



## Diagnóstico molecular del virus de laringotraqueítis infecciosa aviar en granjas de gallinas ponedoras localizadas en Tungurahua, Ecuador

Revelo-Cueva, M.<sup>1</sup> ; Vinueza-Burgos, C.V.<sup>1</sup> ; Metz, G.E.<sup>2</sup> ; Echeverría, M.G.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Resistencia a los Antimicrobianos (UNIETAR), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador. Jerónimo Leyton y Gatto Sobral. EC170103. <sup>2</sup>Cátedra de Virología, Laboratorio de Virología, Centro de Microbiología Básica y Aplicada (LAVIR-CEMIBA), Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y CONICET CCT-La Plata, Argentina. Av. 60 y 118, B1900 La Plata, Buenos Aires. ✉ [gecheverria@fcv.unlp.edu.ar](mailto:gecheverria@fcv.unlp.edu.ar)

### Resumen

La laringotraqueítis infecciosa aviar (ILT) es una enfermedad producida por el *Gallid alphaherpesvirus 1* (GaHV-1) que se transmite a través de secreciones respiratorias o fómites de aves infectadas de forma natural o por el uso de vacunas vivas originadas en embrión de pollo (CEO). El objetivo de esta investigación fue detectar molecularmente el GaHV-1 en granjas de gallinas ponedoras localizadas en la provincia de Tungurahua, Ecuador. Se trabajó con hisopados laringotraqueales y muestras de tráqueas de 47 granjas y una vacuna recombinante de uso comercial con la glicoproteína B del GaHV-1. Se encontró que 3 granjas fueron positivas a GaHV-1 al amplificarse segmentos de los genes *ICP4* y timidina kinasa (*TK*) del virus. Por otro lado, la vacuna recombinante analizada resultó negativa a la amplificación de los genes mencionados. La amplificación de los genes *ICP4* y *TK* en las muestras de campo demostró la presencia del GaHV-1 en la provincia, pero se descartó la posibilidad de que se trate de virus vacunal derivado del uso de la vacuna recombinante autorizada para ser usada en la zona de estudio. Dado que las aves no presentaron signos clínicos relacionados con ILT se determinó que no se podría hablar de un brote de la enfermedad, pero se requiere un estudio molecular de secuenciación de genoma completo para obtener resultados concluyentes. No obstante, debería evitarse la utilización de vacunas tipo CEO en los calendarios vacunales en la provincia de Tungurahua y continuar sólo con el uso de las vacunas vectorizadas autorizadas por el ente de control nacional.

**Palabras clave:** gallinas comerciales, secuencias, vacunas, timidina kinasa, *ICP4*.

## Molecular diagnosis of infectious laryngotracheitis virus in laying hen farms located in Tungurahua, Ecuador

**Abstract.** Avian infectious laryngotracheitis (ILT) is a disease caused by *Gallid alphaherpesvirus 1* (GaHV-1), which is transmitted through respiratory secretions or fomites from infected birds, either naturally or through the use of chicken embryo-origin (CEO) live vaccines. The objective of this research was to develop a molecular detection of GaHV-1 in laying hen farms located in Tungurahua Province. Laryngotracheal swabs and tracheal samples were collected from 47 farms. In addition, a recombinant vaccine with GaHV-1 glycoprotein B was used. Three farms tested positive to GaHV-1 as they amplified segments of the *ICP4* and thymidine kinase (*TK*) genes. As expected, the recombinant vaccine analyzed was negative to the amplification of the studies genes. The amplification of the *ICP4* and *TK* genes in the field samples demonstrated the presence of GaHV-1 in the province, but the possibility that it was a vaccine-derived virus from the use of the recombinant vaccine authorized for use in the study area was ruled out. Since the birds did not present clinical signs related to ILT, it was determined that an outbreak of the disease could not be confirmed. However, a molecular study with full genome sequencing is required to obtain conclusive results. However, the use of CEO-type vaccines should be avoided in vaccination schedules in Tungurahua Province, and only the use of vectorized vaccines authorized by the national regulatory authority should continue.

**Key words:** Commercial hens, sequences, vaccines, thymidine kinase, *ICP4*.

## INTRODUCCIÓN

La laringotraqueítis infecciosa aviar (ILT) es una enfermedad viral que provoca signología respiratoria en aves domésticas, *Gallus gallus domesticus* (Wolfrum, 2020, Pajić et al. 2022). El agente causal de ILT es el *Gallid alphaherpesvirus 1* (GaHV-1), virus que pertenece al género *Iltovirus*, subfamilia Alphaherpesvirinae, familia Herpesviridae y al orden Herpesvirales (García y Spatz 2020, Gowthaman et al. 2020, International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV 2023). El GaHV-1 posee ADN lineal de doble cadena, formado por 150 a 155 kbp (Gowthaman et al. 2020, Elshafiee et al. 2022) y cuenta con 80 marcos abiertos de lectura (ORFs, por sus siglas en inglés *open reading frames*) ubicados en tres regiones (Elshafiee et al. 2022). En la región única larga (UL) se encuentran 65 ORFs, en la región única corta (US) se ubican nueve ORFs y en las regiones flanqueantes de repetición invertida (IR) están ubicados seis ORFs (Gowthaman et al. 2020, Elshafiee et al. 2022). Tres genes están contenidos en las IR: *ICP4* (del inglés, Infected Cell Protein 4) US10 y sORF4/3 (García y Spatz 2020, Gowthaman et al. 2020). Los ORFs en la UL codifican para las once glicoproteínas de la envoltura del GaHV-1 (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL y gM) y para otras proteínas no estructurales como la Timidina kinasa (*TK*) (Wolfrum 2020, Yi et al. 2024).

