



Tesis de Maestría

PEDECIBA - Área: Biología - Sub-área: Genética

**Diagnóstico, caracterización genética y
análisis evolutivo de las cepas del virus
de la Anemia Infecciosa Aviar presentes
en la industria avícola uruguaya**

Lic. Claudia Techera

Orientador de Tesis: Dr Ruben Pérez

Co-orientador de Tesis: Dra Ana Marandino

Laboratorio de ejecución: Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología,
Departamento de biología animal, Facultad de Ciencias.

Montevideo-Uruguay

Noviembre de 2018

Índice

Abreviaturas	III
Resumen	VI
1. Introducción	1
1.1. Relevancia de CAV para el sector productivo.....	1
1.2. Clasificación taxonómica.....	2
1.3. Características del virus.....	2
1.4. Variabilidad de CAV.....	7
1.5. Anemia Infecciosa Aviar	8
1.6. CAV en Uruguay, la región y el mundo.....	11
2. Hipótesis de trabajo.....	13
3. Objetivos.....	13
4. Materiales y métodos.....	14
4.1. Muestras.....	14
4.2. Extracción del genoma viral.....	14
4.3. Estandarización del ensayo de PCR en tiempo real.....	14
4.4. Ensayo de cuantificación absoluta.....	17
4.5. Diagnóstico de muestras de campo por PCR en tiempo real.....	21
4.6. Obtención de la secuencia parcial y completa del gen <i>vp1</i>	21
4.7. Obtención de la secuencia del genoma completo codificante.....	22
4.8. Visualización de los productos de PCR.....	23
4.9. Purificación de los amplicones y secuenciación.....	23
4.10. Análisis bioinformáticos.....	23

5. Resultados	27
5.1. Estandarización del ensayo de PCR en tiempo real	27
5.2. Ensayo de cuantificación absoluta.....	28
5.3. Aplicación del ensayo de PCR en tiempo real en muestras de campo.....	30
5.4. Caracterización genética de las cepas de CAV uruguayas utilizando el gen <i>vp1</i>	31
5.5. Caracterización genómica de las cepas de CAV uruguayas basadas en la secuencia de genomas completos codificantes.....	40
5.6. Análisis de coalescencia.....	48
6. Discusión.....	51
6.1. Ensayo de diagnóstico y cuantificación de CAV basado en PCR en tiempo real.....	51
6.2. Origen y divergencia genética de CAV.....	53
6.3. Mecanismos de variabilidad genética de CAV.....	54
6.4. Divergencia filogenética de CAV.....	56
6.5. Las cepas uruguayas en el contexto de la diferenciación global de CAV.....	57
6.6. Diferencia de cepas de campo uruguayas (clado II) con vacunas comerciales.....	58
6.7. Impacto del trabajo en la genética de virus aviares en Uruguay y la región.....	60
7. Conclusiones.....	62
8. Perspectivas.....	62
9. Bibliografía.....	64
10. Anexos.....	70

Abreviaturas

ADN: Acido desoxirribonucleico

Ala: aminoácido Alanina

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

Asn: aminoácido Asparagina

CAV: virus de la Anemia Infecciosa Aviar

Cf: concentración final

CPA: Complejo Promotor de la Anafase

Ct: ciclo umbral

CV: coeficiente de variación

EEUU: Estados Unidos

E: Eficiencia

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

g: gramos

G2: Fase G2 del ciclo celular

HEX: 5'-hexachloro-fluoresceina fosforamidita

HPD: intervalo de confianza

IBDV: virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio

IBV: virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar

kb: kilobase

kDa: kiloDalton

LOQ: límite de cuantificación

LT: Largo del amplicón

M: Fase mitótica del ciclo celular

MCMC: cadenas de Markov Monte Carlo

MDV: virus de la Enfermedad de Marek

MEGA: Molecular Evolutionary Genetic Analysis

min: minutos

NA: Número de Avogadro

NDV: virus de la Enfermedad de Newcastle

ng: nanogramos

°C: grados Celsius

ORF: marco abierto de lectura

PAST: Paleontological Statistics

pb: pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

R2: Coeficiente de determinación RCR: Replicación del círculo rodante

s: segundos

SEN: Señal de exportación nuclear

SLN: señal de localización nuclear

SNV: seroneutralización viral

SPF: Libre de patógenos específicos

tMRCA: edad del ancestro común más reciente

Tyr: aminoácido Tirosina

µg: microgramo

μL : microlitros

μM : microMolar

UV: ultra violeta

Val: aminoácido Valina

V_0 : Volumen inicial

vp1: gen que codifica para la proteína VP1

VP1: Proteína estructural de la cápside

Vp2: gen que codifica para la proteína VP2

VP2: Proteína de andamio

Vp3: gen que codifica para la proteína VP3

VP3: Apoptina

Resumen

El virus de la Anemia Infecciosa Aviar (CAV, del inglés Chicken Anemia Virus) provoca problemas sanitarios e importantes pérdidas económicas en la industria avícola mundial. CAV genera una enfermedad inmunosupresora (anemia infecciosa) que disminuye los parámetros productivos a través del aumento de la incidencia de otras patologías y la disminución de la tasa de conversión de las aves. La infección de CAV produce una sintomatología que puede variar desde una leve inmunodepresión subclínica hasta una grave inmunosupresión. Para controlar adecuadamente esta enfermedad se necesita un conocimiento genético detallado de las cepas y variantes locales que permita desarrollar métodos de diagnóstico específicos y diseñar planes de vacunación efectivos para mantener la sanidad aviar. CAV (*Anelloviridae*) es un virus pequeño y desnudo, con genoma de ADN simple hebra circular de polaridad negativa (2,3 Kb) que codifica para tres genes parcialmente solapados, *vp1*, *vp2* y *vp3*. Las cepas circulantes se clasifican en un único serotipo o variante antigénica y en variantes genéticas o genotipos en base a la región variable de *vp1*. El objetivo de esta tesis fue diagnosticar y caracterizar genéticamente cepas de campo de CAV que circulan en la industria avícola uruguaya y analizarlas en un contexto evolutivo general del virus. Durante la investigación se diseñó, estandarizó y validó una metodología de diagnóstico molecular de CAV basada en PCR en tiempo real. A partir de esta metodología se estandarizó un ensayo de cuantificación absoluta de la carga viral que mostró un excelente desempeño analítico. Para la caracterización genética se secuenció y comparó la región parcial y completa de *vp1* de 25 cepas uruguayas de CAV; la caracterización genómica se realizó mediante la secuenciación del genoma completo codificante de 10 cepas. Estas secuencias fueron utilizadas en análisis filodinámicos globales para contribuir al entendimiento del origen, dispersión y evolución del virus en la región y el mundo. En todos los análisis filogenéticos se aprecia la formación de cuatro clados, dos de los cuales circulan en Uruguay (clados II y III). El clado II agrupa cepas que circulan en diferentes partes del mundo, mientras que el clado III está constituido por cepas vacunales introducidas en la década del 90, cepas de campo y cepas que se podrían haber originado por “asilvestración” de vacunas. Los análisis de coalescencia sugieren que CAV emergió

alrededor de 1923 previo al desarrollo de la avicultura industrial, y que los clados II y III se originaron hace aproximadamente 50 años. El surgimiento de estos dos clados se da en el período de mayor crecimiento de la avicultura mundial (1950-1970). Los análisis de coalescencia indicaron también que CAV presenta altas tasas de sustitución del orden de 10^{-4} sustituciones/sitio/año. Utilizando aproximaciones bioinformáticas se confirmaron 4 eventos de recombinación a nivel inter-clado en las cepas chinas SD22 y SD24, y las cepas taiwanesas 4 y 6. Ninguna cepa uruguaya presentó evidencia de recombinación entre ellas o con cepas de la región (argentinas y brasileras). Las cepas uruguayas del clado II son muy divergentes filogenéticamente con la cepa vacunal utilizada actualmente a nivel nacional para prevenir la enfermedad. Esta divergencia involucra cambios a nivel nucleotídico y aminoacídico en los genes *vp1*, *vp2* y *vp3*. Además, de establecer la amplia circulación en CAV en aves de producción, este trabajo profundizó además en aspectos evolutivos claves del virus, contribuyendo al entendimiento de los mecanismos responsables de generar la variabilidad observada en las cepas de campo. La información obtenida será útil para proyectar posibles escenarios epidemiológicos de esta enfermedad y diseñar planes de control que se ajusten a estos comportamientos.

1. Introducción

1.1 Relevancia de CAV para el sector productivo

Desde los años 60 la producción mundial de carnes se ha acelerado de forma notable, en particular para las especies de ciclo productivo corto como cerdos y aves. De acuerdo a proyecciones publicadas recientemente, la carne de ave se convertirá en el tipo de carne más consumida en el mundo (OECD/FAO, 2016). Países sudamericanos como Brasil y Argentina se encuentran entre los mayores productores de carne aviar a nivel mundial. En el 2017, Brasil encabezó la lista de mayor exportador del mundo con 4.3 millones de toneladas, superando a Estados Unidos y la Unión Europea (USDA, 2017). En Argentina, en el período 2001-2015 la producción de carne aviar creció un 111% (FADA, 2015). En los últimos años, Uruguay experimentó un incremento en la producción avícola similar al observado en los países de la región. En el quinquenio 2010-2015 la producción de carne de pollo y huevos cerraron con un crecimiento de 38,5% y 31,2%, respectivamente (DIEA, 2016). La posibilidad de crecimiento de esta cadena productiva, a través de la reactivación de las exportaciones y el incremento del consumo interno, indican que la avicultura uruguaya se encuentra en un importante momento de desarrollo, y que debemos estar preparado para las oportunidades que se presenten. Sin embargo, estamos muy por debajo del esfuerzo e inversión que realizan los países del primer mundo en el aspecto sanitario, el cual es considerado el factor de mayor impacto en la avicultura mundial ya que incide sobre los parámetros zootécnicos y puede convertirse en un fundamento de restricciones comerciales en el mercado internacional. Contrariamente a lo que se suele pensar, los problemas sanitarios mediáticos como el de Influenza Aviar no necesariamente ocasionan las mayores pérdidas productivas en la industria avícola. Los grandes compromisos económicos están relacionados a dolencias que no son tan explosivas pero ocurren persistentemente en la mayoría de los lugares del mundo en donde se practica la cría intensiva de aves. Las infecciones inmunosupresoras, como la producida por CAV, tienen efectos muy negativos en la cadena productiva avícola. Una infección por CAV puede disminuir la inmunidad vacunal para otros patógenos aviares y puede aumentar la susceptibilidad de las aves a diversos patógenos virales y bacterianos (Schat et al., 2009). Lo anteriormente expuesto sustenta la relevancia epidemiológica de CAV, siendo su estudio un instrumento importante para diseñar estrategias de control.

1.2. Clasificación taxonómica

CAV es el único miembro del género *Gyrovirus* de la familia *Anelloviridae*. Los virus de esta familia se agrupan en 12 géneros e infectan vertebrados (Rosario et al., 2017). Son virus pequeños, sin envoltura, y con un genoma ADN simple hebra circular de polaridad negativa (Figura 1).

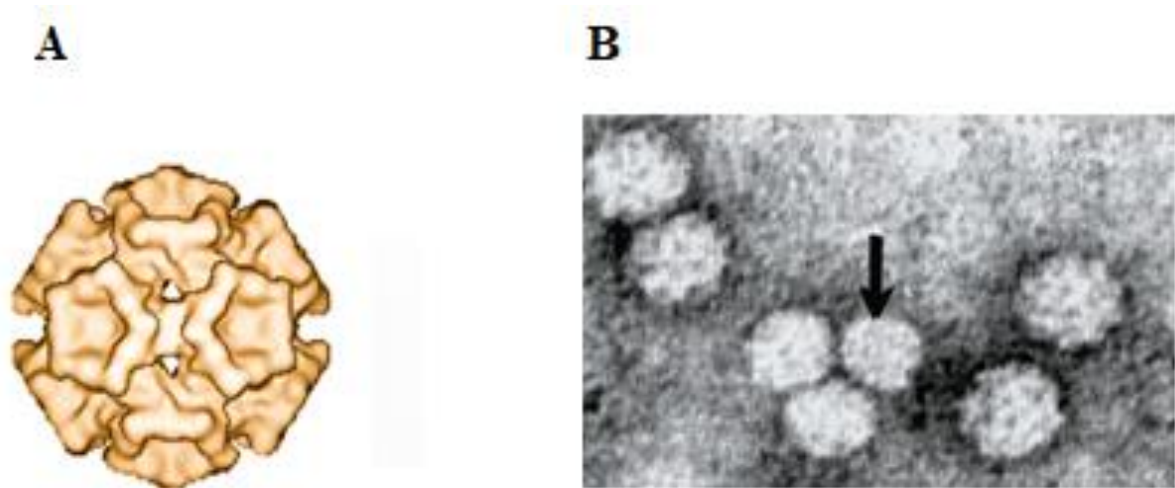


Figura 1. A. Imagen de microscopia crioelectrónica de una partícula de CAV. Tomada de Crowther (2003). B. Microscopia electrónica de contraste negativo de partículas de un aislado de CAV. Tomada de Virus Taxonomy (King et al., 2011).

1.3. Características del virus

1.3.1. Genoma y proteínas de CAV

CAV posee un genoma de ADN simple hebra circular de polaridad negativa de 2,3 kilobases (Kb) de longitud, y contiene tres genes parcialmente solapados: *vp1*, *vp2* y *vp3*. Existe una región no transcripta del genoma donde se localiza el promotor/potenciador que regula la replicación y transcripción del virus (Figura 2). El genoma de CAV transcribe un solo ARNm policistrónico (2,1 kb) que codifica para las 3 proteínas virales requeridas para la infección de células en división (Schat et al., 2009).

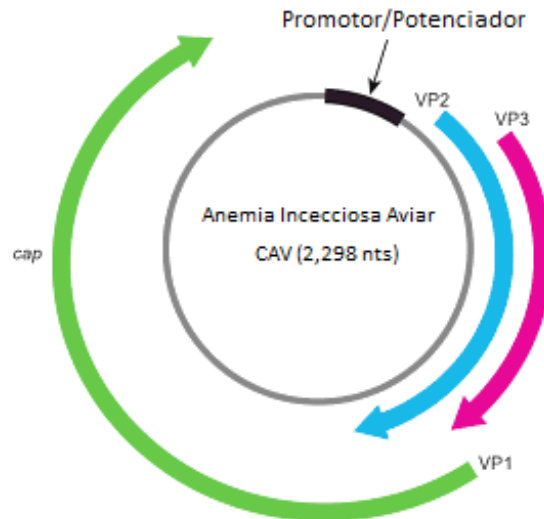


Figura 2. Representación esquemática del genoma de CAV. Está formado por tres ORF parcialmente solapados. ORF 1: codifica la proteína estructural de cápside VP1 (cap); ORF 2: codifica la proteína no estructural VP2; ORF 3: codifica la proteína Apoptina VP3. Tomada y modificada de Virus Taxonomy (King et al., 2011).

VP1 es una proteína estructural de 449 aminoácidos que forma la cápside viral. La presencia de esta proteína en células infectadas por CAV se detecta a las 30 horas post infección (Douglas et al., 1995). VP1 presenta la mayor variabilidad genética, ya que contiene los epítopes neutralizantes (Todd et al., 1990a). Estos epítopes mapean principalmente en la región hipervariable de la proteína que se extiende desde la posición 139 hasta la 151. La región hipervariable se encuentra en un dominio hidrofílico cuya estructura secundaria es una alfa hélice (Renshaw et al., 1996). El extremo N-terminal de VP1 está cargado positivamente por su riqueza en arginina, y es probable que actúe como un dominio de unión al ADN para empaquetar el genoma viral en la cápside (Lee et al., 2009). El extremo C-terminal contiene un motivo conservado (RCR) que participaría en la regulación de la replicación.

VP2 es una proteína de 216 aminoácidos con actividad fosfatasa de especificidad dual. La mutación en residuos catalíticos claves (por ej. cisteína en las posiciones 95 y 97) reduce la eficiencia de replicación del virus, lo que indica que se requiere la actividad de la fosfatasa de VP2 para la replicación viral (Peters et al., 2002). VP2 también actúa como una proteína de andamio que altera la conformación de VP1, ya que la formación de anticuerpos neutralizantes para CAV requiere la expresión de VP1 y VP2 en la misma

célula (Koch et al., 1995; Noteborn et al., 1998a; Noteborn et al., 1998b). VP2 induce la apoptosis celular (Kaffashi et al., 2015).



Figura 3. Representación esquemática de las señales de localización de la Apoptina y los dominios de interacción con proteínas. Tomada y modificada de Heilman et al. (2006). SEN: señal de exportación nuclear. SLN: señal de localización nuclear. CPA1: complejo promotor de la anafase.

VP3 o Apoptina es una proteína no estructural de 121 aminoácidos que induce apoptosis en las células infectadas. Próximo al extremo N-terminal tiene una señal de exportación nuclear (SEN), y en el extremo C-terminal una señal de localización nuclear (SLN). También presenta un dominio de multimerización que se superpone a la señal SEN, y un dominio de unión a la subunidad CPA1 del Complejo Promotor de la Anafase (CPA/C) que se solapa con la señal SLN en el extremo C-terminal de la proteína (Heilman et al., 2006; Noteborn et al., 1994) (Figura 3).

CAV tiene tropismo para las células del linaje hematopoyético. Estas células tienen rápida proliferación y experimentan las principales respuestas de estrés asociadas a la replicación viral. Estas respuestas son el resultado de la generación de estructuras de replicación de ADN aberrantes y la exposición del genoma viral monocatenario. La Apoptina es un sensor de señalización del daño del ADN a través de la ruta ATM-Chk2, y migra al núcleo durante la replicación viral (Kucharski et al., 2016). Una vez en el núcleo la Apoptina induciría apoptosis en las células infectadas porque se asocia a la subunidad CPA1 del CPA. El secuestro del CPA1 por la Apoptina detiene el ciclo celular en la fase G2/M, lo que desencadena la apoptosis (Heilman et al., 2006) (Figura 4).

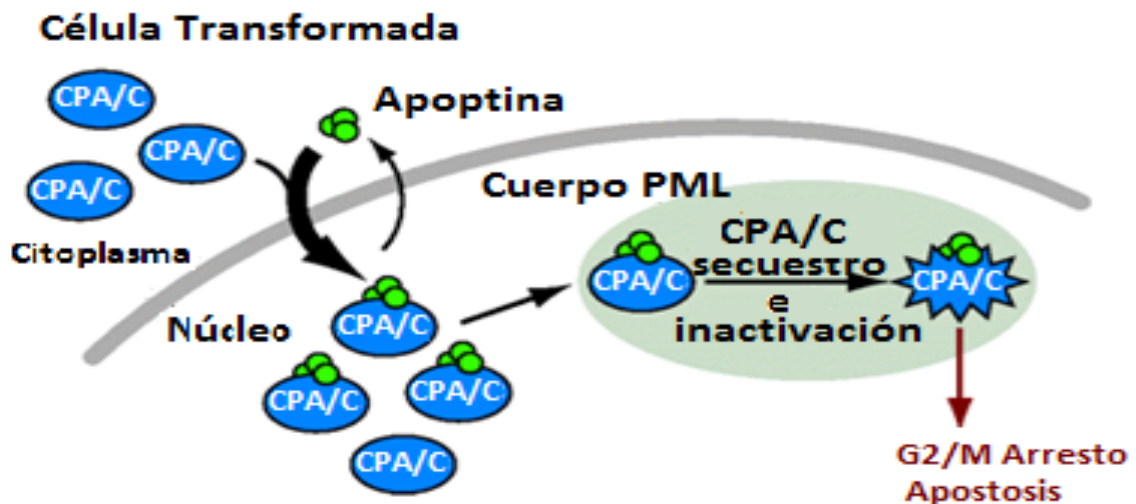


Figura 4. Modelo de acción de la Apoptina en células infectadas. Tomada y modificada de Heilman et al. (2006).

1.3.2. Replicación y expresión de CAV

CAV ingresa a la célula mediante receptores en la membrana celular que aún no se han identificados (Schat et al., 2009). La replicación del genoma ocurre en el núcleo y la realiza la ADN polimerasa de la célula huésped en la fase S de la división celular. Durante la replicación se sintetiza un intermediario de doble hebra que actúa como molde para la generación de ADN simple hebra viral, probablemente utilizando el mecanismo de replicación del círculo rodante (RCR) (Schat & van Santen, 2008).

La mayoría de los autores describen la presencia de un único ARN policistrónico de aproximadamente 2,1 Kb que codifica para las tres proteínas VP1, VP2 y VP3 (Noteborn et al., 1992). Estas tres proteínas se traducen en el citoplasma utilizando diferentes codones de iniciación (Schat et al., 2009). Una vez sintetizadas se transportan al núcleo para ensamblar el virión. El mecanismo por el cual el virión egresa de la célula es desconocido (Figura 5).

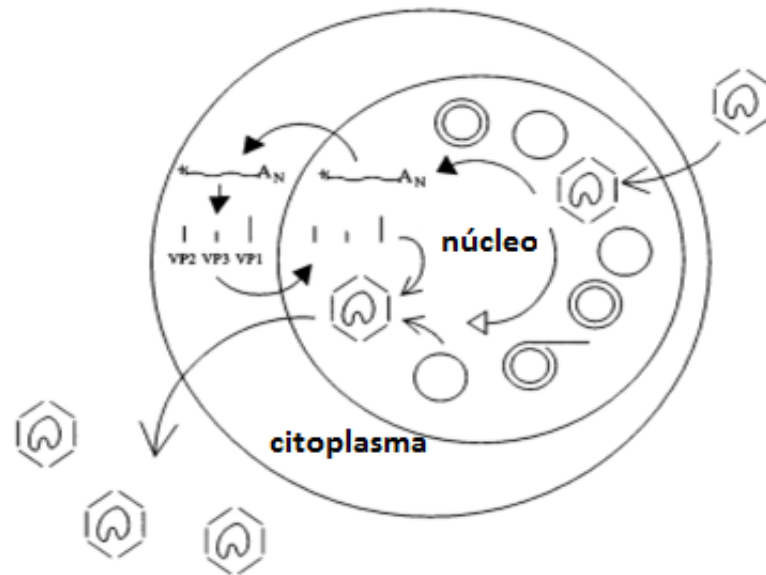


Figura 5. Representación esquemática del ciclo de vida de CAV. Tomada y modificada de Noteborn et al. (1998c).

El ARN viral además se procesa (*splicing*) diferencialmente para generar tres transcritos de menor tamaño. Uno de estos transcritos (1,3 kb) presenta un sitio de corte en la posición 1222 y un sitio de empalme en la posición 1814. El segundo transcripto (1,2 kb) tiene un sitio de corte adicional localizado en los nucleótidos 994 y 1095. El tercer transcripto de 0,8 kb elimina la región que va desde la posición 639 hasta la posición 1719 (Figura 6). La presencia de estos transcritos más pequeños se detectan en etapas tardías del ciclo viral; se desconocen sus funciones y si son traducidos (Kamada et al., 2006).

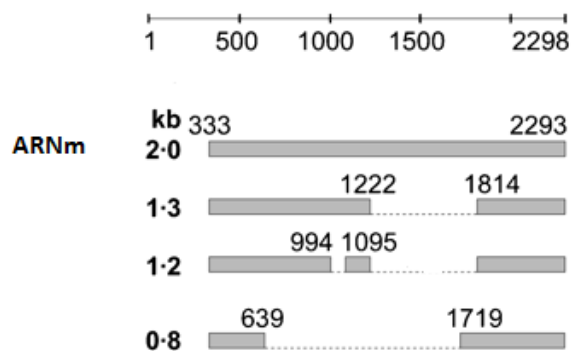


Figura 6. Representación esquemática de los cuatro transcritos de ARN en donde se indican los sitios de procesamiento alternativo para los transcritos de 1,3 Kb, 1,2 Kb y 0,8 Kb. Tomada de Kamada et al. (2006).

1.4. Variabilidad de CAV

Todas las cepas de CAV se agrupan en una única variante antigénica o serotipo (Koch et al., 1995). Se han descrito tres variantes genéticas o genotipos mediante análisis filogenéticos de la región hipervariable del gen *vp1* (Figura 7) (Craig et al., 2009; Islam et al., 2002; Kim et al., 2010) y cuatro genotipos cuando se realizan los análisis con las secuencias de genomas completos (Elthair et al., 2011). La variabilidad genética del virus se genera principalmente por mutación, aunque también se describieron eventos de recombinación intra e inter genotipos, todos con puntos de recombinación en el gen *vp1* (He et al., 2007; Elthair et al., 2011).

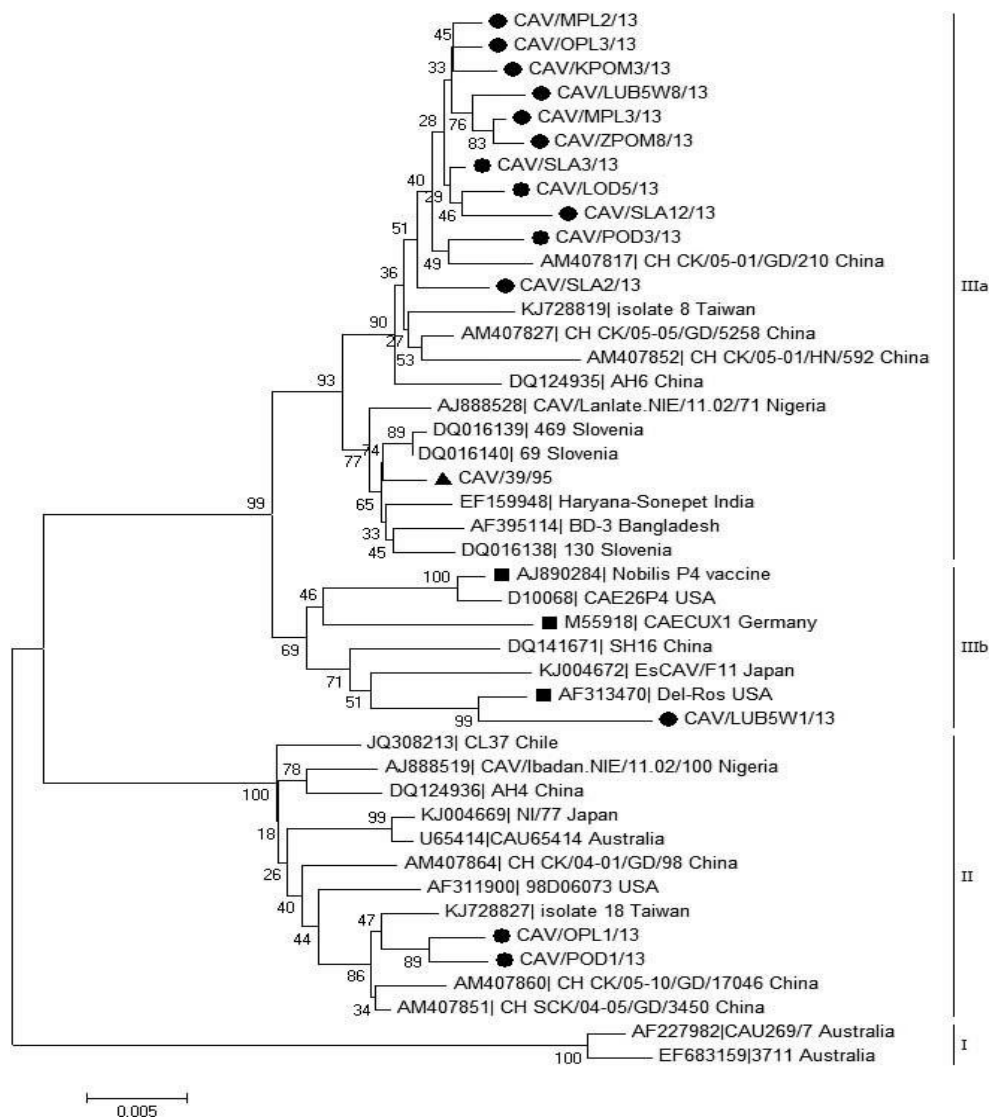


Figura 7. Árbol filogenético basado en la secuencia nucleotídica completa del gen *vp1* de CAV. Se observa la formación de tres genotipos denominados I, II y III. Tomada de Olszewska-Tomczyk et al. (2016).

1.5. Anemia Infecciosa Aviar

1.5.1. Patogenia

CAV puede infectar aves de todas las edades, y las consecuencias de esta infección en pollos libres de patógenos (SPF) dependen de la edad del ave y la presencia de anticuerpos maternos. En base a esto encontramos una manifestación clínica y subclínica de la enfermedad (Schat & van Santen, 2008).

La manifestación clínica se produce en pollos menores a dos semanas de edad sin anticuerpos maternos. La presentación es aguda y ocurre en el período de 7 a 14 días de edad. Las aves infectadas suelen presentar signos clínicos tales como palidez, depresión y disminución de la ganancia de peso. Durante la necropsia, se puede observar anemia, hemorragias, atrofia del timo y cambios en la médula ósea (Schat & van Santen, 2008). La forma subclínica de la enfermedad se presenta en aves de mayor edad, una vez que los anticuerpos maternos contra CAV han disminuido (3-4 semanas de edad). Esto vuelve a las aves susceptibles a la infección, teniendo como resultado la inmunosupresión (Schat & van Santen, 2008).

