



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

Identificación de cepas variantes de la enfermedad de la bolsa de Fabricio en el
occidente y centro de México.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable.

PRESENTA:

M.V.Z. E.P.A. Josué Sánchez Morales.

DIRIGIDO POR

M en C. Irma Sánchez Gallegos.

ASESORES

Dr. Carlos Francisco Sosa Ferreira.

Dr. Guillermo de la Isla Herrera.

Dr. Fernando Galindo Ramírez.

Dr. Horacio Zendejas Martínez.

Campus Juriquilla
Querétaro, Qro.
Diciembre 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
 FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
 MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

Identificación de cepas variantes de la enfermedad de la bolsa de Fabricio en el occidente y centro de México.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable.

PRESENTA:

M.V.Z. E.P.A. Josué Sánchez Morales.

DIRIGIDO POR

M en C. Irma Sánchez Gallegos

SINODALES

M en C. Irma Sánchez Gallegos.
 Presidente

Firma

Dr. Carlos Francisco Sosa Ferreira.
 Secretario

Firma

Dr. Guillermo de la Isla Herrera.
 Vocal

Firma

Dr. Fernando Galindo Ramírez.
 Suplente

Firma

Dr. Horacio Zendejas Martínez.
 Suplente

Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca.

Directora de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña.

Directora de investigación y Posgrado
 Centro Universitario
 Querétaro, Qro.
 Diciembre 2016.

RESUMEN

En los últimos años se han presentado brotes atípicos de la enfermedad de la bolsa de Fabricio, en el occidente y centro de México, provenientes de gallinas en postura y pollo de engorda. En el presente trabajo se realizó un muestreo en aves entre 1 y 4 semanas de edad donde se hicieron improntas de bolsas de Fabricio, se tomaron 300 muestras de bolsas de Fabricio para su análisis filogenético, el tamaño de muestra fue calculado con el programa Epidat versión 3.1 con un intervalo de confianza del 95%. Los estudios fueron enfocados en el genoma de la IBDV del segmento A fragmento de la VP2 (proteína viral 2) analizados por medio de RT PCR y secuenciación de aminoácidos. Al situarlo en el árbol filogenético, se detectaron cepas variantes de IBDV donde se identificaron cepas parecidas a las denominadas clásicas pero que muestran mutaciones únicas, así mismo cepas parecidas a la Delaware (Del-E) las cuales también presentan mutaciones, dichos cambios se presume podrían hacerlas antigénicamente diferentes. Estos resultados dan las bases para posteriormente realizar pruebas que confirmen si las vacunas comerciales actuales contra la IBDV confieren protección contra cepas variantes o la realización de una nueva vacuna contra IBDV que confiera protección contra dichas cepas.

Palabras clave: Infección de la bolsa de Fabricio, IBDV, VP2, variantes, mutaciones.

SUMMARY

In the last years have been presented atypical outbreaks of the bursal infection (IBDV, for its acronym in English), in the West and center of Mexico, from laying hens and broilers. The present work was sampled birds between 1 and 4 weeks of age where bursas imprints in FTA cards, there were taken 300 bursa samples or this analysis phylogenetic, the sample size was calculated by the program Epidat version 3.1 by a confidence interval of 95%. The studies were focused on the genome of the IBDV of the segment A, fragment of VP2 (viral protein 2) analyzed by RT PCR and amino acids sequencing. By placing it on the phylogenetic tree, variant strains of IBDV were identified similar to the classic denominated but they show unique mutations, also strains similar to Delaware (Del-E) which also have mutations, those changes are detected and is presumed they could make antigenically different. These results provide the bases for later testing that confirm if the current commercial vaccines confer protection against IBDV variant strains or develop a new vaccine against IBDV to confer protection against these strains.

Keywords: infection Bursa Disease, IBDV, VP2, variants, mutations.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme dar el sustento y determinación para poder concretar esta nueva etapa en mi vida profesional.

A mi Esposa Nohemí por estar siempre a mi lado dándome su apoyo incondicional y ser mi soporte en todo momento.

A mis hijos Leonardo y Natalia, por ser mis motores y mi fuerza para seguir adelante.

A mi padre Jorge y mi madre Susana, por haberme dado los cimientos y consejos en mi vida.

A mis asesores, M en C. Irma Sánchez, Dr. Carlos F. Sosa, Dr. Guillermo de la Isla, Dr. Fernando Galindo, M en C. José Alberto Uribe, Dr. Aristóteles Malo y el Dr. Horacio Zendejas, que me brindaron su guía durante todo el trayecto de mi tesis.

Al Dr. Aristóteles Malo, que me brindó la oportunidad, recursos y guía para realiza el presente trabajo y por su invaluable amistad.

Al Dr. Daral Jackwood, por su guía y participación en los resultados del presente trabajo.

A los doctores de campo y empresas que me apoyaron para realizar el muestreo.

ÍNDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Antecedentes.	4
2.2. Etiología.....	7
2.3. Antigenicidad.	8
2.4. Mecanismos de Patogenicidad.	13
2.4.1. Evidencia de virulencia en otras proteínas virales.	13
2.4.2. Proteínas de la cápside.	14
2.4.3. Patogenicidad en virus mutados.	14
2.4.4. Patogenicidad de otras proteínas.....	15
2.5. Replicación de la enfermedad de la bolsa de Fabricio.....	16
2.5.1. Receptores celulares y penetración del virus.	16
2.5.2. Patogenia.....	16
2.5.3. Signos clínicos y lesiones.	17
2.6. Pruebas moleculares.	23
2.6.1. Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa (RT-PCR).....	23
2.6.2. Secuenciación de aminoácidos.	24

III. OBJETIVOS.....	25
3.1. Objetivo General.....	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
III. HIPÓTESIS.....	26
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
5.1. Extracción de RNA.....	29
5.2. Técnica RT-PCR.....	30
VI. RESULTADOS.....	31
6.1. Tipificaciones.....	31
6.2. Secuenciación de aminoácidos.....	32
VII. DISCUSIÓN.....	38
VIII. CONCLUSIONES.....	41
IX. LITERATURA CITADA.....	42
X. APENDICES.....	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Función de las proteínas de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio.	9
2.	Zonas, distribución de empresas, fin zootécnico y casetas muestreadas.	28
3.	Identificación de cepas variantes, vacúnales y negativas por zonas.	32
4.	Muestra las zonas geográficas con los hallazgos más relevantes de la secuenciación del fragmento de la VP2.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Relación filogenética de cepas procedentes en Latinoamérica.	5
2.	Identificación de cepas variantes de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio en pollo de engorda proveniente del noreste de México.	6
3.	Clasificación de cepas de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio de acuerdo a su antigenicidad y virulencia.	7
4.	Esquema del <i>Avibirnavirus</i> mostrando su genoma de doble cadena y sitio antigénico VP2.	8
5.	Depresión, postración, anorexia, plumas erizadas y renuencia a moverse.	18
6.	Plumas de la cloaca manchadas de heces blanquecinas y uratos aparentes.	18
7.	Comportamiento subclínico de las cepas variantes de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio.	19
8.	Bolsa de Fabricio aumentada de tamaño, edematosa, con exudado gelatinoso.	20
9.	Hemorragias petequiales en la Bolsa de Fabricio.	20
10.	Lesión sero hemorrágica y hemorrágicas severa.	21
11.	Hemorragias en músculos pectorales, abdominales y de los muslos.	21
12.	Riñones afectados por una diátesis severa de uratos.	22

13.	Bolsas de Fabricio afectadas por cepas variantes las cuales presentan edema, hemorrágicas de leves, moderadas y severas.	22
14.	Impronta de la bolsa de Fabricio en la tarjeta FTA.	29
15.	Secuenciación de Aminoácidos comparativa entre cepas variantes y cepas control de la enfermedad de la bolsa de Fabricio.	33
16.	Muestra los cambios en los aminoácidos específicamente de las posiciones 253, 279 y 284.	34
17.	Árbol filogenético mostrando las variantes de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio.	36

I. INTRODUCCIÓN.

En la última década se han registrado brotes atípicos de la enfermedad de la bolsa de Fabricio, provenientes de dos zonas consideradas con alta población como lo es el occidente y centro de México, esto se ha detectado incluso en aves inmunizadas con vacunas elaboradas de cepas clásicas y recombinantes (Jackwood et al., 2014). Estos hallazgos se convierten en una problemática importante para la avicultura, donde cabe la posibilidad de que estén circulando cepas variantes no identificadas como están siendo reportadas en diversos países.

Países miembros de la OIE (por sus siglas en inglés World Organisation of Animal Health), han reportado la presencia de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio muy virulenta (vIBDV) basado en investigaciones patológicas y moleculares provenientes del campo. Un estudio de epidemiología molecular global de la enfermedad de la bolsa de Fabricio procedente de los cuatro continentes incluyendo África demostró que el 60-67% eran aislamientos de cepas muy virulentas. (Nagash et al., 2013).

La enfermedad de la Bolsa de Fabricio, también conocida como la enfermedad de Gumboro e Infección de la Bolsa de Fabricio, es una infección viral aguda y altamente contagiosa de las aves jóvenes, que afecta principalmente a los tejidos linfoides (linfocitos “B” inmaduros) alojados en la Bolsa de Fabricio. Esta enfermedad tiene gran importancia económica porque puede ocasionar mortalidad elevada, sin embargo, lo más relevante es la capacidad que presenta el virus para provocar inmunosupresión, lo que facilita la aparición de otras enfermedades, exacerbando reacciones post vacúnales, falla en la respuesta de las vacunas y bajo rendimiento productivo en general. El agente causal es un virus miembro de la familia Birnaviridae y género Avibirnavirus. Tienen un genoma ARN de doble cadena bisegmentado. Esto es importante porque las mutaciones en los virus ARN son más frecuentes que en los virus ADN. Como resultado, los tipos antigénicos y patogénicos de la enfermedad de la bolsa de Fabricio, han evolucionado considerablemente desde que se identificó por primera vez hace aproximadamente 50 años (Jackwood et al., 2014). Desde la década de 1980 se

han identificado numerosas cepas antigénicas de los virus del serotipo I que es el causante de la enfermedad en aves (Jackwood et al., 2011).

Se han observado desafíos en animales vacunados con vacunas vivas comerciales, donde posiblemente existe un riesgo de reversión a la enfermedad de la Bolsa de Fabricio más virulentos de virus recombinantes por intercambio de segmentos virales entre la enfermedad de la Bolsa de Fabricio vacunal y de campo (Nagash et al., 2013).

Al realizar un análisis filogenético, de dos estudios enfocados en el genoma de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio del segmento A fragmento de la proteína viral 2 que de ahora en adelante le llamaremos (fracción VP2) y al situarlo en el árbol filogenético, se encontraron incongruencias que indican una fuerte recombinación entre cepas muy virulentas y virus vacúnales en el periodo del 2001-2011 de aves comerciales localizadas en Colombia y Venezuela (Jackwood et al., 2014). En diversos estudios, la alineación de nucleótidos y las secuenciaciones de aminoácidos ha demostrado ser una herramienta diagnóstica confiable para revelar los segmentos del genoma, situar al virus en el árbol filogenético y diferenciar nuevas cepas circulantes (Cui et al., 2013). Estos estudios evidencian el cambio genético del virus de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio, en diversos países, lo que ha propiciado que las vacunas actuales posiblemente confieran una protección parcial, contra las nuevas cepas variantes circulantes en el campo, aunado a la importación de huevo embrionado a México, proveniente de países que aparentemente no vacunan contra la enfermedad de la Bolsa de Fabricio, dando como resultado aves sin anticuerpos maternos que son expuestas a zonas de alto riesgo a edades tempranas (1-3 semanas) donde la enfermedad de la Bolsa de Fabricio ataca a los linfocitos B, causando un daño inmunológico severo. Se han observado aves desafiadas por cepas variantes de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio aparentemente normales que presentan daños leves en la bolsa de Fabricio, así como, aves con signos agudos severos de cepas variantes clasificadas como muy virulentas (Jackwood et al., 2014). Por tal motivo, en el presente trabajo se realizaron estudios de reacción en cadena de la

polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR del inglés Reverse transcription polymerase chain reaction), secuenciación de aminoácidos y lineamiento de la fracción VP2 de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio, para determinar si actualmente existen variantes de dicha enfermedad en el Occidente y centro de México.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 . Antecedentes.