Las glicoproteínas de la envoltura del GaHV-1 son importantes para la generación de la respuesta inmune en el hospedador (Gowthaman et al. 2020), en tanto que, los genes *ICP4* y timidina kinasa (*TK*) suelen estar relacionados con la reactivación del virus a partir de la latencia (Elshafiee et al. 2022). Por ello, para la caracterización molecular de ILT se incluye el estudio de las glicoproteínas del GaHV-1. Sin embargo, para realizar un diagnóstico molecular rápido se utilizan frecuentemente los genes *ICP4* y *TK*, así como las glicoproteínas G (gG) y E (gE) (Gowthaman et al. 2020, World Organisation for Animal Health-WOAH 2021).

ILT es una enfermedad de distribución mundial, pero su presentación es más frecuente en países con producción avícola intensiva (Gowthaman et al. 2020, Wolfrum 2020, Organización Mundial de Sanidad Animal-OIE 2021). En países como, Estados Unidos, China y Canadá es una

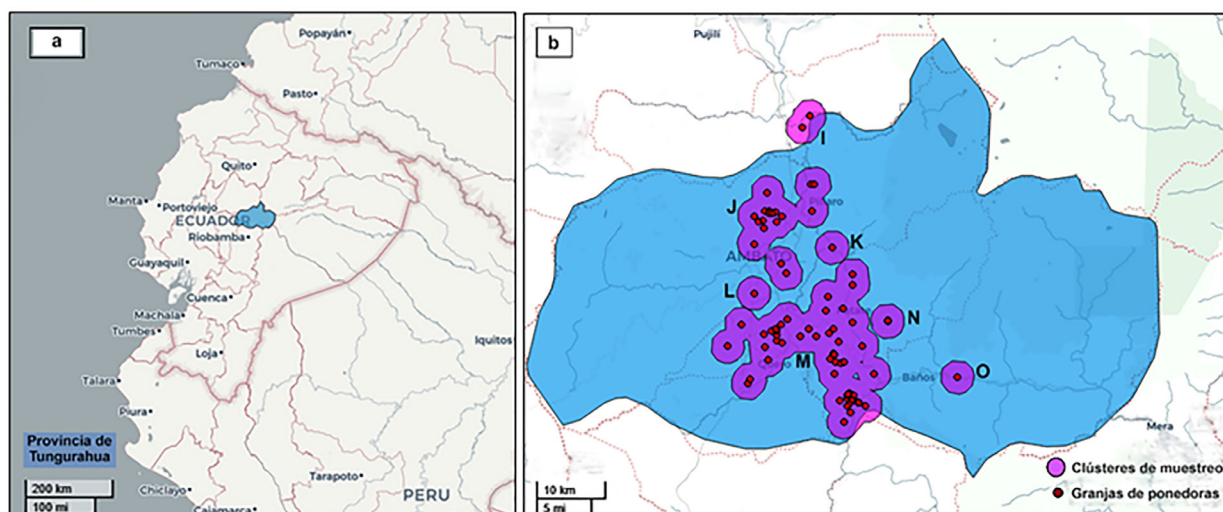
enfermedad periódica, ocasionada por el paso del virus desde parvadas infectadas a las no vacunadas (Elshafiee et al. 2022). Por otra parte, en países en vías de desarrollo ILT se presenta como una infección endémica de aves de traspatio y de explotaciones comerciales (García y Spatz 2020).

Hasta el año 2011, la ILT era una enfermedad exótica en el Ecuador, a pesar de que la enfermedad estaba presente en Perú y Colombia (Morales et al. 1971, Vinueza et al. 2011). El primer brote de GaHV-1 en Ecuador ocurrió en el año 2011 como consecuencia del ingreso del virus desde los países vecinos (Ayala et al. 2014). A partir de este hallazgo, no sólo se notificó a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA, antigua OIE), sino que se autorizó la vacunación contra GaHV-1 con vacunas recombinantes vectorizadas (OIE 2012, Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario-AGROCALIDAD 2019). En Ecuador, las vacunas registradas contra GaHV-1 incluyen vacunas vectorizadas en virus de viruela aviar con la inclusión de la glicoproteína B o los genes 632 y NS175 (AGROCALIDAD 2022).

Desde la fecha de detección del GaHV-1 en Ecuador, sólo se ha encontrado un trabajo relacionado con el estudio epidemiológico de ILT. El estudio señalado se realizó en el año 2016 y en el cual se muestrearon 92 granjas ubicadas en 13 provincias (Garrido et al. 2016), donde 48 granjas tuvieron resultados positivos, presentándose la mayor cantidad de seropositivos en las provincias de Tungurahua y Cotopaxi (Garrido et al. 2016); situación que resulta importante ya que el 45% de la producción de huevos de mesa del país está en Tungurahua. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue detectar molecularmente el GaHV-1 en granjas de gallinas ponedoras localizadas en la provincia de Tungurahua a través de la amplificación de los genes *ICP4* y *TK*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Muestreo.** Según el último censo avícola, en la provincia de Tungurahua existían 149 granjas de gallinas de postura o gallinas comerciales (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos-INEC 2015). El cálculo muestral a partir de este total fue de 47 granjas. Gracias a



