



Detección y caracterización del virus de la *anemia infecciosa aviar* en Colombia

Elizabeth L. Folleco-Villarreal¹ ; Diego Piedrahita¹ ; José A. Usme-Ciro² ;
Gloria C. Ramirez-Nieto³ ; Jenny J. Chaparro-Gutiérrez^{1*} .

¹Universidad de Antioquia UdeA, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Medicina Veterinaria, Grupo CIBAV. Medellín, Colombia

²Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad de Medicina, Centro de Investigación en Salud para el Trópico (CIST). Santa Marta, Colombia.

³Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Bogotá, Colombia.

*Correspondencia: jenny.chaparro@udea.edu.co

Recibido: Enero 2023; Aceptado: Mayo 2023; Publicado: Mayo 2023.

RESUMEN

Objetivo. identificar el virus de la anemia infecciosa aviar (*chicken anemia virus*, CAV) en granjas avícolas y aves de traspatio en Antioquia, Colombia. **Materiales y métodos.** Se tomaron muestras de sangre y plumas de gallinas ponedoras; en cada granja se eligieron tres aves de seis edades diferentes (1, 15, 30, 60, 90 y 120 días de edad). También se obtuvieron muestras de aves de traspatio ubicadas cerca de las granjas estudiadas. Se realizó ELISA y PCR para el análisis de las muestras. **Resultados.** Mediante PCR, el 84% de las aves resultaron positivas al CAV en sangre total y el 66% en muestras de plumas. El 60% de las aves de traspatio dieron positivo en sangre y el 40% en folículo de pluma. Mediante ELISA, el 22% de las aves de las granjas avícolas presentó títulos de anticuerpos altos y el 19% moderados. En las aves de traspatio, el 43% presentó títulos de anticuerpos altos y 29% moderados. Además, los resultados de la prueba de RFLP y la secuenciación mostraron que el virus circulante encontrado en este estudio era diferente del de la cepa vacunal Cux-1 utilizada en el país. **Conclusiones.** El CAV está presente en Colombia en aves comerciales como de traspatio. Según los hallazgos, un alto porcentaje de las aves dieron positivo para la detección viral, aunque el número de aves positivas por anticuerpos fue bajo. Se requiere determinar las características del virus circulante para explicar la respuesta de anticuerpos obtenida.

Palabras clave: Análisis filogenético; estudio molecular; secuenciación; virus de la anemia infecciosa aviar (*Fuente: NLM*).

ABSTRACT

Objective. identify the presence of chicken anemia virus (CAV) in poultry farms and backyard chickens from Antioquia, Colombia. **Materials and Methods.** Blood and feather samples were taken from laying chickens; in each farm, three birds of six different ages (1, 15, 30, 60, 90, and 120 days old) were chosen randomly. Backyard chicken samples were also obtained near the research farms. We used serology and molecular techniques to analyze the samples. **Results.** By PCR, the 84% of the birds were positive in whole blood and 66% were positive in feather samples. The 60%

Como citar (Vancouver).

Folleco-Villarreal EL, Piedrahita D, Usme-Ciro JA, Ramirez-Nieto GC, Chaparro-Gutiérrez JJ. Detección y caracterización del virus de la *anemia infecciosa aviar* en Colombia. Rev MVZ Córdoba. 2023; 28(2):e2835. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2835>



©El (los) autor (es) 2023. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

of backyard chickens tested were positive in blood and 40% in feather follicle. By serology, the 22% of the poultry farm birds presented high antibody titers and 19% moderate antibody titers. In the backyard chickens, 43% of them presented high antibody titers and 29% moderate antibody titers. In addition, results from the RFLP test and sequencing showed that the circulating virus found in this study was different from the Cux-1 vaccine strain used in Colombia. **Conclusions.** CAV is present in Colombia in both commercial and backyard chickens. According to the findings, a high percentage of the birds tested positive for viral detection, whereas the number of birds that tested positive for antibodies was low. Thus, the characteristics of the circulating virus need to be determined to explain the antibody response observed in this study.

Keywords: Chicken anemia virus; molecular detection; phylogenetic analysis; sequencing (*Source: NLM*).

INTRODUCCIÓN

La anemia infecciosa aviar-AIA (*chicken infectious anemia*) es causada por el virus de la anemia infecciosa aviar (*chicken anemia virus*, CAV) y ocurre en aves de menos de 2 semanas de edad sin anticuerpos maternos (1). El CAV se transmite tanto vertical como horizontalmente (2), se excreta a través de las heces (3) y probablemente también a través de las plumas (4). El virus infecta los hemocitoblastos y linfoblastos de células T (5,6), lo cual genera inmunosupresión (7) y puede permitir la entrada de otros agentes infecciosos (8).

El CAV es uno de los diez miembros del género *Gyrovirus* dentro de la familia *Anelloviridae* (9). Su genoma de 2.3 kb es circular, con ADN monocatenario negativo (1). Codifica un ARN policistrónico (5) con tres marcos abiertos de lectura para tres proteínas virales: VP1, VP2 y VP3 (10). El fragmento que codifica el gen VP1 se caracteriza por su alta variabilidad (2,11), lo que lo hace útil para la caracterización y el análisis filogenético del CAV (12). Aunque el virus ha sido detectado y caracterizado en varias partes del mundo (1), en Colombia no se han realizado estudios al respecto a pesar de que las gallinas reproductoras son vacunadas antes de la postura.

Debido a la falta de información en el país, este estudio tuvo como objetivo identificar la presencia del CAV, realizar una caracterización filogenética de las cepas circulantes y determinar los niveles de anticuerpos en granjas comerciales de aves ponedoras de diferentes edades y en aves de traspatio en el oriente y norte de Antioquia, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de muestreo. Entre 2014 y 2015 se tomaron muestras de sangre y plumas de aves ponedoras Lohmann Brown e Isa Brown clínicamente sanas y sin antecedentes de haber sido vacunadas contra el CAV, el virus objeto del estudio. Las aves pertenecían a cuatro granjas avícolas ubicadas en el departamento de Antioquia, Colombia. En cada granja se eligieron al azar tres aves de seis edades distintas (1, 15, 30, 60, 90 y 120 días de edad). También se incluyeron muestras de aves de traspatio provenientes de predios situados cerca de las granjas del estudio. El método de muestreo fue por conveniencia, y no fue posible tomar muestras de todas las aves a los 90 días de edad ni de todas las aves de traspatio. Los procedimientos y métodos con animales que se utilizaron en el estudio fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia (Acta 99 de 2015).