CAV se replica en los hemocitoblastos de la médula ósea y en los linfoblastos o linfocitos inmaduros en el timo (Adair et al., 2000; Miller and Schat et al., 2004). Los primeros son precursores de los eritrocitos, trombocitos y heterófilos que son los equivalentes de neutrófilos en mamíferos, y los segundos son precursores de las células T CD4+ y CD8+. En todas las células infectadas se desarrolla una infección citolítica, desencadenada por un mecanismo apoptótico a partir de 6-8 días post-infección (Hu et al., 2000). La destrucción de los hemocitoblastos en la médula ósea (lo cual se evidencia 8 días post infección) genera anemia, hemorragias e infecciones bacterianas secundarias debido a una disminución de la respuesta inmune innata (Engström and Luthman 1984). La depleción de linfocitos resulta en inmunosupresión y aumento de la susceptibilidad a diversos patógenos virales y bacterianos (Adair et al., 2000) (Figura 8).

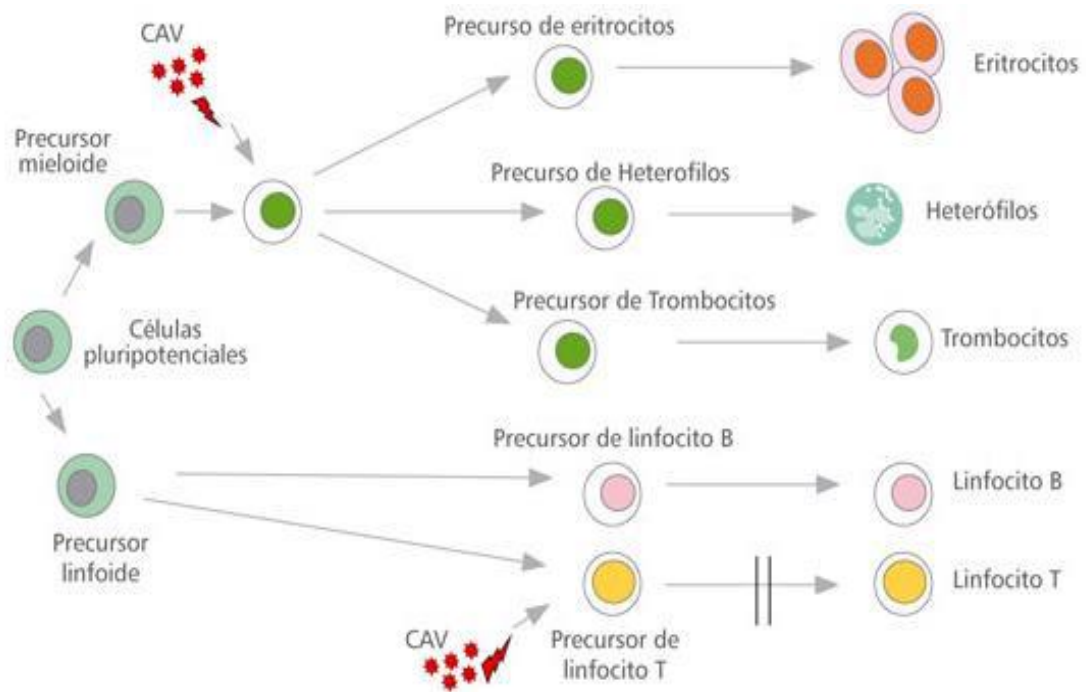


Figura 8. Representación esquemática de los efectos de la infección de CAV sobre la hematopoyesis y el desarrollo de las células T. Tomada de www.actualidadavipecuaria.com.

1.5.2. Interacción con otros patógenos

Las infecciones que se asocian más comúnmente con CAV son dermatitis gangrenosa (*Staphylococcus aureus*), colibacilosis y aspergilosis pulmonar (Goryo et al., 1987). Suele además observarse un aumento en la susceptibilidad a condronecrosis bacteriana con osteomielitis (*Staphylococcus aureus*) (McNamee et al., 1999). CAV también promueve la multiplicación del *Cryptosporidium* (Hornok et al., 1998), y genera sinergia con los virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV), de Marek (MDV), de la Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV) y de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa de Fabricio (IBDV). Después de una infección dual con anemia y otro agente, se generan lesiones más severas debido al sinergismo y potenciación que tiene el otro agente (Adair et al., 2000; Toro et al., 2006).

La respuesta inmune a muchas de las vacunas, incluidas MDV, NDV y laringotraqueitis, es obstaculizada cuando éstas se aplican en aves infectadas con CAV. La vacunación contra NDV o MDV, realizada utilizando cepas muy atenuadas, puede incluso generar reacciones severas si las aves están previamente infectadas con CAV (Adair et al., 2000).

1.5.3. Herramientas de control de la enfermedad

a) Diagnóstico

El diagnóstico de CAV se puede realizar en base a los signos clínicos y hallazgos macro y microscópicos en la necropsia (Imai et al., 1998). Existen también pruebas serológicas como la de neutralización viral (von Bülow et al., 1986), ELISA (Todd et al., 1990b), inmunofluorescencia (McNulty et al., 1984) y pruebas de detección directa como la PCR, DotBlot (Noteborn et al., 1992), hibridación in situ y aislamiento en cultivos celulares, huevos embrionados y aves susceptibles (Pope et al., 1991).

El aislamiento en cultivo celular requiere de líneas celulares específicas ya que el virus no crece normalmente en cultivos celulares primarios, ni en líneas celulares comunes. Sólo las células linfoblastoides transformadas permiten la replicación, aunque con bajo rendimiento (Natesan et al., 2006). La línea MDCC MSB1 es la más usadas a nivel mundial para el crecimiento y aislamiento de CAV. El aislamiento en huevos embrionados es dificultoso porque requiere de inoculación en el saco vitelino (Rosemberger et al., 1989; McNulty et al., 1990).

Para la evaluación de la presencia de anticuerpos existen métodos como el de ELISA y la seroneutralización viral (SNV) (Todd et al., 1990b). Los anticuerpos contra CAV están presentes en aves vacunadas o previamente infectadas (Lee et al., 2009).

La detección por técnicas moleculares, incluyendo PCR, es una alternativa a los métodos convencionales, ya que posee alta sensibilidad, especificidad y permite obtener resultados en menor tiempo (Todd et al., 1992). Los ensayos de PCR tienen como blanco las regiones solapadas que codifican VP2-VP3 y VP1-VP2, y fueron empleados por primera vez por Taylor y cols. (1989). Más recientemente, se han desarrollado metodologías de PCR en tiempo real o PCR cuantitativa que han adquirido mucha importancia en la detección de patógenos por su alta sensibilidad, especificidad y rapidez. La mayoría de estos ensayos diseñados para CAV emplean una región variable del genoma (región codificante del gen *vp1*) (Markowski-Grimsrud et al., 2002; Olszewska-Tomczyk et al., 2016). Solo existe un ensayo que emplea una región conservada del genoma (van Santen et al., 2004), pero se diseñó en base a un número muy limitado de secuencias y no detecta algunas variantes nuevas.

b) Vacunas

Existen en el mercado tres tipos de vacunas para CAV que difieren en su nivel de atenuación (Schat & van Santen, 2008). La primera vacuna comercial surgió en Alemania a principio de la década de los '90. Esta vacuna de baja atenuación se aplica en reproductoras entre las semanas 9 y 15 de vida para asegurar que el virus vacunal no se transmita al huevo. Puede aplicarse por vía oral (agua de bebida) o por vía parenteral (intramuscular, subcutánea, intradérmica), y se emplea frecuentemente en el mercado europeo.

La segunda vacuna, desarrollada a finales de la década de los '90, corresponde a un virus vivo muy atenuado. El alto nivel de atenuación de este virus y su incapacidad de infectar por vía oral requiere de aplicación individual, por vía parenteral. Estas vacunas se administran después de la quinta semana de edad para no tener problemas con la interferencia de anticuerpos maternos, que tienen una vida media de 14 días en reproductoras pesadas y de 28 días en reproductoras livianas. En el año 2000 se desarrolló una vacuna en Estados Unidos con virus vivo atenuado en cultivo celular, indicada para pollos de engorde de un día de edad por vía oral o parenteral (Schat & van Santen, 2008).

La vacunación con cepas menos atenuadas aplicadas en el agua de bebida es más económica, pero la infección oral es menos inmunogénica y su éxito probablemente se vea más afectado por los niveles de anticuerpos maternos presentes en las aves. La vacunación por vía parenteral tiene un alto costo de mano de obra, pero induce excelente inmunidad.

Las vacunas atenuadas más utilizadas a nivel mundial son la Nobilis P4 (la única autorizada en Uruguay) que se aplica por vía parenteral y Del-Ros (utilizadas en algunos países de la región) que se aplica en el agua de bebida.

Aunque las vacunas recombinantes podrían ser una buena alternativa, hasta la fecha no se encuentran disponibles en el mercado (Schat & van Santen, 2008).

1.6. CAV en Uruguay, la región y el mundo

CAV se detectó inicialmente en Japón en 1979, en Europa en 1981 y en EE.UU. en 1989. Posteriormente, se demostró su presencia, tanto serológicamente como por aislamiento,

en la mayor parte de las regiones del mundo con una industria avícola desarrollada. En Latinoamérica hay varios estudios en los que revelan la presencia de CAV en las aves. En México los primeros registros de la enfermedad fueron en 1993 en reproductoras y pollos de engorde, pero se reconoció como enzoótica en 1999, ya que todas las granjas estudiadas resultaban seropositivas (Nestor et al., 2007). En Venezuela, a partir del año 1996, se ha reportado seropositividad para CAV, valores bajos de hematocrito en pollos de engorde y presencia de lesiones microscópicas compatibles con las causadas por el virus (Urdaneta et al., 1996). En Brasil se describió la circulación de CAV por primera vez en 1991 (Brentano et al., 1991). En Argentina se detectó por primera vez en 1994, y los análisis filogenéticos mostraron que todos los aislamientos se agrupan en un único genotipo (genotipo III) (Craig et al., 2009). En Uruguay se realizó por primera vez la detección y caracterización de CAV en el año 2014 utilizando siete muestras de timo y bursa colectadas durante el periodo 2013-2014 (Techera, 2014). Los análisis genéticos realizados con una pequeña región de *vp1* (región hipervariable), sugieren que estas cepas uruguayas presentan una considerable variabilidad nucleotídica.

2. Hipótesis de Trabajo

En Uruguay circulan variantes de CAV que pueden detectarse y caracterizarse adecuadamente mediante el análisis de la región codificante del gen *vp1*, y más profundamente mediante el análisis del genoma completo. La comparación de estas cepas con las descritas en la región y en el resto del mundo permitirá una mejor comprensión de la epidemiología y evolución de este importante patógeno aviar.

3. Objetivos

Objetivo General

Diagnosticar y caracterizar genéticamente cepas de campo del virus de la Anemia Infecciosa Aviar que circulan en aves de la industria avícola uruguaya para analizarlas en un contexto evolutivo general del virus.

Objetivos Específicos

- Diseñar, estandarizar y validar una metodología de diagnóstico molecular basada en PCR en tiempo real que permita una cuantificación absoluta y precisa de CAV.
- Identificar el virus en muestras colectadas en la industria avícola uruguaya.
- Caracterizar genéticamente las cepas mediante el análisis de la secuencia completa y parcial (región hipervariable) del gen *vp1*.
- Establecer la variabilidad genómica de las cepas uruguayas mediante el análisis de genomas completos.
- Comparar las cepas uruguayas con cepas de la región y el mundo, incluyendo cepas vacunales comerciales.
- Analizar la evolución global del virus mediante la estimación de la edad de ancestros recientes, determinación de la tasa de sustitución nucleotídica, y análisis de recombinación.

4. Materiales y métodos

4.1. Muestras

Se utilizó una cepa vacunal de CAV para estandarizar los ensayos de diagnóstico y caracterización molecular, y para disponer de un control positivo para el diagnóstico de cepas de campo. Dicha cepa vacunal se utiliza en Uruguay para inmunizar contra CAV a las reproductoras y en consecuencia a su descendencia. Es una vacuna a virus vivo atenuado y fue elaborada en base a la cepa CAV P4 (Nobilis, Intervet).

Se analizaron 83 muestras uruguayas de pollos con síntomas sugerentes de inmunodepresión, las cuales fueron colectadas entre los años 2004 y 2016. La colecta de las muestras se hizo en 20 establecimientos avícolas de Canelones y los órganos utilizados fueron timo, bursa y tonsilas cecales. El procesamiento del material biológico fue realizado por veterinarios especialistas en avicultura que colaboran con nuestro grupo de trabajo. Las muestras se remitieron al laboratorio con los registros correspondientes y se almacenaron a -80° C hasta su procesamiento.

4.2. Extracción del genoma viral

Para realizar la extracción del ADN viral a partir de la muestra vacunal se utilizó el kit QIAmp Viral DNA Mini Kit (Qiagen) (anexo 1.a). Se partió de 0,01 g de vacuna liofilizada resuspendida en 200 µl de PBS pH 7,5. En el caso de las muestras de campo la extracción de ADN se realizó siguiendo un protocolo estándar de fenol-cloroformo (anexo 1.b). También se realizaron extracciones de ARN, realizadas con el kit “Quick-RNA™ MiniPrep” (Zymo Research) (anexo 1.c), seguidas de una Retrotranscripción con random primers, ya que se observó en estas una detección eficiente de CAV.

4.3. Estandarización del ensayo de PCR en tiempo real

Se estandarizó la detección del genoma de CAV mediante PCR en tiempo real utilizando la cepa vacunal Nobilis P4. Se diseñó un juego de cebadores (CAV-F 630 y CAV-R 756) y una sonda de hidrólisis doble *quencher* (CAV-VP2-VP3). Los cebadores amplifican una región de 127 pb de la región solapada de los genes *vp2* y *vp3* del genoma de CAV. La sonda presenta el fluoróforo HEX (5'-hexachloro-fluoresceína fosforamidita) en el extremo 5', y un doble quencher de moléculas no fluorescentes (ZEN y 3IABkFQ) (Tabla

1). Para los ensayos se utilizó el Hot Mater Mix de Bioron. Para la estandarización del ensayo se probaron diferentes concentraciones de sonda y cebadores (0,05 μM – 0,15 μM , 0,1 μM – 0,3 μM y 0,2 μM – 0,6 μM), manteniendo siempre la relación recomendada de concentración sonda:cebadores (1:3). Las condiciones de ciclado se detallan en la tabla 2 (Protocolo 1). Todos los experimentos basados en PCR en tiempo real se realizaron en el equipo ABI 7500 (Applied Biosystems) de la Sección Genética Evolutiva, que emplea el software ABI 7500 versión 3.0.

Tabla 1. Cebadores y sonda utilizada en las reacciones de PCR en tiempo real, final y para secuenciar.

	Cebadores y sonda	Secuencia 5' → 3'	Polaridad	Posición en el genoma
Cebadores y sonda PCR en tiempo real	CAV-F630*	ACGCTAAGATCTGCAACTG	+	630-648 ^a
	CAV-VP2-VP3*	HEX-CAAGCCTCC-ZEN-CTCGAAGAAGC-3IABkFQ	+	707-726 ^a
	CAV-R756*	TTACCCTGTACTCGGAGG	-	756-739 ^a
Cebadores PCR en tiempo final	CAV6*	ATCATCACC ACTACTACAGCG	+	1681-1701 ^a
	CAV4*	GTTGCTCGTCGGGTCTCAT	-	1651-1633 ^a
	CAV-Genoma Uru fw*	GCAACTGCGGACAATTCAGA	+	642-661 ^a
	CAV-Genoma Uru rev*	ATTCCAGCGATACCAATCCG	-	583-564 ^a
	CAV-58 fw*	GGTACGTCACAGCCAATCA	+	229-247 ^a
	CAV-VP1-100 rev*	TACCGCTGTCTCCTCCGAT	-	950-932 ^a
Cebadores para secuenciar	VP1 A fw **	CAAGAAGGTGTATAAGACTG	+	808-827 ^a
	VP1 A rev **	ATCGCTGCTGTACTTAACAT	-	1566-1547 ^b
	VP1 B fw **	GAAACCCGCTTTCAGCT	+	1450-1466 ^a
	VP1 B rev **	CAGTACATGGTGCTGTT	-	2165-2149 ^a
	CAV-Sec 4 fw ***	AGGGCAACGTTTCAGTTTCTA	+	1812-1831 ^a

^a Posición nucleotídica en el genoma de la cepa LN1401 de CAV (KU641013).

^b Posición nucleotídica en el genoma de la cepa CAV18 de CAV (KJ872514).

* Cebadores y sonda diseñados para este trabajo. **Cebadores descritos por Craig et al. (2009).

***Cebador descrito por Rimondi et al. (2014).

Tabla 2. Protocolos de ciclados de PCR. Protocolo 1: PCR en tiempo real. Protocolo 2: amplificación del fragmento CAV6-CAV4. Protocolo 3: Amplificación del fragmento de 2100 pb. Protocolo 4: Amplificación del fragmento de 722 pb.

	Proceso	Temperatura	Tiempo	
Protocolo 1	Lectura pre-PCR	50° C	5 min	
	Desnaturalización inicial	95° C	10 min	
	Desnaturalización	95° C	15 s	40 ciclos
	Hibridación-Extensión	60° C	1 min	
	Lectura pos-PCR	70° C	5 min	
Protocolo 2	Desnaturalización inicial	94° C	5 min	
	Desnaturalización	94° C	30 s	40 ciclos
	Hibridación	64° C	30 s	
	Extensión	72° C	3 min 20 s	
	Extensión final	72° C	5 min	
Protocolo 3	Desnaturalización inicial	94° C	5 min	
	Desnaturalización	94° C	30 s	40 ciclos
	Hibridación	60° C	30 s	
	Extensión	72° C	3 min 20 s	
	Extensión final	72° C	5 min	
Protocolo 4	Desnaturalización inicial	94° C	5 min	
	Desnaturalización	94° C	30 s	35 ciclos
	Hibridación	58° C	30 s	
	Extensión	72° C	50 s	
	Extensión final	72° C	5 min	

El análisis de especificidad del método se realizó a través de diferentes aproximaciones. Durante el diseño de cebadores y sonda se evaluó la capacidad de los mismos para unirse a regiones no específicas, ya sea correspondientes al genoma de CAV como de la especie blanco del virus, *Gallusgallus*. Esto se hizo utilizando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), la cual permite buscar homología con todas las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank. Una vez culminado el diseño de cebadores y sonda, y la puesta a punto del método, se evaluó su capacidad para detectar como negativas tanto muestras de virus comunes (IBV, IBDV, NDV y Reovirus) como

muestras negativas para CAV diagnosticadas por otros métodos moleculares basados en PCR a tiempo final.

La sensibilidad clínica (capacidad de un método para detectar una muestra que se sabe positiva) se analizó utilizando un total de 15 muestras. El resultado de este análisis se expresa en porcentaje, y es particularmente importante en aquellos métodos que son desarrollados con fines diagnósticos.

4.4. Ensayo de cuantificación absoluta

El ensayo de cuantificación absoluta se basa en la generación de una curva estándar a partir de diluciones seriadas de ADN viral cuyo número de copias genómicas es conocido. Esta curva estándar representa la relación lineal entre el logaritmo del número de copias ADN viral y el Ct (primer ciclo de la PCR donde se registra fluorescencia significativa) de cada dilución. Para realizar la curva estándar se amplificó un fragmento de 2270 pb de la cepa vacunal Nobilis P4 con los cebadores CAV6-CAV4 que abarca la mayor parte del genoma viral e incluye el amplicón de la PCR en tiempo real. Este fragmento se purificó y se calculó el número de copias de ADN/ μ l (Y). A partir del producto de PCR purificado se realizaron diluciones seriadas que se sometieron a una PCR en tiempo real. Con los Ct resultantes y el Y calculado se generó la curva estándar. En la figura 9 se esquematiza la metodología realizada para la generación de la curva estándar.

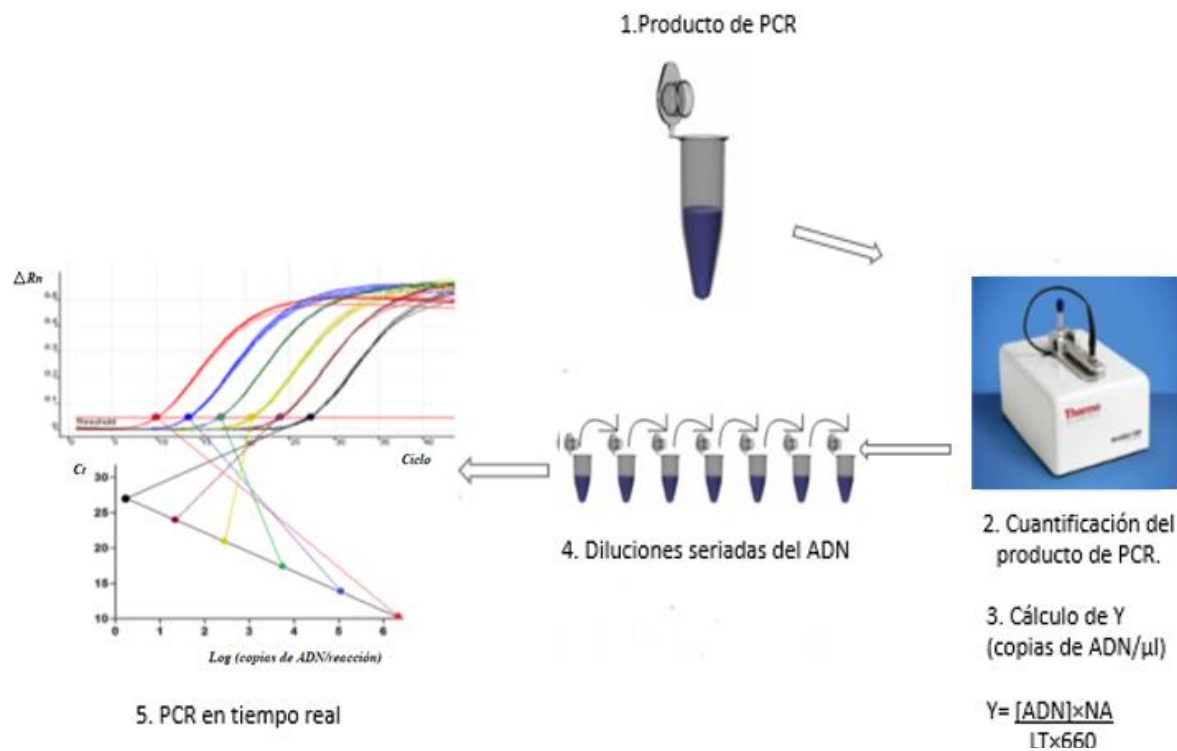


Figura 9. Metodología empleada para la generación de la curva estándar. Para realizar la curva estándar (relación lineal entre el Log₁₀ del número de copias de ADN viral y el Ct) se amplificó un fragmento de la cepa vacunal Nobilis P4 (2270 pb) que contiene el amplicón de la PCR en tiempo real, se purificó y se calculó el número de copias de ADN/ μ l (Y). A partir del producto de PCR purificado se realizaron diluciones seriadas que se sometieron a una PCR en tiempo real. Con los Ct resultantes y el Y calculado se generó la curva estándar. [ADN]: concentración del producto de PCR purificado expresada en g/ μ L. NA: número de Avogadro (6,022 x 10²³ moléculas/mol). LT: largo del amplicón expresado en nucleótidos. 660: peso molecular de un nucleótido expresado en g/mol.nt.

4.4.1. Amplificación del fragmento de 2270 pb con cebadores CAV6-CAV4

El fragmento de 2270 pb que contiene la secuencia empleada en el ensayo de diagnóstico de PCR en tiempo real se amplificó con el juego de cebadores CAV6 y CAV4 (Tabla 1). Se utilizó un termociclador con gradiente de temperatura “CG1/96” (Corbett Research) y las condiciones detalladas en las tablas 2 (Protocolo 2) y 3 A. El amplicón se purificó con el kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research) (anexo 1.d).

Tabla 3. Concentraciones de los reactivos de las reacciones de PCR en tiempo final. A) Para los amplicones CAV6-CAV4 y el de 2100 pb. B) Para el amplicón de 722 pb.

A)

Reactivos	C _o	C _f	V _o /tubo (μL)
H ₂ O			9.75
Buffer	10 X	1X	1.5
MgCl ₂	25 μM	2 μM	1.2
dNTPs	10 mM	0.3 mM	0.45
Taq	5 U/ μL	0.067 μL	0.2
Cebador F	10 μM	0.3 μM	0.45
Cebador R	10 μM	0.3 μM	0.45
ADNc			1

B)

Reactivos	C _o	C _f	V _o /tubo (μL)
H ₂ O			10.25
Buffer	10 X	1X	1.5
MgCl ₂	25 μM	2 μM	1.2
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.3
Taq	5 U/ μL	0.05 μL	0.15
Cebador F	10 μM	0.4 μM	0.3
Cebador R	10 μM	0.4 μM	0.3
ADNc			1

4.4.2. Cálculo de Y (Número de copias de ADN/μL)

El número de copias de ADN/ul (Y) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Y = \frac{[ADN] \times NA}{LT \times 660}$$

[ADN] es la concentración del producto de PCR purificado expresada en g/μL, NA es el número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$ moléculas/mol), LT es el largo del amplicón expresado en nucleótidos, y 660 es el peso molecular de un nucleótido expresado en g/mol.nt. La concentración del transcripto se midió con un NanoDrop 1000 (ThermoScientific, EEUU).

4.4.3. PCR en tiempo real

A partir del producto de PCR de 2270 pb se realizaron ocho diluciones seriadas en base 10 en un rango de 1×10^8 a 10 copias de ADN/μl. Las diluciones incluyeron ADN proveniente de una muestra negativa para CAV para simular una situación real donde el genoma viral se encuentra en baja proporción en relación al celular. Cada ensayo, que incluye la realización de las diluciones seriadas y las reacciones de PCR en tiempo real

(Figura 10), se realizó por triplicado bajo las mismas condiciones. También fue realizada por triplicado cada reacción de PCR en tiempo real a partir de un mismo ADN.

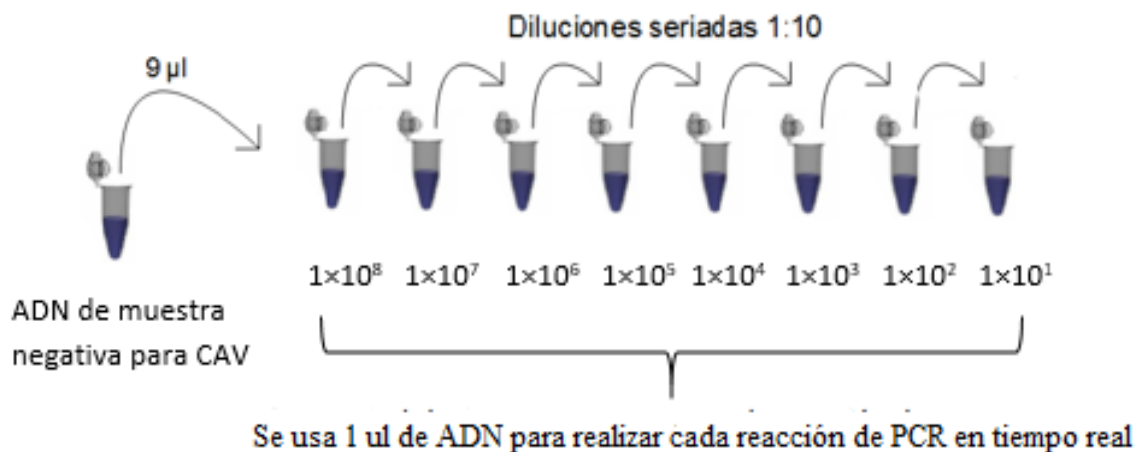


Figura 10: Esquema representativo de las diluciones de ADN utilizadas para generar la curva estándar. A partir del producto de PCR se realizaron ocho diluciones seriadas en base 10.

4.4.4. Curva estándar

La mejor recta que describe la relación entre el Log_{10} (Nº de copias de ADN) y el Ct se obtuvo por el método de los mínimos cuadrados implementado por el programa PAST (PAleontological STatistics) versión 1.94b (http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).

El desempeño analítico del ensayo se determinó midiendo cuatro parámetros: la eficiencia, el coeficiente de determinación, el rango dinámico y el coeficiente de variación intra- e inter-ensayo.

La eficiencia se calculó usando la fórmula $E = (10^{(-1/k)}) - 1$ (Ginzinger, 2002; Pfaffl, 2001) donde k es la pendiente de la curva estándar. Un valor de $E=1$ corresponde a una eficiencia de amplificación del 100%, lo que indica que la PCR es capaz de duplicar el ADN molde de un ciclo a otro. El coeficiente de determinación (R^2) se calculó mediante la fórmula:

$$R^2 = \frac{\sigma^2_{X Y}}{\sigma^2_X \sigma^2_Y}$$

σ_{XY} es la covarianza de Log copias de ADN/reacción y Ct; σ_X es la desviación típica de la variable de Log copias de ADN/reacción; σ_Y es la desviación típica del Ct.

Este coeficiente puede tomar valores de 0 a 1, siendo 1 cuando todos los valores estimados caen sobre la recta de regresión.

En el rango dinámico de un ensayo se observa una relación lineal entre el Log_{10} del número de moléculas de ADN y el Ct. Este rango está delimitado por el límite de cuantificación LOQ inferior y el LOQ superior. Dentro de estos límites, la PCR se comporta de forma lineal y permite cuantificar una muestra problema. El LOQ superior generalmente no se detecta ya que suele ser muy alto y no es útil en la práctica.

