

Caracterización molecular de aislamientos mexicanos del virus de la anemia infecciosa del pollo, a través del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción

Molecular characterization of Mexican isolates of chicken infectious anemia virus through restriction fragment length polymorphism

Néstor Ledesma Martínez* Tamas Fehervari* Rogelio Alonso**

Abstract

Chicken infectious anemia is the main immunosuppressive disease of poultry. It is caused by a Gyrovirus. Thirty positive samples for chicken infectious anemia virus (CIAV) were identified by PCR amplification of a fragment of 675 bp of the amino-terminal end of the VP1 gene protein. Amplified fragments were characterized by restriction fragment length polymorphism, digesting with *Hae*III, *Hin*FI and *Hpa*II endonucleases. From the 30 samples, 12 could be classified into 4 previously described viral groups, whereas the 18 remaining samples formed 6 new groups. These results suggest that the virus of the chicken infectious anemia in Mexico has a wide genetic variability including worldwide distributed variants and novel local varieties.

Key words: ANEMIA, INFECTIOUS, CHICKEN, RFLP, MEXICO.

Resumen

La anemia infecciosa del pollo es una de las enfermedades inmunodepresoras más frecuentes de las aves domésticas. El agente causal es un Gyrovirus. Se identificaron 30 muestras de virus de anemia infecciosa mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 675 bp, correspondiente al extremo aminoterminal del gen de la proteína VP1. Los fragmentos amplificados fueron caracterizados mediante el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, utilizando las endonucleasas *Hae*III, *Hin*FI y *Hpa*II. De las 30 muestras, 12 se clasificaron en cuatro grupos virales previamente descritos, mientras que las 18 restantes formaron seis grupos más, algunos de ellos nuevos. Estos resultados indican que la variabilidad genética de los virus de anemia infecciosa es amplia e incluye tipos virales similares a otras regiones del mundo y variantes locales nuevas.

Palabras clave: ANEMIA, INFECCIOSA, POLLOS, RFLP, MÉXICO.

Recibido el 12 de enero de 2006 y aceptado el 4 de julio de 2006.

*Departamento de Producción Animal: Aves: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F., Tels.: 5622 5868 y 56161969, Correo electrónico: neslm@servidor.unam.mx

**Laboratorio de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F..

Responsable de correspondencia y solicitudes de sobretiros: Néstor Ledesma Martínez, Departamento de Producción Animal: Aves: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F., Tels.: 5622 5868 y 56161969, Correo electrónico: neslm@servidor.unam.mx

Nota: Este trabajo forma parte de la tesis doctoral del primer autor

Introduction

Chicken infectious anemia is a vertically and horizontally transmitted disease of domestic fowl. It is considered one of the main immunodepressive diseases. The causative agent is a DNA virus classified in the *Circoviridae* family Gyrovirus genus. The first report of this agent was in 1978 in Japan,¹ from a commercial vaccine against Marek's disease contaminated with chicken infectious anemia virus (CIAV) and reticulum-endotheliosis virus.

The first reports of this disease in Mexico occurred in 1993,² in breeders and broilers. Nevertheless, the disease was not recognized as enzootic until 1999. Even though CIAV is widely spread in Mexico, due to the fact that all flocks of breeders and broilers are seropositive, little is known about the epidemiology and characteristics of the virus.³

The CIAV genome consists of a single negative sense DNA chain of 2 300 base pairs with three open read segments that codify for three proteins: VP1 or viral capsid, VP2 and VP3 or apoptin. The VP1 protein has variations in the sequence and it has been suggested that these variations could be related with the pathogenicity and virulence characteristics of the virus.^{4,5}

In field infections of CIAV the clinical signs are variable and are generally unseen due to the presence of secondary infections that result from its immunodepressive effect. Birds show various degrees of aplastic anemia as well as severe thymus atrophy; nevertheless, in some cases only seroconversion occurs without any apparent signs or lesions. Among the factors that influence this phenomenon are: the immune state of the bird, age and infection pathway.⁶

The isolation of the CIAV virus is laborious and time consuming because it does not produce lesions in chicken embryos, does not hemagglutinate and does not propagate in conventional cellular cultures; it can only be isolated through inoculation in specific-pathogen free chicks or lymphoid line cell cultures.⁷ In the lymphoid lines at least 10 passes are required and this could be due to some CIAV not being able to adapt to cellular culture.⁸