Cuando la enfermedad de la Bolsa de Fabricio apareció en 1962 (Cosgrove et al., 1962), la enfermedad fue señalada como "Enfermedad de Gumboro" pertenece a la familia Birnaviridae y género Avibirnavirus (Hitchner et al., 1970), después haber ubicado la zona geográfica de los primeros brotes registrados. Las infecciones provocadas por la enfermedad de la Bolsa de Fabricio pueden exacerbar otras enfermedades concomitantes y reducir la capacidad de la respuesta vacunal. Las células linfoides de la bolsa de Fabricio son las células blancas del serotipo I, el serotipo II hasta el momento no se ha registrado como patógeno o que causa daño. (Jacwood et al., 2014). Las aves se muestran susceptibles a la enfermedad entre las 3 y 6 semanas de edad en el caso de gallinas. La infección produce agotamiento linfoides y la destrucción de la Bolsa de Fabricio. En la forma clásica de los brotes, la tasa de mortalidad puede variar de 1 a 50%. En pollos de engorde, pueden provocar infecciones hasta un 50% la morbilidad. En pollitas de reemplazo, las pérdidas pueden alcanzar hasta un 20% en parvadas susceptibles. También se observa la caída en la producción de huevos y deterioro en la calidad del cascarón en ponedoras comerciales. Además de la mortalidad, la enfermedad de la Bolsa de Fabricio es un agente inmunosupresor. En pollos de engorde, la inmunosupresión se denota por una alta prevalencia de infecciones respiratorias de origen viral y una elevada mortalidad debido a aërosaculitis y colisepticemia al término del ciclo entre la 6 y la salida del pollo. (Müller et al., 2003).

Aproximadamente hace 30 años, se caracterizaron los virus del serotipo I en dos grupos antigénicos conocidos como clásicos y variantes. Hoy se han descrito varios subtipos antigénicos dentro de los grupos clasificados como clásicos; por ejemplo, las cepas Winterfield y Lukert, de estas cepas, se han derivado nuevos virus con variantes antigénicas provenientes de las cepas

clásicas Delaware y Winterfield (Jackwood et al., 2014). Las cepas clásicas y las cepas variantes están localizadas en dos ramas diferentes del análisis filogenético de la región hipervariable localizada en la proteína viral 2 (hvVP2); también se han clasificado cepas muy virulentas, dichas caracterizaciones se observan en la figura 1 (Villegas et al., 2006).

Caracterizaciones de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio

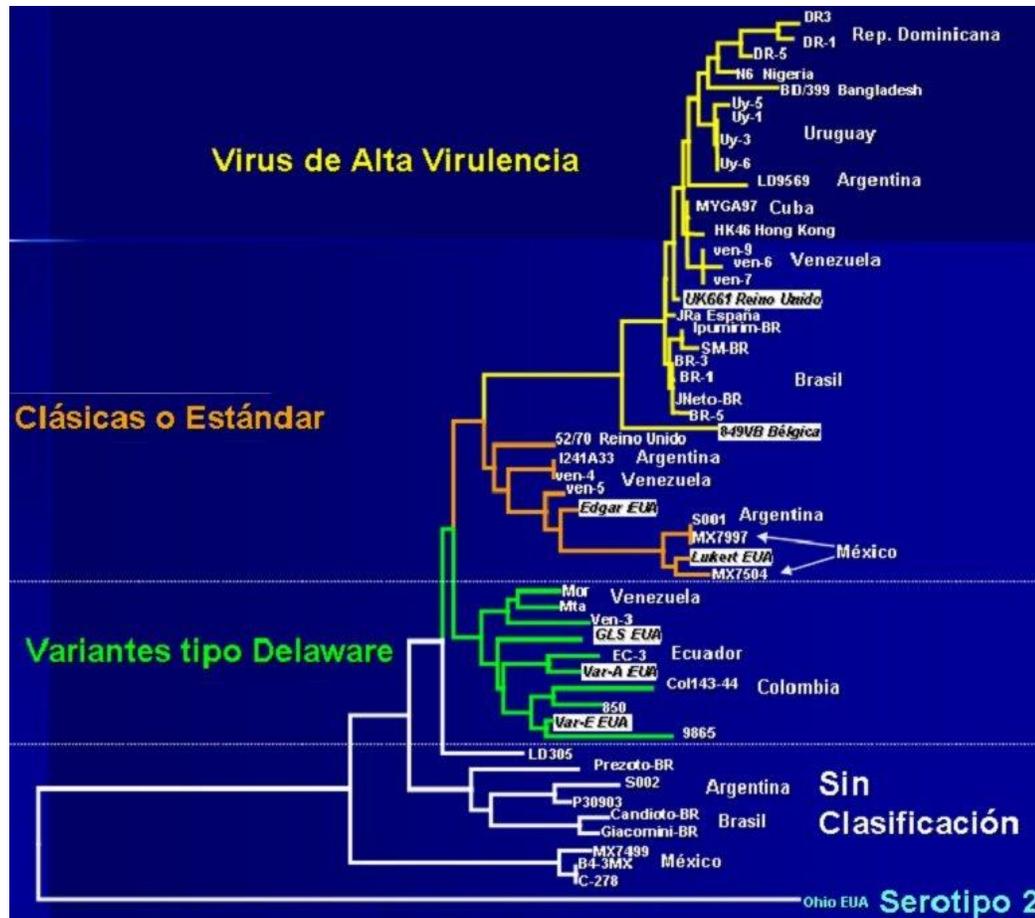


Figura 1. Relación filogenética de cepas procedentes en Latinoamérica (Villegas et al., 2006).

En investigaciones realizadas durante el 2008 el doctor Valladares y colaboradores, estudiaron muestras de 30 granjas de pollo de engorda del noreste de México, para identificar y tipificar los virus de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio en esta zona, por medio de RT-PCR se detectaron 28 cepas de la IBDV. El análisis de las secuencias de nucleótidos determinó que 21 virus mostraron

características genéticas de los virus variantes tipo Delaware “E”. El análisis filogenético de la región híper variable de la VP2 indicó que estos virus son genéticamente similares al virus 11153 USA (por sus siglas en inglés United States of America), que fue aislado en Georgia, USA en el año 2001. Dichas cepas variantes se muestran en la Figura 2, denominadas cepas variantes de la Infección de la Bolsa de Fabricio (Valladares *et al.*, 2008).

Cepas variantes tipo Delaware localizadas en el Noreste de México

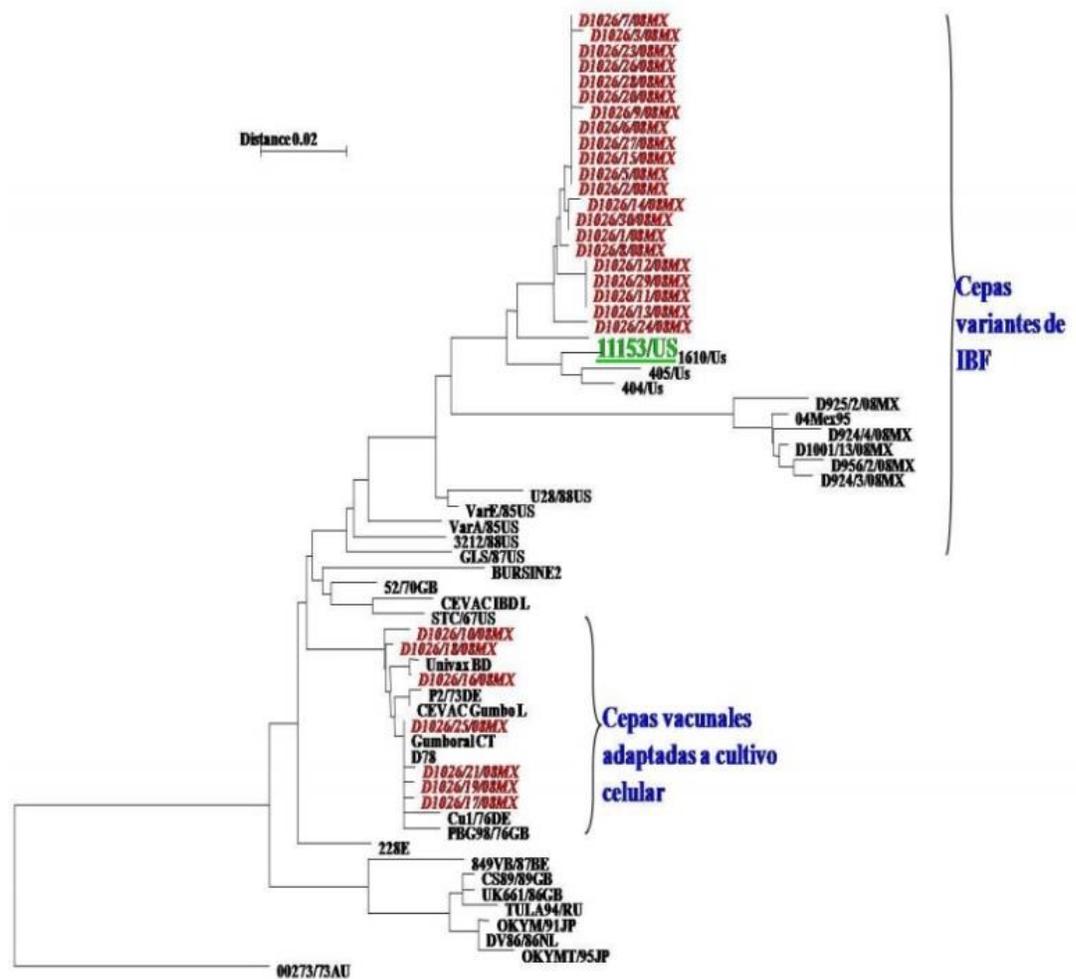


Figura 2. Identificación de cepas variantes de la infección de la Bolsa de Fabricio en pollo de engorda proveniente del noreste de México (Valladares *et al.*, 2008).

2.2 Etiología.

El virus de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio, pertenece al género *Avibirnavirus* de la familia *Birnaviridae*, en dicho virus se reconocen dos serotipos denominados I y II, sin embargo, sólo el serotipo I es considerado patógeno para las aves. El serotipo I comprende subtipos clásicos y variantes, los virus clásicos fueron aislados y caracterizados desde 1980, los virus que no pertenecían a esta clase fueron determinados como virus antigénicamente diferentes de los clásicos denominados como virus variantes. Existe un tercer grupo identificado acorde a su patogenicidad, este grupo está clasificado como muy virulento (wIBDV) ya que puede causar alta mortalidad en aves susceptibles, lo antes mencionado se muestra claramente en la Figura 3. (Jackwood y Sommer, 2007) (Picoux *et al.*, 2014).