Para medir la reproducibilidad del ensayo se calculó la variabilidad intrínseca de los datos a través de los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo de los valores de Ct. Los coeficientes de variación intra-ensayos indican la variabilidad de los Ct en tres reacciones idénticas de un mismo experimento; los coeficientes de variación inter-ensayos reflejan la variabilidad de los Ct en tres experimentos independientes. Los coeficientes de variación se calcularon mediante la fórmula:

$$\text{C.V.} = (S_{n-1}/X) \times 100, \text{ donde } X \text{ es la media de los Ct y } S_{n-1} \text{ la desviación estándar.}$$

4.5. Diagnóstico de muestras de campo por PCR en tiempo real

La metodología de PCR en tiempo real estandarizada se aplicó en 83 muestras uruguayas, de pollos que no presentaban la manifestación clínica de la enfermedad, pero mostraban exacerbación de síntomas respiratorios, sugerentes de inmunodepresión. Los órganos utilizados para los diagnósticos fueron timo, bursa y tonsilas cecales. En todos los casos se utilizó como control interno un ensayo previamente diseñado en el laboratorio que amplifica una región de la beta actina aviar (Tesis de Maestría Ana Marandino).

4.6. Obtención de la secuencia parcial y completa del gen *vp1*

La secuencia completa del gen *vp1* (1350 pb) de todas las muestras positivas para CAV se obtuvo utilizando los cebadores CAV-Genoma Uru fw y CAV-Genoma Uru rev, los cuales amplifican un fragmento de 2100 pb (Tabla 1). Para secuenciar todo el amplicón se utilizaron cebadores adicionales disponibles en la literatura: VP1 A fw, VP1 A rev, VP1 B fw, VP1 B rev y CAV-Sec 4 fw (Tabla 1).

Las concentraciones de los reactivos utilizadas en las reacciones de PCR y las condiciones de ciclado se detallan en la tabla 3 A y 2 (Protocolo 3), respectivamente. Las reacciones se realizaron en un termociclador con gradiente de temperatura “CG1/96” (Corbett Research).

4.7. Obtención de la secuencia del genoma completo codificante

El genoma codificante completo se obtuvo en dos amplicones parcialmente solapados (Figura 11). Uno de ellos fue el mismo que se utilizó en la sección 4.6 (2100 pb) y el otro (722 pb) se obtuvo con los cebadores CAV-58 fw y CAV-VP1-100 rev (Tabla 1).

Las concentraciones de los reactivos utilizadas en las reacciones de PCR y las condiciones de ciclado se detallan en la tabla 3 (A y B) y 2 (Protocolo 3 y 4), respectivamente. Las reacciones se realizaron en un termociclador con gradiente de temperatura “CG1/96” (CorbettResearch).

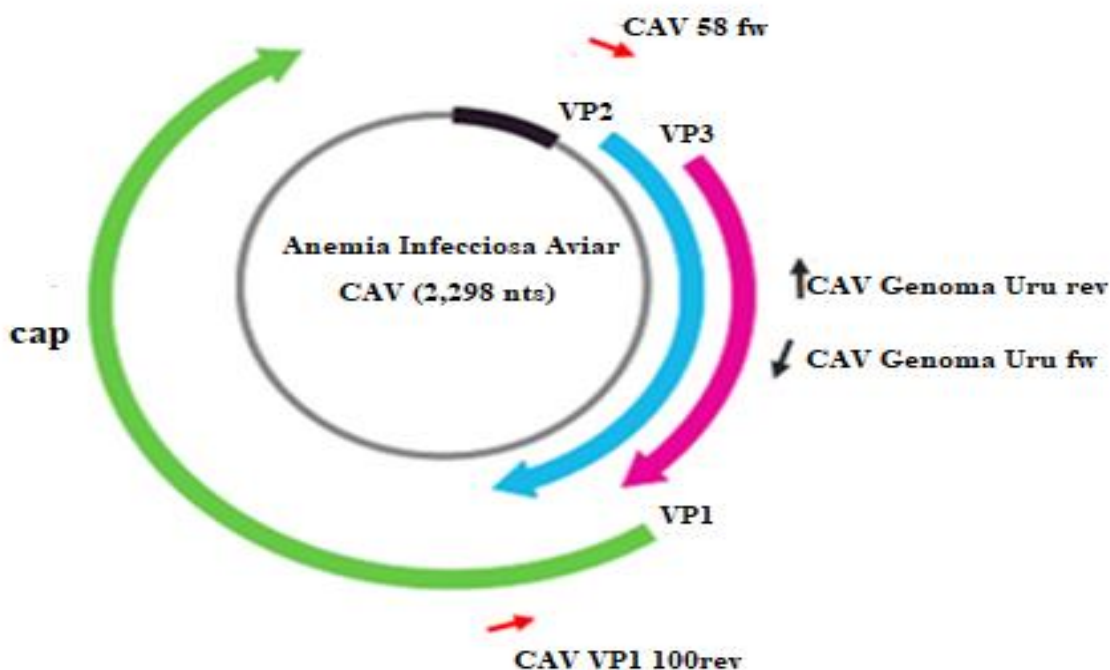


Figura 11. Representación gráfica de las regiones del genoma de CAV amplificadas por PCR en tiempo final para obtener los genomas completos codificantes. Con flechas pequeñas se indica la posición de los cebadores.

4.8. Visualización de los productos de PCR

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. La electroforesis se realizó a 90 volts con buffer TAE 1×. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y visualizados bajo luz UV.

4.9. Purificación de los amplicones y secuenciación

La purificación de los amplicones a partir de los productos de PCR de la muestra vacunal y de las muestras de campo se realizó con el kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo 1.d). Los amplicones purificados se secuenciaron en ambas direcciones de forma automática en MacroGen (Corea).

4.10. Análisis bioinformáticos

4.10.1. Diseño de cebadores y sondas

El diseño de cebadores se realizó sobre secuencias conservadas del genoma viral. Los cebadores se analizaron con la herramienta *Oligoanalyzer* de IDT (*Integrated DNA Technologies*), empresa donde fueron adquiridos (<http://www.idtdna.com>).

4.10.2. Edición y alineamiento de secuencias nucleotídicas

Las secuencias obtenidas se ensamblaron y editaron con el programa *SeqMan* del paquete *Lasergene 7.0* (DNASTAR). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo *MUSCLE* del programa MEGA versión 7 e incluyeron secuencias de las diferentes variantes de CAV que se encuentran disponibles en la base de datos del GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.10.3. Determinación de secuencias recombinantes

Para determinar la presencia de recombinantes en el conjunto de secuencias obtenidas en este trabajo se utilizó los paquetes informáticos *SplitsTree4* y RDP4 (*Recombination Detection Program*) (Huson & Bryant, 2006 ; Martin et al., 2010).

El programa *SplitsTree4* compara los alineamientos de secuencias mediante la construcción de redes filogenéticas. La diferencia de las redes filogenéticas con los tradicionales árboles filogenéticos es que estos últimos asumen únicamente evolución

vertical de los linajes, ya que se considera que los linajes actuales solo reciben información de linajes parentales ancestrales. Por el contrario, las redes filogenéticas permiten visualizar eventos evolutivos, como el intercambio horizontal de genes o la recombinación, que implican la transferencia de información a partir de linajes contemporáneos. Estos eventos se representan como líneas transversales en las ramas de los árboles filogenéticos. Para darle soporte estadístico a los resultados se calculó la probabilidad (en forma de *p-value*) de existencia de secuencias recombinantes en el conjunto de datos analizado (*Phi test*). Para obtener más información sobre el recombinante, por ejemplo para identificar el punto de recombinación, se utilizó el programa RDP4. Este programa integra siete algoritmos (RDP, Bootscann, MaxChi, Chimaera, GeneConv, Sis-scan y 3seq) que detectan las secuencias recombinantes, las hipotéticas secuencias parentales y los sitios de recombinación. Los algoritmos se basan en dos tipos de metodologías: i- métodos filogenéticos (RDP y Bootscan) que comparan árboles filogenéticos contruidos a partir de distintas partes de la secuencia, detectando los eventos de recombinación por diferencias en las topologías de estos árboles, y ii- métodos de sustitución nucleotídica (MaxChi, Chimaera, GeneConv, Sis-scan y 3seq) que determinan en las secuencias nucleotídicas un agrupamiento de sustituciones que se ajuste a una distribución estadística esperada.

Para el análisis se utilizó un tamaño de ventana de 200 pb y una significancia estadística de $p \leq 0,05$. Los datos de las secuencias utilizadas tanto en el SplitsTree como en el RDP4 se encuentran en el anexo 2.a, 2.b y 2.c.

4.10.4. Análisis filogenéticos

Se realizaron análisis filogenéticos basados en la secuencia completa (1350 pb) y parcial (726 pb) del gen *vp1*, y en la secuencia de genomas completos codificantes (1823 pb) (anexo 3.a, 3.b y 3.c). En estos análisis se compararon todas las de cepas de campo y vacunales disponibles en la base de datos y además las secuencias uruguayas obtenidas en este estudio. Se determinó el modelo de sustitución en cada alineamiento con jModelTest (Posada, 2008). Estos datos se emplearon para inferir árboles filogenéticos con el método de máxima verosimilitud implementado en el servidor <http://www.phylogeny.fr/>. Para obtener el nivel de significancia de las ramas de los

árboles filogenéticos se aplicó el método de aLRT (*approximate likelihood ratio test*). Las filogenias se visualizaron con TreeGraph2 (Stöver & Müller, 2010).

4.10.5. Análisis de similitud nucleotídica y aminoacídica

Los cálculos de similitud nucleotídica y aminoacídica se realizaron con el programa MEGA 7.0, utilizando el modelo de sustitución *p-distance*.

4.10.6. Análisis de coalescencia

Para realizar el análisis de coalescencia se utilizaron secuencias datadas y obtenidas en distintos puntos en el tiempo (datos heterocronicos) (anexo 4.a, 4.b, 4.c, 4.d, 4.e y 4.f). Se emplearon todas las secuencias uruguayas obtenidas en este trabajo y las disponibles en el NCBI.

Se estimó la edad del ancestro común más reciente (tMRCA) de todas las secuencias de *vp1* completas (1350 pb) y parciales (726 pb). Además se estimaron la tasa de sustitución (sustituciones/sitio/año) y el tMRCA de los clados II y III.

Para el Clado II se realizaron análisis de coalescencia con cuatro *dataset* diferentes. El primer *dataset* (n=154) estaba formado por todas las secuencias completas de *vp1*, datadas entre los años 1976 y 2016 (anexo 4.a). El segundo (n=281) incluyó todas las secuencias parciales de *vp1* (726 pb), datadas entre los años 1976 y 2016. Esto se realizó con el fin de contar con un mayor número de secuencias y mayor cantidad de años representados (anexo 4.d). El tercer *dataset* (n=35) se realizó con secuencias completas de *vp1* que pertenecían únicamente al Clado II datadas entre los años 1977 y 2016 (anexo 4.b). Por último, el cuarto *dataset* incluyó las secuencias parciales de *vp1* del Clado II (n=93) datadas también entre los años 1977 y 2016 (anexo 4.e).

Para el Clado III se realizaron los mismos análisis que para el Clado II, siendo los dos primeros los descriptos anteriormente. El tercer *dataset* incluyó todas las secuencias completas de *vp1* que forman el Clado III (n=117) datadas entre los años 1976 y 2015 (anexo 4.c). El cuarto incluyó las secuencias parciales de *vp1* que forman el Clado III (n=186) datadas entre los años 1976 y 2015 (anexo 4.f).

Las estimaciones de estos parámetros evolutivos fueron calculadas con el paquete BEAUTi/BEAST (Drummond et al., 2012). Previamente se utilizó el programa BEAUti

para, a partir de un alineamiento de secuencias en formato NEXUS, generar un archivo en formato XML que sirve de *input* al BEAST.

El paquete BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees*) (Drummond et al., 2012) analiza secuencias de ADN utilizando aproximaciones bayesianas a través de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC). Para calcular el tMRCA el programa BEAST genera un grupo de árboles filogenéticos a partir de un alineamiento de secuencias de edad conocida, y para cada uno de ellos estima la edad de la raíz. Para nuestros datos se analizaron un total de 10.000 árboles, ya que el largo de la cadena de Markov utilizado fue de 100.000.000 pasos y se tomaron muestras cada 10.000. Para asegurarse que la MCMC había llegado a la convergencia se corroboró que todos los parámetros tuvieran valores de ESS (*Effective Sample Size*) mayores a 200.

La estadística bayesiana se caracteriza por incorporar incertidumbre a cada parámetro calculado. La incertidumbre de los dos parámetros, tMRCA y la tasa de sustitución, en nuestro conjunto de datos se calculó mediante los valores del intervalo de confianza del 95% (HPD 95%).

Con el programa TRACER (Drummond et al., 2012) se analizaron de forma gráfica los archivos generados por el BEAST.

5. Resultados

5.1. Estandarización del ensayo de PCR en tiempo real

El ensayo de diagnóstico de CAV basado en PCR en tiempo real se estandarizó utilizando la cepa vacunal Nobilis P4. Además se utilizaron para probar el ensayo la muestra positiva M43 y la muestra negativa 221403. Las condiciones estandarizadas para la reacción se muestran en la tabla 4. Las curvas de amplificación presentaron buenos niveles de fluorescencia en las muestras positivas y controles, los blancos fueron negativos (Figura 12)

Tabla 4. Concentración final (Cf) de los reactivos de PCR en tiempo real.

Reactivos	Cf
Hot Master Mix (Bioron)	1X
CAV-F630	0.3 μ M
CAV-R756	0.3 μ M
CAV-VP2-VP3	0.1 μ M

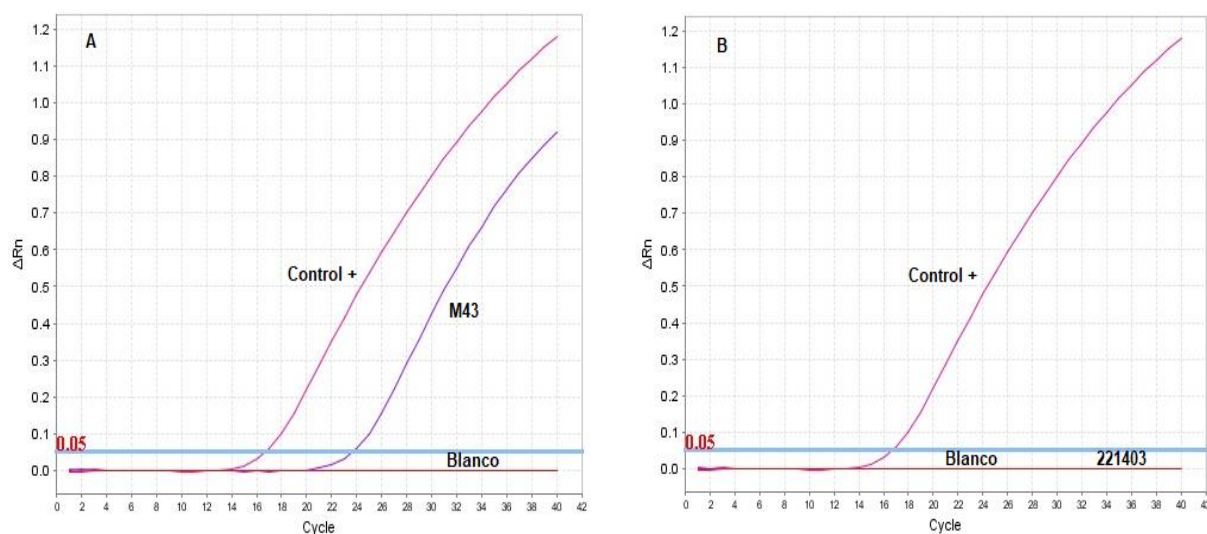


Figura 12. Ensayo de diagnóstico de CAV por PCR en tiempo real de una muestra positiva (M43) y una muestra negativa (221403). Para cada ensayo se muestran las curvas de amplificación de detección del genoma de CAV. (A) En el ensayo de diagnóstico de la muestra positiva hay un incremento de fluorescencia en la muestra y en el control positivo (cepa vacunal) de la reacción de detección del genoma de CAV. (B) En el ensayo de diagnóstico de la muestra negativa no se observa incremento de la fluorescencia como se observa en el control positivo. (A y B) No se detecta incremento de fluorescencia correspondiente a los blancos de PCR.

El análisis de especificidad realizado con el BLAST indicó que los cebadores y la sonda solo hibridan correctamente con las regiones genómicas de CAV en base a las cuales fueron diseñados. Las muestras de campo negativas para CAV y las muestras correspondientes a otros virus (IBV, IBDV, NDV y Reovirus) no generaron amplificaciones positivas. La sensibilidad clínica del método se analizó empleando un total de 15 muestras positivas para CAV. Todas las muestras fueron correctamente diagnosticadas como positivas con el método de diagnóstico, alcanzando así una sensibilidad clínica del 100%.

5.2. Ensayo de cuantificación absoluta

5.2.1. Obtención del ADN estándar

Se amplificó un fragmento de 2270 pb que abarca la secuencia del amplicón empleado en los ensayos de diagnóstico de CAV. El amplicón purificado tuvo una concentración de 58 ng/ μ l correspondiente a $2,3 \times 10^{10}$ copias de ADN/ μ L.

5.2.2. Curva Estándar

La curva estándar mostró un rango dinámico lineal de 1×10^2 - 1×10^8 copias de ADN por reacción (Figura 13).

Los valores de eficiencia (E: 96,1%) y coeficiente de determinación (R^2 : 0,9987) de la curva estándar fueron muy satisfactorios (Figura 13); los valores aceptables de estas variables son E entre 90-110% y de R^2 mayor a 0,98. Los valores mínimos de los CVs intra- e inter-ensayo indicaron que la reproducibilidad del ensayo es alta (Tabla 5).

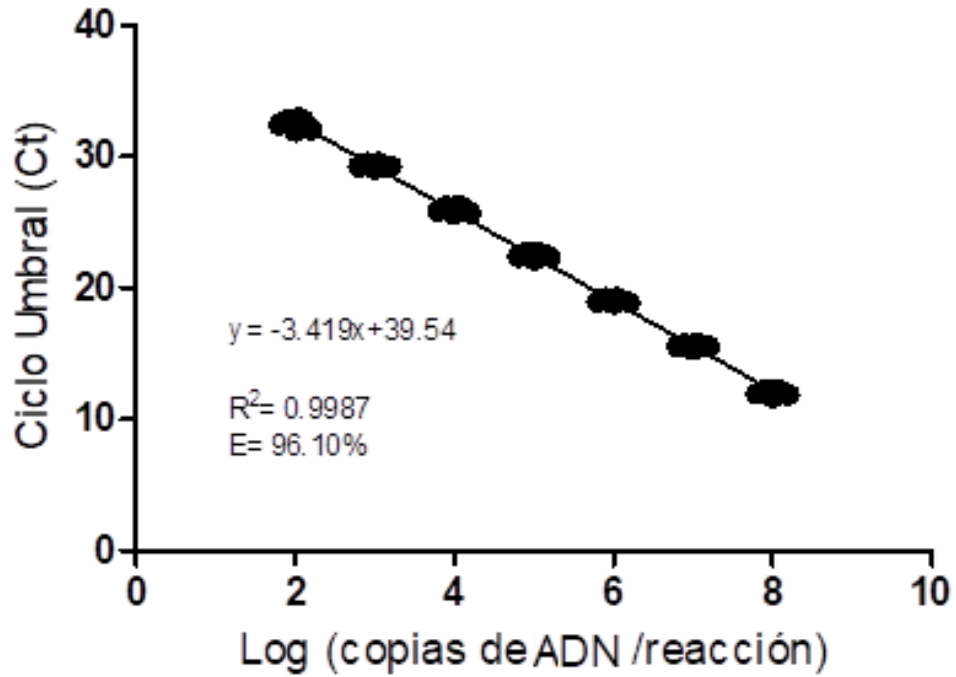


Figura 13. Curva estándar del ensayo de diagnóstico de CAV por PCR en tiempo real. Cada punto representa el Ct de nueve medidas (tres ensayos independientes con tres replicas cada uno) para su correspondiente valor de Log (copias de ADN/reacción). Se indican los valores de la eficiencia de la reacción (E) y el coeficiente de determinación (R^2) de la curva de regresión lineal.

Tabla 5. Variabilidad intra- e inter-ensayo

Copias de ADN/reacción	Variaciones intra-ensayo		Variaciones inter-ensayo	
	Media de Ct	CV	Media de Ct	CV
1×10^2	32.47 - 32.55	1.21-1.50	32.51	1.22
1×10^3	29.31 - 29.39	0.46-0.71	29.35	0.55
1×10^4	25.94 - 26.04	0.96-1.20	25.99	0.99
1×10^5	22.45 - 22.57	0.74-1.29	22.51	0.99
1×10^6	19.01- 19.09	0.79-1.14	19.05	0.91
1×10^7	15.59 - 15.67	0.49-1.45	15.63	1.00
1×10^8	11.98 - 12.72	1.74-2.15	12.05	1.87

CV: coeficiente de variación de los valores de Ct (%)

Ct: ciclo umbral.

5.3. Aplicación del ensayo de PCR en tiempo real en muestras de campo

La metodología de PCR en tiempo real estandarizada detectó el genoma viral de CAV en 28 de las 83 muestras uruguayas provenientes de aves que no presentaban manifestación clínica de anemia, aunque tenían problemas respiratorios sugerentes de inmunodepresión (Tabla 6). En todas las muestras analizadas se amplificó correctamente el control interno.

Tabla 6. Muestras positivas para CAV por PCR en tiempo real. Se detalla el nombre de la muestra, el año en que fue colectada, el órgano analizado y la edad del animal.

Muestra	Año de colecta	Órgano analizado	Edad (días)
M23	2005	Bursa	ND
M34	2005	Bursa	ND
M43	2007	Bursa	ND
M0509	2009	Bursa	ND
M0610A	2010	Bursa	ND
M0610B	2010	Bursa	ND
421102	2011	Bursa	38
421103	2011	Bursa	46
351201	2012	Bursa	ND
221401	2014	Bursa	56
221402	2014	Bursa	27
M1403	2014	Timo	42
141404	2014	Bursa	47
171401	2014	Bursa	45
171403	2014	Bursa	42
361401	2014	Bursa	ND
361402	2014	Bursa	ND
31501	2015	Bursa	ND
201502	2015	Tonsila	40
211501	2015	Tonsila	17 semanas
171502	2015	Bursa	42
361501	2015	Bursa	ND
451502	2015	Tonsila	ND
051601	2016	Bursa	18 semanas
071601	2016	Bursa	49
181601	2016	Bursa	41
471602	2016	Bursa	48
471604	2016	Bursa	48

ND: no disponible

5.4. Caracterización genética de las cepas de CAV uruguayas utilizando el gen *vp1*

5.4.1. Amplificación y secuenciación

En todas las muestras uruguayas, diagnosticadas como positivas para CAV por PCR en tiempo real (Tabla 6), se intentó amplificar el fragmento de 2100 pb que contiene el gen completo *vp1*. En 25 de las 28 muestras uruguayas se obtuvo el amplicón esperado (Figura 14) el cual fue purificado y secuenciado bidireccionalmente.

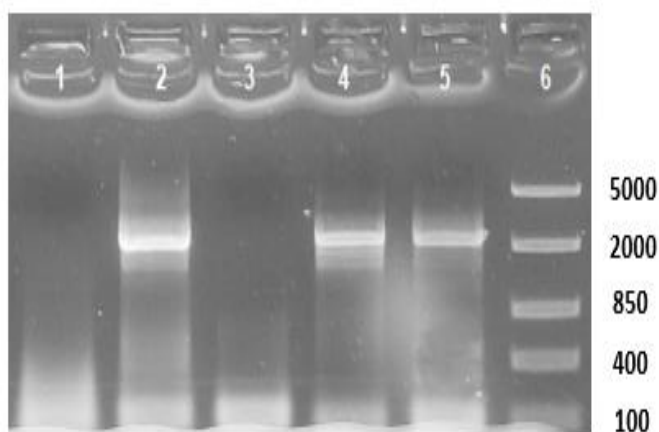


Figura 14. Amplificación del fragmento de 2100 pb que contiene el gen completo *vp1*. Carril 1: Blanco de PCR. Carril 2: Muestra 361402. Carril 3: Muestra 221403. Carril 4: Muestra 361501. Carril 5: Control Positivo (cepa vacunal Nobilis P4). Carril 6: Marcador de peso molecular Low Range, Thermo Fisher (se indican los tamaños en pares de bases).

5.4.2. Determinación de secuencias recombinantes

Previo a la realización de los análisis filogenéticos se implementó una búsqueda de secuencias recombinantes con los programas *SplitsTree4* y RDP4.

En este análisis se incluyeron todas las secuencias completas del gen *vp1* (1350 pb) disponibles en la base de datos del GenBank (206 secuencias) y las 25 secuencias uruguayas obtenidas en este estudio (anexo 2.a).

En la red filogenética obtenida con el programa *SplitsTree4* se definen claramente cuatro agrupaciones o clados: clado I formado únicamente por cepas de origen australiano, clado II formado por cepas de campo que circulan en diferentes partes del mundo, clado III formado por cepas estadounidenses, europeas, africanas, asiáticas, uruguayas y por todas las cepas vacunales que se han desarrollado hasta la fecha, y el clado IV formado únicamente por una cepa japonesa. Para mejor visualización de los clados se realizó una red filogenética utilizando sólo secuencias de referencias y las secuencias uruguayas (Figura 15).

Según el resultado del *Phi test* se encontró evidencia estadísticamente significativa de recombinación en el conjunto de datos analizado. Las cepas chinas SD22 y SD24 y las cepas taiwanesas 4 y 6 son posibles secuencias recombinantes y se encuentran unidas con líneas transversales al clado II y al clado III (clados parentales hipotéticos). Estas cepas habían sido previamente reportadas como recombinantes (He et al., 2007; Ou et al., 2018). Además confirmamos que los puntos de recombinación en todos los casos ocurrieron en el gen *vp1*. En ninguna de las cepas uruguayas se encontró evidencia de recombinación mediante estos análisis.

Seis de los siete algoritmos integrados en el paquete RDP4 identificaron que las secuencias nucleotídicas de *vp1* de las cepas chinas SD22 y SD24, y las cepas taiwanesas 4 y 6 son recombinantes.

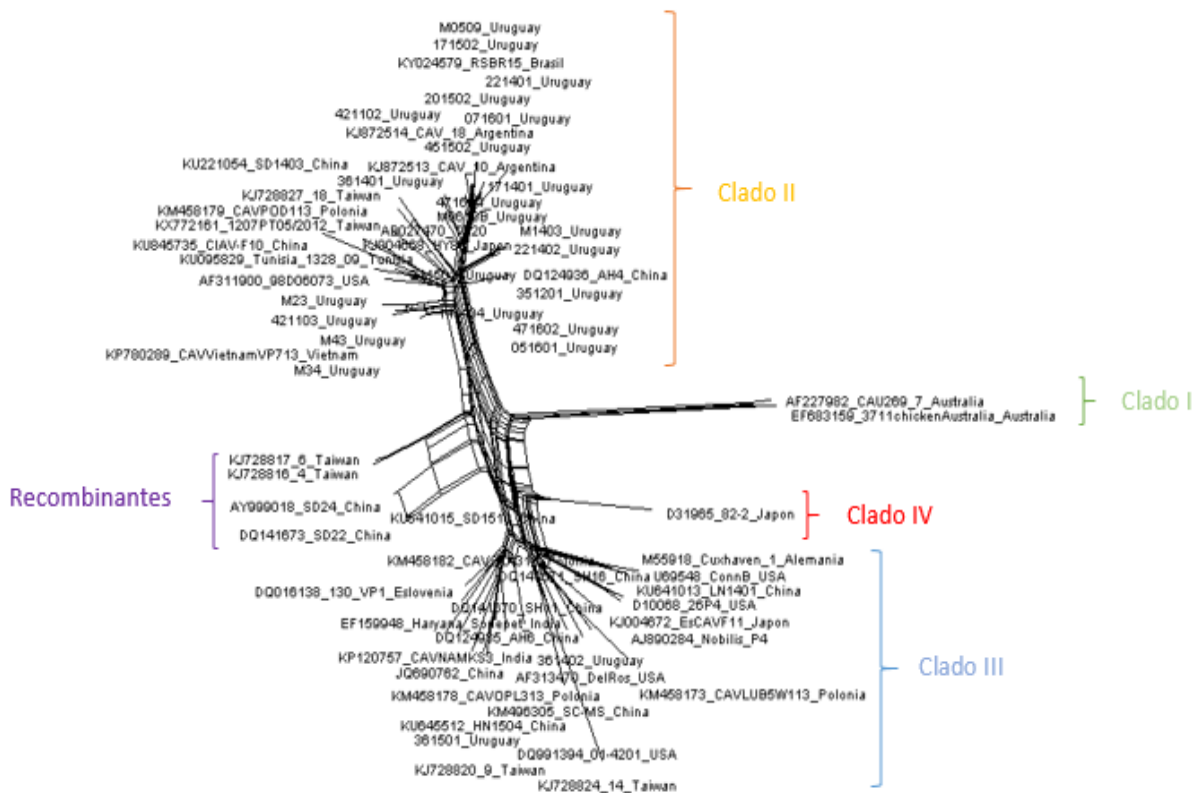


Figura 15. Red filogenética basada en la secuencia nucleotídica completa del gen *vp1* de secuencias de referencias de CAV. Se definen cuatro clados: clado I (en verde), clado II (en anaranjado), clado III (en azul) y clado IV (en rojo). En violeta se señala las cepas recombinantes.

Se realizó también este análisis con todas las secuencias parciales del gen *vp1* (726 pb) disponibles en la base de datos del GenBank (313 secuencias) y las 25 secuencias uruguayas obtenidas en este trabajo (anexo 2.b). En la red filogenética no se visualizaron eventos de recombinación y ninguno de los siete algoritmos integrados en el paquete RDP4 identificó secuencias recombinantes en estas cepas.

