EN son HI y ELISA (Bello y col., 2018; OIE, 2021b). La prueba de HI es ampliamente empleada por ser la más simple, rápida y económica para detectar anticuerpos contra la enfermedad (Bello y col., 2018; MacLachlan y Dubovi, 2017). Sin embargo, sólo resulta diagnóstica para lotes de aves no vacunadas (MacLachlan y Dubovi 2017).

La prueba de ELISA se usa generalmente para evaluar los niveles de anticuerpos después de la vacunación (Bello y col., 2018; OIE, 2021c). Para la correcta interpretación de los resultados de ELISA en lotes vacunados se

requiere conocer el historial (MacLachlan y Dubovi, 2017; OIE, 2021b). Actualmente, se cuenta con kits de ELISA comerciales diseñados con la totalidad o parte del NDV (Bello y col., 2018). En términos generales las pruebas de ELISA han demostrado ser reproducibles, tener alta sensibilidad y especificidad (MacLachlan y Dubovi, 2017; OIE, 2021b).

La prueba de VN es una prueba serológica útil en la medición de anticuerpos específicos contra NDV (Bello y col., 2018). La prueba se realiza infectando cultivos de la línea celular DF1 (fibroblastos de pollo) con una mezcla de un suero diluido en serie más una cantidad estándar del NDV (Bello y col., 2018). El título de anticuerpos corresponderá a la dilución más alta de suero donde se tuvo un efecto citopático (Bello y col., 2018).

## **4.2. Antecedentes del estudio de la Enfermedad de Newcastle en Ecuador**

La mayoría de las investigaciones relacionadas con EN se han orientado a las aves de riña y aves de traspatio. En el estudio efectuado con aves de pelea de la ciudad de Riobamba, Chimborazo, se encontró que todas las aves muestreadas presentaron anticuerpos contra NDV (Guevara y Salazar, 2013). En referencia a las aves de traspatio, en un trabajo realizado en 2006 en el noroeste de Ecuador, se obtuvo una seroprevalencia del 97% para el NDV (Hernandez y col., 2006). En contraposición, luego del análisis molecular de hisopados laringo-traqueales y cloacales se estableció la

ausencia del NDV en aves de traspatio de la parroquia de Puéllaro, Pichincha (Manzano, 2017).

Adicionalmente, en el trabajo realizado por Villacís y colaboradores (2014) con aves centinelas repartidas en explotaciones de comunidades rurales del cantón Zapotillo, Loja, se logró aislar NDV en huevos SPF. Finalmente, en un estudio llevado a cabo a partir de las cepas aisladas por Villacís y col., (2014) se encontró mediante el análisis filogenético de la región parcial del gen F que las cepas estaban relacionadas con vacunas lentogénicas ubicadas en el genotipo II de la clase II (Muñoz-Chamba y Villacís, 2018).

### 4.3. Materiales y Métodos para la caracterización molecular del NDV



#### 4.3.1. Determinación de la presencia del NDV en muestras de gallinas ponedoras mediante PCR para el gen M

Se realizó una PCR punto final utilizando los cebadores M+4100 (5'-AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3') y M-4220 (5'-CCTGAGGAGAGGCATTTGCTA-3'), que fueron diseñados para amplificar una región de 121 pb del gen M (Wise y col., 2004). A partir del promedio de las temperaturas del juego de cebadores se corrió un gradiente térmico entre 52°C a 62°C y se puso a punto la técnica en cuanto a concentraciones de reactivos, de manera semejante a lo realizado para la PCR de la región 5'UTR.

Como controles positivos se usaron dos vacunas vivas contra NDV y una cosecha de líquido alantoideo positivo a NDV facilitado por el Laboratorio de Virología (LAVIR) de la UNLP. Además, se adquirieron seis vacunas comerciales contra NDV que se emplean en la provincia de Tungurahua (Tabla 15). A partir de las vacunas reconstituidas se extrajo ARN y se procedió con la retrotranscripción a ADNc. Luego, con los tres tipos de muestras (a, b y c) y las vacunas contra NDV se realizaron las pruebas de PCR para  $\beta$ -actina aviar y para el gen M.

**Tabla 15.**

Vacunas vivas contra NDV comercializadas en la zona de estudio.

No.	Código	Cepa del NDV señalada por empresa fabricante
1	1Nc	La Sota
2	2N	Clon 30
3	3N	La Sota
4	4Na	La Sota B1
5	7Nb	La Sota B1
6	10N	La Sota

#### **4.3.2. Análisis de la relación filogenética entre las secuencias obtenidas de las muestras de aves ponedoras y las secuencias de cepas de referencia para el virus del NDV**

##### **4.3.2.1. Técnica de PCR para el gen F del NDV.**

Con el fin de realizar el análisis filogenético de las muestras positivas al gen M del NDV se buscó amplificar el gen F. Se usaron como controles positivos cosecha de líquido alantoideo facilitados por LAVIR y ADNc del NDV entregado por AGROCALIDAD. Inicialmente, se emplearon técnicas de PCR con las que se planteó amplificar todo el gen F. Luego, al no tenerse amplificación con las muestras se buscaron cebadores para regiones más cortas del gen y finalmente se trató con cebadores que flanqueaban más cercanamente al sitio de escisión del gen F. En total se probaron siete juegos de cebadores (Tabla 16).

**Tabla 16.**

Cebadores utilizados en las PCR para el gen F del NDV.

Cebadores	Secuencia 5' → 3'	Posición en el genoma	Temperatura de <i>melting</i> (°C)
<b>F completo 1</b>			
Fforward	ATGGGCTCCAACCTTCTAC	1-19 <sup>1</sup>	54
Freverse	CTCTCCGAATTGACAGAC	1662-1646 <sup>1</sup>	51
<b>F completo 2</b>			
F-1	ACGGGTAGAAGATTCTG	4498-4514 <sup>2</sup>	54,8
F-1780	CTCTCCGAATTGACAGAC	6278-6261 <sup>2</sup>	57,6
<b>F parcial</b>			
FF-parcial	ATGGGCTCCARAYCTTCTAC	1-20 <sup>1</sup>	60,4
FR-parcial	GGATTATCACA ACTAKCAGTGGCAG	535-511 <sup>1</sup>	63,8
<b>M + F</b>			
M+4100	AGTGATGTGCTCGGACCTTC	4100-4119 <sup>2</sup>	60,5
FR-parcial	GGATTATCACA ACTAKCAGTGGCAG	535-511 <sup>1</sup>	
<b>F clivaje corto</b>			
FF-clivaje	CCCCTTGGTGAITCTATCCGIAG	280-302 <sup>1</sup>	64,6
FR-clivaje	CTGCCACTGCTAGTTGIGATAATC	514-535 <sup>1</sup>	62,9
<b>F clivaje largo</b>			
FF-clivajeL	TTGATGGCAGGCCTCFFGC	95-113 <sup>1</sup>	62,3
FR-clivajeL	GGAGGATGTTGGCAGCATT	457-439 <sup>1</sup>	60,2
<b>F parcial combinado</b>			
F-1	ACGGGTAGAAGATTCTG	4498-4514 <sup>2</sup>	54,8
FRclivaje	CTGCCACTGCTAGTTGIGATAATCC	514-535 <sup>1</sup>	62,9

<sup>1</sup>Ubicación en el gen F del NDV.<sup>2</sup>Posición en la secuencia el genoma de la cepa La Sota del NDV (AF077761).

En primer lugar se probó la amplificación del gen F con un tamaño de 1662 pb; usando los cebadores diseñados por Quin y colaboradores (2008)

(Tabla 16). El cebador reverso se modificó ligeramente considerando al alineamiento realizado con 23 secuencias del NDV tomadas como referencia del GenBank (Anexo 8). Luego se intentó amplificar una región de 1780 pb con cebadores que fueron usados para secuenciación de muestras tomadas en brotes en Egipto durante 2006 (Mohamed y col., 2011).

A continuación, se trató de amplificar un segmento más corto de 535 pb del gen F con la utilización de cebadores degenerados (Ogali y col., 2018). Los cebadores para esta PCR también se modificaron (Tabla 16) de acuerdo con el análisis del alineamiento de 135 secuencias seleccionadas a partir del trabajo de Dimitrov y col., (2019) (Anexo 9). Posteriormente, dada la cercanía entre el gen M y F, se combinó el cebador inicial de M y el cebador reverso de la región de 583 pb de F (Tabla 16). El fragmento resultante fue de 976 pb.

Conociendo que los cambios a nivel del sitio de escisión de la proteína F se correlacionaron genóticamente con la virulencia del virus se buscó amplificar regiones más cortas, pero que incluyeran el sitio de escisión (Seal y col., 1995). Se trabajó con dos juegos de cebadores para intentar la amplificación parcial del gen F que incluyeran el sitio de escisión. El primer juego permitió amplificar una región corta de F de 254 pb (Seal y col., 1995) (Tabla 16). El segundo juego de cebadores se escogió porque los autores los diseñaron para poder detectar de manera general las cepas de NDV y luego realizar la clasificación por patotipos (Ahmadi y col., 2014) (Tabla 16). Con estos últimos cebadores se obtuvo un segmento más largo de 363 pb, donde estaba incluido el sitio de corte de F.

Para cada juego de cebadores mencionado se realizó un gradiente térmico. Las condiciones de las técnicas de PCR se trabajaron en un volumen final de 45µl, empleando los mismos reactivos utilizados para la PCR para detección del NDV y del mismo modo se variaron las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> y de molde.

Finalmente, se realizó una PCR donde se combinaron cebadores diseñados por investigadores diferentes. El cebador directo corresponde al F-1 de Mohamed y col., (2011) y el cebador inverso al diseñado por Seal y col., (2015) (Tabla 16). Los cebadores F-1 y FR clivaje amplificaban un fragmento de 581 pb. Las seis vacunas comerciales contra NDV se corrieron con la técnica de PCR para el gen F parcial combinado.

Las muestras que resultaron positivas al NDV luego de amplificar el segmento de 121 pb del gen M del NDV fueron evaluadas con los siete juegos diferentes de cebadores para el gen F del virus. Al no existir amplificación, como alternativa se ensayó la técnica de PCR que permitía amplificar el fragmento de 581 pb del gen F pero con la enzima MegaFi<sup>LM</sup> Fidelity DNA Polymerase (abm, G896). Dado que se trataba utilizar una enzima diferente como alternativa para lograr la amplificación del gen F, se facilitaron alícuotas de los reactivos sólo suficientes para realizar la puesta a punto y probar cuatro muestras. Por lo que, se seleccionaron las muestras tipo b de cuatro granjas positivas al NDV (U5269, U5270, U5272 y U5273). Para mejorar la resolución de bandas se adicionó MgCl<sub>2</sub> y para eliminar bandas inespecíficas se usó DMSO del 3 al 5%.

#### **4.3.2.2. Secuenciación y análisis filogenético del gen parcial F del NDV.**

Los productos de la PCR para F parcial combinada de las seis vacunas analizadas contra el NDV fueron enviados para su secuenciación a MacroGen – Corea. En cuando a las muestras de granjas, se cortaron las bandas del gel de agarosa correspondientes a 581 pb de la F parcial y se purificaron mediante el kit comercial PureLink<sup>LM</sup> Quick Gel Extraction and PCR Purification combo kit (Invitrogen, K220001). Se enviaron los amplicones de las siete vacunas y de cuatro productos purificados a partir de granjas (U5269, U5270, U5272 y U5273).

Las secuencias recibidas se limpiaron y consolidaron con el uso del programa MEGA-X 11.0.8. Se verificó que las secuencias estuvieran relacionadas con el NDV mediante alineamiento local en Nucleotide-BLAST. Además, se determinó la similitud nucleotídica entre las secuencias vacunales y la cepa La Sota (AJ629062) mediante el cálculo de *p-distance*.

#### **4.3.2.3. Aislamiento viral del NDV.**

Con el fin de obtener mejor calidad y mayor cantidad de ADNc se intentó hacer aislamiento viral para el NDV a partir de muestras tipo b positivas al gen M de tres granjas (U5256, U5261 y U5270). Las granjas se seleccionaron porque correspondían a aquellas donde se obtuvieron secuencias de S1 del IBV de buena calidad. Por lo que se usaron como control para verificar la buena conservación de las muestras.

Los huevos embrionados fueron facilitados por una explotación de gallinas de campo que no habían sido vacunadas contra NDV e IBV y que resultaron negativas por serología a la EN y a BIA. La cantidad de huevos embrionados que se pudo conseguir en el contexto de la pandemia de COVID 19, sólo hizo factible la realización de un pequeño ensayo donde se incluyeron tres muestras, controles positivo y negativo hasta un tercer pasaje.

Las muestras se centrifugaron a 2000 rpm y se filtraron a través de microfiltros (0,2  $\mu$ m) estériles. Se usó una vacuna viva (1N) como control positivo y se dejaron embriones sin inocular como control negativo. Se inoculó con 0,2 ml en la cavidad alantoidea de embriones de 10 días de edad por quintuplicado. Los embriones se observaron con ovoscopio diariamente y al cuarto día post-inoculación se realizó la cosecha del líquido alantoideo. Se infectaron nuevos embriones. El líquido alantoideo del último pasaje se utilizó para correr las pruebas de PCR para  $\beta$ -actina aviar, gen M y gen F parcial combinado.

#### 4.4. Resultados y discusiones de la caracterización molecular del NDV

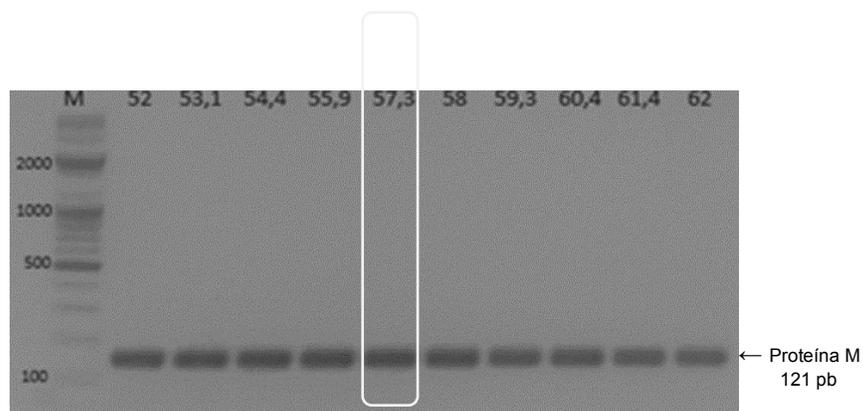


##### 4.4.1. Determinación de la presencia del NDV en muestras de gallinas ponedoras mediante PCR para el gen M

La técnica de PCR para el fragmento de 121 pb del gen M se realizó con una temperatura de hibridación de 57°C (Imagen 11). De esta manera, se pudieron realizar a la par con las PCR para  $\beta$ -actina aviar y la región 5'UTR del IBV por las condiciones de ciclado similares.

##### Imagen 11.

Electroforesis para el gradiente térmico probado para el gen M del NDV.



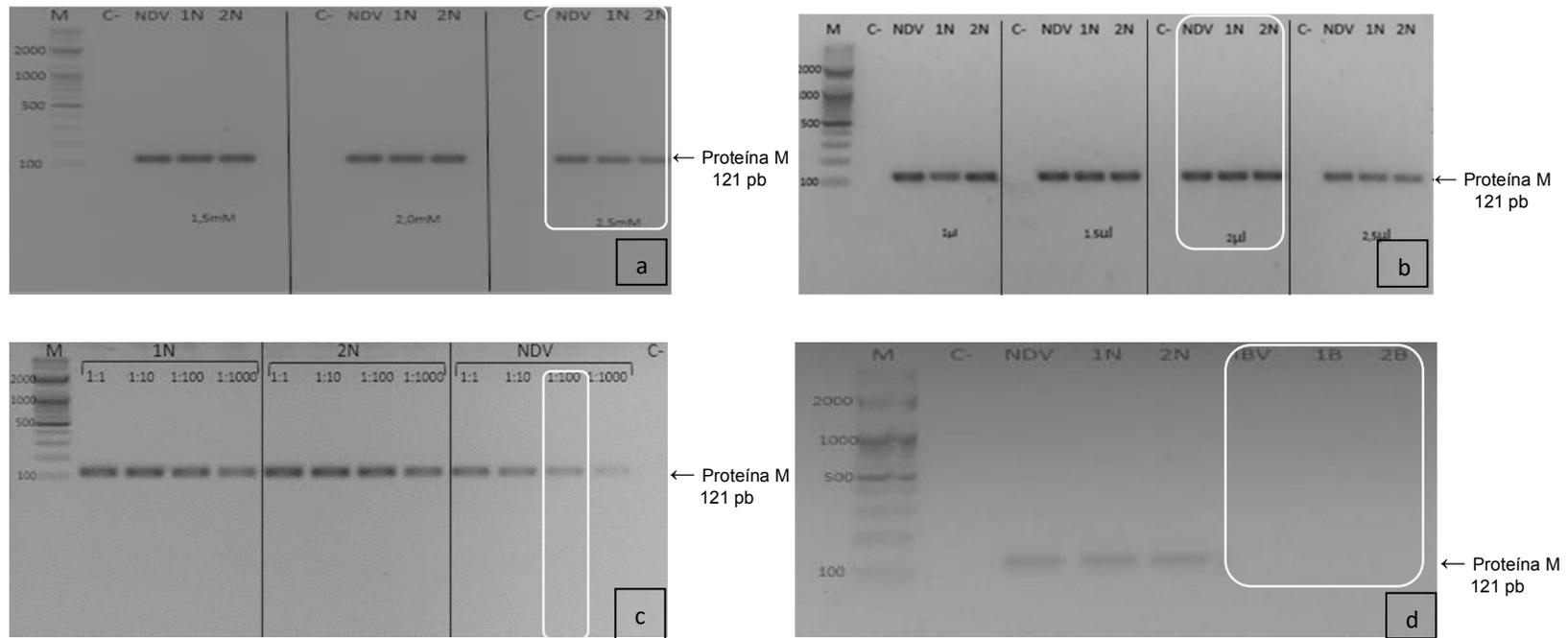
Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñidas con Sybr (Invitrogen) en la que se observa en cada carril diferentes temperaturas (°C). (M) marcador de con pares de bases. (C-) control negativo. En recuadro blanco se destaca la temperatura seleccionada.

El fragmento de 121 pb del gen M del NDV se amplificó adecuadamente con una concentración para  $MgCl_2$  de 2,5 mM (Imagen 12a). Con relación a la cantidad de ADNc empleado, no se observaron diferencias entre las cantidades empleadas, por lo que se optó por trabajar con 2  $\mu$ l/reacción (Imagen 12b).

En cuanto a la sensibilidad analítica, la PCR para el fragmento del gen M amplificó hasta la dilución 1:1000 que corresponde a detectar hasta 1,7ng/ $\mu$ l, valor encontrado en la cosecha de líquido alantoideo positivo a NDV (Imagen 12c). Finalmente, la PCR para el gen M del NDV fue específica al amplificar sólo los controles positivos del NDV (Imagen 12d). Este resultado era el esperado dado que Wise y colaboradores (2004), quienes diseñaron los cebadores mencionan que, éstos eran específicos inclusive para evitar una reacción positiva cruzada con otros paramixovirus aviares.

## Imagen 12.

Electroforesis relacionadas con la puesta a punto de la PCR para el gen M del NDV

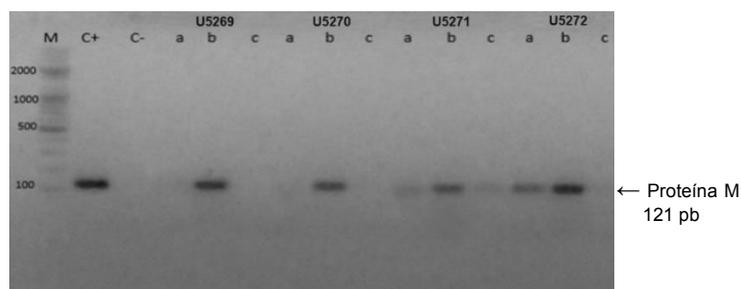


Geles de agarosa al 2% teñidos con Sybr (Invitrogen) donde se observa la amplificación de un fragmento de 121 pb del gen M con: a. diferentes concentraciones de  $MgCl_2$  (1,5 mM, 2 mM y 2,5mM). ). b. diferentes cantidades de molde (1 $\mu$ l, 1,5 $\mu$ l, 2 $\mu$ l y 2,5 $\mu$ l). c. diferentes diluciones (1:1; 1:10; 1:100; 1:1000) de controles positivos del NDV (NDV, 1N, 2N). d. ausencia de bandas para controles positivos del IBV (IBV, 1B, 2B). (M) marcador de pares de bases. (C-) control negativo. (C+) control negativo. En recuadros blancos se destacan las condiciones seleccionadas.

De las granjas analizadas en el estudio, 46 (97,87%) resultaron positivas al NDV (Imagen 13) (Anexo 4). Las seis vacunas vivas contra NDV también amplificaron la región de 121 pb del gen M.

### Imagen 13.

Electroforesis de PCR para el gen M con los tres tipos de muestras (a, b y c).



Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR safe DNA (Invitrogen) para PCR de un segmento de 121 pb del gen M del NDV. (M) marcador de pares de bases. (C-) control negativo. (C+) control positivo.

#### **4.4.2. Análisis de la relación filogenética entre las secuencias obtenidas de las muestras de aves ponedoras y las secuencias de cepas de referencia del NDV.**

##### **4.4.2.1. Técnica de PCR para un segmento del gen F.**

Se logró establecer las temperaturas de *annealing* (Tabla 17) para los siete pares de cebadores ensayados con el uso de los controles positivos (Imagen 14). Sólo con el juego de cebadores de la región F parcial de 535 pb no fue posible amplificar ni siquiera los controles positivos. No obstante, se tuvieron resultados positivos para las seis vacunas vivas contra NDV al amplificar el segmento de 581 pb del gen F (Imagen 15).

**Tabla 17.**

Temperaturas de hibridación para cebadores utilizados para amplificar gen F.

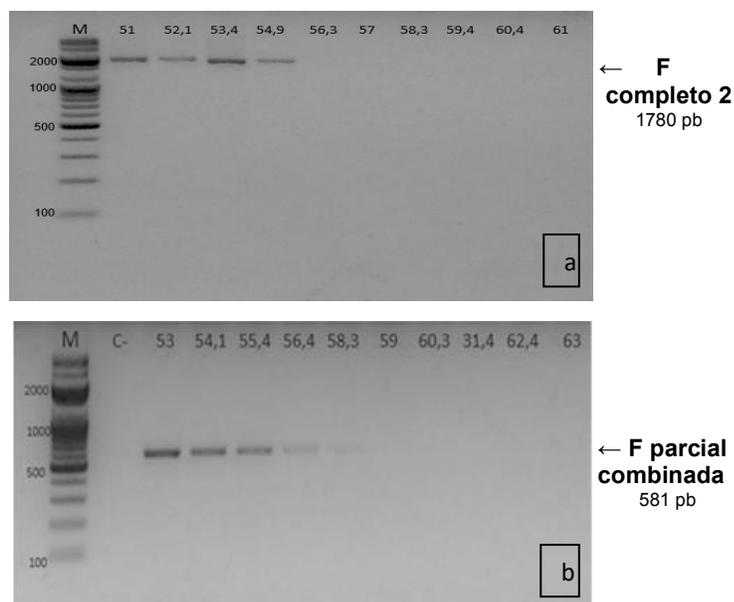
Nombre de PCR	Temperatura de hibridación de cebadores (°C)
F completo 1	55
F completo 2	53
M+F	60
F clivaje corto	63
F clivaje largo	63
F parcial combinado <sup>1</sup>	53
F parcial combinado <sup>2</sup>	47

<sup>1</sup>Con uso de enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase.

<sup>2</sup>Con empelo de enzima MegaFi<sup>LM</sup> Fidelity DNA Polymerase

**Imagen 14.**

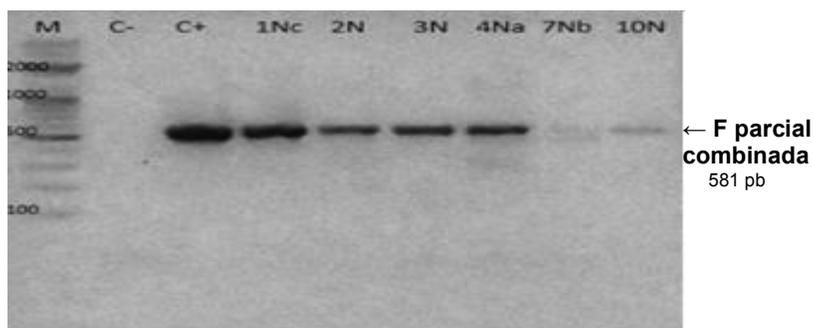
Electroforesis para el gradiente térmico probado para dos técnicas de PCR para gen F del NDV.



Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñidas con Sybr (Invitrogen) en las que se observa en cada carril diferentes temperaturas (°C). (M) marcador de pares de bases. a. perfil para el gen F completo con cebadores de Mohamed y col., (2011). b. perfil para F parcial combinada con enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase.

### Imagen 15.

Electroforesis de PCR para F parcial combinado con vacunas comerciales contra el NDV empleadas en la zona de estudio.



Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR safe DNA (Invitrogen) de ocho vacunas para PCR de un segmento de 581 pb de la proteína F del NDV. (M) marcador de pares de bases. (C-) control negativo. (C+) control positivo.

Por otro lado, no se lograron resultados positivos para el gen F a partir de las muestras que amplificaron para el gen M a través de seis juegos de cebadores empleados en pruebas PCR realizadas con la enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase. Dado que existen varias razones por las cuales en una PCR punto final se presenta la ausencia de un producto, se realizaron una serie de actividades a fin de lograr la amplificación (Anexo 10).

Con las soluciones implementadas no se obtuvieron resultados positivos para las muestras de campo con relación al gen F; volviéndose importante recordar que la alta capacidad de mutación del NDV, provoca que evolucione de manera continua (Miller y col., 2010). De hecho, aislamientos recuperados de aves columbiformes en Estados Unidos entre 2000 y 2007 fueron considerados como positivos al NDV al amplificar la proteína M

mediante ensayo qRT-PCR y tener valores de ICPI mayores de 0,7; sin embargo, todos los aislamientos fueron negativos para la prueba qRT-PCR del gen F (Kim y col., 2008b). Debe mencionarse que, la prueba qRT-PCR empleada para el gen F había sido diseñada originalmente para examinar muestras de pollos infectados con cepas del NDV responsables de una epizootia en los Estados Unidos durante el 2002 (Wise y col., 2004).

La prueba diseñada por Wise y col., (2004) fue capaz de identificar una amplia gama de aislamientos de diferentes lugares del mundo e inclusive fue validada para la identificación de los virus NDV de clase II (OIE, 2004). No obstante, el ensayo no fue capaz de amplificar la proteína de F del virus Dove/It recogido de Italia en 2000. La comparación de la secuencia del aislado Dove/It con las secuencias de los cebadores y sonda mostró la presencia de varios *mismatches* en los cebadores y cuatro en la sonda; siendo necesario un rediseño de cebadores y sonda para lograr caracterizar esta y otras cepas del NDV (Kim y col., 2008b; Kim y col., 2006).