Clasificación de las cepas de la bolsa de Fabricio



Figura 3. Clasificación de cepas de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio de acuerdo a su antigenicidad y virulencia (Jackwood y Sommer, 2007).

2.3 Antigenicidad.

Su genoma consta de dos segmentos, A y B, del ARN que se encuentra dentro de una capsula icosaédrica en forma de partículas, con un diámetro de 65 a 70 nm. El segmento A es el más grande, el cual codifica una poli proteína de aproximadamente 110 kDa que es una fracción proteolítica de la *proteasa viral* la cual forma proteínas virales (VP) VP2, VP3, y VP4, lo antes mencionado se esquematiza en la Figura 4.

Esquema de *Avibirnavirus*

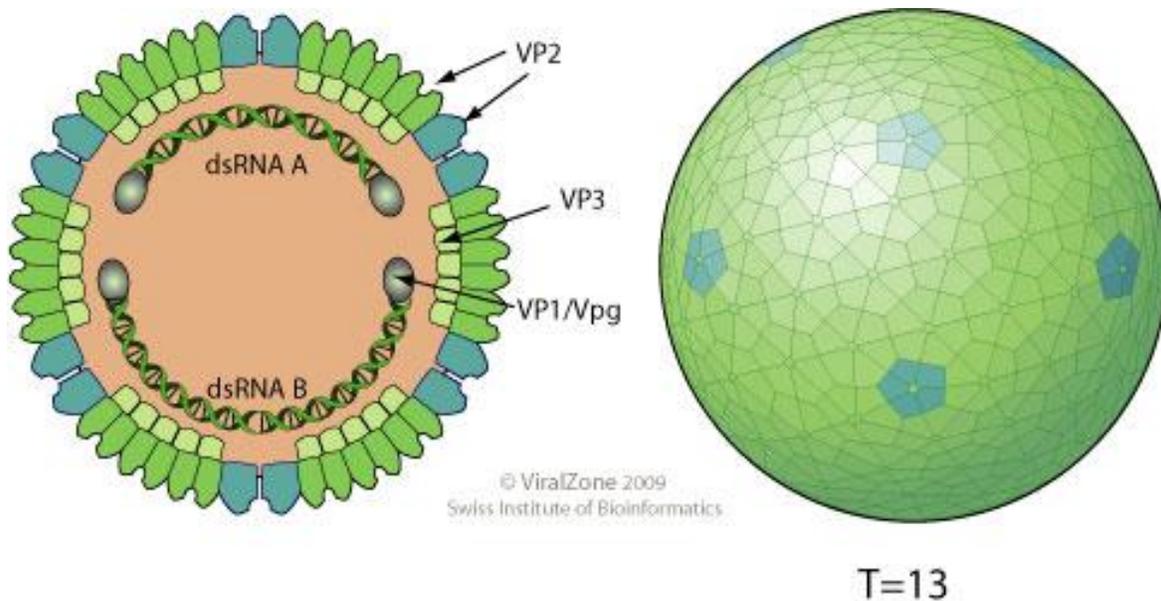


Figura 4. Esquema del *Avibirnavirus* mostrando su genoma de doble cadena y sitio antigénico VP2. (Swiss Institute of Bioinformatics, 2009).

Las funciones de las proteínas virales de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Función de las proteínas de la enfermedad de la bolsa de Fabricio.

Proteínas	Funciones
VP1	Contiene la polimerasa viral. Determina la virulencia.
VP2	Unión de receptor. Contiene epítomos neutralizantes. Determina la Virulencia. Da la adaptación a la célula. Da la Apoptosis. Da la actividad de la endoperoxidasa.
VP3	Actividad supervisora. Actividad Antiapoptosis. Suprime el mecanismo de la célula anfitriona escondiendo el ARN viral. Activa la transcripción. Forma complejos de ribo proteínas.
VP4	Activa los procesos de la proteína viral. Active la síntesis de VP1. Suprime el interferón tipo I.
VP5	Da los efectos tempranos y tardíos antiapoptóticos.

(Nagash *et al.*, 2013).

El gen que contiene la poli proteína, codifica la VP5, que ha sido detectada en aves infectadas con la enfermedad de la Bolsa de Fabricio, en células de embrión y en células bursales de aves (Saif *et al.*, 2003).

El segmento del genoma A contiene una poli proteína (PP) (NH₂-pVP2-VP4-VP3-COOH), la cual es desdoblada por una proteasa viral para dar origen a la VP2, VP3 y VP4. La VP2 presente en la precápside sufre una diferenciación derivada de la acción por la proteasa viral VP4 que modifica a la puromicina aminopeptidasa y por la actividad endopeptidasa de la VP2 para liberar la proteína VP2 madura. A partir de este proceso otros péptidos pequeños son liberados como lo es el pep46 fuertemente asociado a la cápside. El Péptido 46 (pep46) tiene una molécula (N), la cual es considerada como el responsable de la penetración del virus en el citoplasma de la célula infectada, asimismo contiene una terminal (C) el cual ayuda a aumentar el tamaño del poro para mejorar la entrada del virus en las células infectadas (*Galloux et al.*, 2010; *Irigoyen et al.*, 2012).

Cepas variantes de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio han sido capaces de causar la enfermedad en aves, con presencia de anticuerpos maternos altos, contra las cepas clásicas del serotipo I. Una prueba de virus suero neutralización (VSN) muestra una habilidad restringida de los anticuerpos generados por las cepas clásicas de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio para neutralizar las cepas variantes. La proteína VP2 (con 442 aminoácidos) es el único componente de la cápside viral icosaédrica y la única proteína viral reconocida por los anticuerpos neutralizantes.

La estructura cristalina de la VP2 se compone de tres dominios, la base (B), escudo (S) y los dominios de proyección (P) (*Letzel et al.*, 2007). Los dominios (B) y (S) están formados por la molécula (N) y la terminal (C). Los dominios de proyección (P) forman la porción variable de la región hipervariable (hVP2) (206 a 350 aminoácidos) y parte central que contiene el receptor de la célula huésped. La región hipervariable de la (hVP2) está conformada por picos hidrofílicos considerados la principal zona antigénica (A) y (B) los cuales conforman bucles y picos hidrofílicos (*Coulibaly et al.*, 2005; *Garriga et al.*, 2006).

La cápside externa de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio se compone de 260 picos formados por el dominio P de la VP2 proyectados en la cápside organizados en 13 icosaedros, dicha organización interactúa de manera electrostática con la VP2, VP3 y los sitios C terminales (Saugar *et al.*, 2010). Los primeros cinco ácidos del sitio C terminal interactúan con la VP2 durante la morfogénesis para que el montaje en la cápside sea correcto. Los dieciséis residuos restantes del sitio C terminal de la VP3 interactúan con la VP1 para que se de la unión del RAN genómico y la VP1 forme la ribonucleoproteína del complejo (Chevalier *et al.*, 2004; Saugar *et al.*, 2005; Luque *et al.*, 2009). La proteína VP2 madura es expresada como una proteína recombinante formada por una partícula subviral la cual contiene 20 trímeros en forma tubular localizada en la precápside (Caston *et al.*, 2001; Garriga *et al.*, 2006).

Los últimos 5 ácidos residuales de la C terminal correspondientes a la VP3 interactúan con la precápside de la VP2 durante la morfogénesis para que se dé un correcto ensamble. Los dieciséis C terminales de la VP3 interactúan con la VP1 para construir la doble cadena de RNA y dar la forma del complejo de ribonucleoproteínas (Maraver *et al.*, 2003; Garriga *et al.*, 2007).

La proteína VP5 está asociada a la membrana viral de origen proteico, compuesta por una N terminal citoplásmica y una C terminal extracelular llamada dominio (Lombardo *et al.*, 2000).

El segmento B codifica la polimerasa presente en el virión ligada al genoma que forma la región cristalizada de la VP1. La VP1 tiene 3 dominios, la central denominada N terminal, (aminoácido 1-167) polimerasa (aminoácido 168-658) y el dominio C terminal (aminoácido 659-878). El dominio N terminal de la VP1 está envuelta en una lipoproteína. El dominio de la polimerasa se pliega para formar la estructura que conforma la RNA polimerasa semejanado una mano (los dedos y la palma), donde se encuentran las cinco estructuras (C, A, B, D, E y F), cada una tiene una función específica durante la replicación del virus, por ejemplo el A, B y F hacen reconocimiento de nucleótidos y de unión, las estructuras A y C se

encargan de la transferencia de grupos fosforilados unidos a un ion de metal como él (Mn²⁺), la región C de manera individual es el encargado de formar el sitio activo donde va a actuar la polimerasa, la D es responsable de dirección de nucleótidos y sitios activos, la E lo marca los nucleótidos para ser acarreados. Los subdominios F y G que se encuentran en los dedos, participan en la replicación del virus (Pan *et al.*, 2007).

Letzel *et al.* en el 2007 realizo estudios indican que las regiones hidrofílicas A (aminoácido 212-224) y B (aminoácido 314-325) pueden formar parte de los epítomos que bloquean los anticuerpos maternos (AM). Existe evidencia experimental donde los anticuerpos maternos están asociados con las regiones hidrofílicas de las cepas variantes encontradas en la VP2 de las regiones A y B. Aunado a esto en un estudio donde se realizó la secuenciación de los sitios o bucles denominados (PBC) y (PHI) se demostró que estos forman un papel crítico para evadir a los anticuerpos maternos que pretenden neutralizar a los virus de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio variantes (Letzel *et al.*, 2007).

En la parte superior del dominio P, se encuentran lazos denominados bucles de (PDE) y (PFG) con (aminoácido 253 y 284) respectivamente, los cuales desempeñan papeles importantes en la infectividad del virus, esto demostrado en cultivo celular y pruebas de patogenicidad en pollos. (Letzel *et al.*, 2007).

Por tal motivo el fenotipo antigénico de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio está determinado por la región hipervariable de la secuencia de la VP2 (hvVP2). La estructura cristalina de la VP2 identifica cuatro estructuras hipervariables que fueron señaladas como la (PBC, PDE, PFG y PHI). Las características antigénicas de enfermedad de la bolsa de Fabricio son controladas por aminoácidos específicos en el ápice de la VP2 (Jacwood *et al.*, 2014).

Estudios han demostrado que varios mecanismos evolutivos son utilizados por la enfermedad de la Bolsa de Fabricio para cambiar los aminoácidos en estas

estructuras bucle. Las mutaciones de la sustitución del aminoácido en los dominios de PBC y PDE han contribuido a la diversidad antigénica entre las cepas. Al examinar los aminoácidos 222 y 254 de la cepa variante Del-E, encontraron que solo un aminoácido presentó mutaciones en ambos sitios afectando profundamente su antigenicidad (Jacwood *et al.*, 2014).

Las estructuras de bucle en la proteína viral VP2 han mutado mediante recombinación homóloga. Este es un evento que ocurre cuando diferentes cepas infectan la misma célula huésped. La coinfección proporciona una oportunidad para romper los segmentos del genoma y recombinar. Cuando esto ocurre dentro de la región hipervariable de la (hvVP2), la estructura antigénica del virus puede ser afectada (Nagash *et al.*, 2013).