5.4.3. Análisis filogenéticos

5.4.3.1. Secuencia completa del gen *vp1*

Se realizaron dos análisis por máxima verosimilitud basados en la secuencia nucleotídica completa del gen *vp1*. En el análisis realizado con las 202 secuencias del GenBank y las 25 uruguayas (anexo 3.a) se aprecian cuatro clados (Figura 16); el clado I, integrado únicamente por cepas de origen australiano; el clado II, constituido por cepas de campo que circulan en diferentes partes del mundo; el clado III formado por cepas asiáticas, europeas, africanas, estadounidenses, uruguayas y todas las vacunales desarrolladas hasta la fecha y el clado IV formado únicamente por una cepa de origen japonés.

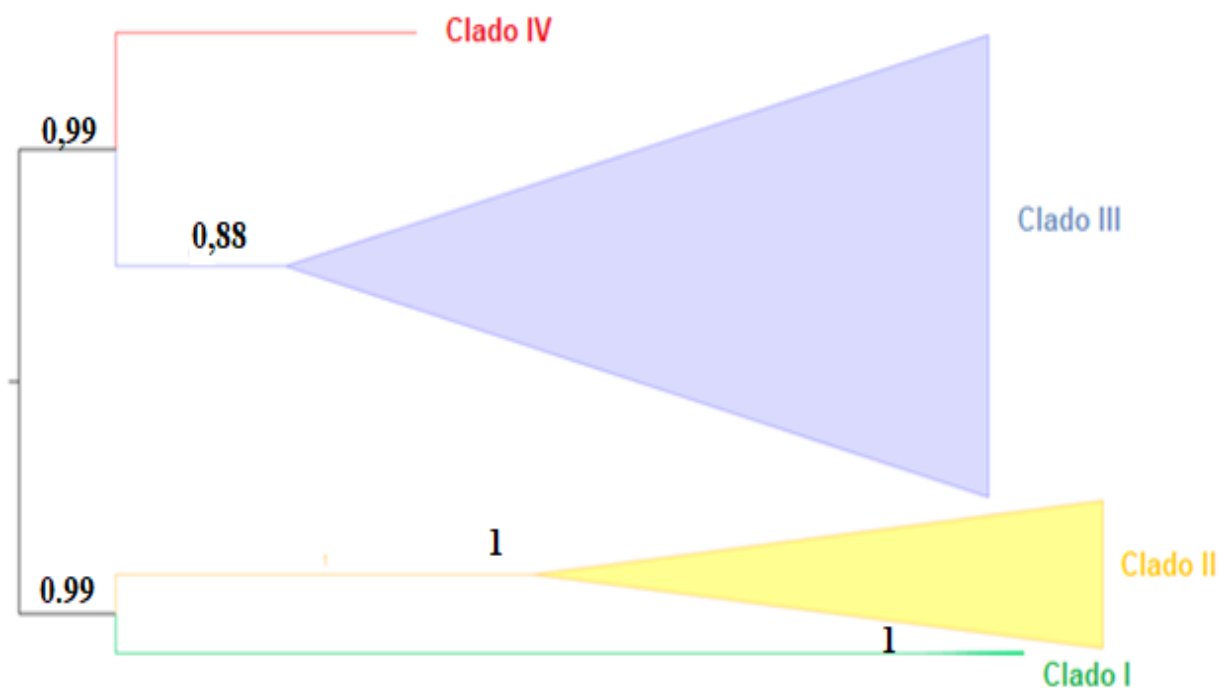


Figura 16. Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en todas las secuencias nucleotídicas completas de *vp1* (1350 pb) disponibles en la base de datos del GenBank junto con todas las secuencias uruguayas obtenidas en este trabajo. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el HKY+I+G. Se muestran los apoyos estadísticos de los principales nodos.

El análisis realizado con cepas representantes de los diferentes clados de CAV muestra la formación de los mismos clados (Figura 17). La cepa vacunal Nobilis P4 secuenciada en este trabajo se agrupa en el clado III, mientras que las cepas de campo uruguayas obtenidas en este estudio se agrupan en los clados II y III.

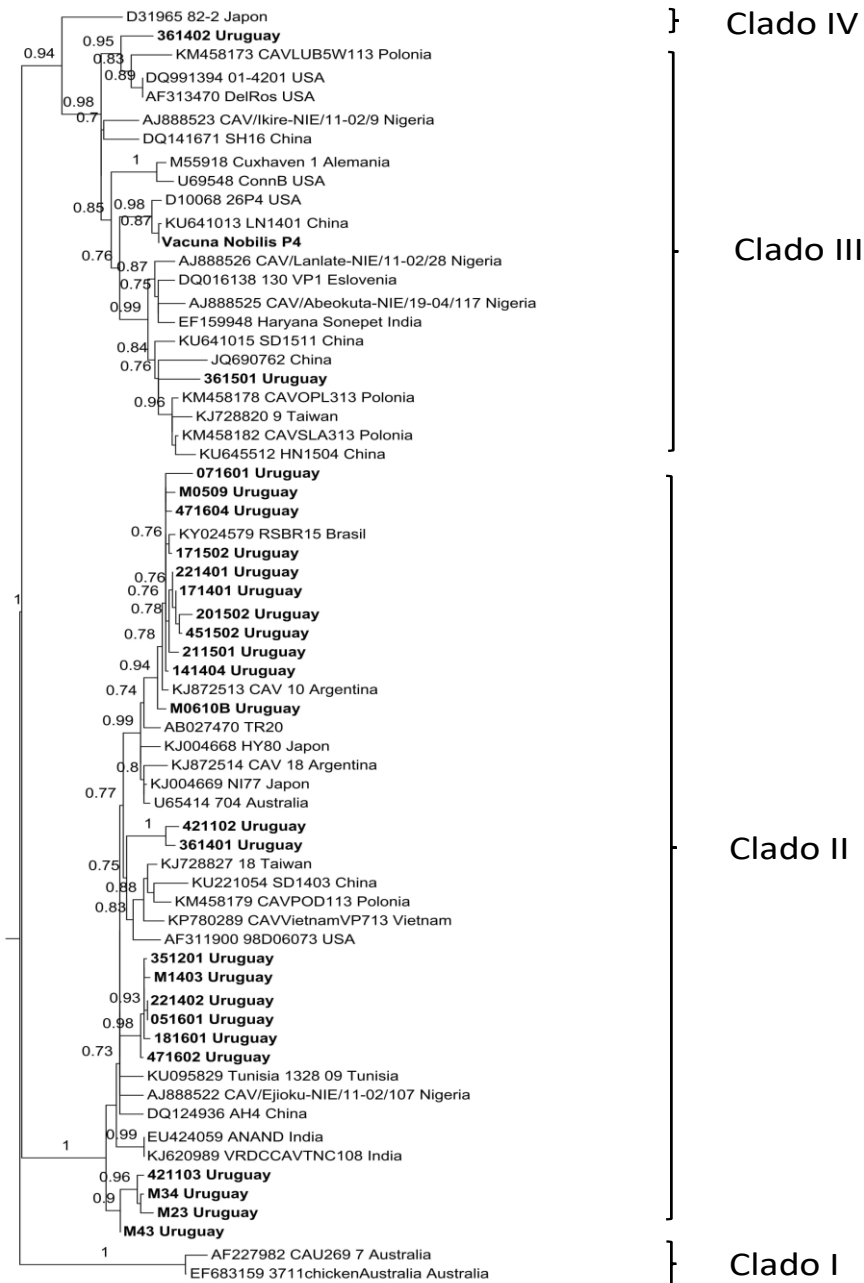


Figura 17. Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en secuencias nucleotídicas completas del gen *vp1* de cepas representantes de los diferentes clados de CAV y las secuencias uruguayas. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el HKY+I+G. Las secuencias obtenidas en esta tesis se indican en negrita. Se muestran los apoyos estadísticos de los principales nodos.

Las cepas uruguayas que se encuentran dentro del clado II se agrupan en cuatro subgrupos, presentando mayor identidad con cepas argentinas, africanas y asiáticas. Únicamente dos cepas uruguayas pertenecen al clado III (361501 y 361402). La cepa uruguaya 361501 presenta mayor identidad con cepas polacas, mientras que la cepa 361402 presenta mayor identidad con una cepa estadounidense y la cepa vacunal Del-Ros.

5.4.3.2. Secuencia parcial del gen *vp1*

Se realizaron dos análisis filogenéticos por máxima verosimilitud utilizando la secuencia parcial del gen *vp1* (726 pb), que contiene la región hipervariable de este gen. Esto se realizó con la finalidad de incorporar un mayor número de secuencias disponibles en la base de datos, en particular las secuencias sudamericanas (brasileras y argentinas). El primer análisis fue realizado con todas las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank (309 secuencias) y las 25 secuencias uruguayas obtenidas en este trabajo (anexo 3.b) (Figura 18), mientras que el segundo análisis se realizó con cepas representantes de los diferentes clados de CAV (Figura 19). En ambos análisis se observa la formación de los cuatro clados descritos en base a la secuencia completa del gen *vp1*.

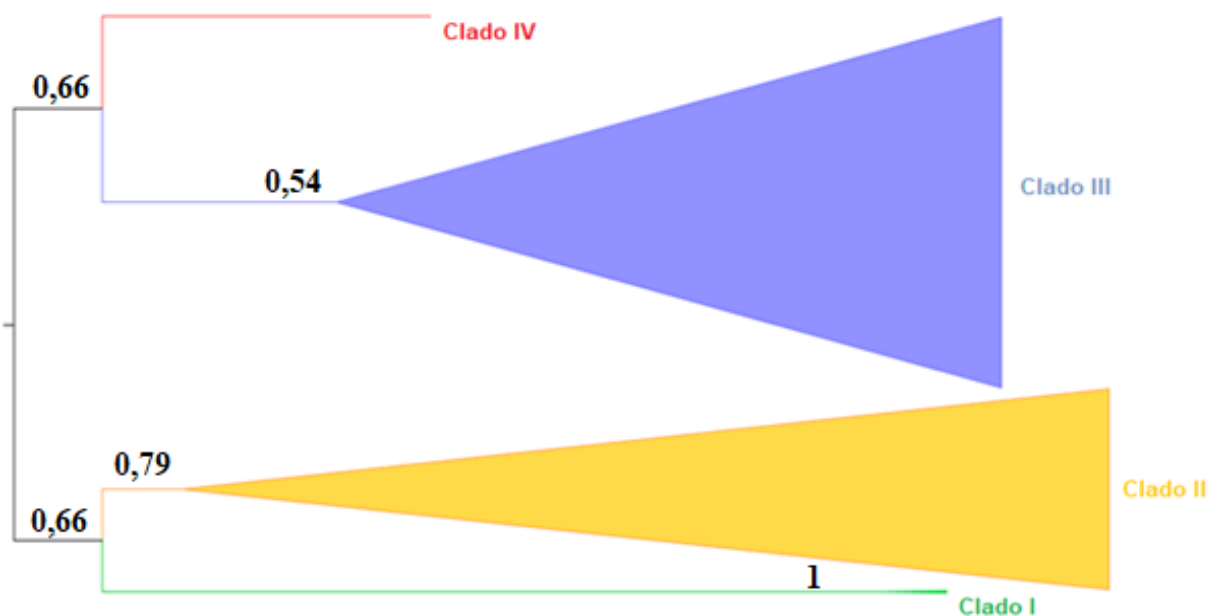


Figura 18. Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en todas las secuencias nucleotídicas parciales de *vp1* (726 pb) disponibles en la base de datos del GenBank junto con todas las secuencias uruguayas obtenidas en este trabajo. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el HKY+I+G. Se muestran los apoyos estadísticos de los principales nodos.

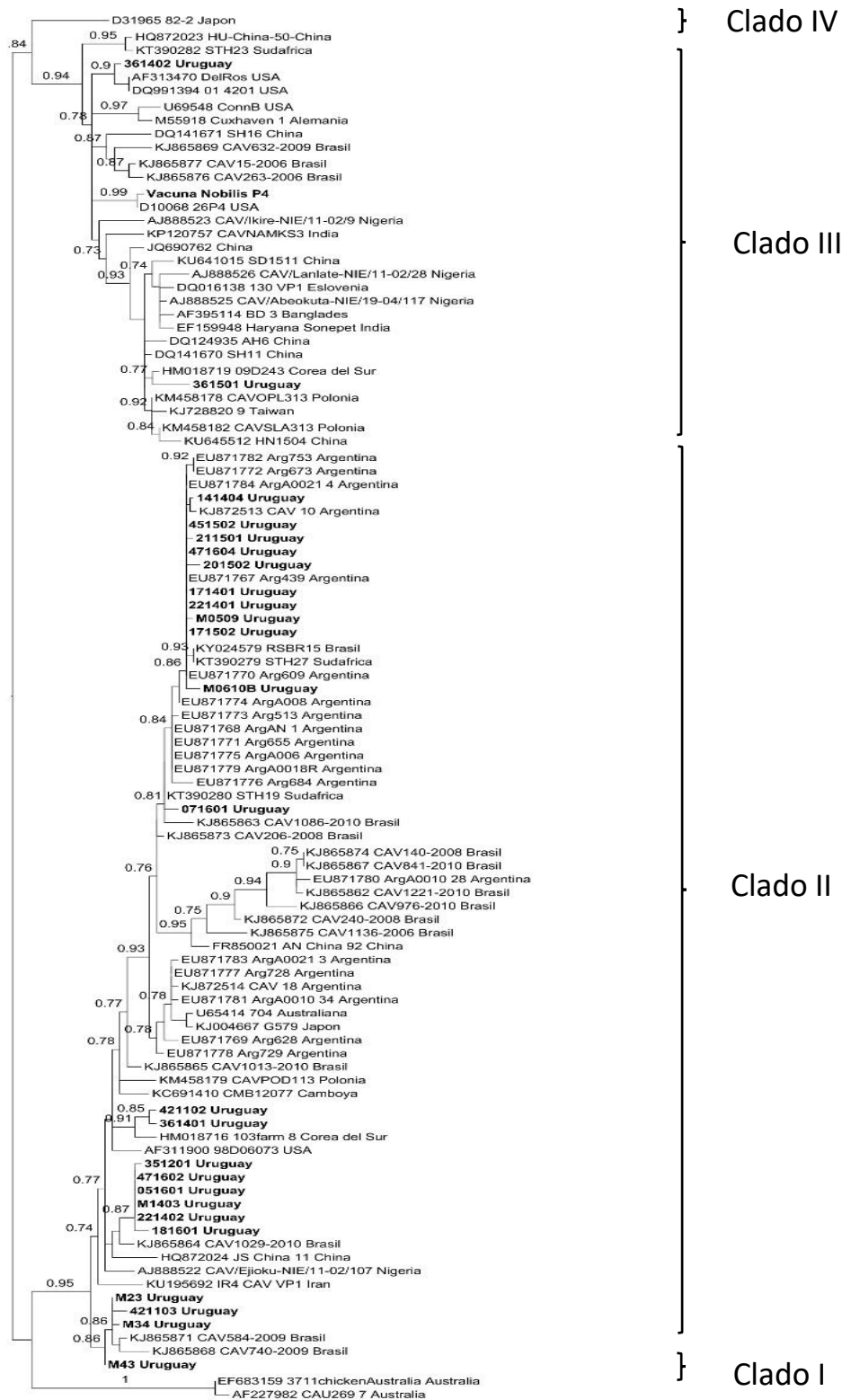


Figura 19. Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en secuencias nucleotídicas parciales de *vp1* (726 pb) de cepas representantes de los diferentes clados de CAV y las secuencias uruguayas. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el HKY+I+G. Las secuencias obtenidas en esta tesis se indican en negrita. Se muestran los apoyos estadísticos de los principales nodos.

Aquí también se observa que la cepa vacunal secuenciada en este trabajo agrupa en el clado III, mientras que las cepas de campo uruguayas agrupan en los clados II y III. Las cepas uruguayas del clado II agrupan en cinco subgrupos, presentando mayor identidad con cepas argentinas, brasileras, africanas y asiáticas.

En el clado III se incluyen, además de las cepas descritas anteriormente, cepas brasileras. La cepa uruguaya 361501 (clado III) presenta mayor identidad con cepas coreanas (que no tienen disponibles secuencias completas de *vp1*) mientras que la cepa 361402 (clado III) tiene mayor identidad con una cepa estadounidense y la cepa vacunal Del-Ros (al igual que sucede con el análisis basado en *vp1* completo).

5.4.4. Variabilidad nucleotídica y aminoacídica en VP1

5.4.4.1. Similitud nucleotídica y aminoacídica entre las cepas uruguayas y la cepa vacunal Nobilis P4

El análisis nucleotídico y aminoacídico de VP1 incluyó todas las cepas uruguayas obtenidas en este estudio y la cepa vacunal autorizada en nuestro país Nobilis P4. La similitud nucleotídica y aminoacídica intra-clado es mayor a 97%.

Las cepa uruguaya 361402 del clado III es la que presenta mayor identidad nucleotídica con respecto a la cepa vacunal (Tabla 7).

Tabla 7. Similitud nucleotídica y aminoacídica de VP1 entre las cepas uruguayas y la cepa vacunal Nobilis P4

clado	Similitud nucleotídica (%)		Similitud aminoacídica (%)	
	1	2	1	2
1-Cepas uruguayas III	97.04		97.77	
2-Cepas uruguayas II	94.67-96.07	97.63-100	97.55-99.78	98.89-100
3- Nobilis P4	97.48-98.00	94.59-96.00	97.77-98.22	97.55-98.00

Las diferencias aminoacídicas entre las cepas de campo uruguayas y las cepas vacunales Nobilis P4 y Del-Ros (muy utilizada en algunos países de la región) se observan en la Figura 20. La cepa 361402 es la cepa uruguaya que posee mayor identidad aminoacídica con la cepa vacunal Nobilis P4 y presenta sólo un cambio aminoacídico en la posición 22 con respecto a la cepa vacunal Del-Ros.

		Posición aminoacídica															
		22	75	92	97	139	144	157	242	254	287	290	370	413	447	448	
Clado II	141404_Uruguay	H	I	G	L	Q	Q	V	Y	E	T	P	S	A	S	Q	
	471604_Uruguay	
	471602_Uruguay	Q	A	
	181601_Uruguay	Q	A	
	071601_Uruguay	N	
	051601_Uruguay	Q	A	.	.	.	H	
	451502_Uruguay	H	
	171502_Uruguay	A	.	.	.	H	
	211501_Uruguay	
	201502_Uruguay	H	
	361401_Uruguay	N	S	A	.	.	H	
	171401_Uruguay	H	
	M1403_Uruguay	Q	A	A	.	.	.	
	221402_Uruguay	Q	A	.	.	.	H	
	221401_Uruguay	H	
	351201_Uruguay	Q	A	
	421103_Uruguay	S	A	T	.	.	
	421102_Uruguay	N	S	A	.	.	.	
	M0610B_Uruguay	
	M0509_Uruguay	
M43_Uruguay	S	A	.	.	.		
M34_Uruguay	S	A	T	.	H		
M23_Uruguay	S	A	.	.	T		
Clado III	361402_Uruguay	N	V	.	M	K	E	.	.	.	S	A	G	S	G		
	361501_Uruguay	A	A	.	.	H		
	Nobilis_P4	.	V	D	M	K	E	M	.	G	.	A	.	.	T		
	Del-Ros	.	V	.	M	K	E	.	.	.	S	A	G	S	G		

Figura 20. Análisis comparativo de la secuencia aminoacídica completa de VP1 de las cepas de campo uruguayas y las cepas vacunales Nobilis P4 y Del-Ros.

5.4.4.2. Similitud nucleotídica y aminoacídica intra-e inter- clado

El análisis nucleotídico y aminoacídico del clado I incluyó las 2 secuencias disponibles en GenBank. Para el clado II se analizaron 55 secuencias (23 secuencias uruguayas y 32 de otros países), en el clado III se analizaron 169 secuencias (2 secuencias uruguayas y 167 de otros países), y en el clado IV se consideró la única secuencia que lo conforma (anexo 3.a).

La similitud nucleotídica y aminoacídica varía dentro de los clados, siendo el clado III el más variable. Los niveles de identidad inter-clado son similares para todas las comparaciones (Tabla 8)

Tabla 8. Similitud nucleotídica y aminoacídica de VP1 a nivel intra- e inter-clado

clado	Similitud nucleotídica %				Similitud aminoacídica %			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
I (2)*	99.8				99.33			
II (55)*	93.78-95.11	96.8-100			96.66-98.66	97.1-100		
III(169)*	93.7-95.33	93.33-96.89	94.37-100		95.76-100	94.2-99.78	93.53-100	
IV(1)*	94.67-95.04	94.74-96.22	95.92-97.8	-	97.55-98.22	95.32-96.88	95.09-98.66	-

*entre paréntesis se especifica el número de secuencias que conforman el clado.

Las secuencias de *vp1* uruguayas presentaron 18 sustituciones nucleotídicas que no se habían observado en cepas de otras partes del mundo (Figura 21).

Cepa	Posición nucleotídica																	
	267	270	327	339	474	724	816	888	1011	1068	1074	1077	1080	1149	1155	1206	1275	1341
AJ988625_CAV/-NIE/1_Nigeria	A	G	G	G	C	T	G	C	C	G	G	G	C	T	A	C	G	G
EF159948_Haryana_Sonepet_India
KM458178_CAVOPL313_Polonia
KJ728820_9_Taiwan
361501_Uruguay	.	.	C	.	.	.	A	.	.	C	C
Vacuna_Nobilis_P4	C
AF313470_DelRos_USA	C
U69548_ConnB_USA	C
M55918_Cuxhaven_1_Alemania	C
AJ988623_CAV/-NIE/11-0_Nigeria	C
DQ141671_SH16_China	C
361402_Uruguay	T	C	T	.	A
DQ016138_130_VP1_Eslovenia	C
141404_Uruguay	.	.	.	T	T	C
471604_Uruguay	.	.	C	T	C
071601_Uruguay	.	.	C	.	A	T	T	C	T
451502_Uruguay	.	.	C	T	C
171502_Uruguay	.	.	C	T	C
211501_Uruguay	.	.	C	.	.	A	C
201502_Uruguay	.	.	C	.	.	.	T	.	.	T	C
171401_Uruguay	.	.	C	T	C
221401_Uruguay	.	.	C	T	C
M0610B_Uruguay	.	.	C	T	C
M0509_Uruguay	.	.	C	T	T
471602_Uruguay	.	C	C	T	C	T
181601_Uruguay	.	C	C	T	C
051601_Uruguay	.	C	C	T	C
221402_Uruguay	.	C	C	T	C
M1403_Uruguay	.	C	C	T	C
351201_Uruguay	G	C	C	T	C
421103_Uruguay	.	.	C	C	C
M43_Uruguay	.	.	C	C	C
M34_Uruguay	.	.	C	C	C
M23_Uruguay	.	.	C	C	C
421102_Uruguay	.	.	C	A	T	C	G
361401_Uruguay	.	.	C	A	T	C
KJ972613_CAV_10_Argentina	T	C
KJ972614_CAV_18_Argentina	T	C
KY024679_RSB15_Brasil	.	.	C	T	C
JQ908213_CL97_Chile	.	.	C	T	C
JQ908214_CL52_Chile	.	.	C	T	C	T	.	.
KM458179_CAVPOD113_Polonia	.	.	C	T	C
AJ988622_CAV/Ejioku-Nigeria	.	.	C	T	C	.	C	.	.	.	C	.
DQ124935_AH6_China	C
U65414_704_Australia	.	.	C	T	C
EF683159_3711_Australia	T	.	C	C

Figura 21. Sustituciones nucleotídicas de *vp1* específicas de las cepas uruguayas. Con un círculo en rojo se señala la única sustitución nucleotídica que provocó un cambio aminoacídico no observado en cepas de otras partes del mundo.

La cepa uruguaya 071601 fue la única que presentó un cambio aminoacídico no observado en cepas de otras partes del mundo. Este cambio fue en la posición aminoacídica 242 de VP1 (Tyr→Asn), que corresponde a la sustitución nucleotídica no sinónima de la posición 724 de *vp1* (señalada en rojo en la Figura 21).

5.5. Caracterización genómica de las cepas de CAV uruguayas basadas en la secuencia de genomas completos codificantes

5.5.1. Amplificación y secuenciación

Se seleccionaron 10 muestras uruguayas para obtener el genoma completo codificante. La elección se hizo en base al clado al cual pertenecían y al año de colecta (Tabla 9).

Tabla 9. Muestras uruguayas para las que se obtuvo el genoma completo codificante.

Muestra	Año de colecta	clado
M34	2005	II
M43	2007	II
M0610B	2010	II
421102	2011	II
351201	2012	II
141404	2014	II
M1403	2014	II
361402	2014	III
361501	2015	III
471602	2016	II

En las 10 muestras uruguayas el genoma se amplificó en dos fragmentos, el fragmento de 2100 pb que incluye *vp1* (Figura 14) y el fragmento de 722 pb que abarca las secuencias de los genes *vp2* y *vp3* (Figura 22).

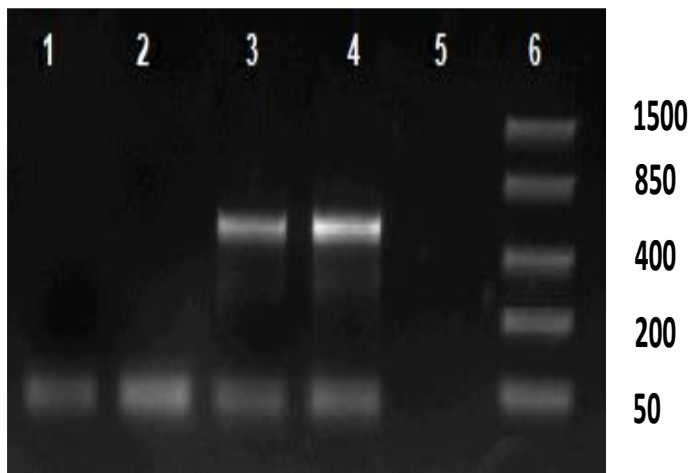


Figura 22. Amplificación del fragmento de 722 pb que contiene los genes *vp2* y *vp3*. Carril 1: Blanco de PCR. Carril 2: Muestra 221403. Carril 3: Muestra 361402. Carril 4: Control Positivo (cepa vacunal Nobilis P4). Carril 5:-. Carril 6: Marcador de peso molecular Low Range, Thermo Fisher (se indican los tamaños en pares de bases).

5.5.2. Determinación de secuencias recombinantes

Previo a la realización de los análisis filogenéticos se implementó una búsqueda de secuencias recombinantes con los programas *SplitsTree4* y RDP4. En este análisis se incluyeron todas las secuencias completas codificantes del genoma de CAV disponibles en la base de datos del GenBank (136 secuencias) y las 10 secuencias uruguayas obtenidas en este estudio (anexo 2.c).

Los resultados obtenidos en este análisis fueron los mismos que los presentados en la sección 5.4.2 para el gen *vp1*. Seis de los siete algoritmos integrados en el paquete RDP4 identificaron que los genomas de las cepas chinas SD22 y SD24 y las cepas taiwanesas 4 y 6 son recombinantes (He et al., 2007; Ou et al., 2018).

5.5.3. Análisis filogenéticos

Se realizaron dos análisis filogenéticos por máxima verosimilitud basados en la secuencia de genomas completos codificantes. En el análisis filogenético realizado con todas las secuencias disponibles del GenBank (132 secuencias) y las 10 secuencias uruguayas (anexo 3.c) se obtienen, al igual que con *vp1*, cuatro clados (Figura 23). El clado I está integrado únicamente por cepas de origen australiano. El clado II incluye cepas asiáticas, sudamericanas y australiana. El clado III está constituido por cepas asiáticas, estadounidenses, uruguayas y todas las vacunales desarrolladas hasta la fecha. El clado IV formado únicamente por la cepa de origen japonés.

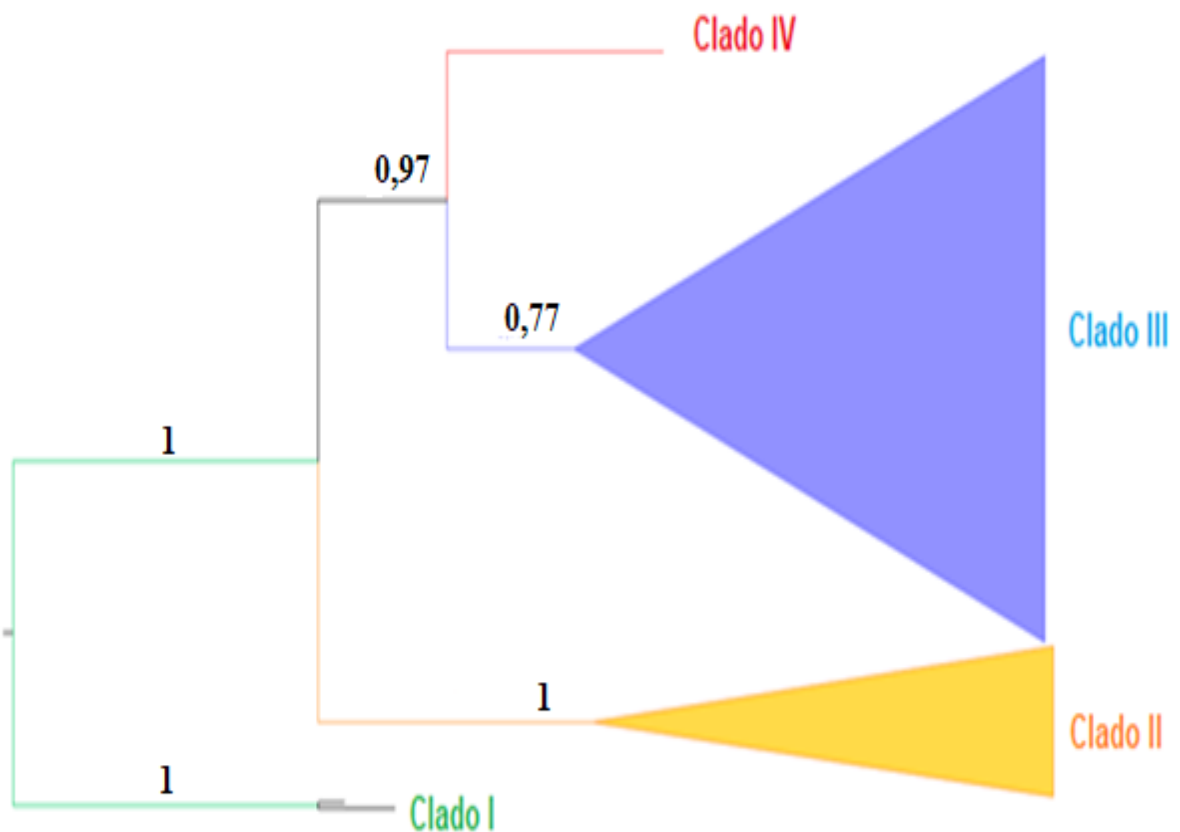


Figura 23. Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en todas las secuencias de genomas completos codificantes de CAV disponibles del GenBank junto con todas las secuencias uruguayas obtenidas en este trabajo. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el GTR+I+G. Se muestran los apoyos estadísticos de los principales nodos.