Detección de anticuerpos contra el CAV por ELISA. Para identificar presencia de anticuerpos contra el CAV en los animales, se utilizó un kit comercial (IDEXX®, Estados Unidos). Las muestras de sangre se centrifugaron a 2000 xg durante 5 minutos para obtener las fracciones de suero, que se diluyeron en una relación 1:100 para la prueba. La lectura de los resultados se realizó por espectrofotómetro (BioTek®, Vermont, Estados Unidos) a una longitud de onda de 650 nm.

Los procedimientos y análisis se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante (IDEXX®, Estados Unidos). Para calcular los

resultados, se empleó la relación entre las lecturas de densidad óptica de las muestras y la del control negativo (S/N). Las muestras con valores inferiores a 0.2 se definieron como positivas y aquellas de valores superiores a 0.8 se definieron como negativas. Se estableció una relación entre el resultado, los títulos correspondientes y la protección. Se consideró que títulos muy bajos (por debajo de 1000) no conferían protección; títulos moderados (entre 1000 y 8600) conferían una protección baja, y títulos altos (superiores a 8600) proporcionarían una protección alta (13).

Detección del CAV en muestras de sangre y plumas por PCR. El ADN de las muestras de sangre se extrajo utilizando un kit comercial (Qiagen®, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para extraer el ADN de las plumas, se utilizó el mismo kit con un protocolo modificado: se cortaron los folículos de plumas en fragmentos de aproximadamente 2 mm, se mezclaron con 180 µL del tampón ATL y 20 µL de proteinasa K. La mezcla se incubó a 56°C durante una hora, agitándola cada 15 minutos. El ADN obtenido se almacenó a -20°C.

Se analizaron un total de 81 muestras de ADN de sangre completa (3 granjas con 18 muestras cada una, 1 granja con 17 muestras, y 10 muestras de aves de traspatio), 29 muestras de ADN de plumas (6 grupos por granja y 5 grupos de aves de traspatio) y 78 muestras de suero sanguíneo (3 granjas con 18 muestras cada una, 1 granja con 17 muestras, y 7 muestras de aves de traspatio).

Para la detección, se llevó a cabo PCR para amplificar un fragmento de 713 pb del gen que codifica la proteína CAV VP2, con los cebadores 5-GCG CAC TAC CGG TCG GCA GT-3 y 5-GGG GTT CGG CAG CCT CAC ACT AT-3 (14). Se realizó la amplificación en tampón de PCR que contenía 2 mM de MgCl₂, 0.4 mM de desoxinucleótido 5'-trifosfato, 0.4 pM de cada cebador y 5 U de *Taq* ADN polimerasa (ThermoFisher Scientific®, Estados Unidos) en un volumen final de 25 µL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador automatizado (MJ Research®, Massachusetts, Estados Unidos) con el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión a 94°C durante 1 minuto, 63°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, respectivamente.

PCR dirigida al gen VP1. En las muestras positivas para el CAV, se realizaron ensayos de PCR para amplificar de manera independiente dos fragmentos del gen que codifica VP1. Uno de ellos utilizó el siguiente par de cebadores: directo 5-GAC TGT AAG ATG GCA AGA CGA GCT C-3 e inverso 5-GGC TGA AGG ATC CCT CAT TC-3 para amplificar un fragmento de 675 pb (15). El otro utilizó el siguiente par de cebadores: directo 5-AGC CGA CCC CGA ACC GCA AGA A-3 e inverso 5-TCA GGG CTG CGT CCC CCA GTA CA-3 para amplificar un fragmento de 1390 pb (14). Las reacciones se llevaron a cabo en tampón de PCR que contenía 2 mM de MgCl₂, 0.4 mM de desoxinucleótido 5'-trifosfato, 0.4 pM de cada cebador y 5 U de *Taq* ADN polimerasa (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos) en un volumen final de 25 µL.

Las condiciones de PCR para la amplificación del fragmento de 675 pb fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión a 95°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, respectivamente. Por otra parte, las condiciones de PCR para la amplificación del fragmento de 1390 pb fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión a 94°C durante 1 minuto, 56°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, respectivamente.

RFLP para la caracterización de cepas. Los productos de PCR del fragmento de 675 pb del gen VP1 de las muestras del estudio y de la cepa vacunal Cux-1 se digirieron independientemente con endonucleasas: *Dde* I (HpyF3I), *Hae* III (BsuRI), *Hha* I, *Mbo* I, *Hpa* II y *Hinf* I (ThermoFisher Scientific®, Estados Unidos) (15,16). La reacción en un volumen final de 32 µL contenía 10 µL del producto PCR, 1X del tampón recomendado para cada enzima y 20 U de la enzima. La reacción se incubó a 37°C durante 6 horas y se desnaturalizó a 80°C durante 30 minutos. Los productos digeridos se analizaron y separaron por electroforesis con tampón TBE 1X en gel de poliacrilamida al 15% y se tiñeron con el Silver Kit (ThermoFisher Scientific®, Estados Unidos) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se determinó el número de bandas y su peso a partir de los marcadores de peso molecular de 50 pb y 100 pb (GeneRuler DNA Ladder, ThermoFisher Scientific®, Estados Unidos).

Análisis filogenético. Las secuencias M5S3_N_CO_2015, D5S2_N_CO_2015 y C+_vaccine_Cux_1_RegICA8649BV derivadas del gen VP2 se editaron y ensamblaron utilizando Geneious® 9.1.8 (Biomatters Ltd®, Nueva Zelanda). Después, se alinearon entre sí y con respecto a secuencias homólogas disponibles en GenBank, incluida la secuencia de la cepa CAV Cux-1 (NC_001427.1) como referencia (únicamente se incluyó el fragmento correspondiente a la longitud de las secuencias obtenidas en este estudio), utilizando el algoritmo ClustalW integrado en el software MEGA 7.0 (17). Se identificaron las posiciones de los nucleótidos y aminoácidos según las secuencias de referencia NC 001427.1 y NP 056774.1.