Due to the isolation difficulties, the polymerase chain reaction technique has become popular as the diagnostic tool for this disease as it represents a sensitive and specific method, and produces results in less time.^{9,10}

Additionally, the digestion with restriction enzymes of an informative DNA segment, amplified through PCR, allows differentiation and viral classification through size polymorphism of the restriction fragments (RFLP). In this manner viral variants of

Introducción

La anemia infecciosa del pollo es una enfermedad de transmisión vertical y horizontal de las aves domésticas. Se le considera una de las principales enfermedades inmunodepresoras. El agente causal es un virus de ADN clasificado en la familia *Circoviridae* género Gyrovirus. El primer informe de este virus fue en 1978 en Japón,¹ a partir de una vacuna comercial contra enfermedad de Marek, contaminada con el virus de anemia infecciosa del pollo (VAIP) y el virus de reticuloendoteliosis.

En México, los primeros registros de esta enfermedad se efectuaron en 1993² en reproductoras y pollos de engorda. Sin embargo, la enfermedad fue reconocida como enzoótica hasta 1999. A pesar de que el VAIP está diseminado ampliamente en México, ya que casi todas las parvadas de reproductoras y pollos de engorda resultan seropositivas, se conoce poco acerca de la epidemiología y características de los virus.³

El genoma del VAIP consiste en una cadena de ADN sencilla de sentido negativo de 2 300 pares de bases con tres segmentos de lectura abierta que codifican para tres proteínas: VP1 o cápside viral, VP2 y VP3 o apoptina. La proteína VP1 presenta variaciones en la secuencia y se ha sugerido que estas variaciones pudieran estar relacionadas con las características de patogenicidad y virulencia.^{4,5}

En infecciones de campo por VAIP, los signos clínicos son variables y generalmente pasan desapercibidos ante la presencia de infecciones secundarias, como resultado del efecto inmunodepresor. Las aves presentan anemia aplásica en diversos grados y atrofia severa de timo; sin embargo, en algunos casos sólo seroconvierten sin mostrar signos o lesiones aparentes; entre los factores que influyen en este fenómeno se encuentra el estado inmune del ave, la edad y la vía de infección.⁶

El aislamiento de virus de VAIP es laborioso y consume mucho tiempo, pues no produce lesiones en el embrión de pollo, no hemoaglutina y no se propaga en cultivos celulares convencionales, sólo puede ser aislado mediante la inoculación de pollitos libres de patógenos específicos o cultivos celulares de líneas linfoides.⁷ En las líneas linfoides se requiere de por lo menos diez pases, y una complicación resulta podría deberse a que algunos VAIP no se adaptan a los cultivos celulares.⁸

Debido a las dificultades de aislamiento, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa se ha popularizado como método de diagnóstico para esta enfermedad, ya que representa un método sensible y específico, y proporciona resultados en menos tiempo.^{9,10}

the infectious bronchitis virus,¹¹ Newcastle's disease¹² and CIAV¹⁰ have been classified.

In a study carried out with the PCR-RFLP techniques, using a fragment that corresponds to the VP1 protein gene and the restriction patterns obtained with the *HaeIII*, *HinfI* and *HpaII* enzymes, it was possible to separate into seven groups the 14 CIAV isolates from several countries.¹⁰

The object of the present study was to identify the different CIAV variants through PCR-RFLP from 30 isolates obtained from different states in Mexico.

Materials and methods

Samples

Suspensions at 20% in phosphate buffer solution were prepared from samples of thymus, bone marrow, liver and lung of 29 cases of birds sent for their diagnosis to the Avian Pathology Laboratory of the Faculty of Medicine and Animal Husbandry of the National Autonomous University of Mexico (FMVZ-UNAM). These were later clarified through centrifuging at 3 000 *g* and frozen at -85°C until they were used. Work was also carried out with a sample of a virus used as vaccine.

Samples came from different states in Mexico: eight from Jalisco, seven from the State of Mexico, four from Morelos, three from Hidalgo, three from Queretaro, three from Guerrero and one from Veracruz.

DNA purification

Total DNA was extracted from the samples through the technique described previously in 1992.¹⁰ Equal volumes of the viral suspension with proteinase K lysis solution (1 mg/mL), 0.001M EDTA, 0.01M Tris HCL pH 8.0 and 1% SDS were mixed together. The samples were incubated in a water bath at 37°C for two hours, then the DNA was extracted through phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) and precipitated with ethanol. The DNA was suspended in 100 µL of water, quantified with spectrophotometer and frozen at -85°C until it was used.