**Figura 1.** Grupos o clústeres utilizados para el muestreo en la provincia de Tungurahua. a. Mapa del Ecuador con provincia de Tungurahua resaltada. b. Distribución de las granjas de postura en la provincia de Tungurahua dentro de los 7 grupos (identificados con letras mayúsculas, “I” hasta “O”) de muestreo. Imágenes generadas con mapview de R (Appelhans et al. 2021).

la aplicación de una capa vectorial de distancia de 2 km, con el programa R acompañado del paquete mapview se generaron siete clústeres o grupos de muestreo (Figura 1). El muestreo se realizó durante diez meses (noviembre de 2020 - agosto de 2021). En cada granja se seleccionó un galpón con aves entre 15 a 100 semanas de edad y dentro de cada galpón se tomaron al azar cinco aves. Las aves fueron llevadas bajo parámetros de bienestar animal hasta el Laboratorio de Anatomía Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Central del Ecuador (UCE).

**Obtención de las muestras.** Se tomaron hisopados laringotraqueales antes de sacrificar a las aves a través de electrocución de una sola aplicación, empleando el protocolo incluido en el formulario (CICUAL 86-4-18T) aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Luego, se tomaron muestras traqueales que se colocaron en frascos individuales con PBS estéril más antibióticos (Penicilina 10.000 U ml<sup>-1</sup>, Estreptomina 10.000 µg ml<sup>-1</sup>, Eurobio). Las muestras de hisopos y tráqueas se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Además, se incluyó en el estudio una vacuna utilizada en la zona de estudio y que incluía la glicoproteína B del GaHV-1 recombinada en el virus de viruela aviar.

**Procesamiento de las muestras.** Las muestras se descongelaron a 37 °C en baño María. Luego, con la ayuda de un cepillo citológico estéril se raspó la mucosa de las muestras traqueales. El material obtenido se escurrió contra las paredes de un tubo Falcon con medio MEM (MP Biomedicals) estéril. Adicionalmente, las tráqueas se cortaron, molieron con arena estéril y se homogenizaron con medio MEM estéril (MP Biomedicals), consiguiéndose suspensiones al 20% (p/v). Los hisopados laringotraqueales, el raspado citológico y las suspensiones de molienda se centrifugaron por separado a 4500 rpm por 30 minutos a 4 °C. Los tres sobrenadantes resultantes se juntaron en partes iguales (600 µl como volumen total) y se almacenaron a -80°C.

**Extracción de material genético y control interno mediante PCR para β-actina aviar.** Para la extracción de ADN se empleó un kit comercial marca Promega, Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Se siguió el protocolo para extracción establecido por la casa fabricante; destacándose la utilización de 100 µl de la solución provista para rehidratar ADN, con la posterior incubación a 4 °C por toda la noche. Para la extracción de ADN a partir de la vacuna vectorizada estudiada, se utilizaron dos reconstituyentes diferentes. Por un lado, la mitad del liofilizado se reconstituyó con el diluyente propio de la vacuna (V. oleoso); mientras que la otra parte se reconstituyó con medio MEM (MP Biomedicals) estéril (V. MEM).

Previo a realizar el control interno de extracción, se cuantificó el ADN en cada muestra empleando el kit QuantiFluor® ONE dsDNA System (Promega, E4870). Para realizar la PCR de control se emplearon los iniciadores o cebadores FW 685 (5'-GAGAAATTGTGCGTGACATCA-3') y RV 818

(5'-CCTGAACCTCTCATTGCCA-3'); permitiendo amplificar un segmento de 152 pb del exón 3 de la β-actina aviar (Marandino 2013).

**Detección del GaHV-1 mediante PCR para los genes ICP4 y TK.** Se amplificó un fragmento de 222 pb del gen *ICP4* del GaHV-1 mediante la utilización de los cebadores diseñados por Creelan et al. (2006): *ICP4f* (5'-CTCTTCCTCTCTTCCTCAT-3') y *ICP4rev* (5'-GTTACTGACTGAACCGACCC-3'). Mientras que, para amplificar un fragmento de 649 pb de la *TK* se emplearon los cebadores: *TKIPf* 5'-CTTAGCGGAACCTATGCAAG-3' y *TKIPrev* 5'-TAGCGTCTGGTCGATTGAAG-3' (Ham y Kim 2001). Para validar las pruebas se utilizó como control positivo ADN de GaHV-1 (LT-A) proporcionado por AGROCALIDAD - Agencia de Regulación y control Fito y Zoonosanitario del Ecuador. Además, se incluyeron como controles negativos ADNc de los virus causantes de Bronquitis infecciosa aviar y de la enfermedad de Newcastle.

La electroforesis de los productos amplificados se realizó en una cuba horizontal ENDURO GelXL (LABNET) que contenía buffer TAE (40 mM, EDTA 0,5 M a pH 8,0). La corrida electroforética se hizo a 120 V y 400 mA durante 40 minutos. Los resultados se visualizaron en geles de agarosa (Promega) al 2% y se registraron con el uso de una cámara fotográfica digital.

**Análisis de secuencias obtenidas para el gen TK.** Los productos de PCR para el gen *TK* de las granjas positivas se secuenciaron mediante la técnica Sanger (Macrogen – Corea). Las secuencias obtenidas se procesaron utilizando el programa MEGA-X 11.0.8. A partir del alineamiento construido con las secuencias muestrales y 16 secuencias de referencia (Tabla 1) se efectuó el cálculo de *p-distance* con el correspondiente análisis de similitud nucleotídica.