En el análisis filogenético realizado con cepas representantes de los diferentes clados de CAV se observa la formación de los cuatro clados descritos previamente (Figura 24). La cepa vacunal secuenciada en este trabajo se agrupa en el clado III, mientras que las cepas de campo uruguayas obtenidas en este estudio se agrupan en los clados II y III.

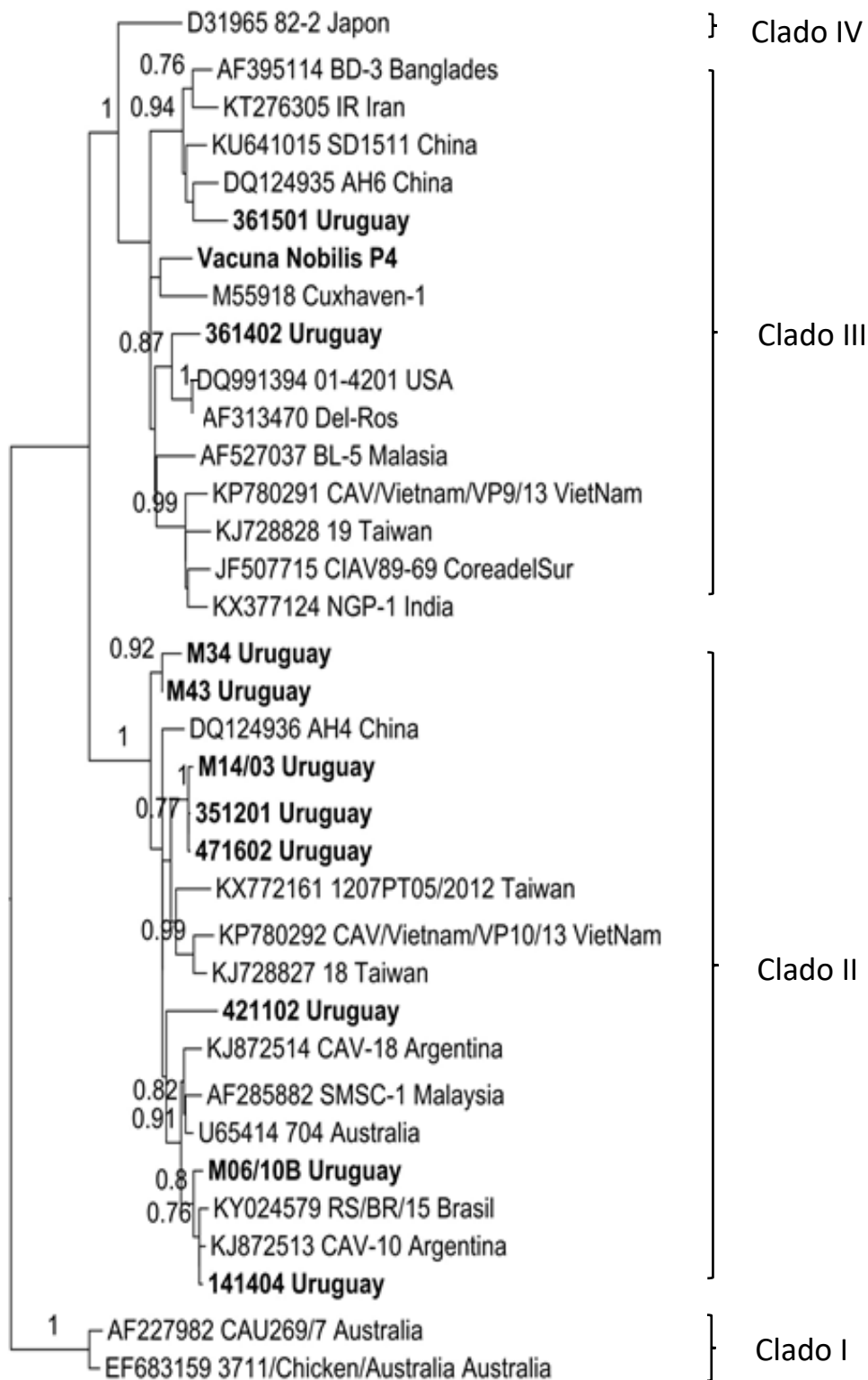


Figura 24. Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en secuencias de genomas completos codificantes de cepas representantes de los diferentes clados de CAV y las secuencias uruguayas. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a los datos fue el GTR+I+G. Las secuencias obtenidas en esta tesis se indican en negrita.

Las cepas uruguayas que se encuentran dentro del clado II presentan mayor identidad con cepas argentinas, brasileras y asiáticas. La cepa uruguaya 361501 (clado III) presenta mayor identidad con cepas chinas, mientras que la cepa 361402 (clado III) comparte gran identidad con una cepa estadounidense y la cepa vacunal Del-Ros.

5.5.4. Variabilidad nucleotídica y aminoacídica en VP2 y VP3

5.5.4.1. Similitud nucleotídica y aminoacídica entre las cepas uruguayas y la cepa vacunal Nobilis P4

El análisis nucleotídico y aminoacídico de VP2 y VP3 incluyó las 10 cepas uruguayas para las que se obtuvo la secuencia de genoma completo codificante y la cepa vacunal Nobilis P4.

Para el gen *vp2*, la identidad nucleotídica intra-clado es mayor a 98% y la identidad aminoacídica mayor a 99%. Con respecto a la cepa vacunal Nobilis P4, la cepa uruguaya 361402 del clado III es la que presenta mayor identidad de secuencia nucleotídica y aminoacídica (Tabla 10).

Para el gen *vp3*, la identidad nucleotídica intra-clado es mayor a 99% y la identidad aminoacídica mayor a 97%. Con respecto a la cepa vacunal Nobilis P4, las cepas uruguayas de ambos clados presentan similar identidad de secuencia nucleotídica y aminoacídica (Tabla 11)

Tabla 10. Similitud nucleotídica y aminoacídica de VP2 entre las cepas uruguayas y la cepa vacunal Nobilis P4

clado	Similitud nucleotídica (%)		Similitud aminoacídica (%)	
	1	2	1	2
1-Cepas uruguayas III	99.39		100	
2-Cepas uruguayas II	98.92-99.69	98.77-100	99.07-100	99.07-100
3-Nobilis P4	99.54	99.08-99.85	99.54	98.61-99.54

Tabla 11. Similitud nucleotídica y aminoacídica de VP3 entre las cepas uruguayas y la cepa vacunal Nobilis P4

clado	Similitud nucleotídica (%)		Similitud aminoacídica (%)	
	1	2	1	2
1-Cepas uruguayas III	99.18		97.52	
2-Cepas uruguayas II	98.91-99.73	99.18-100	96.69-99.17	98.35-100
3-Nobilis P4	99.45-99.73	99.45-100	98.35-99.17	98.35-100

Las diferencias aminoacídicas en VP2 y VP3 entre las cepas de campo uruguayas y las cepas vacunales Nobilis P4 y Del-Ros (muy utilizada en algunos paíes de la región) se observa en las tablas 12 y 13 respectivamente.

Tabla 12. Análisis comparativo de la secuencia aminoacídica de VP2 de las cepas de campo uruguayas y las cepas vacunales Nobilis P4 y Del-Ros.

Cepa	clado	Posición aminoacídica			
		5	169	177	180
351201/M14-03/471602	II	G	D	A	S
M34/M43/M06-10B/421102/141404	II	G	D	G	T
361402/361501	III	G	D	G	T
Nobilis P4	III	G	G	G	T
Del-Ros	III	D	D	G	T

Tabla 13. Análisis comparativo de la secuencia aminoacídica de VP3 de las cepas de campo uruguayas y las cepas vacunales Nobilis P4 y Del-Ros.

Cepa	clado	Posición aminoacídica				
		21	31	54	64	73
421102	II	N	R	A	S	V
M34/M43/M06-10B/M14-03/141404/471602	II	S	R	A	N	V
361402	III	S	R	A	N	A
361501	III	S	K	V	N	V
Nobilis P4/ Del-Ros	III	S	R	A	N	V

5.5.4.2. Similitud nucleotídica y aminoacídica intra-e inter-clado.

El análisis nucleotídico y aminoacídico del clado I incluyó las 2 secuencias disponibles del GenBank. Para el clado II se analizaron 29 secuencias (8 secuencias uruguayas y 21 secuencias disponibles en la base de datos), para el clado III se analizaron 110 secuencias (2 secuencias uruguayas y 108 secuencias disponibles en la base de datos) y el clado IV incluyó la única secuencia que lo conforma (anexo 3.c).

Para VP2 los clados I, II y III presentan similitudes nucleotídicas equivalentes a nivel intra-clado. No ocurre lo mismo con las similitudes aminoacídicas, siendo el clado I (representado únicamente por dos secuencias) el que presenta la mayor identidad y el clado III el que presenta la menor. Se observan niveles de identidad nucleotídica inter-clado muy similares para todas las comparaciones. La mayor identidad aminoacídica inter-clado se observa entre los clados I-IV y la menor entre los clados II-III (Tabla 14)

Para VP3 los clados I, II y III difieren en la similitud nucleotídica y aminoacídica a nivel intra-clado, siendo las dos cepas del clado I las que presentan la mayor identidad, y las del clado III la menor. Se observan niveles de identidad nucleotídica inter-clado muy similares para todas las comparaciones. La mayor identidad aminoacídica inter-clado se observa entre los clados II-IV y la menor entre los clados I-II y I-III (Tabla 15)

Tabla 14. Similitud nucleotídica y aminoacídica de VP2 a nivel intra- e inter-clado

clado	Similitud nucleotídica %				Similitud aminoacídica %			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
I (2)*	99.69				99.07			
II (29)*	98.31-99.23	98.31-100			97.69-99.54	97.22-100		
III(110)*	98.16-99.23	97.7-99.85	98.16-100		97.22-99.54	95.83-100	95.83-100	
IV(1)*	98.46	98-99.39	98.31-99.54	-	99.07	97.69-99.54	97.22-99.54	-

*entre paréntesis se especifica el número de secuencias que conforman el clado.

Tabla 15. Similitud nucleotídica y aminoacídica de VP3 a nivel intra- e inter-clado

clado	Similitud nucleotídica %				Similitud aminoacídica %			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
I (2)*	99.45				98.35			
II (29)*	97.81-99.18	98.09-100			94.21-97.52	95.87-100		
III(110)*	97.54-98.91	97.81-100	97.81-100		94.21-97.52	95.04-100	95.04-100	
IV(1)*	98.36	98.63-99.73	98.63-99.73	-	95.87	97.52-99.17	96.69-99.17	-

*entre paréntesis se especifica el número de secuencias que conforman el clado.

La secuencia uruguaya 361402 fue la única que presentó una mutación en los genes *vp2* y *vp3* (genes solapados y con corrimiento del marco de lectura) que no se había observado en cepas de otras partes del mundo (Figura 25). Para el gen *vp2* es una mutación sinónima (posición 324) ya que no provoca cambio de aminoácido, mientras que para el gen *vp3* es una mutación no sinónima (posición 218 Val→Ala).

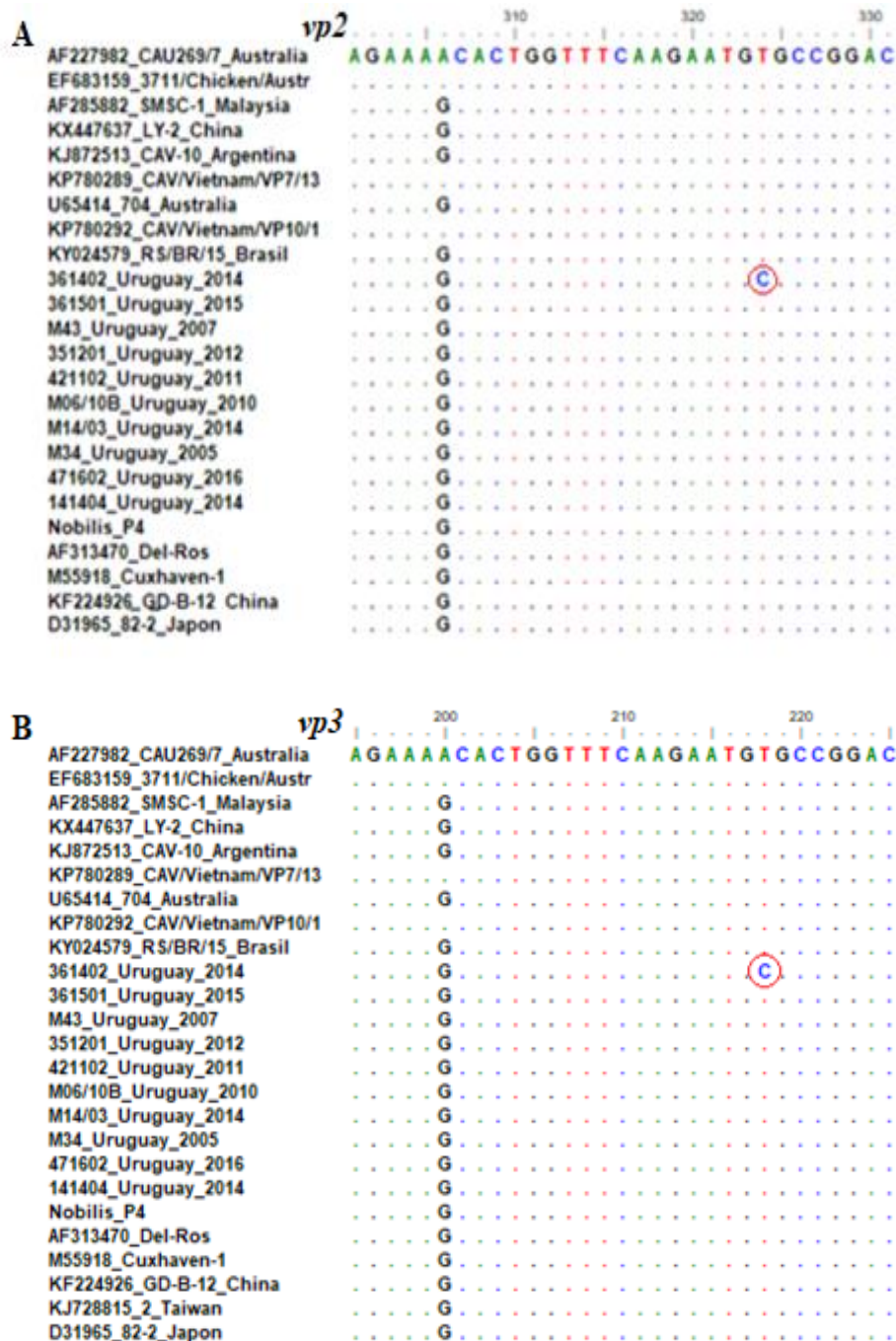


Figura 25. A) Posición nucleotídica en *vp2* de la mutación observada solo en la muestra uruguaya 361402. B) Posición nucleotídica en *vp3* de dicha mutación.

5.6. Análisis de coalescencia

A través de análisis de coalescencias se estimó la edad del ancestro común más reciente (tMRCA) de todas las secuencias de *vpI* completas (1350 pb) y parciales (726 pb) disponibles en el NCBI y las secuencias uruguayas obtenidas en este trabajo. Además se estimaron la tasa de sustitución (sustituciones/sitio/año) y el tMRCA de los clados II y III.

En todos los análisis de coalescencia el reloj molecular que mejor se ajustó a los datos analizados fue el relajado. Este modelo permite que los diferentes linajes evolucionen a distinta velocidad.

El tMRCA calculado para todas las secuencias completas de *vpI* disponibles (154 sec) es de 116 años (Figura 26), lo que indica que el ancestro se habría alrededor de 1900 (HPD 1853-1938). En base a las secuencias de *vpI* parcial (281 sec) el tMRCA es de 93 años (Figura 27), lo que indica que el ancestro se habría originado alrededor de 1923 (HPD 1901 - 1953). La tasa de sustitución global para el análisis con *vpI* completo es de $4,3 \times 10^{-4}$ sustituciones/sitio/año y para el de *vpI* parcial es de $6,3 \times 10^{-4}$ sustituciones/sitio/año.

El tMRCA calculado para el clado II con el primer *dataset* de secuencias (*vpI* completo) es de 52 años, lo que indica que el ancestro de este clado se habría originado en 1964 (HPD 1954-1973) (Tabla 16). Con el segundo *dataset* de secuencias (*vpI* parcial) el tMRCA es de 55 años y el origen en 1961 (HPD 1952-1974) (Tabla 16). Con el tercer *dataset* de secuencias el tMRCA es de 44 años y el origen en 1972 (HPD 1962-1977) (Tabla 16). Con el cuarto *dataset* de secuencias el tMRCA es de 49 años y el origen en 1967 (HPD 1947-1977) (Tabla 16).

El tMRCA calculado para el clado III con el primer *dataset* de secuencias (*vpI* completo) es de 52 años, lo que indica que el ancestro de este clado se habría originado en 1964 (HPD 1954-1971) (Tabla 16). Con el segundo *dataset* de secuencias (*vpI* parcial) el tMRCA es de 56 años y el origen en 1960 (HPD 1954-1973) (Tabla 16). Con el tercer *dataset* de secuencias el tMRCA es de 47 años y el origen en 1968 (HPD 1961 -1973) (Tabla 16). Con el cuarto *dataset* de secuencias el tMRCA es de 49 años y el origen en 1966 (HPD 1954-1973) (Tabla 16).

Si consideramos las medias geométricas de los tMRCA para los clados II y III, se observa en la tabla 16 que ambos clados tienen similar origen en el tiempo.

Tabla 16. Edad del ancestro común más reciente (tMRCA) de los clados II y III con su correspondiente intervalo de confianza (HPD 95%) y tasa de sustitución (sustituciones/sitio/año) de los clados II y III con su correspondiente intervalo de confianza.

Región analizada	clado	tMRCA	HPD 95%	Tasa de sustitución	HPD 95%
VP1 completo	II <i>dataset 1</i>	52	43-62		
VP1 parcial	II <i>dataset 2</i>	55	42-64		
VP1 completo	II <i>dataset 3</i>	44	39-54	$4,5 \times 10^{-4}$	$2,6 \times 10^{-4} - 6,9 \times 10^{-4}$
VP1 parcial	II <i>dataset 4</i>	49	39-69	$3,5 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-4} - 5,7 \times 10^{-4}$
VP1 completo	III <i>dataset 1</i>	52	45-62		
VP1 parcial	III <i>dataset 2</i>	56	43-62		
VP1 completo	III <i>dataset 3</i>	47	42-54	$3,5 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-4} - 4,5 \times 10^{-4}$
VP1 parcial	III <i>dataset 4</i>	49	42-61	$5,3 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-4} - 6,9 \times 10^{-4}$

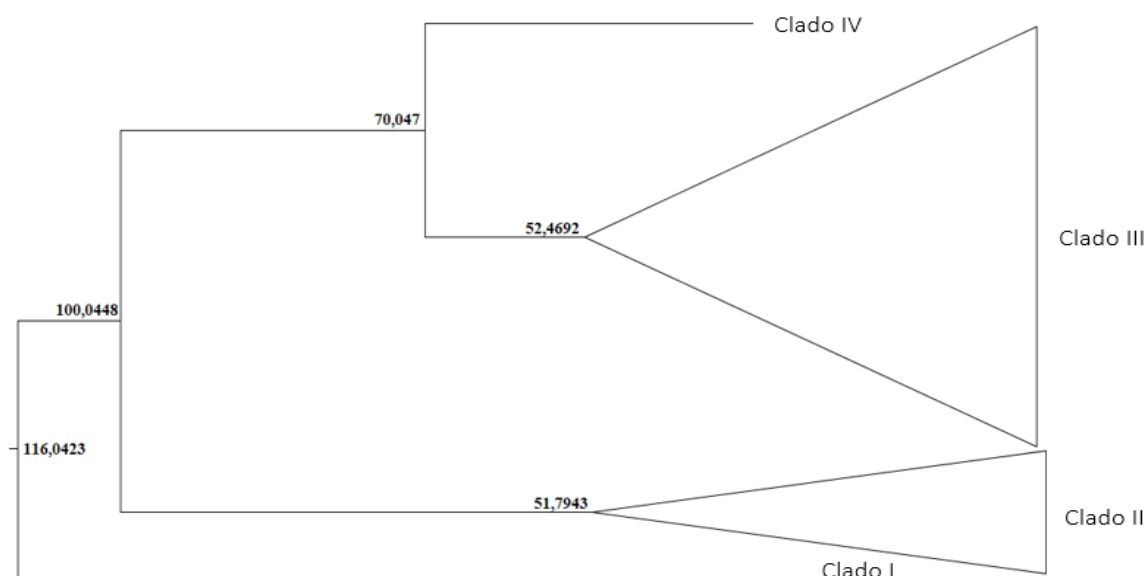


Figura 26. Reconstrucción filogenética datada basada en la secuencia nucleotídica completa de *vp1* de todas las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank para los cuatro clados y las cepas uruguayas obtenidas en este trabajo. Se indica, en los nodos, la edad en años del ancestro común más reciente.

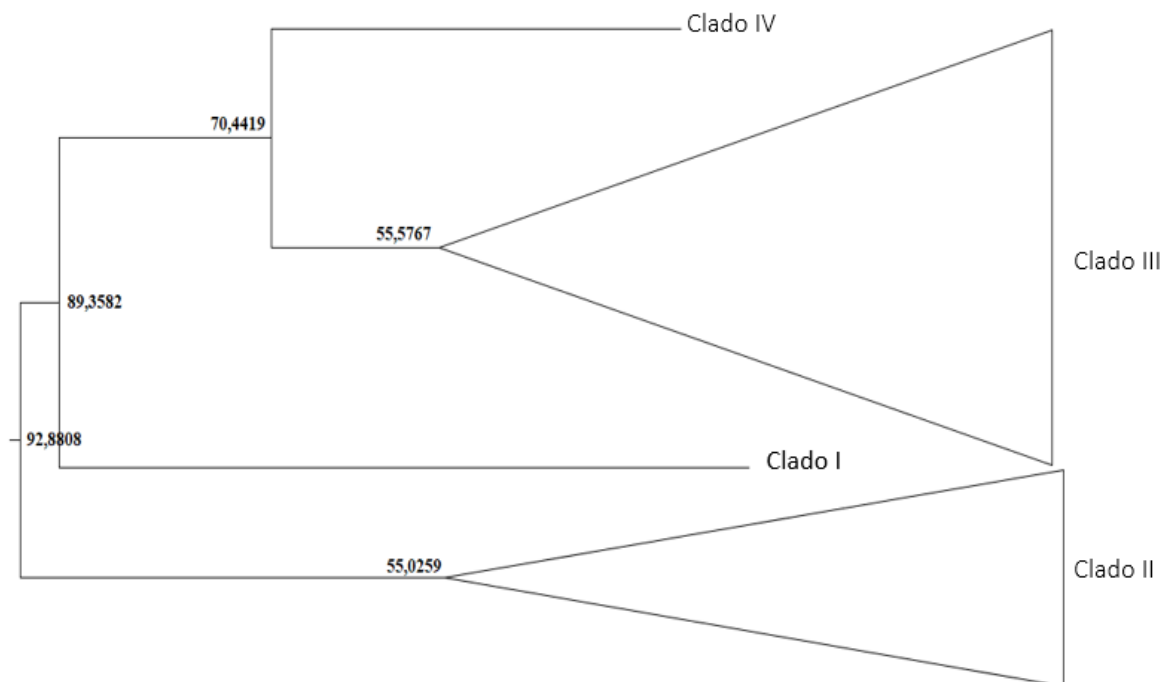


Figura 27. Reconstrucción filogenética datada basada en la secuencia nucleotídica parcial de *vp1* (726 pb) de todas las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank para los cuatro clados y las cepas uruguayas obtenidas en este trabajo. Se indica, en los nodos, la edad en años del ancestro común más reciente.

6. Discusión

6.1. Ensayo de diagnóstico y cuantificación de CAV basado en PCR en tiempo real

El diagnóstico clínico de CAV es dificultoso debido a que la enfermedad suele presentarse en sus formas más leves y pasa desapercibida. Por esta razón, es necesario desarrollar métodos de diagnóstico más rápidos y sensibles, como los basados en PCR en tiempo real, que complementen la clínica. Considerando la distribución mundial del virus y su variabilidad, estos métodos deben de ser lo suficientemente robustos para poder aplicarse en cepas de diferentes procedencias.

Existen algunos métodos de diagnóstico de CAV basados en PCR en tiempo real (Tabla 17) que presentan una o varias desventajas importantes. Una de las más recurrentes es el diseño en base a regiones altamente variables, como es el caso del gen *vp1*. Esta región genómica es la más estudiada porque permite clasificar las cepas y porque contiene los epítopes neutralizantes. La alta variabilidad dificulta su utilidad como blanco para el diseño de métodos de diagnóstico, ya que hay una alta probabilidad de que existan cepas de CAV que escapen a su detección (Davidson et al., 2013; Varela et al., 2014). Otros métodos tienen el inconveniente de haber sido diseñados en base a cepas específicas (Markowski-Grimsrud et al., 2002), o en base a pocas secuencias (Varela et al., 2014). También existen métodos que utilizan sondas de hibridación FRET (en el gen *vp1*) que no detectan todas las cepas circulantes (van Santen et al., 2004). Algunos estudios han empleado SYBR-Green como fluorocromo (Rimondi et al., 2014) aunque este suele ser menos específico que las sondas fluorescentes.

Sin considerar diseño de los métodos, un inconveniente muy frecuente es la ausencia de una correcta validación. La correcta validación consiste en evaluar la especificidad, sensibilidad clínica y desempeño analítico del ensayo y es fundamental para asegurar su buen funcionamiento.

Tabla 17. Resumen de los métodos de diagnóstico desarrollados hasta la fecha para CAV.

Referencia	Región blanco	Sistema de Detección	Validación	Estándares en curva de calibración	Rango dinámico	E	R ²	Variación intra-esy	Variación inter-esy
Markowski-Grimsrud et al., 2002	<i>vp1</i>	Sonda de Hidrólisis	Parcial	Plásmido	10 ¹ -10 ⁷	107 %	0,998	-	-
van Santen et al., 2004	<i>vp2</i>	Sonda de hibridación	Parcial	Plásmido	10 ² -10 ⁵	107,9 %	1.0	-	-
Davidson et al., 2013	<i>vp1</i>	Sonda de Hidrólisis	Parcial	Plásmido	10 ² -10 ⁶	109,9 %	0,995	-	-
Rimondi et al., 2014	<i>vp2-vp3</i>	SYBR Green	No						
Varela et al., 2014	<i>vp1</i>	Sonda de Hidrólisis	Parcial	Plásmido					
Olszewska-Tomczyk et al., 2016	<i>vp1</i>	Sonda de Hidrólisis	No						

E: Eficiencia. R²: Coeficiente de determinación. esy: ensayo.

En el presente trabajo se desarrolló y validó por primera vez en Uruguay, una metodología de diagnóstico molecular de CAV basada en PCR en tiempo real. Para esto se diseñó un juego de cebadores (CAV-F 630 y CAV-R 756) y una sonda de hidrólisis. El ensayo amplifica y detecta una región de 127 pb de la región solapada de los genes *vp2* y *vp3* del genoma viral. Se eligió esta región porque existen antecedentes que indican que las regiones correspondientes a genes solapados son particularmente conservadas (Hughes et al., 2001; Pavesi et al., 2006) lo que la convierte en un blanco ideal para ensayos de diagnóstico. El ensayo molecular desarrollado en el presente trabajo presenta ventajas frente a otras técnicas de diagnóstico alternativas ya que es rápido, específico y sensible. Estas características son muy valoradas por los profesionales veterinarios porque les permite aplicar medidas de control rápidamente.

A partir de esta metodología se estandarizó un ensayo para la cuantificación absoluta y precisa de la carga viral de CAV en futuros estudios. La curva estándar obtenida tuvo una eficiencia (E) de 96,1%, un coeficiente de determinación (R²) de 0,9987 y un límite de cuantificación (LOQ) inferior de 100 copias. Estos resultados están dentro de los valores considerados como muy satisfactorios, por lo tanto los datos y conclusiones que se pueden obtener a partir de esta curva estándar son totalmente válidos. Además los bajos valores de los CVs intra e inter-ensayo avalan la reproducibilidad que tiene este ensayo (Tabla 6).