PCR amplification

A 675 bp fragment was amplified, corresponding to the VP1 protein gene (between positions 844 and 1519 of the Cux-1 virus, GenBank NC_001427). The amplification reactions were done in a 100 µL volume. The following primers were used: 5'-GAC TGT AAG ATG GCA AGA CGA GCT C-3' (forward) and 5'-GGC TGA AGG ATC CCT CAT TC-3' (reverse). Reactions were

En forma adicional, el corte con enzimas de restricción de un segmento de ADN informativo, amplificado por PCR, permite la diferenciación y clasificación viral al mostrar el polimorfismo en los tamaños de los fragmentos de restricción (RFLP). De este modo se han clasificado variantes virales en el virus de bronquitis infecciosa,¹¹ enfermedad de Newcastle¹² y el VAIP.¹⁰

En un estudio efectuado con las técnicas PCR-RFLP, empleando un fragmento correspondiente al gen de la proteína VPI y los patrones de restricción obtenidos mediante las enzimas *HaeIII*, *HinfI* y *HpaII*, fue posible separar en siete grupos, 14 aislamientos de VAIP de varios países.¹⁰

El objetivo del presente trabajo fue identificar las diferentes variantes del VAIP a través de PCR-RFLP de 30 aislamientos obtenidos en diferentes estados de México.

Material y métodos

Muestras

A partir de timo, médula ósea, hígado y pulmón de 29 casos de aves remitidas para su diagnóstico al Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM), se prepararon suspensiones al 20% en solución amortiguada de fosfatos, clarificadas por centrifugación a 3 000 *g* y congeladas a -85°C hasta su utilización. Adicionalmente se trabajó con una muestra de virus empleado como vacuna.

Las muestras provinieron de diferentes estados de México: ocho de Jalisco, siete del Estado de México, cuatro de Morelos, tres de Hidalgo, tres de Querétaro, tres de Guerrero y una de Veracruz.

Purificación de ADN

El ADN total de las muestras fue extraído mediante la técnica previamente descrita en 1992,¹⁰ se mezclaron volúmenes iguales de la suspensión viral con solución de lisis con proteinasa K (1 mg/mL), 0.001M EDTA, 0.01M Tris HCl pH 8.0 y 1% de SDS. Las muestras se incubaron en baño María a 37°C durante dos horas y el ADN fue extraído mediante fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitado con etanol. El ADN fue suspendido en un volumen de 100 µL de agua, cuantificado por espectrometría y congelado a -85°C hasta su utilización

Amplificación por PCR

Se amplificó un fragmento de 675 pb, correspondiente

carried out in a hot lid thermocycler* and included: 5 μ L of DNA sample (200 ng/ μ L), 1.5 mM of $MgCl_2$ **, 0.2 mM of dNTP mix***, 2.5 U of Taq DNA polymerase (5U/ μ L),[†] 0.5 μ M of each primer, 1X PCR buffer 10X,[‡] and H₂O cbp 100 μ L. The amplification conditions consisted of an initial denaturing at 95 °C for five minutes followed by 30 cycles of 95°C for 30 seconds, 65°C for 30 seconds and 72 °C for one minute, with a final extension of five minutes.

PCR products were separated in 1% agarose gels stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light,¹³ then they were purified with silica pearls using commercial reagents[‡] and re-suspended in a 50 μ L volume.

Analysis with restriction endonucleases

The purified products were digested independently with the endonucleases *Hae*III, *Hinf*I and *Hpa*II in a 30 μ L volume that had 15 μ L of the amplified product and 1X of the buffer recommended by the manufacturer and one unit of the enzyme. The samples were incubated at 37 °C for two hours and the digestion products were separated in 10% polyacrylamide gels (10 cm $\times$ 12 cm) for 45 minutes at 150 volts, stained with ethidium bromide (1 μ g/mL) and visualized with ultraviolet light.¹³ The molecular size of each band was calculated through regression analysis with the pBR322 *Msp*I size marker and the substitution of the X value in the line by the distance in centimeters run by each band. Later the partial digestion bands were determined by adding bands and determining the restriction sites previously described.