Aunque las técnicas de PCR empleadas en el presente estudio son de punto final y no estarían influenciadas por el diseño de la sonda fluorescente requerida en las qPCR mencionadas, debe recordarse que los cebadores fueron diseñados por los autores originales a partir de secuencias existentes, lo que supone que el virus desconocido se parecería a los virus previamente secuenciados (Miller y col., 2010). Por esta razón, Bello y col., (2018) mencionan que, se deben actualizar continuamente los cebadores utilizados en las técnicas de PCR para el gen F a fin de tener en cuenta las variantes

que podrían escapar a la detección como resultado de la mutación en el sitio de unión del cebador. Un planteamiento semejante se encuentra en el Manual Terrestre de la OIE (2021b), donde se indica que dada la diversidad genética del NDV, estudios filogenéticos universales mediante pruebas RT-PCR específicas del gen F son un desafío. Además, en este documento se recalca que debido a la variabilidad en la región F0, las pruebas disponibles son de uso limitado y pueden no detectar variantes (OIE, 2021b).

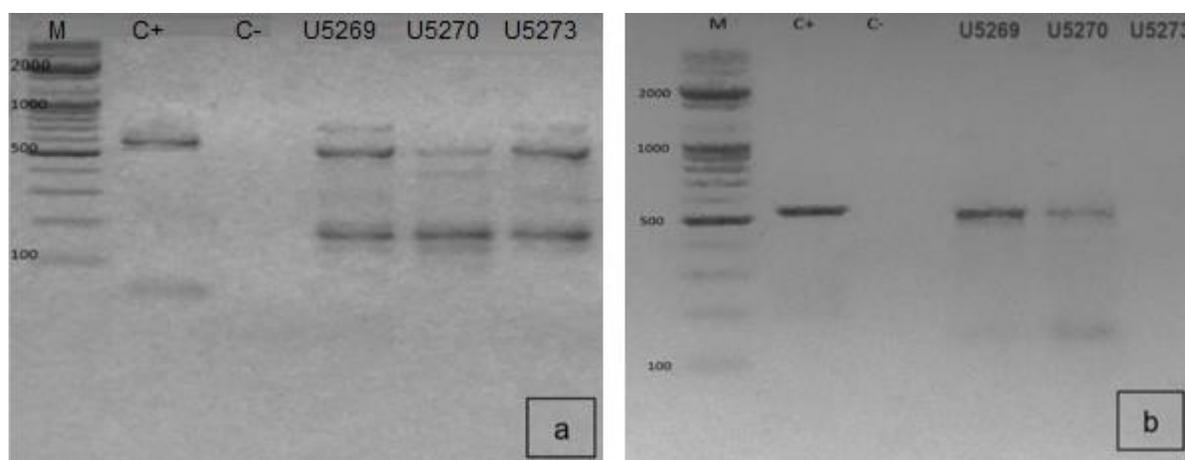
En consecuencia, las muestras positivas a NDV obtenidas de la provincia de Tungurahua podrían presentar alguna variación genética que dificulta la hibridación de los cebadores utilizados (OIE, 2021b). Más aún si se recuerda que en la EN es frecuente la aparición de infecciones mixtas con diferentes genotipos o que, como ya se mencionó, que existe una gran diversidad de genotipos del NDV, lo cual dificulta la predicción de su composición genética (Miller y col., 2010; OIE, 2021b).

En el caso de la PCR para la región F parcial combinada realizada con la enzima MegaFi<sup>LM</sup> Fidelity DNA Polymerase se presentaron bandas inespecíficas con las muestras, siendo necesario probar diferentes temperaturas de hibridación e incorporar el uso de DMSO al 3% (Imagen 16). Se evidenció que al disminuir la temperatura de hibridación usada para los cebadores de la región F parcial combinada se pudieron encontrar bandas del tamaño esperado. De manera similar, Kim y col., (2006) encontraron como posible solución para lograr detectar ciertas cepas del NDV, la reducción de la temperatura de *annealing*. Sin embargo, los investigadores también

mencionan la modificación de la sonda para lograr detectar determinadas cepas (Kim y col., 2006). Consecuentemente, se hace necesaria la aplicación de NGS (por sus siglas en inglés, *Next-Generation Sequencing*) o la secuenciación genómica completa para el estudio de este virus con alto potencial para evolucionar (Miller y col., 2010; Satharasinghe y col., 2016).

### Imagen 16.

Electroforesis del gen F parcial combinado con diferentes concentraciones de DMSO.



Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñida con SYBR safe DNA (Invitrogen) de tres muestras de campo para PCR de un segmento de 581 pb del GEN F del NDV empleando enzima MegaFi<sup>LM</sup> Fidelity DNA Polymerase. a. se observan bandas inespecíficas, sin uso de DMSO. b. se aprecia disminución de bandas inespecíficas con uso de DMSO al 3%. (M) marcador de pares de bases. (C-) control negativo. (C+) control positivo.

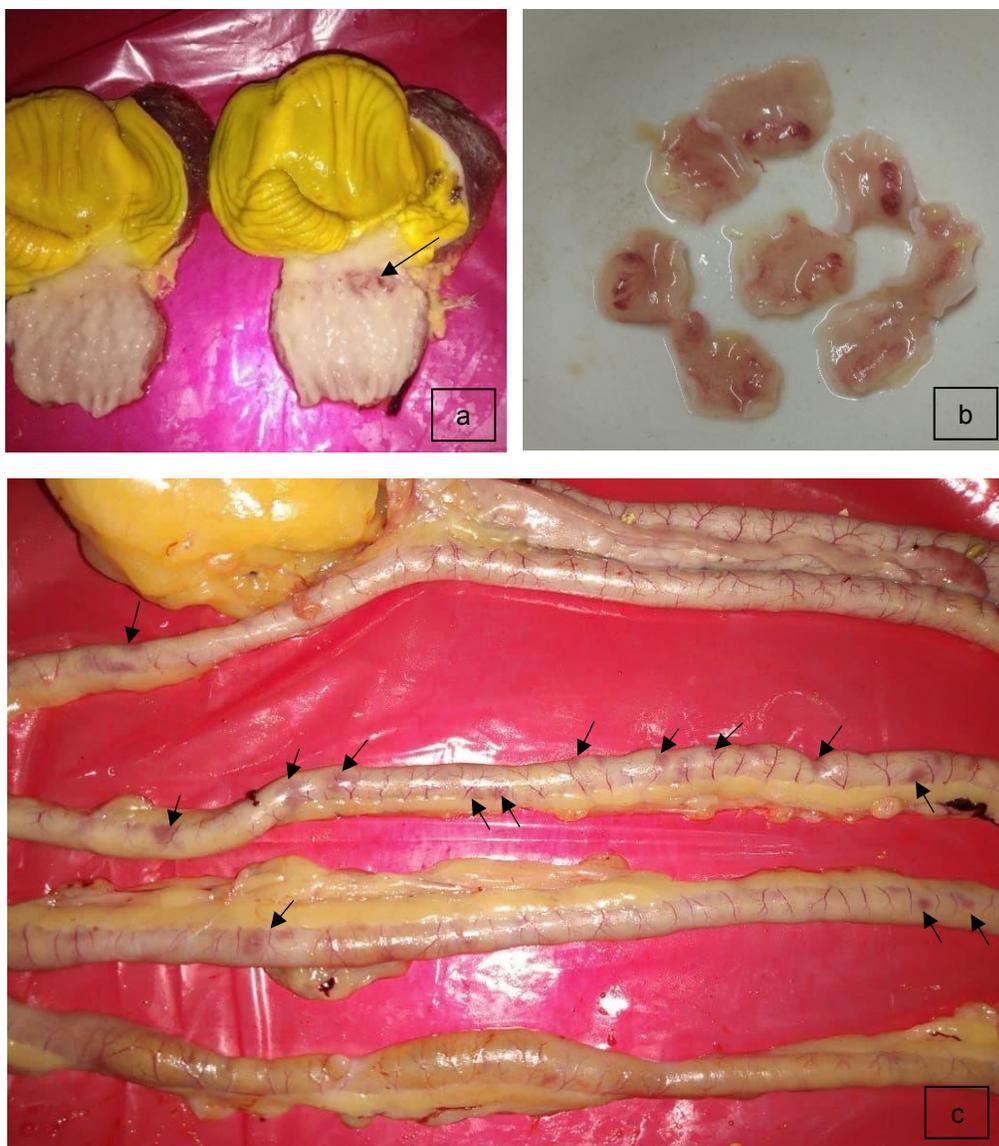
En este punto se hace necesario mencionar que, en la única granja negativa a NDV (U5285) no se observaron ni signos ni lesiones aparentes (Anexo 11 y 12). No obstante, en las necropsias realizadas a las aves

muestreadas se encontraron lesiones que podrían revelar la replicación del NDV. Alrededor del 25% de granjas muestreadas (Anexo 11) tenían aves en cuyas necropsias se encontraron: hemorragias equimóticas a nivel de intestino delgado, hemorragias petequiales y edema en el proventrículo y tonsilas cecales hemorrágicas (Imagen 17).

A pesar de que, las lesiones mencionadas no son patognomónicas para la EN, se suelen reportar en conjunto en aves infectadas con cepas velogénicas viscerotrópicas del NDV (Brown y Bevins 2017; Cattoli y col., 2011; Chowdhary y col., 2020; Valencia, 2020b). En consecuencia, no se podría inferir que las lesiones eran indicativas de la presencia de cepas velogénicas o un brote de la EN (Brown y Bevins 2017; Moreno, 1994; The Center for Food Security and Public Health 2010). Las lesiones simplemente podrían demostrar que aunque las vacunas contra el NDV disponibles comercialmente son capaces de prevenir de manera eficiente la mortalidad y los signos graves de la enfermedad, no se estaría impidiendo la replicación viral (Absalón y col., 2019). Además, debe acotarse que ciertas cepas vacunales como La Sota tienen el potencial de volverse virulentas y se ha demostrado que las cepas virulentas pueden estar presentes en poblaciones de aves sin que estas sean afectadas, dada la protección producida por las vacunas (Brown y Bevins, 2017b; Roy, 2012; Taylor y col., 2017).

**Imagen 17.**

Fotos representativas de lesiones más comúnmente encontradas durante las necropsias realizadas a las aves muestreadas.



a. hemorragias petequiales (flechas) y edema en proventrículo. b. tonsilas cecales hemorrágicas. c. hemorragias equimóticas (flechas) en intestino delgado.

#### **4.4.2.2. Análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas para el gen F parcial del NDV.**

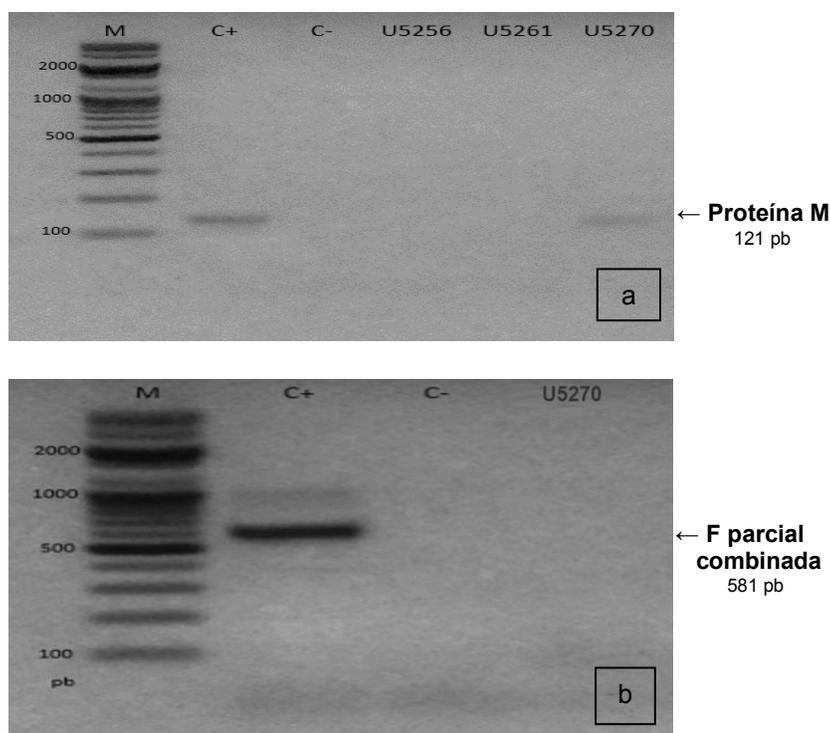
El alineamiento entre las secuencias de seis vacunas usadas en la zona de estudio, el control positivo y la cepa La Sota se presenta en el Anexo 13. La similitud nucleotídica a partir del cálculo de *p-distance* (0,0333) entre las vacunas contra NDV y la cepa La Sota fue de 96,67%. Con este porcentaje se pudo considerar que las vacunas comercializadas emplean cepas lentogénicas homólogas a la cepa La Sota. Por otra parte, las secuencias muestrales mostraron cromatogramas “sucios” (Anexo 14); dificultando la definición de una secuencia consenso. En el análisis Nucleotide-BLAST de las secuencias obtenidas a partir de las cuatro granjas no se encontró similitud significativa para ninguna de ellas.

#### **4.4.2.3. Aislamiento viral del NDV**

El resultado final al tercer pasaje fue positivo a  $\beta$ -actina aviar para las tres muestras analizadas y negativo a NDV para dos muestras (U5256 y U5261). Se amplificó el gen M con la muestra de la granja U5270 (Imagen 18a). Los resultados de los controles negativo y positivo de la técnica de aislamiento viral respaldaron los resultados obtenidos. Sin embargo, la muestra de la granja U5270 resultó negativa a la amplificación del gen F parcial combinado (Imagen 18b).

### Imagen 18.

Electroforesis de PCR para el gen M y gen F parcial combinado empleando cosechas de líquido alantoideo de pasaje III.



Geles de agarosa al 2% teñido con SYBR safe DNA (Invitrogen) para: a. tres muestras para PCR de un segmento de 121 pb del gen M. b. muestra U5270 empleando enzima MegaFi<sup>LM</sup> Fidelity DNA Polymerase. (M) marcador de pares de bases. (C-) control negativo. (C+) control positivo.

El aislamiento viral se realizó como prueba complementaria considerando que la no amplificación de productos en las técnicas de PCR punto final puede deberse a la insuficiente cantidad de molde (Thermo Fisher Scientific, 2021). No obstante, no se lograron resultados positivos para el gen F luego del tercer pasaje por embriones. Adicionalmente, hubo ausencia de amplificación para el gen M en las muestras U5256 y U5261. De igual manera,

sólo se pudo amplificar el fragmento de 783pb del gen S1 del IBV a partir de muestra de la granja U5270. Dado que estas granjas se seleccionaron porque fueron positivas al gen S1 e inclusive se contaba con las secuencias correspondientes, se consideró que las partículas virales no fueron capaces de replicarse y/o perdieron su viabilidad (OIE, 2021b). Situación que no es exclusiva del estudio realizado en la provincia de Tungurahua ya que, Selim y col., (2013) encontraron muestras positivas a IBV a través de RT-PCR, pero que no se lograron identificar mediante aislamiento viral.

## CAPÍTULO 5

### 5. LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA AVIAR

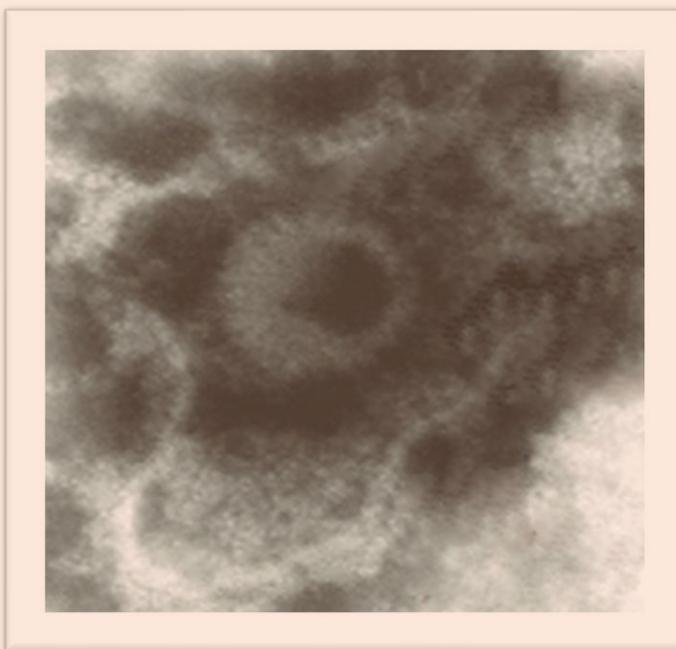


Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una partícula ILTV  
(Portz y col., 2008)

## 5.1. Revisión de Literatura



### 5.1.1. Etiología

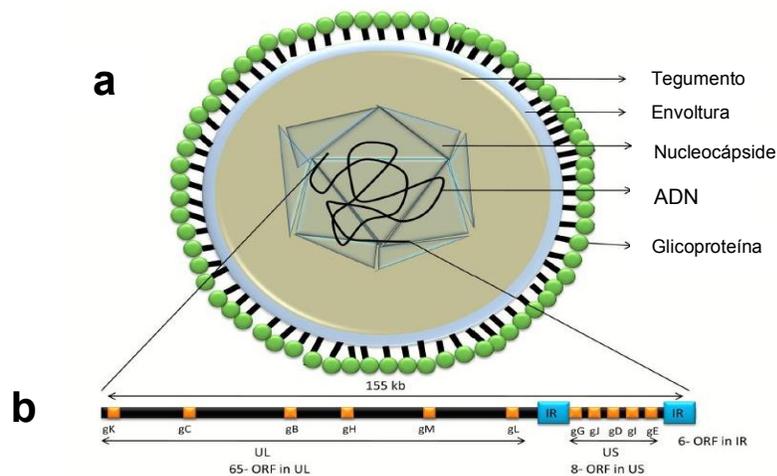
La ILT es producida por el *Gallid alphaherpesvirus 1* (GaHV-1) (García y Spatz, 2020; Gowthaman y col., 2020). Este virus pertenece al género *Iltovirus*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, familia *Herpesviridae* y al orden *Herpesvirales* (ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses, 2021).

El ILTV posee una envoltura externa de glicoproteínas que envuelven una capa de tegumento proteico, que a su vez rodea una nucleocápside de simetría icosaédrica (García y Spatz, 2020; Gowthaman y col., 2020). El tamaño de la partícula viral es de 200 a 350nm (Granzow y col., 2001). El virus posee ADN lineal de doble cadena, formado por 151.607 nt (Guy y Garcia, 2008; Lee y col., 2011).

El genoma del ILTV cuenta con 79 ORFs, de los cuales 64 se encuentran en la región única larga (UL), nueve en la región única corta (US) y seis en las regiones flanqueantes de repetición invertida (IR) (Figura 6) (García y Spatz, 2020). La envoltura contiene once glicoproteínas, gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL y gM, que están codificadas por los ORFs: UL27, UL44, US6, US8, US4, UL22, US7, US5, UL53, UL1 y UL10, respectivamente (Piccirillo y col., 2016). Las glicoproteínas son importantes para la generación de la respuesta inmune en el huésped (Gowthaman y col., 2020).

## Figura 5.

### Representación esquemática del ILTV



a. Diagrama esquemático de la estructura del ILTV. b. Organización del genoma del ILTV del extremo 3' a 5': región única larga (UL), región única corta (US) y repetición invertida (IR) (Gowthaman y col., 2020).

#### 5.1.2. Clasificación molecular

Debido a la antigenicidad conservada del ILTV, la clasificación se realiza tomando en cuenta el genoma del virus (García y Spatz, 2020; Menendez y col., 2014). La relación filogenética entre los genomas secuenciados del ILTV ha sido desarrollada por varios autores. Por ejemplo, García y Spatz (2019), encontraron la formación de cuatro clados para el virus de ILTV. Se destaca en dicha filogenia el hecho de que en el clado I se encontraban cepas de vacunas originadas en cultivo de embriones de pollo (CEO), mientras que en clado II se agruparon las cepas de vacunas originadas

en cultivo celular (TCO); pero, en los cuatro clados se ubicaron cepas virulentas (García y Spatz, 2020). Por su parte Spatz y col., (2019) identificaron nueve genotipos que se agruparon en 5 subgenotipos. La conclusión más importante de los estudios de clasificación molecular es que las cepas circulantes del ILTV están relacionadas con la vacuna (Menendez y col., 2014).

### **5.1.3. Incidencia y distribución**

ILTV está presente en diferentes países de los cinco continentes (Gowthaman y col., 2020). No obstante, es más frecuente en regiones donde hay producción avícola intensiva y/o grandes concentraciones de aves de corral (Guy y Garcia, 2008; OIE, 2021d).

En países como, Estados Unidos, China, Canadá y ciertas naciones de la Unión Europea es una enfermedad periódica, ocasionada por el paso del virus de parvadas infectadas a las no vacunadas ( Guy y Garcia, 2008; Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria-Argentina (SENASA-AR), 2009). En los países en vías de desarrollo, LT es considerada una infección endémica en aves de traspatio y aves de producción comercial (Bagust y col., 2000). En América del Sur se registraron brotes en Colombia, Perú, Argentina, Brasil, Chile, Perú, Surinam y Uruguay (Hidalgo, 2003; Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2021d; SENASA-AR, 2009; Ventura, 2010; Vinueza y col., 2011).

#### **5.1.4. Hospedadores y transmisión**

Las aves como cuervos, palomas, gorriones y estorninos parecen ser resistentes al ILTV (OIE, 2021d). Por su parte, el *Gallus domesticus* se considera el huésped principal, pero la enfermedad se ha reportado también en pavos, pavos reales y faisanes (Guy y Garcia, 2008; OIE, 2021d). Las aves de todas las edades son susceptibles, pero aquellas de más de tres semanas de edad tienen una mayor predisposición para infectarse (Dufour-Zavala, 2008; Linares y col., 1994). Las aves de traspatio y los patos se consideran portadores de la enfermedad (Hidalgo, 2003; Ojkic y col., 2006).

ILTV entra en el huésped a través de las las vías respiratorias superiores, la mucosa ocular u oral (Hidalgo, 2003; Murphy y Gibbs, 2005). La transmisión directa se produce generalmente por la introducción de aves portadoras o clínicamente enfermas a un lote de aves susceptibles (García y Spatz, 2020; Gowthaman y col., 2020). Por otro lado, la transmisión indirecta se da a través de vectores (escarabajos negros, perros o gatos) o por fómites contaminados con exudados respiratorios (García y Spatz, 2020; Gowthaman y col., 2020; Hidalgo, 2003; Ou y Giambrone, 2012). No se ha confirmado la transmisión vertical, ni tampoco que la enfermedad sea transmisible a los seres humanos (García y Spatz, 2020; OIE, 2021d).

#### **5.1.5. Patogenia, signos y lesiones anatomo-patológicas**

El período de incubación de ILTV varía entre 6 y 14 días (García y Spatz, 2020; Guy y Garcia, 2008). La replicación inicial tiene lugar en el epitelio

de la conjuntiva, senos respiratorios, laringe y vías respiratorias superiores (García y Spatz, 2020). La infección citolítica activa del ILTV genera daños en el revestimiento epitelial traqueal y conjuntival; conduciendo a hemorragias y otras manifestaciones clínico-patológicas (García y Spatz 2019; Gowthaman y col., 2020). ILTV establece latencia en el ganglio trigémino después de la fase lítica de infección aproximadamente a los siete días del inicio de la infección (García y Spatz, 2020; Gowthaman y col., 2020; Hidalgo, 2003).

La reactivación de ILTV a partir de la latencia está mediada por la TK y el ICP4 (Han y col., 2002a). La latencia le permite al virus reactivarse bajo ciertas circunstancias (procesos de estrés, exceso de amoníaco, cuadros tóxicos y sobre exposición a otros virus respiratorios) y provocar nueva infección en las aves que, aunque no presentan signos clínicos, excretan virus (Han y col., 2002a; Murphy y Gibbs, 2005; OIE, 2021d).

Se han descrito tres formas de ILT, la forma hiperaguda o epizootica grave, la forma subaguda y la forma suave o crónica (García y Spatz, 2020; OIE, 2021d). Los signos varían en intensidad de acuerdo con la forma de presentación (Tabla 18); destacándose que las aves afectadas con la forma a hiperaguda pueden morir súbitamente sin presentar signos clínicos (Preis y col., 2013).

**Tabla 18.**

Resumen de signos clínicos de acuerdo con la forma de presentación de la ILT.

SIGNOS	FORMA DE PRESENTACIÓN		
	Hiperaguda	Aguda	Crónica
Letargia	SI	SI	NO
Disnea	Si (marcada)	SI	NO
Estertores	SI	SI	SI (leves)
Estornudos	SI	SI	NO
Jadeo	SI	SI	NO
Disnea	SI (marcada)	SI	NO
Graznidos agudos	NO	SI	NO
Disminución de producción de huevos <sup>1</sup>	NO	SI <sup>2</sup>	SI (10%)
Expectoración de moco mezclado con sangre	SI	NO	NO
Gorgojeo y tos cuando aves intentan expulsar obstrucciones en la tráquea	SI	NO	NO

<sup>1</sup> En aves reproductoras y ponedoras

<sup>2</sup> Producción de huevos cesa o disminuye para luego volver a normalidad.

(Creelan y col., 2006; Guy y Garcia, 2008; Hidalgo, 2003; OIE, 2021d; Ou y Giambrone, 2012)

Con relación a las lesiones, en la forma epizootica se incluyen: traqueítis hemorrágica grave con coágulos sanguíneos, formación de membranas diftéricas, rinitis mucoide, conjuntivitis e hinchazón de párpados (Guy y Garcia, 2008; OIE, 2021a). La morbilidad es alta (90 al 100%) y la mortalidad moderada (5 al 70%) (García y Spatz, 2020; Gowthaman y col., 2020; Ou y Giambrone, 2012). En la forma subaguda se observa conjuntivitis purulenta, sinusitis, traqueítis con exudado mucoide y presencia de membranas diftéricas en la laringe y tráquea (Gowthaman y col., 2020; OIE, 2021d). En la forma suave, el virus ocasiona traqueítis catarral leve a moderada, sinusitis y conjuntivitis con hinchazón de los senos infraorbitarios (García y Spatz, 2020; Hidalgo, 2003). La morbilidad es relativamente baja y la mortalidad entre 0,1 y 2% (Ou y Giambrone, 2012).

