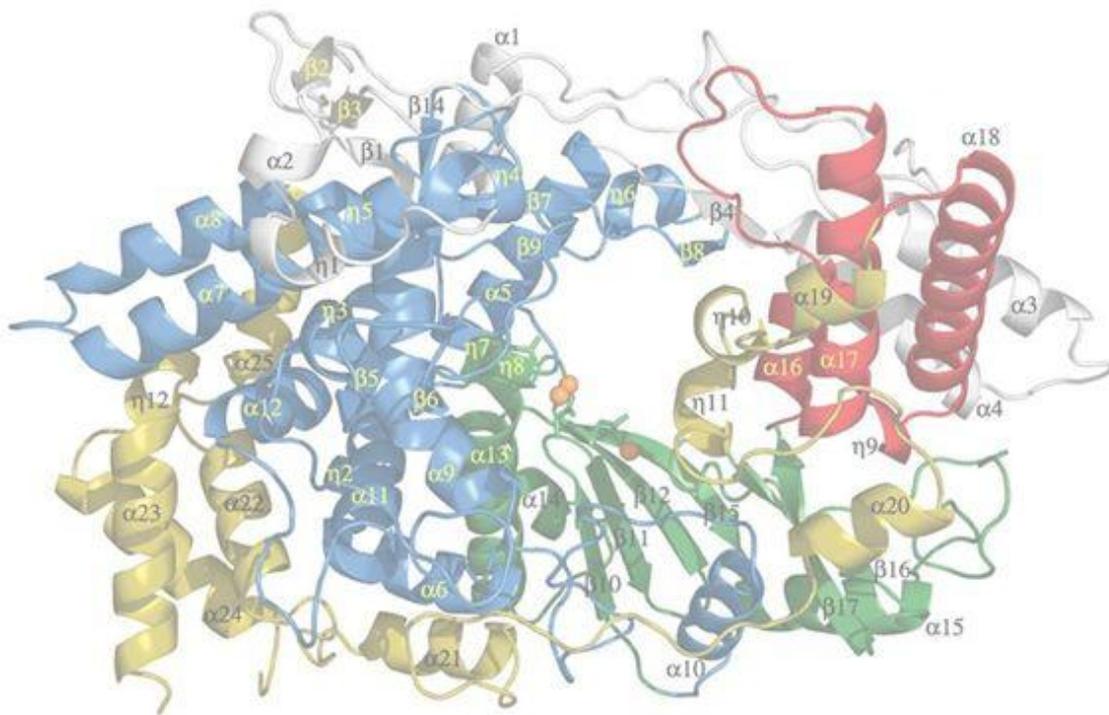


CARACTERIZACION GENETICA Y ESTUDIOS COMPARATIVOS DEL GEN VP1 DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD INFECCIOSA DE LA BURSA



Florencia Ferrara Albano

Tutor: Dr. Ruben Pérez

Co-tutor: Lic. Martin Hernández

Sección Genética Evolutiva

Facultad de Ciencias

Julio 2012

INDICE

INTRODUCCION	4
ENFERMEDAD INFECCIOSA DE LA BURSA	4
Agente etiológico: Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa	4
Estructura y organización genómica.....	4
Proteínas virales	5
VP2	5
VP3	6
VP4	7
VP5	7
VP1	7
Ciclo replicativo	9
Historia y Epidemiología.....	10
Diagnostico y caracterización de IBDV	12
Inmunidad e inmunosupresión	12
Signos clínicos y lesiones	13
Prevención y control	13
Diagnostico y caracterización	13
OBJETIVOS.....	15
MATERIALES Y METODOS.....	16
Muestras	16
Extracción del genoma viral	16
Amplificación del genoma viral	16
Cebadores	16
Retrotranscripción.....	17
Reacción en cadena de la Polimerasa.....	18
Visualización del amplicón	18
Purificación de los amplicones	19
Clonación.....	19

Extracción de ADN plasmídico.....	20
Secuenciación.....	20
Análisis bioinformático de las secuencias.....	20
RESULTADOS	22
Amplificación del gen vp1	22
Clonación y verificación de los productos obtenidos	23
Análisis de las secuencias	24
DISCUSION	30
Identificación y descripción de las secuencias.....	31
Estudios evolutivos: análisis de filogenia y presiones selectivas	32
Caracterización genética de las secuencias	33
PERSPECTIVAS	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
ANEXO: PROTOCOLOS.....	42
Agradecimientos	47

INTRODUCCION

La avicultura es una industria alimenticia de gran importancia a nivel mundial que se caracteriza por su continuo crecimiento en varios países, incluido Uruguay. Una de las claves para el desarrollo productivo de esta industria es el aspecto sanitario. Las aves de corral en un entorno de producción intensiva están expuestas a factores de estrés y a enfermedades infecciosas que alteran su salud y bienestar general, disminuyendo su potencial genético y nutricional para una producción eficiente.

ENFERMEDAD INFECCIOSA DE LA BURSA

La Enfermedad Infecciosa de la Bursa o de Gumboro se encuentra ampliamente distribuida en America del Sur y es una de de las principales enfermedades de las aves de corral, generando alta morbilidad y eventual mortalidad. Se trata de una afección que afecta el sistema inmune de las aves a temprana edad y favorece la aparición de infecciones secundarias por agentes oportunistas (Cosgrove, 1962; Hitchner, 1970).

Agente etiológico: Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa

Su agente etiológico es el virus de Gumboro o virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (IBDV, del inglés Infectious Bursal Disease Virus). IBDV se replica en la bursa o bolsa de Fabricius, el principal órgano linfoide de los pollos de corta edad (entre 3 y 6 semanas); allí el virus destruye los linfocitos B inmaduros, causando daño masivo e inmunosupresión (Hirai & Calnek, 1979; Käufer & Weiss, 1980).

Se pueden distinguir dos serotipos de IBDV, 1 y 2, descritos originalmente mediante ensayos de neutralización. De los dos serotipos, el serotipo 1 es el único que se asocia con la enfermedad clínica (McFerran *et al.*, 1980). Aislados del serotipo 1 de IBDV muestran una amplia gama de potencial inmunosupresor, patogenicidad y virulencia (Brandt *et al.*, 2001).

Estructura y organización genómica

IBDV pertenece al género *Avibirnavirus* dentro de la familia *Birnaviridae*, la cual se caracteriza por incluir virus con genoma de ARN doble hebra bisegmentado (Müller *et al.*, 1979). IBDV presenta una cápside de simetría icosaédrica de 60 nm de diámetro, sin envoltura lipídica (Böttcher *et al.*, 1997).

Los dos segmentos genómicos de IBDV, denominados A y B, codifican cinco proteínas (Figura 1). El segmento A es el de mayor tamaño (3,3 kb) y contiene dos marcos abiertos de lectura (ORFs) parcialmente solapados (Spies *et al.*, 1989). El ORF más

grande A1, produce una poliproteína de 1012 aminoácidos (110 kDa) la cual, por un proceso de autoproteólisis, genera las proteínas virales pVP2, VP3 y VP4 (Dobos *et al.*, 1979; Kibenge *et al.*, 1990). El ORF más pequeño A2 codifica para la proteína no estructural VP5 (Mundt *et al.*, 1995).

El segmento B es de menor tamaño (2,9 kb) y codifica para la proteína VP1, la ARN polimerasa ARN-dependiente del virus (Spies *et al.*, 1987).

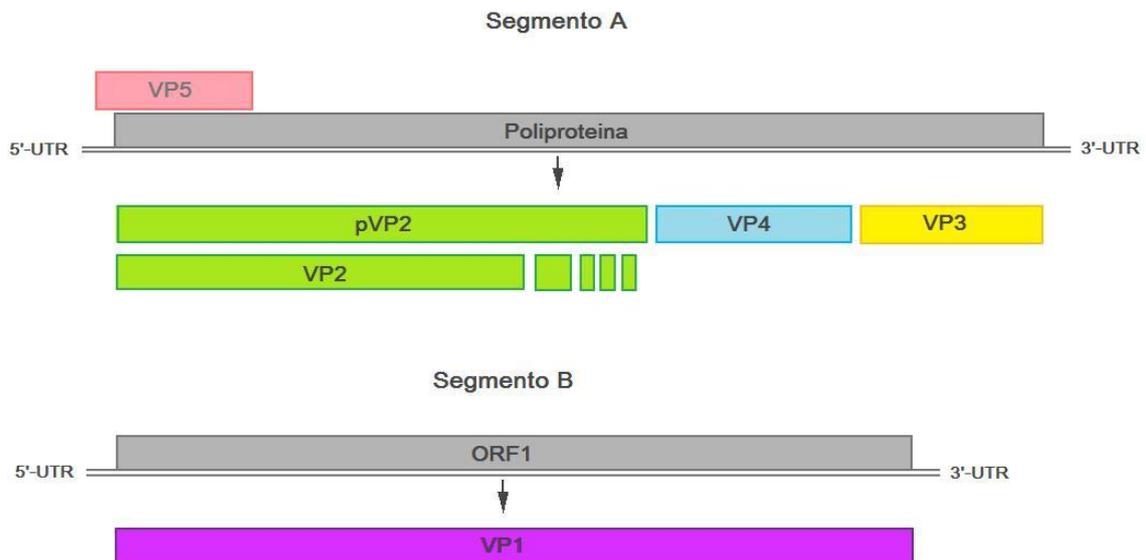


Figura 1. Esquema del genoma de IBDV. Se representan ambos segmentos genómicos y las proteínas que codifican. La proteína madura VP2 se origina por procesamiento ulterior de la pVP2.

Proteínas virales

VP2

La proteína precursora de VP2, pVP2 de 512 aminoácidos (41 kDa), se genera por el procesamiento de la poliproteína. La proteína precursora se hidroliza proteolíticamente de forma secuencial en su extremo carboxi-terminal, generando cuatro péptidos pequeños de 7 a 46 aminoácidos; estos péptidos se mantienen asociados al virión y parecen tener un papel importante en el ensamblaje, y la encapsidación del genoma (Figura 1). Posteriormente, pVP2 es escindida nuevamente para liberar la proteína VP2 madura (Da Costa *et al.*, 2002).

VP2 es una proteína estructural de 454 aminoácidos (38 kDa). Cada unidad de VP2 se pliega en tres dominios, denominados Base (B), Capa (S) y Proyección (P) (Figura 2A). Los dominios B y S son muy conservados, mientras que el dominio P es el más variable (Caston *et al.*, 2001; Garriga *et al.*, 2006; Letzel *et al.*, Dic. 2007). VP2 constituye la

cápside viral, organizándose de a trímeros (Figura 2B). Doscientos sesenta trímeros se disponen para formar la capa externa del virión (Böttcher *et al.*, 1997; Luque *et al.*, 2009).

Además de su rol estructural, VP2 tiene gran importancia en la determinación de la virulencia de IBDV (Brandt *et al.*, 2001). VP2 contiene la mayor región antigénica responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes (Schnitzler *et al.*, 1993). Esta región incluye una porción particular, denominada región hipervariable, entre las posiciones aminoacídicas 206 y 350. Esta región hipervariable presenta la mayor tasa de mutación del genoma de IBDV y concentra los cambios más significativos de la estructura proteica (Bayliss *et al.*, 1990; Jackwood *et al.*, 1996).

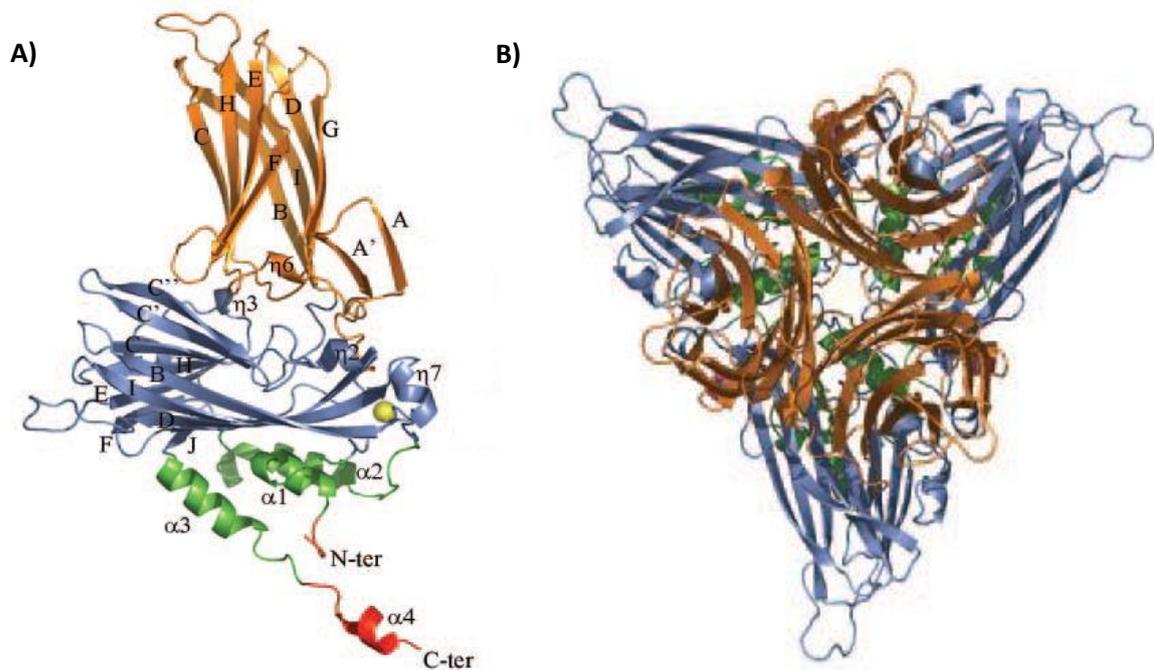


Figura 2. A) Representación de la estructura de VP2. Se muestran los diferentes dominios: proyección P (naranja), capa S (azul) y base B (verde), y los extremos amino- y carboxi-terminal (rojo). **B)** Diagrama que representa la unión de tres monómeros de VP2 formando un trímero. Figura tomada y modificada de Garriga *et al.*, 2006.