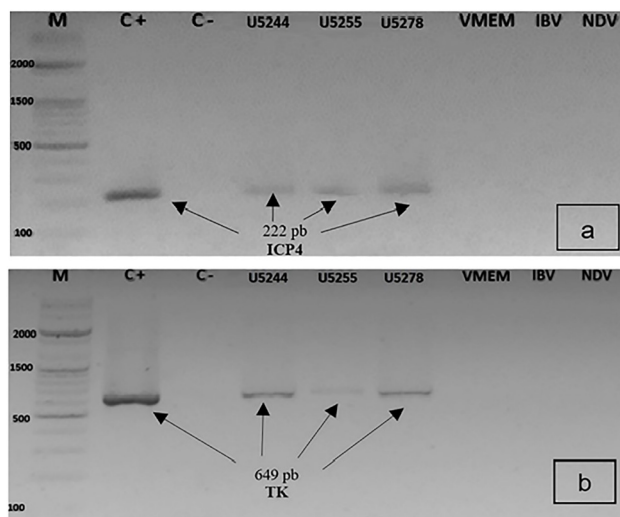
**Tabla 1.** Cepas representativas para GaHV-1 seleccionadas del GenBank

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



**RESULTADOS**

Las 141 PCRs para β-actina aviar, 3 por granja y 1 para control positivo resultaron positivas, con excepción de aquella realizada con la vacuna reconstituida con medio oleoso. Por otro lado, tres granjas (6,38%) de las 47 muestreadas resultaron positivas a GaHV-1 al amplificarse los genes *TK* e *ICP4* para las muestras obtenidas (Figura 2). Las granjas positivas correspondieron a aquellas codificadas como U5244, U5255 y U5278 (Figura 3). La granja 5244 pertenecía al clúster de muestreo J, específicamente en el cantón Ambato; mientras que las otras 2 explotaciones avícolas positivas se ubicaron en el clúster M, cantón Pelileo.



**Figura 2.** Electroforesis gel de agarosa al 2% para los genes *ICP4* (a) y *TK* (b). Se observa amplificación para

el control positivo LT-A (C+) y muestras positivas a GaHV-1 (U5244, U5255 Y U5278). También se visualiza la ausencia de amplificación para: control negativo (C-), ADNc del virus de Bronquitis infecciosa aviar (IBV), ADNc del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y vacuna vectorizada contra GaHV-1 reconstituida en MEM (VMEM).



**Figura 3.** Mapa de la provincia de Tungurahua con las explotaciones avícolas positivas a GaHV-1 codificadas como: U5244, U5255 y U5278. Imagen generada con mapview de R (Appelhans et al. 2021).

Acorde al cálculo de *p-distance*, las secuencias obtenidas para *TK* tenían un porcentaje de similitud nucleotídica entre 99,49 y 100%. Además, el control positivo tenía un 100% de similitud con la cepa P1369-TK-UFMG/Brasil; mientras que, las secuencias de las muestras positivas tuvieron un 100% de similitud nucleotídica con la cepa peruana USP-81 (Tabla 2).