2.4 Mecanismos de Patogenicidad.

Los mecanismos de patogenicidad se considera el proceso por el cual el virus infecta a la célula e inicia el ciclo de replicación viral. Estudios han revelado que el segmento A es el principal determinante de la virulencia del virus sin embargo estudios moleculares orientan a que existe sinergismo entre ambos segmentos del virus (Escaffre *et al.*, 2012).

2.4.1 Evidencia de virulencia en otras proteínas virales.

Con el fin de localizar los determinantes moleculares de la virulencia entre el segmento A y B de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio, se secuenciaron varias cepas muy virulentas (vIBDV), enfocados a los aminoácidos relacionados al sitio de maduración de la VP2 localizada en la precápside (aminoácidos 441-442) cercanos de la VP2-VP4 (aminoácidos 512-513) así como de la VP4-VP3 (aminoácidos 755-756), del extremo C terminal. Al analizar una cepa muy virulenta denominada UK661 se detectó que en el sitio activo de la VP4 una proteasa contribuía a la virulencia, tomando en cuenta que la VP1 y VP2 son las

encargadas de determinar la virulencia viral. Estos hallazgos determinaron que el virus había sufrido una mutación acelerando la actividad proteolítica de la VP4, la maduración de la VP2 y mejorando eficiencia de ensamblaje de la cápside; dando como resultado una mayor replicación viral (Xia *et al.*, 2008; Chevalier *et al.*, 2004).

2.4.2. Proteínas de la cápside.

Estas proteínas se encuentran expuestas en la superficie del virión las cuales contribuyen a la virulencia de la VP2 de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio. Existe evidencia en cepas wIBDV de a.á. que definen la virulencia ubicados en la región hipervariable de la VP2, así mismo haciendo uso de genética reversa, en cultivo celular se han detectado a.á. de esta región, los cuales se presume son los responsables de la adaptabilidad, virulencia y tropismo del virus (Islam *et al.*, 2001).

2.4.3. Patogenicidad en virus mutados.

Se han detectado mutaciones en los aminoácidos de las posiciones 253,279 y 284 que conforman la VP2 en cepas muy virulentas, las cuales fueron adaptadas y sometidas a varios pases en cultivo celular donde fueron bajando su patogenicidad al ser inoculadas en pollos de engorda. Sin embargo, se ha demostrado que una simple mutación en los aminoácidos específicamente de la posición 253 puede incrementar o bajar la patogenicidad del virus (Loon *et al.*, 2002; Jacwood *et al.*, 2008).

Existe evidencia que el segmento B juega un papel muy importante en la patogenicidad. Aislamientos de campo donde se consideró analizar el segmento A y B se encontraron cepas atenuadas con patogenicidad reducida mostrando el mismo comportamiento al ser utilizadas para pruebas de desafío en comparación con cepas muy virulentas (Nouen *et al.*, 2006; Boot *et al.*, 2005). Lo anterior se comprobó al usar un virus modificado genéticamente donde insertaron el gen de la

VP2 de una cepa muy virulenta a un virus de baja patogenicidad, este virus no causo morbilidad y mortalidad en aves SPF (libres de patógenos específicos, por sus siglas en inglés). Sin embargo, si el virus modificado contiene el segmento típico B que determina la patogenicidad de una cepa muy virulenta, el virus podría exacerbar la mortalidad y morbilidad (Vakharia *et al.*, 2004).

La presencia de treonina en la posición 276 en la región hidrófoba del dominio ubicada en los dedos de la VP1, contribuye a disminuir la patogenicidad del virus, cuando existen cambios en los aminoácidos ubicados en la posición 276 se han observado que la patogenicidad del virus se restaura (Escaffre *et al.*, 2012).

2.4.4. Patogenicidad de otras proteínas.

Se cree que la VP5 juega un papel importante en la patogenicidad de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio, al momento de que el virus se está replicando en su célula huésped, se puede encontrar gran presencia de VP5 en la membrana de las células infectadas, al mismo tiempo está haciendo su acción antiapoptótica para evitar que las células hospedadoras se auto destruyan para evitar la replicación viral, después de que el virus se replicó, la VP5 induce la apoptosis. Así mismo juega un papel importante en la liberación del virus a partir de células infectadas mediante la activación de la muerte celular (Wu *et al.*, 2009; Vakharia *et al.*, 2006).

Cuando se produce la infección con la enfermedad de la bolsa de Fabricio, inmediatamente se induce la activación de la fosfatidilinositol 3- quinasa, durante la fase temprana de replicación al mismo tiempo suprime la apoptosis celular, para sostener la replicación del virus dando como resultados grandes cantidades de virus los cuales salen por medio del canal aniónico 2 (CA2) y la acción de la VP5. El bloqueo del canal aniónico dos es inducido por fragmentos de RNA de interferencia que evitan la apoptosis inducida por la enfermedad de la Bolsa de

Fabricio y reduce la liberación viral. Cuando la fosfatidilinositol 3-quinasa es inhibida las células infectadas entran de inmediato a una fase de apoptosis (Wei *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Shoshan *et al.*, 2010).

2.5. Replicación de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio.

2.5.1. Receptores celulares y penetración del virus.

El virus de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio se une a sus receptores celulares como el polipéptido N-glicosilada contenidos en la membrana celular de linfocitos B (LB) e inmunoglobulinas M (IgM). El péptido 46 asociado a la cápside externa del virus, forma poros en el citoplasma de las células infectadas para facilitar la entrada del virus al interior de la célula. La interacción de las partículas sub virales derivadas de la VP2 con la proteína de choque térmico 90 expresada en la superficie de la célula hospedadora al momento de la unión de receptores virus – huésped, puede ser bloqueada por micro RNA's interferentes ocasionando una reducción en la excreción viral. Por otro lado, la unión de la VP2 con partículas sub virales más la integrina $\alpha 4\beta 1$ ayudan a la unión con la célula hospedadora, esta integrina forma parte de todas las cepas de la enfermedad y también de los LB inmaduros. Si llegara a ocurrir una mutación en la integrina podría dejar sin efecto la unión de las partículas virales a la célula hospedadora (Luo *et al.*, 2010; Galloux *et al.*, 2007; 2010; Yip *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2007; Delgui *et al.*, 2009; Rose *et al.*, 2002).

2.5.2. Patogenia.

La infección se produce por vía oral naturalmente, otras vías de infección comprobadas son las mucosas. Las células fagocíticas mononucleares y células linfoides presentes en la mucosa del intestino sirven como células diana para la infección y replicación de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio. Los macrófagos infectados transportan el virus de la bolsa de Fabricio el cual es considerado el

órgano principal para la replicación esto sucede directamente en el citoplasma de los linfocitos B inmaduros. El virus se difunde a otros órganos linfoides tales como timo, médula ósea, bazo, placas de Peyer, tonsilas cecales y glándulas de Harder. En aproximadamente 48 horas post infección, la enfermedad induce inflamación severa de la bolsa de Fabricio. Entre el día 7 y el 21 post infección, la bolsa de Fabricio muestra depleción linfoide significativa. Los macrófagos se infectan por lo tanto se ve disminuida su capacidad fagocítica. Otras células de la médula ósea pueden estar infectadas como las células madres o mesenquiales. Las células hematopoyéticas presentes en el bazo, resultan ser más susceptibles a la enfermedad, el centro germinal y la pulpa roja presenta cierta resistencia. Las secuelas que deja la enfermedad de la Bolsa de Fabricio van desde signos clínicos, lesiones en órganos e inmunosupresión el cual está relacionado con el estado de inmunidad, edad y virulencia del virus (Williams *et al.*, 2005; Kabell *et al.*, 2006; Petkow *et al.* 2009; Khatri *et al.*, 2009; Biro *et al.*, 2012).

La infección ocasionada por una cepa muy virulenta, desencadena una mayor producción de Interferón- γ (INF- γ) proveniente de la bolsa de Fabricio. Los linfocitos T se infiltran a la bolsa de Fabricio durante la infección aguda, activan a los macrófagos y liberan citoquinas pro inflamatorias tales como interleuquina tipo 6 (IL-6) y el óxido nítrico agrava lesiones en la bolsa de Fabricio. El Interferón- γ induce la apoptosis de los linfocitos B sanos, infectados o adyacentes. Los mastocitos en aves infectadas con cepas muy virulentas son capaces de desatar una respuesta de hipersensibilidad aguda. La bursitis esta mediada por citoquinas causando inmunosupresión a edad temprana (Rautenschlein *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; 2012; Aricibasi *et al.*, 2010).

2.5.3. Signos clínicos y lesiones.

Las aves infectadas entre tres y seis semanas de edad desarrollan los signos clínicos, los signos clínicos se ven entre los dos y tres días post infección, caracterizado por depresión severa, diarrea blanquecina y plumas

erizadas, como se muestran en la figura 5 y 6 (Eterradossi *et al.*, 2008) (Picoux *et al.*, 2014) (Jacwood *et al.*, 2014).

Signos clínicos durante la fase aguda de la enfermedad



Figura 5. Depresión, postración, anorexia, plumas erizadas y renuencia a moverse. (Jacwood *et al.*, 2014) (Picoux *et al.*, 2014).

Presencia de Diarrea Blanquecina



Figura 6. Plumas de la cloaca manchadas de heces blanquecinas y uratos aparentes. (Picoux *et al.*, 2014)

La enfermedad tiene dos formas de presentación: clínica y subclínica, que están determinadas por la edad cuando ocurre la infección, por la virulencia de la cepa viral involucrada y por el grado de inmunidad de las aves infectadas. En Latinoamérica y en los Estados Unidos la presentación más importante de la enfermedad ocurre como un cuadro subclínico. Esta presentación cursa con

atrofia severa e irreversible de la bolsa de Fabricio, lo que genera un estado permanente de inmunodepresión que produce fallas vacúnales y un incremento en la susceptibilidad hacia las enfermedades infecciosas (colibacilosis, coccidiasis, hepatitis con cuerpos de inclusión, enfermedad de Marek, etc.). La inmunodepresión que se presenta es debida a defectos en la inmunidad humoral y en la producción de anticuerpos; los efectos sobre la inmunidad celular son leves y transitorios. La gravedad del daño sobre el sistema inmune depende del momento de la vida del ave en el que ocurre la infección, entre más joven sea el ave la inmunodepresión resultante será más severa (Villegas *et al.*, 2006).

La forma subclínica de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio se produce por la infección de cepas variantes usualmente en aves menores a tres semanas de edad. Infecciones por cepas clásicas de virulencia moderada pueden también causar la forma subclínica de la enfermedad, sobre todo en aves infectadas menores a dos semanas de edad como se muestra en la figura 7 (Jacwood *et al.*, 2014).



Figura 7. Comportamiento subclínico de las cepas variantes de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio. (Jacwood *et al.*, 2014).

El diagnóstico del cuadro subclínico de la infección de la Bolsa de Fabricio basado en los signos es difícil ya que no hay signos específicos de la enfermedad; sin embargo existen indicadores generales que sugieren un problema de inmunodepresión en la parvada, como son los parámetros productivos deficientes tales como: peso final al mercado, ganancia de peso, conversión alimenticia e índices de productividad bajos, aumento en la incidencia de complicaciones en las

enfermedades respiratorias, aumento en la severidad de las reacciones post vacúnales, respuestas serológicas menores a lo esperado en las vacunaciones rutinarias y aumento en la incidencia de enfermedades oportunistas (hepatitis con cuerpos de inclusión, dermatitis gangrenosa, colibacilosis) (Saif *et al.*, 2003).