VP3

La proteína estructural VP3 de 257 aminoácidos (33 kDa) es clave en la organización y ensamblaje viral, así como en el empaquetamiento del genoma. Posee un extremo carboxi-terminal altamente hidrofílico que actúa como dominio de unión a otras proteínas y es vital en el ensamblaje del virión (Maraver *et al.*, Jun. 2003).

VP3 se asocia en homo-trímeros que se ensamblan constituyendo la cara interna del virión. Además, interacciona con pVP2 en la morfogénesis de la partícula viral (Chevalier *et al.*, 2004). VP3 tendría dos dominios funcionales en su extremo carboxi-terminal, uno mediante el cual interacciona con VP1 y otro dominio cargado positivamente, que se uniría a ambos segmentos genómicos, contribuyendo a su estabilidad (Tacken *et al.*, 2002). La proteína VP3 sería fundamental para crear un andamiaje para el ensamblado de las diferentes proteínas del virión y permitir, entre otras cosas, su correcta replicación (Tacken *et al.*, 2000; Maraver *et al.*, Feb. 2003; Pous *et al.*, 2005).

VP4

La proteína VP4 de 243 aminoácidos (27 kDa) es la proteasa viral y se encarga del procesamiento co-traducciona de la poliproteína. Produce el clivaje de pVP2-VP4 y de VP4-VP3, generando pVP2, VP3 y la propia VP4. También procesa la región C-terminal de pVP2 para generar la proteína VP2 madura (Jadagish *et al.*, 1988; Petit *et al.*, 2000). Se han encontrado dos aminoácidos críticos para la actividad catalítica de VP4, Ser-652, que representa el residuo nucleofílico y Lys-692, el sitio catalítico. Esta diada catalítica de serina-lisina, se conserva entre los birnavirus (Lejal *et al.*, 2000; Birghan *et al.*, 2000).

VP5

La proteína no estructural VP5 de 145 aminoácidos (17 kDa) es la proteína más pequeña de IBDV. Su región codificante se solapa casi totalmente con el gen de la poliproteína, correspondiendo la primer base del codón del gen de la poliproteína a la tercer base del codón del gen vp5. El gen vp5 es conservado entre las distintas cepas de IBDV (Mundt *et al.*, 1995).

VP5 no es esencial en la replicación del virus pero está muy relacionada con el proceso de apoptosis celular, lo cual tendría un rol importante en la liberación de la progenie viral y la patogénesis (Mundt *et al.*, 1997; Yao & Vakharia, 2001; Schröder *et al.*, 2001).

VP1

La proteína VP1 de 878 aminoácidos (90 kDa) es codificada por el gen vp1 que ocupa casi totalmente el segmento genómico B. VP1 es la ARN polimerasa ARN-dependiente del virus, la responsable de la replicación del genoma y de la síntesis del ARNm (Von Einem *et al.*, 2004). VP1 se encuentra asociada covalentemente a los extremos 5' del ARN genómico e interacciona con VP3, formando un complejo ribonucleoproteico (Lombardo *et al.*, 1999).

La proteína VP1 también participa de la encapsidación del genoma durante el ensamblaje de las partículas virales debido a su interacción con VP3, crucial en la morfogénesis viral (Maraver *et al.*, Feb. 2003). La formación de complejos VP3-VP1 es un paso crítico en la generación de progenie y el ciclo de vida del virus (Lombardo *et al.*, 1999; Tacken *et al.*, 2002). Se ha demostrado que VP1 es determinante para la replicación viral célula-específica (Brandt *et al.*, 2001), y junto a VP2, contribuye y modula la virulencia de IBDV (Boot *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005; Boot *et al.*, 2005).

La estructura de VP1 se determinó por cristalografía de rayos X y presentó una estructura ovalada compacta (Figura 3). La cadena polipeptídica se organiza en tres dominios principales:

- i) Un dominio central (aminoácidos 169-657) que posee una estructura muy conservada entre las ARN polimerasas ARN-dependientes. Este dominio recuerda la forma de una mano derecha con sus subdominios “dedos”, “palma” y “pulgar” (Figura 3).
- ii) Una región N-terminal (aminoácidos 1-168) que rodea el dominio central y une los subdominios dedos y pulgar en un lado de la hendidura catalítica.
- iii) Una región C-terminal (aminoácidos 658-845) que se extiende a través de palma y dedos al otro lado de la hendidura catalítica (Garriga *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2007).

El sitio activo de la polimerasa, la palma, es el subdominio más conservado y presenta una región central invariable formada por cuatro cadenas de hojas β y cinco motivos catalíticos comunes (de A a E). Una característica inusual de VP1 de los birnavirus es la permutación del motivo C, provocando que estos cinco motivos catalíticos esenciales se ordenen en forma particular (C-A-B-D-E). Además, el motivo C posee en su sitio activo la secuencia Ala-Asp-Asn, en lugar de la secuencia tradicional Gli-Asp-Asp (Von Einem *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2007).

Como sucede con otras polimerasas, la interacción con iones metálicos es importante para su actividad. VP1 depende de iones Mg^{+2} , pero se ha visto estimulada también por otros iones divalentes como Mn^{+2} y sorprendentemente por Co^{+2} . El motivo C está involucrado en el control de la dependencia de iones metálicos y se cree que su permutación en VP1 puede llevar a requerimientos inusuales de iones metálicos (Von Einem *et al.*, 2004; Letzel *et al.*, 2007).

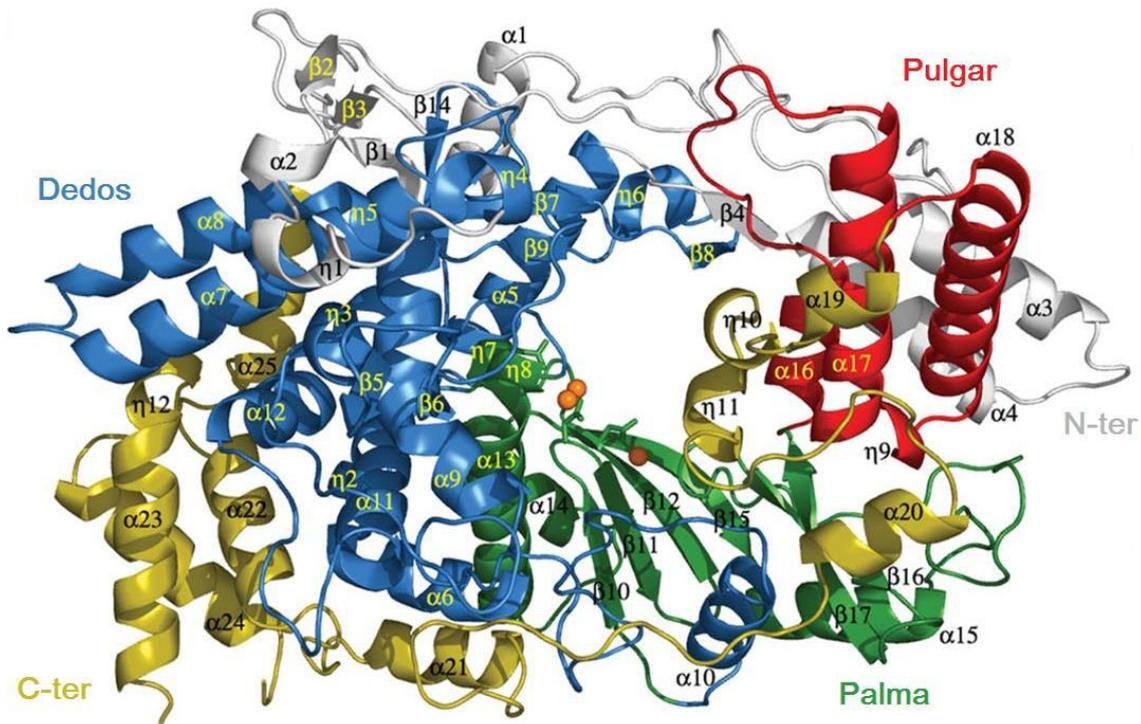


Figura 3. Estructura de VP1. En el diagrama se representan las estructuras secundarias de los subdominios dedos, pulgar y palma, y los extremos amino- y carboxi-terminal. Figura tomada y modificada de Garriga *et al.*, 2007.

Ciclo replicativo

Una vez que el virión ingresa a la célula, VP1 cataliza el proceso de replicación genómica y síntesis del ARNm viral (Spies *et al.*, 1987).

La polimerasa de los birnavirus comienza la síntesis de ARN viral mediante el mecanismo de protein-priming. Este mecanismo es utilizado por varios virus para iniciar la síntesis de genomas de ADN o ARN, siendo los birnavirus los únicos virus de ARN doble hebra que lo utilizan. Usualmente el cebador y la polimerasa son dos proteínas distintas pero en los birnavirus, VP1 cumple ambos roles. Además de la actividad de ARN polimerasa, VP1 posee actividad enzimática de auto-guanilil transferasa (Spies & Müller, 1990) catalizada por un sitio activo diferente del sitio activo de la polimerasa (Pan *et al.*, 2009). Esta reacción de auto-guanilación de VP1 es el primer paso del proceso de protein-priming, no depende del molde de ARN y requiere de iones divalentes como cofactores. En esta reacción se genera un producto (VP1-pG) que puede ser nuevamente guanilado (VP1-pGG) y así unirse a la secuencia conservada (-pCC) que se encuentra formando parte de una horquilla localizada en el extremo 3' del molde de ARN, iniciándose así la polimerización nucleotídica. Como

consecuencia, los extremos 5' de las cadenas de ARN de ambos segmentos genómicos y los ARNm virales están unidos covalentemente a VP1 (Boot *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2009).

La generación del ARN viral ocurre de manera semiconservativa, asimétrica y por hebra-desplazada. Primero, el ARN doble hebra viral debe separarse, así la hebra negativa de cada segmento genómico puede utilizarse como molde para la síntesis de ARN viral. En la estructura de VP1 se observa un prominente surco cargado positivamente, cercano al canal de entrada del molde de ARN. Este surco parece estabilizar la hebra que no está siendo utilizada como molde, y permite que se convierta en ARNm al ser desplazada por la hebra de ARN naciente (Spies *et al.*, 1987; Pan *et al.*, 2007).

Los ARNm virales se diferencian de los ARNm celulares por no poseer cola poli(A) en su extremo 3', aunque la formación de estructuras secundarias en su 3'-UTR sería importante en la eficiencia de la traducción. Los ARNm virales en su extremo 5' no poseen el cap característico de ARNm celulares y solo presentan 5'-UTR de corta longitud. Esto no permite la formación de estructuras secundarias y terciarias que puedan actuar como IRES (internal ribosome entry site) y reclutar factores de inicio para la traducción, tal como ocurre con otros virus de ARN que también carecen de 5'-cap (Boot *et al.*, 2004). Los ARNm de los birnavirus utilizarían un mecanismo alternativo para entrar a los ribosomas y comenzar la traducción. Se ha demostrado la interacción entre el intermediario guanilado de VP1 y el extremo carboxi-terminal del factor de inicio de la traducción, eIF4AII, permite reclutar la subunidad ribosomal menor 40S al extremo 5' del ARNm viral y comenzar la traducción (Tacken *et al.*, 2004).

Historia y Epidemiología

La Enfermedad Infecciosa de la Bursa se observó por primera vez en 1957 y fue descrita por Albert Cosgrove en una granja de la comunidad de Gumboro, Delaware (Estados Unidos), por lo que también se conoce como Enfermedad de Gumboro (Cosgrove, 1962). Inicialmente se consideró que era generada por una variante del Virus de la Bronquitis Infecciosa aviar (IBV), y se la llamó "nefrosis aviar" por encontrar daño severo en los riñones de pollos afectados. Posteriormente se estableció que la enfermedad era generada por el Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (Hitchner, 1970). Tras sus estudios en el tropismo tisular y persistencia del virus, este autor logró la primera descripción de la patogenia de IBDV.

La cepa clásica (cIBDV) fue la primera en surgir y se expandió rápidamente, en 1965 ya se encontraba distribuida por todo Estados Unidos, reportándose casos también en Europa y Medio Oriente. A mediados de los años 70 fue controlada exitosamente por vacunación (Lasher & Davis, 1997).