### **5.1.6. Prevención y control**

Un plan de bioseguridad eficaz para ILT incluye evitar granjas de varias edades, limpieza y desinfección de equipos y vehículos, compostaje interno de basura, eliminación adecuada de aves muertas y períodos de vacío sanitario superiores a los 21 días (García y Spatz, 2020; Halvorson 2011; Hidalgo, 2003). Las medidas de bioseguridad preventivas también deben incluir el control de aves silvestres, roedores, perros y gatos (Volkova y col., 2012). Además, las aves de traspatio cercanas a las explotaciones comerciales deben monitorearse (García y Spatz, 2020). Finalmente, debe existir comunicación y colaboración entre el gobierno, la industria avícola y la academia a fin de tener planes de contingencia rápidos; más aún cuando se conoce que en las áreas donde se ha presentado un brote de ILTV, probablemente se experimenten más brotes (Gowthaman y col., 2020; Halvorson, 2011).

#### **5.1.6.1. Vacunación contra el ILTV**

Actualmente, la vacunación con vacunas TCO y CEO sigue siendo una práctica común (Menendez y col., 2014). Las vacunas CEO pueden volverse virulentas después de varios pasajes y además generan latencia (Dufour-Zavala, 2008; Guy y John Barnes, 1991; Menendez y col., 2014). La administración de las vacunas CEO se realiza través del agua de bebida, vía ocular o por aspersión (Dufour-Zavala, 2008; García y Spatz, 2020). Las vacunas TCO tienen la ventaja de que luego de pasajes en las aves no vuelven

a ser virulentas, pero sólo se pueden administrar vía ocular (Dufour-Zavala, 2008).

Las vacunas recombinantes se consideran alternativas más seguras, debido a su incapacidad para transmitirse de ave en ave, por no presentar reversión a la virulencia y a que no establecen latencia (Menendez y col., 2014). No obstante, estas vacunas no detienen la diseminación viral y la existencia de anticuerpos contra los vectores recombinados puede neutralizar las vacunas (Gowthaman y col., 2020; Thilakarathne y col., 2020). Actualmente, existen comercialmente disponibles vacunas contra ILTV que emplean como vectores virales al HVT o al virus de la viruela aviar (Dufour-Zavala, 2008; Menendez y col., 2014). Estas vacunas se administran *in ovo* o mediante punción alar (Dufour-Zavala, 2008; Menendez y col., 2014).

Tanto las vacunas atenuadas como las vacunas vectorizadas virales recombinantes se pueden usar solas o en combinación (García y Spatz, 2020). En los Estados Unidos dependiendo de la zona, los programas vacunales de reproductoras y ponedoras utilizan diferentes combinaciones de vacunas y edades (Dufour-Zavala, 2008). En ponedoras y reproductoras se puede aplicar una vacuna CEO a las 4-8 semanas de edad mediante agua de bebida, seguida de una vacuna TCO vía ocular a las 10-15 semanas de edad (Dufour-Zavala, 2008; Gowthaman y col., 2020). Los pollos de engorde se vacunan cuando se presenta un brote (Dufour-Zavala, 2008; Gowthaman y col., 2020; Ou y Giambrone, 2012).

### **5.1.7. Diagnóstico**

Los métodos de diagnóstico para ILT incluyen aislamiento viral, inmunofluorescencia (IF), inmunohistoquímica (IHQ) y métodos serológicos (virus neutralización -VN-, inmunodifusión en gel de agar -AGID- o ELISA) (Gowthaman y col., 2020). Sin embargo, la histopatología y las técnicas de qPCR tienen un alto valor diagnóstico y se utilizan más comúnmente (García y Spatz, 2020; OIE, 2021d).

#### **5.1.7.1. Aislamiento viral**

Las muestras clínicas a partir de las que se realiza el aislamiento viral incluyen: pulmones, tráquea, hisopos conjuntivales, raspados traqueales y/o exudados de la tráquea (García y Spatz, 2020; Gowthaman y col., 2020). Las muestras deben tomarse preferente de aves en las primeras etapas de la infección (OIE, 2021d).

El aislamiento del ILTV se realiza en huevos SPF embrionados de 10 a 12 días de edad a través de la inoculación en la membrana corioalantoidea (CAM) (OIE, 2021d). Los embriones infectados con ILTV mueren a los 2 a 8 días post-inoculación, pero a las 48h ya se pueden observar placas opacas en la CAM (Gowthaman y col., 2020; OIE, 2021d).

El aislamiento viral del ILTV también se puede realizar en cultivos celulares (Gowthaman y col., 2020; OIE, 2021d). Se suelen utilizar cultivos primarios de células de hígado, pulmón o riñón de embriones de pollo; así como células de riñón de pollo (Gowthaman y col., 2020). La infección con

ILTV en los cultivos incluyen la hinchazón de las células, el desplazamiento de la cromatina, el redondeo de los nucleolos, la formación de sincitios y la presencia de inclusiones intranucleares (Gowthaman y col., 2020; OIE, 2021d).

#### **5.1.7.2. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia**

La IF y la IHQ se pueden utilizar para detectar el ILTV en tejidos traqueales o frotis (Gowthaman y col., 2020; OIE, 2021d). La IHQ es más sensible que la IF y la mayor positividad con IHQ se ha reportado a nivel de la tráquea (Gowthaman y col.,2020).

#### **5.1.7.3. Serología**

La técnica de AGID se suele utilizar para diferenciar ILT de la forma diftérica de viruela aviar (Gowthaman y col., 2020). No obstante, la sensibilidad de AGID es menor comparada con VN, IF y ELISA (Gowthaman y col., 2020; García y Spatz, 2020). Por su parte, la VN se utiliza para evaluar el aislamiento viral en CAM o tejidos celulares (OIE, 2021d). El anticuerpo usado en la VN neutraliza el ILTV evitando la formación de placas en el caso de las CAM o los efectos citopáticos en el caso de los cultivos celulares (OIE, 2021d).

ELISA por otro lado es la técnica de elección para la detección de anticuerpos en muestras de campo (Gowthaman y col., 2020). Los kits de ELISA disponibles comercialmente en su mayoría utilizan virus enteros como antígeno, por lo que no se pueden diferenciar las respuestas de anticuerpos

entre las aves infectados y las aves vacunadas (García y Spatz, 2020; Gowthaman y col., 2020). No obstante, con el uso de las vacunas recombinantes que transportan glicoproteínas del ILTV, también se fabricaron kits de ELISA con glicoproteínas específicas; facilitando diferenciar las poblaciones de aves infectadas de las vacunadas (García y Spatz, 2020; Gowthaman y col., 2020).

#### **5.1.7.4. Pruebas moleculares**

Técnicas moleculares como PCR punto final, qPCR, PCR anidada y RFLP se han utilizado para detectar el ILTV de manera precisa y rápida (Creelan y col., 2006). Las pruebas de PCR son igual de sensibles que el aislamiento viral cuando se toma muestras de aves hasta la fase final de la infección, pero muestran una sensibilidad superior para la detección de ILTV durante la fase de recuperación de la enfermedad (OIE, 2021d).

Aunque las cepas de campo y vacunales de ILTV se pueden diferenciar utilizando RFLP, se ha desarrollado un análisis de fusión de alta resolución (HRM) para clasificar las cepas de ILTV y detectar eventos de recombinación (Craig y col., 2017; Fakhri y col., 2019; OIE, 2021d). Igualmente, las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) o los ensayos de genotipado de polimorfismo de nucleótido único TaqMan (TaqMan-SNP) son empleados para identificar mutaciones o eventos de recombinación del ILTV (Gowthaman y col., 2020; Loncoman y col., 2017). Los genes que se estudian varían de

acuerdo con el criterio de los investigadores, pero comúnmente se examinan: ICP4, TK, gG, gE y gJ (Craig y col., 2017; Creelan y col., 2006; OIE, 2021d).

#### **5.1.7.5. Histopatología**

Las lesiones microscópicas producidas por el ILTV se pueden identificar en cortes histológicos conjuntivales y traqueales teñidos con Giemsa o hematoxilina- eosina (García y Spatz, 2019; OIE, 2021d). De manera clásica se observa la presencia de células sincitiales, pero la detección de cuerpos de inclusión intranucleares de Cowdry tipo A se considera patognomónico de la enfermedad (García y Spatz, 2019; Gowthaman y col., 2020; OIE, 2021d). Los cuerpos de inclusión están presentes solo de 3 a 5 días después de la infección y aún con su identificación se requiere la confirmación de los resultados mediante inmunocitoquímica o PCR (García y Spatz, 2019; OIE, 2021d).

## **5.2. Antecedentes del estudio de la Laringotraqueitis infecciosa aviar en Ecuador**

Hasta el año 2011, la ILT se consideraba una enfermedad exótica en el Ecuador, a pesar de que la enfermedad se había reportado en los países vecinos de Perú y Colombia (Morales y col., 1971; Vinuesa y col., 2011). A partir de un brote de ILT ocurrido en agosto del 2008 en Perú, el Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria realizó un monitoreo en las provincias

fronterizas, Loja y El Oro. Los resultados a la prueba de ELISA indirecta fueron negativos (SESA, comunicación personal, 2009). En el año 2009, se muestrearon explotaciones comerciales localizadas en las provincias de Pichincha e Imbabura (Revelo, 2009). Las aves de estas granjas presentaban problemas respiratorios, pero en ellas no se encontró evidencia serológica (prueba de ELISA) ni histopatológica de exposición al virus de ILTV (Revelo, 2009).

Durante el año 2011, se realizó la detección de ILTV a partir de un brote ocurrido por primera vez en Ecuador (Ayala y col., 2014). En este estudio se tomaron muestras traqueales de aves con signología respiratoria pertenecientes a 26 granjas avícolas del Ecuador continental (Ayala y col., 2014). Para evaluar la presencia de ILTV en las muestras traqueales, se amplificó mediante PCR punto final a los genes ICP4 y TK (Ayala y col., 2014). En la investigación se infirió que el brote no fue causado por cepas vacunales y que el mismo pudo ingresar desde países vecinos (Ayala y col., 2014). Con este hallazgo, la enfermedad fue notificada a la OIE en el año 2012 y se autorizó en el país la vacunación contra ILTV mediante el uso de vacunas recombinantes vectorizadas (AGROCALIDAD, 2012; OIE, 2012). Cabe señalar que, en una investigación realizada en la isla Floreana de las Islas Galápagos, realizado en el año 2012 no se observaron signos clínicos de ILT, ni se detectaron resultados positivos con ELISA (Deem y col., 2012).

En el último trabajo de investigación se muestrearon 92 granjas de aves de corral situadas en trece provincias del Ecuador (Garrido y col., 2016). Los

investigadores reportaron resultados positivos en 48 granjas de las 12 provincias estudiadas; siendo las provincias de Tungurahua y Cotopaxi las que presentaron la mayor proporción de reactores seropositivos (Garrido y col., 2016). No obstante, desde esa fecha no se han realizado otros estudios que permitan conocer el estado epidemiológico de la enfermedad en el país.

### 5.3. Materiales y Métodos para la caracterización molecular del ILTV



#### 5.3.1. Determinación de la presencia del ILTV en muestras de gallinas ponedoras a través de PCR para los genes ICP4 y TK.

Se amplificó un fragmento de 222 pb del gen ICP4. Para el efecto se utilizaron los cebadores ICP4f (5'CTCTTCCTCCTTCCTCAT-3') y ICP4rev (5'-GTTACTGACTGAACCGACCC-3'), diseñados por Creelan y col., (2006) (Anexo 6). De igual manera, se utilizaron los cebadores descritos por Han y Kim (2001) para amplificar un fragmento de 649 pb de la Timidina kinasa (TK): cebador directo TKIPf 5' CTTAGCGGAACCTATGCAAG 3' y cebador inverso TKIPrev 5' TAGCGTCTGGTCGATTGAAG 3' (Anexo 6). En las dos técnicas de PCR se empleó como control positivo, ADN facilitado por AGROCALIDAD.

Con las muestras traqueales, muestras tipo d, se realizaron las dos pruebas de PCR para detección de ILTV y la PCR de  $\beta$ -actina aviar. Adicionalmente, se procesó una vacuna contra ILTV empleada en la provincia de Tungurahua. La vacuna correspondía a una vacuna vectorizada liofilizada acompañada de diluyente oleoso. Se procedió a fragmentar el liofilizado y reconstituir una parte con el diluyente (V.oleoso) y otra con medio MEM (MP Biomedicals) estéril (V.MEM). Luego, se extrajo ADN de cada muestra vacunal reconstituida y se corrió la PCR para  $\beta$ -actina aviar. Sólo la muestra de vacuna

reconstituida con medio MEM amplificó y se utilizó con las PCR para los fragmentos de los genes ICP4 y TK.

### 5.3.2. Secuenciación, *alineamiento y análisis de similitud nucleotídica de las secuencias obtenidas para el gen TK*

Los productos de PCR para TK de las granjas positivas se enviaron a secuenciar a Macrogen - Corea. Las secuencias se procesaron en el programa bioinformático MEGA-X 11.0.8. Se construyó un alineamiento incluyendo 17 cepas de referencia (Tabla 19) y se realizó un análisis de similitud nucleotídica entre todas las secuencias de referencia y las muestrales mediante *p-distance*.

**Tabla 19.**

Cepas representativas para ILTV.

Número acceso GenBank	Código en alineamiento	Procedencia
FJ444832	LTI-IVAX	Brasil
FJ444847	Brasil/2007/USP-57	Brasil
HM230801	CEO-vacuna-Merial-UL24	Italia
DQ522949	Cepa-CG	China
HM230794	Cepa-288269/2007-UL24	Italia
EU360946	Cepa-CH04	Suiza
EU423897	Cepa-SP-Trachivax	China
EU360950	TCO-vacuna	Suiza
S83714	US-aislado-632	Estados Unidos
FJ444833	Brasil/2002/USP-01	Brasil
GQ499344	Perú/2008/USP-81	Perú
EU360949	CEO-vacuna-Europa	Suiza
FJ444831	Nobilis-ILT-vacuna	Brasil
MN643594	P1369-TK-UFGM/Brasil	Brasil
JX977077	Sharkia-11	Egipto
HM230800	CEO-vacuna-Fort-Dodge-UL24	Italia

## 5.4. Resultados y discusiones de la caracterización molecular del ILTV

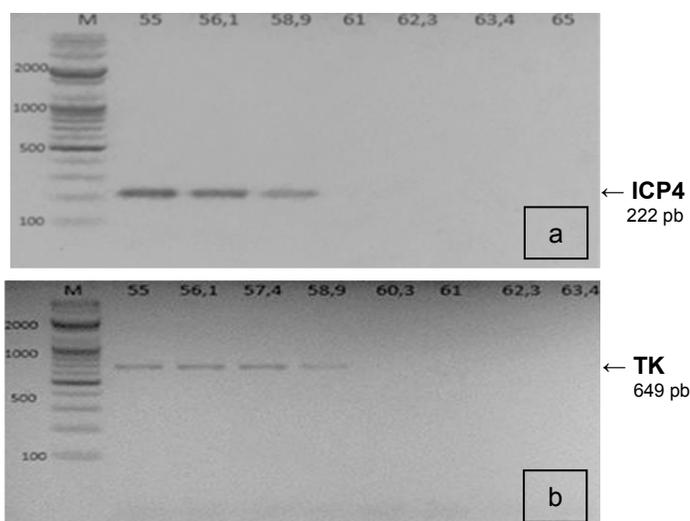


### 5.4.1. Determinación de la presencia del ILTV en muestras de gallinas ponedoras a través de PCR para los genes ICP4 y TK.

Para el gen ICP4 y TK, los perfiles térmicos realizados mostraron como temperaturas de hibridación para los cebadores empleados de 55°C y 57°C (Imagen 19), respectivamente. Las condiciones de ciclado para las PCR para los genes ICP4 y TK se detallan en la Tabla 20, conservándose las mismas concentraciones de reactivos empleadas en las PCR para 5'UTR y gen M.

#### Imagen 19.

Electroforesis de los perfiles térmicos probados para los genes ICP4 y TK.



Geles de agarosa al 2% teñidas con Sybr (Invitrogen) en las que se observa siete diferentes temperaturas (°C) una por carril para: a. gen ICP4. b. gen TK. (M) marcador de pares de bases. (C-) control negativo. (C+) control positivo.

**Tabla 20.**

Protocolo para las PCR de los genes ICP4 y TK del ILTV.

Proceso	Temperatura (°C)		Tiempo (minutos:segundos)		No. Ciclos
	ICP4	TK	ICP4	TK	
Desnaturalización inicial	94	94	03:00	05:00	1
Desnaturalización	94	94	00:15	01:00	
Hibridación	55	57	00:30	01:00	40
Extensión	72	72	00:15	01:00	
Extensión final	72	72	03:00	10:00	1

Las 47 muestras traqueales provenientes de las granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Tungurahua resultaron positivas para  $\beta$ -actina aviar (Tabla 21). De estas 47 muestras, tres resultaron positivas para ILTV (U5244, U5255 y U5278) al amplificarse los fragmentos de las proteínas ICP4 y TK (Tabla 21) (Imagen 20).

**Tabla 21.**

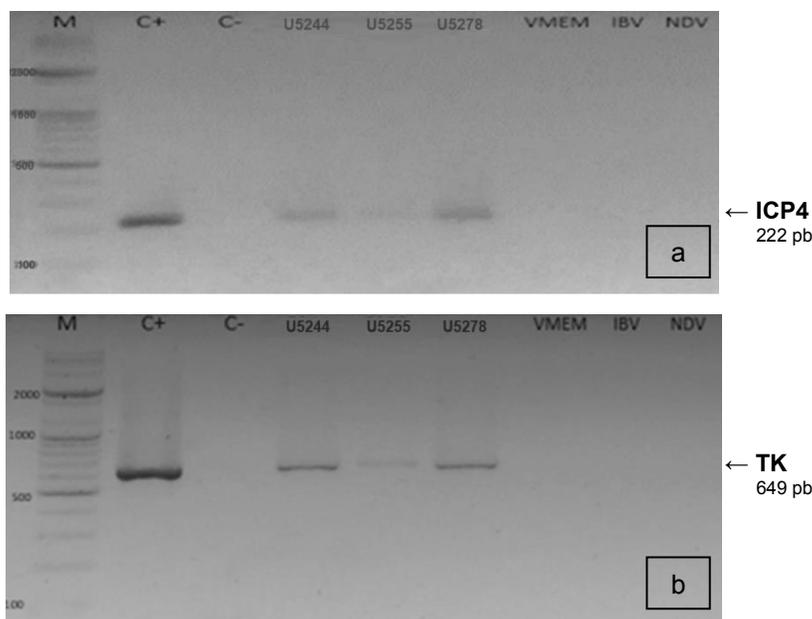
Resultados para ICP4 y TK del ILTV con muestras de gallinas ponedoras.

No.	Código de granja	Tipo de muestra	$\beta$ -actina aviar	Resultados	
				ICP4	TK
1	U5240	d	+	-	-
2	U5241	d	+	-	-
3	U5242	d	+	-	-
4	U5243	d	+	-	-
5	U5244	d	+	+	+
6	U5245	d	+	-	-
7	U5246	d	+	-	-
8	U5247	d	+	-	-
9	U5248	d	+	-	-
10	U5249	d	+	-	-

No.	Código de granja	Tipo de muestra	$\beta$ -actina aviar	Resultados	
				ICP4	TK
11	U5250	d	+	-	-
12	U5251	d	+	-	-
13	U5252	d	+	-	-
14	U5253	d	+	-	-
15	U5254	d	+	-	-
16	U5255	d	+	+	+
17	U5256	d	+	-	-
18	U5257	d	+	-	-
19	U5258	d	+	-	-
20	U5259	d	+	-	-
21	U5260	d	+	-	-
22	U5261	d	+	-	-
23	U5262	d	+	-	-
24	U5263	d	+	-	-
25	U5264	d	+	-	-
26	U5265	d	+	-	-
27	U5266	d	+	-	-
28	U5267	d	+	-	-
29	U5268	d	+	-	-
30	U5269	d	+	-	-
31	U5270	d	+	-	-
32	U5271	d	+	-	-
33	U5272	d	+	-	-
34	U5273	d	+	-	-
35	U5274	d	+	-	-
36	U5275	d	+	-	-
37	U5276	d	+	-	-
38	U5277	d	+	-	-
39	U5278	d	+	+	+
40	U5279	d	+	-	-
41	U5280	d	+	-	-
42	U5281	d	+	-	-
43	U5282	d	+	-	-
44	U5283	d	+	-	-
45	U5284	d	+	-	-
46	U5285	d	+	-	-
47	U5286	d	+	-	-
<b>TOTAL POSITIVOS</b>			<b>47</b>	<b>3</b>	<b>3</b>

### Imagen 20.

Electroforesis de muestras positivas y especificidad de las PCR de los genes ICP4 y TK del ILTV.



Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñida con SYBR safe (Invitrogen) para: a. gen ICP4 y b. gen TK. Se observa amplificación para muestras positivas a ILTV (U5244, U5255 y U5278) y ausencia de bandas en los controles positivos del IBV y NDV y para la vacuna ILTV (VMEM). (M) marcador de pares de bases. (C-) control negativo.

Los resultados positivos muestran la presencia de ILTV de campo y/o vacunal en la provincia de Tungurahua. Cabe señalar que, la vacuna comercial vectorizada probada en las dos técnicas de PCR no amplificó para ninguno de los fragmentos pues posee sólo la gB del ILTV. En consecuencia, no se puede hablar de un virus de ILTV derivado de la vacuna utilizada y autorizada. La detección de las proteínas ICP4 y TK revelaría la circulación de virus de campo o de virus derivado del uso de una vacuna CEO.

#### **5.4.2. Secuenciación, alineamiento y análisis de similitud nucleotídica de las secuencias obtenidas para la proteína TK del ILTV.**

El alineamiento de las cepas muestrales y las de referencia (Anexo 15) mostró que no existían diferencias entre ellas. Lo cual coincide con lo reportado a partir de aislamientos de Ecuador del año 2011 que fueron idénticos a las secuencias de referencia elegidas para TK (Ayala y col., 2014).

Con el cálculo de *p-distance* se encontró que las secuencias tenían un porcentaje de similitud nucleotídica entre 99,49 y 100% (Tabla 22). En el trabajo realizado con cepas de campo de Argentina entre los años 2006 y 2013, el análisis de las secuencias correspondientes al gen TK no mostró diferencias entre las muestras de campo e incluso entre las vacunas (Craig y col., 2017). Adicionalmente, el control positivo de ILTV tuvo un 100% de similitud con la cepa P1369-TK-UFMG/Brasil. Mientras que, se encontró que las secuencias de las granjas U5244, U5255 y U5278 tenían un 100% de similitud nucleotídica con la cepa peruana USP-81 (Tabla 22).

Aunque la TK no suele emplearse para realizar filogenia, su estudio es importante dado que está relacionado con la virulencia de ILTV y contribuye con la caracterización (Han y col., 2002). En el presente estudio no fue factible establecer el origen de las secuencias; siendo necesario estudiar otras regiones genómicas o utilizar otras técnicas moleculares como RLFP o NGS. El segmento gJ fue el que Craig y col., (2017) determinaron como el más informativo para lograr la diferenciación entre cepas de campo y vacunales.

Tabla 22.

Resultados de *p-distance* entre cepas muestrales y cepas de referencia de ILTV.

	LT-A	U5244	U5255	U5278	LTH-IVAX	Brasil/2007/ /USP-57	CEO- vacuna- Merial- UL24	Cepa- CG	Cepa- 288269/ 2007- UL24	Cepa- CH04	Cepa- SP- Trachivax	TCO- vacuna	US- aislado- 632	Brasil/2002/ USP-01	Cepa- UL23	Peru/2008/ /USP-81	CEO- vacuna- Europa	Nobilis- ILT_vacuna	P1369- TK- UFMG/Brasil	Sharkia- 11	CEO- vacuna- Fort- Dodge- UL24	
LT-A																						
U5244	0,0034																					
U5255	0,0034	0,0000																				
U5278	0,0034	0,0000	0,0000																			
LTH-IVAX	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017																		
Brasil/2007/USP-57	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000																	
CEO-vacuna-Merial-UL24	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000																
Cepa-CG	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000															
Cepa-288269/2007-UL24	0,0034	0,0034	0,0034	0,0034	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017														
Cepa-CH04	0,0034	0,0034	0,0034	0,0034	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000													
Cepa-SP-Trachivax	0,0034	0,0034	0,0034	0,0034	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0034	0,0034												
TCO-vacuna	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017	0,0017	0,0017											
US-aislado-632	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000										
Brasil/2002/USP-01	0,0051	0,0051	0,0051	0,0051	0,0034	0,0034	0,0034	0,0034	0,0051	0,0051	0,0051	0,0034	0,0034									
Cepa-UL23	0,0034	0,0034	0,0034	0,0034	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0034	0,0034	0,0034	0,0017	0,0017	0,0051								
Peru/2008/USP-81	0,0034	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0034	0,0034	0,0034	0,0017	0,0017	0,0051	0,0034							
CEO-vacuna-Europa	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0034	0,0017	0,0017						
Nobilis-ILT_vacuna	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0034	0,0017	0,0017	0,0000					
P1369-TK-UFMG/Brasil	0,0000	0,0034	0,0034	0,0034	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0034	0,0034	0,0034	0,0017	0,0017	0,0051	0,0034	0,0034	0,0017	0,0017				
Sharkia-11	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0034	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0017			
CEO-vacuna-Fort-Dodge-UL24	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0034	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0017	0,0000		

Mayor similitud para cepas muestrales en verde y para control positivo en celeste.

## CAPÍTULO 6

### 6. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES PARA LA INVESTIGACIÓN REALIZADA



La investigación realizada permitió detectar la presencia de NDV, IBV e ILTV en granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Tungurahua directamente a partir de hisopos laringotraqueales y muestras de tráquea, oviducto y tonsilas cecales. La detección se realizó gracias a la amplificación de las regiones conservadas de cada uno de los virus: región 5'UTR para IBV, gen M para NDV e ICP4 y TK para ILTV. Sin embargo, la caracterización molecular mediante técnicas de PCR para las regiones hipervariables sólo fue posible para el IBV. Se infirió a partir de las 16 secuencias parciales del gen S1 del IBV que, las secuencias encontradas pertenecen al genotipo GI. Además, se consideró que 12 de estas secuencias eran homólogas a las cepas vacunales (tipo Mass y tipo 4/91) utilizadas en la zona de estudio. No obstante, las cuatro secuencias restantes de IBV, las 46 secuencias de NDV y las tres de ILTV encontradas en esta investigación, podrían estar vinculadas al uso de las vacunas o podrían estar relacionadas a cepas de campo.

En este punto es importante mencionar que los estudios de caracterización molecular tanto de IBV, como NDV e ILTV suelen considerar aislamientos tomados a partir de brotes de las enfermedades (Alvarado y col., 2005; Felipe y col., 2010; Kim y col., 2006; Marandino, 2013; Ayala y col., 2014). Los virus de IBV, NDV y ILTV, como parte del complejo respiratorio, desarrollan signos clínicos respiratorios que no son patognomónicos pero que en conjunto con otros indicativos clínico-patológicos permiten realizar diagnósticos presuntivos o monitoreos pasivos (Brown y Bevins 2017; Cavanagh and Britton 2008; García y Spatz, 2020; OIE, 2021d). Debe

mencionarse que durante el periodo de muestreo ninguna granja reportó sospechas de brotes para BIA, EN o ILT. Según el reporte del sistema OIE-WAHIS durante los años 2020 y 2021 (período de muestreo del trabajo realizado) no se registraron brotes de BIA e ILTV en el Ecuador, pero si se reportaron 20 brotes de la EN (<https://wahis.woah.org/#/dashboards/qd-dashboard>).