Con el fin de establecer la relación entre las secuencias obtenidas en el presente estudio y otras secuencias de cepas circulantes a nivel mundial, se construyó un árbol filogenético mediante el software MEGA 7.0, utilizando el método de máxima verosimilitud (maximum likelihood, ML) con el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura de 2 parámetros (17,18). Se usó el método de soporte *bootstrap* con 1000 réplicas para establecer la confianza de la topología del árbol. Las secuencias nucleotídicas generadas en el presente estudio fueron depositadas en la base de datos GenBank.

RESULTADOS

Amplificación de CAV VP2 a partir de muestras de sangre mediante PCR. De acuerdo con los resultados de la PCR de amplificación del gen VP2, el 84% (68/81) del total de muestras analizadas fueron positivas

para la detección del CAV. Se encontraron aves CAV-positivas en todas las edades: el 92% (11/12) de las aves de 1 día; el 83% (10/12) de las aves de 15, 30 y 60 días; el 82% (9/11) de las aves de 90 días; y el 100% (12/12) de las aves de 120 días. Respecto a las aves de traspatio, el 60% (6/10) arrojó resultados positivos para el CAV (Tabla 1).

Amplificación de CAV VP2 a partir de muestras de plumas mediante PCR. El 66% (19/29) de las muestras de plumas resultaron positivas para el CAV. Se encontraron muestras de pluma de aves comerciales positivas en todas las edades. Las cifras de los resultados positivos fueron las siguientes: 100% (4/4) de las aves de 1 y 60 días; 50% (2/4) de las de 15 días; 75% (3/4) de las de 30 y 90 días; y 25% (1/4) de las de 120 días. Además, el 40% (2/5) de las aves de traspatio dieron positivo para el virus (Tabla 1).

Serología para CAV. Del total de muestras de suero analizadas, el 41% (32/78) resultaron positivas para anticuerpos contra el CAV. Hubo un 22% (17/78) de aves positivas con títulos de anticuerpos elevados y un 19% (15/78) con títulos moderados. Los porcentajes de animales que presentaron títulos de anticuerpos elevados contra el CAV fueron los siguientes: 50% (6/12) de las aves de 1 y 120 días, 8% (1/12) de las aves de 15 días y 9% (1/11) de las aves de 90 días. Los porcentajes de aves que presentaron únicamente títulos de anticuerpos moderados fueron los siguientes: 17% (2/12) de las aves de 30 días y 8% (1/12) de las aves de 60 días. Del total de aves de traspatio analizadas, el 43% (3/7) presentaron títulos de anticuerpos elevados y el 29% (2/7) títulos moderados (Figura 1).

Tabla 1. Resultados de PCR del fragmento VP2 y serología.

Edad	PCR del gen VP2 (713 pb)				Serología para CAV			
	PCR en sangre		PCR en plumas		S/N <0.2 ^a		S/N 0.8-0.2 ^b	
1 día	92%	(11/12)	100%	(4/4)	50%	(6/12)	17%	(2/12)
15 días	83%	(10/12)	50%	(2/4)	8%	(1/12)	25%	(3/12)
30 días	83%	(10/12)	75%	(3/4)	0%	0	17%	(2/12)
60 días	83%	(10/12)	100%	(4/4)	0%	0	8%	(1/12)
90 días	82%	(9/11)*	75%	(3/4)	9%	(1/11)	27%	(3/11)
120 días	100%	(12/12)	25%	(1/4)	50%	(6/12)	17%	(2/12)
Aves de traspatio	60%	(6/10)*	40%	(2/5)	43%	(3/7)	29%	(2/7)
Total de positivos	84%	(68/81)	66%	(19/29)	22%	(17/78)	19%	(15/78)

^a Positivos con títulos de anticuerpos elevados; ^b Positivos con títulos moderados; *El muestreo se realizó por conveniencia, pero en estas granjas no fue posible muestrear 12 aves como en las demás granjas.

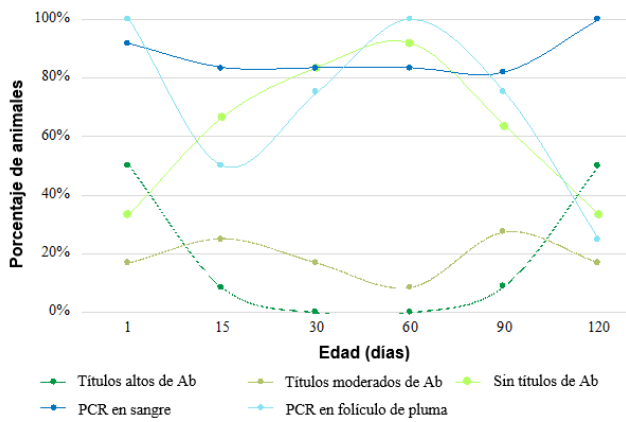


Figura 1. Porcentaje de animales CAV-positivos frente a animales con anticuerpos contra el virus (aves de 1 a 120 días de edad).

La línea azul denota el porcentaje de animales CAV-positivos en sangre por PCR. La línea azul claro denota el porcentaje de animales CAV-positivos en folículo de pluma por PCR. Las líneas verdes indican el porcentaje de aves con anticuerpos detectados por ELISA (títulos de anticuerpo elevados: S/N <0.2; títulos de anticuerpo moderados: S/N 0.8-0.2; títulos bajos o ausencia de anticuerpos: S/N >0.8).

Caracterización molecular de la cepa de CAV circulante en Colombia. Los resultados de la prueba de RFLP de las muestras colombianas mostraron un patrón que difería del de la cepa de control (cepa vacunal Cux-1)(Figura 2).