Es importante destacar que la aplicación de esta metodología en muestras de campo reveló una alta prevalencia de este virus en las muestras analizadas (33%). Esto nos ha permitido crear conciencia de la importancia de CAV en el ámbito veterinario ya que las infecciones

inmunosupresoras, como la producida por CAV, tienen efectos muy negativos en la cadena productiva avícola. CAV pueden alterar la eficacia de la vacunación y afectar la gravedad de otras infecciones. Una infección por CAV puede disminuir la inmunidad vacunal para otros patógenos aviares, ya que al eliminar los linfocitos T citotóxicos se produce una disminución de la inmunidad protectora (Schat et al., 2009). Se observa también que pollos infectados con CAV, y posteriormente con virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV) presentaron síntomas y lesiones características de bronquitis más severas que aquellas presentes en pollos infectados únicamente con IBV (Toro et al., 2006). Las infecciones primarias de cepas de CAV al causar depleción de linfocitos, estarían generando inmunosupresión y aumentando la susceptibilidad de los pollos al virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV) y probablemente a otros virus aviares.

6.2. Origen y divergencia genética de CAV

Los resultados obtenidos en esta tesis, permitieron establecer que el ancestro común más reciente de CAV se habría originado alrededor de 1900 (según los análisis de *vp1* completo) o 1923 (con secuencias parciales de *vp1*). Esta diferencia en los resultados puede deberse a que en el segundo análisis el número de secuencias disponibles era mayor y con mejor representación de años, obteniéndose así un resultado más preciso. CAV se detectó inicialmente en Japón en 1979, en Europa en 1981 y en EEUU en 1989. Posteriormente se demostró la presencia de anticuerpos específicos contra CAV en sueros de pollos en EEUU en 1959 (Schat et al., 2009). Por lo tanto el primer reporte de CAV fue 36 años después de su supuesto origen. Dos factores pudieron favorecer a la detección tardía de CAV; la manifestación subclínica de la enfermedad y la existencia de pocas herramientas metodológicas para la detección de nuevos virus en ese periodo. Resulta interesante que el ancestro de las variantes actuales de CAV haya surgido durante el inicio del desarrollo de la avicultura industrial, aunque previo a su auge. Es posible que la variante ancestral tuviera alguna ventaja selectiva en ambientes de encierro, con mayor densidad de aves y sometidos a ciclos de cría rápida; esto le habría permitido expandirse y reemplazar variantes previas. La avicultura comercial comenzó su desarrollo en la década de 1920 con el descubrimiento de la vitamina D, lo cual permitió la sobrevivencia de las aves en los meses de invierno y el confinamiento en lugares cerrados y techados. El auge en la avicultura mundial se produjo recién en el periodo 1950-1970, ya que fue

en esa etapa que ocurrieron grandes avances en la nutrición, la mejora genética de las aves de corral, el aumento de la mecanización y el programa de erradicación de enfermedades (Gordon, 1996).

6.3. Mecanismos de variabilidad genética de CAV

6.3.1. Tasas de sustitución nucleotídica

La tasa de sustitución es un parámetro crítico para la comprensión de la evolución de los virus, dado que las restricciones en la diversidad genética dentro de una población viral puede conducir a una menor adaptabilidad y patogenicidad (Denison et al., 2011). A pesar de su importancia, este parámetro no se había establecido para CAV. En este trabajo se obtuvieron las primeras tasas de sustitución reportadas para este virus. Los valores obtenidos son extremadamente altos y similares a las tasas de evolución estimadas para los demás *Anellovirus*, entre $2,79 \times 10^{-4}$ y $8,63 \times 10^{-4}$ sustituciones /sitio /año (Cadar et al., 2013), y para otros virus ADN simple hebra de mamíferos (Shackelton et al., 2005; Pereira et al., 2006; Maya et al., 2013). Estos valores son llamativos porque CAV es replicado por la maquinaria de ADN celular que suele funcionar con alta fidelidad. Sin embargo, es posible que solo un subconjunto de esta maquinaria se use para replicar el genoma de CAV. El molde simple hebra del genoma de CAV o los mecanismos utilizados para su replicación podrían también estar alterando la eficacia o la precisión de las polimerasas utilizadas. Además, los mecanismos de revisión y reparación pueden no ser tan activos o eficientes en estos genomas o en una célula infectada. Alternativamente, la falta de una doble hélice puede dejarlos vulnerables a procesos mutacionales como la oxidación, metilación y desaminación de bases nitrogenadas (Domingo et al., 1997; Shackelton et al., 2005; Walsh & Xu, 2006)

Esta alta tasa de sustitución de CAV explica la diversidad que este virus ha alcanzado desde su emergencia, reflejada en la divergencia de sus genes y en la existencia de diversos grupos (clados) que se observan en los árboles filogenéticos.

Al realizar el análisis de divergencia genética de los genes *vp1*, *vp2* y *vp3* de todas las secuencias disponibles en la base de datos y las uruguayas obtenidas en este trabajo, encontramos que los valores máximos de diversidad nucleotídica fueron de 6,67% (*vp1*), 2,3% (*vp2*), y 2,46% (*vp3*). A nivel aminoacídico los valores fueron de 6,47% (VP1),

4,17% (VP2) y 5,79% (VP3). Se observa claramente que la secuencia codificante de *vp1* es más diversa a nivel nucleotídico y aminoacídico que los otros dos genes de CAV, corroborando resultados previos (Ducatez et al., 2006). Esto puede ser consecuencia de las funciones de cada una de las proteínas y a la organización genómica de CAV, ya que los genes *vp2* y *vp3* están solapados y presentan corrimiento en una posición del marco de lectura. Las secuencias solapadas tienen bajas tasas de evolución y son regiones más conservadas en la mayoría de los genomas virales ADN y ARN. En IBDV (virus de Gumboro), los genes *vp2* y *vp5* están solapados y presentan un corrimiento en el marco de lectura, lo que genera que evolucionen bajo diferentes presiones selectivas. La proteína estructural VP2 (cápside viral) presenta selección negativa o purificadora mientras que la proteína no estructural VP5 puede cambiar en forma más libre. La proteína VP2 presenta mayores restricciones funcionales o estructurales que VP5, que sería una proteína con un rol regulador menos relevante y de más reciente origen evolutivo (Hernández et al., 2010). Esto puede estar ocurriendo en CAV y podría explicar la menor diversidad aminoacídica observada en VP2 con respecto a la proteína reguladora VP3.

6.3.2. Recombinación en CAV

La recombinación cumple un papel importante en la evolución de muchos virus y es esencial para generar y mantener la diversidad genética de los mismos (Li et al., 2017). Los procesos por los cuales ocurre la recombinación dentro de los virus ADN simple hebra todavía están poco caracterizados pero posiblemente involucren una cantidad de mecanismos diferentes. Como la recombinación homóloga requiere moléculas en doble hebra, estos virus podrían recombinar como consecuencia de un desprendimiento prematuro del complejo de replicación. Este desprendimiento puede darse por choques entre complejos de transcripción y las enzimas de replicación o por roturas monocatenarias en el intermediario replicativo de doble hebra. Si la replicación se reinicia en una molécula distinta de aquella en la que se inició, los genomas resultantes serán recombinantes generados por un mecanismo conocido como *copy-choice*, típico de los virus con genoma de ARN (Martin et al., 2011).

Como sucede con la mayoría de los virus de ADN, la recombinación en CAV se describe en muy baja frecuencia (Li et al., 2017). Los eventos de recombinación inter o intra-clados en cepas de campo de CAV son poco frecuentes (He et al., 2007; Eltahir et al.,

2011; Zhang et al., 2013; Li et al., 2017; Ou et al., 2018). En la mayoría de los trabajos se observa que el punto de recombinación (*breakpoint*) ocurre en las regiones codificantes del genoma, sobre todo en el gen *vp1*. Nosotros analizamos todas las secuencias disponibles de *vp1* y de genomas completos codificantes y confirmamos cuatro eventos de recombinación entre clados mayores (inter-clado) en las cepas chinas SD22 y SD24 (He et al., 2007), y las cepas taiwanesas 4 y 6 (Ou et al., 2018). En todos los casos el punto de recombinación ocurrió en el gen *vp1*. No detectamos ningún evento de recombinación entre cepas más estrechamente relacionadas (intra-clado) a pesar de que estos eventos han sido descritos previamente (Elthair et al., 2011). Esto puede deberse a que los métodos utilizados para detectar recombinación tienen un rendimiento deficiente y no identifican puntos de corte cuando las secuencias parentales son cortas y presenten alta similitud nucleotídica en sus genomas (Bay et al., 2011).

6.4. Divergencia filogenética de CAV

Las cepas circulantes de CAV originadas del ancestro común presentan una marcada diferenciación filogenética en cuatro clados con buenos soportes estadísticos, al igual que se describió en Eltahir et al. (2011) (Figura 16, 17, 18, 19, 23 y 24). La misma clasificación se obtiene utilizando genomas completos o el gen *vp1* (completo o parcial), lo que sugiere que el análisis de este gen es suficiente para la correcta clasificación genética de las cepas. Esta clasificación en cuatro clados se sustenta por las diferencias nucleotídicas y aminoacídicas existentes entre las cepas analizadas. Sin embargo, la cepa del clado IV quizás debería ser considerada una cepa atípica más que un nuevo clado, al menos hasta que se establezca si existen otras cepas con características similares. En este contexto, la cepa japonesa atípica podría ser incluida dentro del clado III o no ser considerada en los análisis de clasificación general. En algunos estudios de caracterización genética de CAV, esta cepa se descarta en la clasificación y se describen únicamente tres clados o genotipos (Craig et al., 2009; Hailemariam et al., 2008; He et al., 2007; Islam et al., 2002; Kim et al., 2010). Esto demuestra que no existe una nomenclatura consensuada para la denominación de los clados y es un tema que requerirá estudios muy profundos. Un problema común de varias publicaciones es la utilización de pocas secuencias en los estudios de clasificación, lo que impide la comparación de resultados y la obtención de conclusiones generales. En esta tesis, y como aproximación

a esta problemática, empleamos todas las secuencias disponibles de genomas completos y del gen *vp1* para poder evaluar la variabilidad de CAV a nivel mundial (Figura 16, 18 y 23).

La formación de los clados II y III no muestra un patrón geográfico claro, lo que puede deberse a que la diseminación del virus se produce con rapidez y facilidad de una región a otra por intermedio de portadores naturales o por el comercio de aves y sus productos. (Carter et al., 2005). Para el caso de los clados formados por la cepa japonesa o las australianas (IV y I) es difícil realizar asociaciones válidas debido al bajo número de secuencias que los conforman. Son necesarios más relevamientos a nivel mundial que permitirán establecer si estas variantes fueron capaces de expandirse o permanecen restringidas a zonas geográficas delimitadas. Es probable que se confirme la diferenciación genética de las cepas australianas ya que ésta se observa en otros virus aviares como IBV e IBDV, rasgo que se lo atribuye al aislamiento geográfico de este continente (Ignjatovic & Sapats, 2002; Ignjatovic et al., 2006).

Los clados II y III tienen un origen similar de aproximadamente 50 años, que coincide con el período de auge de la avicultura comercial. El clado II está formado por cepas de campo que circulan en diferentes partes del mundo. Por otro parte, el clado III está formado por cepas vacunales introducidas en la década del 90, cepas de campo que se originaron al menos 20 años previo al desarrollo de las vacunas y cepas que se podrían haber originado por “asilvestración” de vacunas (*vaccine-like*) como ya fue reportado por Ou et al. (2018).

6.5. Las cepas uruguayas en el contexto de la diferenciación global de CAV

Las cepas uruguayas obtenidas en este trabajo se agrupan en los clados II y III. Ninguna cepa presentó evidencia de recombinación entre ellas o con cepas de la región (argentinas y brasileras). Esto puede deberse a que existen muy pocas secuencias disponibles del gen *vp1* y de genomas completos codificantes para analizar y a la similitud entre las secuencias que eviten la detección.

Las cepas del clado II son mayoritarias y se trata claramente de cepas de campo como las del resto del clado, mientras que las dos cepas del clado III podrían tener diferente origen. El genoma de una de las cepas uruguayas del clado III (361501) presenta mayor

homología con cepas de campo de este clado, mientras que el genoma de la otra cepa (361402) mantiene una mayor homología con la cepa vacunal Del-Ros. Por lo tanto, es posible que esta última cepa se haya originado como consecuencia de eventos de reversión de la cepa vacunal Del-Ros. Este proceso de “asilvestración” requiere que la cepa vacunal adquiera la capacidad de circular nuevamente en la naturaleza y puede ocurrir debido a una atenuación deficiente o a procesos evolutivos que incluyen mutaciones en sitios atenuados, mutaciones compensatorias en otras partes del genoma, recombinación, reordenamiento o cambios en la diversidad de cuasiespecies (Hanley et al., 2011). Se han reportado casos de reversión en virus ARN (Jennings et al., 1994; Nielsen et al., 2001; Lupini et al., 2011;) así como también en virus ADN (Christensen et al., 1992), resaltando los problemas de seguridad inherentes en el uso de vacunas vivas atenuadas tradicionales (Nielsen et al., 2001).

Además de la similitud genética, la hipótesis de la asilvestración de la cepa uruguaya 361402 del clado III se sustenta en algunas características aminoacídicas. Se ha descrito que los aminoácidos en las posiciones 139 y 144 de la proteína VP1 no son independientes, una glutamina en la posición 139 siempre está asociada a una glutamina en la posición 144, mientras que una lisina en la posición siempre 139 está asociada a un ácido glutámico en la posición 144 (Simionatto et al., 2006). Los aminoácidos en estas posiciones tienen un papel vital en el crecimiento y propagación del virus. La presencia de glutamina en estas posiciones, está asociada a una disminución de la tasa de propagación del virus en cultivo celular MDCC-MSB-1 (Renshaw et al., 1996). La cepa 361402, homóloga con la cepa vacunal Del-Ros, es la única que presenta una lisina y un ácido glutámico en las posiciones 139 y 144, mientras que el resto de las cepas uruguayas presentan glutaminas.

6.6. Diferencia de cepas de campo uruguayas (clado II) con vacunas comerciales

Las cepas uruguayas del clado II son muy divergentes filogenéticamente de la cepa vacunal utilizada actualmente a nivel nacional para prevenir la enfermedad, evidenciando la necesidad de evaluar el nivel de protección de las vacunas actuales. La divergencia entre las cepas de campo y la vacunal está sustentada por cambios relevantes en la secuencia nucleotídica y aminoacídica de VP1 (Tabla 7, Figura 20), VP2 (Tabla 10 y 12) y VP3 (Tabla 11 y 13). De los 14 cambios observados en la proteína VP1 entre las cepas

uruguayas del clado II y la cepa vacunal Nobilis P4, siete de ellos son cambios de aminoácidos con diferentes propiedades químicas. En las posiciones 92, 139 y 144 ocurren sustituciones de residuos polares sin carga por residuos polares con carga. En el caso de las posiciones 97, 157 y 287 se observa la sustitución de residuos apolares por residuos polares sin carga. En la posición 254 ocurre la sustitución de un residuo polar con carga negativa por un residuo polar sin carga. Estos cambios podrían tener implicancias en la estructura secundaria de la proteína VP1, aunque para su análisis se requieren más estudios. De los tres cambios observados en la proteína VP2 entre las cepas uruguayas del clado II y la cepa vacunal Nobilis P4, dos de ellos constituyen cambios de aminoácidos con diferentes propiedades químicas. En la posición 169 las cepas uruguayas presentan la sustitución de un residuo polar con carga negativa por uno polar sin carga. Algunas cepas del clado II (351201, M14/03 y 471602) presentan, también en la posición 177, la sustitución de un residuo apolar por uno polar sin carga. Estos cambios ocurrieron en el extremo C-terminal de esta proteína. Esto está en concordancia con otros estudios que indican que los tres cuartos del extremo N-terminal de VP2 son extremadamente conservados, ya que cumplirían funciones esenciales (Farkas et al., 1996). Para la proteína VP3 los cambios aminoacídicos que se observan en las posiciones 21 y 64 no implican cambios de aminoácidos con diferentes propiedades químicas.

La divergencia entre las cepas de campo del clado II y las vacunas sugiere que hasta el momento no se han generado cepas vacunales a partir de cepas de campo del clado II. Según esta hipótesis, todas las cepas vacunales de CAV se desarrollaron utilizando cepas semillas del clado III, lo cual explica su composición actual.

Debido a que es común que las cepas de campo en Sudamérica sean del clado II, la aplicación de vacunas atenuadas puede generar la aparición de recombinantes, como los recombinantes inter-clados observados entre las cepas chinas y las taiwanesas. La co-circulación de variantes es un requerimiento indispensable para la ocurrencia y detección de eventos de recombinación (Pérez et al., 2014)

Se ha reportado para otros virus de ADN simple hebra, como parvovirus canino, la recombinación entre cepas de campo y vacunales (Mochizuki et al., 2008). La patogenicidad o capacidad de distribución de estos nuevos virus es impredecible. Por esta razón, la introducción de cepas vacunales muy divergentes a las cepas de campo que

circulan en Uruguay podría llevar a la recombinación entre los genomas virales, generando mayor diversidad y la aparición de nuevos clados.

6.7. Impacto del trabajo en la genética de virus aviares en Uruguay y la región

Este trabajo contribuyó a mejorar nuestro conocimiento de la sanidad en la industria avícola uruguaya mediante el desarrollo de metodologías de diagnóstico de PCR en tiempo real, y la caracterización genética de las cepas de CAV que circulan en nuestro país.

Las técnicas de PCR en tiempo real son consideradas las herramientas de mayor aplicabilidad diagnóstica, debido a su sensibilidad, carácter cuantitativo, velocidad y grado de automatización. El desarrollo de un ensayo de PCR en tiempo real para el diagnóstico de las cepas de CAV permitirá acortar los tiempos de diagnósticos y aumentar su especificidad. Este ensayo validado permite también la cuantificación absoluta de CAV, aspecto relevante porque su titulación es dificultosa y lleva mucho tiempo. CAV solo replica en líneas celulares de linfocitos y por lo tanto no genera placas o un efecto citopático evidente. Un ensayo de PCR en tiempo real nos permite una alternativa de cuantificación viral para futuros estudios de patogenicidad de las cepas circulantes en nuestro país y la región. La caracterización genética del virus, realizada mediante el análisis de su secuencia, nos permitió determinar los clados circulantes, y analizar su impacto en parámetros de interés veterinario (divergencia con cepas vacunales, relevamiento de variantes, etc.). Uno de los principales problemas en la investigación de CAV es la escasa información que se dispone del virus en la región y el mundo, a pesar de su importancia sanitaria y biológica. Si bien hay secuencias disponibles en el GenBank, la mayoría corresponde a virus obtenidos en forma esporádica o en un brote particular. Existen muy pocos casos en que se hayan obtenido virus en una misma región en forma seriada a lo largo del tiempo. Este trabajo profundizó además en aspectos evolutivos claves, como lo es el cálculo de tasas de sustitución y la edad del ancestro común más cercano (tMRCA) de los clados circulantes en Uruguay (II y III), y contribuyó en el entendimiento de los mecanismos responsables de generar la variabilidad observada en las cepas de CAV. La información obtenida será útil para proyectar posibles escenarios epidemiológicos de esta enfermedad y diseñar planes de control que se ajusten a estos comportamientos.

La detección, caracterización y análisis de las relaciones evolutivas y mecanismos que gobiernan la evolución de CAV son relevantes para reforzar las capacidades productivas de nuestro país y generar un impacto positivo a escala social y económica. Por otro lado colabora con la definición del estatus sanitario que presenta la región, y genera conocimiento básico imprescindible para comprender la evolución de CAV.

7. Conclusiones

- Se desarrolló un método de diagnóstico del virus de CAV basado en PCR en tiempo real que funciona adecuadamente y puede aplicarse en todas las variantes virales de circulación mundial. Este método de diagnóstico también puede utilizarse para la cuantificación absoluta de CAV, siendo particularmente apropiado para esta tarea según los resultados obtenidos durante su validación.
- La aplicación del ensayo estandarizado en muestras de campo sugiere una importante circulación de CAV en la industria avícola uruguaya.
- Se determinó el año de origen de CAV y de los clados II y III. Estos clados tienen distinto origen lo que explica los patrones de variabilidad genética observados en las cepas uruguayas y del mundo.
- Se reportaron las primeras tasas de sustitución para CAV, cuyos valores son extremadamente altos y explica la diversidad que CAV ha alcanzado desde su emergencia.
- Se obtuvieron, por primera vez en Uruguay, el genoma completo codificante de diez cepas de campo y de la cepa vacunal autorizada. Este resultado es importante porque existe escasa información de las cepas de CAV circulantes en Sudamérica (3 genomas completos) a pesar de su importancia sanitaria y biológica.
- Se evidenció diferencias genéticas entre las cepas de campo del clado II circulantes en nuestro país y cepas vacunales.

8. Perspectivas

- Continuar con el diagnóstico y caracterización genética de muestras de campo.
- Obtener y analizar más genomas completos de cepas de CAV uruguayas y de la región.
- Determinar las presiones selectivas que actúan sobre los genes *vp2* y *vp3* para comprender como evoluciona esta región del genoma de CAV.

- Realizar nuevos análisis de filogeografía que incluyan *datasets* actualizados. Estos análisis nos permitirán avanzar en el conocimiento del lugar y el año de origen de CAV en la región, la dinámica de distribución y las rutas migratorias de las diferentes variantes regionales.
- Evaluar si existen diferencias en las tasas de propagación de CAV en cultivo celular entre cepas uruguayas que presentan glutamina en las posiciones 139 y 144 de VP1 y la cepa que presenta lisina y ácido glutámico.
- Realizar estudios de protección con las cepas vacunales del clado III y las cepas del clado II.
- Sintetizar un clon infectivo que nos permita el estudio de cuasiespecies y cálculo de la tasa de mutación en cultivos primarios de embriones de pollos.

9. Bibliografía

- Adair BM (2000). Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Developmental & Comparative Immunology* 24:247-255.
- Bay RA, Bielawski JP (2011). Recombination detection under evolutionary scenarios relevant to functional divergence. *Journal of Molecular Evolution* 73:273-286.
- Brentano L, Mores N, Wentz I, Chandratilleke D, Schat KA (1991). Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil. *Avian Diseases* 35(4):793-800.
- Cadar D, Kiss T, Ádám D, Cságola A, Novosel D, Tuboly T (2013). Phylogeny, spatio-temporal phylodynamics and evolutionary scenario of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) in wild boars: fast dispersal and high genetic diversity. *Veterinary Microbiology* 166(1-2):200-213.
- Carter GR, Wise DJ, Flores EF (2005). Virus ADN con genoma simple hebra. En *Virología Veterinaria* Ed: Flores E.F. pp: 59-75. International Veterinary Information Service, Ithaca NY.
- Christensen LS, Medveczky I, Strandbygaard BS, Pejsak Z (1992). Characterization of field isolates of suid herpesvirus 1 (Aujeszky's disease virus) as derivatives of attenuated vaccine strains. *Archives of Virology* 124(3-4):225-234.
- Craig MI, Rimondi A, Delamer M, Sanasalone P, König G, Vagnozzi A, Pereda A (2009). Molecular Characterization of Chicken Infectious Anemia Virus Circulating in Argentina during 2007. *Avian Diseases* 53:331-335.
- Crowther RA, Berriman JA, Curran WL, Allan GM, Todd D (2003). Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *Journal of Virology* 77(24):13036-13041.
- Davidson I, Raibshstein I, Al-Touri A (2013). Quantitation of Marek's Disease and Chicken Anemia Viruses in Organs of Experimentally Infected Chickens and Commercial Chickens by Multiplex Real-Time PCR. *Avian Diseases* 57(2 Suppl):532-538.
- DIEA, Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Oficina de Programación y Políticas Agropecuarias, MGAP (2016). Anuario Estadístico DIEA.
- Domingo E (1997). Rapid evolution of viral RNA genomes. *Journal of Nutrition* 127:958-961.
- Douglas AJ, Phenix K, Mawhinney KA, Todd D, Mackie DP, Curran WL (1995). Identification of a 24-kDa protein expressed by chicken anemia virus. *Journal of General Virology* 76:1557-1562.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology Evolution* 29:1969-1973.
- Ducatez MF, Owoade AA, Abiola JO, Muller CP (2006). Molecular epidemiology of chicken anemia virus in Nigeria. *Archives of Virology* 151(1):97-111.
- Eltahir YM, Qian K, Jin W, Wang P, Qin A (2011). Molecular epidemiology of chicken anemia virus in commercial farms in China. *Virology Journal* 8:145.
- Engström BE, Luthman M (1984). Blue wing disease of chickens: signs, pathology and natural transmission. *Avian Pathology* 13:1-12.
- FADA, Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina (2015). *Carnes Argentinas: Actualidad, propuestas y futuro.*

- Farkas T, Tanaka A, Kai K, Kanoe M (1996). Cloning and sequencing of the genome of chicken anaemia virus (CAV) TK-5803 strain and comparison with other CAV strains. *Journal of Veterinary Medical Science* 58(7):681-684.
- Gordon JS (1996). The Chicken Story. *American Heritage* 47(5).
- Goryo M, Shibata Y, Suwa T, Umemura T, Itakura C (1987). Outbreak of anemia associated with chicken anemia agent in young chicks. *Japanese Journal of Veterinary Science* 49:867-873.
- Hailemariam Z, Omar AR, Hair-Bejo M, Giap TC (2008). Detection and characterization of chicken anemia virus from commercial broiler breeder chickens. *Virology Journal* 5:128.
- Hanley KA (2011). The double-edged sword: How evolution can make or break a live- attenuated virus vaccine. *Evolution* 4(4):635-643.
- He CQ, Ding NZ, Fan W, Wu YH, Li JP, Li YI (2007). Identification of chicken anemia virus putative intergenotype recombinants. *Virology* 366:1-7.
- Heilman, DW, Teodoro JM, Green MR (2006). Apoptin nucleocytoplasmic shuttling is required for cell type-specific localization, apoptosis, and recruitment of the anaphase-promoting complex/cyclosome to PML bodies. *Journal of Virology* 80 (15):7535-7545.
- Hernández M, Villegas P, Hernández D, Banda A, Maya L, Romero V, Tomás G, Pérez R (2010). Sequence variability and evolution of the terminal overlapping VP5 gene of the infectious bursal disease virus. *Virus Genes* 41(1):59-66.
- Hornok S, Heijmans J, Bekesi L, Peek H, Kovacs MD, Dren C (1998). Interaction of chicken anemia virus and *Cryptosporidium baileyi* in experimentally infected chickens. *Veterinary Parasitology* 76:43-55.
- Hu L, Lucio B, Schat KA (2000). Depletion of CD4 + and CD8 + T lymphocyte subpopulations by CIA-1, a chicken infectious anemia virus. *Avian Diseases* 37:492-500.
- Hughes AL, Westover K, da Silva J, O'Connor DH, Watkins DI (2001). Simultaneous positive and purifying selection on overlapping reading frames of the tat and vpr genes of simian immunodeficiency virus. *Journal of Virology* 75(17):7966-7972.
- Ignjatovic J, Sapats S (2002). Confirmation of the existence of two distinct genetic groups of infectious bursal disease virus in Australia. *Australian Veterinary Journal* 80:689-694.
- Ignjatovic J, Gould G, Sapats S (2006). Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. *Archives of Virology* 151:1567-1585.
- Imai K, Mase M, Yamaguchi S, Yuasa N, Nakamura K (1998). Detection of chicken anemia virus DNA from formalin-fixed tissues by polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science* 64(3):205-208.
- Islam MR, Johne R, Raue R, Todd D, Müller H (2002). Sequence Analysis of the Full-Length Cloned DNA of a Chicken Anemia Virus (CAV) Strain from Bangladesh: Evidence for Genetic Grouping of CAV Strains Based on the Deduced VP1 Amino Acid Sequences. *Journal Veterinary Medicine B* 49: 332-337.
- Jennings AD, Gibson CA, Miller BR, Mathews JH, Mitchell CJ, Wood DJ, Barrett ADT (1994). Analysis of a yellow fever virus isolated from a fatal case of vaccine associated human encephalitis. *The Journal of Infectious Diseases* 169:512-518.
- Kaffashi A, Pagel CN, Noormohammadi AH, Browning GF (2015). Evidence of apoptosis induced by viral protein 2 of chicken anemia virus. *Archives of Virology* 60(10):2557-2563.