Para los años 1986-1987, la efectividad de los programas de vacunación había disminuido y se reportó la emergencia de nuevas cepas de IBDV. En Estados Unidos se describieron las primeras cepas llamadas variantes antigénicas (vaIBDV), que presentaban un cambio antigénico y un leve aumento de la virulencia. Al caracterizar estas cepas se encontró que contenían cambios únicos en la región hipervariable de VP2, mostrando una manifestación clínica un poco diferente a las cepas clásicas.

En Bélgica y Holanda se reportaron por primera vez cepas de IBDV que produjeron un brote severo de la enfermedad, provocando alta mortalidad en granjas. Antigénicamente estas cepas no presentaban diferencias con las cepas clásicas, pero mostraban una mayor virulencia, por lo que se las denominó hipervirulentas (vvIBDV) (Chettle *et al.*, 1989). La caracterización de las cepas vvIBDV reveló al compararlas con cepas cIBDV, la presencia de mutaciones aminoacídicas en todas las proteínas virales, aunque la mayoría se concentraban en la región hipervariable de VP2 (Brown *et al.*, 1994).

Después de la emergencia de las cepas vvIBDV, la enfermedad sufrió una expansión a nivel mundial, consiguiendo para los años 90 una distribución por toda Europa, Asia y África. Posteriormente se identificó en países de América Latina como Brasil, Venezuela, República Dominicana, Argentina (Di Fabio *et al.*, 1999; Banda *et al.*, 2003; Remorini *et al.*, 2006) y más recientemente en Estados Unidos (Stoute *et al.*, 2009). En 2004 se observó por primera vez un brote de vvIBDV en Uruguay (Hernández *et al.*, 2006).

El evento epidemiológico que llevó a la emergencia y expansión de vvIBDV no se conoce, pero se ha sugerido que pudo haber sido consecuencia de un evento de reordenamiento genómico que incorporó un segmento B desconocido hasta ese momento (Hon *et al.*, 2006). El reordenamiento genómico (reassortment) es una estrategia característica de virus de ARN segmentados que genera variabilidad y juega un importante papel en la evolución, creación y expansión de nuevas cepas con patogenicidad alterada, virulencia e incluso con distintos hospederos.

Análisis de filogenia y coalescencia sugieren que el gen vp1 de las cepas hipervirulentas tiene un origen independiente del resto de las cepas de IBDV (Yamaguchi *et al.*, 1997; Islam *et al.*, 2001), posiblemente de algún ave silvestre que haya oficiado como reservorio natural. Se han encontrado aislamientos de IBDV particulares que carecen

de vvVP1 y podrían corresponder a los “antiguos” IBDV que presentaban una menor patogenia. Estos IBDV antiguos habrían aportado el segmento A a los vvIBDV actuales (Le Nouën *et al.*, 2006). Estos hechos brindan sustento a la hipótesis que sugiere un posible rol del reordenamiento de vp1 en el inicio de la expansión de vvIBDV (Kong *et al.*, 2004; Hon *et al.*, 2006).

Las bases genéticas de la expresión del fenotipo de alta virulencia no han sido claramente establecidas (Jackwood & Sommer, 2005). La caracterización molecular se ha enfocado en la región hipervariable de VP2, estudiando los cambios nucleotídicos y aminoacídicos involucrados en la virulencia en las distintas cepas (Brandt *et al.*, 2001). No obstante, se ha demostrado que VP2 no es el único factor asociado a virulencia (Boot *et al.*, 2000), ya que VP1 también modula y contribuye a su expresión (Boot *et al.*, 2005).

La generación artificial de IBDV reordenados con capacidad infecciosa (Li *et al.*, 2005) impulsó la idea de la existencia de este tipo de IBDV circulando naturalmente. En el año 2006, Le Nouën *et al.* reportaron por primera vez aislamientos naturales de IBDV con segmentos genómicos reordenados. Dichos aislamientos, que presentaban el segmento A relacionado filogenéticamente a cepas vvIBDV y el segmento B con características de cepas cIBDV, desarrollaron una manifestación patogénica intermedia entre cepas vvIBDV y cIBDV (Le Nouën *et al.*, 2006).

Esta evidencia sustenta la hipótesis de que la expresión del segmento A no es suficiente para regular la virulencia; lejos de eso, el incremento de virulencia de los vvIBDV se debería a la expresión coordinada de ambos segmentos genómicos (Hon *et al.*, 2006).

Diagnostico y caracterización de IBDV

Inmunidad e inmunosupresión

IBDV infecta células B en proliferación que se encuentran en la bursa de Fabricius. Su período de incubación es corto (dos a tres días), detectándose el antígeno viral en la bursa luego de 12hs de la inoculación oral con el virus (Hirai & Calnek, 1979; Käufer & Weiss, 1980; Kibenge *et al.*, 1988).

Una activa replicación viral genera la apoptosis de las células linfoides, causando depleción de los folículos de la bursa que consisten en su gran mayoría de células B. Los pollos infectados con IBDV experimentan así supresión de la inmunidad humoral.

La activa replicación viral en la bursa está acompañada de grandes cantidades de células T que se infiltran en este órgano, por lo que la inmunidad de células T juega un importante rol en la defensa contra IBDV (Kim *et al.*, 2000).

Signos clínicos y lesiones

Los signos clínicos no son específicos, y su severidad depende de la cepa viral. Los síntomas más comunes incluyen diarrea, anorexia, depresión, deshidratación y plumaje erizado.

La bursa sufre cambios importantes a partir de los tres días post-infección: inflamación, coloración roja, necrosis, atrofia y hemorragias (Kibenge *et al.*, 1988; Saif, 1998). Se ha observado que las cepas cIBDV producen mayor daño en la bursa y también acumulan más células T, en comparación con las vIBDV (Rauf *et al.*, 2011). Las cepas vvIBDV además de dañar la bursa, causan lesiones severas en otros tejidos y órganos del sistema inmune como el timo, bazo y medula ósea (Saif, 1998).

Generalmente, esta enfermedad alcanza el 100% de morbilidad, pero la mortalidad varía según la cepa viral, las cepas vvIBDV están asociadas a altos porcentajes de mortalidad.

Prevención y control

Debido a que IBDV es altamente contagiosa y muy resistente en el ambiente, las medidas higiénicas no son suficientes y la vacunación se vuelve esencial para el control de la enfermedad. Los planes de vacunación para combatir la infección de IBDV incluyen vacunas con virus atenuados e inactivados. Las vacunas con virus atenuados incluyen cepas clásicas y variantes, e imitan la infección natural en el huésped. Las aves reproductoras también son inoculadas con vacunas con virus inactivados para inducir respuesta inmune pasiva y transferir protección a la progenie.

Diagnóstico y caracterización

El desarrollo y aplicación de técnicas de diagnóstico y caracterización rápidas y confiables se ha vuelto imprescindible para el mejoramiento del control sanitario de las enfermedades, en la obtención de información epidemiológica, y en la implementación de esquemas de vacunación.

El diagnóstico de IBDV depende de la detección de anticuerpos específicos inducidos por el virus o de la detección del virus en los tejidos, utilizando métodos inmunológicos o moleculares.

Las técnicas inmunológicas tradicionales, como el ELISA, son útiles para la identificación del virus, pero solo detectan cambios a nivel antigénico y no permiten la discriminación entre cepas cIBDV y vvIBDV.

Las técnicas de análisis genético, son las más utilizadas, permitiendo la rápida identificación y caracterización de IBDV. Se han descrito sitios en el genoma viral que actúan como marcadores genéticos de variaciones antigénicas y patogénicas, permitiendo la genotipificación de las distintas cepas de IBDV. De manera general, las técnicas de análisis genético para IBDV incluyen la amplificación por RT-PCR (retrotranscripción - reacción en cadena de la polimerasa), del ARN viral extraído directamente de las bursas de Fabricius (Lin *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994; Mittal *et al.*, 2005). Posteriormente se aplican las metodologías de caracterización. Una de las técnicas más empleadas para genotipificar IBDV ha sido el RFLP (Polimorfismo en el Largo de los Fragmentos de Restricción). Esta utiliza diferentes enzimas de restricción para el posterior análisis de los fragmentos obtenidos por la digestión que permiten detectar la presencia de secuencias de ADN específicas de las distintas cepas.

La forma más precisa de identificación y caracterización de IBDV es la secuenciación, que revela la composición nucleotídica y permite deducir la composición aminoacídica del genoma viral.

Las técnicas de identificación y caracterización se han centrado en el análisis de la región hipervariable de VP2, pero la detección de aislamientos con segmentos genómicos reordenados, ha sido motivo de una reevaluación de los sistemas de diagnóstico y genotipificación utilizados hasta el momento en IBDV (Hernández *et al.*, 2011). El análisis de VP2 nos proporciona información solo del segmento genómico A, por ello resulta importante a la hora del diagnóstico y la caracterización incluir el segmento B. El estudio de VP1 permite obtener información más completa del genoma del virus, pudiendo contribuir con el desarrollo de técnicas de diagnóstico más precisas, que puedan detectar casos de reordenamiento genómico. Además de lograr un mayor conocimiento de la diversidad y variabilidad de IBDV, aportando datos que puedan ayudar a un mejor entendimiento de su evolución, epidemiología, y contribuyendo a la prevención y el control de la enfermedad.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterización genética del gen vp1 del Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa de aislamientos de campo uruguayos de diferentes patogenias.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desarrollar un ensayo molecular para la amplificación total del gen vp1 y estandarizar la metodología utilizando una cepa vacunal.
- Obtener las primeras secuencias completas del gen vp1 de cepas uruguayas clásicas e hipervirulentas.
- Realizar el estudio comparativo con secuencias existentes en la base de datos.
- Identificar marcadores moleculares asociados con las distintas cepas.
- Estudiar las presiones selectivas del gen vp1 y de los marcadores identificados para aportar información sobre el origen y evolución de las cepas hipervirulentas.

MATERIALES Y METODOS

Muestras

Para la realización de este trabajo se utilizó una cepa vacunal y virus de campo. La cepa vacunal se obtuvo de la vacuna comercial Nobilis Gumboro D78 de Laboratorios Intervet, la cual incluye en su formulación virus de una cepa clásica atenuada.

Los virus de campo se obtuvieron a partir de muestras de bursas extraídas directamente de pollos que presentaban signos clínicos característicos de IBDV. Estas muestras se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Se eligieron dos muestras con cepas de campo de patogenicidad diferente (clásica e hipervirulenta); estas cepas habían sido previamente caracterizadas analizando el gen vp2.

Tabla 1. Se detallan los aislamientos, a que cepa pertenecen, y su origen.

Muestra	Cepa	Tipo
D78	Clásica	Vacunal
M07C	Clásica	Campo
M102	Hipervirulenta	Campo

Extracción del genoma viral

La vacuna liofilizada se resuspendió en PBS (solución salina amortiguada por fosfatos), esta resuspensión se utilizó para la extracción de ARN mediante el kit "High Pure RNA isolation kit" (Roche).

En el caso de la extracción del ARN viral de las muestras de campo, se cortaron pliegues internos de las bursas y se efectuó un pre-tratamiento con SDS (dodecil sulfato sódico) y proteinasa K. La extracción del ARN viral se realizó con el método de TRIzol, obteniéndose $50\mu\text{l}$ de ARN eluido en agua ultra pura (Ver Anexo).

Amplificación del genoma viral

Cebadores

En este estudio se utilizaron cuatro juegos de cebadores para lograr la amplificación completa del gen vp1, incluyendo parte de las regiones 5'-UTR y 3'-UTR, amplificando 2779 pb en total (Figura 4).

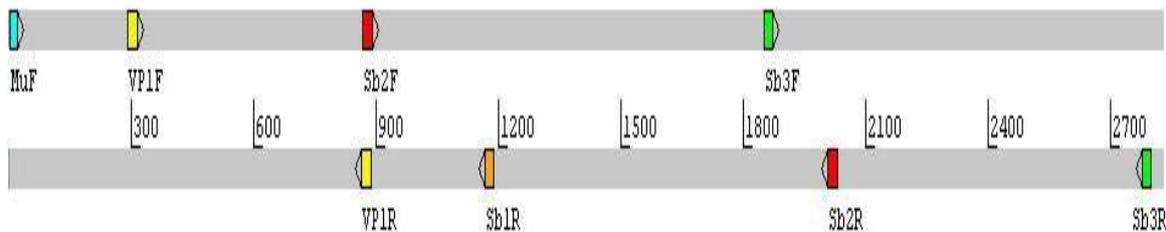


Figura 4. Representación grafica del segmento B de IBDV (barras grises) utilizando el programa bioinformático Artemis 12.0 (The Wellcome Trust Sanger Institute). Los cebadores utilizados se muestran en diferentes colores.

Se diseñaron nuevos juegos de cebadores para utilizar en conjunto con cebadores previamente diseñados en el laboratorio, logrando la amplificación total deseada (Tabla 2). El diseño se realizó usando la herramienta Primer BLAST del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) y se utilizó el programa Oligo Analyzer 3.1 de “Integrated DNA Technologies” (IDT) para analizar sus temperaturas de melting (Tm) y la posible formación de estructuras secundarias y dímeros.