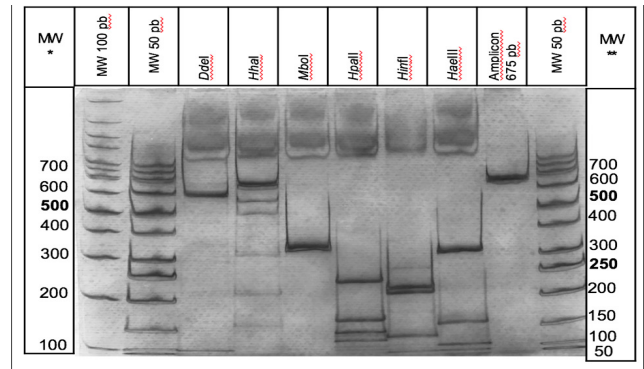


Figura 2. Caracterización por RFLP del control positivo (cepa Cux-1) mediante gel de poliacrilamida (15%) a través de las enzimas *Hha I*, *Mbo I*, *Dde I*, *Hae III*, *Hinf I* y *Hpa II*. Columna 1* y 12** : marcadores de peso molecular de 100 pb y 50 pb, respectivamente. Columnas 2, 3 y 11: posiciones de las bandas de los marcadores de peso molecular. Columnas 4 a 9: posiciones de las bandas de Cux-1 digeridas con endonucleasas. Columna 10: fragmento PCR de 675 pb del gen VP1 de la cepa vacunal Cux-1.

Se obtuvo un patrón de restricción como el de la cepa Cux-1 solo con las enzimas *Hha I* y *Mbo I*. Un patrón de restricción distinto al de Cux-1 se obtuvo con *Dde I*, *Hae III*, *Hinf I* y *Hpa II*. Cabe destacar que *Hae III* y *Hpa II* mostraron más cortes que *Hinf I* y *Dde I* (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de las bandas moleculares obtenidas por RFLP de las muestras estudiadas (M) en comparación con el control positivo (C+).

Endonucleasa	Número de bandas respecto al peso molecular (pb)												Número total de bandas	
	=50 - <200		≥200 - <300		≥300 - <400		≥400 - <500		≥500 - <600		≥600			
	M	C+	M	C+	M	C+	M	C+	M	C+	M	C+	M	C+
<i>Dde I</i>	3	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	-	5	1
<i>Hha I</i>	-	1	1	1	1	1	-	-	-	2	-	1	2	6
<i>Mbo I</i>	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Hpa II</i>	2	3	1*	1*	-	-	2	-	-	-	-	-	5	4
<i>Hinf I</i>	-	1	-	2	-	-	-	-	1	-	-	-	1	3
<i>Hae III</i>	-	2	3	-	-	1	-	-	-	-	-	-	3	3

*: este resultado obtuvo el mismo número de bandas, pero su posición dentro del intervalo fue diferente.

Las secuencias parciales de nucleótidos del gen VP2 de las muestras positivas obtenidas en el estudio se identificaron como M5S3_N_CO_2015 y D5S2_N_CO_2015 y se depositaron en GenBank* con los números de acceso MF357710 y MF357711. Estas secuencias correspondían al CAV circulante en aves ponedoras de 90 días de edad en granjas ubicadas en el norte de Antioquia, Colombia. El control positivo de la reacción se identificó como C+_vaccine_Cux_1_RegICA8649BV y se depositó en GenBank* con el número de acceso MF357712. La longitud de estas secuencias, excluyendo las regiones de hibridación de los oligonucleótidos utilizados durante la amplificación por PCR, fue de 221 pb, localizadas entre los nucleótidos 640 y 860 del genoma de referencia. Se observaron dos grandes linajes en el árbol construido, que se identificaron como A y B (Figura 3). Las secuencias de Colombia pertenecían al linaje A junto con la mayoría de las secuencias analizadas, excepto Mhd8 y Mhd6 de Irán, que fueron las únicas secuencias situadas en el linaje B.

*ID de GenBank de las secuencias de este estudio: MF357710, MF357711, MF357712.

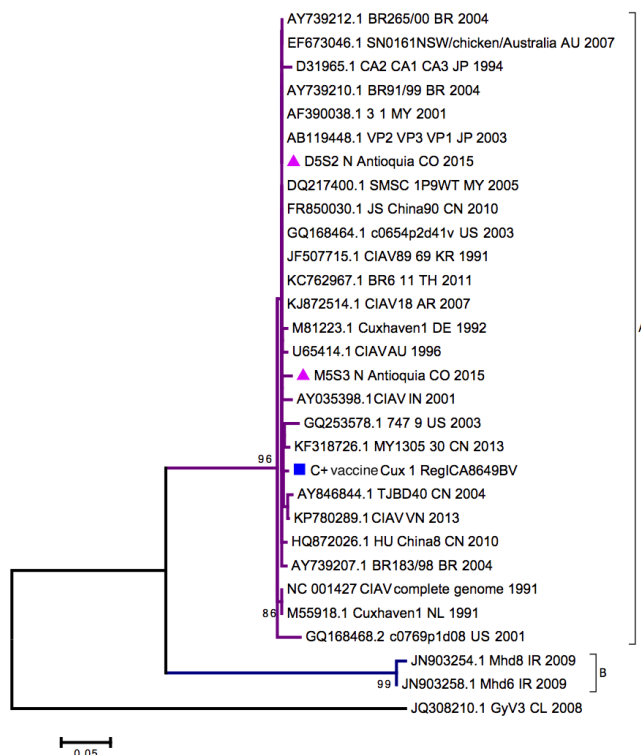


Figura 3. Análisis filogenético molecular de 26 secuencias de nucleótidos del CAV.

Árbol filogenético construido usando el método de máxima verosimilitud con el modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura de 2 parámetros (18) en el software MEGA 7.0 (17) con 1000 réplicas *bootstrap*. Se indican los valores relevantes de las ramas (≥ 60). Se

identificaron dos clados (clado A y clado B); la mayoría de las secuencias pertenecían al grupo A. Las secuencias identificadas en las granjas estudiadas se indican con triángulos rosa (D5S2-N-Antioquia-CO-2015 y M5S3-N-Antioquia-CO-2015). La secuencia de control está denotada con un cuadrado azul (cepa vacunal C+_vaccine_Cux_1_RegICA8649BV). Las 26 secuencias disponibles en GenBank se identificaron con el número de acceso seguido del nombre, el país y el año.

Tres posiciones de nucleótidos fueron variables al comparar por pares las secuencias M5S3_N_Antioquia_CO_2015, D5S2_N_Antioquia_CO_2015 y C+_vaccine_Cux_1_RegICA8649BV. Cabe destacar que dos de las tres sustituciones fueron compartidas por las secuencias D5S2_N_Antioquia_CO_2015 y C+_vaccine_Cux_1_RegICA8649BV, y la otra sustitución fue compartida por las secuencias M5S3_N_Antioquia_CO_2015 y D5S2_N_Antioquia_CO_2015 (Tabla 3).