- Kamada K, Kuroishi A, Kamahora T, Kabat P, Yamaguchi S, Hino S (2006). Spliced mRNAs detected during the life cycle of chicken anemia virus. *Journal of General Virology* 87:2227-2233.
- Kim HR, Kwon YK, Bae YC, Oem JK, Lee OS (2010). Molecular characterization of chicken infectious anemia viruses detected from breeder and broiler chickens in South Korea. *Poultry Science* 89:2426-2431.
- Koch G, van Roozelaar DJ, Verschueren CA, van der Eb AJ, Noteborn MH (1995). Immunogenic and protective properties of chicken anemia virus proteins expressed by baculovirus. *Vaccine* 13:763-770.
- Kucharski TJ, Ng TF, Sharon DM, Navid-Azarbaijani P, Tavassoli M, Teodoro JG (2016). Activation of the Chicken Anemia Virus Apoptin Protein by Chk1/2 Phosphorylation Is Required for Apoptotic Activity and Efficient Viral Replication. *Journal of Virology* 90(20):9433-9445.
- Lee MS, Lien YY, Feng SH, Huang RL, Tsai MC, Chang WT, Chen HJ (2009). Production of chicken anemia virus (CAV) VP1 and VP2 protein expressed by recombinant *Escherichia coli*. *Processes Biochemistry* 44:390-395.
- Li Y, Fang L, Cui S, Fu J, Li X, Zhang H, Cui Z, Chang S, Shi W, Zhao P (2017). Genomic Characterization of Recent Chicken Anemia Virus Isolates in China. *Frontiers in Microbiology* 8:401.
- Lupini C, Cecchinato M, Ricchizzi E, Naylor CJ, Catelli E (2011). A turkey rhinotracheitis outbreak caused by the environmental spread of a vaccine-derived avian metapneumovirus. *Avian Pathology* 40(5):525-530.
- Markowski-Grimsrud CJ, Miller MM, Schat KA (2002). Development of strain-specific real-time PCR and RT-PCR assays for quantitation of chicken anemia virus. *Journal of Virological Methods* 101: 135-147.
- Martin DP, Biagini P, Lefevre P, Golden M, Roumagnac P (2011). Recombination in eukaryotic single stranded DNA viruses. *Viruses* 3: 1699-1738.
- Maya L, Calleros L, Francia L, Hernández M, Iraola G, Panzera Y, Sosa K, Pérez R (2013). Phylodynamics analysis of canine parvovirus in Uruguay: evidence of two successive invasions by different variants. *Archives of Virology* 158(6):1133-1141.
- McNamee P, McCullagh J, Rodgers J, Thorp B, Ball H, Connor T (1999). Development of an experimental model of bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broilers following exposure to *Staphylococcus aureus* by aerosol, and inoculation with chicken anemia and infectious bursal disease viruses. *Avian Pathology* 28:26-35.
- McNulty MS, Allan GM (1984). Applications of immunofluorescence in veterinary viral diagnosis. *Recent Advances Virus Diagnosis* 15-26.
- McNulty MS, Curran WL, Todd D, Mackie DP (1990). Chicken anemia agent: An electron microscopic study. *Avian Diseases* 34:352-358.
- Miller MM, Schat KA (2004). Chicken infectious anemia virus: an example of the ultimate host-parasite relationship. *Avian Diseases* 48:734-745.
- Mochizuki M, Ohshima T, Une Y, Yachi A (2008). Recombination between vaccine and field strains of canine parvovirus is revealed by isolation of virus in canine and feline cell cultures. *Journal of Veterinary Medical Science* 70(12):1305-14.
- Natesan S, Kataria JM, Dhama K, Rahul S, Bhardwaj N, Baradhvaj N (2006). Biological and molecular characterization of chicken anemia virus isolates of Indian origin. *Virus Research* 118(1-2):78-86.

- Nestor L, Tamas F, Rogelio. A (2007). Caracterización molecular de aislamientos mexicanos del virus de la anemia infecciosa del pollo, a través del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción. *Veterinaria México* 38(1).
- Nielsen HS, Oleksiewicz MB, Forsberg R, Stadejek T, Bøtner A, Storgaard T (2001). Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *Journal of General Virology* 82(Pt 6):1263-1272.
- Noteborn MH, Kranenburg O, Zantema A, Koch G, de Boer GF, van der Eb AJ (1992). Transcription of the chicken anemia virus (CAV) genome and synthesis of its 52-kDa protein. *Gene* 118:267-271.
- Noteborn, MH, Todd D, Verschuieren CA, de Gauw HW, Curran WL, Veldkamp S, Douglas AJ, McNulty MS, van der Eb AJ, Koch G (1994). A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *Journal of Virology* 68:346-351.
- Noteborn MH, Verschuieren CA, Koch G, Van der Eb AJ (1998a). Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope. *Journal of General Virology* 79:3073-3077.
- Noteborn MH, Verschuieren CA, van Ormondt H, van der Eb AJ (1998b). Chicken anemia virus strains with a mutated enhancer/promoter region share reduced virus spread and cytopathogenicity. *Gene* 223:165-172.
- Noteborn MHM, Danen-van Oorschot AAM, van der Eb AJ (1998c). Chicken Anemia Virus: Induction of Apoptosis by a Single Protein of a Single-Stranded DNA Virus. *Virology* 8:497-504.
- OECD/FAO (2016). OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025. OECD Publishing.
- Olszewska-Tomczyk M, Świętoń E, Minta Z, Śmietanka K (2016). Occurrence and Phylogenetic Studies of Chicken Anemia Virus from Polish Broiler Flocks. *Avian Diseases* 60(1):70-74.
- Ou SC, Lin HL, Liu PC, Huang HJ, Lee MS, Lien YY, Tsai YL (2018). Epidemiology and molecular characterization of chicken anaemia virus from commercial and native chickens in Taiwan. *Transboundary and emerging diseases* doi: 10.1111.
- Pavesi A (2006). Origin and evolution of overlapping genes in the family *Microviridae*. *Journal of General Virology* 87(Pt 4):1013-1017.
- Pereira CA, Leal ES, Durigon EL (2006). Selective regimen shift and demographic growth increase associated with the emergence of high-fitness variants of canine parvovirus. *Infection Genetics and Evolution* 7(3):399-409.
- Pérez R, Calleros L, Marandino A, Sarute N, Iraola G, Grecco S, Blanc H, Vignuzzi M, Isakov O, Shomron N, Carrau L, Hernández M, Francia L, Sosa K, Tomás G, Panzera Y (2014). Phylogenetic and genome-wide deep-sequencing analyses of canine parvovirus reveal co infection with field variants and emergence of a recent recombinant strain. *PLoS One* 9(11):e111779.
- Peters MA, Jackson DC, Crabb BS, Browning GF (2002). Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase. *Journal Biological Chemistry* 42:39566–39573.
- Pope CR (1991). Chicken anemia agent. *Veterinary Immunology Immunopathology* 30:51–65.
- Posada D (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25:1253-1256.
- Renshaw RW, Soiné C, Weinkle T, O'Connell PH, Ohashi K, Watson S, Lucio B, Harrington S, Schat KA (1996). A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. *Journal of Virology* 70:8872–8878.

- Rimondi A, Pinto S, Olivera V, Dibárbora M, Pérez-Filgueira M, Craig MI, Pereda A (2014). Comparative histopathological and immunological study of two field strains of chicken anemia virus. *Veterinary Research* 45:102.
- Rosario K, Breitbart M, Harrach B, Segalés J, Delwart E, Biagini P, Varsani A (2017). Revisiting the taxonomy of the family *Circoviridae*: establishment of the genus *Cyclovirus* and removal of the genus *Gyrovirus*. *Archives of Virology* 162(5):1447-1463.
- Rosemberger J, Cloud S (1989). The isolation and Characterization of chicken anemia agent (CAA) from broilers in the United States. *Avian Diseases* 33:707-713.
- Schat KA, van Santen V (2008). Chicken infectious anemia. In: *Diseases of poultry*. Ed: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE. Blackwell Publish ing, Ames, pp 211–235.
- Schat KA (2009). Chicken Anemia Virus. *Current Topics Microbiology Immunology* 331:151-183.
- Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U, Holmes EC (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(2):379-384.
- Simionatto S, Lima-Rosa CA, Binneck E, Ravazzolo AP, Canal CW (2006). Characterization and phylogenetic analysis of Brazilian chicken anemia virus. *Virus Genes* 33:5–10.
- Stöver BC, Müller KF (2010). TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC bioinformatics* 11:7.
- Taylor S (1989). National veterinary services laboratory (NVSL). IA: USDA, ARS
-
- Todd D, Creelan JL, Mackie DP, Rixon F, McNulty MS (1990a). Purification and biochemical characterization of chicken anemia agent. *Journal of General Virology* 71:819-823.
- Todd D, Mackie DP, Mawhinney KA, Conner, McNeilly, F. McNulty MS (1990b). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect serum antibody to chicken anemia agent. *Avian Diseases* 34:359-363.
- Todd D, Mawhinney KA, McNulty MS (1992). Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30:1661-1666.
- Toro H, van Santen VL, Li L, Lockaby SB, van Santen E, Hoerr FJ (2006). Epidemiological and experimental evidence for immunodeficiency affecting avian infectious bronchitis. *Avian Pathology* 35: 455-466.
- Urdaneta S, Andrade LF, Parra O (1996). Estudio serológico y valores de hematocrito para la Anemia Infecciosa Aviar en pollos de engorde de los municipios Mara y La Cañada de Urdaneta del estado Zulia. *Memorias VI Congreso Nacional de Avicultura* 537-543.
- USDA, United States Department of Agriculture (2017). *Livestock and Poultry: World Markets and Trade*.
- van Santen VL, Li L, Hoerr FJ, Lauerman LH (2004). Genetic characterization of chicken anemia virus from commercial broiler chickens in Alabama. *Avian Disease* 45: 373-388.
- Varela AP, Dos Santos HF, Cibulski SP, Scheffer CM, Schmidt C, Sales Lima FE, Silva AD, Esteves PA, Franco AC, Roehe PM (2014). Chicken anemia virus and avian gyrovirus 2 as contaminants in poultry vaccines. *Biologicals* 42(6):346-350.

Virus Taxonomy (2011). *Circoviridae*. In: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed: King AMQ, Adams MJ, Lefkowitz EJ. pp 343-349.

von Bülow V, Rudolph R, Fuchs B (1986). Enhanced pathogenicity of chicken anemia agent (CAA) in dual infections with Marek's disease virus (MDV), infectious bursal disease virus (IBDV) or reticuloendotheliosis virus (REV). *Zentralbl Veterinarmed B* 33(2):93-116.

Walsh CP, Xu GL (2006). Cytosine methylation and DNA repair. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 301: 283-315.

Zhang X, Liu Y, Wu B, Sun B, Chen F, Ji J, Ma J, Xie Q (2013). Phylogenetic and molecular characterization of chicken anemia virus in southern China from 2011 to 2012. *Scientific Reports* 3:3519.

10. Anexos

10.1. Anexo 1: Protocolos

a) Extracción de ADN vacunal con el kit "QIAamp Viral DNA Mini Kit" (Qiagen).

- Resuspender 0,01 g de vacuna liofilizada en 200 µL de PBS pH 7.5.
- Utilizar esta suspensión para realizar la extracción de ADN con el kit "QIAamp Viral DNA Mini Kit" (Qiagen).
- Colocar la suspensión en un tubo de 1,5 ml y agregar 20 µL de proteinasa K.
- Adicionar 200 µL de buffer AL a la muestra.
- Mezclar con *vortex* por 15 segundos.
- Incubar a 56 °C por 10 minutos y centrifugar brevemente para remover las gotas de las paredes del tubo.
- Adicionar 200 µL de etanol (96-100 %) y mezclar con *vortex* por 15 segundos.
- Colocar la solución en una columna "QIAamp Mini spin column" (en un tubo colector de 2 ml) y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo y descartar el filtrado.
- Adicionar 500 µL de buffer AW1 y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo y descartar el filtrado.
- Adicionar 500 µL de buffer AW2 y centrifugar a 13.000 rpm por 3 minutos. Descartar el filtrado.
- Secar la columna centrifugando a 13.000 rpm por 1 minuto.
- Colocar la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml y adicionar 80 µL de buffer de elución.
- Incubar a TA por 1 minuto y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.

b) Extracción de ADN viral Fenol/Cloroformo

- Cortar de 4 a 6 pliegues de bolsas de Fabricio de un mismo lote.
- Macerar con 300 μl de buffer de lisis.

Buffer de lisis (1 mL):

- 870 μL de H_2O
- 20 μL de EDTA 5M
- 10 μL de Tris 1M
- 20 μL de NaCl 5M
- 80 μL de SDS 10 %

- Agregar al macerado 4 μL de proteinasa K 1 mg/mL e incubar a 55 °C por una hora, agitando el tubo cada 15 minutos.
- Agregar 400 μL de fenol/cloroformo/IAA, mezclar y centrifugar 5 minutos a 13000 rpm.
- Recuperar la fase superior, transferir a un nuevo tubo y agregar 400 μL de fenol/cloroformo/IAA. Mezclar y centrifugar 5 minutos a 13000 rpm.
- Recuperar la fase superior, transferir a un nuevo tubo y agregar 400 μL de cloroformo. Mezclar y centrifugar 5 minutos a 13000 rpm.
- Recuperar la fase superior, transferir a un nuevo tubo y agregar 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío.
- Incubar toda la noche a -20 °C.
- Centrifugar 15 minutos a 13000 rpm y descartar el sobrenadante.
- Lavar con 400 de etanol 70 % frío y centrifugar 15 minutos a 13000 rpm.
- Descartar el sobrenadante y secar el pellet en estufa a 37 °C.
- Resuspender el pellet en 50 μL de H_2O .

c) Extracción de ARN con el kit “Quick-RNA™ MiniPrep” (Zymo Research)

- Pesar 25 mg de tejido y homogeneizar con 600 µL del buffer ZR.
- Centrifugar la suspensión a 3.000 g durante 2 minutos para eliminar restos de tejido.
- Transferir el sobrenadante a una columna y centrifugar a 12.000 g por 1 minuto.
- Agregar a la columna 400 µL de buffer de pre-lavado a la columna y centrifugar a 12.000 g por 1 minuto.
- Agregar a la columna 700 µL de buffer de lavado y centrifugar a 12.000 por 1 minuto.
- Secar la columna centrifugando a 13.000 rpm por 2 minutos.
- Colocar la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml y adicionar 30 µl de H₂O libre de ARNasas.
- Incubar a TA por 1 minuto y centrifugar a 13000 g por 30 segundos.
- Almacenar el ARN a -80° C.

d) Purificación de producto de PCR con el kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research)

- Adicionar 5 volúmenes de ADN de buffer de unión a cada volumen de muestra de ADN.
- Colocar la mezcla dentro de una columna Zymo-Spin en un tubo colector.
- Centrifugar a máxima velocidad (≥ 10000 g) por 30 segundos. Descartar el filtrado.
- Adicionar 200 µL de ADN buffer de lavado a la columna y centrifugar por 30 segundos. Repetir éste paso.
- Colocar la columna dentro de un nuevo tubo de 1.5 ml.
- Adicionar 23 µL de ADN de buffer de elución directamente en la columna y centrifugar para eluir el ADN.

10.2. Anexo 2: Secuencias usadas para análisis de recombinación.

a) Secuencias nucleotídicas completas de *vp1*

N° de acceso	Nombre de muestra	País de origen
AB027470	TR20	
KX377126	NGP-4	India
AF527037	BL-5	Malasia
DQ124934	BJ0401	China
AY843527	TJBD33	China
D31965	82-2	Japón
KJ728817	6	Taiwán
AJ888526	CAV/Lanlate-NIE/11-02/28	Nigeria
AJ888525	CAV/Abeokuta-NIE/19-04/117	Nigeria
AJ888523	CAV/Ikire-NIE/11-02/9	Nigeria
AJ888522	CAV/Ejioku-NIE/11-02/107	Nigeria
KX811526	SD15	China
KX447637	LY-2	China
KX447636	LY-1	China
KX447635	HB160430	China
KX447634	BS-C2	China
KX447633	BS-C1	China
KX772161	1207PT05/2012	Taiwán
KY053900	CAV/NAM/TANUVAS/09	India
KY486136	HLJ14101	China
KY486137	HLJ15108	China
KY486138	HLJ15109	China
KY486139	HLJ15125	China
KY486140	HLJ15140	China
KY486141	HLJ15165	China
KY486142	HLJ15166	China
KY486143	HLJ15169	China
KY486144	HLJ15170	China
KY486145	JL14023	China
KY486146	JL14024	China
KY486147	JL14026	China
KY486148	JL14028	China
KY486149	JL15120	China
KY486150	NX15091	China
KY486151	NX15140	China
KY486152	JS15165	China
KY486153	JS15166	China
KY486154	LN15169	China
KY486155	LN15170	China
AB031296	A2	Japón
AB119448	G6	Japón
AF227982	CAU269_7	Australia
AF311892	98D02152	USA
AF311900	98D06073	USA
AF313470	Del Ros	USA
AF390038	3_1	Malasia
AF395114	BD_3	Bangladés
AF475908		China

AY839944	LF4	China
AY846844	TJBD40	China
D10068	26P4	USA
DQ016138	130_VP1	Eslovenia
DQ016139	469	Eslovenia
DQ016140	69_VP1	Eslovenia
DQ124935	AH6	China
DQ124936	AH4	China
DQ141670	SH11	China
DQ141671	SH16	China
DQ141672	HN9	China
DQ991394	01_4201	USA
EF159948	Haryana_Sonepet	India
EF176599	C14	China
EF683159	3711chickenAustralia	Australia
EU424059	ANAND	India
FJ172347	SDLY08	China
FJ498867		India
FJ883781	INDTN06	India
FJ883782	INDAP07	India
FJ896818	INDKA06	India
JF507715	ClAV89_69	Corea del Sur
JF712621		India
JQ690762		China
JX260426	GD_1_12	China
JX964755	GXC060821	China
KC414026	CAT_CAV	China
KF224926	GD_B_12	China
KF224927	GD_C_12	China
KF224928	GD_D_12	China
KF224929	GD_E_12	China
KF224930	GD_F_12	China
KF224931	GD_G_12	China
KF224932	GD_H_12	China
KF224933	GD_I_12	China
KF224934	GD_J_12	China
KF224935	GD_K_12	China
KF224936	GD_L_12	China
KF224937	GD_M_12	China
KF224938	GD_N_12	China
KJ004667	G579	Japón
KJ004668	HY80	Japón
KJ004669	NI77	Japón
KJ620989	VRDCCAVTNC108	India
KJ728814	1	Taiwán
KJ728815	2	Taiwán
KJ728818	7	Taiwán
KJ728819	8	Taiwán
KJ728820	9	Taiwán
KJ728821	10	Taiwán
KJ728822	12	Taiwán
KJ728823	13	Taiwán
KJ728824	14	Taiwán
KJ728825	16	Taiwán

KJ728826	17	Taiwán
KJ728827	18	Taiwán
KJ728828	19	Taiwán
KJ728829	20	Taiwán
KJ728830	22	Taiwán
KJ872513	CAV_10	Argentina
KJ872514	CAV_18	Argentina
KM226337	A176	Japón
KM226338	AO77	Japón
KM226339	G174	Japón
KM226340	IBA94	Japón
KM226341	KY80	Japón
KM226342	G791	Japón
KM226343	NI92	Japón
KM458172	CAVL0D513	Polonia
KM458173	CAVLUB5W113	Polonia
KM458174	CAVLUB5W813	Polonia
KM458175	CAVMPL213	Polonia
KM458176	CAVMPL313	Polonia
KM458177	CAVOPL113	Polonia
KM458178	CAVOPL313	Polonia
KM458179	CAVPOD113	Polonia
KM458181	CAVSLA213	Polonia
KM458182	CAVSLA313	Polonia
KM458183	CAVSLA1213	Polonia
KM458184	CAVZPOM813	Polonia
KM458185	CAV3995	Polonia
KM496300	SC_BL	China
KM496301	SC_DL1	China
KM496302	SC_DL2	China
KM496303	SC_HY	China
KM496304	SC_LS	China
KM496305	SC_MS	China
KM496306	SC_MZ	China
KM496307	SC_MZ42A	China
KM496308	SC_NC1	China
KM496309	SC_NC2	China
KM496310	SC_PS	China
KP090251	NAM227	India
KP090253	EABCOM	India
KP090254	NAMCCAV	India
KP090256	CAVVP1NAMM01	India
KP090257	CAVVP1NAMM02	India
KP120755	CAVNAMKS5	India
KP120756	CAVNAMKS4	India
KP120757	CAVNAMKS3	India
KP120758	CAVNAMKS1	India
KP120759	CAVNAMKS6	India
KP120760	CAVNAMKS7	India
KP780287	CAVVietnamBN113	Vietnam
KP780288	CAVVietnamHN113	Vietnam
KP780289	CAVVietnamVP713	Vietnam
KP780290	CAVVietnamVP813	Vietnam
KP780291	CAVVietnamVP913	Vietnam

KP780292	CAVVietnamVP1013	Vietnam
KT276305	IR	Irán
KU050677	GD_102	
KU050678	GD_103	
KU050679	GD_104	
KU050680	GD_101	
KU095829	Tunisia_1328_09	Túnez
KU221054	SD1403	China
KU598851	SD1510	China
KU641013	LN1401	China
KU641014	JN1503	China
KU641015	SD1511	China
KU645506	SD1512	China
KU645507	SD1507	China
KU645508	SD1502	China
KU645509	JS1503	China
KU645510	SD1509	China
KU645511	LN1402	China
KU645512	HN1504	China
KU645513	BJ1406	China
KU645514	HB1404	China
KU645515	SD1515	China
KU645516	HB1517	China
KU645517	SD1513	China
KU645518	JS1501	China
KU645519	SD1508	China
KU645520	HN1405	China
KU645521	SD1514	China
KU645522	SD1518	China
KU645523	SD1505	China
KU845734	FAdV_N22	China
KU845735	CIAV_F10	China
KX377124	NGP_1	India
KX377125	NGP_2	India
	141404	Uruguay
	471604	Uruguay
	471602	Uruguay
	181601	Uruguay
	71601	Uruguay
	51601	Uruguay
	451502	Uruguay
	361501	Uruguay
	171502	Uruguay
	211501	Uruguay
	201502	Uruguay
	361402	Uruguay
	361401	Uruguay
	171401	Uruguay
	M1403	Uruguay
	221402	Uruguay
	221401	Uruguay
	351201	Uruguay
	421103	Uruguay
	421102	Uruguay

	M0610B	Uruguay
	M0509	Uruguay
	M43	Uruguay
	M34	Uruguay
	M23	Uruguay
KX377127	NGP_7	India
KX377128	NGP_8	India
KX377129	NGP_10	India
KX377130	NGP_11	India
KY024579	RSBR15	Brasil
M55918	Cuxhaven_1	Alemania
U65414	704	Australia
U69548	ConnB	USA
M55918	Cuxhaven	Alemania
L14767	CIA-1	
D10068	26P4	
	Nobilis P4	Uruguay
AY999018	SD24	China
DQ141673	SD22	China
KJ620989	VRDC/CAV/TN/C1/08	India
KJ728816	4	Taiwán

b) Secuencias nucleotídicas parciales de *vp1*

Nº de acceso	Nombre de muestra	País de origen
KU195689	_IR1_CAV_VP1	Irán
KX377126	NGP-4	India
AF527037	BL-5	Malasia
DQ124934	BJ0401	China
AY843527	TJBD33	China
D31965	82-2	Japón
KJ728817	6	Taiwán
AY999018	SD24	China
DQ141673	SD22	China
KJ728816	4	Taiwán
KX772161	1207PT05/2012	Taiwán
KY053900	CAV/NAM/TANUVAS/09	India
KX447634	BS-C2	China
KX447637	LY-2	China
KX811526	SD15	China
KY486136	HLJ14101	China
KY486137	HLJ15108	China
KY486139	HLJ15125	China
KY486140	HLJ15140	China
KX447636	LY-1	China
KY486143	HLJ15169	China
KY486145	JL14023	China
KY486146	JL14024	China

KY486147	JL14026	China
KY486148	JL1402	China
KY486150	NX15091	China
KY486151	NX15140	China
KY486153	JS15166	China
KY486154	LN15169	China
KY486155	LN15170	China
KU195690	IR2_CAV_VP1	Iran
KU195691	IR3_CAV_VP1	Iran
KU195692	IR4_CAV_VP1	Iran
KU195693	IR5_CAV_VP1	Iran
KT390277	STH28	Sudafrica
KT390278	STH47	Sudafrica
KT390279	STH27	Sudafrica
KT390280	STH19	Sudafrica
KT390282	STH23	Sudafrica
KT390283	STH33	Sudafrica
KJ865862	CAV1221-2010	Brasil
KJ865863	CAV1086-2010	Brasil
KJ865864	CAV1029-2010	Brasil
KJ865865	CAV1013-2010	Brasil
KJ865866	CAV976-2010	Brasil
KJ865867	CAV841-2010	Brasil
KJ865868	CAV740-2009	Brasil
KJ865869	CAV632-2009	Brasil
KJ865871	CAV584-2009	Brasil
KJ865872	CAV240-2008	Brasil
KJ865873	CAV206-2008	Brasil
KJ865874	CAV140-2008	Brasil
KJ865875	CAV1136-2006	Brasil
KJ865876	CAV263-2006	Brasil
KJ865877	CAV15-2006	Brasil
KJ620990	VRDC_CAV_TN_C6_10	India
KJ620991	VRDC_CAV_TN_C7_10	India
KJ620992	VRDC_CAV_CHD_C2_09	India
KJ620993	VRDC_CAV_VC_C3_09	India
KJ620994	VRDC_CAV_CHD_C4_09	India
KJ620995	VRDC_CAV_MH_C5_09	India
KJ620996	VRDC_CAV_TN_C8_10	India
KJ621023	VRDC_CAV_MH_BR_C37_12	India
KJ126838	HK1_13	Japón
KF716159	U101	India
KC691410	CMB12077	Camboya
KC691411	CMB11090	Camboya
KC691412	CMB11091	Camboya
FR850021	AN_China_92	China

FR850022	AN_China_95	China
FR850023	JS_China96	China
FR850024	JS_China_3	China
FR850025	JS_China_72	China
FR850026	JS_China_85	China
FR850027	JS_China_81	China
FR850028	JS_China_80	China
FR850029	AN_China_13	China
FR850030	JS_China_90	China
HQ872023	HU_China_50	China
HQ872024	JS_China_11	China
HQ872025	HU_China_13	China
HQ872026	HU_China_8	China
HQ872027	HU_China_6	China
HQ872028	HU_China_10	China
HQ872029	JS_China_22	China
HQ872030	AN_China_23	China
HQ872031	AN_China_36	China
HQ872032	AN_China_34	China
HQ872033	JS_China_70	China
HQ872034	JS_China_78	China
HQ872035	JS_China_32	China
HQ872037	JS_China_84	China
HQ872038	JS_China_83	China
HQ872039	JS_China_9	China
HQ872040	JS_China_14	China
HQ872041	JS_China_17	China
HQ872042	JS_China_60	China
HQ872043	JS_China_66	China
HQ872044	JS_China_4	China
HQ872045	JS_China_6	China
HQ872046	JS_China_7	China
HQ872047	JS_China_73	China
HM018710	09D367	Corea del Sur
HM018711	JB_KYS	Corea del Sur
HM018712	JB_LCK2	Corea del Sur
HM018713	HKYJ_HI_4A	Corea del Sur
HM018714	HKYJ_HI_1D	Corea del Sur
HM018715	HH_D	Corea del Sur
HM018716	103farm_8	Corea del Sur
HM018717	CN_YJS	Corea del Sur
HM018718	JB_BJS1	Corea del Sur
HM018719	09D243	Corea del Sur
HM018720	CN_MJfarm	Corea del Sur
HM018721	JB_AH4_6	Corea del Sur
HM018722	JB_YKS19_20	Corea del Sur

HM018723	CN_BR_37	Corea del Sur
HM018725	09D301	Corea del Sur
HM018726	09D354	Corea del Sur
HM018727	CN_HJH	Corea del Sur
HM018728	HKYJ_DP_1	Corea del Sur
HM018729	09D359	Corea del Sur
HM018730	09Q174	Corea del Sur
HM018731	09D318	Corea del Sur
HM018732	JB_KYS14	Corea del Sur
HM018733	CN_SHCK	Corea del Sur
HM018734	CN_KRfarm	Corea del Sur
HM018735	HKYJ_DP_3	Corea del Sur
HM018736	HKYK_KC_2	Corea del Sur
HM018737	CN_KKT	Corea del Sur
HM018738	SHJE6B	Corea del Sur
HM018739	CN_TBfarm	Corea del Sur
HM018740	SHJE2	Corea del Sur
EU871767	Arg439	Argentina
EU871768	ArgAN_1	Argentina
EU871769	Arg628	Argentina
EU871770	Arg609	Argentina
EU871771	Arg655	Argentina
EU871772	Arg673	Argentina
EU871773	Arg513	Argentina
EU871774	ArgA008	Argentina
EU871775	ArgA006	Argentina
EU871776	Arg684	Argentina
EU871777	Arg728	Argentina
EU871778	Arg729	Argentina
EU871779	ArgA0018R	Argentina
EU871780	ArgA0010_28	Argentina
EU871781	ArgA0010_34	Argentina
EU871782	Arg753	Argentina
EU871783	ArgA0021_3	Argentina
EU871784	ArgA0021_4	Argentina
AY583755	CAV-A_Chicken_India	India
AY583757	CAV-E_Chicken_India	India
AB027470	TR20	
AB031296	A2	Japón
AB119448	G6	Japón
AF227982	CAU269_7	Australia
AF311892	98D02152	USA
AF311900	98D06073	USA
AF313470	DelRos	USA
AF390038	3_1	Malasia
AF395114	BD_3	Bangladés