La presentación clínica de la enfermedad de Gumboro es producida por cepas de tipo Estándar llamadas Clásicas) o por cepas de alta virulencia. Esta forma generalmente se presenta en aves de tres a seis semanas de edad. Las aves presentan un cuadro caracterizado por diarrea acuosa y blanquecina (diuresis), anorexia, depresión y erizamiento de las plumas. Las aves afectadas con este cuadro clínico presentan lesiones en la bolsa de Fabricio características. En los estadios iniciales de la enfermedad se observa un aumento de tamaño de la bolsa, seguido de un edema acuoso marcado en la serosa, edema que más tarde se torna gelatinoso y de un color amarillento, como se muestra en la figura 8.

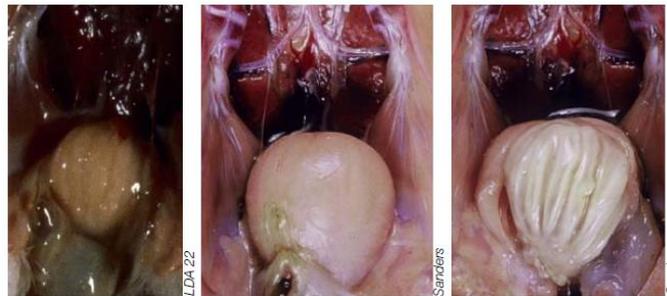


Figura 8. Bolsa de Fabricio aumentada de tamaño, edematosa y cubierta con exudado gelatinoso (Picoux *et al.*, 2014).

De igual manera es común observar hemorragias petequiales diseminadas en la Bolsa de Fabricio afectadas por el virus, como se muestra en la figura 9.



Figura 9. Hemorragias petequiales en bolsa de Fabricio. (Picoux *et al.*, 2014).

Los cuadros muy severos de la enfermedad son producidos por cepas de Tipo clásicas denominadas "Muy Virulentas" y se caracterizan por provocar un aumento súbito y severo de la mortalidad, que puede alcanzar niveles tan elevados como del 70%. En las etapas finales de la enfermedad es común observar temores, postración; deshidratación severa e hipotermia. En estos casos la bolsa de Fabricio presenta hemorragias severas que se pueden observar tanto en la mucosa como en la serosa de la bolsa, como se aprecia en la figura 10 (Dinev *et al.*, 2011) (Picoux *et al.*, 2014).



Figura 10. Lesión en la bolsa serohemorrágica y hemorrágica severa (Picoux *et al.*, 2014).



Figura 11. Hemorragias en músculos pectorales, abdominales y muslos (Picoux *et al.*, 2014).

Otras lesiones frecuentes son nefritis, nefrosis y deshidratación, como se muestra en la figura 12. (Dinev *et al.*, 2011).

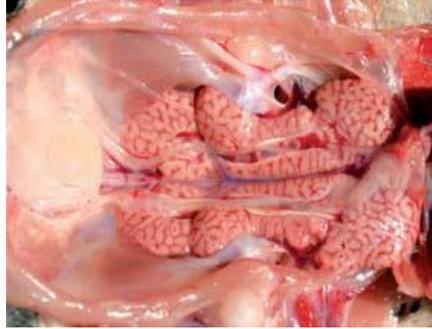


Figura 12. Riñones afectados por una diátesis severa de uratos (Dinev *et al.*, 2011).

En los primeros días después de la infección aguda, se presenta un marcado aumento en la bolsa de Fabricio con edema. En ocasiones puede verse hemorrágica en el caso de cepas muy virulentas y afectar al timo disminuyendo su tamaño considerablemente. Las cepas variantes causan una rápida atrofia sin inflamación aparente de la bolsa de Fabricio, sin embargo, presentan hemorragias de leves a severas como se muestra en la figura 13. La inflamación va seguida de una infiltración heterofílica y un agotamiento de los linfocitos presentes en las tonsilas cecales, timo, aunado a la depleción linfoide (Etteradossi *et al.*, 2008) (Sánchez *et al.*, 2015); (Sánchez *et al.*, 2016).



Figura 13. Bolsas de Fabricio afectadas por cepas variantes las cuales presentan edema, hemorragias leves, moderadas y severas. (Sánchez *et al.*, 2015).

2.6 Pruebas moleculares.

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("polymerase chain reaction"), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer") (Herschorn *et al.*, 2010).

2.6.1. Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa (RT-PCR).

La prueba RT-PCR es una técnica de laboratorio comúnmente usada en biología molecular para generar una gran cantidad de copias de ADN, proceso llamado "amplificación". En la RT-PCR, sin embargo, una hebra de ARN es retro transcripta en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada Reversa Transcriptasa. Esta técnica puede utilizarse como método de detección molecular de genes, para estudiar el genoma de virus de ARN, por ejemplo, en IBDV (Herschorn *et al.*, 2010).

El proceso de detección de un gen específico por amplificación genética se desarrolla de manera habitual en tres etapas. La primera consiste en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo de la muestra biológica, seguido de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante Reversa Transcriptasa-Reacción en cadena de la Polimerasa, y por último la secuenciación del fragmento de interés. En este trabajo

el objetivo será la secuenciación de la proteína VP2 de IBDV. (Herschorn *et al.*, 2010).

2.6.2. Secuenciación de aminoácidos.

Una secuencia de ADN o secuencia genética es una sucesión de letras representando la estructura primaria de una molécula real o hipotética de ADN, Las posibles letras son A, C, G, y T, que simbolizan las cuatro subunidades de nucleótidos de una banda ADN adenina, citosina, guanina, timina, que son bases covalentemente ligadas a cadenas fosfóricas. Al hacerlo, demostró que las proteínas tienen estructuras específicas. (Sanger *et al.*, 1977)

Existen diferentes estudios donde se han realizado secuenciaciones de la proteína VP2, estos análisis de secuencias del gen VP2 mostraron que los cambios en el centro de la VP2 muestran variaciones antigénicas o patógenas de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio. (Block *et al.*, 2007).

Actualmente es importante describir la epidemiología molecular de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio para demostrar que hay diferencias entre las cepas de diferentes regiones que se pueden considerar muy virulentas o para comprobar la protección de las vacunas en el mercado. La secuenciación proporciona una información valiosa sobre la relación evolutiva entre las cepas de enfermedad de la Bolsa de Fabricio en diferentes regiones. (Ho *et al.*, 1999).

III. OBJETIVOS.

3.1. Objetivo General.

Identificar cepas variantes de la Infección de la Bolsa de Fabricio en la zona centro y occidente de la República Mexicana, por medio de la secuenciación de aminoácidos de la proteína VP2.

3.2. Objetivos específicos.

- Recolectar 300 muestras de Bolsas de Fabricio de pollo de engorda y gallina de postura entre la primera y cuarta semana de vida.
- Realizar improntas de la bolsa de Fabricio en tarjetas FTA.
- Analizar las muestras por medio de la técnica RT-PCR.
- Secuenciar e identificar las cepas en el árbol filogenético de la Enfermedad de la bolsa de Fabricio.

III. HIPÓTESIS.

Existen cepas variantes de IBDV no identificadas en México.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

El material que se requirió para realizar el muestreo se describe a continuación

- 300 bolsas de Fabricio.
- 1 Tijera.
- 1 pinza de disección con dientes de ratón.
- Guantes de látex.
- 80 tarjetas FTA clásicas marca Whatman (Por sus siglas en inglés Fast Technology for Analysis of nucleic acids).
- 1 Lápiz.
- Sobres de papel.
- Desecantes.

La metodología que se siguió fue basada bajo protocolos de seguimiento establecidos por el Dr. Jackwood enfocados en los estudios de la VP2 para detectar de la enfermedad de la bolsa de Fabricio.

En el presente trabajo se muestrearon un total de 300 bolsas de Fabricio de pollo de engorda y de gallina ligera de la zona occidente y centro de la República Mexicana.

El tamaño de muestra se calculó con el programa Epidat versión 3.1 para obtener el muestreo o proporción de la población con un intervalo de confianza del 95% de manera aleatoria, arrojando un total 275 muestras ajustado a 300. Todas las aves muestreadas fueron alojadas en casetas tecnificadas con agua potable, alimento balanceado y acceso libre a los suministros.

Se tomaron 200 muestras de bolsa de Fabricio para la zona centro y 100 muestras en la zona Occidente de México. Dichas zonas se dividieron como se muestra en el cuadro 2.

Zonas geográficas muestreadas

Zona geográfica	Unidad de producción	fin zootécnico	No. De muestras	Identificación de casetas
Zona Centro de México	1	Pollo de Engorda	25	1,2 y 3
	2	Pollo de Engorda	25	1, 2 y 6
	3	Pollo de Engorda	25	2, 4 y 6
	4	Pollo de Engorda	25	5, 8 y 12
	5	Gallina ligera (crianza)	25	1 - 3
	6	Gallina ligera (crianza)	25	1, 2 y 4
	7	Gallina ligera (crianza)	25	1 – 3
	8	Pollo de Engorda	25	de la 1-3
Zona Occidente de México	9	Gallina ligera (crianza)	25	1, 3 y 6
	10	Gallina ligera (crianza)	25	2, 3 y 4
	11	Pollo de Engorda	25	1 – 3
	12	Gallina ligera (crianza)	25	2,3 y 4

Cuadro 2. Zonas, unidades de producción, fin zootécnico, número de muestras e identificación de casetas. (Sánchez *et al.*, 2015).

Se obtuvieron 25 bolsas de Fabricio por unidad de producción, las muestras tomadas de la zona centro fueron de cinco granjas correspondientes a pollo de engorda y tres a crianza en gallina de postura, asimismo, de la zona Occidente

sólo una granja de pollo de engorda fue considerada y tres granjas para crianza en gallina de postura. Todas las muestras fueron extraídas de la mortalidad diaria en aves de 1 a 4 semanas de edad previamente vacunadas.

El método realizado para hacer la impronta de la Bolsa de Fabricio fue el siguiente: se cortó a la mitad para realizar la impronta de la cara interna dentro del círculo de la tarjeta (FTA). Colocando una muestra por círculo como se muestra en la figura 14.

Método de la impronta de la Bolsa de Fabricio en la tarjeta FTA

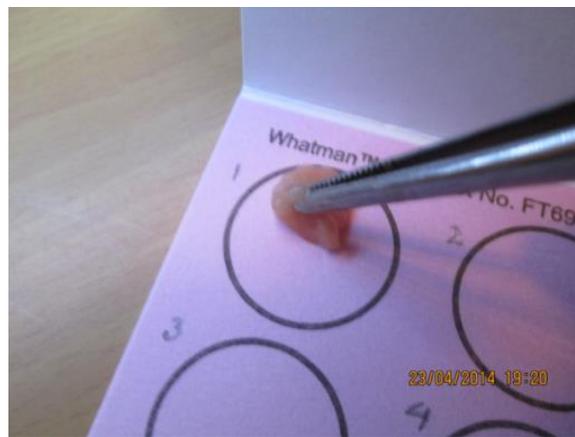


Figura 14. Impronta de la bolsa de Fabricio en las tarjetas FTA.

Se esperaron aproximadamente 15 minutos a que la impronta estuviera seca para cerrar la tarjeta. Se ingresó la tarjeta FTA dentro del sobre de transporte a temperatura ambiente con un desecante.

Todas las muestras se enviaron con el permiso de importación proporcionado por el US Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service Veterinary, para ser analizadas en el laboratorio de la Universidad de Ohio con el Dr. Daral J. Jackwood.