A nivel de aminoácidos, se produjeron cambios en las posiciones 93, 118, 138 y 153 del gen VP2 (K/L, A/K, K/S y A/R, respectivamente) y en la posición 83 del gen VP3 (P/K) con respecto a la secuencia de referencia (NC 001427). En particular, la secuencia M5S3 N Antioquia CO 2015 presentó una variación frente a las secuencias identificadas en este estudio y la que se empleó como referencia. Se encontraron variaciones menores en comparación con las demás secuencias analizadas, excepto en el caso de las secuencias de Irán y la secuencia del grupo externo. Los cambios en nucleótidos y aminoácidos se presentan en la tabla 3.

De acuerdo con la estimación de divergencia evolutiva, las secuencias colombianas D5S2_N_Antioquia_CO_2015 y M5S3_N_Antioquia_CO_2015 presentaron una distancia de 0,005 y 0,014 frente al control positivo (C+_vaccine_Cux_1_RegICA8649BV) respectivamente, siendo menor o igual a la distancia encontrada entre este control y las cepas de otras partes del mundo, como Japón (VP2 VP3 VP1 JP 2003), Malasia (3 1 MY 2001; SMSC 1P9WT MY 2005), Brasil (BR265/00 BR 2004; BR91/99 BR 2004), China (TJBD40 CN 2004; JS China90 CN 2010), Estados Unidos (c0654p2d41v US 2003), Corea (CIAV89 69 KR 1991), Tailandia (BR6 11 TH 2011), Argentina (CAV 18 AR 2007) y Australia (SN0161NSW/chicken/Australia AU 2007). La mayor distancia se encontró al comparar con las secuencias de Irán (Mhd8 IR 2009; Mhd6 IR 2009) (Matriz de la estimación de divergencia evolutiva entre secuencias, como material suplementario).

Tabla 3. Cambios en aminoácidos de las secuencias seleccionadas de este estudio.

N ^a	Secuencias del estudio						
	NC 001427 CAV genoma completo 1991	M5S3_N_Antioquia_CO_2015	D5S2_N_Antioquia_CO_2015	C+_vaccine_Cux_1_RegICA8649BV			
656	Leucina	K	ORF2: 93	-	-	-	
		L	ORF3: 57				
732	Lisina	A	ORF2: 118	-	-	-	
		P	ORF3: 83				
794	Serina	K	ORF2: 138	-	-	-	
		S	ORF3: 103				
838	Arginina	A	ORF2: 153	A	ORF2: 153	A	ORF2: 153
		R	ORF3: 118	R	ORF3: 118	R	ORF3: 118

^a N: nucleótido. Posición del cambio de nucleótido según la longitud de la secuencia de referencia del CAV (NC 001427). Los cambios se muestran según la longitud del CAV de referencia y su posición en cada marco abierto de lectura (open reading frame, ORF).

DISCUSIÓN

Un número elevado de animales resultó positivo en la PCR para el CAV (84%), a pesar de no haber antecedentes de vacunación ni signos de enfermedad. La presencia del virus en muestras de sangre y tejidos se ha asociado a la migración de células linfoides infectadas al torrente sanguíneo y, posteriormente, a otros tejidos u órganos linfoides (19). A pesar de que esto evidenciaría una infección activa, el porcentaje de aves que dieron positivo en las pruebas de anticuerpos fue bajo (41%), posiblemente debido a la afectación del tejido linfóide previamente reportada (20) que dificulta la seroconversión, lo que hace que estas aves sean muy susceptibles de presentar la enfermedad.

Los resultados en aves de 1 día que mantuvieron la infección durante poco más de 15 días podrían explicarse suponiendo que pudieron adquirirla de la madre por vía vertical (21), ya que el virus invade y permanece en las gónadas (22) y en el tracto reproductor hasta 12 meses después de la infección sin presentar signos de la enfermedad y con transmisión del virus a la progenie (23).

Sin embargo, aunque se esperaba que el 100% de las aves de 1 día presentaran anticuerpos contra el CAV debido a la inmunidad pasiva (transferencia de anticuerpos de la madre), este porcentaje fue del 50%. Esto probablemente se asoció a una variación en los títulos de anticuerpos de la madre que afecta la transmisión a la progenie y las hace susceptibles al AIA (24). La seroconversión en las aves puede verse

alterada por factores como el tipo de cepa, la alimentación, las condiciones de incubación, el estrés, las micotoxinas, los agentes infecciosos y los ambientes contaminados (25,26,27). Estas razones podrían favorecer la escasa transmisión de anticuerpos de las madres a la progenie (21,28).

Teniendo en cuenta el periodo de infección a partir de la madre, las aves de edades posteriores a los 15 días pudieron re infectarse por vía horizontal, ya que la probabilidad de adquirir el virus aumenta a medida que aumenta la edad (29) y la inmunidad pasiva decae a los 21 o 42 días (28). Lo anterior, junto con la afectación del tejido inmune (20), explicaría por qué tan solo unas pocas aves en las edades intermedias de 30 y 60 días presentaron anticuerpos a pesar de dar positivo al virus en sangre, lo que hace que las aves sean susceptibles a los efectos del virus y facilita la entrada de otros agentes como el virus de la bronquitis infecciosa (30) o el virus de la enfermedad de Marek (31). En particular, la presencia del virus de la enfermedad de Marek podría aumentar la susceptibilidad al CAV o a su infección persistente.

Las reinfecciones con el CAV o la reactivación del virus podrían estimular la producción de anticuerpos 2 semanas después de la infección (32,33), lo que daría lugar a que más animales dieran positivo en ELISA a edades avanzadas (34), como en el caso de este estudio que fue a los 120 días de edad. En esta etapa, el inicio de la madurez sexual podría favorecer la reactivación del virus debido a los cambios hormonales, lo

que induce su replicación (22,35) y la posterior seroconversión. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmarlo.