En la presente investigación se realizó un muestreo epidemiológico de carácter activo y por ende, no estaba orientado a la búsqueda de aves con signos clínicos relacionados con las enfermedades estudiadas. Consecuentemente, la signología que presentaron las aves al momento del muestreo no contribuyó como dato orientativo, no pudiéndose hablar de un brote para ninguna de las tres enfermedades.

Cabe señalar que, de las diez granjas muestreadas que presentaron signos respiratorios (ronquidos, estornudos o estertores), todas fueron positivas a NDV, mientras que seis fueron positivas a NDV e IBV y sólo una a ILTV y NDV (Anexo 12). Tampoco debe olvidarse que los signos respiratorios pueden desarrollarse por la influencia de otros agentes patógenos (*Escherichia coli*, *Avibacterium paragallinarum*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* y *Ornithobacterium rhinotracheale*) o físicos (exceso de polvo y/o amoníaco) relacionados con el complejo respiratorio (Bande y col. 2017; Cavanagh y Gelb 2008). Además, las tres enfermedades estudiadas presentan en las aves ponedoras otros signos como, la disminución de la postura y/o alteraciones en la calidad de la

cáscara de los huevos (Brown y Bevins 2017; Guy y Garcia, 2008; Valencia, 2020). Sólo en una granja (U5244) se informó de la disminución de la postura y resultó positiva a ILTV y NDV (Anexo 12). Además, tres granjas comunicaron mortalidades superiores al 10% (U5243, U5244 y U5255); siendo positivas dos de ellas a NDV e ILTV (U5244 y U5255) (Anexo 12). No obstante, es importante considerar que en el caso particular de NDV, las aves aún bien vacunadas pueden infectarse con cepas diferentes a la vacunal y no presentar signos clínicos (Absalón y col., 2019). En contraposición, las aves pueden presentar signos respiratorios generados mayormente por infecciones bacterianas secundarias que enmascaran a los agentes primarios, IBV o ILTV (Acevedo-Beras, 2017; Guy y Garcia, 2008; Valencia, 2020).

Lo que se puede deducir del análisis de signos clínicos y porcentajes de mortalidad en las granjas muestreadas es que, los programas de vacunación múltiples aplicados contra IBV y NDV en la provincia de Tungurahua serían eficaces en la prevención de las enfermedades clínicas (Bello y col., 2018). A pesar de lo expresado, dichos esquemas de vacunación, no estarían impidiendo la multiplicación y excreción del NDV, mientras que para IBV podrían contribuir con la generación de cepas variantes de IBV (Bello y col., 2018; Brown y Bevins 2017; Quinteros y col., 2016).

Efectivamente, se conoce que la cepa La Sota del NDV tiene el potencial de volverse virulenta, se excreta en las heces y está presente en las aves sin que estas manifiesten signos clínicos o problemas productivos (Bello y col., 2018; Brown y Bevins 2017). Justamente, se determinó mediante

análisis de similitud nucleotídica realizado entre seis vacunas comerciales contra NDV y la secuencia de la cepa La Sota que, las vacunas usadas en Tungurahua son cepas homólogas a La Sota. La replicación de estas cepas vacunales podría estar reflejada en las lesiones macroscópicas compatibles con la EN presentes en el 25% de granjas muestreadas y en la amplificación del gen M del NDV a partir de muestras provenientes de 46 de las 47 granjas analizadas. Pese a ello, al no haberse logrado amplificar el gen F se infirió la presencia de cepas de NDV con alguna variación genética. Consecuentemente, como los calendarios vacunales contra NDV se deberían establecer de acuerdo con la cepa endémica circulante, se requiere hacer estudios de secuenciación del genoma completo del virus para determinar con exactitud el tipo de cepa circulante (Roy 2012). Mientras tanto, se podría recomendar el uso de la cepa B1 (no origina reacciones post-vacunales) o vacunas recombinantes (no se excretan, ni revierten en virulencia) (Bello y col., 2018; Brown y Bevins 2017).

Por su parte, a pesar de la alta capacidad de mutación del IBV, se considera que la propagación de una cepa de un país a otro se debe mayormente a la introducción del virus a través de vacunas vivas e inclusive se destaca que la tasa de mutación encontrada en aislamientos provenientes de aves vacunadas es superior a las tasa encontrada en aves no vacunadas (Montassier, 2010). Las cepas variantes del IBV están en constante evolución no sólo por las mutaciones propias de los virus ARN, sino porque las mismas vacunas utilizadas para el control contribuyen a generar nuevas cepas ya sea

por la reversión a la virulencia o por favorecer la selección de otra cepa (Dolz y col., 2008; Guzmán e Hidalgo, 2020). Por esas razones, la OIE (2018) recomienda la vacunación contra IBV con la cepa Massachusetts, aunque se pueden emplear cepas variantes cuando se tiene conocimiento de su existencia en el país. Por ello, en los programas vacunales contra IBV aplicados en la provincia de Tungurahua se debería continuar solo con la utilización de vacunas comerciales que incluyan las cepas tipo Mass y 4/91, con las cuales doce secuencias del presente trabajo tuvieron relación filogenética.

Resulta importante recordar se debe evaluar y monitorear la introducción de vacunadas tipo 4/91 en las granjas donde no ha sido detectada. Se considera que la mayor propagación de cepas específicas de IBV es consecuencia del uso de vacunas vivas atenuadas (Valastro y col., 2016). En particular, la cepa 4/91 al introducirse en una zona interactúa con virus de campo y podría derivar en la generación nuevas cepas (Guzmán y col., 2019). No obstante, la vacuna 4/91 se ha empezado a aplicar en diferentes países incluso cuando la variante no se había descrito previamente (Guzmán y col., 2019). Esto sucede porque se ha demostrado que la utilización de dos vacunas con cepas heterólogas contribuye a producir anticuerpos neutralizantes de diferentes cepas de campo y la combinación Mass con 4/91 ha reportado buenos resultados (Malo y col., 1998). Una vez introducida la cepa 4/91 bajo el concepto de inmunización mencionado, no es recomendable

retirlarla de los calendarios vacunales porque las cepas de campo heterólogas continúan circulando y se podrían generar brotes (Guzmán e Hidalgo, 2020).

Del mismo modo, no sería recomendable la introducción de cepas variantes nuevas, lo que incluye a la cepa Q1, con la que cuatro secuencias de la investigación estuvieron relacionadas. Esto considerando que, son necesarios estudios donde se incluya todo el gen S, con el objetivo de identificar de manera precisa el origen de las secuencias y evitar la generación de cepas emergentes debido a la recombinación viral (Bhuiyan y col., 2021; Cook y col., 2012; Montassier, 2010; Quinteros y col., 2016). Igualmente, no debe olvidarse que la aparición de determinadas cepas en un país puede originarse en el uso de vacunas vivas no autorizadas (Felippe y col., 2010). En Brasil, durante los años 2003 a 2009 el virus tipo Massachusetts era el único que se usaba en la vacuna viva; pero se encontraron aislamientos de este período relacionados con las cepas Arkansas y Connecticut debido al uso de vacunas vivas no autorizadas (Felippe y col., 2010). Con ello, se destaca el rol humano en la diseminación de cepas (Felippe y col., 2010; Guzmán e Hidalgo, 2020). Adicionalmente, se ha demostrado que el proceso de atenuación para obtener una vacuna viva podría generar patrones de mutación heterogéneos que se constituyen en diferentes puntos iniciales para la evolución de la cepa empleada en la vacuna viva (Oade y col., 2019). Por este motivo, se puede tener diferentes subpoblaciones dentro de vacunas comerciales con la misma cepa (van Santen y Toro, 2009).

También debe mencionarse que aunque las muestras utilizadas fueron tomadas en diferentes clústeres de muestreo, todas las explotaciones muestreadas correspondían a la misma provincia. Inclusive debido a la cercanía entre las granjas de Tungurahua conviene considerarlas como una unidad epidemiológica (AGROCALIDAD, 2021a). Las secuencias en el árbol filogenético no se agruparon de ninguna manera particular relacionada con su presentación en un determinado cantón. Por lo que, no se puede hablar de algún patrón geográfico. Además, debido a que no existen secuencias previas del IBV reportadas en Ecuador, no fue posible realizar una comparación, quedando como un apartado pendiente para futuras investigaciones.

Con relación a ILT, aunque los signos clínicos encontrados en las tres granjas positivas a ILTV podrían ser orientativos, no se consideraron suficientes para hablar de la presencia de la enfermedad como tal. Además, en el trabajo realizado no fue factible establecer el origen de las cepas a través del análisis del gen TK. Por lo tanto, al no encontrarse indicativos clínicos ni moleculares suficientes para determinar el origen del ILTV detectado, es necesario utilizar otras técnicas moleculares como NGS. Debe mencionarse que, las cepas circulantes del ILTV en todo el mundo han cambiado de tipo salvaje a cepas virulentas relacionadas con la vacuna, es decir, las vacunas tipo CEO contra ILTV constituyen frecuentemente la fuente principal de los brotes de ILT (Menendez y col., 2014). Por esta razón, se debería continuar con el uso exclusivo de las vacunas recombinantes autorizadas por el

organismo de control (AGROCALIDAD) en la provincia de Tungurahua (AGROCALIDAD, 2012).

Finalmente, aunque el trabajo realizado constituye el primer estudio de caracterización molecular realizado con cepas de IBV encontradas en gallinas de postura comercial de la provincia de Tungurahua, son necesarios estudios complementarios no sólo para IBV, sino para NDV e ILTV. Con ello, se realizaría un control mediante vacunación más eficiente, sobre todo porque la interacción entre estos patógenos es sinérgica y determina posteriormente la gravedad del complejo respiratorio y la generación de serios problemas económicos (Hadipour y col., 2011). Además, para la generación de programas vacunales con nuevas cepas deberán considerarse también estudios relacionados con la dinámica del virus de la vacuna atenuada en el ambiente y estimarse los recursos institucionales y comunicacionales necesarios para la correcta introducción de nuevas vacunas en la zona de estudio (Felippe y col, 2010; Liu y col., 2009b).

## CAPÍTULO 7

### 7. BIBLIOGRAFÍA



1. Abro S. 2013. Molecular Characterization and Detection of Infectious Bronchitis Virus. Thesis Doctoral. Swedish University of Agricultural Sciences. 2013.
2. Absalón A, Cortés-Espinosa D, Lucio E, Miller P, Afonso C. Epidemiology, control, and prevention of Newcastle disease in endemic regions: Latin America. Tropical Animal Health and Production. 2019; 51:1033–1048.
3. Acevedo-Beiras, A. Bronquitis infecciosa aviar: diagnóstico y control. REDVET-Revista Electrónica de Veterinaria. 2010; 11(3):1–23.
4. Acevedo-Beiras, A. Virus de la bronquitis infecciosa: un desafío para la avicultura. Revista de Salud Animal. 2017; 39(3):1–13.
5. Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD). Plan de Atención Emergente de Laringotraqueitis Infecciosa Aviar - Resolución 085. 2012. [Online]. <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/a3.pdf>. Accessed 11 may 2020.
6. Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD). Programa Nacional Sanitario Avícola-Dirección de Sanidad Animal: Programas Específicos. 2013. [Online]. <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/a1.pdf>. Accessed 18 may 2020.
7. Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD). Estrategia para la implementación de compartimientos libres de Influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP) y la enfermedad de Newcastle (Nc) - Resolución 0135. 2021a. [Online]. <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2021/08/135-Estrategia-Compartimentacion-avicolaCM.pdf>. Accessed 12 august 2021.
8. Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD). Instructivo para el registro de biológicos. 2021b. [Online]. <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2021/04/Anexo-B-Biologicos-.pdf>. Accessed 15 april 2021.

9. Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD). Listado de cepas vacunales registradas ante la Agencia. 2022. [Online]. <https://www.bing.com/ck/a?!&&p=40f9f82db4f7f61cc32c7209a24ac7d87d1847334c792b2e0c96cb5ac6c5a12cJmltdHM9MTY1NTEyMjQzNiZpZ3VpZD0xMmRIN2UzNS00MjZhLTQ1MTctOGUzZS1kZDBiZDBIMmE0ZjUm aW5zaWQ9NTEyOQ&pfn=3&fclid=4c018656-eb12-11ec-b00d-80843e13383e&u=a1aHR0cHM6Ly93d3cuYWdyb2NhbGkYWQuZ29iLmVjL3dwLWNvbnRlbnQvdXBsb2Fkcy8yMDIxLzA3L0xpc3RhZG9fQ2VwYXNfUmVnaXN0cmFkYXNfQWdyb2NhbGkYWQueGxzeA&ntb=1>. Accessed 11 april 2022.
10. Armesto M, Evans S, Cavanagh D, Abu-Median A, Keep S, Britton P. A recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene belonging to the 4/91 serotype. *PLoS One*. 2011; 6(8): e24352.
11. Ahmadi E, Pourbakhsh S, Ahmadi M, Talebi A. Pathotypic characterization of the Newcastle disease virus isolated from commercial poultry in Northwest Iran. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2014; 38(4):383–387.
12. Aillón M. Propuesta e implementación de un proyecto comunitario que se dedicará a la crianza, producción y comercialización avícola en la parroquia de Ascázubi. Tesis previa a la obtención del título Ingeniera en contabilidad y auditoría-Contadora pública autorizada. Escuela de Contabilidad y Auditoría, Universidad Central del Ecuador. 2012.
13. Alexander D, Senne D. Newcastle Disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. En: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK Diseases of poultry. 12va. Edición. Iowa, Estados Unidos, Iowa State University Press, 2008. p. 75–116.
14. Alvarado IR, Villegas P, Mossos N, Jackwood MW. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Colombia during 2003. *Avian Disease*. 2005; 49(4):494-499.

15. Al-Jallad T, Kassouha M, Salhab M, Alomar A, Al-Masalma M, Abdelaziz F. Molecular characterization of isolated infectious bronchitis viruses from affected vaccinated broiler flocks in Syria. BMC Veterinary Research. 2020; 16(1):1–8.
16. Ammayappan A, Upadhyay C, Gelb J, Vakharia VN. Complete genomic sequence analysis of infectious bronchitis virus Ark DPI strain and its evolution by recombination. Virology Journal. 2008; 5:1–7.
17. Aston E, Jordan B, Williams S, García M, Jackwood M. Effect of pullet vaccination on development and longevity of immunity. Viruses. 2019; 11(2):1-18.
18. Ayala S, Revelo M, Barragán V, Chiriboga J, Torres A, Santiana I, Trueba G. Detection and characterization of infectious Laryngotracheitis virus from an outbreak of respiratory disease in Ecuador. Journal of Applied Research in Veterinary Medicine. 2014; 12(3):245–248.
19. Bagust T, Jones R, Guy J. Avian infectious laryngotracheitis. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2000; 19(2):483–492.
20. Bande F, Arshad S, Omar A, Bejo M, Abubakar M, Abba M. Pathogenesis and diagnostic approaches of avian infectious bronchitis. Advances in Virology. 2016; (2016): 1-11.
21. Bande F, Arshad SS, Omar AR, Hair-Bejo M, Mahmuda A, Nair V. Global distributions and strain diversity of avian infectious bronchitis virus: a review. Animal Health Research Reviews. 2017; 18(1):70–83.
22. Bello M, Yusoff K, Ideris A, Hair-Bejo M, Peeters B, Omar A. Diagnostic and vaccination approaches for Newcastle disease virus in poultry: the current and emerging perspectives. BioMed Research International. 2018; (2018):1-18.
23. Bermudez A. Introduction. En: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK. Diseases of poultry. 12va. Edición. Iowa, Estados Unidos, Iowa State University Press, 2008, p. 3–46.

24. Bhuiyan M, Amin Z, Bakar A, Saallah S, Yusuf N, Shaarani SM, Siddiquee S. Factor influences for diagnosis and vaccination of avian infectious bronchitis virus (Gammacoronavirus) in chickens. Veterinary Sciences. 2021; 8(47): 2-25.
25. Bolivar A, Rojas A, Garcia-Lugo P. PCR y PCR-Múltiple parámetros críticos y protocolo de estandarización. Avances en Biomedicina. 2014; 3(1): 25–33.
26. Brown V, Bevins S. A review of virulent Newcastle disease viruses in the United States and the role of wild birds in viral persistence and spread. Veterinary Research. 2017; 48(68): 1-15.
27. Callison S, Hilt D, Boynton T, Sample B, Robison R, Swayne D, Jackwood M. Development and evaluation of a Real-Time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. Journal of Virological Methods. 2006; 138(1–2):60–65.
28. Cardoso C. 2020. Infectious Bronchitis Virus Affects Energy Production-Research Outreach. [Online]. <http://reasearoutreach.org/articles/infectious-bronchitis-virus-affects-energy-production/>). Accessed 11 october 2021.
29. Cattoli G, Susta L, Terregino C, Brown C. Newcastle Disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2011; 23(4):637–56.
30. Cavanagh D, Britton P. Coronaviruses: General Features. En: Mahy B, Van Regenmortel M Encyclopedia of Virology. California, Estados Unidos, Academic Press, 2008, p. 549-554.
31. Cavanagh D. Infectious Bronchitis. En: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK. Diseases of poultry. 12va. Edición. Iowa, Estados Unidos, Iowa State University Press, 2008, p. 117–35.
32. Chávez A. Infectious Bronchitis Virus. En: Alfen NV. Encyclopedia of Agriculture and Food Systems. San Diego, USA, Ed Elsevier, 2014, p. 504–520.

33. Choi KS. Newcastle disease virus vectored vaccines as bivalent or antigen delivery vaccines. Clinical and Experimental Vaccine Research. 2017; 6(2):72–82.
34. Chowdhary M, Nashiruddullah N, Abrol R, Sood S, Rahman S, Ahmed J, Maqbool R. Newcastle Disease and their pathology in fowls affected with genotype XIII and Pigeons with Genotype II. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2020; 9: 3800-3810.
35. Colvero L, Villarreal L, Torres C, Brañdo P. Assessing the economic burden of avian infectious bronchitis on poultry farms in Brazil. OIE Revue Scientifique et Technique. 2015; 34(3):993–99.
36. Cook J, Jackwood M, Jones R. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. Avian Pathology. 2012; 41(3): 239-250.
37. Cornejo A, Rendón S, Rocha M. PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa. En: INECC-Semarnat, Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, México, México, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2014, p. 53–75.
38. Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador (CONAVE). Importancia de la producción avícola en el contexto nacional. Maíz y Soya. 2020a, [Online] <https://maizsoya.com/lector.php?id=20200585&tabla=articulos>.
39. Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador (CONAVE). Cada año en Ecuador aumenta consumo de pollo y huevos. Maíz y Soya, 2020b. [Online] <https://maizysoya.com/lector.php?id=202005488&tabla=articulos>.
40. Craig M, Rojas M, van der Ploeg C, Olivera V, Vagnozzi A, Pérez A, König G. Molecular characterization and cluster analysis of field isolates of avian infectious laryngotracheitis virus from Argentina. Frontiers in Veterinary Science. 2017; 4(DEC):1–7.
41. Creelan J, Calvert V, Graham D, McCullough S. Rapid detection and characterization from field cases of infectious laryngotracheitis virus by Real-Time polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. Avian Pathology. 2006; 35(2):173–79.

42. Cumming R. Studies on australian infectious bronchitis virus. IV. Apparent Farm-to-Farm Airborne Transmission of Infectious Bronchitis Virus. Avian Diseases. 1970; 14(1):191–95.
43. Davison S, Gingerich E, Casavant S, Eckroade R. Evaluation of the efficacy of a live Fowlpox-Vectored infectious laryngotracheitis/avian encephalomyelitis vaccine against ILT viral challenge. Avian Diseases. 2006; 50(1):50–54.
44. Deem S, Cruz M, Higashiguchi J, Parker P. Diseases of poultry and endemic birds in Galapagos: implications for the reintroduction of native species. Animal Conservation. 2012; 15(1):73–82.
45. Dhama K, Singh S, Barathidasan R, Desingu P, Chakraborty S, Tiwari R, Kumar M. Emergence of avian infectious bronchitis virus and its variants need better diagnosis, prevention and control strategies: a global perspective. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2014; 17(6):751–67.
46. Diel D, Susta L, Cardenas-Garcia S, Killian M, Brown C, Miller P, Afonso C. Complete genome and clinicopathological characterization of a virulent Newcastle disease virus isolate from South America. Journal of Clinical Microbiology. 2012; 50(2):378–87.
47. Dimitrov K, Abolnik C, Afonso C, Albina E, Bahl J, Berg M, Briand F, Brown I, Choi K, Chvala I, Diel D, Durr P, Ferreira H, Fusaro A, Gil P, Goujgoulova G, Grund C, Hicks J, Joannis T, Torchetti M, Kolosov S, Lambrecht B, Lewis N, Liu H, Liu H, McCullough S, Miller P, Monne I, Muller C, Munir M, Reischak D, Sabra M, Samal S, Servan de Almeida R, Shittu I, Snoeck C, Suarez D, Van Borm S, Wang Z, Wong F. Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. Infection, Genetics and Evolution. 2019; 74(April):103917.
48. Dolz R, Pujols J, Ordóñez G, Porta R, Majó N. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus in Spain over a fourteen-year period. Virology. 2008; 374(1):50–59.

49. Dufour-Zavala L. Epizootiology of infectious laryngotracheitis and presentation of an industry control program. Avian Diseases. 2008; 52(1):1–7.
50. Eldemery F, Li Y, Yu Q, van Santen V, Toro H. Infectious bronchitis virus S2 of 4/91 expressed from recombinant virus does not protect against Ark-type challenge. Avian Diseases. 2017; 61(3):397-401.
51. Esaki M, Noland L, Eddins T, Godoy A, Saeki S, Saitoh S, Yasuda A, Dorsey K. Safety and efficacy of a turkey herpesvirus vector Laryngotracheitis vaccine for chickens. Avian Diseases. 2013; 57(2):192–198.
52. Fakhri O, Hartley C, Devlin J, Browning G, Noormohammadi A, Lee S. Development and application of high-resolution melting analysis for the classification of infectious Laryngotracheitis virus strains and detection of recombinant progeny. Archives of Virology. 2019; 164(2):427–38.
53. Farrell, D. Función de las aves de corral en la nutrición humana- Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2013 [Online]. <https://www.fao.org/3/i353s/i3531s02.pdf>. Accessed 19 may 2022.
54. Farsang A, Ros C, Renström L, Baule C, Soós T, Belák S. Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain. Avian Pathology. 2002; 31(3):229–236.
55. Felipe P, da Silva L, Santos M, Spilki F, Arns C. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. Avian Disease. 2010; 54(4):1191-6.
56. Feng K, Wang F, Xue Y, Zhou Q, Chen F, Bi Y, Xie Q. Epidemiology and characterization of avian infectious bronchitis virus strains circulating in Southern China during the period from 2013-2015. Scientific Reports. 2017; 7(1):1–11.

57. Firouzmandi M, Moeini H, Hosseini D, Bejo M, Omar A, Mehrbod P, Ideris A. Improved immunogenicity of Newcastle disease virus inactivated vaccine following DNA vaccination using Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase and fusion protein genes. Journal of Veterinary Science. 2016; 17(1):21–26.
58. Ganar K, Das M, Sinha S, Kumar S. Newcastle disease virus: current status and our understanding. Virus Research. 2014; 184:71–81.
59. García M, Spatz S. Infectious Laryngotracheitis. En: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL, de Wit S, Grimes T, Johnson D, Kromm M, Prajitrno Y, Rubinoff I, Zavala D. *Diseases of Poultry*. 14va. Edición, New Jersey, Estados Unidos, John Wiley & Sons, Inc., 2020, p. 189–209.
60. García W. Detección de Bronquitis Infecciosa Aviar mediante diagnóstico molecular en aves de traspatio. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador. 2016.
61. Garrido A, Barrionuevo M, Santiana I, Sandoval P, Alfonso P, Barrera M. 2016. Serologic and molecular survey of Avian Infectious Laryngotracheitis in Ecuador. Ecuador es calidad: Revista Científica Ecuatoriana. 2016; 3(1): 43-51.
62. Giner A. 2011. Bronquitis Infecciosa Aviar, desarrollo de una nueva vacuna. *Selecciones Avícolas*. 2011; Agosto. [Online]. <https://seleccionesavicolas.com/avicultura/2011/08/bronquitis-infecciosa-aviar.-desarrollo-de-una-nueva-vacuna>.
63. Gowthaman V, Kumar S, Koul M, Dave U, Murthy TRGK, Munuswamy P, Tiwari R, Karthik K, Dhama K, Michalak I, Joshi S. Infectious Laryngotracheitis: etiology, epidemiology, pathobiology, and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. Veterinary Quarterly. 2020; 40(1):140–161.

64. Granzow H, Klupp B, Fuchs W, Veits J, Osterrieder N, Mettenleiter T. Egress of Alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. Journal of Virology. 2001; 75(8):3675–84.
65. Grimes E. 2002. Newcastle Disease Virus: Classification and important viral proteins. A basic Laboratory Manual for the small-scale production and testing of I-2 Newcastle disease vaccine. FAO-APHCA. [Online]. <https://www.fao.org/3/AC802E/ac802e00.htm#Contents>. Accessed 15 april 2022.
66. Guevara V, Salazar E. Determinación de anticuerpos séricos contra Newcastle en aves de pelea de veinte criaderos ubicados en la ciudad de Riobamba. Tesis de grado como requisito para obtener el Título de Médico Veterinario Zootecnista, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador. 2013.
67. Guy J, Bagust T. Laryngotracheitis. En: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE. Diseases of Poultry. 11va. Edición. Georgia, Estados Unidos, Blackwell Publishing Company, 2003, p. 121–127.
68. Guy J, Barnes H. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage. Avian Disease. 1991; 35(2):348–55.
69. Guy J, Garcia M. Laryngotracheitis. En: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE. Diseases of Poultry. 11va. Edición. Georgia, Estados Unidos, Blackwell Publishing Company, 2008, p. 137-152.
70. Guzmán M, Hidalgo H. Live attenuated infectious bronchitis virus vaccines in poultry: modifying local viral populations dynamics. Animals (Basel). 2020; 10(2058): 1-9.
71. Hadipour M, Habibi G, Golchin P, Hadipourfard M, Shayanpour N. The role of avian influenza, Newcastle disease and infectious bronchitis viruses during the respiratory disease outbreak in commercial broiler farms of Iran.