Se guardaron muestras de retención en una bolsa estéril para ser congeladas.

5.1 Extracción de RNA.

Para realizar la extracción de RNA se usó el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit®, No. de cat. 52906 siguiendo la metodología del fabricante. Técnica descrita en el apéndice 1.

5.2 Técnica RT-PCR.

Para realizar el diagnóstico cualitativo para la detección de ácidos ribonucleicos del virus de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio a través del RT-PCR se usó el kit detección de SSIII 1 STEP WHIT PLAT TAQ 100 de la marca Invitrogen® No. de Cat. L12574026, siguiendo la metodología del fabricante. (Técnica descrita en el apéndice 2).

5.3 Secuenciación de aminoácidos.

Los primers utilizados y la técnica para secuenciar los aminoácidos se utilizaron de la metodología sugerida por el Dr. Daral Jackwood y el Dr. Sommer-Wagner, en el 2005 (primers utilizados descritos en el apéndice 3).

VI. RESULTADOS

6.1. Tipificaciones.

Se obtuvieron 135 muestras positivas propiamente de cepas variantes de la región VP2 y 165 cepas homologas a cepas consideradas como vacúnales o clásicas. En el cuadro 3 se observan las zonas geográficas de donde se obtuvieron las muestras e identificaron cepas variantes.

Zonas geográficas e identificación de cepas variantes, vacunales y negativas

Zona geográfica	Fin zootécnico	Muestras positivas	Identificación de cepas	Descripción y nomenclatura
Zona Centro de México	Pollo de engorda	25	Lukert AY918948	Cepas clásicas intermedias (tipo Lukert)
		27	254, 648 y 652	Nuevas Variantes Tipo Delaware DelE AF133904
		15	Lukert AY918948	Cepas clásicas intermedias (tipo Lukert)
		33	279, 281,282, 651 y 643.	Clásicas Con cambios antigénicamente diferentes
	Gallina ligera	25	D78 EU162087	Cepas Clásicas Tipo Delaware
		25	Vacunal Gen VP2	Vacunal Gen VP2
		25	Vacunal Gen VP2	Vacunal Gen VP2
	Pollo de	25	Lukert AY918948	Cepas clásicas intermedias

	engorda			(tipo Lukert)
Zona geográfica	Fin zootécnico	Muestras positivas	Identificación de cepas	Descripción y nomenclatura
Zona Occidente de México	Gallina ligera	25	94 y 252	Nuevas Variantes Tipo Delaware DelE AF133904
		25	285	Variante tipo Georgia
	Pollo de engorda	25	Lukert AY918948	Cepas clásicas intermedias (tipo Lukert)
	Gallina ligera	25	284	Cepas clásicas Con cambios antigénicamente diferentes
Total, muestras positivas variantes	135			
Total, muestras positivas vacúnales	165			
Total, muestras negativas	0			
Total, de muestras analizadas	300			

Cuadro 3. Zonas geográficas e identificación de cepas variantes, vacunales y negativas.

6.2. Secuenciación de aminoácidos.

El estudio del material genético fue realizado desde el sitio 210 hasta el 440, como lo marca los protocolos establecidos para estudiar la VP2 de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio (Jackwood, 2014). Las secuenciaciones obtenidas de las muestras positivas fueron comparadas con cepas control como: la cepa UK_661 proveniente del Reino Unido considerada como muy virulenta, la cepa STC D00499 corresponde una cepa clásica, la cepa V877 AJ878882 considerada una cepa clásica de Australia, la cepa D78 EU162087 correspondiente una cepa clásica vacunal, F52-70 AY321953 considerada una

	370	380	390	400	410	420	430	440
DelE_AF133904	NFELIPNPEL	AKQLVTEYGR	FDPGAMNYTK	LILSERDRLG	IKTWWPTREY	IDFREYFMEV	ADLNSPLKIA	GAFG
279 Zona Centro
284 Zona Occidente
281 Zona Centro
282 Zona Centro
285 Zona Occidente
252 Zona Centro
254 Zona Centro
94 Zona Centro
643 Zona Centro
648 Zona Centro
651 Zona Centro
652 Zona Centro
228E_AF457104
AL-2_JF736011
D78_EU162087
F52-70_KY321953
Lukert_KY918948
STC_D00499
T1_AF281238
UK661_NC004178
V877_AJ878882

Figura 15. Secuenciación de aminoácidos comparativa entre cepas variantes y cepas control de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio (Jackwood y Sanchez, *et al.*, 2015).

La identificación molecular se enfocó en la caracterización del segmento A, especialmente de la región que codifica la VP2. Existen diversos protocolos para realizar la caracterización basados en el uso de endonucleasas de restricción en la técnica de RT-PCR el cual identifica el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción. El uso de enzimas de corte específicas en los puntos de restricción para detectar la virulencia o variantes, así como la secuenciación de aminoácidos sirven para valorar con más precisión la relación genética entre las cepas de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio. Actualmente se cuentan con marcadores que detectan los pares de aminoácidos 279 N-284T o los 253 H-284T específicos para la detección de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio. En virus considerados como virulentos están presentes cuatro aminoácidos típicos (222 A, 256 I, 294 I y 299 S) (OIE, 2004). Tomando en cuenta lo anterior debemos de tener presente que las principales mutaciones de los aminoácidos se dan en las posiciones **253, 279 y 284 de la VP2** (Loon *et al.*, 2002), asimismo está documentado que los cambios que se presenten en la posición 253 puede estar mediando una alta o baja virulencia del virus, en el presente trabajo se detectaron cambios en estas posiciones como se observa en la Figura 16. (Jackwood *et al.*, 2008).

Cambios en los aminoácidos específicamente en las posiciones 253, 279 y 284.

	210	220	230	240	250	253	260	270	279	280	284
DelE_AF133904	AADNYQFSSQ	YQTGGVTIIL	FSANIDAITS	LSVGGELVFK	TSV	QSLVLGA	IIVLIGFDGT	AVITRAVAM	NGLTR	SIDNL	
279_Zona Centro	..D.....	..P.....Q...	..NGT..T..
284_Zona Occidente	..D.....	..P.....H...T..T..
281_Zona Centro	..D.....	..P.....Q...	..G...T.....T..T..
282_Zona Centro	..D.....	..P.....Q...	..G...T.....T..T..
285_Zona OccidenteA.N...
252_Zona CentroQ..N..	..N...K.....	..S...T...
254_Zona CentroQ..N..	..N...K.....	..S...T...
94_Zona CentroQ..N..	..N...K.....	..S...T...
643_Zona Centro	..D.....	..P.....Q...	..HGT.....T..T..
648_Zona Centro	..D.....	..P.....Q..N..	..N...K.....	..S...T...
651_Zona Centro	..D.....	..P.....Q...	..NGT.....T..T..
652_Zona Centro	..D.....	..S.....Q..N..	..N...K.....	..S...T...
228E_AF457104	..D.....Q...	..G.IT.....T...
AL-2_JF736011	..D.....	..P.....Q...	..HGT.....T..T..
D78_EU162087	..D.....	..P.....I....	..Q...	..G...D...	..T...
F52-70_AY321953	..D.....	..S.....I....	..H...	..G.A.D.T.....SD	..T...
Lukert_AY918948	..D.....	..P.....Q...	..G...	..F.....	..T.....D...	..T...
STC_D00499N...
T1_AF281238	..D.....	..A.....I....	..Q...	..G.ID...	..T...
UK661_NC004178	..D.....	..P.....Q...	..G.N.V.V.T.T...G...	..T...
V877_AJ878882	..D.....	..P.....Q...	..G.N.V.V.T.T...G...	..T...

Figura 16. Muestra los cambios en los aminoácidos específicamente en las posiciones 253, 279 y 284 (Jackwood y Sanchez, *et al.*, 2015).

Haciendo un análisis de la figura 17, donde se muestra el resultado de las mutaciones o cambios en los aminoácidos alineados de las Bolsas de Fabricio muestreadas, podemos ver que sólo las muestras de pollo de engorda identificadas con 279, 643 y 651 Zona centro de México, presentaron cambios en la posición 253 de la VP2, de igual manera la cepa control D78 EU162087. Podemos considerar que son cepas clásicas, sin embargo, los cambios presentes en su secuencia las hacen antigénicamente diferentes. Las cepas 279, 281, 282 de la zona centro de México provenientes de pollo de engorda, pertenecen a la misma clasificación, sin embargo, sus cambios en los aminoácidos los presentan en las posiciones 253 (azul), 279 (verde) y 284 (rojo) de la VP2.

Por otro lado, se identificaron 5 secuencias genómicas en diferentes zonas geográficas que son consideradas como nuevas variantes nunca reportadas, la 94 y la 252 correspondiente a gallina ligera de la zona occidente; y la 254, 648 y 652 correspondiente a pollo de engorda, localizadas en la zona centro.

Para un mejor entendimiento en el cuadro 4, se resumen los hallazgos de manera ordenada del árbol filogenético.

Zona geográfica	Descripción y nomenclatura
<p>Zona centro de México 652, 254 y 648.</p>	<p>Nuevas Variantes Derivadas de la Delaware (DeIE AF133904) Presentan cambios en la estructura de la VP2 que las hacen antigénicamente diferentes.</p>
<p>Zona centro de México 279, 281,282, 651 y 643.</p>	<p>Son consideradas Clásicas derivadas de la cepa vacunal (D78 EU162087) Pero presentan cambios en la VP2 que las hacen antigénicamente diferentes.</p>
<p>Zona occidente de México 94 y 252.</p>	<p>Nuevas Variantes Tipo Delaware DeIE AF133904</p>
<p>Zona occidente de México 285</p>	<p>Variante tipo Georgia</p>
<p>Zona occidente de México 284</p>	<p>Son consideradas Clásicas derivadas de la cepa vacunal (D78 EU162087) Pero presentan cambios en la VP2 que las hacen antigénicamente diferentes.</p>

Cuadro 4. Resumen de las zonas geográficas con los hallazgos más relevantes de la secuenciación del fragmento VP2.

VII. DISCUSIÓN

Investigaciones previas realizadas por Jackwood *et al.*, en el 2011, clasifican a la enfermedad de la Bolsa de Fabricio en serotipos en 1 y 2, donde el serotipo 1 es considerado patógeno, dentro de este serotipo se identifican las cepas clásicas, variantes y nuevos tipos antigénicos los cuales presentan cambios en su estructura antigénica. Dentro de esta última se forma otra clasificación viral: naturalmente atenuados, sub-clínicos y clásicos virulentos. En los casos sub clínicos, podemos encontrar aves aparentemente sanas, pero que están siendo inmunosuprimidos por el virus que pudiera presentar cambios en su estructura antigénica llamadas mutaciones. Dichas mutaciones se presentan específicamente en la región hipervariable de la proteína VP2, las cuales sufren cambios, de igual manera concordando con la investigación referida el presente trabajo identifico virus de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio, que muestran mutaciones únicas de la VP2 circulantes en el campo mexicano. Así como el Dr. Jackwood reporta dichos resultados, los hallazgos en el presente estudio detectaron cepas variantes reportadas con mutaciones únicas derivadas de cepas clásicas y tipo Delaware,

El Dr. Jackwood *et al.*, 2011, al realizar un análisis filogenético, en dos estudios enfocados en el genoma de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio del segmento A fragmento de la VP2 y al situarlo en el árbol filogenético, encontraron incongruencias que indican una fuerte recombinación entre cepas muy virulentas y virus vacúnales en el periodo del 2001-2011 de aves comerciales localizadas en Colombia y Venezuela, sin embargo en el presente trabajo no se detectamos cepas variantes de alta patogenicidad como lo mencionan. Comparativamente en investigaciones realizadas por Valladares *et al.*, durante el 2008, estudiaron muestras de 30 granjas de pollo de engorda de la zona noreste de México, cuyo objetivo fue identificar y tipificar los virus de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio, por medio de la técnica RT-PCR se detectaron 28 cepas de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio, el análisis de las secuencias de nucleótidos determinó que 21 virus mostraron características genéticas de los virus variantes tipo Delaware E. El

análisis filogenético de la región hipervariable de la VP2 que él investigador obtuvo, indican que estos virus son genéticamente similares al virus 11153 USA (por sus siglas en inglés United States of America), que fue aislado en Georgia, USA en el año 2001. De igual manera como el Dr. Valladares en la presente investigación encontramos cepas variantes tipo Delaware tanto en gallina de postura como en pollo de engorda provenientes de la zona centro y occidente de México.