Results

A total of 30 samples were identified as positive to CIAV through the amplification of a 675 bp fragment of the VP1 protein gene. The restriction products revealed different patterns for each endonuclease (identified by letters) as shown in figures 1 and 2. The restriction sites and the fragments generated are shown. The *Hae*III enzyme showed ten different patterns, six previously described and four new ones. The *Hinf*I enzyme generated four patterns of which three were previously described and one new. The *Hpa*II presented three patterns, one of them new.

In some samples, *Hae*III showed two additional restriction sites that generated fragments of 29, 78 and 161 bp, but none of the samples had the restriction sites number six and seven described for this enzyme. With enzyme *Hinf*I restriction site number five was not found, while digestion with *Hpa*II showed a new site that produced fragments of 41 and 129 bp. In this case, the virus were only grouped into two categories,

al gen de la proteína VPI (entre las posiciones 844 y 1 519 del virus Cux-1, GenBank NC_001427). Las reacciones de amplificación se efectuaron en un volumen de 100 μ L. Se utilizaron los iniciadores 5'-GAC TGT AAG ATG GCA AGA CGA GCT C-3' (sentido) y 5'-GGC TGA AGG ATC CCT CAT TC-3' (reversa). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador de tapa caliente* e incluyeron: 5 μ L de muestra de ADN (200 ng/ μ L), 1.5 mM de $MgCl_2$ **, 0.2 mM de dNTP mix***, 2.5 U de Taq DNA polimerasa (5U/ μ L),[†] 0.5 M de cada iniciador, 1X amortiguador de PCR 10X,[‡] y H₂O cbp 100 μ L. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C durante cinco minutos, seguida de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos y 72°C por un minuto, con extensión final de cinco minutos.

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio, visualizados con luz ultravioleta,¹³ purificados mediante perlas de sílica, utilizando un juego de reactivos comercial[‡] y resuspendidos en un volumen de 50 μ L.

Análisis de endonucleasas de restricción

Los productos purificados fueron digeridos en forma independiente con las endonucleasas *Hae*III, *Hinf*I y *Hpa*II en un volumen de 30 μ L que contenía 15 μ L del producto amplificado 1X del amortiguador recomendado por el fabricante y una unidad de enzima. Las muestras se incubaron a 37°C por dos horas y los productos de digestión se separaron en geles de poliacrilamida al 10% (10 cm $\times$ 12 cm) por 45 minutos a 150 volts, teñidos con bromuro de etidio (1 μ g/mL) y visualizados con luz ultravioleta.¹³ El tamaño molecular de cada banda se calculó mediante el análisis de regresión del marcador de tamaño molecular pBR322 *Msp*I y la sustitución del valor de X en la recta por la distancia en centímetros recorrida por cada banda. Posteriormente se realizó la determinación de bandas de digestión parcial mediante la suma de bandas y determinación de los sitios de corte previamente descritos.

Resultados

Se identificaron 30 muestras positivas a VAIP mediante la amplificación de un fragmento de 675 pb del gen de la proteína VPI. Los productos de digestión revelaron diferentes patrones para cada endonuclease (identi-

*Perkin Elmer Gene Amp 2400, Estados Unidos de América.

**Gibco BRL 11615-010, Estados Unidos de América.

***Biogénica EA 500, México.

†Amplificasa Biogénica EA 500, México

‡DNA extraction kit K0513 fermentas, Estados Unidos de América.

HaeIII digestion

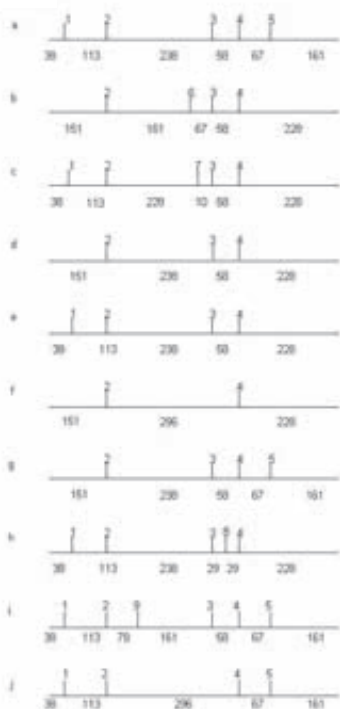


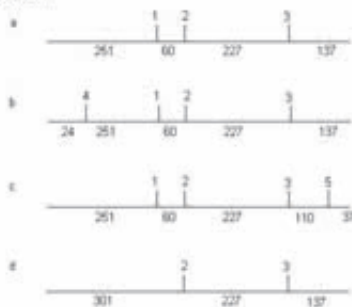
Figura 1: Sitios de corte y fragmentos generados por la enzima *HaeIII* sobre un fragmento de 675 pb que contenía el gen VP1 del VAIP.*

* Cada patrón de restricción es identificado con una letra, el número superior indica el sitio de corte, y el número inferior, el tamaño del fragmento generado (los patrones g, h, i y j no habían sido descritos antes).