- International Journal of Animal and Veterinary Advances. 2011; 3(2): 69-70.
72. Halvorson D. Biosecurity on a multiple-age egg production complex: a 15-year experience. Avian Diseases. 2011; 55(1):139–142.
73. Han M, Kweon C, Mo I, Kim S. Pathogenicity and vaccine efficacy of a thymidine kinase gene deleted Infectious Laryngotracheitis virus expressing the green fluorescent protein gene. Archives of Virology. 2002; 147(5):1017–1031.
74. Hernández M, Tomás G, Marandino A, Panzera Y, Hernández D, Villegas P, Banda A, Pérez R. Desarrollo de tecnología diagnóstica en Sanidad Aviar para la detección y caracterización de los virus de la Bronquitis Infecciosa y de Gumboro. 2012. [Online]. Sitio Argentino de Producción. [https://produccion-animal.com.ar/produccion\\_aves/enfermedades\\_aves/18-diagnostica.pdf](https://produccion-animal.com.ar/produccion_aves/enfermedades_aves/18-diagnostica.pdf). Accessed 12 de julio de 2021.
75. Hernandez-Divers S, Villegas P, Prieto F, Unda J, Stedman N, Ritchie B, Carroll R, Hernandez-Divers S. A survey of selected avian pathogens of backyard poultry in Northwestern Ecuador. Journal of Avian Medicine and Surgery. 2006; 20(3):147–158.
76. Hidalgo H. 2003. Infectious Laryngotracheitis: A Review. Brazilian Journal of Poultry Science. 2003; 5(3):157–68.
77. Hoang D, Chernomor O, von Haeseler A, Minh B, Vinh L. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. Mol Biol Evol. 2018; 35(2): 518-522.
78. Hodgson T, Casais R, Dove B, Britton P, Cavanagh D. Recombinant infectious bronchitis coronavirus Beaudette with the spike protein gene of the pathogenic M41 strain remains attenuated but induces protective immunity. Journal of Virology. 2004;78(24):13804-13811.
79. ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses. 2021. Taxonomy-Master Species List. [Online]. <https://ictv.global/taxonomy/>.

80. Ignjatovic J, Sapats S. Avian Infectious Bronchitis Virus. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics). 2000; 19(2):493–508.
81. Instituto Geográfico Militar. Descarga de Información Educativa-Láminas Educativas-Mapa Político del Ecuador. [Online]. 2009. <https://www.geoportaligm.gob.ec/portal/index.php/descargas/geoinformacion/>.
82. Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). Aves planteles avícolas\_nac2015. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC). 2015. [Online]. <https://anda.inec.gob.ec/anda/index.php/catalog/750/download/14283>.
83. JackWood M, de Wit S. Infectious bronchitis. En: Swayne E, Boulianne M, Logue C, McDougald L, Nair V, Suarez D, de Wit S, Grimes T, Johnson D, Kromm M, Prajitno Y, Rubinoff I, Zavala D. Diseases of Poultry. 14va. Edición. New Jersey, Estados Unidos, John Wiley & Sons, Inc., 2020. p. 167–188.
84. Jackwood M. Review of Infectious Bronchitis Virus around the world. Avian Diseases Digest. 2012; 56(4):634–641.
85. Jones R. Respiratory Viral Diseases – Lessons to Be Learned? International Poultry Production. 2004; 12(4):11–13.
86. Jordan B. Vaccination against Infectious Bronchitis Virus: a continuous challenge. Veterinary Microbiology. 2017; 206:137–143.
87. Kalyaanamoorthy S, Minh B, Wong T, von Haeseler A, Jermini L. ModelFinder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates. Nature Methods. 2017; 14(6):587–589.
88. Kang Y, Xiang B, Yuan R, Zhao X, Feng M, Gao P, Li Y, Li Y, Ning Z, Ren T. Phylogenetic and pathotypic characterization of Newcastle disease viruses circulating in South China and transmission in different birds. Frontiers in Microbiology. 2016; 2016(7): 1-13.

89. Keeler C, Reed K, Nix W, Gelb J. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. Avian Diseases. 1998; 42(2):275–84.
90. Keep S, Sives S, Stevenson-Leggett P, Britton P, Vervelde L, Bickerton E. Limited cross-protection against Infectious Bronchitis provided by recombinant Infectious Bronchitis viruses expressing heterologous spike glycoproteins. Vaccines (Basel). 2020; 8(2):1-19.
91. Kim L, Afonso C, Suarez D. Effect of probe-site mismatches on detection of virulent Newcastle disease viruses using a fusion-gene Real-Time reverse transcription polymerase chain reaction test. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2006; 18:519–28.
92. Kim L, King D, Curry P, Suarez D, Swayne D, Stallknecht D, Slemons R, Pedersen J, Senne D, Winker K, Afonso C. Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. Journal of Virology. 2007; 81(22):12641–12653.
93. Kim L, Suarez D, Afonso D. Detection of a broad range of class I and II Newcastle disease viruses using a multiplex Real-Time reverse transcription polymerase chain reaction assay. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2008a; 20:414–25.
94. Kim L, King D, Guzman H, Tesh R, Travassos Da Rosa A, Bueno R, Dennett J, Afonso C. Biological and phylogenetic characterization of pigeon paramyxovirus serotype 1 circulating in wild North American pigeons and doves. Journal of Clinical Microbiology. 2008b; 46(10):3303–3310.
95. Kim S, Samal S. Newcastle Disease Virus as a vaccine vector for development of human and veterinary vaccines. Viruses. 2016; 8(7):183.
96. Lee S, Markham P, Markham J, Petermann I, Noormohammadi A, Browning G, Ficorilli N, Hartley C, Devlin J. First complete genome

- sequence of infectious Laryngotracheitis virus. BMC Genomics. 2011; 12:197.
97. Legnardi M, Tucciarone C, Franzo G, Cecchinato M. Infectious Bronchitis Virus evolution, diagnosis and control. Veterinary Sciences. 2020; 7(2):1–18.
98. Linares J, Bickford A, Cooper G, Charlton B, Woolcock P. An outbreak of infectious Laryngotracheitis in California broilers. Avian Diseases. 1994; 38(1):188–92.
99. Liu L, Benyeda Z, Zohari S, Yacoub A, Isaksson A, Leijon M, Leblanc N, Benyeda J, Belák J. Assessment of preparation of samples under the field conditions and a portable Real-Time RT-PCR assay for the rapid on-site detection of Newcastle disease virus. Transboundary and Emerging Diseases. 2016; 63(2):245–250.
100. Liu S, Zhang X, Wang Y, Li C, Liu Q, Han Z, Zhang Q, Kong X, Tong G. Evaluation of the protection conferred by commercial vaccines and attenuated heterologous isolates in China against the CK/CH/LDL/971 strain of infectious bronchitis coronavirus. Vet J. 2009a; 179(1):130-136.
101. Liu S, Zhang X, Wang Y, Li C, Han Z, Shao Y, Li H, Kong X. Molecular characterization and pathogenicity of infectious bronchitis coronaviruses: complicated evolution and epidemiology in China caused by cocirculation of multiple types of infectious bronchitis coronaviruses. Intervirology. 2009b; 52(4):223-234
102. Loncoman C, Hartley C, Coppo M, Vaz P, Diaz-Méndez A, Browning G, Lee S, Devlin J. Development and application of a TaqMan single nucleotide polymorphism genotyping assay to study infectious laryngotracheitis virus recombination in the natural host. PLoS One. 2017; 12(3):e0174590.
103. MacLachlan J, Dubovi EJ. 2017. Paramyxoviridae and Pneumoviridae. En: MacLaachlan J, Dubovi E. Fenner's Veterinary Virology. 5ta. Edición. Boston, London, Elsevier-Academic Press, 2017, p. 327–56.

104. Mahgoub K, Bassiouni A, Manal A, Rabie S. The prevalence of Infectious Bronchitis (IB) in some chicken farms in Egypt: I. Spotlight on the status of IB outbreaks in some chicken flocks. Journal of Veterinary Medical Research. 2010; 20(1):324–41.
105. Maíz y Soya. 2017. Tungurahua, Centro Productor de Huevo de Mesa. [Online].  
<https://maizysoya.com/lector.php?id=20170307&tabla=articulos#:~:text=Las%20aves%20ponedoras%20son%20las%20que%20abastece%20n%20de,d%20a%20est%20a%20en%20la%20mesa%20de%20los%20ecuatorianos>. Accessed 21 de mayo de 2020.
106. Malo, A.; Orbell, S.; Huggins, M.; Woods, M.; Cook, J. Cross protection studies after the use of live- attenuated IBV vaccines Nobilis® IB 4-91 and Nobilis® IB Ma5 (Massachusetts type). Intervet VSD News. 1998; 5, 1–6.
107. Manzano E. Detección del virus de Newcastle en aves de traspatio mediante diagnóstico molecular en la parroquia de Puéllaro. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador. 2017.
108. Marandino A. Diagnóstico y caracterización genética del virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar en la industria avícola regional. Tesis de Maestría PEDECIBA Biología, Universidad de La República del Uruguay. 2013.
109. Marandino A, Pereda A, Tomás G, Hernández M, Iraola G, Craig M, Hernández D, Banda A, Villegas P, Panzera Y, Pérez R. Phylodynamic analysis of avian infectious bronchitis virus in South America. Journal of General Virology. 2015; 96(2015):1340–1346.
110. Menendez K, García M, Spatz S, Tablante NL. Molecular epidemiology of Infectious Laryngotracheitis: a review. Avian Pathology. 2014; 43(2):108–117.

111. Miller P, Decanini E, Afonso C. Newcastle Disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. Infection, Genetics and Evolution. 2010; 10(1):26–35.
112. Ministerio de agricultura y ganadería (MAG). 2011. Texto Unificado de Legislación Secundaria del MAG, Libro II. Ecuador: Registro Oficial Suplemento 1 de 20-mar-2003. [Online]. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu165574.pdf
113. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). 2021. Ecuador celebra el día nacional del huevo. [Online]. Retrieved: <https://www.agricultura.gob.ec/ecuador-celebra-el-dia-nacional-del-huevo/>. Accessed 20 may 2021.
114. Mo ML, Li M, Huang BC, Fan WS, Wei P, Wei TC, Cheng QY, Wei ZJ, Lang YH. Molecular characterization of major structural protein genes of avian coronavirus infectious bronchitis virus isolates in southern China. Viruses. 2013; 5(12):3007-3020.
115. Mohamed M, Kumar S, Paldurai A, Samal S. Sequence analysis of fusion protein gene of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in Egypt during 2006. Virology Journal. 2011; 8(1):237.
116. Montassier HJ. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus. Revista Brasileira de Ciencia Avícola. 2010; 12(2):87–96.
117. Morales G, Aycardi E, López LA, González E. Laringotraqueitis Infecciosa Aviar en Colombia: características y diagnóstico histopatológico. Revista ICA. 1971; 6(2):181–189.
118. Moreno R. La enfermedad de Newcastle y algunos avances recientes en diagnóstico. Ciencia Veterinaria. 1994; 6(1994):49–72.
119. Muñoz-Chamba W, Villacís G. Caracterización molecular y filogenética de cepas del virus de la enfermedad de Newcastle, aislado de zonas rurales del sur del Ecuador. CEDAMAZ Revista UNL. 2018; 7(1):39–53.

120. Murphy F, Gibbs P. Herpesvirus. En: Murphy F, Gibbs E, Horzinek M, Studdert M. *Veterinary Virology*. San Diego, Estados Unidos, Ed Elsevier, 2005, p. 302–309.
121. Nguyen L, Schmidt H, von Haeseler A, Minh B. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol*. 2015; 32(1):268-274.
122. Oade M, Keep S, Freimanis G, Orton R, Britton P, Hammond J, Bickerton E. Attenuation of infectious bronchitis virus in eggs results in different patterns of genomic variation across multiple replicates. *Journal of Virology*. 2019; 93(14):1-14.
123. Ogali I, Wamuyu L, Lichoti J, Mungube E, Agwanda B, Ommeh S. Molecular characterization of Newcastle disease virus from backyard poultry farms and live bird markets in Kenya. *International Journal of Microbiology*. 2018; 2018: 2368597.
124. Ojkic D, Swinton J, Vallieres M, Martin E, Shapiro J, Sanei B, Binnington B. Characterization of field isolates of infectious Laryngotracheitis virus from Ontario. *Avian Pathology*. 2006; 35(4):286–292.
125. Organización Mundial de Salud Animal (OIE). 2004. Manual of diagnostic test and vaccines for Terrestrial Animals: mammals, birds and bees. Biological Standards Commission, World Organization for Animal Health. [Online]  
[http://books.google.com.ar/books?redjr\\_esc=y&hl=es&id=xmZWAAAAYA AJ&focus](http://books.google.com.ar/books?redjr_esc=y&hl=es&id=xmZWAAAAYA AJ&focus). Accessed 22 may 2022.
126. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2012. Informe de notificación inmediata-referencia del Informe: Ref OIE: 12139, Fecha del informe: 20-07-2012, País: Ecuador. [En línea].  
[http://web.oie.int/wahis/reports/es\\_imm\\_0000012139\\_20120720\\_183415.pdf](http://web.oie.int/wahis/reports/es_imm_0000012139_20120720_183415.pdf).
127. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2018. Avian infectious bronchitis. OIE Terrestrial Manual. World Organization for Animal Health.

- [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.03.02\\_AI\\_B.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.02_AI_B.pdf). Accessed 19 may 2021.
128. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2020. Análisis-situación Bronquitis Infecciosa Aviar. [archivo PDF]. OIE-WAHIS-Retrieved March 11, 2021. Retrieved: <https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>. Accessed 11 march 2021.
129. Organización Mundial de Sanidad Animal OIE. 2021a. Enfermedad de Newcastle-Sanidad Animal en el mundo. [archivo PDF]. Retrieved: <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/enfermedad-de-newcastle/>. Accessed 20 june 2021.
130. Organización Mundial de Sanidad Animal OIE. 2021b. Newcastle Disease (Infection with Newcastle Disease Virus). [archivo PDF]. Retrieved: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/current/chapitre\\_nd.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_nd.pdf). Accessed 15 april2022.
131. Organización Mundial de Sanidad Animal OIE. 2021c. Infección por el Virus de la enfermedad de Newcastle. [Online]. Retrieved: ([https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahc/current/chapitre\\_nd.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_nd.pdf)). Accessed15 april 2022.
132. Organización Mundial de Sanidad Animal OI). 2021d. Avian Infectious Laryngotracheitis. [archivo PDF]. Manual Terrestre. Retrieved: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.03.03\\_AVIAN\\_INF\\_LARYNGO.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.03_AVIAN_INF_LARYNGO.pdf)). Accessed 20 may 2022.
133. Organización Mundial de Sanidad Animal OIE. 2022. Newcastle disease virus (Wild Birds) (Infection With). [Technical Disease Card]. Retrieved: <https://www.oie.int/app/uploads/2022/02/newcastle-disease-virus-wild-birdsinfection-with.pdf>. Accessed 17 april 2022.
134. Ou S, Giambrone J. Infectious Laryngotracheitis Virus in chickens world Journal of Virology. 2012; 1(5):142.

135. Panisello T, Giner A. 2010. Virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar “un enemigo cambiante”. Selecciones Avícolas, 2010; Agosto: 23–28 [Online]. <https://seleccionesavicolas.com/avicultura/2010/08/virus-de-la-bronquitis-infecciosa-aviar-un-enemigo-cambiante>
136. Parsons L, Bouwman K, Azurmendi H, de Vries R, Cipollo J, Verheije M. Glycosylation of the viral attachment protein of Avian Coronavirus is essential for host cell and receptor binding. Journal of Biological Chemistry. 2019; 294(19):7797–7809.
137. Pereira C, Saraiva G, Vidigal P, Fietto J, Bressan G, Moreira M, de Almeida M, Júnior A. Distribution of infectious bronchitis virus strains in different organs and evidence of vertical transmission in natural infection. Arch Virol. 2016; 161(12):3355-3363.
138. Piccirillo A, Lavezzo E, Niero G, Moreno A, Massi P, Franchin E, Toppo S, Salata C, Palú G. Full genome sequence-based comparative study of wild-type and vaccine strains of Infectious Laryngotracheitis Virus from Italy. Plos one. 2016; 11(2): e0149529.
139. Preis I, Brag JFV, Couto R, Brasil B, Martins N, Ecco R. Outbreak of Infectious Laryngotracheitis in large multiage. Pesquisa Veterinaria Brasileira. 2013; 33(5):591–596.
140. Quinteros J, Sang Won Lee, Markham P, Noormohammadi A, Hartley C, Leone A, Coppo M, Vaz P, Browning G. Full genome analysis of Australian infectious bronchitis viruses suggests frequent recombination events between vaccine strains and multiple phylogenetically distant Avian Coronaviruses of unknown origin. Veterinary Microbiology. 2016; 197:27–38.
141. Rafique S, Siddique N, Abbas M, Shah A, Sharif A, Naeem K. Isolation and molecular characterization of Infectious Bronchitis Virus (IBV) variants circulating in commercial poultry in Pakistan. Pakistan Veterinary Journal. 2018; 38(4):365–370.

142. Revelo M. Monitoreo serológico de Laringotraqueitis Aviar en granjas de la sierra norte del país con el uso de la prueba de ELISA. Tesis para obtener el grado de médico veterinario y zootecnista, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, 2009.
143. Ricks C, Avakian A, Bryan T, Gildersleeve R, Haddad E, Ilich R, King S, Murray L, Phelps P, Poston R, Whitfill C, Williams C. In ovo vaccination technology. Adv Vet Med. 1999; 41:495-515.
144. Rimondi A, Craig MI, Vagnozzi A, König G, Delamer M, Pereda A. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001-2008). Avian Pathol. 2009 Apr;38(2):149-53.
145. Roberts J, Chousalkar K. Infectious Bronchitis. En: Hester Y Egg Innovations and Strategies for Improvements. IN, Estados Unidos, Ed. Elsevier, 2017, p. 561–570
146. Rohaim M, El Naggar R, Abdelsabour M, Mohamed M, El-Sabagh I, Munir M. Evolutionary analysis of Infectious Bronchitis virus reveals marked genetic diversity and recombination events. Genes (Basel). 2020; 11(6):605.
147. Rovalino M. 2013. Estandarización de la técnica PCR en tiempo real para la detección del virus Influenza Tipo A en tejidos de Gallus. Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Medicina Veterinaria, Universidad San Francisco de Quito. 2013.
148. Roy P. Diagnosis and control NDV developing countries. World's Poultry Science Journal. 2012; 68:693–706.
149. Roy P, Venugopalan AT. Unexpected Newcastle disease virus in day old commercial chicks and breeder hen. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2005; 28(4):277–85.
150. Satharasinghe D, Murulitharan K, Tan S, Yeap S, Munir M, Ideris A, Omar A. Detection of Inter-Lineage natural recombination in avian paramyxovirus serotype 1 using simplified deep sequencing platform. Front Microbiol. 2016; 7:1907.

151. Seal B, King D, Bennett J. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. Journal of Clinical Microbiology. 1995; 33(10):2624–2630.
152. Seifi S, Boroomand Z. The role of avian metapneumovirus in respiratory complex disease circulating in broilers in Northern Iran. Trakia Journal of Sciences. 2015; 2: 175-179.
153. Selim K, Arafa A, Hussein H, El-Sanousi A. Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler and layer chicken farms in Egypt during 2012. Int J Vet Sci Med. 2013;1(2):102-108.
154. Servicio Agrícola Ganadero (SAG) de Chile. 2016. Bronquitis Infecciosa Aviar. (Ficha técnica). Retrieved: [https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/f\\_tecnica\\_bronq\\_infec\\_aviar\\_v2-2016.pdf](https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/f_tecnica_bronq_infec_aviar_v2-2016.pdf). Accessed 8 march 2020.
155. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria-Argentina (SENASA-AR). 2009. Manual para la prevención y el control de brotes de Laringotraqueitis Infecciosa Aviar. (archivo PDF) Retrieved: <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/file2821-laringotraqueitis-infecciosa.pdf>. Accessed 22 march 2022.
156. Shang J, Zheng Y, Yang Y, Liu C, Geng Q, Luo C, Zhang W, Li F. Cryo-EM structure of infectious bronchitis coronavirus spike protein reveals structural and functional evolution of coronavirus spike proteins. PLoS Pathog. 2018; 14(4): e1007009.
157. Simon-Loriere E, Holmes EC. Why do RNA viruses recombine? Nat Rev Microbiol. 2011; 9(8):617-626.
158. Sjaak de Wit J, Cook J, van der Heijden H. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. Avian Pathology. 2011; 40(3):223-235.

159. Soos C, Padilla L, Iglesias A, Gottdenker N, Bédon MC, Rios A, Parker PG. Comparison of pathogens in Broiler and backyard chickens on the Galápagos Islands: Implications for transmission to Wildlife. The Auk. 2008; 125(2):445–455.
160. Spatz S, Garcia M, Riblet S, Ross T, Volkening J, Taylor T, Kim T, Afonso C. MinION sequencing to genotype US strains of infectious laryngotracheitis virus. Avian Pathology. 2019; 48(3):255–269.
161. Stannard L. Paramyxoviruses. (página de internet). <http://www.virology.uct.ac.za/vir/teaching/linda-stannard/paramyxovirus>. Accessed 21 june 2022.
162. Taylor T, Miller P, Olivier T, Montiel E, Cardenas-Garcia S, Dimitrov K, Williams-Coplin D, Afonso C. Repeated challenge with virulent Newcastle disease virus does not decrease the efficacy of vaccines. Avian Diseases. 2017; 61(2):245–249.
163. The Center for Food Security and Public Health. 2010. Enfermedad de Newcastle. (archivo PDF). <https://www.cfsph.iastate.edu/diseaseinfo/?disease=newcastle-disease&lang=en>. Accessed 7 april 2021.
164. Thermo Fisher Scientific. 2021. PCR Troubleshooting Guide. [Online] Retrieved: <https://www.thermofisher.com/ar/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-troubleshooting.html>). Accessed 16 may 2022.
165. Thilakarathne D, Hartley C, Diaz-Méndez A, Coppo M, Devlin J. Development and application of a combined molecular and tissue culture-based approach to detect latent infectious laryngotracheitis virus (ILT) in chickens. J Virol Methods. 2020; 277:113797.
166. Valastro V, Holmes E, Britton P, Fusaro A, Jackwood M, Cattoli G, Monne I. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: an attempt to harmonize virus classification. Infect Genet Evol. 2016; 39:349-364.

167. Valencia B. Bronquitis Infecciosa: Soluciones Prácticas. VII Congreso Nacional de Avicultura AMEVEA-E. 2007, Conferencia, p. 12, Quito, Ecuador
168. Valencia B. Bronquitis Infecciosa. En: Valencia B Enfermedades más comunes de las aves. Quito, Ecuador, CONAVE, 2020, p. 31–42.
169. Valencia B. Newcastle. En: Valencia B Enfermedades más comunes de las aves. Quito, Ecuador, CONAVE, 2020b, p. 11–30.
170. van Santen VL, Toro H. Rapid selection in chickens of subpopulations within ArkDPI-derived infectious bronchitis virus vaccines. *Avian Pathology*. 2008; 37(3):293-306.
171. Ventura J. 2010. El INTA de Concepción del Uruguay Investiga el Virus de la Laringotraqueitis Infecciosa Aviar. [Online]. <https://www.portalveterinaria.com/articoli/actualidad/7710/el-inta-de-concepcion-del-uruguay-investiga-el-virus-de-la-laringotraqueitis-infecciosa-aviar.html#:~:text=El%20INTA%20de%20Concepci%C3%B3n%20del%20Uruguay%20investiga%20el,molecular%20del%20virus%20de%20la%20laringotraqueitis%20infecciosa%20%28ILTV%29>. Accessed 16 may2022.
172. Villacís G, Escudero G, Cueva F, Luzuriaga-Neira A. Aislamiento del virus de la enfermedad de Newcastle en zonas rurales del sur del Ecuador. *Revista CEDAMAZ*. 2014; 4(1):86–90.
173. Villarreal L, Brandão P, Chacón J, Saidenberg A, Assayag M, Jones R, Ferreira A. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. *Avian Diseases*. 2007; 51(4):974-978.
174. Villarreal L. Diagnosis of Infectious Bronchitis: an overview of concepts and tools. *Revista Brasileira de Ciencia Avícola*. 2010; 12(2):111–14.
175. Villegas P. Bronquitis Infecciosa. XXII Congreso Latinoamericano de Avicultura, 2011, Conferencia, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

176. Vinueza C, Orosco R, Cortegana-Rucoba J, Cisneros M, Lozano F, Paulet y Gardin P. Experiencias de campo con laringotraqueitis infecciosa en Perú y el uso de una vacuna vectorizada contra laringotraqueitis. XXII Congreso Latino-Americano de Avicultura, 2011, Ponencia. Buenos Aires, Argentina.
177. Volkova V, Thornton D, Hubbard SA, Magee D, Cummings T, Luna L, Watson J, Wills R. Factors associated with introduction of infectious laryngotracheitis virus on broiler farms during a localized outbreak. Avian Diseases. 2012; 56(3):521–528.
178. Wakanell P. Management and medicine of backyard Poultry. En: Speer B, Sauters WB. Current Therapy in Avian Medicine and Surgery. China, Ed. Elsevier, 2016, p. 550–565
179. Wise M, Suarez D, Seal B, Pedersen J, Senne D, King D, Kapczynski D, Spackman E. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. J Clin Microbiol. 2004; 42(1):329-338.
180. de Wit J. Detection of infectious bronchitis virus. Avian Pathology. 2000; 29(2):71-93.
181. de Wit J, Dijkman R, Guerrero P, Calvo J, Gonzalez A, Hidalgo H. Variability in biological behaviour, pathogenicity, protectotype and induction of virus neutralizing antibodies by different vaccination programmes to infectious bronchitis virus genotype Q1 strains from Chile. Avian Pathology. 2017; 46(6):666-675.
182. de Wit J, Cook J. Spotlight on avian pathology: infectious bronchitis virus. Avian Pathology. 2019; Oct;48(5):393-395.
183. Yang X, Zhou Y, Li J, Fu L, Ji G, Zeng F, Zhou L, Gao W, Wang H. Recombinant infectious bronchitis virus (IBV) H120 vaccine strain expressing the hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein of Newcastle

- disease virus (NDV) protects chickens against IBV and NDV challenge. Arch Virol. 2016;161(5):1209-1216.
184. Yu L, Jiang Y, Low S, et al. Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. Avian Diseases. 2001; 45(2):416-424.
185. Zheng J, Yamada Y, Fung TS, Huang M, Chia R, Liu DX. Identification of N-linked glycosylation sites in the spike protein and their functional impact on the replication and infectivity of coronavirus infectious bronchitis virus in cell culture. Virology. 2018; 513:65-74.
186. Zwaagstra KA, van der Zeijst BA, Kusters JG. Rapid detection and identification of avian infectious bronchitis virus. Journal of Clinical Microbiology. 1992; 30(1):79-84.