**Tabla 2.** Resultados para *p-distance* entre secuencias muestrales y de referencia para GaHV-1

|                            | LT-A   | U5244  | U5255  | U5278  | LT-IVAX | Brasil2007/USP-57 | CEO-vacuna-Merial-UL24 | Cepa-CG | Cepa-288269/2007-UL24 | Brasil2002/USP-01 | Cepa-UL23 | Perú2008/USP-81 | CEO-vacuna-Europa | Nobilis-LT-vacuna | P1369-TK-UFMG/Brasil | Sharkia-II | CEO-vacuna-Fort-Dodge-UL24 |  |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|---------|-------------------|------------------------|---------|-----------------------|-------------------|-----------|-----------------|-------------------|-------------------|----------------------|------------|----------------------------|--|
| LT-A                       |        |        |        |        |         |                   |                        |         |                       |                   |           |                 |                   |                   |                      |            |                            |  |
| U5244                      | 0,0034 |        |        |        |         |                   |                        |         |                       |                   |           |                 |                   |                   |                      |            |                            |  |
| U5255                      | 0,0034 | 0,0000 |        |        |         |                   |                        |         |                       |                   |           |                 |                   |                   |                      |            |                            |  |
| U5278                      | 0,0034 | 0,0000 | 0,0000 |        |         |                   |                        |         |                       |                   |           |                 |                   |                   |                      |            |                            |  |
| LT-IVAX                    | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 |         |                   |                        |         |                       |                   |           |                 |                   |                   |                      |            |                            |  |
| Brasil2007/USP-57          | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0000  |                   |                        |         |                       |                   |           |                 |                   |                   |                      |            |                            |  |
| CEO-vacuna-Merial-UL24     | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0000  | 0,0000            |                        |         |                       |                   |           |                 |                   |                   |                      |            |                            |  |
| Cepa-CG                    | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0000  | 0,0000            | 0,0000                 |         |                       |                   |           |                 |                   |                   |                      |            |                            |  |
| Cepa-288269/2007-UL24      | 0,0034 | 0,0034 | 0,0034 | 0,0034 | 0,0017  | 0,0017            | 0,0017                 | 0,0017  |                       |                   |           |                 |                   |                   |                      |            |                            |  |
| Cepa-CH04                  | 0,0034 | 0,0034 | 0,0034 | 0,0034 | 0,0017  | 0,0017            | 0,0017                 | 0,0017  | 0,0000                |                   |           |                 |                   |                   |                      |            |                            |  |
| Cepa-SP-Trachivax          | 0,0034 | 0,0034 | 0,0034 | 0,0034 | 0,0017  | 0,0017            | 0,0017                 | 0,0017  | 0,0017                | 0,0034            |           |                 |                   |                   |                      |            |                            |  |
| TCD-vacuna                 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0000  | 0,0000            | 0,0000                 | 0,0000  | 0,0017                |                   |           |                 |                   |                   |                      |            |                            |  |
| US-nistado-632             | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0000  | 0,0000            | 0,0000                 | 0,0000  | 0,0017                |                   |           |                 |                   |                   |                      |            |                            |  |
| Brasil2002/USP-01          | 0,0051 | 0,0051 | 0,0051 | 0,0051 | 0,0034  | 0,0034            | 0,0034                 | 0,0034  | 0,0051                |                   |           |                 |                   |                   |                      |            |                            |  |
| Cepa-UL23                  | 0,0034 | 0,0034 | 0,0034 | 0,0034 | 0,0017  | 0,0017            | 0,0017                 | 0,0017  | 0,0034                | 0,0051            |           |                 |                   |                   |                      |            |                            |  |
| Perú2008/USP-81            | 0,0034 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0017  | 0,0017            | 0,0017                 | 0,0017  | 0,0034                | 0,0051            | 0,0034    |                 |                   |                   |                      |            |                            |  |
| CEO-vacuna-Europa          | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0000  | 0,0000            | 0,0000                 | 0,0000  | 0,0017                | 0,0034            | 0,0017    | 0,0017          |                   |                   |                      |            |                            |  |
| Nobilis-LT-vacuna          | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0000  | 0,0000            | 0,0000                 | 0,0000  | 0,0017                | 0,0034            | 0,0017    | 0,0017          | 0,0000            |                   |                      |            |                            |  |
| P1369-TK-UFMG/Brasil       | 0,0000 | 0,0034 | 0,0034 | 0,0034 | 0,0017  | 0,0017            | 0,0017                 | 0,0017  | 0,0034                | 0,0051            | 0,0034    | 0,0034          | 0,0017            | 0,0017            |                      |            |                            |  |
| Sharkia-II                 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0000  | 0,0000            | 0,0000                 | 0,0000  | 0,0017                | 0,0034            | 0,0017    | 0,0017          | 0,0000            | 0,0000            | 0,0017               |            |                            |  |
| CEO-vacuna-Fort-Dodge-UL24 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0000  | 0,0000            | 0,0000                 | 0,0000  | 0,0017                | 0,0034            | 0,0017    | 0,0017          | 0,0000            | 0,0000            | 0,0017               | 0,0000     |                            |  |

Se observa resultado con color verde la mayor similitud para cepas muestrales y en celeste para el control positivo.

## DISCUSIÓN

La detección de los genes *ICP4* y *TK* en muestras provenientes de gallinas ponedoras de granjas ubicadas en la provincia de Tungurahua sugiere la circulación del GaHV-1. Sin embargo, el virus circulante GaHV-1 podría derivarse del uso de vacunas vivas originadas en cultivo de embriones de pollo (CEO), vacunas originadas en cultivo celular (TCO) que sufrieron algún evento de reversión o tener un origen en campo (Elshafiee et al. 2022, Santander-Parra 2022). Se debe recordar que las fuentes de transmisión de ILT son principalmente: aves con enfermedad aguda, aves portadoras con infección latente, fómites contaminados con el virus y vacunas tipo CEO o TCO que sufrieron reversión de la virulencia por el paso de ave a ave (Salhi et al. 2021, WOAH 2021, Pajić et al. 2022, Santander-Parra et al. 2022). Por lo tanto, aunque las aves muestreadas no presentaban signos clínicos relacionados con ILT, al ser el agente causal un herpes virus, se debe tomar en cuenta que se puede presentar reactivación lo que implicaría que las aves puedan excretar virus y sin manifestar signología clínica (García y Spatz 2020, Santander-Parra et al. 2022). Igualmente debe recordarse que toma entre 6 y 14 días desde que el ave se infecta hasta que se observan signos clínicos, es decir, que las aves infectadas pueden mostrarse asintomáticas durante el tiempo de incubación (García y Spatz 2020, Ontario Association of Poultry Veterinarians 2021). En consecuencia, el no haber encontrado indicativos clínicos en las aves muestreadas no implica la ausencia de cepas de campo del GaHV-1 en la provincia de Tungurahua o cepas derivadas de la reversión de la virulencia de cepas vacunales no autorizadas tipo CEO o TCA (Santander-Parra et al. 2022).

A pesar de lo señalado, no se reportaron oficialmente brotes de la ILT en el país durante el periodo del muestreo (<https://wahis.woah.org/#/dashboards/qd-dashboard>). Sin embargo, si se considera que la forma suave o silenciosa de presentación de la enfermedad exhibe signos comunes a otras afecciones respiratorias, pudo no haberse detectado la presencia del virus en un determinado lote de aves (Carnaccini et al. 2022). En este punto, es necesario mencionar que las granjas positivas a los genes *TK* e *ICP4* tenían explotaciones avícolas a 2 kilómetros o menos de distancia y pudo ocurrir una transmisión mecánica del GaHV-1 por el movimiento de personas, el mal manejo de la gallinaza y/o el aire (Chacón et al. 2015, Ahaduzzaman et al. 2020, Gowthaman et al. 2020, Pajić et al. 2022). Más aún cuando las medidas de bioseguridad no son las ideales en la zona de estudio y la bioseguridad rigurosa es fundamental en el control de ILT (Elshafiee et al. 2022, Pajić et al. 2022). Por lo que, tampoco se puede descartar la transmisión indirecta a través de vectores (Gowthaman et al. 2020, Pajić et al. 2022).