En un estudio epidemiológico realizado en los cinco continentes incluyendo África se encontraron cepas muy virulentas (Nagash et al., 2013), no siendo el caso para el presente estudio, por lo que cabe la posibilidad de que este tipo de cepas no se encuentren en las principales zonas geográficas productoras de la República Mexicana.

Nagash *et al.*, 2013, observo desafíos de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio en aves comerciales vacunadas, a lo cual referencia que existe una posible reversión a alta virulencia de virus recombinantes por intercambio de segmentos virales vacúnales y de campo, acorde con lo antes mencionado, el presente estudio detecto cepas variantes parecidas a las cepas clásicas vacúnales identificadas como 279, 281, 282, 284, 651, 643 y ubicadas en el centro y occidente del país, sin embargo la secuenciación de aminoácidos no las clasifica como de alta virulencia, lo que hace pensar que si, existen intercambios de segmentos virales entre las cepas vacúnales y las cepas de campo sin revertir a alta virulencia.

En las investigaciones realizadas por Loon *et al.*, en el 2002, detecto que las principales mutaciones de los aminoácidos se dan en las posiciones 253, 279 y 284 de la VP2, así mismo Jacwood et al., 2008, demostró que una simple mutación de los aminoácidos posición 253 puede incrementar o bajar la patogenicidad del virus, por otro lado los resultados obtenidos en la secuenciación de aminoácidos en esta investigación para la tipificación de la 279, 643 y 651 zona centro presentaron cambios en la posición 253 y 284, ninguno cambio para

la 279. Estos hallazgos concuerdan con la literatura de que las tipificaciones 279, 643 y 651 podrían cambiar su patogenicidad a alta.

Cabe mencionar que en la zona occidente de México la tipificación 285 dio para una variante tipo Georgia, hasta el momento no ha sido descrita en México.

VIII. CONCLUSIONES.

Los resultados muestran que todos los virus de la enfermedad de la Bolsa de Fabricio encontrados en la investigación resultaron tener mutaciones en el fragmento hipervariable de la VP2, algunas derivadas de cepas clásicas y otros de cepas tipo Delaware. Lo que se comprueba que, en el Centro y Occidente de la República Mexicana, actualmente este tipo de cepas están circulando en el campo, comprobando la hipótesis planteada en el presente trabajo.

En la zona centro se encontró una nueva variante jamás descrita hasta el momento, provenientes en pollo de engorda y gallina de postura.

El presente trabajo nos da la base para continuar investigando si existe protección de las vacunas actuales contra los virus variantes encontrados en el occidente y centro de México, asimismo se comprobó que cepas variantes se encuentran circulando tanto en gallina ligera como en pollo de engorda.

IX. LITERATURA CITADA

- Biro, E., Kocsis, K., Nagy, N. Molnar, D. Kabell, S. Palya S. Olah, I. 2011. Origin of the chicken splenic reticular cells influences the effect of the infectious bursal disease virus on the extracellular matrix. *Avian Pathol* 40, 199-206.
- Block, H. Block, K. Dierk, E. Rebeski, H. Scharr, S. Wit, K. Rohn. R. Silke R. 2007. A field study on the significance of vaccination against infectious bursal disease virus (IBDV) at the optimal time point in broiler flocks with maternally derived IBDV antibodies *Avian Pathology* 36(5), 401-409.
- Boot, H. Hoekman, I. Gielkens, J. 2005: The enhanced virulence of very virulent infectious bursal disease virus is partly determined by its B-segment. *Archives of virology* 150, 137-144.
- Chevalier, C., Lepault, J. Costa, B. Delmas, B. 2004: The last C-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of infectious bursal disease virus. *J Virol* 78, 3296-3303.
- Cosgrove, A. 1961. An apparently new disease of chickens- avian nephrosis. *Avian diseases*. 6, 385-389.
- Costa, J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades infecciosas microbiología clínica*. Cap. 12. Barcelona. España. 22, 299-305.
- Coulibaly, F. Chevalier, C. Gutsche, I. Pous, J. Javaza, J. Bressanelli, S. Delmas, D. Rey, A. 2005: The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell* 120, 761-772.
- Cui, P. Jei, S. Geng, Y. Sheng, X. Yun, X. An, B. Ying, H. 2013. Genomic sequence analysis of a new reassortant infectious bursal disease virus from commercial broiler flocks in central China. *Virology*. Springer Verlag Wien. 158, 1973–1978.
- Delgui, L., Ona, A. Gutierrez, S. Luque, D. Navarro, A. Caston J. Rodriguez, F. 2009. The capsid protein of infectious bursal disease virus contains a functional alpha 4 beta 1 integrin ligand motif. *Virology* 386, 360-372.

- Dinev, I. 2011. Enfermedad de las aves. Enfermedad Infecciosa de la Bursa. Atlas a color. 2da Edic. Facultad de Medicina Veterinaria. Trakia University. Stara Zagora. Bulgaria.75-78.
- Escaffre, O. Le, N. Amelot, M. Ambroggio, X, Ogden, K. Guionie, O. Toquin, D. Müller, H. Islam, M. Eterradossi, M. 2012. Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursaldisease virus.J Virol.
- Eterradossi, N. Saif, M. 2008. Infectious Bursal Disease. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE, editors. Diseases of Poultry 12 ed. Iowa: Iowa State University Press. 185-2008.
- Galloux, M. Libersou, S. Morellet, S. Bouaziz, S. Costa, B. Ouldali, M. Lepault, J. Delmas, B. 2007: Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. J Biol Chem 282, 20774-20784.
- Galloux, M., Libersou, M. Alves, I. Marquant, M. Salgado, G. Rezaei, H. Lepault, J. Delmas, B. Bouaziz, S. Morellet, N. 2010. NMR Structure of a Viral Peptide Inserted in Artificial Membranes. A view on the early steps of the birnavirus entry process. J Biol Chem 285, 19409-19421.
- Garriga, D., Navarro, A. Querol, J. Abaitua, F. Rodríguez, F. Verdaguer, N. 2007. Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 20540-20545.
- Herschorn A, Hizi A. 2010. Retroviral reverse transcriptases. Cell Mol Life Sc.; 67, 2717-2747.
- 1. Hitchner, 1970. Infectivity of Infectious Bursal Disease virus for embryonating eggs. Poultry Science 49, 511-516.
- Ho, T. Tsuyoshi, Y. Ninh, T. Oanh, T. Sa, V. 1999. Sequence Comparison of the VP2 Variable Region of Infectious Bursal Disease Virus Isolates from Vietnam, J. Vet. Med. Sci. 61(4), 429–432.
- http://viralzone.expasy.org/all_by_species/572.html. Swiss Institute of Bioinformatics, 2015. Viral Zone. Revisado el 01 de diciembre del 2015.

- Irigoyen, N., Caston, J. Rodriguez, F. 2012: Host Proteolytic Activity Is Necessary for Infectious Bursal Disease Virus Capsid Protein Assembly. *J Biol Chem* 287, 24473-24482.
- Islam, M. Zierenberg, K. Muller, H. 2001. The genome segment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains. *Arch Virol* 146, 2481-2492.
- Jackwood D. Sommer, W. Crossley, B. Stoute, S. Woolcock, P. Charlton, B. 2011. Identification and pathogenicity of a natural reassortant between a very virulent serotype 1 infectious bursal disease virus (IBDV) and a serotype 2 IBDV. *Virology*. Elsevier. 420, 98-105.
- Jackwood D., 2014. Infectious Bursal Disease (Gumboro) is still causing poultry production problems. Food Animal Health Research Program The Ohio State University. Ohio Agricultural Research and Development Center Wooster, Ohio, USA. 63rd WPDC/XXXIX ANECA.
- Jackwood, D. 2016. Infectious Bursal Disease Virus VP2 sequences and NJ Phylogenetic Tree. Larad, Inc.
- Jackwood, D. Sommer, S. 2007. Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virology* 365, 369-375.
- Jackwood, D. Sreedevi, B. Lefever, I. Sommer, S. 2008: Studies on naturally occurring infectious bursal disease viruses suggest that a single amino acid substitution at position 253 in VP2 increases pathogenicity. *Virology* 377, 110-116.
- Kabell, S., Igyarto, B. Magyar, A. Hajdu, Z. Biro, E. Bisgaard, M. Olah, I. 2006. Impact of heterophil granulocyte depletion caused by 5-fluorouracil on infectious bursal disease virus infection in specific pathogen free chickens *Avian Pathol* 35, 341-348.
- Khatri, M. Sharma J. 2009. Susceptibility of chicken mesenchymal stem cells to infectious bursal disease virus. *J Virol Methods* 160, 197-199.
- Letzel, T. Coulibaly, F. Rey, F. Delmas, B. Jagt, E. Van, A. Loon, E. 2007. Molecular and Structural Bases for the Antigenicity of VP2 of Infectious

Bursal Disease Virus. American Society for Microbiology. Journal of virology. 12827–12835.

- Li, Z. Wang, Y. Xue, Y. Li, X. Cao, H. Zheng, S. 2012. Critical Role for Voltage-Dependent Anion Channel 2 in Infectious Bursal Disease Virus-Induced Apoptosis in Host Cells via Interaction with VP5. Journal of Virology 86, 1328-1338.
- Lin, T. Lo, C. Lai, S. Fan, R. Lo, C. Chou, Y. Thiruvengadam, R. Wang, A. Wang, M. 2007. Chicken heat shock protein 90 is a component of the putative cellular receptor complex of infectious bursal disease virus. J Virol 81, 8730-8741.
- Liu, M. Vakharia, V. 2006: Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. J Virol 80, 3369-3377.
- Lombardo, E. Maraver, A. Espinosa, I. Fernandez, A. Rodríguez, F. 2000, VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. Virology. 277, 345-357.
- Luo, J. Zhang, H. Teng, M. Fan, J. You, I. Xiao, Z. Yi, M. Zhi, Y. Li, X. Zhang, G. 2010. Surface IgM on DT40 cells may be a component of the putative receptor complex responsible for the binding of infectious bursal disease virus. Avian Pathol 39, 359-365.
- Luque, D. Saugar, I. Rejas, M. Carrascosa, J. Rodríguez, F. Caston, J. 2009. Infectious Bursal Disease Virus. Ribonucleoprotein Complexes of a Double-Stranded RNA Virus. J Mol Biol 386, 891-901
- Maraver, A. Clemente, R. Rodríguez, F. Lombardo, E. 2003. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. J Virol 77, 2459-2468.
- Müller, H. Rafiqul, M. Rauea. R. 2003. Research on infectious bursal disease the past, the present and the future. Veterinary Microbiology. Elsevier. 97, 153-165.