## CAPÍTULO 8

### 8. ANEXOS





## ANEXO 1

### Consentimiento Informado



#### 1. Título del proyecto:

“Caracterización molecular de los virus de Bronquitis infecciosa aviar y Newcastle en granjas de gallinas ponedoras de la provincia de Tungurahua, Ecuador”

#### 2. Objetivo de la investigación

Caracterizar molecularmente los virus de Bronquitis infecciosa y Newcastle, que circulan en las explotaciones de gallinas ponedoras de la provincia de Tungurahua.

#### 3. Patrocinadores e investigador a cargo

El proyecto de investigación se realiza gracias a un convenio entre la Universidad Central del Ecuador (UCE) y la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). La investigación será llevada a cabo por MVZ Mg. María Revelo.

#### 4. Términos de la participación

La participación de la explotación avícola es totalmente voluntaria. Los materiales requeridos para la toma de muestras y los procedimientos de laboratorio le serán provistos sin cargo. Los procedimientos en campo consistirán en tomar 5 aves para realizar hisopados laringotraqueales y cloacales. Las 5 gallinas también serán sacrificadas, a través de electrocución, a fin de obtener diferentes órganos (tráquea, pulmones, riñones y tonsilas cecales) que serán procesados para realizar análisis moleculares.

Se seguirán todas las medidas de bioseguridad que internamente posean las granjas, recordándose que como parte del protocolo de la investigación existen 48 horas entre la visita a granjas diferentes. Además, se usará materiales de protección personal desechables o en su defecto el facilitado por la granja.

#### 5. Duración del muestreo/resultados

El período de toma de muestras de la investigación abarca alrededor de ocho meses. Luego de lo cual se llevará a cabo el procesamiento de las muestras. Los resultados de granjas muestreadas se mantendrán en absoluta reserva, denominando cada granja con números arábigos, siguiendo un orden por fecha de muestreo. La información que se obtenga de este estudio será difundida, respetando la confidencialidad de los datos de los participantes, mediante conferencias, presentaciones en congresos y publicaciones, con el

fin de compartir el conocimiento adquirido y colaborar con todos los integrantes del sector avícola.

#### **6. Contacto en caso de dudas/aprobación de estudio**

Si Ud. tiene dudas, aun cuando el estudio ya haya comenzado, y durante toda la duración de este, puede contactar a la MVZ Mg. María Revelo al correo electrónico: [mcrevelo@uce.edu.ec](mailto:mcrevelo@uce.edu.ec)

Recuerde que esta investigación ha sido aprobada por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP y tiene el respaldo de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UCE.

#### **7. Aceptación técnico responsable/propietario explotación**

He leído y me han comentado la información referente a la investigación que figura en este formulario. Estoy de acuerdo con lo propuesto. Por ello, doy mi consentimiento voluntario para que la empresa/granja avícola que represento participe en esta investigación.

Técnico/Propietario	
Nombre	
Firma	

## ANEXO 2

## Formulario de Datos

**FORMULARIO GRANJAS PONEDORAS COMERCIALES  
DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BIA, NC e ILT**

## UBICACIÓN Y DATOS GENERALES

Provincia:	Cantón:	Parroquia:
Dirección aproximada:		
Ubicación:		Fecha:

## DATOS DE EXPLOTACIÓN AVÍCOLA

Código:	Lote:	Línea de aves:
Capacidad instalada:	Capacidad ocupada:	Capacidad galpón muestreado:
Número de galpones:	Número galpón muestreado:	Edades de aves:

## DATOS GENERALES DE BIOSEGURIDAD

Plan de control de plagas externo e interno	SI ___	NO ___
Cuenta con técnico de campo	SI ___	NO ___
Granja registrada en AGROCALIDAD	SI ___	NO ___
Existen cercas externas	SI ___	NO ___
Presencia de duchas para personas	SI ___	NO ___
Ubicación unidireccional instalaciones	SI ___	NO ___
Existencia de pediluvios/arcos	SI ___	NO ___
Existe otro tipo de explotación animal aparte de la avícola*	SI ___	NO ___
*¿Qué tipo de explotación animal?	_____	
Existencia de otras explotaciones avícolas cercanas+	SI ___	NO ___
+Distancia de la explotación más cercana	_____	
Distancia a centro poblado	_____	

## INFORMACIÓN ZOOTECNIA RELEVANTE (Aves muestreadas)

Edad:	Mortalidad a la fecha:	Peso promedio:
Ganancia diaria:	Porcentaje de postura:	
Enfermedades presentes con anterioridad: _____		
Antibióticos que ha usado durante el levante: _____		Frecuencia: _____
Antibióticos que ha usado durante producción: _____		Frecuencia: _____

## Presencia signos clínicos al muestreo:

Ronquidos / estornudos		Estertores				
Secreción nasal		Baja de consumo de balanceado				
Baja de postura		Blefaritis				
Cabeza hinchada (los grados de coriza estandarizados)	G1	G2	G3	G4	Diarrea	
					Aumento o disminución de consumo de agua	



### ANEXO 3

**Cebadores utilizados en las PCR punto final para  $\beta$ -actina, región 5'UTR del IBV, gen M del NV y genes ICP4 y TK del ILTV.**

Cebadores	Secuencia 5' → 3'	Posición en el genoma	Temperatura de melting (°C)
<b>5' UTR</b>			
IBV5' GU391	GCTTTTGAGCCTAGCGTT	391–408 <sup>1</sup>	53,9
IBV5' GL533	GCCATGTTGTCACTGTCTATTG	533–512 <sup>1</sup>	60,3
<b>MATRIZ</b>			
M+4100	AGTGATGTGCTCGGACCTTC	4100-4119 <sup>2</sup>	60,5
M-4220	CCTGAGGAGAGGCATTTGCTA	4240-4220 <sup>2</sup>	61,3
<b>ICP4</b>			
ICP4f	CTCTTCCTCCTCTTCCTCAT	3239- 3258 <sup>3</sup>	60,4
ICP4rev	GTTACTGACTGAACCGACCC	3460- 3460 <sup>3</sup>	62,4
<b>TK</b>			
TKIPf	CTTAGCGGAACCTATGCAAG	4614-4633 <sup>4</sup>	60,4
TKIPrev	TAGCGTCTGGTCGATTGAAG	5254-5273 <sup>4</sup>	60,4
<b><math>\beta</math>-ACTINA</b>			
FW 685	GAGAAATTGTGCGTGACATCA	3003-3023 <sup>5</sup>	57,4
RV 818	CCTGAACCTCTCATTGCCA	3154-3136 <sup>5</sup>	57,3

<sup>1</sup> Posición nucleotídica en el genoma de la cepa M41 del IBV (AY851295).

<sup>2</sup> Posición nucleotídica en el genoma de la cepa La Sota del NDV (AF077761).

<sup>3</sup> Posición nucleotídica en la proteína ICP4 del *Gallid herpesvirus 1* (L32139).

<sup>4</sup> Posición nucleotídica en el gen de la TK del *Gallid herpesvirus 1* (D00565).

<sup>5</sup> Posición en el gen de  $\beta$ -actina del *Gallus domesticus* (X00182).

## ANEXO 4

Resultados para  $\beta$ -actina aviar, región 5'UTR del IBV y fragmento del gen M del NDV con muestras provenientes de gallinas ponedoras de la provincia de Tungurahua.

No.	Código de granja	Tipo de muestra	Resultados por muestras			Resultados por granjas	
			$\beta$ -actina aviar	Matriz	5'UTR	NDV	IBV
1	U5240	a	+	+	+		
		b	+	+	+	+	+
		c	+	+	+		
2	U5241	a	+	+	+		
		b	+	+	+	+	+
		c	+	-	+		
3	U5242	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
4	U5243	a	+	+	-		
		b	+	-	-	+	-
		c	+	-	-		
5	U5244	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
6	U5245	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
7	U5246	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
8	U5247	a	+	+	-		
		b	+	+	+	+	+
		c	+	-	+		
9	U5248	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
10	U5249	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
11	U5250	a	+	+	+		
		b	+	+	-	+	+
		c	+	-	-		

No.	Código de granja	Tipo de muestra	Resultados por muestras			Resultados por granjas	
			$\beta$ -actina aviar	Matriz	5'UTR	NDV	IBV
12	U5251	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
13	U5252	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
14	U5253	a	+	-	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
15	U5254	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
16	U5255	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
17	U5256	a	+	-	-		
		b	+	+	+	+	+
		c	+	-	-		
18	U5257	a	+	-	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
19	U5258	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
20	U5259	a	+	-	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
21	U5260	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	+	-		
22	U5261	a	+	+	-		
		b	+	+	+	+	+
		c	+	-	-		
23	U5262	a	+	+	-		
		b	+	+	+	+	+
		c	+	-	-		
24	U5263	a	+	+	-		
		b	+	+	+	+	+
		c	+	+	-		

No.	Código de granja	Tipo de muestra	Resultados por muestras			Resultados por granjas	
			$\beta$ -actina aviar	Matriz	5'UTR	NDV	IBV
25	U5264	a	+	-	-		
		b	+	+	+	+	+
		c	+	-	+		
26	U5265	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
27	U5266	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
28	U5267	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
29	U5268	a	+	+	+		
		b	+	+	+	+	+
		c	+	-	+		
30	U5269	a	+	-	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
31	U5270	a	+	-	-		
		b	+	+	-	+	+
		c	+	-	+		
32	U5271	a	+	+	+		
		b	+	-	+	+	+
		c	+	+	+		
33	U5272	a	+	+	+		
		b	+	+	-	+	+
		c	+	-	-		
34	U5273	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
35	U5274	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
36	U5275	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	+	-		
37	U5276	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	+	-		

No.	Código de granja	Tipo de muestra	Resultados por muestras			Resultados por granjas	
			$\beta$ -actina aviar	Matriz	5'UTR	NDV	IBV
38	U5277	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	+	-		
39	U5278	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	+	-		
40	U5279	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	+	-		
41	U5280	a	+	+	-		
		b	+	+	+	+	+
		c	+	-	-		
42	U5281	a	+	+	-		
		b	+	+	+	+	+
		c	+	-	-		
43	U5282	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	-	-		
44	U5283	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	+	-		
45	U5284	a	+	+	-		
		b	+	+	+	+	+
		c	+	+	+		
46	U5285	a	+	-	-		
		b	+	-	-	-	-
		c	+	-	-		
47	U5286	a	+	+	-		
		b	+	+	-	+	-
		c	+	+	-		
<b>TOTAL POSITIVOS</b>			<b>141</b>	<b>96</b>	<b>28</b>	<b>46</b>	<b>16</b>

+: Positivo

-: Negativo

**ANEXO 5**

**Programas vacunales contra IBV y NDV empleados en las granjas**

**muestreadas de la provincia de Tungurahua**

Granja	Edad de ves al muestreo (semanas)	Cepas del IBV empleadas	Edades para vacunación (semanas)			Vías de administración de vacunas		
			Levante	Antes de inicio de postura	Revacunaciones	Levante	Antes de inicio de postura	Revacunaciones
U5240	65	H120	4, 5, 9	15	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
5241	70	Mass	7, 9	16	Cada 7 semanas	Aspersión	IM	Agua de bebida
U5242	70	Mass	4, 10	18	Cada 6 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5243	61	Mass	NC	15	Cada 5 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5244	40	Mass	5,10, 14	18	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5245	33	Mass	NC	14	Cada 12 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5246	75	Mass	NC	16	Cada 9 Semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5247	14	Mass	4	NA	NA	Agua de bebida	NA	NA
U5248	63	Mass	4, 9, 12	18	Cada 7 Semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5249	78	Mass	9, 12	16	Cada 4 Semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5250	82	Mass	9	18	Cada 6 Semanas	Agua de bebida	NA	Agua de bebida
U5251	60	Mass	12	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5252	35	Mass	NC	16	Cada 10 Semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5253	76	Mass	NC	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5254	27	Mass	NC	17	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5255	72	Mass	5, 8	17	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5256	53	Mass	NC	18	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5257	85	Mass	NC	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5258	48	Mass	NC	17	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5259	86	Mass	NC	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5260	50	Mass	NC	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5261	85	Mass	NC	16	Cada 7 Semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5262	100	Mass	NC	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5263	60	Mass	NC	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5264	27	Mass	NC	16	Cada 6 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5265	22	Mass	NC	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5266	15	Mass	NC	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5267	57	H120	4, 9	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5268	26	Mass	NC	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5269	70	Mass	NC	16	Depende de desafío	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5270	59	Mass	NC	16	Cada 6 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5271	50	Mass	NC	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5272	29	H120	NC	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5273	70	H120	NC	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5274	46	H120	NC	16	Cada 6 u 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida

Granja	Edad de ves al muestreo (semanas)	Cepas del IBV empleadas	Edades para vacunación (semanas)			Vías de administración de vacunas		
			Levante	Antes de inicio de postura	Revacunaciones	Levante	Antes de inicio de postura	Revacunaciones
U5275	67	Mass	NC	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5276	48	Mass	NC	16	Cada 10 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5277	43	Mass	3, 5	16	Cada 12 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5278	70	Mass	3, 7, 12	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5279	32	Mass	4, 7, 12	16	Cada 12 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5280	40	Mass	4, 9, 13	17	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5281	65	Mass	7, 12	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5282	38	M41	7, 12	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5283	55	Mass	NC	15	Cada 4 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5284	90	H120	NC	16	Cada 6 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5285	50	Mass	NC	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida
U5286	52	Mass	NC	16	Cada 8 semanas	Agua de bebida	IM	Agua de bebida

Todas las granjas reportaron el uso de la cepa La Sota contra NDV.

NC: No se conocía

NA: No se aplicaba todavía

IM: Intramuscular

Granjas agrupadas en clado de cepas Massachussets resaltadas en color rojo, cepas tipo 7/93 en color verde y cepas tipo Q1 en color rosa.

**ANEXO 6**  
**Algunas medidas de Bioseguridad implementadas en las granjas avícolas muestreadas en la provincia de Tungurahua**

Granja	Resultados			Presencia de otras explotaciones avícolas	Presencia de otras explotaciones pecuarias	Control de plagas	Técnico de campo	Cercas externas	Duchas	Pediluvios	Distancia a explotación avícola (Km)	Distancia a centro poblado (Km)	Tipo explotación diferente a la aviar
	IBV	NDV	ILTV										
U5240	+	+	-	SI	NO	SI	SI	SI	SI	NO	5	4	NA
U5241	+	+	-	SI	NO	SI	SI	SI	SI	NO	5	5	NA
U5242	-	+	-	SI	SI	SI	NO	SI	SI	SI	4	5	Bovina
U5243	-	+	-	SI	NO	SI	SI	SI	SI	NO	5	5	NA
U5244	-	+	+	SI	NO	SI	SI	SI	SI	SI	0,5	1	NA
U5245	-	+	-	SI	NO	SI	NO	NO	NO	SI	6	7	NA
U5246	-	+	-	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	3	4	Bovina
U5247	+	+	-	SI	NO	SI	SI	SI	SI	SI	2	4	NA
U5248	-	+	-	SI	SI	SI	NO	SI	NO	SI	6	3	Bovina
U5249	-	+	-	NO	SI	NO	SI	SI	SI	SI	1	0,2	NA
U5250	+	+	-	SI	SI	SI	NO	SI	NO	SI	0,5	5	Bovina
U5251	-	+	-	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	0,01	1	Porcina
U5252	-	+	-	SI	SI	SI	NO	SI	NO	SI	1	2	Bovina
U5253	-	+	-	SI	NO	SI	SI	NO	SI	SI	1	2	NA
U5254	-	+	-	SI	NO	SI	SI	SI	SI	SI	3	5	NA
U5255	-	+	+	SI	SI	SI	NO	NO	NO	SI	0,05	1	Bovina
U5256	+	+	-	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	1	1,5	Bovina
U5257	-	+	-	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI	5	3	NA
U5258	-	+	-	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	3	8	Porcina
U5259	-	+	-	SI	NO	SI	SI	SI	SI	SI	6	10	NA
U5260	-	+	-	SI	NO	SI	SI	SI	SI	SI	3	1	NA
U5261	+	+	-	SI	SI	SI	NO	SI	NO	NO	0,5	1	Bovina
U5262	+	+	-	SI	NO	NO	NO	NO	NO	SI	1	1	NA
U5263	+	+	-	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	0,5	1	NA
U5264	+	+	-	SI	NO	SI	SI	SI	SI	SI	0,6	3	NA
U5265	-	+	-	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	1	1	NA
U5266	-	+	-	SI	NO	SI	SI	SI	NO	SI	3	10	NA

Granja	Resultados			Presencia de otras explotaciones avícolas	Presencia de otras explotaciones pecuarias	Control de plagas	Técnico de campo	Cercas externas	Duchas	Pediluvios	Distancia a explotación avícola (Km)	Distancia a centro poblado (Km)	Tipo explotación diferente a la aviar
	IBV	NDV	ILTV										
U5267	-	+	-	SI	NO	SI	SI	SI	NO	SI	0,5	2	NA
U5268	+	+	-	SI	NO	SI	SI	NO	NO	SI	1	3	NA
U5269	+	+	-	SI	SI	NO	SI	SI	NO	NO	1	1	Porcina
U5270	+	+	-	SI	NO	SI	SI	SI	NO	SI	2	1	NA
U5271	+	+	-	NO	NO	SI	SI	SI	NO	NO	0,1	2	NA
U5272	+	+	-	NO	NO	SI	SI	SI	NO	SI	0,1	1	NA
U5273	-	+	-	SI	NO	SI	SI	SI	NO	NO	2	1	NA
U5274	-	+	-	SI	SI	NO	SI	SI	NO	SI	0,5	0,5	Bovina y porcina
U5275	-	+	-	SI	NO	NO	SI	NO	NO	NO	0,5	1	NA
U5276	-	+	-	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	0,2	1,5	Bovina
U5277	-	+	-	NO	NO	SI	SI	NO	NO	SI	0	3	NA
U5278	-	+	+	SI	NO	SI	SI	NO	NO	NO	0,5	1	NA
U5279	-	+	-	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	1	3	Bovina
U5280	+	+	-	SI	NO	SI	NO	SI	NO	NO	1	2	NA
U5281	+	+	-	SI	NO	NO	SI	NO	NO	NO	0,2	0,2	NA
U5282	-	+	-	SI	NO	NO	SI	NO	NO	NO	0,2	0,2	NA
U5283	-	+	-	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	1	3	NA
U5284	+	+	-	SI	NO	SI	SI	NO	NO	NO	3	1	NA
U5285	-	-	-	SI	NO	SI	SI	NO	NO	NO	3	1	NA
U5286	-	+	-	SI	NO	SI	SI	SI	SI	NO	5	4	NA
<b>TOTAL DE GRANJAS</b>	16	46	3	42	15	36	34	32	17	27	2,06	2,81	NA
<b>PORCENTAJE (%)</b>	34	97,87	6,38	89,36	31,91	76,60	72,34	68,09	36,17	57,45	Promedio		

NA: No aplica

+: Positivo

-: Negativo

## ANEXO 7

### Alineamiento de secuencias para S1 parcial de cepas muestrales y referencia ubicadas en el grupo Q1 (Clustal Omega)

IZ028/86-GI-16	ATGTTGGGGAAGTCACTGTTTATAGTGACTCTTTTGGTTTGCACATGTAGTGCCGTTTCCG	60
Q1-Chile	AUGUUGGGGAAGUCACUGUUUAUAGUGACUCUUUUUUUGCACUAUGUAGUGCCGCUUUG	60
Q1-China	AUGUUGGGGAAGUCACUGUUUAUAGUGACUCUUUUUUUGCACUAUGUAGUGCCGCUUUG	60
D100273-Chile	AUGUUGGGGAAGUCACUGUUUAUAGUGACUCUUUUUUUGCACUAUGUAGUGCCGCUUUG	60
12.124-Chile	AUGUUGGGGAAGUCACUGUUUAUAGUGACUCUUUUUUUGCACUAUGUAGUGCCGCUUUG	60
UY/097/CA/01	AUGUUGGGGAAGUCACUGUUUAUAGUGACUCUUUUUUUGCACUAUGUAGUGCCGCUUUG	60
AR/11/BA/28	AUGUUGGGGAAGUCACUGUUUAUAGUGACUCUUUUUUUGCACUAUGUAGUGCCGCUUUG	60
AR/10/BA/30	AUGUUGGGGAAGUCACUGUUUAUAGUGACUCUUUUUUUGCACUAUGUAGUGCCGCUUUG	60
AR/09/BA/38	AUGUUGGGGAAGUCACUGUUUAUAGUGACUCUUUUUUUGCACUAUGUAGUGCCGCUUUG	60
AR/09/BA/39	AUGUUGGGGAAGUCACUGUUUAUAGUGACUCUUUUUUUGCACUAUGUAGUGCCGCUUUG	60
U5262	ATGTTGGCCAAACCGCTTTTACTAGTGACTCTTTGGTGTGCACATGTAGTGCTTTGCTT	60
U5247	ATGTCGGTAACGCTACCTTTTATAGTGACTCTTTTGGTGTGCACATGTAGTGCTAACTTG	60
U5256	ATGTTGGGGAAGTCACTGTTTATAGTGACTCTTTTGGTGTGCACATGTAGTGCCGCTCTG	60
U5270	ATGTTGGGGAAGTCACTGTTTATAGTGACTCTTTTGGTGTGCACATGTAGTGCCGCTCTG	60
	* * * * *	
IZ028/86-GI-16	TTTGATAATAATGAAACCGTTTACTACTACCAAAGTGCCTTTAGACCGTCTGATGGATGG	120
Q1-Chile	UUUGAUAUAUAAUGAAACCGUUUAUCUACUACCAAAGUGCAUUUAGACCCGUGAUGGCUGG	120
Q1-China	UUUGAUAUAUAAUGAAACCGUUUAUCUACUACCAAAGUGCCUUUAGACCCGUGAUGGAUGG	120
D100273-Chile	UUUGAUAUAUAAUGAAACCGUUUAUCUACUACCAAAGUGCAUUUAGACCCGUGAUGGCUGG	120
12.124-Chile	UUUGAUAUAUAAUGAAACCGUUUAUCUACUACCAAAGUGCAUUUAGACCCGUGAUGGCUGG	120
UY/097/CA/01	UUUGAUAUAUAAUGAAACCGUUUAUCUACUACCAAAGUGCAUUUAGACCCGUGAUGGCUGG	120
AR/11/BA/28	UUUGAUAUAUAAUGAAACCGUUUAUCUACUACCAAAGUGCAUUUAGACCCGUGAUGGCUGG	120
AR/10/BA/30	UUUGAUAUAUAAUGAAACCGUUUAUCUACUACCAAAGUGCAUUUAGACCCGUGAUGGCUGG	120
AR/09/BA/38	UUUGAUAUAUAAUGAAACCGUUUAUCUACUACCAAAGUGCAUUUAGACCCGUGAUGGCUGG	120
AR/09/BA/39	UUUGAUAUAUAAUGAAACCGUUUAUCUACUACCAAAGUGCAUUUAGACCCGUGAUGGCUGG	120
U5262	TATGATAATAACTTACGTTTACTACTACCACAGTTCCTTTAGGCCTGGTCAAGGTTGG	120
U5247	TTCACT---GATACTTATAATTACTACTACCAAAGTGCCTTTAGACCATTTGATGGTTGG	117
U5256	TTTGATAATAATGAAACTGTTTACTACTACCAAAGTGCCTTTAGACCATTTAATGGTTGG	120
U5270	TTTGATAATAATGAAACTGTTTACTACTACCAAAGTGCCTTTAGACCATTTAATGGTTGG	120
	* * * * *	
IZ028/86-GI-16	CATTTGCATGGTGGTCTTATGTCAGTAGTAAACGTCCTTTCAGAACTAATAATGCAGGC	180
Q1-Chile	CAUUUGCAUGGUGGUCUUUAGCAGUAGUAAACGUUUUUUUAGAAAUAUAAUUGCAGGC	180
Q1-China	CAUUUGCAUGGUGGUCUUUAGCAGUAGUAAACGUUUUU-UAGAACAUAUAAUUGCAGGC	179
D100273-Chile	CAUUUGCAUGGUGGUCUUUAGCAGUAGUAAACGUUUUUAGAAAUAUAAUUGCAGGC	180
12.124-Chile	CAUUUGCAUGGUGGUCUUUAGCAGUAGUAAACGUUUUUAGAAAUAUAAUUGCAGGC	180
UY/097/CA/01	CAUUUGCAUGGUGGUCUUUAGCAGUAGUAAACGUUUUUAGAAAUAUAAUUGCAGGC	180
AR/11/BA/28	CAUUUGCAUGGUGGUCUUUAGCAGUAGUAAACGUUUUUAGAAAUAUAAUUGCAGGC	180
AR/10/BA/30	CAUUUGCAUGGUGGUCUUUAGCAGUAGUAAACGUUUUUAGAAAUAUAAUUGCAGGC	180
AR/09/BA/38	CAUUUGCAUGGUGGUCUUUAGCAGUAGUAAACGUUUUUAGAAAUAUAAUUGCAGGC	180
AR/09/BA/39	CAUUUGCAUGGUGGUCUUUAGCAGUAGUAAACGUUUUUAGAAAUAUAAUUGCAGGC	180
U5262	CATTTACATGGCGGTGCTTATGTCAGTAGTAAACGTTTCTTTAGAAATAATAATGCAGGC	180
U5247	CATTTACATGGCGGTGCTTATGTCAGTAGTAAACGTTTCTTTAGAACATAATAATGCAGGC	177
U5256	CATTTATATGGCGGTGCTTATGTCAGTAGTAAATGTTTCGACAGAAATAATAACCGAGGT	180
U5270	CATTTACATGGCGGTGCTTATGTCAGTAGTAAATGTTTCGATAGAATAATAACCGAGGT	180
	* * * * *	
IZ028/86-GI-16	GCAGCTTCACAAATGCATTGCAGGGGCTATTTCTGGAGTAAAAATTTCTCTGCTTCTTCT	240
Q1-Chile	ACAGCUUCAGAAUGUGUUGCAGGGGCUUUUUUUUGGAGUAAAAUUUCUCUGCUUCUGCU	240
Q1-China	ACAGCUUCAGAAUGCAUUGCAGGGGCUUUUUUUUGGAGUAAAAUUUCUCUGCUUCUGCU	239
D100273-Chile	ACAGCUUCAGAAUGCAUUGCAGGGGCUUUUUUUUGGAGUAAAAUUUCUCUGCUUCUGCU	240
12.124-Chile	ACAGUUUCAGAAUGCAUUGCAGGGGCUUUUUUUUGGAGUAAAAGAGUUUCUCUGCUUCUGCU	240
UY/097/CA/01	ACAGUUUCAGAAUGCAUUGCAGGGGCUUUUUUUUGGAGUAAAAUUUCUCUGCUUCUGCU	240
AR/11/BA/28	ACAGUUUCAGAAUGCAUUGCAGGGGCUUUUUUUUGGAGUAAAAUUUCUCUGCUUCUGCU	240
AR/10/BA/30	ACAGUUUCAGAAUGCAUUGCAGGGGCUUUUUUUUGGAGUAAAAUUUCUCUGCUUCUGCU	240
AR/09/BA/38	ACAGUUUCAGAAUGCAUUGCAGGGGCUUUUUUUUGGAGUAAAAUUUCUCUGCUUCUGCU	240
AR/09/BA/39	ACAGUUUCAGAAUGCAUUGCAGGGGCUUUUUUUUGGAGUAAAAUUUCUCUGCUUCUGCU	240
U5262	GAAGCTCAACAATGTATGGTGGTGTCTATTATTGGAGCAAGAAATTTAGTGCATCATCT	240
U5247	ACA---GCTGATTGTAAAGCTGGTGTCTATTATTGGAGCAAGAAATTTAGTGCATCATCT	234
U5256	TCTGCTTCAGAAATGTGAAGCTGGTGTCTATTATTGGAGCAAGAAATTTAGTGCATCATCC	240
U5270	TCTGCTTCAGAAATGTGAAGCTGGTGTCTATTATTGGAGCAAGAAATTTAGTGCATCATCC	240
	* * * * *	
IZ028/86-GI-16	GTAGCCATGACTGCACCTGGTTCAGGGATGCAGTGGTCAACTAATCAATTCTGCACGGCT	300
Q1-Chile	GUAGCCAUGACUGCACCUGAGUCAGGGAGUCAGUGGUAACUAGCCAUAUUCUGCAGGGCU	300
Q1-China	GUAGCCAUGACUGCACCUGAGUAGGGAGUCAGUGGUAACUAGGGCAUUCUGCAGGGCU	299
D100273-Chile	GUAGCCAUGACUGCACCUGAGUCAGGGAGUAGAGUGGUAACUAGCCAUAUUCUGCAGGGCU	300
12.124-Chile	GUAGCCAUGACUGCACCUCAGUUAGGGAUGACGUGGUAACUGGGCAUUCUGCAGGGCU	300
UY/097/CA/01	GUAGCCAUGACUGCACCUCAGUUAGGGAUGACGUGGUAACUGGGCAUUCUGCAGGGCU	300
AR/11/BA/28	GUAGCCAUGACUGCACCUCAGUUAGGGAUGACGUGGUAACUGGGCAUUCUGCAGGGCU	300
AR/10/BA/30	GUAGCCAUGACUGCACCUCAGUUAGGGAUGACGUGGUAACUGGGCAUUCUGCAGGGCU	300
AR/09/BA/38	GUAGCCAUGACUGCACCUCAGUUAGGGAUGACGUGGUAACUGGGCAUUCUGCAGGGCU	300
AR/09/BA/39	GUAGCCAUGACUGCACCUCAGUUAGGGAUGACGUGGUAACUGGGCAUUCUGCAGGGCU	300
U5262	ATAGCTATGACTGCACCATCTAATGGTATGTCATGGTCAAGAAATGAATTTTGTACGGCT	300
U5247	ATAGCTATGACTGCACCATCTAATGGTATGTCATGGTCAAGAAATGAATTTTGTACGGCT	294
U5256	ATAGCTATGACTGCACCATCTAATGGTATGTCATGGTCCACTAGTCAATTTGTACCGCT	300
U5270	ATAGCTATGACTGCACCATCTAATGGTATGTCATGGTCCACTAGCCAATTTGTACTGCT	300
	* * * * *	