Por otra parte, es necesario mencionar que la vacuna comercial vectorizada analizada no amplificó ninguno de los fragmentos de genes utilizados en el estudio para

detectar GaHV-1, lo que concuerda con la composición señalada en la etiqueta comercial, donde se indica que posee sólo la glicoproteína gB del GaHV-1. Además, debe recordarse que en Ecuador la vacunación contra GaHV-1 está autorizada sólo con vacunas recombinantes vectorizadas (OIE 2012, AGROCALIDAD 2019). En consecuencia, no se podría hablar de la detección de una cepa de GaHV-1 derivado de la vacunación autorizada. No obstante, tomando en cuenta que en todo el mundo los datos de tipificación molecular han identificado en su mayoría como la fuente principal de brotes de ILT a las vacunas tipo CEO (Yang et al. 2020, Yi et al. 2024), se podría realizar un análisis de epidemiología molecular basado en secuencias completas del genoma virus a fin de determinar el origen de las secuencias encontradas en Tungurahua. Igualmente, sería conveniente continuar restringiendo el uso de vacunas vivas tipo CEO y TCO para el control de esta enfermedad debido a la posibilidad de reversión de la virulencia de las cepas vacunales (Santander-Parra et al. 2022).

Con relación al cálculo de *p-distance* entre las secuencias muestrales y las de referencia obtenidas para el gen *TK*, los resultados coinciden con lo reportado en el trabajo realizado en Ecuador por Ayala et al. (2014), al no existir diferencias entre ellas. Coincidiendo igualmente con trabajos realizados en Myanmar, país del sudeste asiático, en el 2018 y la India entre 2019 y 2020; donde tampoco se encontraron diferencias entre las secuencias de campo y vacunales del gen *TK* (Yang et al. 2020, Ponnusamy et al. 2022). A pesar de esta ausencia de diferencia entre las secuencias nucleotídicas del gen *TK* encontradas, otros países han empleado la secuenciación parcial del gen *TK* para diferenciar cepas de GaHV-1 (Creelan et al. 2006, Diallo et al. 2010, Moreno et al. 2010). Sin embargo, actualmente los métodos moleculares para distinguir entre aislados de campo de GaHV-1 y cepas vacunales utilizan otros genes para caracterización molecular. Por ejemplo, en el trabajo de Yang et al. (2020) a partir de hisopados orofaríngeos además de los genes *ICP4* y *TK* se utilizaron los genes de las glicoproteínas B, G y J (gB, gG y gJ). Por otro lado, investigadores argentinos usaron los genes de las glicoproteínas D, G, B, C y J (gD, gG, gB, gC y gJ) para caracterizar ILT a partir de muestras de diferentes brotes entre 2006 y 2013 (Craig et al. 2017). La utilización de determinados genes para la caracterización molecular de ILT tiene como limitación que dependen de una pequeña región del genoma viral y con ello es posible que no se logre diferenciar todas las cepas (Agnew-Crumpton et al. 2016, Sabir et al. 2020, Elshafiee et al. 2022). Por lo tanto, la secuenciación completa del genoma viral permite un análisis comparativo y caracterización más eficiente para el ILTV (Sabir et al. 2020, Elshafiee et al. 2022, Hussein y Abdullah 2022).

Cabe señalar que las pruebas de PCR constituyen una herramienta crucial para control de ILT (García y Spatz 2020, Gowthaman et al. 2020). La razón es porque su alta sensibilidad y especificidad aseguran la detección rápida y precisa del ILTV en muestras de aves en fases tempranas de infección o en portadoras asintomáticas (Creelan et al. 2006). Esto resulta fundamental para la gestión de la salud aviar y la mitigación de pérdidas económicas no sólo en


las ponedoras comerciales, sino en cualquier categoría de producción dentro de la industria avícola (AGROCALIDAD 2019, García y Spatz 2020, Gowthaman et al. 2020).


En conclusión, para caracterizar al GaHV-1 circulante en la provincia de Tungurahua son necesarios estudios moleculares complementarios. En otras palabras, si bien en el presente estudio fue posible detectar al GaHV-1, se hace necesario estudiar otras regiones genómicas (gD, gG, gB, gI y gJ) o utilizar secuenciación completa, para establecer con mayor precisión el grado de variabilidad y la epidemiología molecular del GaHV-1 en la provincia de Tungurahua.

**Agradecimientos.** Al Instituto Ecuatoriano del Huevo (INEH) y los avicultores de la provincia de Tungurahua. A la Universidad Nacional de La Plata, especialmente al Laboratorio de Virología (LAVIR). A la Universidad Central del Ecuador y su programa de becas doctorales. Se extiende el agradecimiento al Doctor Lenin Javier Ron Garrido, Centro Internacional de Zoonosis-CIZ, Universidad Central del Ecuador.