En cuanto a las aves de traspatio, no se esperaba encontrar animales positivos, ya que forman parte de pequeñas producciones y son criados para el consumo del propietario (36) y no cuentan con programas de vacunación. Sin embargo, un gran número de ellos tenía anticuerpos que teóricamente podrían neutralizar la cepa circulante, lo que pudo llevar a que solo un bajo porcentaje resultara positivo por PCR. Además, el virus circulante en estas aves podría ser vacunal o igual a la encontrada en este estudio, debido a que las aves comerciales que terminan su etapa productiva son vendidas y se convierten en aves de traspatio. Por otro lado, si estas aves no tuvieran anticuerpos, siendo susceptibles, podrían favorecer la propagación del virus en el campo (37). Por lo tanto, es fundamental caracterizar el CAV que circula en las aves de traspatio e identificar sus efectos en la producción avícola comercial, ya que pueden mantener el ciclo de transmisión del virus (38).

En cuanto al muestreo de plumas, éste ha sido útil para identificar el CAV a nivel poblacional, teniendo en cuenta que el virus se elimina por las heces únicamente hasta los 5 dpi (4,39). Además, es una técnica no invasiva que permite evaluar fácilmente la infección horizontal por CAV en las producciones avícolas (33,40). En consecuencia, una posible explicación para las aves de 1 día de edad que resultaron 100% positivas por pluma podría ser un entorno contaminado con el virus entre la eclosión y la llegada a la granja. En el caso de las aves de 90 y 120 días, los resultados por PCR fueron bajos, pero los porcentajes de ELISA fueron altos, esto permitiría pensar que los anticuerpos fueron capaces de detener la replicación del CAV en dichos animales. Sin embargo, el haber tenido resultados positivos por PCR en todas las edades, puede sugerir un fallo en las medidas de bioseguridad aplicadas en las granjas estudiadas (41) y una falta de seguimiento del estado sanitario, ya que las plumas funcionan como vehículo para diseminación del virus y lo mantienen hasta 32 días a 4°C (4,40). Por lo tanto, los resultados de PCR en pluma obtenidos en este estudio indican que el virus se encontraba en aves comerciales de todas las edades y también en aves de traspatio. Pero son necesarios más estudios para evaluar el papel de las plumas en la transmisión de la cepa identificada en condiciones naturales y su relación con los niveles de anticuerpos encontrados.

Igualmente, se deben evaluar las medidas de bioseguridad en estas granjas y se debe estudiar la vacunación como medida útil frente al CAV, especialmente en gallinas reproductoras, ya que esta es la primera inmunidad pasiva frente al virus que tendrá la progenie (42). Por otro lado, un diagnóstico a tiempo con las técnicas adecuadas favorecería la vigilancia sanitaria y evitaría pérdidas económicas por inmunosupresión (24).

Características de la cepa colombiana del CAV. Teniendo en cuenta las características de la infección, se espera que el virus transmitido de la madre a la progenie derive de la vacuna. En este trabajo, el patrón de restricción que presentaron las muestras mediante la prueba de RFLP fue diferente al de la cepa vacunal Cux-1; y esta diferencia podría afectar a la respuesta inmunitaria del animal (43). Esto concuerda con los resultados publicados por otros autores (44,45,46,47). De igual manera, se determinó que las enzimas útiles para diferenciar la cepa colombiana de la Cux-1 mediante RFLP son *Dde I*, *Hha I*, *Hae III*, *Hinf I* y *Hpa II*; algunas de las cuales han sido reportadas por otros autores (14,48). Se destaca la utilidad de *Hae III* y *Hpa II* debido al número de cortes que se pueden realizar, lo que aumenta la posibilidad de clasificar las cepas. Del mismo modo, la escasa información que puede aportar *Hinf I* se debe al bajo número de fragmentos que genera. Si bien el patrón obtenido con *Mbo I* para las muestras del estudio fue el mismo que para la cepa vacunal Cux-1, no se consideró que la cepa circulante correspondiera a Cux-1 debido a los resultados obtenidos con otras endonucleasas utilizadas en el estudio.

Pese a la limitación en la longitud del fragmento analizado, los resultados de la prueba de RFLP se ven respaldados por la secuenciación del ADN, lo que confirma que las cepas circulantes de las granjas del estudio no son 100% idénticas a la cepa (vacunal) Cux-1.

Esto se ve soportado por la distancia filogenética de las cepas identificadas, que fue menor con cepas que han causado brotes de CIA, por ejemplo, en Argentina (44,46). La distancia evolutiva que presentan las secuencias del CAV colombiano podría estar relacionada con los efectos que generan en animales, la capacidad de diseminación en cultivo celular (49) o el curso subclínico de la enfermedad (44,46). Por lo tanto, los cambios nucleotídicos de las cepas identificadas deben evaluarse más a fondo,

junto con su patogenicidad y su capacidad para estimular la seroconversión, más aún cuando se asocia con otros agentes inmunosupresores (50).

En este sentido, se puede concluir que el CAV circulaba en las granjas estudiadas a lo largo de las diferentes etapas de crecimiento con baja seroconversión en los animales y que, de acuerdo con las secuencias obtenidas, el virus no fue idéntico a la cepa vacunal Cux-1 que se utiliza para la prevención del virus en Colombia.

Cabe mencionar que este constituye el primer reporte de CAV en Colombia utilizando técnicas moleculares, donde las diferencias moleculares entre la cepa colombiana y la vacunal podrían estar relacionadas con cuadros de inmunosupresión que podrían promover un curso subclínico de la infección. Esto debería ser objeto de más investigación, dado que, como hemos mencionado, el CAV tiene la capacidad de favorecer la entrada y permanencia de agentes secundarios como el virus de la enfermedad de

Marek, así como llevar a una mala respuesta a la vacunación y a pérdidas económicas aún por determinar. Por último, se necesitan más estudios para profundizar en la información conocida sobre la cepa, su patogenicidad y las consecuencias económicas de su presencia en las granjas afectadas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Asociación Colombiana de Médicos Veterinarios y Zootecnistas Especialistas en Avicultura, AMEVEA, Colombia, por financiar el proyecto. Grupo de Investigación CIBAV, Reconocimiento de la Estrategia para Apoyo a los Grupos de Investigación en Proceso de Consolidación 2018-2019, CODI, Universidad de Antioquia.