Tabla 2. Descripción de los cebadores utilizados. Se muestran las secuencias nucleotídicas en sentido 5’ – 3’, las posiciones de hibridación en el genoma viral y el tamaño del amplicón generado con la utilización de cada juego de cebadores. Se indica con (+) si el cebador es directo y con (-) si es reverso.

Cebador	Secuencia	Posición de hibridación (pb)	Tamaño del amplicón (pb)
MuF (+)	5'- GGATACGATCGGTCTGAC - 3'	1 - 18	845
VP1R (-)	5' - TTGATGACTTGAGGTTGATTTTG - 3'	864 - 883	
VP1F (+)	5'- AGATTCTGCAGCCACGGTCTCT - 3'	290 - 311	853
Sb1R (-)	5' – TTGGACATCACGGGCCAGGT - 3'	1165 - 1184	
Sb2F (+)	5' - ATCAACCTCAAGTCATCAAGTGG - 3'	865 - 887	1120
Sb2R (-)	5' – TGTCAGGAGTGGGTAGTTC - 3'	2007 - 2026	
Sb3F (+)	5' - ATCTGGGATCTATGTGCCG - 3'	1850 - 1869	909
Sb3R (-)	5' - GGGTCTGGGGTTAGTGTC - 3'	2778 - 2795	

Retrotranscripción

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) se utilizó el kit “RevertAid First Strand cDNA Synthesis” (Fermentas). Por cada retrotranscripción (RT) se utilizaron 10µl de ARN extraído (Ver Anexo). Se realizaron RT específicas utilizando un juego de cebadores (directo y reverso) por tratarse de un genoma de ARN doble hebra.

Reacción en cadena de la Polimerasa

Para la amplificación de los fragmentos genómicos se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos (Tabla 2). Las concentraciones y volúmenes de los reactivos se muestran en la Tabla 3. Las condiciones de ciclado se mantuvieron, adecuando la temperatura de hibridación para cada juego de cebadores (Tabla 4).

Para las reacciones de RT y PCR se utilizó un termociclador Corbett PCR Thermal Cycler.

Tabla 3. Composición general de la reacción de PCR. Se indica concentración inicial y final de cada reactivo así como el volumen utilizado para cada uno de ellos.

Reactivo	Concentración	Concentración	Volumen utilizado
	Stock	Final	
Buffer	10x	1x	1,5µl
MgCl ₂	25mM	2µM	1,5µl
dNTPs	40mM	0,8mM	0,375µl
Cebador directo	10 µM	0,4µl	0,75µl
Cebador reverso	10µM	0,4µl	0,75µl
Taq polimerasa (Fermentas)	5U/µl	0,05U/µl	0,15µl
ADNc	-	-	1µl
H ₂ O	-	-	8,975µl

Tabla 4. Condiciones de ciclado utilizadas en las reacciones de PCR. Se indican las temperaturas de hibridación para los correspondientes cebadores.

	Etapa	Temperatura	Tiempo de duración
	Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
30 ciclos	Desnaturalización	95 °C	30 segundos
	Hibridación	55 - 62°C	1 minuto
	Extensión	72 °C	1 minuto
	Extensión final	72 °C	15 minutos

Visualización del amplicón

Los productos de las reacciones de PCR (amplicones) fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador con luz UV.

Purificación de los amplicones

Los amplicones se cortaron del gel de agarosa y se purificaron utilizando el kit “GFX PCR DNA and Gel Band purification kit” (General Electric).

Clonación

La clonación de los amplicones purificados se realizó con el kit “GeneJet PCR Product Cloning kit” (Fermentas), utilizando células competentes de E. Coli XL-1 Blue.

El vector utilizado (pJET1.2/blunt) contiene el gen que codifica para β -lactamasa, que proporciona resistencia a la ampicilina a la bacteria que lo adquiera. También contiene un gen “letal” cuya secuencia codificante incluye sitios diana para diversas enzimas de restricción (sitio de policlonado), así el gen “letal” es interrumpido al adquirir un inserto y su producto no se expresa. De esta manera al cultivar las bacterias en un medio (LB) con ampicilina solo aquellas que hayan adquirido el vector logran crecer; asimismo solo las bacterias que han sido transformadas con el vector que contiene el inserto sobrevivirán por tener el gen “letal” interrumpido. Solo las bacterias recombinantes que contienen el inserto crecerán en la placa.

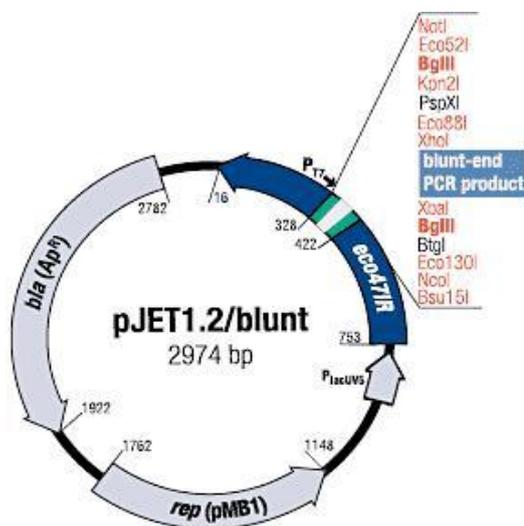


Figura 5. Mapa del vector de clonación pJET1.2/blunt. Se indica el gen de la β -lactamasa (Ap^R) y el gen “letal” (eco47IR).

Los fragmentos a clonar fueron ligados al vector utilizando DNA ligasa T4. Las transformaciones fueron incubadas en medio líquido con agitación a 37°C durante 90 minutos. Luego estos cultivos fueron plaqueados en medio sólido LB-agar-ampicilina (Ver Anexo).

Finalmente, para corroborar la presencia del fragmento de interés en las colonias transformadas se realizó un screening por PCR, con cebadores específicos para el inserto, utilizando las mismas condiciones ya citadas, pero se aplicó directamente cada colonia como ADN molde y se analizó mediante una corrida electroforética.

Extracción de ADN plasmídico

Los clones positivos se incubaron en medio líquido LB-ampicilina a 37°C toda la noche con agitación. La extracción del ADN plasmídico se realizó mediante minipreparaciones (Ver Anexo). La presencia del fragmento de interés en los clones se estableció mediante una nueva reacción de PCR, bajo las mismas condiciones ya mencionadas y posterior corrida electroforética. Los productos de las minipreparaciones fueron cuantificados en Nanodrop.

Secuenciación

Los insertos fueron secuenciados en forma automática, empleando los cebadores específicos del vector: pJET-F y pJET-R.

Análisis bioinformático de las secuencias

Los cromatogramas de las secuencias fueron revisados y editados utilizando el programa "BioEdit Sequence Alignment Editor" (BioEdit).

Las secuencias parciales del gen vp1 de los dos virus de campo y del virus vacunal se ensamblaron utilizando la herramienta SeqMan de Lasergene, obteniendo de ese modo la secuencia lineal completa del gen vp1 de cada cepa.

Se realizó una búsqueda de homología con las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI. Se utilizó la herramienta BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool), un algoritmo que permite comparar la secuencia nucleotídica de interés con las existentes en la base de datos. BLASTN realiza alineamientos con las secuencias de mayor homología y brindando valores estadísticos para cada alineamiento, como el porcentaje de identidad calculado en base al número de residuos que coinciden entre la secuencia de interés y la encontrada por la base de datos.

Con las secuencias nucleotídicas de las muestras y las encontradas en la base de datos se realizaron alineamientos con el método Clustal W del programa "Molecular Evolutionary Genetics Analysis" versión 4 (MEGA4). Con la información obtenida del alineamiento se realizaron estimaciones del número de diferencias nucleotídicas y aminoacídicas existentes entre las secuencias.

Se realizó una reconstrucción filogenética a través del método neighbour-joining utilizando el programa MEGA4; el soporte estadístico de los clusters se estableció mediante bootstrap con 1000 réplicas.

Para determinar las presiones selectivas a las que están sometidos los codones de VP1, se utilizó el algoritmo "Single likelihood ancestor counting" (SLAC) de la interfase Datamonkey. SLAC es uno de los métodos de conteo basado en verosimilitud más utilizados para identificar las presiones selectivas (positivas, negativas y neutras) de los

codones. Este método infiere por verosimilitud la secuencia ancestral y usándola como referencia contabiliza para cada codón del alineamiento el número de cambios sinónimos y no-sinónimos, con el objetivo de establecer si el número de cambios no-sinónimos por sitio no-sinónimo (dN) es significativamente diferente del número de cambios sinónimos por sitio sinónimo (dS).

RESULTADOS

Amplificación del gen vp1

Los primeros ensayos realizados consistieron en la puesta a punto de las condiciones de la amplificación con el objetivo de establecer las variables óptimas para el funcionamiento de los cebadores. Para cada juego de cebadores se realizaron reacciones de PCR con gradiente de temperatura relativa a su T_m , seleccionando la temperatura de hibridación de mayor rendimiento. Estos ensayos se realizaron con la cepa vacunal con el objetivo de estandarizar los procedimientos y contar con un control positivo para los ensayos.

Tabla 5. Temperaturas de hibridación óptimas para cada juego de cebadores establecida por estudio de gradiente de temperatura.

Cebadores	Temp. de hibridación óptima
MuF/VP1R	55°C
VP1F/Sb1R	62°C
Sb2F/Sb2R	62°C
Sb3F/Sb3R	62°C

Luego de determinar la temperatura óptima para cada juego de cebadores, se realizaron las amplificaciones de cada segmento con su juego de cebadores correspondiente.

Los cebadores fueron probados en la amplificación de cepas con distintas virulencia y mostraron un buen rendimiento. De esta manera se logró la amplificación del gen vp1 en los virus de campo M07C (clásico) y M102 (hipervirulento).

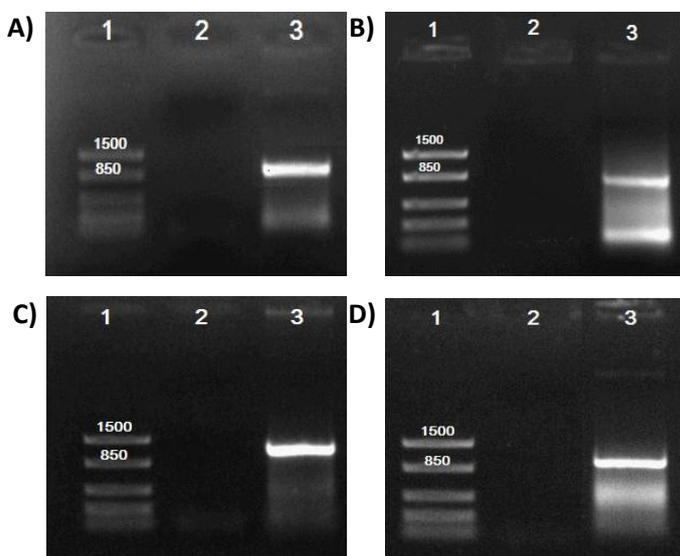


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de la amplificación de la muestra M102 con los distintos cebadores. En todos los casos el carril 1 corresponde a un marcador de peso molecular, el carril 2 al blanco (control sin ADNc) y el carril 3 a la amplificación de M102 con A) MuF/VP1R; B) VP1F/Sb1R; C) Sb2F/Sb2R y D) Sb3F/Sb3R.

Clonación y verificación de los productos obtenidos

Los amplicones obtenidos fueron clonados en el vector pJET1.2/blunt. Se corroboró la presencia de los insertos de interés en el vector realizando un screening por PCR con cebadores específicos para cada inserto, bajo las condiciones anteriormente descritas.

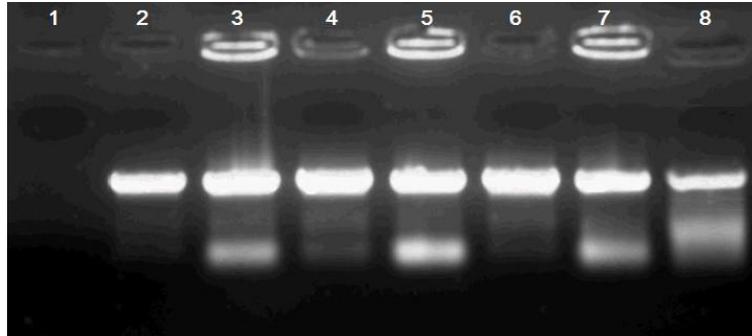


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% correspondiente al screening de colonias de la clonación de D78 con Sb2F/Sb2R (tamaño del inserto 1120pb). Carriles: 1- Blanco; 2- Colonia 1; 3- Colonia 2; 4- Colonia 3; 5- Colonia 4; 6- Colonia 5; 7- Colonia 6 y 8- Control positivo: producto de PCR D78 Sb2F/Sb2R.

Luego de confirmar la presencia del inserto en las colonias, se seleccionaron las colonias 1 y 2 y se realizó una extracción de ADN plasmídico. Se realizó una nueva amplificación por PCR con cebadores específicos, con el fin de verificar que los productos de las minipreparaciones contenían efectivamente el amplicón deseado.