## ORCID

Revelo-Cueva, M. [mcrevelo@uce.edu.ec](mailto:mcrevelo@uce.edu.ec),  <http://orcid.org/0000-0002-5713-0020>

Vinueza-Burgos, C.V. [cvinueza@uce.edu.ec](mailto:cvinueza@uce.edu.ec),  <https://orcid.org/0000-0002-4893-502X>

Metz, G.E. [germanmetz@fcv.unlp.edu.ar](mailto:germanmetz@fcv.unlp.edu.ar),  <https://orcid.org/0000-0001-5098-7059>

Echeverría, M.G. [gecheverria@fcv.unlp.edu.ar](mailto:gecheverria@fcv.unlp.edu.ar),  <https://orcid.org/0000-0001-9644-3583>

## REFERENCIAS

1. Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario - AGROCALIDAD. Plan de atención emergente de Laringotraqueítis Infecciosa Aviar - Resolución 0142, DAJ-2019CD-0201.2019. Disponible en: <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/a3.pdf>. Último acceso: 22 de marzo de 2023.
2. Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario - AGROCALIDAD. Listado de cepas vacunales registradas ante la Agencia. 2022. Disponible en: <https://www.bing.com/ck/a?!&&p=40f9f82db4f7f61cc32c7209a24ac7d87d1847334c792b2e0c96cb5ac6c5a12cJmldHM9MTY1NTEyMjQzNiZpZ3VpZD0xMmRIN2UzNS00MjZlLTQ1MTctOGUzZS1kZDBiZDBiMmE0ZjUmaW5zaWQ9NTEyOQ&pnt=3&fclid=4c018656-eb12-11ec-b00d-80843e13383e&u=a1aHR0cHM6Ly93d3cuYWdyb2NhbGlkYWQuZ29iLmVjL3dwLWNvbRlbnQvdXBsb2Fkcy8yMDIxLdyb2NhbGlkYWQueGxzeA&ntb=1>. Último acceso 11 de abril 2022.
3. Agnew-Crumpton R, Vaz PK, Devlin JM, O'Rourke D, Blacker-Smith HP, Konsak-Ilievski B, Hartley CA, Noormohammadi AH. Spread of the newly emerging infectious laryngotracheitis viruses in Australia. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 43: 67-73.
4. Ahaduzzaman M, Groves PJ, Sharpe SM, Williamson SL, Gao YK, Nguyen TV, Gerber PF, Walkden-Brown SW. A practical method for assessing infectious laryngotracheitis vaccine take in broilers following mass administration in water: Spatial and temporal variation in viral genome content of poultry dust after vaccination. *Vet. Microbiol.* 2020; 241: 108545.
5. Appelhans T, Detsh F, Reudenbach C, Woellauer S. 2021. mapview: Interactive viewing of Spatial Data in R. R package version 2.10.0. <https://CRAN.R-project.org/package=mapview>
6. Ayala S, Revelo M, Barragán V, Chiriboga J, Torres A, Santiana I, Trueba G. Detection and characterization of infectious laryngotracheitis virus from an outbreak of respiratory disease in Ecuador. *J. Appl. Res. Vet. Med.* 2014; 12(3): 245-248.
7. Carnaccini S, Palmieri C, Stoute S, Crispo M, Shivaprasad HL. Infectious laryngotracheitis of chickens: Pathologic and immunohistochemistry findings. *Vet. Pathol.* 2022; 59(1): 112-119.
8. Chacón JL, Núñez LF, Vejarano MP, Parra SH, Astolfi-Ferreira CS, Ferreira A J. Persistence and spreading of field and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) in vaccinated and unvaccinated geographic regions, in Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 2015; 47(6): 1101-1108.
9. Craig MI, Rojas MF, van der Ploeg CA, Olivera V, Vagnozzi AE, Perez AM, König GA. Molecular Characterization and Cluster Analysis of Field Isolates of Avian Infectious Laryngotracheitis Virus from Argentina. *Front. Vet. Sci.* 2017; 4: 212.
10. Creelan JL, Calvert VM, Graham DA, McCullough SJ. Rapid detection and characterization from field cases of Infectious laryngotracheitis virus by real-time polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Avian Pathol.* 2006; 35(2): 173-179.
11. Diallo IS, Taylor J, Gibson J, Hoad J, De Jong A, Hewitson G, Corney BG, Rodwell BJ. Diagnosis of a naturally occurring dual infection of layer chickens with fowlpox virus and gallid herpesvirus 1 (infectious laryngotracheitis virus). *Avian Pathol.* 2010; 39(1): 25-30.
12. Elshafiee EA, Hassan M, Provost C, Gagnon C, Ojic D, Abdul-Carem MF. Comparative full genome sequence analysis of wild-type and chicken embryo origin vaccine-like infectious laryngotracheitis virus field isolates from Canada. *Infect. Genet. Evol.* 2022; 104: 105350.
13. García M, Spatz S. Infectious laryngotracheitis. In: Swaine DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL, de Wit S, Grimes T, Johnson D, Kromm M, Prajitno Y, Rubinoff I, Zavala D, editors. *Diseases of poultry*. 14<sup>th</sup> ed. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc; c2020. p. 189-209.
14. Garrido A, Barrionuevo M, Santiana I, Sandoval P, Alfonso P, Barrera M. Serologic and molecular survey of Avian Infectious Laryngotracheitis in Ecuador. *Ecuador es calidad: Revista Científica Ecuatoriana*. 2016; 3(1): 43-51.