IZO28/86-GI-16 CACTGTAACCTTCTCGGATTTTACAGTGTTCGTTACACATTGTTTAAACACGGTAGAGGT 360  
 Q1-Chile CACUGUAACUUCUCGGAUUUUACAGUGUUCGUUACGCAUUGUUUUAAACACGGUACCGU 360  
 Q1-China CACUGUAACUUCUCGGAUUUUACAGUGUUCGUUACGCAUUGUUUUAAACACGGUACCGU 359  
 D100273-Chile CACUGUAACUUCUCGGAUUUUACAGUGUUCGUUACGCAUUGUUUUAAACACGGUACCGU 360  
 12.124-Chile CACUGUAACUUCUCGGAUUUUACAGUGUUCGUUACGCAUUGUUUUAAACACGGUACCGU 360  
 UY/097/CA/01 CACUGUAACUUCUCGGAUUUUACAGUGUUCGUUACGCAUUGUUUUAAACACGGUACCGU 360  
 AR/11/BA/28 CACUGUAACUUCUCGGAUUUUACAGUGUUCGUUACGCAUUGUUUUAAACACGGUACCGU 360  
 AR/10/BA/30 CACUGUAACUUCUCGGAUUUUACAGUGUUCGUUACGCAUUGUUUUAAACACGGUACCGU 360  
 AR/09/BA/38 CACUGUAACUUCUCGGAUUUUACAGUGUUCGUUACGCAUUGUUUUAAACACGGUACCGU 360  
 AR/09/BA/39 CACUGUAACUUCUCGGAUUUUACAGUGUUCGUUACGCAUUGUUUUAAACACGGUACCGU 360  
 U5262 CACTGTAACCTTCTCGGATTTTACAGTGTTCGTTACACATTGCTATAAGGTAGGAGATGGG 360  
 U5247 CACTGTAACCTTCTCGGATTTTACAGTGTTCGTTACACATTGCTATAAGGTAGGAGATGGG 354  
 U5256 CACTGTAACCTTCTCGGATTTTACAGTGTTCGTTACACATTGCTATAAGGTAGGAGATGGG 360  
 U5270 CACTGTAACCTTCTCGGATTTTACAGTGTTCGTTACACATTGCTATAAGGTAGGAGATGGG 360  
 \* \* \* \* \*

IZO28/86-GI-16 CTATGCCCGCTAACAGGGCTTATTCACAGTGGCTTATTCGTTGTTCTGCTATGAGGAAG 420  
 Q1-Chile CUAUGCCCCUUAACAGGGUUUAUCCAGGUGGAUUUAUUCGUGUUUCUGCUAUGAGGAAG 420  
 Q1-China CUAUGCCCCUUAACAGGGUUUAUCCAGGUGGAUUUAUUCGUGUUUCUGCUAUGAGGAAG 419  
 D100273-Chile CUAUGCCCCUUAACAGGGUUUAUCCAGGUGGAUUUAUUCGUGUUUCUGCUAUGAGGAAG 420  
 12.124-Chile CUAUGCCCCUUAACAGGGUUUAUCCAGGUGGAUUUAUUCGUGUUUCUGCUAUGAGGAAG 420  
 UY/097/CA/01 CUAUGCCCCUUAACAGGGUUUAUCCAGGUGGAUUUAUUCGUGUUUCUGCUAUGAGGAAG 420  
 AR/11/BA/28 CUAUGCCCCUUAACAGGGUUUAUCCAGGUGGAUUUAUUCGUGUUUCUGCUAUGAGGAAG 420  
 AR/10/BA/30 CUAUGCCCCUUAACAGGGUUUAUCCAGGUGGAUUUAUUCGUGUUUCUGCUAUGAGGAAG 420  
 AR/09/BA/38 CUAUGCCCCUUAACAGGGUUUAUCCAGGUGGAUUUAUUCGUGUUUCUGCUAUGAGGAAG 420  
 AR/09/BA/39 CUAUGCCCCUUAACAGGGUUUAUCCAGGUGGAUUUAUUCGUGUUUCUGCUAUGAGGAAG 420  
 U5262 ATATGTCCTCTGACAGGCTAATTCACAGGTTATATTCGCATCTCTGCTATGAGTA-- 418  
 U5247 GAGTGCCTGTAACAGGCTTATACACAGGCTATATTCGCATCTCTGCTATGAGTA-- 414  
 U5256 TCATGCCCTTAAACAGGCTTATTCACAGACTATATTCGCATCTCTGCTATGAGTAA 420  
 U5270 TCATGCCCTTAAACAGGCTTATTCACAGACTATATTCGCATCTCTGCTATGAGTAA 420  
 \* \* \* \* \*

IZO28/86-GI-16 GGAA-----GTAATTCCTTGTTTATAATTTAACAGTTCCTGACTAAATATCCT 471  
 Q1-Chile GGAA-----GUAUUCCUUGUUUUUAUUUUAAACAGUUUCUGUGACUAAAUUUCU 471  
 Q1-China GGAA-----GUAUUCCUUGUUUUUAUUUUAAACAGUUUCUGUGACUAAAUUUCU 470  
 D100273-Chile GGAA-----GUAUUCCUUGUUUUUAUUUUAAACAGUUUCUGUGACUAAAUUUCU 471  
 12.124-Chile GGAA-----GUAUUCCUUGUUUUUAUUUUAAACAGUUUCUGUGACUAAAUUUCU 471  
 UY/097/CA/01 GGAA-----GUAUUCCUUGUUUUUAUUUUAAACAGUUUCUGUGACUAAAUUUCU 471  
 AR/11/BA/28 GGAA-----GUAUUCCUUGUUUUUAUUUUAAACAGUUUCUGUGACUAAAUUUCU 471  
 AR/10/BA/30 GGAA-----GUAUUCCUUGUUUUUAUUUUAAACAGUUUCUGUGACUAAAUUUCU 471  
 AR/09/BA/38 GGAA-----GUAUUCCUUGUUUUUAUUUUAAACAGUUUCUGUGACUAAAUUUCU 471  
 AR/09/BA/39 GGAA-----GUAUUCCUUGUUUUUAUUUUAAACAGUUUCUGUGACUAAAUUUCU 471  
 U5262 ---GTGCACTGCTGTTGTTTATAATTTAACATTCGCTGTGACTAAATATCCT 468  
 U5247 GGAGGTTCTAGTCTCCCACTTATTTACAAATTTAACAGTTCCTGTGAGTAAATTTCT 474  
 U5256 GGAA-----GTTTGTTTTATAATTTAACAGTTCCTGTGATTAAGTATTCT 465  
 U5270 GGAAATAATGGTCTAGTGGTTGTTTATAATTTAACAGTTCCTGTGACTAAGTATTCT 480  
 \* \* \* \* \*

IZO28/86-GI-16 ACATTTAAGTCGCTTCAATGTGTTAATAATATACATCTGTGATTTAAATGGTGATCCT 531  
 Q1-Chile AGAUUUAAAGUCGCUUCAUUGUGUUAAUUAUUAACUUCUGUGAUUUAAUUGGUGAUCUU 531  
 Q1-China AGAUUUAAAGUCGCUUCAUUGUGUUAAUUAUUAACUUCUGUGAUUUAAUUGGUGAUCUU 530  
 D100273-Chile ACAUUUAAGUCGCUUCAUUGUGUUAAUUAUUAACUUCUGUGAUUUAAUUGGUGAUCUU 531  
 12.124-Chile AGAUUUAAAGUCGCUUCAUUGUGUUAAUUAUUAACUUCUGUGAUUUAAUUGGUGAUCUU 531  
 UY/097/CA/01 AGAUUUAAAGUCGCUUCAUUGUGUUAAUUAUUAACUUCUGUGAUUUAAUUGGUGAUCUU 531  
 AR/11/BA/28 AGAUUUAAAGUCGCUUCAUUGUGUUAAUUAUUAACUUCUGUGAUUUAAUUGGUGAUCUU 531  
 AR/10/BA/30 AGAUUUAAAGUCGCUUCAUUGUGUUAAUUAUUAACUUCUGUGAUUUAAUUGGUGAUCUU 531  
 AR/09/BA/38 AGAUUUAAAGUCGCUUCAUUGUGUUAAUUAUUAACUUCUGUGAUUUAAUUGGUGAUCUU 531  
 AR/09/BA/39 AGAUUUAAAGUCGCUUCAUUGUGUUAAUUAUUAACUUCUGUGAUUUAAUUGGUGAUCUU 531  
 U5262 AAATTTAAGTCGCTTCAATGTGTTAATAATCAACATCTGTGACTAAATGGTGATCCT 528  
 U5247 AAATTTAAGTCGCTTCAATGTGTTAATAATCAACATCTGTGACTAAATGGTGATCCT 534  
 U5256 AAGTTTAAAGTCGCTTCAATGTGTTAATAATCAACATCTGTGACTAAATGGTGATTTA 525  
 U5270 AAGTTTAAAGTCGCTTCAATGTGTTAATAATCAACATCTGTGACTAAATGGTGATTTA 540  
 \* \* \* \* \*

IZO28/86-GI-16 GTATTCACCTTAATGAAACTAAACCTGTTAGTGCAGCAGGTGTTCTTTAAAGCTGGT 591  
 Q1-Chile GUGUUCACUUCUAAUAGAAACUAAACCGUUAUGGCGAGCAGGUGUUUUAAAGCUGGU 591  
 Q1-China GUGUUCACUUCUAAUAGAAACUAAACCGUUAUGGCGAGCAGGUGUUUUAAAGCUGGU 590  
 D100273-Chile GUGUUCACUUCUAAUAGAAACUAAACCGUUAUGGCGAGCAGGUGUUUUAAAGCUGGU 591  
 12.124-Chile GUGUUCACUUCUAAUAGAAACUAAACCGUUAUGGCGAGCAGGUGUUUUAAAGCUGGU 591  
 UY/097/CA/01 GUGUUCACUUCUAAUAGAAACUAAACCGUUAUGGCGAGCAGGUGUUUUAAAGCUGGU 591  
 AR/11/BA/28 GUGUUCACUUCUAAUAGAAACUAAACCGUUAUGGCGAGCAGGUGUUUUAAAGCUGGU 591  
 AR/10/BA/30 GUGUUCACUUCUAAUAGAAACUAAACCGUUAUGGCGAGCAGGUGUUUUAAAGCUGGU 591  
 AR/09/BA/38 GUGUUCACUUCUAAUAGAAACUAAACCGUUAUGGCGAGCAGGUGUUUUAAAGCUGGU 591  
 AR/09/BA/39 GUGUUCACUUCUAAUAGAAACUAAACCGUUAUGGCGAGCAGGUGUUUUAAAGCUGGU 591  
 U5262 GTTTTTACTTCTAATGAAACTCAAGATGTTAGTGTGCGAGGTTCATTTTAAAGCTGGT 588  
 U5247 GTTTTTACTTCTAATGAAACTCAAGATGTTAGTGTGCGAGGTTCATTTTAAAGCTGGT 594  
 U5256 GTTTTTACTTCTAATGAGACCAAGATGTTAGTGGCGCAAGTCTTTATTTTAAAGCGGAG 585  
 U5270 GTTTTTACTTCTAATGAGACCAAGATGTTAGTGGCGCAAGTCTTTATTTTAAAGCGGAG 600  
 \* \* \* \* \*

IZO28/86-GI-16 GGACCTATAACTTACAAGACTATGAGTGAAG 622  
 Q1-Chile GGACCUUAACUUUAAGAUUAUGAGUGAAG 622  
 Q1-China GGACCUUAACUUUAAGAUUAUGAGUGAAG 621  
 D100273-Chile GGACCUUAACUUUAAGAUUAUGAUGAAG 622  
 12.124-Chile GGACCUUAACUUUAAGAUUAUGAUGAAG 622  
 UY/097/CA/01 GGACCUUAACUUUAAGAUUAUGAGUGAAG 622  
 AR/11/BA/28 GGACCUUAACUUUAAGAUUAUGAGUGAAG 622  
 AR/10/BA/30 GGACCUUAACUUUAAGAUUAUGAUGAAG 622  
 AR/09/BA/38 GGACCUUAACUUUAAGAUUAUGAGUGAAG 622  
 AR/09/BA/39 GGACCUUAACUUUAAGAUUAUGAGUGAAG 622  
 U5262 GGCCCTATAACTTATAAAGTTATGAAGGAAG 619  
 U5247 GGGCCTGTAACCTTATAAAGTTATGAAGGAAG 625  
 U5256 GGACCCATACCTTATAACGTTCTGAGACAAG 616  
 U5270 GGACCCATACCTTATAAAGTTATGAGAGAAG 631  
 \* \* \* \* \*

**ANEXO 8**  
**Cepas representativas para el virus del NDV**

NÚMERO ACCESO GENBANK	NOMBRE DE CEPA	PAÍS O PROCEDENCIA
JN872168	499-31/2008	República Dominicana
JN872169	Pennsylvania/3167/2009	Estados Unidos
JN872152	Ulster	Estados Unidos
MH614933	APMV-1/Chicken/Jordan/J11-Spleen/2018	Estados Unidos
JN872153	Chicken/California/1083(Fontana)/71	Estados Unidos
JN872164	Chicken/Colombia/440620/06	Colombia
GU585905	Chicken/Sweden/97	Suecia
JN872192	Chicken/California/211472-4/2002	Estados Unidos
JN872193	Avian/Peru/1918-3/2008	Perú
JN872194	Chicken/Honduras/498109-15/2007	Honduras
MH377295	PHL253685	Israel
JN688865	G-JS-09-08	China
JN669424	La Sota clone HN-Oj1	India
JX901372	APMV1/Broiler/PA/USA/0901/2009	Estados Unidos
KC844235	La Sota C5	China
JN872177	Chicken/Massachusetts/344783-3/2004	Estados Unidos
JN872150	B1	Estados Unidos
JN872151	Hitchner	Estados Unidos
JN863120	LaSota	Estados Unidos
JN863121	New Jersey-Roakin	Estados Unidos
NC_039223	JSD0812	China
KP780874	ROPI/USA/Allegheny/PA/ND0007199/840/2013	Estados Unidos
KU059752	TX3988	Estados Unidos

## ANEXO 9

### Alineamiento de 135 secuencias del virus del NDV y cebadores para región parcial de la proteína F

Cebador directo:

Cebador FF-parcial de Oligali y col (2019): ATGGGCYCCAGACYCTCTAC

Cebador modificado acorde alineamiento: ATGGGCTCCARAYCTTCTAC

Posición en cebador	Cambio
---------------------	--------

6	T por Y
11	R por G
13	Y por C
14	C por Y
15	T por C

Fusión-F	ATGGGTCYCCAGACYCTCTAC-----	20
MF622038.1_Zambia_Chadiza_2015	ATGGGTTCCAAATCTTCTACCAGGATCCCAACACTCCCGATGCTGATCACTCTGATCATA	60
MF622036.1_Zimbabwe_2013	ATGGGTTCCAAATCTTCTACCAGGATCCCAACTCCCCCGATGCTGAACACTCTGATCATA	60
HQ697255_Indonesia_Sukorejo_2010	ATGGGTTCCAAATCTTCTACCAGGATCCCAACACCCCGATGCTGATCACTCGGATCATG	60
HQ697256_Indonesia_Makassar_2009	ATGGGTTCCAAATCTTCTACCAGGATCCCAACACCCCGATGCTGATCACTCGGATCATG	60
KF026013_Malaysia_2011	ATGGGTTCCAAATCTTCTACCAGGATCCCAACACCCCGATGCTGATCACTCGGATCATG	60
KU523524_Mozambique_2012	ATGGGTTCCAAATCTTCTACCAGGATCCCAACACCCCGATGCTGATCACTCTGATCATA	60
MF622035.1_South Africa_2013	ATGGGTTCCAAATCTTCTACCAGGATCCCAACACCCCGATGCTGATCACTCTGATCATA	60
MF622037.1_South Africa_2013	ATGGGTTCCAAATCTTCTACCAGGATCCCAACACCCCGATGCTGATCACTCTGATCATA	60
JN872153_California_FonTana_1971	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCTCTGATGCTGATCACCCAGATTATG	60
AB853926_Japan_Osaka_1969	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCTCTGATGCTGATCACCCGAATTATG	60
Z12111_Great Britain_Warwick_1966	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCTCTGATGCTGATCACCCGAATTATG	60
MH614933.1_Jordan_2018	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCGTACCCCTGATTTTGTATCCCTCGGATCATG	60
KF1719224_Libya_2013	ATGGGCTCCAAATCTTCTACCAGGATCCCGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
MK006004_Indonesia_Layer_2014	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
KF792019_Israel_2013	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
HQ697254_Indonesia_Banjarmasin_2010	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
KF113339_Pakistan_Lahore_2011	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
MG871466.1_Iran_2017	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
MH432252.1_Belgium_2018	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
KM016459_Israel_2014	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
KY075880_Egypt_Sharkia7_2016	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
KJ525714_China_SD_2011	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
JQ013865_China_JS_2011	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
KU365650_Egypt_2014	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
MK005976_Egypt_Sohag_2011	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
GQ245808_China_XY_2007	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
FJ480789_China_GD_2005	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
KU201409_Iran_SMV_2011	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
MH371022.1_Israel_2007	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
KF442615_South Africa_2008	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
MK006022_Vietnam_Vietnam_2002	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
AF358786_Taiwan_2000	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
DQ067447_China_GX1_2000	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
AB853329_Japan_Fukushima_2002	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
KJ865694_Colombia_2009	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
MK006002_Korea_1995	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
KY404087_South Korea_2013	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
KJ914673_Ukraine_Ivano_Frankivsk_2007	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
KU295451_Bulgaria_Moravitsa_2007	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
EF579733_China_Shandong_Pyan_2004	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
GQ245787_China_HA_2007	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
JQ319052_Venezuela_2009	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
KJ865707_Colombia_2010	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
KU058680_Nigeria_Kudu_1992	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
KJ747482.1_Namibia_2016	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
JN986837_Netherlands_ancestral_1993	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
FJ772491_Burundi_2008	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
U62620_Taiwan_1995	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
DQ227254_China_Broiler_2003	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
JQ267580_Iran_2011	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
HQ589257_India_Bareilly_1997	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
GU585905_Sweden_1997	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
MG869270.1_Vietnam_2008	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
HQ266602_Madagascar_2008	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
KF939088_California_CG_1946	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
JN863121_New Jersey_Roakin_1946	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60
AF077761_USA_IaSota_1946	ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAGGATCCCAAGTACCCCTGATGTTGATCACTCGGATCATG	60

JN872151\_Hitchner\_B1\_1947 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGAACCAGCACCTATGATGCTGACTATCCGGGTCGGG 60  
 KR869090\_China\_GX21\_2013 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGAACCAGCACCTATGATGCTGACTGATCCGGGTCGGG 60  
 AY562991\_Ireland\_Ulster\_1967 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTGATGCTGACCGTCCGGGTCGGG 60  
 AB465607\_Japan\_Ishi\_1962 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTGATGCTGACCGTCCGATTTGTG 60  
 AY935490\_Australia\_2002 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTTATGCTGACCGTCCGATTCATG 60  
 AF217084\_Australia\_Queensland\_1966 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTTATGCTGACCGTCCGAGTCATG 60  
 M24693\_Australia\_Queensland\_1966 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTTATGCTGACCGTCCGAGTCATG 60  
 KT901462\_India\_TPT\_2012 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAGTGTGATCATCCGAATCGCA 60  
 KM056353\_India\_TN\_Namakkal ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAGTGTGATCATCCGAATCGCA 60  
 DQ485259\_China\_Guangxi5\_2000 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGACCATACGGATCAGC 60  
 GU182327\_Pakistan\_Karachi\_1974 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGACCATACGGATCAGC 60  
 AF458009\_China\_1985 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTGATGCTGACCGTCCGATTTGTG 60  
 FJ436303\_China\_ZJ\_1986 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTGATGCTGACCGTCCGATTTGTG 60  
 MF278924.1\_China\_FS\_1997 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTGATGCTGACCGTCCGATTTGTG 60  
 M24701\_Japan\_MIY\_1951 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTGATGCTGACCATCCGATTCGGG 60  
 MH996898\_Nigeria\_Plateau\_1973 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTGATGCTGATCGTCCGAATTCGG 60  
 MH996897\_Nigeria\_Kano\_1973 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTCAATGCTGATCATCCGAATTCGG 60  
 MH996952\_Nigeria\_Ibadan\_1973 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTCAATGCTGATCATCCGAATTCGG 60  
 JF966386\_Mali\_2007 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTGATGCTGGTCACTCCGATTCATG 60  
 FJ772452\_Nigeria\_2006 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTGATGCTGGTCACTCCGATTCATG 60  
 HF969214\_Nigeria\_2011 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTGATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 HF969141\_Nigeria\_2009 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTGATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 JX546245\_Benin\_2009 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGTCACTGTGCCCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 F969179\_Ivory\_Coast\_2007 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGTCACTGTGCCCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 JF966387\_Mali\_2009 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGTCACTGTGCCCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 MH392227\_Nigeria\_2009 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 FJ772466\_IvoryCoast\_2008 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 JX546248\_Togo\_2009 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTGATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 HF969125\_CAR\_CAP09\_2008 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 HF969194\_Nigeria\_2009 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 FJ772469\_Niger\_2008 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 HF969134\_Nigeria\_2009 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 FJ772478\_Cameroon\_2008 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 MH092817\_Wase\_Nigeria\_2009 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 JF966385\_Mali\_2008 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 FJ772458\_Burkina\_Faso\_2008 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 HF969185\_Ivory\_Coast\_2007 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 KU594615\_Peru\_Apurimac\_2005 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 JN800306\_Peru\_2008 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 KJ865695\_Colombia\_2009 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 MF362982.1\_India\_2015 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 GU182323\_Pakistan\_Karachi\_2008 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 KM056346\_India\_2013 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 KT734766\_India\_Pandu\_2015 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 MF409241.1\_Zambia\_Chiwoko\_2015 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 MK633932.1\_Tanzania\_Mbeya\_2012 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 MG988405.1\_Kenya\_KEL007\_2016 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 MK583011.1\_Tanzania\_Mbeya\_2012 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 AY288999\_Mexico\_37821\_1996 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 MK040382.1\_USA\_B1800621\_2018 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 JN872192\_California\_211472\_2002 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 JN872194\_Honduras\_498109\_2007 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 KJ123642\_Brazil\_SJM\_1975 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 KY284094\_Mexico\_14\_2014 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 MH996901\_Bulgaria\_ElovDol\_1981 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 MK006005\_Mexico\_NDVEL\_2009 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 EU518683\_Mexico\_Estado\_de\_Mexico\_2005 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 HM117720\_Mexico\_Puebla\_2005 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 KJ577136\_Mexico\_Chimalhuacan\_1973 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 JX119193\_Dominican\_Republic\_2008 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 KC205475\_Ethiopia\_2011 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 KC205476\_Ethiopia\_2011 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 JN942022\_USA\_Texas\_2004 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 HM748948\_China\_SD5\_2008 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 JN872177\_Massachusetts\_344783\_2004 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 JX901321\_USA\_PA\_2005 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 AF048763\_Malaysia\_1960 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 JX915243\_Mexico\_Queretaro\_1947 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 AY734534\_Argentina\_Trenque\_1970 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 FJ751918\_China\_QH1\_1979 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 KY042143\_Korea\_1993 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 AF458020\_China\_XJ\_1991 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 HQ839733\_Sweden\_1995 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 KY042125\_Bulgaria\_DolnoLinevo\_1992 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 AF458017\_China\_Sh\_1998 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 AB465606\_Japan\_Ibaraki\_1985 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 AF458015\_China\_ZhJ\_1997 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60  
 AF458016\_China\_ZhJ\_1986 ATGGGCTCCAGACCTCTTACCAAGATCCCAGTACCTCTAATGCTGATCACTCCGATTCATG 60