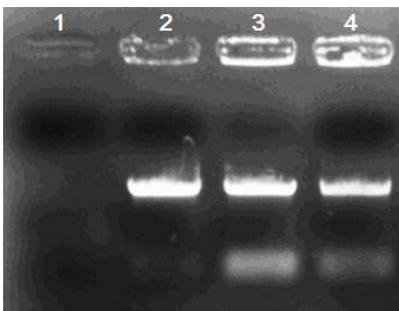


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los amplicones D78 Sb2F/Sb2R obtenidos de las minipreparaciones. Carriles: 1- Blanco; 2- Minipreparación colonia 1; 3- Minipreparación colonia 2 y 4- Control positivo: producto de PCR D78 Sb2F/Sb2R.

Se realizó el mismo procedimiento para la clonación de los otros fragmentos de D78. Una vez probada y estandarizada, esta técnica fue aplicada en los dos virus de campo, utilizando D78 como control positivo. Las amplificaciones y las clonaciones se realizaron satisfactoriamente, tanto sobre la cepa de campo clásica como en la hipervirulenta.

Análisis de las secuencias

Para obtener la secuencia lineal del gen vp1 completo, las secuencias parciales obtenidas de los virus de campo y el virus vacunal se ensamblaron y compararon. De esta manera se obtuvo una secuencia nucleotídica consenso codificante de 2634pb para cada virus analizado. Mediante su secuencia deducida de aminoácidos se obtiene la secuencia de 878 aminoácidos de la proteína VP1 (Figura 9).

Descripción de las secuencias

Las secuencias fueron analizadas y se estimó su divergencia nucleotídica y aminoacídica (Tabla 6 y 7).

Tabla 6. Resultado del estudio de divergencia nucleotídica entre las muestras analizadas. Se muestra el número de bases diferentes por secuencia que surge del análisis entre las secuencias.

	1	2	3
1. cIBDV D78 Uruguay (vac)			
2. cIBDV M07C Uruguay	87,000		
3. vvIBDV M102 Uruguay	285,000	287,000	

Tabla 7. Resultado del estudio de divergencia aminoacídica entre las muestras analizadas. Se muestra el número de aminoácidos diferentes por secuencia que surge del análisis entre las secuencias.

	1	2	3
1. cIBDV D78 Uruguay (vac)			
2. cIBDV M07C Uruguay	13,000		
3. vvIBDV M102 Uruguay	20,000	28,000	

Análisis comparativos

Se realizó una búsqueda de homología para las secuencias nucleotídicas de D78, M07C y M102 en la base de datos del GenBank mediante BLASTN.

La cepa vacunal D78 mostró un 100% de homología nucleotídica con la misma cepa obtenida y analizada por investigadores de EEUU, así como con cepas clásicas de referencia de ese mismo país (Tabla 8).

La secuencia del virus clásico M07C reveló el mayor valor de identidad nucleotídica, 96%, con aislamientos clásicos de EEUU, China, y Europa (Tabla 9).

En el caso del virus hipervirulento M102 se obtuvo un 99-98% de identidad nucleotídica con aislamientos hipervirulentos de referencia de Europa y Asia (Tabla 10).

Tabla 8. Resultado del BLASTN de la cepa clásica vacunal D78. Se muestra número de acceso, nombre del aislamiento, país de origen y tipo de cepa a la cual pertenecen. En todos los casos se muestra el porcentaje de identidad con respecto a la muestra D78.

Número de acceso	Virus	País de origen	Tipo de cepa	% de identidad
EU162090.1	D78	EEUU	c	100%
EU162095.1	H30	EEUU	c	100%
EU162093.1	CS-2-35	EEUU	c	100%
EU162092.1	ViBursa CE	EEUU	c	100%
EU162091.1	ViBursa G	EEUU	c	100%

Tabla 9. Resultado del BLASTN de la cepa clásica de campo M07C. Se muestra número de acceso, nombre del aislamiento, país de origen y tipo de cepa a la cual pertenecen. En todos los casos se muestra el porcentaje de identidad con respecto a las muestra M07C.

Número de acceso	Virus	País de origen	Tipo de cepa	% de identidad
AY459320.1	Edgar	EEUU	c	96%
AY459321.1	9109	EEUU	c	96%
AY103464.1	JD1	China	c	96%
AY918947.1	Lukert	EEUU	c	96%
AY103464.1	Cu-1	Alemania	c	96%

Tabla 10. Resultado del BLASTN de la cepa hipervirulenta M102. Se muestra número de acceso, nombre del aislamiento, país de origen y tipo de cepa a la cual pertenecen. En todos los casos se muestra el porcentaje de identidad con respecto a la muestra M102.

Número de acceso	Virus	País de origen	Tipo de cepa	% de identidad
AF240687.1	D6948	Holanda	vv	99%
AJ318897.1	UK661	Inglaterra	vv	99%
DQ679811.1	HOL	Holanda	vv	99%
DQ927043.1	Ks	Israel	vv	98%
AF083093.1	IL3	Israel	vv	98%

Caracterización genética de las secuencias

El alineamiento de secuencias del gen vp1 completo de los virus caracterizados y de virus de referencia disponibles en la base de datos, permitió establecer los cambios existentes entre ellos. Los resultados de estos análisis revelaron que la mayoría de los cambios nucleotídicos y aminoacídicos existentes entre las secuencias diferencian a las cepas hipervirulentas de las demás cepas.

Analizando la secuencia de aminoácidos (Figura 9) se observan quince cambios que distinguen cepas hipervirulentas de las clásicas y variantes, de los cuales doce diferencian cepas hipervirulentas de las clásicas, variantes y del serotipo 2, siendo cambios característicos de cepa y serotipo (Tabla 11).

No obstante, se pudo observar que existen muchos más cambios nucleotídicos que aminoacídicos (259 vs. 15).

Tabla 11. Cambios aminoacídicos observados que diferencian las cepas hipervirulentas (vv) de las cepas clásicas (c), variantes (va) y del serotipo 2, tras el análisis comparativo de las secuencias en estudio y de aislamientos de referencia mundiales (Figura 9). Se muestran los doce cambios característicos de cepa y serotipo (sombreado).

Posición aminocídica	vvIBDV	cIBDV, vaIBDV	Serotipo 2
4	V	I	V
61	I	V	V
145	T	N	N
146	D	E	E
147	N	G	G
242	E	D	D
287	A	T	T
390	M	L	L
393	D	E	E
508	K	R	K
511	S	R	S
562	P	S	S
646	S	G	G
682	P	S	S
695	R	K	K

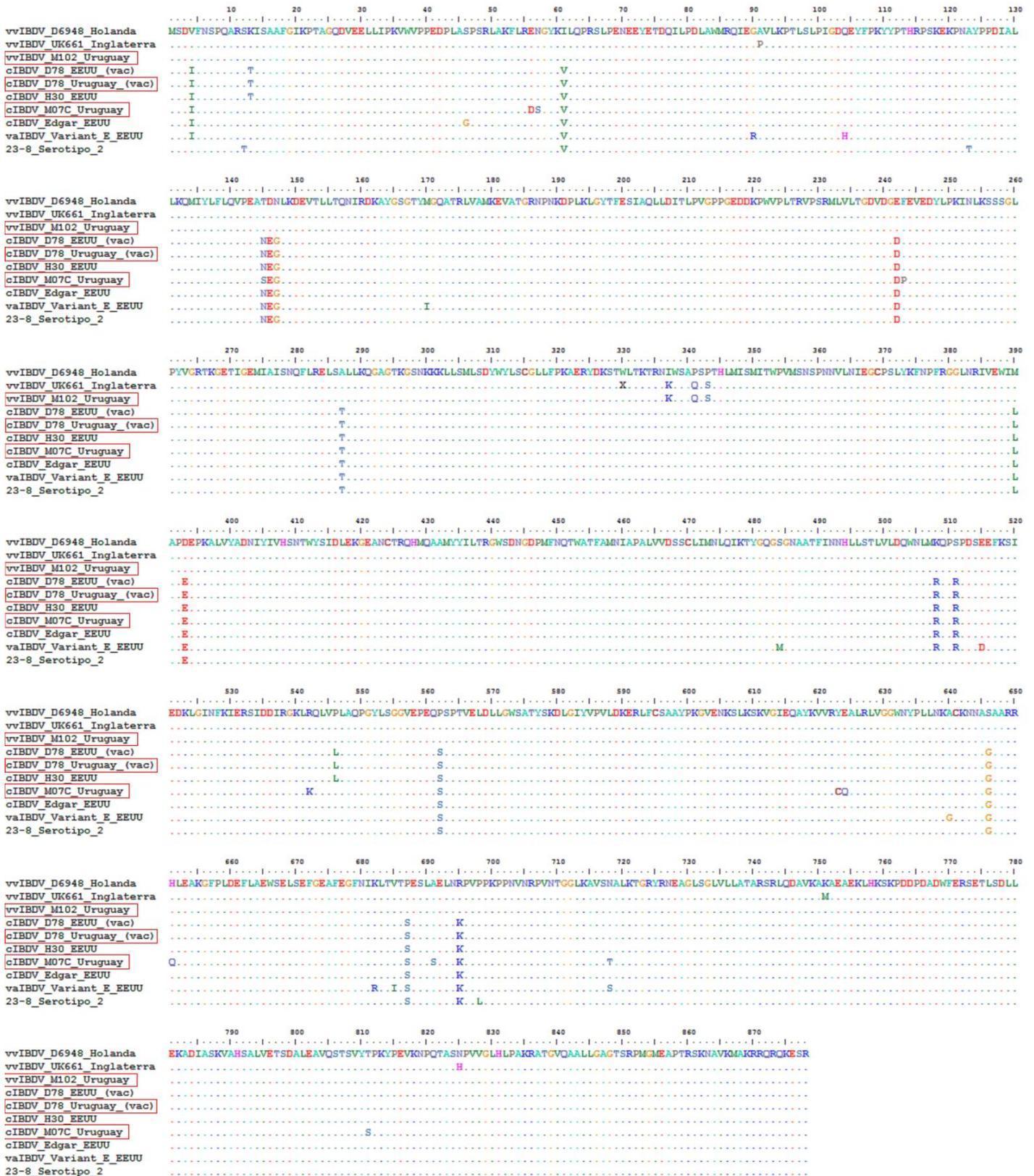


Figura 9. Análisis comparativo de secuencias aminoacídicas de las muestras en estudio (recuadros rojos) con aislamientos de referencia mundiales hipervirulentos (vv), clásicos (c), variantes (va) y del serotipo 2. Se muestra con un punto cuando la secuencia es igual en esa posición respecto a la cepa hipervirulenta D6948.

Reconstrucción filogenética

Utilizando las secuencias en estudio y las disponibles en la base de datos (n=56) se construyó un árbol filogenético mediante el método de neighbour-joining (Figura 10). En el mismo se puede apreciar la presencia de dos agrupamientos bien definidos. Un agrupamiento se encuentra formado por cepas de baja patogenicidad, clásicas y variantes e incluye a la cepa vacunal D78. La cepa clásica uruguaya M07C ocupa una posición basal e independiente en el clado, con un valor de soporte del 99%. El otro agrupamiento, respaldado por valores de soporte del 99%, está formado exclusivamente por cepas hipervirulentas e incluye la cepa uruguaya M102.

Análisis de las presiones selectivas

Se estudiaron las fuerzas selectivas a las que está sometida la evolución de VP1, calculando el dN/dS global y cada uno de los codones que codifican su secuencia proteica.

Se obtuvo un valor de dN/dS global de 0,074. El valor de significancia (p) se fijó de manera estricta en 0,1, dando como resultado que de los 878 codones que forman VP1, ninguno se encuentra sometido a presión selectiva positiva, 237 están bajo selección negativa y los restantes 641 son selectivamente neutros. Al aumentar el valor p fijándolo en 0,5, se obtiene que 7 codones están bajo presión selectiva positiva, 518 sometidos a presión negativa y 353 son selectivamente neutros.