REFERENCIAS

1. Schat KA, van Santen VL. Chicken infectious anemia. En: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nair V, Nola LK, Suarez DL, Eds. Diseases of Poultry. 13th ed. EEUU: John Wiley & Sons; 2013
2. Smyth AJ, Schat KA. Virus-induced immunosuppression: chicken infectious anemia. En: Gimeno I, ed. Immunosuppressive diseases of poultry. 1st ed. Zaragoza, España: Servet; 2013
3. Aboelkhair M, El-razak AGA, Metwally AEY. Molecular Characterization of Chicken Anemia Virus Circulating in Chicken Flocks in Egypt. Adv Virol. 2014; 2014:797151. <https://doi.org/10.1155/2014/797151>
4. Davidson I, Artzi N, Shkoda I, Lublin A, Loeb E, Schat KA. The contribution of feathers in the spread of chicken anemia virus. Virus Res. 2008; 132(1-2):152-159. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.11.012>
5. Van der Eb AJ, Todd D, Noteborn MHM. Gyrovirus: Circoviridae. En: Tidona A. C, Darai G, eds. The springer index of viruses. New York: Springer Berlin Heidelberg; 2002 [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00079-5)
6. Miller MM, Schat KA. Chicken infectious anemia virus: an example of the ultimate host-parasite relationship. Avian Dis. 2004; 48(4):734-745. <https://doi.org/10.1637/7271-090304R>
7. Parrish RC. Circoviridae. En: MacLachlan NJ, Dubovi EJ, eds. Fenner's Veterinary Virology. 4th ed. Estados Unidos: Academic Press; 2011 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375158-4.X0001-6>
8. Bülow V, Rudolph R, Fuchs B. Folgen der Doppelinfektion von Küken mit Adenovirus oder Reovirus und dem Erreger der aviären infektiösen Anämie (CAA)*. J Vet Med Ser B. 1986; 33(1-10):717-726. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1986.tb00092.x>

9. Tariq SP, Nawal BA, Cui X, Shabir S, Wu C, Xing L. Genetic diversity, distribution, and evolution of chicken anemia virus: A comparative genomic and phylogenetic analysis. *Front Microbiol.* 2023; 14(1145225). <https://doi:10.3389/fmicb.2023.1145225>
10. Noteborn MH, de Boer GF, van Roozelaar DJ, Karreman C, Kranenburg O, Vos JG, et al. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *J Virol.* 1991; 65(6):3131–3139. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.6.3131-3139.1991>
11. Eltahir YM, Qian K, Jin W, Wang P, Qin A. Molecular epidemiology of chicken anemia virus in commercial farms in China. *Virology.* 2011; 8(1):145. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-145>
12. Ducatez MF, Owoade AA, Abiola JO, Muller CP. Molecular epidemiology of chicken anemia virus in Nigeria. *Arch Virol.* 2006; 151(1):97–111. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0609-7>
13. Hailemariam Z, Omar AR, Hair-Bejo M, Giap TC. Detection and characterization of chicken anemia virus from commercial broiler breeder chickens. *Virology.* 2008; 5(1):128. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-128>
14. Natesan S, Kataria JM, Dhama K, Rahul S, Baradhvaj N. Biological and molecular characterization of chicken anaemia virus isolates of Indian origin. *Virus Res.* 2006; 118(1–2):78–86. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.11.017>
15. Ledesma Martínez N, Fehervari T, Alonso R. Caracterización molecular de aislamientos mexicanos del virus de la anemia infecciosa del pollo, a través del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción. *Vet México.* 2007; 38(1):31–39. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42338104>
16. Mohamed MA. Chicken Infectious Anemia Status in Commercial Broiler Chickens Flocks in Assiut-upper Egypt: Occurrence, Molecular Analysis Using PCR-RFLP and apoptosis Effect on Affected Tissues. *Int J Poult Sci.* 2010; 9(6):591–596. <https://doi.org/10.3923/ijps.2010.591.598>
17. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33:1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
18. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980; 16(2):111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
19. Wani MY, Dhama K, Malik YS. Impact of virus load on immunocytological and histopathological parameters during clinical chicken anemia virus (CAV) infection in poultry. *Microb Pathog.* 2016; 96:42–51. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.05.003>
20. López S, Piedrahita D, Ramírez GC, Aranzazu D, Williams S, Chaparro J. La inmunodepresión subclínica, un problema importante en los sistemas de producción avícola. *Plumazos.* 2015; 51:14–23. https://amevea.org/pdfplumazos/Plumazos_051.pdf
21. Yuasa N, Yoshida I. Experimental egg transmission of chicken anemia agent. *Natl Inst Anim Health Q.* 1983; 23(3):99–100.
22. Brentano L, Lazzarin S, Bassi SS, Klein TAP, Schat KA. Detection of chicken anemia virus in the gonads and in the progeny of broiler breeder hens with high neutralizing antibody titers. *Vet Microbiol.* 2005; 105(1):65–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.019>
23. Cardona CJ, Oswald WB, Schat KA. Distribution of chicken anaemia virus in the reproductive tissues of specific-pathogen-free chickens. *J Gen Virol.* 2000; 81(8):2067–2075. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-8-2067>
24. Canal CW, Ferreira DJ, Macagnan M, Fallavena LCB, Moraes HLS, Wald VB. Prevalence of antibodies against chicken anaemia virus (CAV) in broiler breeders in Southern Brazil. *Pesqui Vet Bras.* 2004; 24(2):89–92. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2004000200008>