Figure 1: Restriction sites and fragments generated by enzyme *HaeIII* on a fragment of 675 bp that contained gene VP1 of CIAV.*

* Each restriction pattern is identified with a letter, the number above indicates the restriction site and the number below indicates the size of the fragment generated (patterns g, h, i and j had not been described before).

HinfI digestion



HpaII digestion

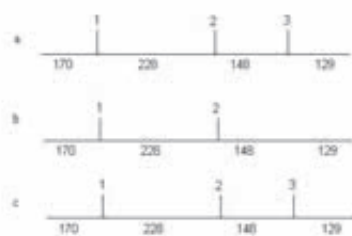


Figure 2: Sitios de corte y fragmentos generados por las enzimas *HinfI* y *HpaII* sobre un fragmento de 675 pb que contenía el gen VP1 del VAIP.*

* Cada patrón de restricción es identificado con una letra, el número superior indica el sitio de corte, y el número inferior, el tamaño del fragmento generado (el patrón d de *HinfI* y el c de *HpaII* no habían sido descritos antes).

Figure 2: Restriction sites and fragments generated by enzymes *HinfI* and *HpaII* on a fragment of 675 bp that contained gene VP1 of CIAV.*

* Each restriction pattern is identified with a letter, the number above indicates the restriction site and the number below indicates the size of the fragment generated (pattern d of *HinfI* and c of *HpaII* had not been described before).

one of them not recorded before which corresponded to the virus used as a vaccine.

The classification for each viral type is based on the combination of the patterns produced by the three enzymes, each one described by three letters according to the order of the enzymes. Table 1 describes the 13 different viral types, representing the result of this

ficados por letras) que se muestran en las figuras 1 y 2. Se presentan los sitios de corte y el tamaño de los fragmentos generados. La enzima *HaeIII* mostró diez patrones diferentes, seis previamente descritos y cuatro nuevos. La enzima *HinfI* generó cuatro patrones, tres descritos previamente y uno nuevo. La enzima *HpaII* presentó tres patrones, uno de ellos nuevo.

classification, including the viral patterns of CIAV previously identified in other countries (types 1 through 7) as well as the new variants found in this study (8 to 13).

According to the restriction pattern of the 30 samples analyzed, 12 of them could be classified in four groups previously described, while the remaining 18 were grouped into six new groups.

In the groups that had two or more virus, some of them were related because they came either from the same state or from a different zone but from the same company.

The enzymes *Hae*III and *Hinf*I were the most useful for differentiating the virus, while *Hpa*II was the least informative.

Figure 3 shows polyacrylamide gels with some of the restriction patterns.

Discussion

The use of PCR-RFLP for diagnosis and viral characterization provides a quick and economical method

En algunas muestras, la enzima *Hae*III mostró dos sitios de cortes adicionales que generaron fragmentos de 29, 78 y 161 pb, pero ninguna de las muestras tuvo los sitios de corte seis y siete mencionados para esta enzima. Con la enzima *Hinf*I no se encontró el sitio de corte cinco, mientras que la digestión con *Hpa*II mostró un nuevo sitio que produjo fragmentos de 41 y 129 pb; en este caso, los virus sólo se agruparon en dos categorías, una de ellas no registrada con anterioridad y que correspondió a un virus empleado como vacuna.

La clasificación para cada tipo viral se basa en la combinación de los patrones con las tres enzimas, cada uno es señalado por tres letras de acuerdo con el orden de las enzimas. En el Cuadro 1 se describen los 13 diferentes tipos virales, que representa el resultado de esta clasificación, incluyendo los patrones virales del VAIP identificados previamente en otros países (tipos 1 al 7), así como las nuevas variantes encontradas en este trabajo (tipos 8 al 13).