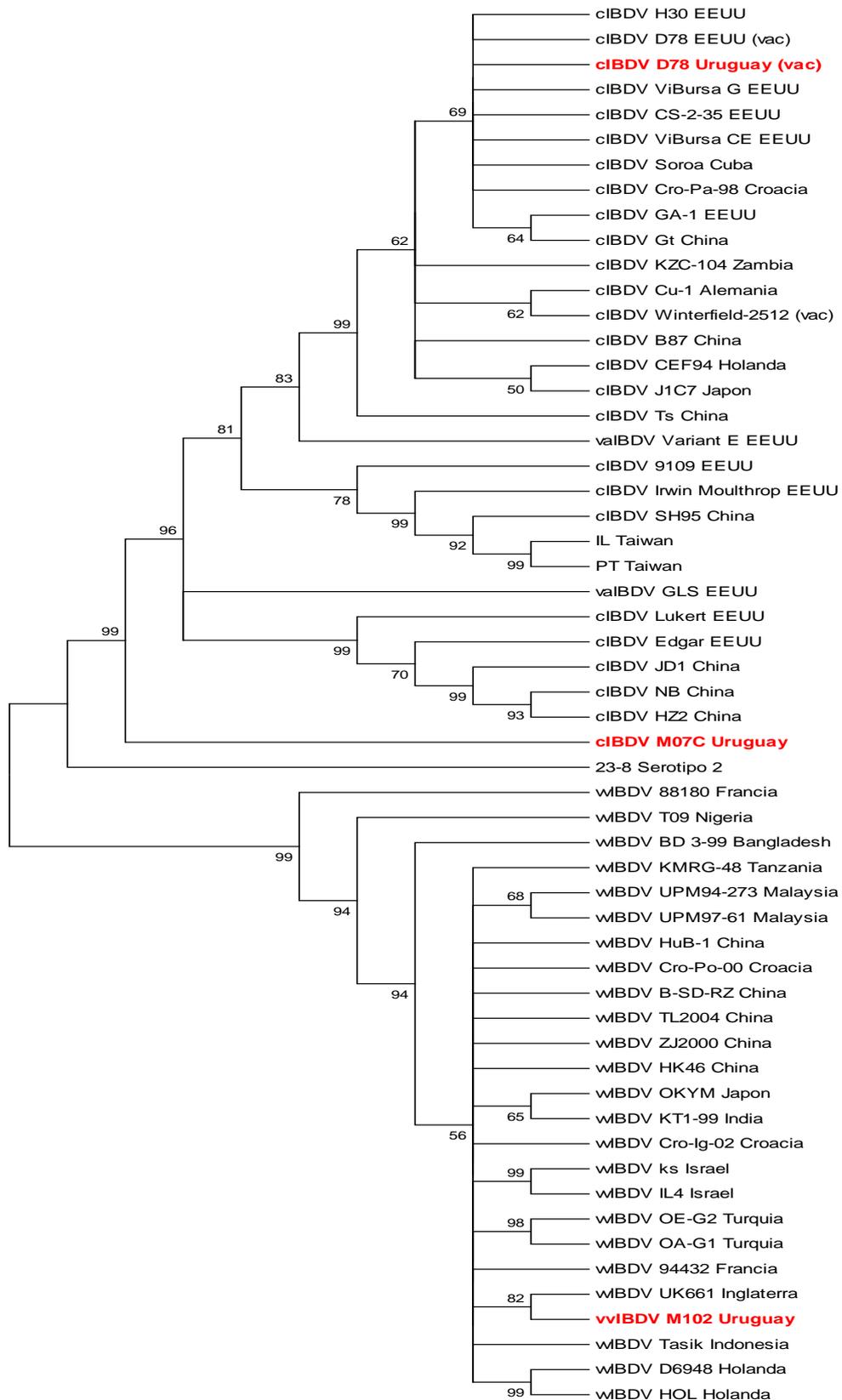


Figura 10. Árbol filogenético obtenido por el método neighbor-joining, utilizando el alineamiento de las secuencias completas del gen vp1 disponibles en el NCBI y las obtenidas en este estudio (en letra roja). Para cada aislamiento se detalla su nombre, el país de origen, y su patogenicia. Se muestran en cada nodo los valores de soporte.

DISCUSION

En los últimos años se ha progresado en la comprensión de la epidemiología molecular del Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa, descifrando la composición del genoma, identificando regiones para determinar relaciones genéticas entre las diferentes cepas, y entendiendo la capacidad para generar variabilidad y evolucionar de este virus (Le Noüen *et al.*, 2005).

Los estudios genéticos de IBDV se han enfocado en el segmento A, principalmente en la región hipervariable de VP2 que constituye la principal región antigénica viral (Bayliss *et al.*, 1990; Schnitzler *et al.*, 1993). Esta región ha sido ampliamente utilizada para análisis antigénicos y moleculares de identificación de IBDV.

La comprensión de las bases moleculares implicadas en la patogenia de las cepas hipervirulentas continúa siendo una interrogante (Jackwood & Sommer, 2005). Los análisis comparativos de cepas con diferente patogenia, como vvIBDV y cIBDV, han mostrado una gran cantidad de diferencias aminoacídicas concentradas en la región hipervariable de VP2, pero también en el resto de las proteínas virales (Brandt *et al.*, 2001). El desarrollo de sistemas de genética reversa (Mundt & Vakharia, 1996) facilitó el estudio de los segmentos genómicos, genes, e incluso aminoácidos particulares y su rol en la patogenia de IBDV. De esta manera se demostró que VP2 no es el único determinante del fenotipo hipervirulento (Boot *et al.*, 2000). Existen factores que contribuyen a la virulencia en el resto del segmento genómico A y también en el segmento B, los que actuarían de forma sinérgica (Boot *et al.*, 2005).

Para comenzar a entender la acción conjunta de ambos segmentos genómicos en la patogenia ha sido muy importante el análisis de los reordenamiento genómico que presenta IBDV. Inicialmente, utilizando herramientas de genética reversa se logró generar de forma artificial un virus de IBDV reordenado cuyos segmentos A y B provenían de cepas con diferentes patogenia (Li *et al.*, 2005). En estos virus se pudo observar una variación en la manifestación clínica respecto a las cepas originales de las que provinieron los segmentos. Poco después, este hecho fue corroborado en aislamientos naturales reordenados cuyos segmentos genómicos provenían de cepas clásicas e hipervirulentas (Le Noüen *et al.*, 2006). Los brotes de IBD provocados por estos virus reordenados mostraron una menor patogenia a la observada para cepas vvIBDV típicas, lo que indica que ambos segmentos están involucrados en la virulencia y patogénesis de IBDV (Le Noüen *et al.*, 2006). Tras estos hallazgos, se ha vuelto necesario el estudio de ambos segmentos y la investigación del rol de VP1 en la virulencia y patogenia de IBDV.

En el presente trabajo se realizó la primera caracterización genética completa del gen vp1 que codifica para la ARN polimerasa ARN-dependiente de aislamientos de IBDV uruguayos, representando una de las primeras caracterizaciones de este tipo para virus que circulan en Sudamérica. Para el estudio utilizamos una cepa vacunal como referencia y dos aislamientos de campo uruguayos. Estos últimos fueron previamente caracterizados por su segmento A, siendo uno de fenotipo clásico y otro hipervirulento (Hernández *et al.*, 2006). Posteriormente se procedió a la amplificación, clonación y secuenciación del gen vp1, obteniéndose finalmente secuencias de 2779 pb que incluyen el gen completo y porciones de las regiones 5' y 3' UTR de los tres IBDV estudiados.

Identificación y descripción de las secuencias

El marco abierto de VP1, correspondiente a una secuencia de 2634 pb, fue identificado en las secuencias de los tres virus caracterizados, obteniéndose luego su secuencia deducida de aminoácidos típica con sus 878 residuos.

Al aplicar el algoritmo BLASTN se obtuvo, como era de esperar, un 100% de homología nucleotídica entre el gen vp1 de la cepa vacunal D78 caracterizada y el correspondiente a la vacuna D78 publicada en el banco de genes, lo que corrobora que el procedimiento desarrollado en este trabajo es correcto.

La cepa clásica de campo M07C mostró mayor homología nucleotídica con cepas clásicas de América del Norte, Asia y Europa (Tabla 9), lo que confirma que el segmento genómico B de este virus es de tipo clásico. La comparación de los virus clásicos estudiados, el de campo M07C y el vacunal D78 entre sí, mostró que presentan una divergencia a nivel nucleotídico y aminoacídico (Tablas 6 y 7). Esta divergencia también se observa al comparar M07C con aislamientos clásicos de referencia. En este sentido debemos tomar en cuenta que el aislamiento M07C fue colectado en el año 2007, en contraste con aislamientos clásicos presentes en la base de datos que datan de varios años atrás (Ej. Edgar aislado en los años 60') y posiblemente no representen a las cepas clásicas que se encuentran circulando en los últimos años en Uruguay y la región.

En el caso de la muestra hipervirulenta de campo M102, la comparación con las muestras clásicas estudiadas D78 y M07C, mostró que se diferencia con ellas en 285 y 287 nucleótidos, y en 20 y 28 aminoácidos, respectivamente. Mediante la aplicación del algoritmo BLASTN a la secuencia de M102 se obtuvo que el mayor porcentaje de homología nucleotídica (99%) lo presenta con cepas hipervirulentas europeas de

referencia, indicando que efectivamente se trata de un aislamiento hipervirulento (Tabla 10).

Estos resultados son concordantes con la clasificación realizada anteriormente mediante el análisis del segmento A de los aislamientos de campo aquí estudiados (Tabla 1), por lo que podemos afirmar que estos aislamientos no presentan reordenamiento genómico.

Estudios evolutivos: análisis de filogenia y presiones selectivas

Se realizó la reconstrucción filogenética con las secuencias obtenidas, y las que se encuentran en la base de datos, logrando un n=56. Entre ellas se incluyeron cepas clásicas, hipervirulentas, variantes y del serotipo 2 (no patogénico). El análisis mostró la presencia de dos grandes agrupamientos o clados, que presentaron un soporte estadístico de 99% (Figura 10).

El primer clado se encuentra formado por cepas de baja patogenicidad, clásicas y variantes. La cepa vacunal D78 quedó perfectamente integrada en este grupo de baja patogenicidad, mostrando su identidad con las D78 caracterizadas por otros grupos, y también una estrecha relación con cepas vacunales del mismo origen de virus madre (Ej. VIBursa). La filogenia reveló que el virus de campo M07C posee una posición basal en el clado, presentando cierta divergencia respecto a las cepas clásicas tradicionales. Esta divergencia también había sido detectada en los análisis de identidad de secuencia, lo que mostraría que el virus uruguayo clásico de campo M07C se diferencia de aislamientos clásicos de referencia mundiales y podría representar una forma de baja patogenicidad un tanto distinta respecto a las tradicionales. Resultados similares obtenidos en el laboratorio mediante el análisis del gen VP2 sustentan esta hipótesis, sugiriendo que los virus uruguayos presentan un nivel de divergencia significativo que demanda estudios futuros más profundos.

El segundo clado representado en la filogenia está integrado exclusivamente por cepas de alta patogenicidad, hipervirulentas, de procedencia europea, africana y asiática. En este grupo se ubicó el virus de campo hipervirulento M102, mostrando cómo se observó mediante los análisis comparativos, que es muy similar a los aislamientos hipervirulentos circulantes en el mundo.

Es importante mencionar que el árbol filogenético de la figura 10 muestra una distribución muy similar a la obtenida por Hon *et al.* (2006), en cuyo trabajo se realizaron complejos estudios de filogenia y coalescencia para descifrar el origen filogenético del segmento B de IBDV. Esta organización filogenética muestra que el clado de las secuencias de vp1 hipervirulentas (vvVP1) se separa de las demás

secuencias del serotipo 1 y 2 de IBDV, indicando un origen independiente para vvVP1. Si bien el origen de vvVP1 es desconocido, su independencia filogenética observada con respecto a las restantes cepas de IBDV sugiere que debe haber sido reordenado desde un reservorio desconocido, posiblemente un ave silvestre que pueda ser portadora natural de IBDV. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Hon *et al.* (2006) brindando apoyo a la teoría de que un reordenamiento del segmento B desde un reservorio desconocido originó el surgimiento de las cepas vvIBDV. La existencia de IBDV atípicos que carecen de vvVP1 sustenta esta hipótesis, pudiendo ser estos aislados los “antiguos” IBDV que brindaron un segmento a las formas hipervirulentas actuales (Le Noüen *et al.*, 2006).

Estudio de las presiones selectivas

Se utilizaron todas las secuencias disponibles codificantes de VP1 para detectar el tipo de fuerza de selección que se encuentra actuando, aplicando el método estadístico dN/dS. Este método permite una interpretación directa a través del valor obtenido de la razón dN/dS, indicando el tipo de presión de selección (neutral, positiva o negativa) que actuaría en la región analizada.

En este estudio se obtuvo un valor global de dN/dS de 0,074, lo que indica que VP1 se encuentra evolucionando bajo selección negativa o purificadora. La acción de una selección purificadora elimina los cambios aminoacídicos que alteren la conformación y función de la proteína. El hecho de que la región genómica que codifica para VP1 se encuentre bajo selección purificadora refleja la importancia funcional de VP1 y su poca tolerancia a los cambios en su secuencia de aminoácidos. Este es un resultado lógico si consideramos que VP1 es proteína con múltiples funciones esenciales para el virus, entre las que se encuentran la replicación del genoma viral (Von Einem *et al.*, 2004), colaboración en la encapsidación y morfogénesis del virión (Maraver *et al.*, Feb. 2003), además de su participación aún no totalmente definida, en la modulación de la virulencia (Boot *et al.*, 2005).

Caracterización genética de las secuencias

El alineamiento y análisis comparativo de las 56 secuencias de vp1, se focalizó en la identificación de cambios claves entre las cepas de alta y baja patogenicidad, intentando asociarlos con la patogenicidad y como posibles determinantes del papel de VP1 en la virulencia de IBDV.