25. Davis M, Morishita TY. Relative ammonia concentrations, dust concentrations, and presence of *Salmonella* species and *Escherichia coli* inside and outside commercial layer facilities. *Avian Dis.* 2005; 49(1):30–35. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2005\)49\[30:RACDCA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2005)49[30:RACDCA]2.0.CO;2)
26. Hoerr FJ. Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian Dis.* 2010; 54(1):2–15. <https://doi.org/10.1637/9246.1>
27. Hulet R, Gladys G, Hill D, Meijerhof R, El-Shiekh T. Influence of egg shell embryonic incubation temperature and broiler breeder flock age on posthatch growth performance and carcass characteristics. *Poult Sci.* 2007; 86(2):408–412. <https://doi.org/10.1093/ps/86.2.408>
28. Otaki Y, Saito K, Tajima M, Nomura Y. Persistence of maternal antibody to chicken anaemia agent and its effect on the susceptibility of young chickens. *Avian Pathol.* 1992; 21(1):147–151. <https://doi.org/10.1080/03079459208418828>
29. Owoade AA, Oluwayelu DO, Fagbohun OA, Ammerlaan W, Mulders MN, Muller CP. Serologic Evidence of Chicken Infectious Anemia in Commercial Chicken Flocks in Southwest Nigeria. *Avian Dis.* 2004; 48(1):202–205. <https://doi.org/10.1637/7075>
30. Hosokawa K, Imai K, Dong H Van, Ogawa H, Suzutou M, Linn SH, et al. Pathological and virological analysis of concurrent disease of chicken anemia virus infection and infectious bronchitis in Japanese native chicks. *J Vet Med Sci.* 2020; 82(4):422–430. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0006>
31. Zhang Y, Cui N, Han N, Wu J, Cui Z. Depression of Vaccinal Immunity to Marek's Disease by Infection with Chicken Infectious Anemia Virus. *Front Microbiol.* 2017; 8(1873):1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01863>
32. Fang L, Li X, Ren Z, Li Y, Wang Y, Cui Z, et al. Effect of Low Dose of Chicken Infectious Anemia Virus in Attenuated Vaccine on SPF Chicken Body Weight and Vaccine Immune Antibody. *Bing Du Xue Bao.* 2016; 32(2):190–4. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27396163/>
33. Vagnozzi AE, Espinosa R, Cheng S, Brinson D, O'Kane P, Wilson J, et al. Study of dynamic of chicken infectious anaemia virus infection: which sample is more reliable for viral detection? *Avian Pathol.* 2018; 47(5):489–496. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1492089>
34. Bhatt P, Shukla SK, Mahendran M, Dhama K, Chawak MM, Kataria JM. Prevalence of Chicken Infectious Anaemia Virus (CIAV) in Commercial Poultry Flocks of Northern India: A Serological Survey. *Transbound Emerg Dis.* 2011; 58(5):458–460. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01215.x>
35. Sommer F, Cardona C. Chicken anemia virus in broilers: dynamics of the infection in two commercial broiler flocks. *Avian Dis.* 2003; 47(4):1466–1473. <https://doi.org/10.1637/7048>
36. Pohjola L, Tammiranta N, Ek-Kommonen C, Soveri T, Hänninen ML, Fredriksson-Ahomaa M, et al. A Survey For Selected Avian Viral Pathogens In Backyard Chicken Farms In Finland. *Avian Pathol.* 2016; 13:1–10. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1232804>
37. Oluwayelu DO, Todd D. Rapid identification of chicken anemia virus in Nigerian backyard chickens by polymerase chain reaction combined with restriction endonuclease analysis. *African J Biotechnol.* 2008; 7(3):271–275. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58398>
38. Barrios P, Marín S, Resende M, Rios R, Resende J, Horta R, et al. Occurrence of chicken anemia virus in backyard chickens of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev Bras Ciência Avícola.* 2009; 11(2):135–138. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2009000200010>
39. Hoop RK. Persistence and vertical transmission of chicken anaemia agent in experimentally infected laying hens. *Avian Pathol.* 1992; 21(3):493–501. <https://doi.org/10.1080/03079459208418867>
40. Davidson I. Diverse uses of feathers with emphasis on diagnosis of avian viral infections and vaccine virus monitoring. *Rev Bras Ciência Avícola.* 2009; 11(3):139–148. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2009000300001>

41. Davidson I, Natour-Altory A, Raibstein I, Kin E, Dahan Y, Krispin H, et al. Monitoring the uptake of live avian vaccines by their detection in feathers. *Vaccine*. 2017; 36(5):637–643. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.12.052>
42. Brentano L, Silva B, Sayd S, Flores S. Anticorpos Para o Vírus da Anemia das Galinhas (CAV) em Matrizes de Corte no Brasil. *Rev Bras Ciência Avícola*. 2000; 2(2):163-175. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2000000200006>
43. Cardona C, Lucio B, O'Connell P, Jagne J, Schat KA. Humoral immune responses to chicken infectious anemia virus in three strains of chickens in a closed flock. *Avian Dis*. 2000; 44(3):661–667. <https://doi.org/10.2307/1593108>
44. Craig MI, Rimondi A, Delamer M, Sansalone P, König G, Vagnozzi A, et al. Molecular characterization of chicken infectious anemia virus circulating in Argentina during 2007. *Avian Dis*. 2009; 53(3):331-335. <https://doi.org/10.1637/8478-100808-Reg.1>
45. Van Dong H, Tran GTH, Van Nguyen G, Dao TD, Bui VN, Huynh LTM, et al. Chicken anemia virus in northern Vietnam: molecular characterization reveals multiple genotypes and evidence of recombination. *Virus Genes*. 2019; 55(5):643–653. <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01686-8>
46. Rimondi A, Pinto S, Olivera V, Dibárbora M, Pérez-Filgueira M, Craig MI, et al. Comparative histopathological and immunological study of two field strains of chicken anemia virus. *Vet Res*. 2014; 45(1):102. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0102-y>
47. Wanasawaeng W, Buatong J, Chaichote S, Chansiripornchai N. Molecular Characterization of Chicken Infectious Anemia Virus Outbreaks during 2008-2011 in Thailand. *Thai J Vet Med*. 2013; 43(4):497–502. <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/tjvm/article/view/15510>
48. Noteborn MH, Verschueren Ca, Van Roozelaar DJ, Veldkamp S, Van Der Eb AJ, de Boer GF. Detection of chicken anaemia virus by DNA hybridization and polymerase chain reaction. *Avian Pathol*. 1992; 21(1):107–118. <https://doi.org/10.1080/03079459208418823>
49. Yamaguchi S, Imada T, Kaji N, Mase M, Tsukamoto K, Tanimura N, et al. Identification of a genetic determinant of pathogenicity in chicken anaemia virus. *J Gen Virol*. 2001; 82(5):1233–1238. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-5-1233>
50. Li Y, Wang Y, Fang L, Fu J, Cui S, Zhao Y, et al. Genomic Analysis of the Chicken Infectious Anemia Virus in a Specific Pathogen-Free Chicken Population in China. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:1–5. <https://doi.org/10.1155/2016/4275718>