De acuerdo con los patrones de restricción de las 30 muestras estudiadas, 12 pudieron ser clasificadas

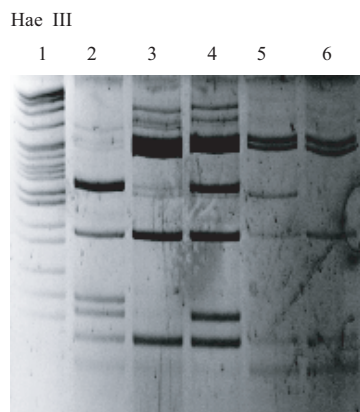
Cuadro 1

CLASIFICACIÓN DEL VIRUS DE ANEMIA INFECCIOSA DEL POLLO, DE ACUERDO
CON EL POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN
DE UN FRAGMENTO DE 675 PB QUE CONTENÍA EL GEN VPI

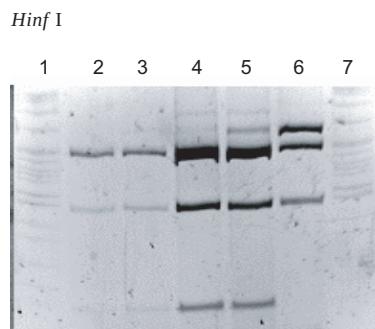
CLASSIFICATION OF THE CHICKEN INFECTIOUS ANEMIA VIRUS, ACCORDING
TO THE RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM OF A 675 BP
FRAGMENT CONTAINED IN THE VP1 GENE

<i>Viral group</i>	<i>CIAV reference strain</i>	<i>CIAV isolates from Mexico</i>	<i>Restriction pattern*</i>
1	Cux-1 or Gifu-1	90, 115, 121, 353, 366	AAA
2	TK5830	3, 290	ABA
3	87/10/44		BBA
4	NI-CAV-1		CCB
5	EF 88/78/2763	279/1	DAA
6	89/3711	103, 118, 184, 229	EBA
7	IMP704		FBA
8		279/A	DBA
9		022, 119, 122, 141, 169, 183, 357, 373, 374, 441	EAA
10		116, 117	GBA
11		120, 160, 161	HBA
12		431	IDA
13		INTE 1	JAC

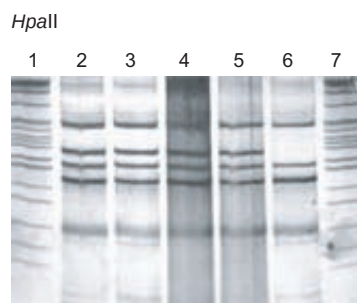
*Each letter identifies the restriction pattern obtained with the enzymes *Hae*III, *Hinf*I and *Hpa*II, respectively



1 pBR322 DNA *MspI* marker
2 Pattern I (Case 431)
3 Pattern E (Case 229)
4 Pattern A (Case 290)
5 Pattern E (Case 441)
6 Pattern H (Case 160)



1 and 7 pBR322 DNA *MspI* marker
2 Pattern B (Case 160)
3 Pattern B (Case 229)
4 Pattern A (Case 290)
5 Pattern A (Case 441)
6 Pattern D (Case 431)



1 pBR322 DNA *MspI* marker
2 Pattern A (Case 431)
3 Pattern A (Case 229)
4 Pattern A (Case 290)
5 Pattern A (Case 441)
6 Pattern C (Case INTE 1)

en cuatro grupos previamente descritos, mientras que las 18 restantes formaron seis grupos nuevos.

En los grupos que tuvieron dos o más virus, algunos casos fueron emparentados, ya que provinieron del mismo estado o de diferente zona, pero de la misma empresa.

Las enzimas *HaeIII* e *HinfI* fueron las más útiles para la diferenciación de virus, mientras que la *HpaII* aportó poca información.

La Figura 3 presenta geles de acrilamida con algunos patrones de corte.

Discusión

El uso de PCR-RFLP con fines diagnósticos y de caracterización viral, proporciona un método rápido y económico para su posible implantación en gran escala; asimismo, la amplificación por PCR directamente del tejido elimina la necesidad del aislamiento viral. En la industria avícola se requiere de resultados en el menor tiempo posible, ya que los pollos de engorda se llevan al rastro entre las semanas siete y ocho. El aislamiento viral, aunque es un método confiable, consume mucho tiempo, ya que se requiere de al menos diez pases en cultivo celular antes de demostrar efecto citopático. Los pases en cultivo celular se llevan a cabo cada 72 horas, de modo que un aislamiento del virus de anemia infecciosa demora por lo menos cuatro semanas,⁷ en comparación con la técnica de PCR que, en conjunto con el RFLP para la clasificación de los virus, se llevó a cabo en cuatro días.