Al analizar las secuencias se observó un patrón conservado, mostrando cambios que diferencian principalmente las cepas hipervirulentas de las clásicas y variantes. Estos cambios fueron numerosos a nivel de secuencia nucleotídica, pero no todos se vieron reflejados en la secuencia proteica. La mayoría de las mutaciones fueron sinónimas, indicando una restricción en la variabilidad aminoacídica, verificándose por el índice dN/dS que VP1 se encuentra evolucionando bajo selección purificadora. Al analizar las secuencias aminoacídicas se observa un patrón conservado (Figura 9) en el que se identifican 15 cambios que permiten distinguir cepas de alta patogenicidad y de baja patogenicidad. De estos 15 cambios aminoacídicos, 12 fueron característicos de cepa y serotipo, permitiendo diferenciar cepas hipervirulentas del resto de las cepas del serotipo 1 y también de cepas del serotipo 2 (Tabla 11). Los virus caracterizados en este trabajo presentaron todos los marcadores de acuerdo a su clasificación, excepto la muestra clásica de campo M07C, que mostró un cambio único en la posición aminoacídica 145. En esta posición, definida previamente como marcador de patogenicidad (Hernández *et al.* 2006), las cepas hipervirulentas presentan una treonina, mientras que las cepas clásicas y variantes una asparagina. Aquí, M07C mostró un cambio no reportado antes, presentando una serina en dicho sitio. Estos tres aminoácidos son polares y comparten tanto la propiedad hidrofílica como el tamaño, no siendo cambios drásticos para la proteína. Como ya habíamos observado, la muestra clásica de campo M07C es un tanto diferente a las secuencias clásicas presentes en el mundo, sin embargo, excepto por uno, presenta todos los marcadores conservados y característicos de las cepas clásicas. Este resultado sustenta su clasificación dentro del grupo de cepas clásicas, a pesar de la divergencia que presentan.

En Hernández *et al.* (2006) se analizaron 178 aminoácidos de VP1 desde las posiciones 71 a la 248 de la proteína, identificándose 3 sitios característicos (146, 147 y 242) sugeridos como marcadores diagnósticos para IBDV. En el presente trabajo en el que se incluyó el gen completo de VP1, se identificaron 12 sitios (Tabla 11) entre los que se incluyen los descritos por Hernández *et al.* Dichos sitios muestran una alta conservación y demostraron ser característicos de cepa y serotipo permitiendo su rápida distinción, por lo que podrían ser considerados como posibles marcadores de virulencia para el virus. Creemos que este es un aporte muy relevante para un mayor conocimiento del modelo en estudio. La caracterización genética de IBDV, un virus emergente que demuestra una capacidad de variación y diversificación, requiere de la definición de marcadores genéticos sólidos de patogenicidad y virulencia, especialmente para el desarrollo de técnicas de diagnóstico en ambos segmentos genómicos.

PERSPECTIVAS

Para brindar un apoyo más sólido al procedimiento aquí desarrollado para la amplificación completa del gen vp1, sería necesario incrementar el número de muestras a analizar. Por otra parte, dado que a nivel regional no existen reportes de caracterización total del gen vp1, únicamente existen caracterizaciones parciales de unos pocos aislamientos de Brasil, sería interesante contar con mayor información y caracterizar aislamientos que han circulado en los últimos años en la región.

Es necesario continuar los estudios de los aislamientos clásicos que se encuentran circulando en Uruguay y ampliarlo a la región. De esta manera se podría aportar mayor información sobre la divergencia encontrada en estos virus, y evaluar el desarrollo de técnicas específicas de identificación para su control.

En este trabajo se observó la existencia de aminoácidos conservados en la proteína VP1 que permiten distinguir a las cepas hipervirulentas de las demás cepas del serotipo 1 (clásicas y variantes) y el 2. Por ser específicos de cepa y serotipo, estos aminoácidos son claros candidatos de marcadores moleculares asociados a virulencia. Estos deberán ser validados en futuros estudios intentando establecer la fidelidad de esta asociación. El presente trabajo representa un punto de inicio para un mayor entendimiento de la epidemiología del virus, habiendo revelado candidatos a marcadores de identificación de IBDV.

En este trabajo se propuso brindar un aporte al conocimiento del origen y la evolución de IBDV, analizando el segmento B casi en su totalidad por su aparente importancia en el surgimiento de las cepas de alta virulencia. Los datos aquí obtenidos concuerdan con las hipótesis más aceptadas mundialmente acerca de la causa de la expansión de las cepas hipervirulentas. Dar continuidad a la investigación, incluyendo nuevas técnicas y métodos de análisis de datos como estudios de coalescencia, puede proveer importantes pistas sobre el camino evolutivo de IBDV.

BIBLIOGRAFÍA

Banda, A., Villegas, P., El-Attrache, J., 2003. Molecular characterization of infectious bursal disease virus from commercial poultry in the United States and Latin America. *Avian Diseases* 47 (1), 87-95.

Bayliss, C.D., Spies, U., Shaw, K., Peters, R.W., Papageorgiou, A., Miiller, H., Bournnell, M.E.G., 1990. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *Journal of General Virology* 71, 1303-1312.

Birghan, C., Mundt, E., Gorbalenya, A.E., 2000. A non-canonical Lon proteinase lacking the ATPase domain employs the Ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *The EMBO Journal* 19 (1), 114-123.

Boot, H.J., ter Huurne, A.A.H.M., Hoekman, A.J.W., Peeters, B.P.H., Gielkens, A.L.J., 2000. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *Journal of Virology* 74 (15), 6701-6711.

Boot, H.J., Pritz-Verschuren, S.B.E., 2004. Modifications of the 3'-UTR stem-loop of infectious bursal disease virus are allowed without influencing replication or virulence. *Nucleic Acids Research* 32 (1), 211-222.

Boot, H.J., Hoekman, A.J.W., Gielkens, A.L.J., 2005. The enhanced virulence of very virulent infectious bursal disease virus is partly determined by its B-segment. *Archives of Virology* 150, 137-144.

Böttcher, B., Kiselev, N.A., Stel'mashchuk, V.Y., Perevozchikova, N.A., Borisov, A.V., Crowther, R.A., 1997. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *Journal of Virology* 71 (1), 325-330.

Brandt, M., Yao, K., Liu, M., Heckert, R.A., Vakharia, V.N., 2001. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology* 75 (24), 11974-11982.

Brown, M.D., Green, P., Skinner, M.A., 1994. VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. *Journal of General Virology* 75, 675-680.

Caston, J.R., Martínez-Torrecuadrada, J.L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J.F., Casal, J.I., Carrascosa, J.L., 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the t number for capsid assembly. *Journal of Virology* 75 (22), 10815-10828.

Chettle, N., Stuart, J.C., Wyeth, P.J., 1989. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *The Veterinary Record* 125 (10), 271-272.

Chevalier, C., Lepault, J., Da Costa, B., Delmas, B. 2004. The last c-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology* 78 (7), 3296-3303.

Cosgrove, A.S., 1962. An apparently new disease of chickens-avian nephrosis. *Avian Diseases* 6, 385-389.

Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J-C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H., Delmas, B., 2002. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *Journal of Virology* 76 (5), 2393-2402.

Di Fabio, J., Rossini, L.I., Eterradossi, N., Toquin, M.D., Gardin, Y., 1999. European-like pathogenic infectious bursal disease viruses in Brazil. *The Veterinary Record* 145 (7), 203-204.

Dobos, P., 1979. Peptide map comparison of the proteins of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology* 32 (3), 1046-1050.

Garriga, D., Querol-Audí, J., Abaitua, F., Saugar, I., Pous, J., Navarro, A., Verdaguier, N., Castón, J.R., Rodríguez, J.F., 2006. The 2.6-angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. *Journal of Virology* 80 (14), 6895-6905.

Garriga, D., Navarro, A., Querol-Audí, J., Abaitua, F., Rodríguez, J.F., Verdaguier, N., 2007. Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. *PNAS* 104 (51), 20540-20545.

Hernández, M., Banda, A., Hernández, D., Panzera, F., Pérez, R., 2006. Detection of very virulent strains of infectious bursal disease virus (vvIBDV) in commercial broilers from Uruguay. *Avian Diseases* 50, 624-631.

Hernández, M., Tomás, G., Hernández, D., Villegas, P., Banda, A., Maya, L., Panzera, Y., Pérez, R., 2011. Novel multiplex RT-PCR/RFLP diagnostic test to differentiate low- from high- pathogenic strains and to detect reassortant infectious bursal disease virus. *Avian Diseases* 55 (3), 368-374.

Hirai, K. & Calnek, B.W., 1979. In vitro replication of infectious bursal disease virus in established lymphoid cell lines and chicken B lymphocytes. *Infection and Immunity* 25 (3), 964-970.

Hitchner, S.B., 1970. Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs. *Poultry Science* 49 (2), 511-516.

Hon, Ch-C., Lam, T.Y., Drummond, A., Rambaut, A., Lee, Y-F., Yip, Ch-W., Zeng, F., Lam, P-Y., Ng, P.T.W., Leung, F.C.C., 2006. Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent infectious bursal disease virus and reassortment of its genome segment B. *Journal of Virology* 80 (17), 8503-8509.

Islam, M.R., Zierenberg, K., Müller, H., 2001. The genome segment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains. *Archives of Virology* 146 (12), 2481-2492.

Jackwood, D.J., Henderson, K.S. Jackwood, R.J., 1996. Enzyme-linked immunosorbent assay-based detection of antibodies to antigenic subtypes of infectious bursal disease viruses of chickens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 3 (4), 456–463.

Jackwood, D.J. & Sommer, S.E., 2005. Molecular studies on suspect very virulent infectious bursal disease virus genomic RNA samples. *Avian Diseases* 49, 246-251.

Jagdish, M.N., Staton, V.J., Hudson, P.J., Azad, A.A., 1988. Birnavirus precursor polyprotein is processed in escherichia coli by its own virus-encoded polypeptide. *Journal of Virology* 62 (3), 1084-1087.

Käufer, I. & Weiss, E., 1980. Significance of bursa of fabricius as target organ in Infectious bursal disease of chickens. *Infection and Immunity* 27 (2), 364-367.

Kibenge, F.S.B., Dhillon, A.S., Russell, R.G., 1988. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *Journal General Virology* 69, 1757-1775.

Kibenge, F.S.B., Jackwood, D.J., Mercado, C.C., 1990. Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. *Journal of General Virology* 71, 569-577.

Kim, I-J., You, S.K., Kim, H., Yeh, H-Y., Sharma, J.M., 2000. Characteristics of bursal T lymphocytes induced by infectious bursal disease virus. *Journal of Virology* 74 (19), 8884-8892.

Kong, L.L, Omar, A.R., Hair-Bejo, M., Aini, I., Seow, H.F., 2004. Sequence analysis of both genome segments of two very virulent Infectious bursal disease virus field isolates with distinct pathogenicity. *Archives of Virology* 149, 425–434.

Lasher, H.N. & Davis, V.S., 1997. History of infectious bursal disease in the U.S.A. – the first two decades. *Avian Diseases* 41, 11-19.

Le Nouën, C., Rivallan, G., Toquin, D., Eterradossi, N., 2005. Significance of the genetic relationships deduced from partial nucleotide sequencing of infectious bursal disease virus genome segments A or B. *Archives of Virology* 150, 313–325.

Le Nouën, C., Rivallan, G., Toquin, D., Darlu, P., Morin, Y., Beven, V., De Boisseson, C., Cazaban, C., Comte, S., Gardin, Y., Eterradossi, N., 2006. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B reassorted isolate. *Journal of General Virology* 87, 209–216.

Lee, L.H., Ting, L.J., Shien, J.H., Shieh, H.K., 1994. Single-tube, noninterrupted reverse transcription-PCR for detection of infectious bursal disease virus. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (5), 1268-1272.

Lejal, N., Da Costa, B., Huet, J-C., Delmas, B., 2000. Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *Journal of General Virology* 81, 983-992.

Letzel, T., Coulibaly, F., Rey, F.A., Delmas, B., Jagt, E., van Loon, A.A.M.W., Mundt, E., Dic. 2007. Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology* 81 (23), 12827-12835.

Letzel, T., Mundt, E., Gorbalenya, A.E., 2007. Evidence for functional significance of the permuted C motif in Co²⁺-stimulated RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus. *Journal of General Virology* 88, 2824-2833.

Li, L., Huang, Y-W., Wang, L-S, Wan, W-J., Yu, L., 2005. Synthesis of reassortant infectious bursal disease virus in chickens injected directly with infectious clones from different virus strains. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 37 (3), 192–198.

Lin, T.L., Wu, C.C., Rosenberg, J.K., Saif, Y.M., 1994. Rapid differentiation of infectious bursal disease virus serotypes by polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation* 6, 100-102.

Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J.R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J.L., Rodríguez, J.F., 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73 (8), 6973-6983.

Luque, D., Rivas, G., Alfonso, C., Carrascosa, J.L., Rodríguez, J.F., Castón, J.R., 2009. Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyploid dsRNA virus. *PNAS* 106 (7), 2148-2152.

Maraver, A., Clemente, R., Rodríguez, J.F., Lombardo, E., Feb. 2003. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. *Journal of Virology* 77 (4), 2459–2468.

Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Ruiz-Díaz, J.A., Castón, J.R., Pazos, F., Rodríguez J.F., Jun. 2003. The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *Journal of Virology* 77 (11), 6438–6449.