- Nagash, T. 2013. Molecular epidemiology of infectious bursal disease viruses and development of a microparticle based vaccine. University of Veterinary Medicine Hannover. Germany. 1-143.
- Nouen, L. Rivallan G. Toquin D. Darlu P. Morin, Y. Beven W. Boisseson C. Cazaban C. Comte S. Gardin Y. Etteradossi N. 2006. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. J Gen Virol 87, 209-216.
- OIE, 2004. Bursitis infecciosa (Enfermedad de Gumboro). Manual de la OIE sobre animales terrestres. Enfermedades aviares de la lista B. Sección 2.7. Capítulo 2.7.1. 285-286.
- Pan, J. Vakharia, V. Tao, Y. 2007. The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 7385-7390
- Petkov, D. Linnemann, E. Kapczynski. D. Sellers, H. 2009. Identification and characterization of two distinct bursal B-cell subpopulations following infectious bursal disease virus infection of White Leghorn chickens. 53(3),347-55.
- Picoux, J. Vaillancourt, J. Shivaprasad, H. Venne, D. Bouzouaia, M. Jackwood, D. 2014. Manual of Poultry Diseases. Viral Diseases. Infectious Bursa Disease. Chapter 32. 215-219.
- Rose, D. Han, J. Ginsberg, M. 2002. Alpha 4 integrins and the immune response. Immunol Rev. 186, 118-124.
- Saif, Y. Barnes, H. Fadly, A. Glisson, J. McDouglad, L. Swayne, D. 2003. Diseases of Poultry. Infectious Bursal Disease. 11th edition. 161-179.
- Sánchez, J. Sánchez, I. Malo, A. Galindo, F. Sosa, C. 2015. Identificación de Cepas Variantes en el Occidente, Bajío y Centro de México. LI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Inifap. Toluca, estado de México.
- Sánchez, J. Christy, N. Infante, S. 2016. Behavior a program of immunization against bursal disease in broilers to challenges variant strains detected in field. International Poultry Scientific Forum. Atlanta Georgia.

- Sánchez, J. Sánchez, I. Malo, A. Galindo, F. Sosa, C. 2016. Identificación de Cepas Variantes en el Occidente, Bajío y Centro de México. IX Foro de investigación y Posgrado. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Sanger, F. Nicklen, S. Coulson, A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, Proc Natl Acad Sci U S A. Dec. 74(12), 5463-7.
- Saugar, I. Irigoyen, N. Luque, D. Carrascosa, J. Rodríguez, F. Caston, J. 2010. Electrostatic Interactions between Capsid and Scaffolding Proteins Mediate the Structural Polymorphism of a Double-stranded RNA Virus. J Biol Chem 285, 3643-3650.
- Saugar, I. Luque, D. Ona, A. Rodríguez, F. Carrascosa, J. Trus, B. Caston, J. 2005. Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: An amphipathic alpha helix as a molecular switch. Structure 13, 1007-1017.
- Shoshan, V. Pinto, V. Zweckstetter, M. Raviv, Z. Keinan, N. Arbel, N. 2010, VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. Mol Aspects Med 31, 227-285.
- Valladares, J. Palya, V. Etcharren, L. Banda, A. Juárez, D. Barrientos, B. Angulo, E. Lara, A. Escobedo, G. Ondarza, A. y Morfin, R. 2009. Caracterización genética de cepas de campo del virus de la Infección de la bolsa de Fabricio detectadas en granjas de pollo de engorda en el estado de Nuevo León. XXXIV Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, A. C., Acapulco, Guerrero.
- Van, A. Haas, N. Zeyda, I. Mundt, E. 2002. Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. J Gen Virol 83, 121-129.
- Villegas, P. Banda A. 2006. Enfermedad infecciosa de la bolsa. Diferencias entre las cepas del virus, diagnóstico y prevención. Memorias del XI Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar. The University of Georgia. AMEVEA Athens. GA.

- Wang, D. Xiong, J. She, R. Liu, I. Zhang, Y. Luo, D. Li, W. Hu, Y. Wang, Y. Zhang, Q. Sun, Q. 2008. Mast cell mediated inflammatory response in chickens after infection with very virulent infectious bursal disease virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 124, 19-28.
- Wang, N. Bazdar, S. Sieg, F. Von, H. 2012: Microparticle delivery of Interleukin-7 to boost T-cell proliferation and survival. *Biotechnol Bioeng* 109, 1835-1843.
- Wei, L. Hou, L. Zhu, S. Wang, J. Zhou, J. Liu, J. 2011. Infectious bursal disease virus activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway by interaction of VP5 protein with the p85 alpha subunit of PI3K. *Virology* 417, 211-220.
- Williams, A. Davison, T. 2005. Enhanced immunopathology induced by very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Pathol* 34, 4-14.
- Wu, Y. Hong, L. Ye, J. Huang, Z. Zhou, J. 2009. The VP5 protein of infectious bursal disease virus promotes virion release from infected cells and is not involved in cell death. *Arch Virol* 154, 1873-1882.
- www.invitrogen.com/pcr, 2004. Revisado el 01 de Enero del 2015. PCR y RT-PCR Guía de recursos.
- www.qiagen.com/es/products/catalog/sample-technologies/rna-sample-technologies/viral-rna/qiaamp-viral-rna-mini-kit/, 2015: Revisado el 01 de Enero del 2015. Extracción de RNA kit QIAMP viral (RNA) mini kit QIAGEN.
- Xia, R. Wang, H. Huang, G. Zhang, M. 2008. Sequence and phylogenetic analysis of a Chinese very virulent infectious bursal disease virus. *Arch Virol* 153, 1725-1729.
- Yip, C. Hon, C. Zeng, F. Leung, F. 2012. Cell culture-adapted IBDV uses endocytosis for entry in DF-1 chicken embryonic fibroblasts. *Virus Res.* 165, 9-16.

X. APÉNDICES

10.1 Apéndice1. Extracción de RNA para muestras tomadas en FTA.

10.1.1 Mezcla de reactivos:

- Adicionar el Carrier RNA al Buffer AVL.
- Adicionar 1 mL de Buffer AVL a un tubo de carrier RNA liofilizado.
- Disolver el carrier RNA liofilizado y transferirlo al frasco del buffer AVL.
- Mezclar suavemente.
- Agregar 560 µl de Buffer AVL en un tubo de 1.5 mL.
- Agregar 140µl de muestra.
- Para Papel FTA: Tomar 5 círculos de 3mm de diámetro cada uno y adicionar 250 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas agitar en vortex. Tomar 140 µl de muestra.

10.1.2 Procedimiento.

- A. Incubar a temperatura ambiente (24°C aprox.) por 10 min.
- B. Agregar 560µl de etanol, mezclar bien en vortex por 15 seg. y pasar a tubos con filtro.
- C. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
- D. Transferir las columnas con filtro a tubos de lavado.
- E. Agregar 500µl de buffer AW1.
- F. Centrifugar a 8000 rpm por 1min.
- G. Transferir las columnas con filtro a tubos de lavado
- H. Agregar 500µl de buffer AW2.
- I. Centrifugar a 14000 rpm por 3min.
- J. Colocar cartucho con filtro a tubos de 1.5 mL.
- K. Agregar 100 µl de buffer AVE y dejar reposar 2min.
- L. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
- M. Colocar el ADN a -20°C.

(QIAGEN, 2014).

10.2. Apéndice 2. Técnica RT-PCR.

10.2.1 Reactivos para PCR punto final.

- SSIII 1 STEP WHIT PLAT TAQ 100 de la marca Invitrogen No. de Cat. L12574026 [Incluye: 2xRxn Mix Buffer, RNasa (40U/ul), Super Script (5/μl)].
- Agua estéril calidad biología molecular.
- Primers:
 - a. Diseño de primers de Gumboro (25mMol/μl).
IBD-A09 F 5'- GCCCAGAGTCTACACCAT-3'

IBD-A10 R 5'- CCCGGATTATGTCTTTGA-3'

10.2.2 Equipo.

- Termocicladores Biorad T100.
- Fuente de Poder.
- Camara de Electroforesis.
- Fotodocumentador.

10.2.3 Procedimiento para la preparación de la mezcla de RT-PCR.

- a) El volumen de los reactivos y muestras está calculada a una reacción de 12.5μl (en el ANEXO se muestran las cantidades para la preparación de la mezcla).

RT-PCR			
REACTIVO	1 MUESTRA	0 MUESTRA	FINAL
10X Buffer s/Mg	6.25	0	1x
RNasa (40U/ul)	0.03	0	5U
Primer	0.25	0	
H ₂ O libre de RNasas	4.47	0	
Super Script (5/ul)	0.5	0	1.25U
RNA	1		
TOTAL	12.5	0	

- b) Dentro de la cabina de PCR preparar una mezcla maestra suficiente para el número de reacciones que serán realizadas. Incluir media reacción más por cada 16 reacciones para tener suficiente mezcla maestra.
- c) Mantener en frío los tubos para la reacción (con ayuda de la gradilla del equipo) y adicionar 11.5 μl de la mezcla maestra a cada uno. Al control negativo adicionar 1 μl de agua y cerrarlo.
- d) Fuera de la cabina de PCR adicionar 1 μl de cada una de las muestras. Primero, adicionar el control positivo; posteriormente colocar las muestras e ir cerrando el tubo conforme se va cargando, antes de introducir las muestras al termociclador centrifugar por 15 segundos.

10.2.4 Procedimiento del termociclador RT-PCR y condiciones de la prueba.

Condiciones de RT PCR de VP2 de Gumboro: Para realizar la reversa transcriptasa y obtener el cDNA del RNA se realizaron a las condiciones de 30 min. 50 °C y 5 min. 94 °C. Para la PCR se realizó a las condiciones de 35 ciclos (30 seg. 94°C; 30 seg. 60°C; 30 seg. 72°C) y por ultimo 7 min. 72°C. (Jackwood and Sommer-Wagner, 2005)

10.2.5 Monitoreo e Interpretación.

- a) Lectura del gel en la foto documentador.

Se elabora un gel de agarosa al 2% con 6 μl de Gel Red y se correrá una electroforesis con las siguientes condiciones: 50 min, 100 voltios, 400 mA.

- b) Se considera animales positivos o positivos débiles en presencia de la banda de DNA que indique el peso molecular del virus del fragmento que se amplificó como se muestra a continuación:

Se obtuvo un fragmento de 743 pares de bases de los nucleótidos 737 a 1479, basado en la secuencia del gen de la cepa VP2.

- c) Una muestra es negativa solo si no hay presencia de la banda de DNA del tamaño del fragmento.
- d) Una prueba se considera nula si el control negativo es positivo o el positivo es negativo. (Invitrogen, 2015).

e) 10.2.6. Apéndice 3. Técnica Secuenciación de IBDV.

El segmento utilizado para la secuenciación de la región hipervariable de la proteína viral dos (hvVP2) fue la A con 743-bp desde el nucleótido 737 al 1479 fue amplificado usando los primers 743-1 (5'-GCCCAGAGTCTACACCAT-3') and 743-2 (5' CCCGGATTATGTCTTTGA-3') (Jackwood and Sommer-Wagner, 2005).