De las tres enzimas utilizadas en los RFLP, dos aportaron información relevante para la clasificación del virus; estos hallazgos concuerdan con lo descrito por Todd *et al.*, quienes pudieron separar 14 aislamientos en siete grupos, de acuerdo con los patrones de restricción.¹⁰

El uso de las tres endonucleasas permitió identificar en las 30 muestras, diez tipos virales distintos; la mayoría de las muestras correspondieron a virus diferentes de los descritos previamente en el mundo, ello sugiere que estas variedades se encuentran sólo en México.

Por otra parte, algunos de los virus fueron similares a los encontrados en Alemania, Suiza, Japón, Estados Unidos de América y Australia, pero ninguna de las muestras correspondió con cepas descritas en Irlanda y el Reino Unido.¹⁰ En estos casos, el virus que se identificó con mayor frecuencia fue el tipo uno, con

Figura 3: Geles de acrilamida al 10% que muestran patrones de restricción para el gen VP1 del virus de anemia infecciosa con las enzimas *HaeIII*, *HinfI* y *HpaII*.

Figure 3: Ten percent polyacrylamide gels that show the restriction patterns for gene VP1 of the chicken infectious anemia virus digested with enzymes *HaeIII*, *HinfI* and *HpaII*.

for widespread use; furthermore, PCR amplification directly from the tissue eliminates the need for viral isolation. In the poultry industry results are required in the least time possible as broilers are taken to slaughter between weeks seven and eight. Viral isolation, although a reliable method, consumes much time because it requires at least 10 passes in cellular culture before a cytopathic effect can be demonstrated. The passes in cellular culture are carried out every 72 hours; therefore, an isolation of the infectious anemia virus takes at least four weeks,⁷ as compared to the PCR technique that together with RFLP for classifying the virus, took a total of four days.

Of the three enzymes used in RFLP, two provided information relevant for classifying the virus which agrees with what was described by Todd *et al.*, who were able to separate 14 isolates in seven groups according to the restriction patterns.¹⁰

The use of three endonucleases allowed the identification of 10 distinct viral types within the 30 samples; the majority of them corresponded to virus different to those previously described worldwide. This suggests that these varieties can only be found in Mexico.

On the other hand, some of the virus were similar to those found in Germany, Switzerland, Japan, United States of America and Australia, but none of the samples corresponded to strains described in Ireland and the United Kingdom.¹⁰ In these cases, the virus that was identified with higher frequency was type one, with five cases, which corresponded to the oldest known isolates and that are widespread throughout the world.¹⁴ Due to the fact that the disease is transmitted vertically, it is possible that the disease arrived in Mexico through the importation of breeders and once the virus was established in farms, the genome suffered changes caused by the multiple passes experienced within the chickens, thus giving rise to local virus.^{15,16}

In the wild, outbreaks of chicken infectious anemia have occurred in animals originating from breeders vaccinated against CIAV. The fact that in this study the virus used for vaccination could not be grouped with any Mexican virus provides scope for the variation in the capsid characteristics to be one of the factors that influence the presence of these cases. The capsid, besides participating in the adhesion and penetration mechanisms, is responsible for the immune response against the virus. It is possible that the protection provided by the vaccines is less effective because the challenges are with virus of different characteristics. In this context, knowledge on the virus in Mexico points towards the development of vaccines from local varieties in order to improve the protection level in vaccinated birds.

Findings suggest that genetic variability of the virus

cinco casos, que corresponden a los aislamientos más antiguos conocidos y están diseminados en todo el mundo.¹⁴ Dado que la enfermedad tiene transmisión vertical, es posible que la enfermedad haya llegado a México a través de la importación de progenitoras, y una vez establecido el virus en las granjas, se presentaron cambios en el genoma, ocasionados por los pasajes que experimenta en los pollos, lo que dio origen a virus locales.^{15,16}

En el campo se han presentado brotes de anemia infecciosa en pollos provenientes de reproductoras vacunadas contra VAIP. El hecho de que el virus empleado como vacuna en este estudio no pudiera ser agrupado con ningún virus mexicano, posibilita que la variación en las características de la cápside sea uno de los factores que influyen en la presentación de estos casos, ésta, además de participar en los mecanismos de adhesión y penetración, es responsable de la respuesta inmune contra el virus. Es posible que la protección conferida por las vacunas sea menos eficiente por tratarse de desafíos con virus de características distintas. En este contexto, el conocimiento de los virus en México orienta hacia el desarrollo de vacunas a partir de las variedades locales, para mejorar el nivel de protección en las aves vacunadas.