McFerran, J.B., McNulty, M.S., McKillop, E.R., Connor, T.J., McCracken, R.M., Collins, D.S., Allan, G.M., 1980. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. *Avian Pathology* 9 (3), 395-404.

Mittal, D., Jindal, N., Gupta, S.L., Kataria, R.S., Tiwari, A.K., 2005. Detection of infectious bursal disease virus in field outbreaks in broiler chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *International Journal of Poultry Science* 4 (4), 239-243.

Müller, H., Scholtissek, C., Becht, H., 1979. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *Journal of Virology* 31 (3), 584-589.

Mundt, E., Beyer, J., Müller, H., 1995. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *Journal of General Virology* 76, 437-443.

Mundt, E. & Vakharia, V.N., 1996. Synthetic transcripts of double-stranded birnavirus genome are infectious. *PNAS* 93, 11131-11136.

Mundt, E., Köllner, B., Kretzschmar, D., 1997. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *Journal of Virology* 71 (7), 5647-5651.

Pan, J., Vakharia, V.N., Tao, Y.J., 2007. The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *PNAS* 104 (18), 7385-7390.

Pan, J., Lin, L., Tao, Y.J., 2009. Self-guanylation of birnavirus VP1 does not require an intact polymerase activity site. *Virology* 395 (1), 87-96.

Petit, S., Lejal, N., Huet, J-C., Delmas, B., 2000. Active residues and viral substrate cleavage sites of the protease of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Virology* 74 (5), 2057-2066.

Pous, J., Chevalier, C., Ouldali, M., Navaza, J., Delmas, B., Lepault, J., 2005. Structure of birnavirus-like particles determined by combined electron cryomicroscopy and X-ray crystallography. *Journal of General Virology* 86, 2339-2346.

Rauf, A., Khatri, M., Murgia, M.V., Jung, K., Saif, Y.M., 2011. Differential modulation of cytokine, chemokine and Toll like receptor expression in chickens infected with classical and variant Infectious Bursal Disease Virus. *Veterinary Research* 42, 85.

Remorini, P., Gallo Calderón, M., Aguirre, S., Periolo, O., La Torre, J., Mattion, N., 2006. Characterization of infectious bursal disease viruses from Argentina. *Avian Diseases* 50, 245-251.

Saif, Y.M., 1998. Infectious bursal disease and hemorrhagic enteritis. *Poultry Science* 77, 1186-1189.

Schnitzler, D., Bernstein, F., Miiller, H., Becht, H., 1993. The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *Journal of General Virology* 74, 1563-1571.

Schröder, A., van Loon, A.A.W.M., Goovaerts, D., Teifke, J.P., Mundt, E., 2001. VP5 and the N terminus of VP2 are not responsible for the different pathotype of serotype I and II infectious bursal disease virus. *Journal of General Virology* 82, 159-169.

Spies, U., Müller, H., Becht, H., 1987. Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Research* 8 (2), 127-140.

Spies, U., Müller, H., Becht, H., 1989. Nucleotide sequence of infectious bursal disease virus genome segment A delineates two major open reading frames. *Nucleic Acids Research* 17 (19), 7982.

Spies, U. & Müller, H., 1990. Demonstration of enzyme activities required for cap structure formation in infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group. *Journal of General Virology* 71, 977-981.

Stoute, S.T., Jackwood, D.J., Sommer-Wagner, S.E., Cooper, G.L., Anderson, M.L., Woolcock, P.R., Bickford, A.A., Senties-Cué, C.G., Charlton, B.R., 2009. The diagnosis of very virulent infectious bursal disease in California pullets. *Avian Diseases* 53 (2), 321-326.

Tacken, M.G.J., Rottier, P.J.M., Gielkens, A.L.J., Peeters, B.P.H., 2000. Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. *Journal of General Virology* 81, 209-218.

Tacken, M.G.J., Peeters, B.P.H., Thomas, A.A.M., Rottier, P.J.M., Boot, H.J., 2002. Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *Journal of Virology* 76 (22), 11301-11311.

Tacken, M.G.J., Thomas, A.A.M., Peeters, B.P.H., Rottier, P.J.M., Boot, H.J., 2004. VP1, the RNA-dependent RNA polymerase and genome-linked protein of infectious bursal disease virus, interacts with the carboxy-terminal domain of translational eukaryotic initiation factor 4AII. *Archives of Virology* 149 (11), 2245-2260.

Von Einem, U.I., Gorbalenya, A.E., Schirrmeier, H., Behrens, S-E., Letzel, T., Mundt, E., 2004. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of General Virology* 85, 2221-2229.

Yamaguchi, T., Ogawa, M., Miyoshi, M., Inoshima, Y., Fukushi, H., Hirai, K., 1997. Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus. *Archives of Virology* 142, 1441-1458.

Yao, K. & Vakharia, V.N., 2001. Induction of apoptosis in vitro by the 17-kDa nonstructural protein of infectious bursal disease virus: possible role in viral pathogenesis. *Virology* 285, 50-58.

ANEXO: PROTOCOLOS

Extracción de ARN viral de bursa

- Tomar pliegues internos de la bursa y cortarlos, no superando los 100 mg.
- Colocar en un eppendorf y agregar 100µL de SDS al 5% y cortar con tijera hasta lograr una buena disociación del tejido.
- Agregar 4µL de Proteinasa K e incubar a 60°C durante 20 minutos.
- Centrifugar durante 2 minutos a 10000g.
- Agregar 1mL de TRIzol, mezclar utilizando vortex.
- Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 200µL de cloroformo, mezclar utilizando vortex.
- Incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 15 minutos a 12000g.
- Extraer el sobrenadante que contiene el ARN y colocarlo en un nuevo eppendorf.
- Agregar 500µL de Isopropanol frío.
- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 10 minutos a 12000g.
- Reconocer el pellet de ARN. Descartar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet en 1mL de Etanol al 75% frío. Mezclar utilizando vortex.
- Centrifugar durante 5 minutos a 7500g.
- Descartar el sobrenadante.
- Eliminar los restos de etanol del pellet, incubando el eppendorf abierto en estufa a 55°C, tener cuidado de no secar el pellet.
- Disolver el ARN en 50µL de agua ultra pura y guardarlo a -80°C.

Extracción de ARN viral de vacuna

Realizado con el kit "High Pure RNA isolation kit" (Roche).

- Mezclar 400µL de la solución tampón S1("Binding buffer" con "carrier" Poli A) y 200µL de muestra, en un eppendorf de 1,5mL.
- Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Ubicar una columna en un tubo colector.
- Transferir la mezcla solución tampón S1-muestra a la columna.
- Centrifugar durante 15 segundos a 8000g.
- Descartar el sobrenadante.

- Adicionar a la columna 500mL de la solución tampón 3a (“Inhibitor Removal Buffer”).
- Centrifugar durante 1 minuto a 8000g.
- Descartar el sobrenadante.
- Adicionar a la columna 450mL de la solución tampón 3 (“Wash Buffer”).
- Centrifugar durante 1 minuto a 8000g.
- Descartar el sobrenadante.
- Centrifugar durante 10 segundos a 13000g.
- Transferir la columna a un eppendorf de 1,5mL.
- Adicionar a la columna 50mL de la solución tampon 4.
- Centrifugar durante 1 minuto a 8000g.
- Almacenar a -80°C.

Retrotranscripción

Realizado con el kit “RevertAid First Strand cDNA Synthesis” (Fermentas).

- Agregar 10µL de extracción de ARN en un tubo de 0,2mL.
- Agregar 1µL de cebador forward.
- Agregar 1µL de cebador reverse.
- Mezclar y dar un spin.
- Incubar la mezcla durante 5 minutos a 98°C para su desnaturalización.
- Pasar inmediatamente a hielo y mantenerlo allí.
- Agregar 4µL de Buffer de reacción 5X.
- Agregar 1µL de Ribolock (inhibidor de ARNasa)
- Agregar 2µL de dNTPs 10mM.
- Mezclar y dar un spin.
- Incubar 5 minutos a 37°C.
- Agregar 1µL de Retrotranscriptasa RevertAid.
- Incubar durante 60 minutos a 42°C.
- Incubar durante 10 minutos a 70°C.
- Almacenar a -20°C.

Purificación de ADN a partir de gel de agarosa

Realizado con el kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit” (General Electric)

- Escindir con bisturí limpio el fragmento del gel que contiene el amplicón que desea purificar.

- Colocar en un tubo de 1,5mL y determinar su peso.
- Adicionar 10 μ L de "Capture Buffer type 3" por cada 10mg de gel y mezclar por inversión.
- Incubar durante 15-30 minutos a 60°C.
- Centrifugar el mix (solución tampón-muestra) durante 10 segundos a máxima velocidad.
- Colocar una columna en un tubo colector.
- Añadir la muestra a la columna e incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 30 segundos a 16000g.
- Descartar el sobrenadante.
- Adicionar 500 μ L de "Buffer type 1" a la columna.
- Centrifugar durante 10 segundos a máxima velocidad.
- Descartar el tubo colector y transferir la columna a un tubo de 1,5 mL.
- Adicionar de 10 a 50 μ L de "Elution Buffer type 6" (H₂O libre de ARNasas).
- Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 1 minuto a 16000g.
- Almacenar a -20°C

Clonación

Realizada con el kit "GeneJet PCR Product Cloning kit" (Fermentas).

- Reacción de blunting:
 - Colocar 10 μ L de buffer 2X en un eppendorf
 - Agregar hasta 7 μ L de producto de PCR purificado (la relación inserto: vector recomendada es 3:1)
 - Adicionar 1 μ L de enzima DNA Blunting.
 - Agregar agua destilada miliQ hasta completar un volumen final de 18 μ L.
 - Vortexear y dar un spin.
 - Incubar durante 5 minutos a 70°C.
 - Enfriar en hielo por varios segundos.

- Reacción de ligación de los productos de PCR al vector PJET1/blunt:
 - Agregar 1 μ L de vector PJET1/blunt (50 ng/ μ L).
 - Agregar 1 μ L de DNA ligasa T4 (50 U/ μ L).
 - Vortexear y dar un spin.
 - Incubar durante 5 minutos a 22°C.

- Transformación de células XL1 Blue competentes:
 - Tomar 50µL de células XL1Blue competentes e inocular 5 µL de ligación.
 - Incubar en hielo por 15 minutos.
 - Incubar en baño a 42°C por 45 segundos.
 - Transferir rápidamente a hielo por 2 minutos.
 - En un tubo falcon agregar 300µL de medio SOC.
 - Incubar en agitador a 200rpm por 1-1,5 horas a 37°C.
 - Plaquear 100µL por placa de LB agar-ampicilina.
 - Incubar la placa a 37°C toda la noche.

Extracción de ADN plasmídico

Realizado mediante el método de fenol-cloroformo.

- Realizar un cultivo en 3mL de medio líquido LB-ampicilina de la colonia deseada.
- Incubar el mismo a 37°C en agitador ON.
- Transferir 1,5mL del cultivo a un tubo de 1,5mL. Centrifugar a 1500 rpm. Descartar el sobrenadante y repetir este paso con el volumen restante.
- Resuspender el pellet en 300µL de solución I (50 mM TRIS.HCl; 10mM EDTA).
- Agregar 300µL de solución II (200mM de NaOH; 1% SDS). Mezclar por inversión hasta que el contenido se torne transparente
- Añadir 300µL de solución III fría (3M AcNa pH=5,5). Mezclar por inversión e incubar en hielo durante 15 minutos.
- Centrifugar a 1500 rpm durante 15 minutos. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5mL.
- Añadir 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).
- Mezclar con vortex y centrifugar a 1500 rpm.
- Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo.
- Añadir 1 volumen de cloroformo. Centrifugar a 1500 rpm durante 15 minutos.
- Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo.
- Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C).
- Añadir 0,1 volúmenes de AcNa 3M y mezclar con vortex.
- Incubar a -20°C ON.
- Centrifugar a 1500 rpm durante 15 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.

- Agregar 900 μ L de Etanol 70% frío (4°C).
- Centrifugar a 1500rpm durante 15 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.
- Incubar a 37°C hasta que el pellet se halla secado.
- Resuspender el pellet en 30 μ L de agua destilada miliQ.
- Adicionar 1 μ L de RNAsa 10 μ g/mL.
- Almacenar a -20°C.

Agradecimientos

A mi tutor el Dr. Ruben Pérez, por haberme dado la oportunidad de ingresar al laboratorio y por los conocimientos brindados.

A mi co-tutor el Lic. Martin Hernández, por su confianza, su disposición y las enseñanzas brindadas.

Al Lic. Gonzalo Tomás, por su paciencia y disposición para enseñarme a trabajar en el laboratorio.

A todos los compañeros del laboratorio, y a los integrantes de la Sección Genética Evolutiva, por su compañía y sus contribuciones.

A mis amigos, por su apoyo incondicional y su compañía durante este proceso.

A mi abuela y a mis familiares más cercanos, por su apoyo y su confianza.

A mis padres por brindarme su apoyo, contención y confianza, a quienes con mucho cariño les dedico este trabajo.