Cebador Inverso:  
 Cebador de Oligali y col (2019): GGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAG  
 Cebador modificado: GGATTATCACA ACTAKCAGTGGCAG

Posición en cebador	Cambio
16	G por K

Fusión-R	-----GGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAG-----	25
MF622038.1 Zambia Chadiza_2015	ACCAATGAAGCTGTGCATGAAGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MF622036.1 Zimbabwe_2013	ACCAATGAAGCTGTGCATGAAGTCACTAACCGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
HQ697255 Indonesia Sukorejo_2010	ACCAATGAAGCTGTGCATGAAGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
HQ697256 Indonesia Makassar_2009	ACCAATGAAGCTGTGCATGAAGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KF026013 Malaysia_2011	ACCAATGAAGCTGTGCATGAAGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KU523524 Mozambique_2012	ACCAATGAAGCTGTGCATGAAGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MF622035.1 South Africa_2013	ACCAATGAAGCTGTGCATGAAGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MF622037.1 South Africa_2013	ACCAATGAAGCTGTGCATGAAGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
JN872153 California Fontana_1971	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
AB853926 Japan OsaKa_1969	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
Z12111 Great Britain Warwick_1966	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MH614933.1 Jordan_2018	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KF119224 Libya_2013	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MK006004 Indonesia Layer_2014	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KF792019 Israel_2013	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
HQ697254 Indonesia Banjarmasin_2010	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KF113339 Pakistan Lahore_2011	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MG871466.1 Iran_2017	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MH432252.1 Belgium_2018	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KM016459 Israel_2014	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KY075880 Egypt Sharkia7_2016	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KJ525714 China SD_2011	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
JQ013865 China JS_2011	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KU365650 Egypt_2014	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MK005976 Egypt Sohag_2011	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
GQ245808 China XY_2007	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
FJ480789 China GD_2005	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KU201409 Iran SMV_2011	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MH371022.1 Israel_2007	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KF442615 South Africa_2008	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MK006022 Vietnam VietNam_2002	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
AF358786 Taiwan_2000	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
DQ067447 China GX1_2000	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
AB853329 Japan Fukushima_2002	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KJ865694 Colombia_2009	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MK006002 Korea_1995	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KY404087 South Korea_2013	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KJ914673 Ukraine Ivano Frankivsk_2007	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KU295451 Bulgaria Moravitsa_2007	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
EF579733 China Shandong Pyan_2004	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
GQ245787 China HA_2007	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
JQ319052 Venezuela_2009	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KJ865707 Colombia_2010	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KU058680 Nigeria Kudu_1992	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KY747482.1 Namibia_2016	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
JN986837 Netherlands ancestral_1993	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
FJ772491 Burundi_2008	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
U62620 Taiwan_1995	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
DQ227254 China Broiler_2003	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
JQ267580 Iran_2011	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
HQ589257 India Bareilly_1997	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
GU585905 Sweden_1997	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MG869270.1 Vietnam_2008	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
HQ266602 Madagascar_2008	ACCAATGAAGCTGTGCATGAGGTCAACCAACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KP939088 California CG_1946	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
NJ863121 New Jersey Roakin_1946	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
AF077761 USA LaSota_1946	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
JN872151 Hitchner BI_1947	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KR869090 China GX21_2013	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
AY562991 Ireland Ulster_1967	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
AB465607 Japan Ishi_1962	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
AY935490 Australia_2002	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
AF217084 Australia Queensland_1966	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
M24693 Australia Queensland_1966	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KT901462 India TPT_2012	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
KM056353 India TN Namakkal	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
DQ485259 China Guangxi5_2000	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
GU182327 Pakistan Karachi_1974	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
AF458009 China_1985	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
FJ436303 China ZJ_1986	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MF278924.1 China FS_1997	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
M24701 Japan MY_1951	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MH968998 Nigeria Plateau_1973	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MH968897 Nigeria Kano_1973	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MH969652 Nigeria Ibadan_1973	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
FJ966386 Mali_2007	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
FJ772452 Nigeria_2006	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
HF969214 Nigeria_2011	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
HF969141 Nigeria_2009	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
JX546245 Benin_2009	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
F969179 Ivory Coast_2007	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
FJ966387 Mali_2009	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MH392227 Nigeria_2009	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
FJ772466 IvoryCoast_2008	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
JX546248 Togo_2009	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
HF969125 CAR CAF09_2008	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
HF969194 Nigeria_2009	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
FJ772469 Niger_2008	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
HF969134 Nigeria_2009	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
FJ772478 Cameroon_2008	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
MH092817 Wase Nigeria_2009	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540
FJ966385 Mali_2008	ACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCACA ACTAGCAGTGGCAGTGGG	540



## ANEXO 10

### Solución de problemas para las reacciones fallidas de PCR de la proteína F del NDV

Razón sospechosa	Medidas	Amplificación
<b>Cebadores</b>		
Cebadores degradados	Uso de alícuotas nuevas	No
Cebadores incorrectos	Nuevos juegos de cebadores	No
Insuficiente cantidad	Optimización de la concentración de cebadores en la mezcla	No
<b>Molde</b>		
Pobre calidad de ADNc	Verificación de la relación 260/280 del ADNc molde en nanodrop.	No
<b>Otros componentes de la reacción</b>		
Cantidad insuficiente de ADN polimerasa	Optimización de la concentración de polimerasa en la mezcla	No
	Aumentar la cantidad de ADN polimerasa	No
	Aumentar la cantidad de enzima cuando la mezcla poseía o incluía DMSO	No
ADN polimerasa inapropiada	Utilización de ADN polimerasa de alta definición	No
Insuficiente cantidad de MgCl <sub>2</sub>	Optimización de la concentración de MgCl <sub>2</sub> en la mezcla	No
Inhibidores en el agua	Prueba de alícuotas de agua PCR nueva.	No
Falta componentes en la reacción	Repetición de PCR	No
Presencia de inhibidor en la reacción	Preparación soluciones frescas y empleo de tubos nuevos	No
<b>Condiciones de Termociclado</b>		
Temperatura incorrecta de hibridación	Repetición de gradiente térmico y verificación de temperaturas de <i>melting</i> .	No
Insuficiente número de ciclos	Correr la reacción con más ciclos	No

**ANEXO 11**  
**Lesiones macroscópicas destacadas encontradas en las necropsias**  
**realizadas a las aves muestreadas de la provincia de Tungurahua**

Granja*	Resultados IBV	Resultados ILTV	Aerosaculitis	Tonsilas cecales hemorrágicas	Molleja con contenido verdoso	Hemorragias petequiales y edema en el proventrículo	Hemorragias (petequiales y/o equimóticas) en intestinos	Persistencia de oviducto derecho
U5240	+	-	P	P	P	N.O	N.O	P
U5241	+	-	P	P	N.O	N.O	N.O	P
U5242	-	-	P	P	N.O	N.O	N.O	P
U5243	-	-	P	P	P	N.O	N.O	N.O
U5244	-	+	N.O	P	P	N.O	P	P
U5245	-	-	P	P	N.O	P	P	N.O
U5246	-	-	P	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5247	+	-	N.O	P	P	N.O	N.O	N.O
U5248	-	-	P	N.O	N.O	N.O	P	N.O
U5249	-	-	P	N.O	N.O	P	N.O	P
U5250	+	-	P	N.O	N.O	N.O	P	P
U5251	-	-	P	P	N.O	N.O	N.O	P
U5252	-	-	P	N.O	N.O	P	N.O	P
U5253	-	-	P	N.O	P	N.O	N.O	P
U5254	-	-	P	N.O	N.O	N.O	P	N.O
U5255	-	+	P	P	N.O	N.O	N.O	P
U5256	+	-	P	N.O	N.O	N.O	P	N.O
U5257	-	-	N.O	N.O	N.O	P	N.O	P
U5258	-	-	N.O	N.O	N.O	P	N.O	P
U5259	-	-	P	N.O	N.O	N.O	P	P
U5260	-	-	N.O	N.O	P	P	N.O	P
U5261	+	-	P	N.O	N.O	N.O	N.O	P
U5262	+	-	P	P	N.O	P	N.O	P
U5263	+	-	N.O	N.O	N.O	P	N.O	P
U5264	+	-	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5265	-	-	P	P	N.O	P	P	N.O
U5266	-	-	N.O	N.O	N.O	N.O	P	N.O
U5267	-	-	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	P
U5268	+	-	P	N.O	N.O	P	N.O	N.O
U5269	-	-	P	N.O	N.O	P	N.O	N.O
U5270	+	-	P	P	N.O	N.O	N.O	P
U5271	+	-	P	N.O	P	N.O	N.O	P
U5272	+	-	P	N.O	N.O	N.O	P	P
U5273	-	-	P	P	P	N.O	N.O	N.O
U5274	-	-	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5275	-	-	P	N.O	N.O	P	N.O	P
U5276	-	-	P	P	N.O	N.O	N.O	N.O
U5277	-	-	N.O	P	N.O	N.O	N.O	P
U5278	-	+	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	P
U5279	-	-	P	P	N.O	N.O	N.O	N.O
U5280	+	-	P	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5281	+	-	N.O	P	N.O	N.O	N.O	P
U5282	-	-	P	N.O	P	P	P	N.O
U5283	-	-	P	N.O	P	P	N.O	N.O
U5284	+	-	P	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5285	-	-	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5286	-	-	P	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
<b>TOTAL</b>	16	3	33	17	11	14	11	25
<b>PORCENTAJE (%)</b>	34	6,38	70,21	36,17	23,40	29,79	23,40	53,19

P: signos observados

N.O: signos no observados

+: Positivo

-: Negativo

\*Todas las granjas a excepción de la granja U5285 fueron positivas a NDV.

**ANEXO 12**  
**Signos clínicos observados en las aves muestreadas de la provincia de**  
**Tungurahua**

Granja*	Resultados IBV	Resultados ILTV	Mortalidad (%)	Ronquidos, estornudos, estertores	Secreción nasal	Disminución de consumo	Cabeza hinchada	Disminución de postura	Huevos con cáscara defectuosa
U5240	+	-	4	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5241	+	-	17	N.O	N.O	N.O	P	N.O	N.O
U5242	-	-	7	N.O	N.O	N.O	P	N.O	N.O
U5243	-	-	10	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5244	-	+	20	P	N.O	P	P	P	N.O
U5245	-	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5246	-	-	1	P	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5247	+	-	2,22	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5248	-	-	2	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5249	-	-	7	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5250	+	-	2	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5251	-	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5252	-	-	3	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5253	-	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5254	-	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5255	-	+	10	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5256	+	-	NR	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5257	-	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5258	-	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5259	-	-	8	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5260	-	-	5,87	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5261	+	-	2	P	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5262	+	-	10	P	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5263	+	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5264	+	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5265	-	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5266	-	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5267	-	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5268	+	-	2	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5269	-	-	1	P	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5270	+	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5271	+	-	1	P	P	P	P	N.O	N.O
U5272	+	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5273	-	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5274	-	-	1	P	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5275	-	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5276	-	-	3,12	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5277	-	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5278	-	+	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5279	-	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5280	+	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5281	+	-	1	P	N.O	N.O	N.O	N.O	P
U5282	-	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5283	-	-	1	P	P	N.O	N.O	N.O	N.O
U5284	+	-	1	P	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5285	-	-	3	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
U5286	-	-	1	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
<b>TOTAL GRANJAS</b>	16	3	Promedio	10	2	2	4	1	1
<b>PORCENTAJE (%)</b>	34	6,38	1,90	21,28	4,26	4,26	8,51	2,13	2,13

P: signos observados

N.O: signos no observados

NR: no registrada

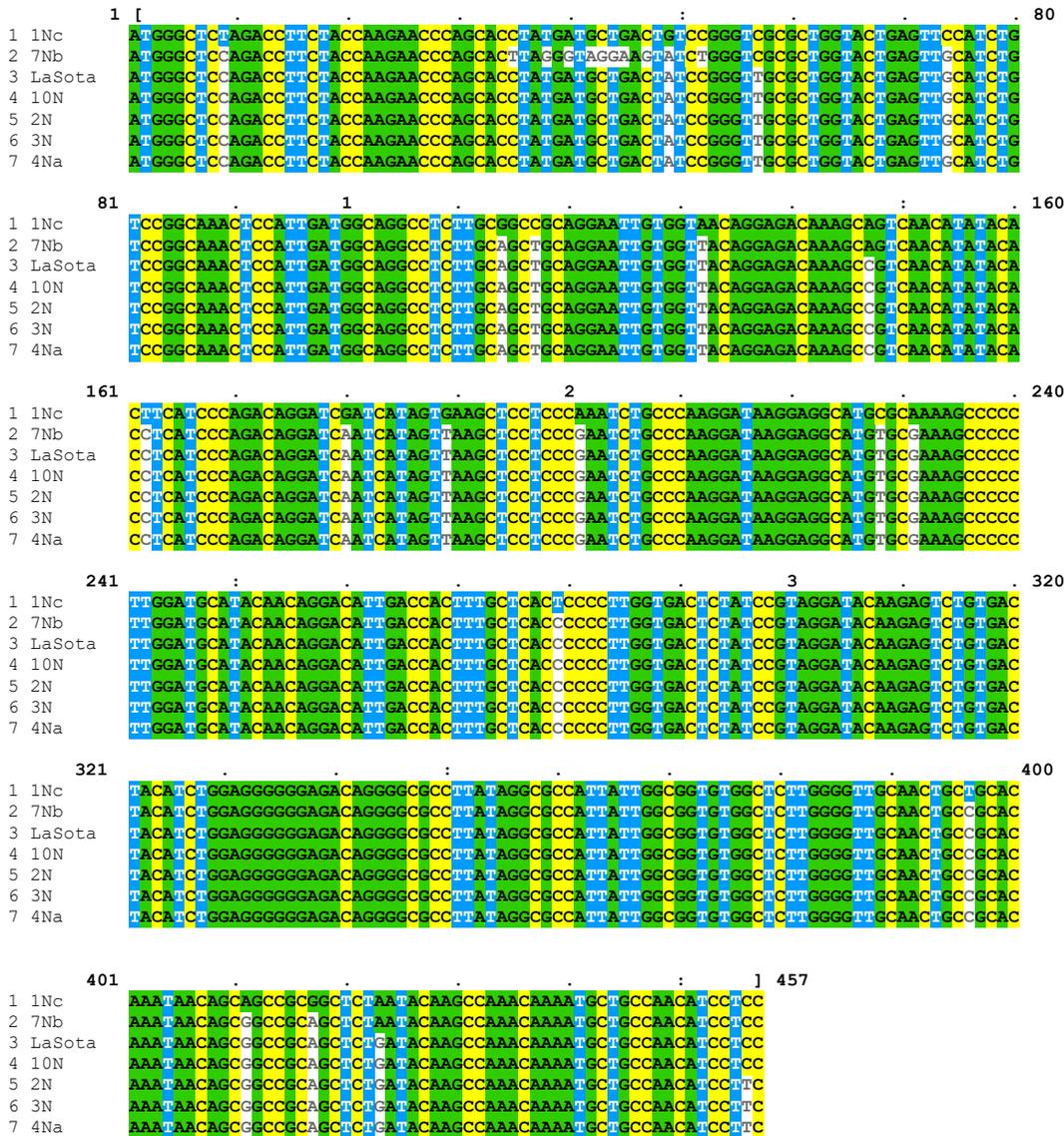
+: Positivo

-: Negativo

\*Todas las granjas a excepción de la granja U5285 fueron positivas a NDV.

### ANEXO 13

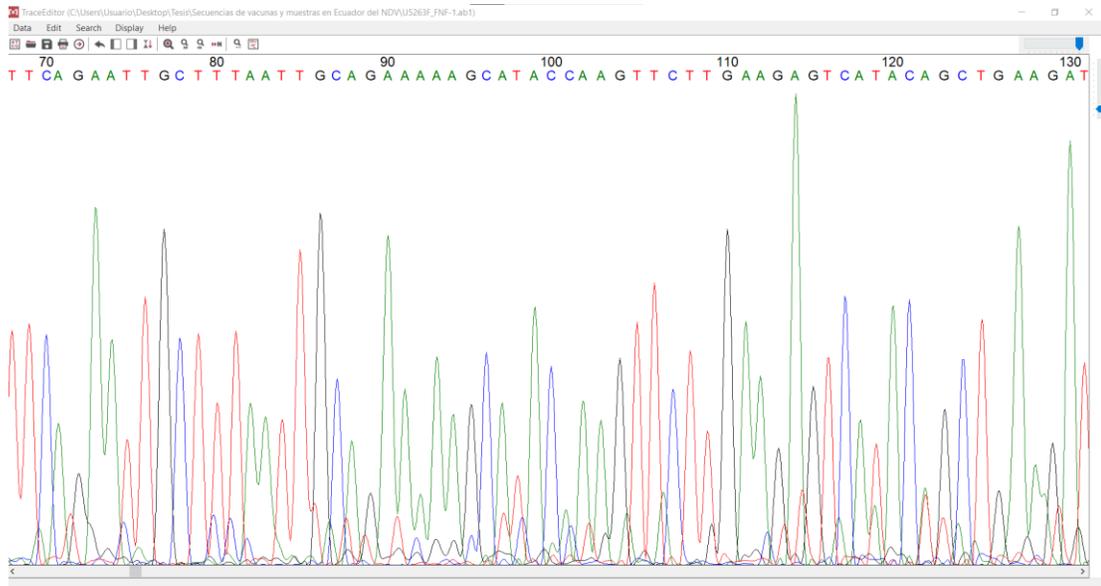
## Alineamiento de secuencias para F parcial combinada de vacunas contra NDV utilizadas en la zona de estudio y la cepa La Sota



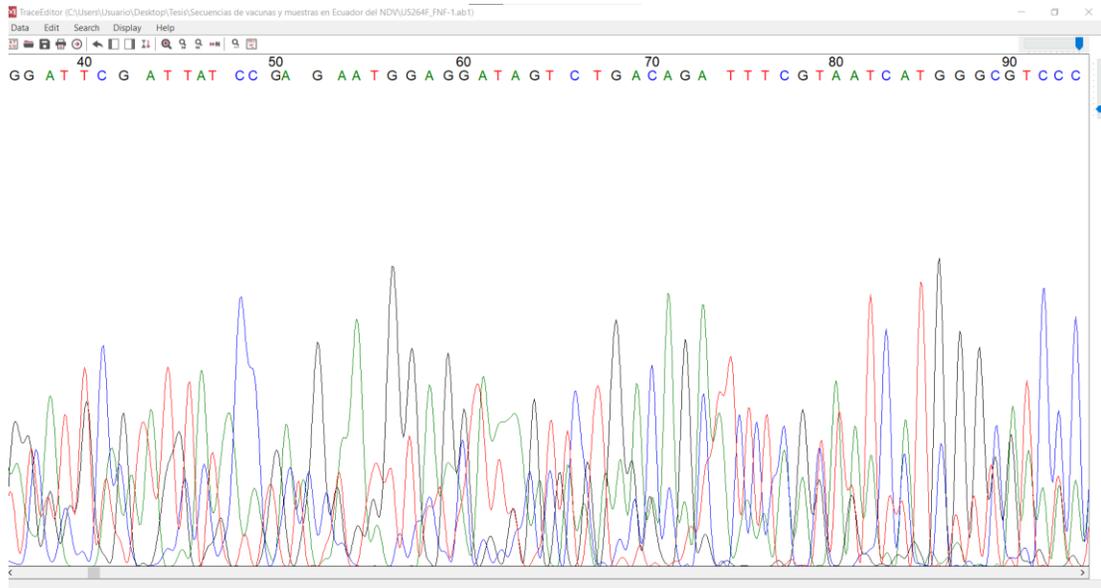
## ANEXO 14

**Ejemplos de cromatogramas de F parcial combinada con cebadores forward para secuencias muestrales**

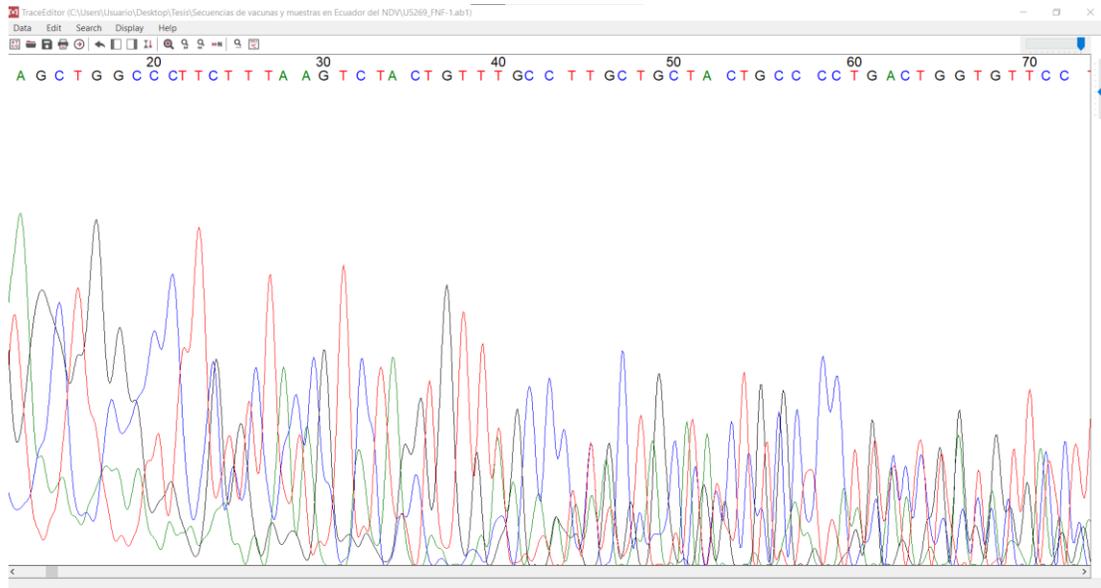
U5269



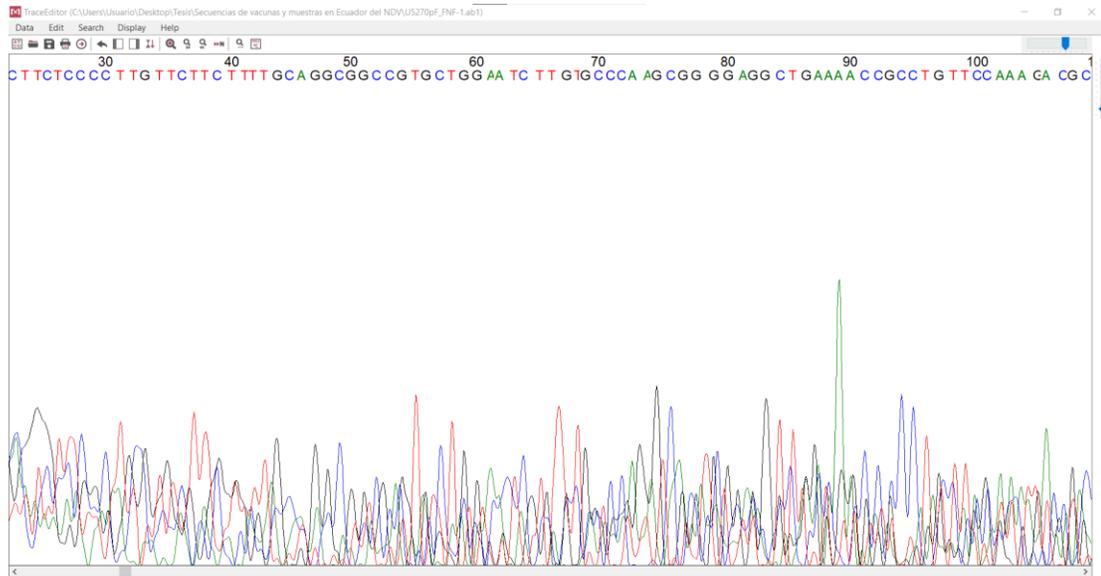
U5270



## U5272



## U5273





321 400

1 Brasil/2002/USP-01  
 2 Cepa-SP-Trachivax  
 3 Cepa-288269/2007-UL24  
 4 Cepa-CH04  
 5 U5244  
 6 U5255  
 7 U5278  
 8 Peru/2008/USP-81  
 9 LT-A  
 10 P1369-TK-UFGM/Brasil  
 11 LTI-IVAX  
 12 Brasil/2007/USP-57  
 13 CEO-vacuna-Merial-UL24  
 14 Cepa-CG  
 15 TCO-vacuna  
 16 US-aislado-632  
 17 CEO-vacuna-Europa  
 18 Nobilis-ILT\_vacuna  
 19 Sharkia-11  
 20 CEO-vacuna-Fort-Dodge-UL24

401 480

1 Brasil/2002/USP-01  
 2 Cepa-SP-Trachivax  
 3 Cepa-288269/2007-UL24  
 4 Cepa-CH04  
 5 U5244  
 6 U5255  
 7 U5278  
 8 Peru/2008/USP-81  
 9 LT-A  
 10 P1369-TK-UFGM/Brasil  
 11 LTI-IVAX  
 12 Brasil/2007/USP-57  
 13 CEO-vacuna-Merial-UL24  
 14 Cepa-CG  
 15 TCO-vacuna  
 16 US-aislado-632  
 17 CEO-vacuna-Europa  
 18 Nobilis-ILT\_vacuna  
 19 Sharkia-11  
 20 CEO-vacuna-Fort-Dodge-UL24

481 560

1 Brasil/2002/USP-01  
 2 Cepa-SP-Trachivax  
 3 Cepa-288269/2007-UL24  
 4 Cepa-CH04  
 5 U5244  
 6 U5255  
 7 U5278  
 8 Peru/2008/USP-81  
 9 LT-A  
 10 P1369-TK-UFGM/Brasil  
 11 LTI-IVAX  
 12 Brasil/2007/USP-57  
 13 CEO-vacuna-Merial-UL24  
 14 Cepa-CG  
 15 TCO-vacuna  
 16 US-aislado-632  
 17 CEO-vacuna-Europa  
 18 Nobilis-ILT\_vacuna  
 19 Sharkia-11  
 20 CEO-vacuna-Fort-Dodge-UL24

561 576

1 Brasil/2002/USP-01  
 2 Cepa-SP-Trachivax  
 3 Cepa-288269/2007-UL24  
 4 Cepa-CH04  
 5 U5244  
 6 U5255  
 7 U5278  
 8 Peru/2008/USP-81  
 9 LT-A  
 10 P1369-TK-UFGM/Brasil  
 11 LTI-IVAX  
 12 Brasil/2007/USP-57  
 13 CEO-vacuna-Merial-UL24  
 14 Cepa-CG  
 15 TCO-vacuna  
 16 US-aislado-632  
 17 CEO-vacuna-Europa  
 18 Nobilis-ILT\_vacuna  
 19 Sharkia-11  
 20 CEO-vacuna-Fort-Dodge-UL24