Los hallazgos sugieren que la variabilidad genética del virus es amplia, representada por virus de otras partes del mundo (Cux-1) y gran variedad de cepas locales. Se requieren estudios extensos que proporcionen más detalles acerca de la variación genética de los virus presentes en México, para conocer su frecuencia y distribución geográfica. Esta información es útil para rastrear los caminos de infección y el origen de los nuevos virus.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado mediante el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN204901 y IN207502) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Referencias

1. Yuasa N, Taniguchi T, Yoshida I. Isolation and Some Characteristics of an Agent Inducing Anemia in Chicks. *Avian Dis* 1979; 23:366-385.
2. Valle VM, Lucio DE. Demostración de la presencia de anticuerpos y del virus de la anemia infecciosa en México por medio de la prueba de inmunoperoxidasa indirecta. *Memorias de la XVIII Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas*; 1993 mayo 5-9; México (DF). México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 1993: 328-335.
3. Ledesma MN, Fehervari T, Casaubon HMT, Lucio DE,

is great, represented by virus of other parts of the world (Cux-1) as well as a great variety of local strains. Further research is required to provide more details in the genetic variation of the virus present in Mexico, in order to know their frequency and geographical distribution. This information is useful to trace the infection pathways and the origin of new virus.

Acknowledgements

This work was financed through the Program for Support to Research Projects and Technological Innovation (PAPIIT IN204901 and IN207502) of the National Autonomous University of Mexico.

-
- Ratz F. Chicken Infectious Anemia in Mexico: Virus Identification and Serology Survey. *Avian Dis* 2001; 4:788-796.
4. Nteborn MH, Koch G. Chicken Anaemia Virus Infection: Molecular Basis of Pathogenicity. *Avian Pathol* 1995; 24: 11-31.
 5. Rehshaw RW, Soiné C, Weinkle T, O'Connell PH, Ohashi K, Watson S *et al.* A Hypervariable Region in VP1 of Chicken Infectious Anemia Virus Mediates Rate of Spread and cell Tropism in Tissue Culture. *J Virology* 1996; 70: 8872-8878.
 6. Ledesma MN. Anemia infecciosa. *Memorias de IX Jornadas Médico Avícolas*; 2003 febrero 19-21; Ciudad Universitaria México (DF). México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2003; 177-182.
 7. McNulty MS. Chicken anemia agent. In: Chairman HG, Arp LH, Domermuth CH, Pearson JE, editors. *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologist, 1989:108-109.

8. Calnek BW, Lucio B, Cardona C, Harris RW, Schat KA, Buscaglia C. Comparative Susceptibility of Marek's Disease Cell Lines to Chicken Anemia Virus. *Avian Dis* 2001; 44:114-124.
9. Tham KM, Stanislawek WL. Polymerase Chain Reaction Amplification for direct Detection of Chicken Anemia Virus DNA in Tissues and Sera. *Avian Dis* 1992; 36:1000-1006.
10. Todd D, Mawhinney KA, McNulty MS. Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1661-1666.
11. Kwon HM, Jackwood MW, Gelb J. Differentiation of Infectious Bronchitis Virus Serotypes Using Polymerase Chain Reactions and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Avian Dis* 1993; 37:194-202.
12. Nanthakumar T, Kataria RS, Tiwari G, Butcaiah G, Kataria JM. Pathotyping of Newcastle Disease Virus by RT-PCR and Restriction Enzyme Analysis. *Vet Res Communications* 2000; 24: 275-286.
13. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
14. McNulty MS. Chicken anaemia agent: a review. *Avian Pathol* 1991; 20: 187-203.
15. Scott ANJ, Connor TJ, Creelan JL, McNulty MS, Todd D. Antigenicity and pathogenicity characteristics of molecularly cloned chicken anemia virus obtained following multiple cell culture passage. *Arch Virol* 1999; 144:1961-1975.
16. Todd D, Connor TJ, Creelan JL, Borgmans BJ, Calvert VM, McNulty MS. Effects of multiple cell culture passages on the biological behaviour of chicken anemia virus. *Avian Pathol* 1998; 27: 74-79.