15. Gowthaman V, Kumar S, Koul M, Dave U, Murthy TRGK, Munuswamy P, Tiwari R, Karthik K, Dhama K, Michalak I, Joshi SK. 2020. Infectious laryngotracheitis: etiology, epidemiology, pathobiology, and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Vet. Q.* 2020; 40(1): 140-161.
16. Hussein MB, Abdullah SM. Molecular detection and isolation of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) in layer farms of Wasit province, Iraq *Int. J. Health Sci.* 2022; 6(S4): 4831-4841.
17. Instituto Nacional de Estadística y Censos -INEC. Aves Planteles avícolas\_nac2015- Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua. 2015. Disponible en: <https://anda.inec.gob.ec/anda/index.php/catalog/750/download/14283>. Último acceso 15 de marzo 2016.
18. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Taxonomy-Master Species List. Disponible en: <https://ictv.global/taxonomy/>. Último acceso 12 marzo 2023.
19. Marandino A. Diagnóstico y caracterización genética del virus de la Bronquitis infecciosa aviar en la industria avícola regional. Tesis de Maestría PEDECIBA Biología. Montevideo: Universidad de la República del Uruguay; 2013. p. 80-113.
20. Ministerio de Agricultura y Ganadería - MAG. Ecuador celebra el día nacional del huevo. 2021. Disponible en: <https://www.agricultura.gob.ec/ecuador-celebra-el-dia-nacional-del-huevo/>. Último acceso 25 de marzo de 2023.
21. Morales G, Aycardi E, López LA, González E. Laringotraqueítis infecciosa aviar en Colombia: Características y diagnóstico histopatológico. *Revista ICA.* 1971; 6(2):177-183.
22. Moreno A, Piccirillo A, Mondin A, Morandini E, Gavazzi L, Cordioli P. Epidemic of infectious laryngotracheitis in Italy: characterization of virus isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism and sequence analysis. *Avian Dis.* 2010; 54(4): 1172-1177.
23. Ontario Association of Poultry Veterinarians. Infectious Laryngotracheitis in Poultry. 2021. Disponible en: <https://www.familyfoodgrower.ca/family-food/css/OAHN-ILT-factsheet-v4.pdf?ext=.pdf>. Último acceso 21 de septiembre de 2022.
24. Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE. Informe de Notificación Inmediata-Referencia del Informe: Ref OIE: 12139, Fecha del Informe: 20-07-2012, País: Ecuador. 2012. Disponible en: [http://web.oie.int/wahis/reports/es\\_imm\\_0000012139\\_20120720\\_183415.pdf](http://web.oie.int/wahis/reports/es_imm_0000012139_20120720_183415.pdf). Último acceso 22 de mayo de 2022.
25. Organización Mundial de Sanidad Animal -OIE. Manual Terrestre – Avian Infectious Laryngotracheitis. 2021. Disponible en: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.03.03\\_AVIAN\\_INF\\_LARYNGO.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.03_AVIAN_INF_LARYNGO.pdf). Último acceso 20 mayo 2022.
26. Pajić M, Knežević S, Djurdjević B, Polaček V, Todorović D, Petrović T, Lazić S. Diagnosis of Infectious Laryngotracheitis Outbreaks on Layer Hen and Broiler Breeder Farms in Vojvodina, Serbia. *Animals.* 2022; 12(24): 3551.
27. Sabir AJ, Olaogun OM, O'Rourke D, Fakhri O, Coppo MJC, Devlin JM, Konsak-Ilievski B, Noormohammadi AH. Full genomic characterisation of an emerging infectious laryngotracheitis virus class 7b from Australia linked to a vaccine strain revealed its identity. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 78: 104067.
28. Salhi O, Messaï CR, Ouchene N, Boussaadi I, Kentouche H, Kaidi R, Khelef D. Indicators and risk factors of infectious laryngotracheitis in layer hen flocks in Algeria. *Vet. World.* 2021; 14(1): 182-189.
29. Santander-Parra SH, Nuñez LFN, Buim MR, Ferreira CSA, Loncoman CA, Ferreira AJP. Detection and molecular characterization of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) in chicken with respiratory signs in Brazil during 2015 and 2016. *Braz. J. Microbiol.* 2022; 53(4): 2223-2232.
30. Vinueza C, Orosco R, Cortegana-Rucoba J, Cisneros M, Lozano F, Pauley Gardin P. Experiencias de campo con laringotraqueítis infecciosa en Perú y el uso de una vacuna vectorizada contra laringotraqueítis. XXII Congreso Latino-Americano de Avicultura. Buenos Aires, Argentina. 2011.
31. Wolfrum N. Infectious laryngotracheitis: an update on current approaches for prevention of an old disease. *J. Anim. Sci.* 2020; 98(Suppl 1): S27-S35.
32. World Organisation for Animal Health- WOA. WOA. Chapter 3.3.3. Avian Infectious Laryngotracheitis. 2021. Disponible en: [https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/3.03.03\\_AVIAN\\_INF\\_LARYNGO.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.03.03_AVIAN_INF_LARYNGO.pdf). Último acceso 15 abril 2024.
33. Yang Z, Murata S, Fujisawa S, Takehara M, Katakura K, Hmoon MM, Win SY, Bawm S, Konnai S, Ohashi K. Molecular detection and genetic characterization of infectious laryngotracheitis virus in poultry in Myanmar. *BMC Vet. Res.* 2020; 16: 453.
34. Yi C, Li G, Mu Y, Cui S, Zhang D, Xu Q, Liang C, Wang M, Zhou S, Zhou H, Zhong M, Zhang A. Isolation, identification molecular and pathogenicity characteristics of an infectious laryngotracheitis virus from Hubei province, China. *Poultry Sci.* 2024; 103(2): 103271.