AF475908		China
AY839944	LF4	China
AY846844	TJBD40	China
D10068	26P4	USA
DQ016138	130_VP1	Eslovenia
DQ016139	469	Eslovenia
DQ016140	69_VP1	Eslovenia
DQ124935	AH6	China
DQ124936	AH4	China
DQ141670	SH11	China
DQ141671	SH16	China
DQ141672	HN9	China
DQ991394	01_4201	USA
EF159948	Haryana_Sonepet	India
EF176599	C14	China
EF683159	3711chickenAustralia	Australia
EU424059	ANAND	India
FJ172347	SDLY08	China
FJ498867		India
FJ883781	INDTN06	India
FJ883782	INDAP07	India
FJ896818	INDKA06	India
JF507715	CIAV89_69	Corea del Sur
JF712621		India
JQ690762		China
JX260426	GD_1_12	China
JX964755	GXC060821	China
KC414026	CAT_CAV	China
KF224926	GD_B_12	China
KF224927	GD_C_12	China
KF224928	GD_D_12	China
KF224929	GD_E_12	China
KF224930	GD_F_12	China
KF224931	GD_G_12	China
KF224932	GD_H_12	China
KF224933	GD_I_12	China
KF224934	GD_J_12	China
KF224935	GD_K_12	China
KF224936	GD_L_12	China
KF224937	GD_M_12	China
KF224938	GD_N_12	China
KJ004667	G579	Japón
KJ004668	HY80	Japón
KJ004669	NI77	Japón
KJ620989	VRDCCA VTNC108	India
KJ728814	1	Taiwán

KJ728815	2	Taiwán
KJ728818	7	Taiwán
KJ728819	8	Taiwán
KJ728820	9	Taiwán
KJ728821	10	Taiwán
KJ728822	12	Taiwán
KJ728823	13	Taiwán
KJ728824	14	Taiwán
KJ728825	16	Taiwán
KJ728826	17	Taiwán
KJ728827	18	Taiwán
KJ728828	19	Taiwán
KJ728829	20	Taiwán
KJ728830	22	Taiwán
KJ872513	CAV_10	Argentina
KJ872514	CAV_18	Argentina
KM226337	A176	Japón
KM226338	AO77	Japón
KM226339	G174	Japón
KM226340	IBA94	Japón
KM226341	KY80	Japón
KM226342	G791	Japón
KM226343	NI92	Japón
KM458172	CAVL0D513	Polonia
KM458173	CAVLUB5W113	Polonia
KM458174	CAVLUB5W813	Polonia
KM458175	CAVMPL213	Polonia
KM458176	CAVMPL313	Polonia
KM458177	CAVOPL113	Polonia
KM458178	CAVOPL313	Polonia
KM458179	CAVPOD113	Polonia
KM458181	CAVSLA213	Polonia
KM458182	CAVSLA313	Polonia
KM458183	CAVSLA1213	Polonia
KM458184	CAVZPOM813	Polonia
KM458185	CAV3995	Polonia
KM496300	SC_BL	China
KM496301	SC_DL1	China
KM496302	SC_DL2	China
KM496303	SC_HY	China
KM496304	SC_LS	China
KM496305	SC_MS	China
KM496306	SC_MZ	China
KM496307	SC_MZ42A	China
KM496308	SC_NC1	China
KM496309	SC_NC2	China

KM496310	SC_PS	China
KP090251	NAM227	India
KP090253	EABCOM	India
KP090254	NAMCCAV	India
KP090256	CAVVP1NAMM01	India
KP090257	CAVVP1NAMM02	India
KP120755	CAVNAMKS5	India
KP120756	CAVNAMKS4	India
KP120757	CAVNAMKS3	India
KP120758	CAVNAMKS1	India
KP120759	CAVNAMKS6	India
KP120760	CAVNAMKS7	India
KP780287	CAVVietnamBN113	Vietnam
KP780288	CAVVietnamHN113	Vietnam
KP780289	CAVVietnamVP713	Vietnam
KP780290	CAVVietnamVP813	Vietnam
KP780291	CAVVietnamVP913	Vietnam
KP780292	CAVVietnamVP1013	Vietnam
KT276305	IR	Irán
KU050677	GD_102	
KU050678	GD_103	
KU050679	GD_104	
KU050680	GD_101	
KU095829	Tunisia_1328_09	Túnez
KU221054	SD1403	China
KU598851	SD1510	China
KU641013	LN1401	China
KU641014	JN1503	China
KU641015	SD1511	China
KU645506	SD1512	China
KU645507	SD1507	China
KU645508	SD1502	China
KU645509	JS1503	China
KU645510	SD1509	China
KU645511	LN1402	China
KU645512	HN1504	China
KU645513	BJ1406	China
KU645514	HB1404	China
KU645515	SD1515	China
KU645516	HB1517	China
KU645517	SD1513	China
KU645518	JS1501	China
KU645519	SD1508	China
KU645520	HN1405	China
KU645521	SD1514	China
KU645522	SD1518	China

KU645523	SD1505	China
KU845734	FAdV_N22	China
KU845735	ClAV_F10	China
KX377124	NGP_1	India
KX377125	NGP_2	India
KX377127	NGP_7	India
KX377128	NGP_8	India
KX377129	NGP_10	India
KX377130	NGP_11	India
KY024579	RSBR15	Brasil
M55918	Cuxhaven_1	Alemania
U65414	704	Australia
U69548	ConnB	USA
	Nobilis_P4	Uruguay
	141404_	Uruguay
	471604	Uruguay
	471602	Uruguay
	181601	Uruguay
	71601	Uruguay
	51601	Uruguay
	451502	Uruguay
	361501	Uruguay
	171502	Uruguay
	211501	Uruguay
	201502	Uruguay
	361402	Uruguay
	361401	Uruguay
	171401	Uruguay
	M1403	Uruguay
	221402	Uruguay
	221401	Uruguay
	351201	Uruguay
	421103	Uruguay
	421102	Uruguay
	M0610B	Uruguay
	M0509	Uruguay
	M43	Uruguay
	M34	Uruguay
	M23	Uruguay

c) Secuencias de genomas completos codificantes

Nº de acceso	Nombre de muestra	País de origen
D31965	82-2	Japón
KJ728814	1	Taiwán

KJ728815	2	Taiwán
KJ728816	4	Taiwán
KJ728817	6	Taiwán
KJ728824	14	Taiwán
KJ728825	16	Taiwán
KJ728826	17	Taiwán
KJ728827	18	Taiwán
KJ728828	19	Taiwán
KJ728829	20	Taiwán
KJ728830	22	Taiwán
KJ728818	7	Taiwán
KJ728819	8	Taiwán
KJ728820	9	Taiwán
KJ728821	10	Taiwán
KJ728822	12	Taiwán
KJ728823	13	Taiwán
KX772161	1207PT05/2012	Taiwán
KX377124	NGP-1	India
KX377125	NGP-2	India
KX377126	NGP-4	India
KX377127	NGP-7	India
KX377128	NGP-8	India
KX377129	NGP-10	India
KX377130	NGP-11	India
KT276305	IR	Iran
KP780287	CAV/Vietnam/BN1/13	Vietnam
KP780288	CAV/Vietnam/HN1/13	Vietnam
KP780289	CAV/Vietnam/VP7/13	Vietnam
KP780290	CAV/Vietnam/VP8/13	Vietnam
KP780291	CAV/Vietnam/VP9/13	Vietnam
KP780292	CAV/Vietnam/VP10/13	Vietnam
AF527037	BL-5	Malasia
EF683159	3711/Chicken/Australia	Australia
AF227982	CAU269/7	Australia
U65414	704	Australia
AB027470	TR20	
DQ141670	SH11	China
DQ141671	SH16	China
DQ141672	HN9	China
DQ141673	SD22	China
DQ124934	BJ0401	China
DQ124935	AH6	China
DQ124936	AH4	China
AY999018	SD24	China
AY843527	TJBD33	China
AY846844	TJBD40	China

AY839944	LF4	China
AF395114	BD-3	Bangladés
AF390038	3_1	Malasia
AF475908		China
AF285882	SMSC-1	Malasia
AF311892	98D02152	
AF311900	98D06073	
FJ172347	SDLY08	China
EF176599	C14	China
DQ991394	3_!1	USA
KJ872514	CAV-18	Argentina
KF224926	GD-B-12	China
KF224927	GD-C-12	China
KF224928	GD-D-12	China
KF224929	GD-E-12	China
KF224930	GD-F-12	China
KF224931	GD-G-12	China
KF224932	GD-H-12	China
KF224933	GD-I-12	China
KF224934	GD-J-12	China
KF224935	GD-K-12	China
KF224936	GD-L-12	China
KF224937	GD-M-12	China
KF224938	GD-N-12	China
JX964755	GXC060821	China
JX260426	GD-1-12	China
JF507715	CIAV89-69	Corea del Sur
KU645516	HB1517	China
KU645517	SD1513	China
KU645518	JS1501	China
KU645519	SD1508	China
KU645520	HN1405	China
KU645521	SD1514	China
KU645522	SD1518	China
KU645523	SD1505	China
KU598851	SD1510	China
KU641013	LN1401	China
KU641014	JN1503	China
KU641015	SD1511	China
KU050677	GD-102	
KU050678	GD-103	
KU050679	GD-104	
KU050680	GD-101	
KU221054	SD1403	China
KJ872513	CAV-10	Argentina
KY053900	CAV/NAM/TANUVAS/09	India

KX447633	BS-C1	China
KX447634	BS-C2	China
KX447635	HB160430	China
KX447636	LY-1	China
KX447637	LY-2	China
KX811526	SD15	China
KY024579	RS/BR/15	Brasil
KU845734	FAdV-N22	China
KU845735	ClAV-F10	China
KU645506	SD1512	China
KU645507	SD1507	China
KU645508	SD1502	China
KU645509	JS1503	China
KU645510	SD1509	China
KU645511	LN1402	China
KU645512	HN1504	China
KU645513	BJ1406	China
KU645514	HB1404	China
KU645515	SD1515	China
KY486136	HLJ14101	China
KY486137	HLJ15108	China
KY486138	HLJ15109	China
KY486139	HLJ15125	China
KY486140	HLJ15140	China
KY486141	HLJ15165	China
KY486142	HLJ15166	China
KY486143	HLJ15169	China
KY486144	HLJ15170	China
KY486145	JL14023	China
KY486146	JL14024	China
KY486147	JL14026	China
KY486148	JL14028	China
KY486149	JL15120	China
KY486150	NX15091	China
KY486151	NX15140	China
KY486152	JS15165	China
KY486153	JS15166	China
KY486154	LN15169	China
KY486155	LN15170	China
AF313470	Del-Ros	
M55918	Cuxhaven-1	Alemania
	M34	Uruguay
	471602	Uruguay
	141404	Uruguay
	361402	Uruguay
	351201	Uruguay

	361501	Uruguay
	421102	Uruguay
	M06/10B	Uruguay
	M43	Uruguay
	M14/03	Uruguay
	Nobilis_P4	Uruguay

10.3. Anexo 3: Secuencias usadas para análisis filogenéticos.

a) Secuencias nucleotídicas completas de *vp1*

N° de acceso	Nombre de muestra	País de origen
AB027470	TR20	
KX377126	NGP-4	India
AF527037	BL-5	Malasia
DQ124934	BJ0401	China
AY843527	TJBD33	China
D31965	82-2	Japón
AJ888526	CAV/Lanlate-NIE/11-02/28	Nigeria
AJ888525	CAV/Abeokuta-NIE/19-04/117	Nigeria
AJ888523	CAV/Ikire-NIE/11-02/9	Nigeria
AJ888522	CAV/Ejoku-NIE/11-02/107	Nigeria
KX811526	SD15	China

KX447637	LY-2	China
KX447636	LY-1	China
KX447635	HB160430	China
KX447634	BS-C2	China
KX447633	BS-C1	China
KX772161	1207PT05/2012	Taiwán
KY053900	CAV/NAM/TANUVAS/09	India
KY486136	HLJ14101	China
KY486137	HLJ15108	China
KY486138	HLJ15109	China
KY486139	HLJ15125	China
KY486140	HLJ15140	China
KY486141	HLJ15165	China
KY486142	HLJ15166	China
KY486143	HLJ15169	China
KY486144	HLJ15170	China
KY486145	JL14023	China
KY486146	JL14024	China
KY486147	JL14026	China
KY486148	JL14028	China
KY486149	JL15120	China
KY486150	NX15091	China
KY486151	NX15140	China
KY486152	JS15165	China
KY486153	JS15166	China
KY486154	LN15169	China
KY486155	LN15170	China
AB031296	A2	Japón
AB119448	G6	Japón
AF227982	CAU269_7	Australia
AF311892	98D02152	USA
AF311900	98D06073	USA
AF313470	DelRos	USA
AF390038	3_1	Malasia
AF395114	BD_3	Bangladés
AF475908		China
AY839944	LF4	China
AY846844	TJBD40	China
D10068	26P4	USA
DQ016138	130_VP1	Eslovenia
DQ016139	469	Eslovenia
DQ016140	69_VP1	Eslovenia
DQ124935	AH6	China
DQ124936	AH4	China
DQ141670	SH11	China
DQ141671	SH16	China
DQ141672	HN9	China
DQ991394	01_4201	USA
EF159948	Haryana_Sonepet	India
EF176599	C14	China
EF683159	3711chickenAustralia	Australia
EU424059	ANAND	India
FJ172347	SDLY08	China
FJ498867		India

FJ883781	INDTN06	India
FJ883782	INDAP07	India
FJ896818	INDKA06	India
JF507715	CIAV89_69	Corea del Sur
JF712621		India
JQ690762		China
JX260426	GD_1_12	China
JX964755	GXC060821	China
KC414026	CAT_CAV	China
KF224926	GD_B_12	China
KF224927	GD_C_12	China
KF224928	GD_D_12	China
KF224929	GD_E_12	China
KF224930	GD_F_12	China
KF224931	GD_G_12	China
KF224932	GD_H_12	China
KF224933	GD_I_12	China
KF224934	GD_J_12	China
KF224935	GD_K_12	China
KF224936	GD_L_12	China
KF224937	GD_M_12	China
KF224938	GD_N_12	China
KJ004667	G579	Japón
KJ004668	HY80	Japón
KJ004669	NI77	Japón
KJ620989	VRDCCAVTNC108	India
KJ728814	1	Taiwán
KJ728815	2	Taiwán
KJ728818	7	Taiwán
KJ728819	8	Taiwán
KJ728820	9	Taiwán
KJ728821	10	Taiwán
KJ728822	12	Taiwán
KJ728823	13	Taiwán
KJ728824	14	Taiwán
KJ728825	16	Taiwán
KJ728826	17	Taiwán
KJ728827	18	Taiwán
KJ728828	19	Taiwán
KJ728829	20	Taiwán
KJ728830	22	Taiwán
KJ872513	CAV_10	Argentina
KJ872514	CAV_18	Argentina
KM226337	A176	Japón
KM226338	AO77	Japón
KM226339	G174	Japón
KM226340	IBA94	Japón
KM226341	KY80	Japón
KM226342	G791	Japón
KM226343	NI92	Japón
KM458172	CAVL0D513	Polonia
KM458173	CAVLUB5W113	Polonia
KM458174	CAVLUB5W813	Polonia
KM458175	CAVMPL213	Polonia

KM458176	CAVMPL313	Polonia
KM458177	CAVOPL113	Polonia
KM458178	CAVOPL313	Polonia
KM458179	CAVPOD113	Polonia
KM458181	CAVSLA213	Polonia
KM458182	CAVSLA313	Polonia
KM458183	CAVSLA1213	Polonia
KM458184	CAVZPOM813	Polonia
KM458185	CAV3995	Polonia
KM496300	SC_BL	China
KM496301	SC_DL1	China
KM496302	SC_DL2	China
KM496303	SC_HY	China
KM496304	SC_LS	China
KM496305	SC_MS	China
KM496306	SC_MZ	China
KM496307	SC_MZ42A	China
KM496308	SC_NC1	China
KM496309	SC_NC2	China
KM496310	SC_PS	China
KP090251	NAM227	India
KP090253	EABCOM	India
KP090254	NAMCCAV	India
KP090256	CAVVP1NAMM01	India
KP090257	CAVVP1NAMM02	India
KP120755	CAVNAMKS5	India
KP120756	CAVNAMKS4	India
KP120757	CAVNAMKS3	India
KP120758	CAVNAMKS1	India
KP120759	CAVNAMKS6	India
KP120760	CAVNAMKS7	India
KP780287	CAVVietnamBN113	Vietnam
KP780288	CAVVietnamHN113	Vietnam
KP780289	CAVVietnamVP713	Vietnam
KP780290	CAVVietnamVP813	Vietnam
KP780291	CAVVietnamVP913	Vietnam
KP780292	CAVVietnamVP1013	Vietnam
KT276305	IR	Irán
KU050677	GD_102	
KU050678	GD_103	
KU050679	GD_104	
KU050680	GD_101	
KU095829	Tunisia_1328_09	Túnez
KU221054	SD1403	China
KU598851	SD1510	China
KU641013	LN1401	China
KU641014	JN1503	China
KU641015	SD1511	China
KU645506	SD1512	China
KU645507	SD1507	China
KU645508	SD1502	China
KU645509	JS1503	China
KU645510	SD1509	China
KU645511	LN1402	China

KU645512	HN1504	China
KU645513	BJ1406	China
KU645514	HB1404	China
KU645515	SD1515	China
KU645516	HB1517	China
KU645517	SD1513	China
KU645518	JS1501	China
KU645519	SD1508	China
KU645520	HN1405	China
KU645521	SD1514	China
KU645522	SD1518	China
KU645523	SD1505	China
KU845734	FAdV_N22	China
KU845735	ClAV_F10	China
KX377124	NGP_1	India
KX377125	NGP_2	India
	141404	Uruguay
	471604	Uruguay
	471602	Uruguay
	181601	Uruguay
	71601	Uruguay
	51601	Uruguay
	451502	Uruguay
	361501	Uruguay
	171502	Uruguay
	211501	Uruguay
	201502	Uruguay
	361402	Uruguay
	361401	Uruguay
	171401	Uruguay
	M1403	Uruguay
	221402	Uruguay
	221401	Uruguay
	351201	Uruguay
	421103	Uruguay
	421102	Uruguay
	M0610B	Uruguay
	M0509	Uruguay
	M43	Uruguay
	M34	Uruguay
	M23	Uruguay
KX377127	NGP_7	India
KX377128	NGP_8	India
KX377129	NGP_10	India
KX377130	NGP_11	India
KY024579	RSBR15	Brasil
M55918	Cuxhaven_1	Alemania
U65414	704	Australia
U69548	ConnB	USA
M55918	Cuxhaven	Alemania
L14767	CIA-1	
D10068	26P4	
	Nobilis P4	Uruguay
KJ620989	VRDC/CAV/TN/C1/08	India

b) Secuencias nucleotídicas parciales de *vp1*

Nº de acceso	Nombre de muestra	País de origen
KU195689	_IR1_CAV_VP1	Irán
KX377126	NGP-4	India
AF527037	BL-5	Malasia
DQ124934	BJ0401	China
AY843527	TJBD33	China
D31965	82-2	Japón
KX772161	1207PT05/2012	Taiwán
KY053900	CAV/NAM/TANUVAS/09	India
KX447634	BS-C2	China
KX447637	LY-2	China
KX811526	SD15	China
KY486136	HLJ14101	China
KY486137	HLJ15108	China
KY486139	HLJ15125	China
KY486140	HLJ15140	China
KX447636	LY-1	China
KY486143	HLJ15169	China
KY486145	JL14023	China
KY486146	JL14024	China
KY486147	JL14026	China
KY486148	JL1402	China
KY486150	NX15091	China
KY486151	NX15140	China
KY486153	JS15166	China
KY486154	LN15169	China
KY486155	LN15170	China
KU195690	IR2_CAV_VP1	Irán
KU195691	IR3_CAV_VP1	Irán
KU195692	IR4_CAV_VP1	Irán
KU195693	IR5_CAV_VP1	Irán
KT390277	STH28	Sudáfrica
KT390278	STH47	Sudáfrica
KT390279	STH27	Sudáfrica
KT390280	STH19	Sudáfrica
KT390282	STH23	Sudáfrica
KT390283	STH33	Sudáfrica
KJ865862	CAV1221-2010	Brasil
KJ865863	CAV1086-2010	Brasil
KJ865864	CAV1029-2010	Brasil
KJ865865	CAV1013-2010	Brasil
KJ865866	CAV976-2010	Brasil

KJ865867	CAV841-2010	Brasil
KJ865868	CAV740-2009	Brasil
KJ865869	CAV632-2009	Brasil
KJ865871	CAV584-2009	Brasil
KJ865872	CAV240-2008	Brasil
KJ865873	CAV206-2008	Brasil
KJ865874	CAV140-2008	Brasil
KJ865875	CAV1136-2006	Brasil
KJ865876	CAV263-2006	Brasil
KJ865877	CAV15-2006	Brasil
KJ620990	VRDC_CAV_TN_C6_10	India
KJ620991	VRDC_CAV_TN_C7_10	India
KJ620992	VRDC_CAV_CHD_C2_09	India
KJ620993	VRDC_CAV_VC_C3_09	India
KJ620994	VRDC_CAV_CHD_C4_09	India
KJ620995	VRDC_CAV_MH_C5_09	India
KJ620996	VRDC_CAV_TN_C8_10	India
KJ621023	VRDC_CAV_MH_BR_C37_12	India
KJ126838	HK1_13	Japón
KF716159	U101	India
KC691410	CMB12077	Camboya
KC691411	CMB11090	Camboya
KC691412	CMB11091	Camboya
FR850021	AN_China_92	China
FR850022	AN_China_95	China
FR850023	JS_China96	China
FR850024	JS_China_3	China
FR850025	JS_China_72	China
FR850026	JS_China_85	China
FR850027	JS_China_81	China
FR850028	JS_China_80	China
FR850029	AN_China_13	China
FR850030	JS_China_90	China
HQ872023	HU_China_50	China
HQ872024	JS_China_11	China
HQ872025	HU_China_13	China
HQ872026	HU_China_8	China
HQ872027	HU_China_6	China
HQ872028	HU_China_10	China
HQ872029	JS_China_22	China
HQ872030	AN_China_23	China
HQ872031	AN_China_36	China
HQ872032	AN_China_34	China
HQ872033	JS_China_70	China
HQ872034	JS_China_78	China
HQ872035	JS_China_32	China

HQ872037	JS_China_84	China
HQ872038	JS_China_83	China
HQ872039	JS_China_9	China
HQ872040	JS_China_14	China
HQ872041	JS_China_17	China
HQ872042	JS_China_60	China
HQ872043	JS_China_66	China
HQ872044	JS_China_4	China
HQ872045	JS_China_6	China
HQ872046	JS_China_7	China
HQ872047	JS_China_73	China
HM018710	09D367	Corea del Sur
HM018711	JB_KYS	Corea del Sur
HM018712	JB_LCK2	Corea del Sur
HM018713	HKYJ_HI_4A	Corea del Sur
HM018714	HKYJ_HI_1D	Corea del Sur
HM018715	HH_D	Corea del Sur
HM018716	103farm_8	Corea del Sur
HM018717	CN_YJS	Corea del Sur
HM018718	JB_BJS1	Corea del Sur
HM018719	09D243	Corea del Sur
HM018720	CN_MJfarm	Corea del Sur
HM018721	JB_AH4_6	Corea del Sur
HM018722	JB_YKS19_20	Corea del Sur
HM018723	CN_BR_37	Corea del Sur
HM018725	09D301	Corea del Sur
HM018726	09D354	Corea del Sur
HM018727	CN_HJH	Corea del Sur
HM018728	HKYJ_DP_1	Corea del Sur
HM018729	09D359	Corea del Sur
HM018730	09Q174	Corea del Sur
HM018731	09D318	Corea del Sur
HM018732	JB_KYS14	Corea del Sur
HM018733	CN_SHCK	Corea del Sur
HM018734	CN_KRfarm	Corea del Sur
HM018735	HKYJ_DP_3	Corea del Sur
HM018736	HKYK_KC_2	Corea del Sur
HM018737	CN_KKT	Corea del Sur
HM018738	SHJE6B	Corea del Sur
HM018739	CN_TBfarm	Corea del Sur
HM018740	SHJE2	Corea del Sur
EU871767	Arg439	Argentina
EU871768	ArgAN_1	Argentina
EU871769	Arg628	Argentina
EU871770	Arg609	Argentina
EU871771	Arg655	Argentina

EU871772	Arg673	Argentina
EU871773	Arg513	Argentina
EU871774	ArgA008	Argentina
EU871775	ArgA006	Argentina
EU871776	Arg684	Argentina
EU871777	Arg728	Argentina
EU871778	Arg729	Argentina
EU871779	ArgA0018R	Argentina
EU871780	ArgA0010_28	Argentina
EU871781	ArgA0010_34	Argentina
EU871782	Arg753	Argentina
EU871783	ArgA0021_3	Argentina
EU871784	ArgA0021_4	Argentina
AY583755	CAV-A_Chicken_India	India
AY583757	CAV-E_Chicken_India	India
AB027470	TR20	
AB031296	A2	Japón
AB119448	G6	Japón
AF227982	CAU269_7	Australia
AF311892	98D02152	USA
AF311900	98D06073	USA
AF313470	DelRos	USA
AF390038	3_1	Malasia
AF395114	BD_3	Bangladés
AF475908		China
AY839944	LF4	China
AY846844	TJBD40	China
D10068	26P4	USA
DQ016138	130_VP1	Eslovenia
DQ016139	469	Eslovenia
DQ016140	69_VP1	Eslovenia
DQ124935	AH6	China
DQ124936	AH4	China
DQ141670	SH11	China
DQ141671	SH16	China
DQ141672	HN9	China
DQ991394	01_4201	USA
EF159948	Haryana_Sonepet	India
EF176599	C14	China
EF683159	3711chickenAustralia	Australia
EU424059	ANAND	India
FJ172347	SDLY08	China
FJ498867		India
FJ883781	INDTN06	India
FJ883782	INDAP07	India
FJ896818	INDKA06	India

JF507715	CIAV89_69	Corea del Sur
JF712621		India
JQ690762		China
JX260426	GD_1_12	China
JX964755	GXC060821	China
KC414026	CAT_CAV	China
KF224926	GD_B_12	China
KF224927	GD_C_12	China
KF224928	GD_D_12	China
KF224929	GD_E_12	China
KF224930	GD_F_12	China
KF224931	GD_G_12	China
KF224932	GD_H_12	China
KF224933	GD_I_12	China
KF224934	GD_J_12	China
KF224935	GD_K_12	China
KF224936	GD_L_12	China
KF224937	GD_M_12	China
KF224938	GD_N_12	China
KJ004667	G579	Japón
KJ004668	HY80	Japón
KJ004669	NI77	Japón
KJ620989	VRDCCA VTNC108	India
KJ728814	1	Taiwán
KJ728815	2	Taiwán
KJ728818	7	Taiwán
KJ728819	8	Taiwán
KJ728820	9	Taiwán
KJ728821	10	Taiwán
KJ728822	12	Taiwán
KJ728823	13	Taiwán
KJ728824	14	Taiwán
KJ728825	16	Taiwán
KJ728826	17	Taiwán
KJ728827	18	Taiwán
KJ728828	19	Taiwán
KJ728829	20	Taiwán
KJ728830	22	Taiwán
KJ872513	CAV_10	Argentina
KJ872514	CAV_18	Argentina
KM226337	A176	Japón
KM226338	AO77	Japón
KM226339	G174	Japón
KM226340	IBA94	Japón
KM226341	KY80	Japón
KM226342	G791	Japón

KM226343	NI92	Japón
KM458172	CAVL0D513	Polonia
KM458173	CAVLUB5W113	Polonia
KM458174	CAVLUB5W813	Polonia
KM458175	CAVMPL213	Polonia
KM458176	CAVMPL313	Polonia
KM458177	CAVOPL113	Polonia
KM458178	CAVOPL313	Polonia
KM458179	CAVPOD113	Polonia
KM458181	CAVSLA213	Polonia
KM458182	CAVSLA313	Polonia
KM458183	CAVSLA1213	Polonia
KM458184	CAVZPOM813	Polonia
KM458185	CAV3995	Polonia
KM496300	SC_BL	China
KM496301	SC_DL1	China
KM496302	SC_DL2	China
KM496303	SC_HY	China
KM496304	SC_LS	China
KM496305	SC_MS	China
KM496306	SC_MZ	China
KM496307	SC_MZ42A	China
KM496308	SC_NC1	China
KM496309	SC_NC2	China
KM496310	SC_PS	China
KP090251	NAM227	India
KP090253	EABCOM	India
KP090254	NAMCCAV	India
KP090256	CAVVP1NAMM01	India
KP090257	CAVVP1NAMM02	India
KP120755	CAVNAMKS5	India
KP120756	CAVNAMKS4	India
KP120757	CAVNAMKS3	India
KP120758	CAVNAMKS1	India
KP120759	CAVNAMKS6	India
KP120760	CAVNAMKS7	India
KP780287	CAVVietnamBN113	Vietnam
KP780288	CAVVietnamHN113	Vietnam
KP780289	CAVVietnamVP713	Vietnam
KP780290	CAVVietnamVP813	Vietnam
KP780291	CAVVietnamVP913	Vietnam
KP780292	CAVVietnamVP1013	Vietnam
KT276305	IR	Irán
KU050677	GD_102	
KU050678	GD_103	
KU050679	GD_104	

KU050680	GD_101	
KU095829	Tunisia_1328_09	Túnez
KU221054	SD1403	China
KU598851	SD1510	China
KU641013	LN1401	China
KU641014	JN1503	China
KU641015	SD1511	China
KU645506	SD1512	China
KU645507	SD1507	China
KU645508	SD1502	China
KU645509	JS1503	China
KU645510	SD1509	China
KU645511	LN1402	China
KU645512	HN1504	China
KU645513	BJ1406	China
KU645514	HB1404	China
KU645515	SD1515	China
KU645516	HB1517	China
KU645517	SD1513	China
KU645518	JS1501	China
KU645519	SD1508	China
KU645520	HN1405	China
KU645521	SD1514	China
KU645522	SD1518	China
KU645523	SD1505	China
KU845734	FAdV_N22	China
KU845735	CIAV_F10	China
KX377124	NGP_1	India
KX377125	NGP_2	India
KX377127	NGP_7	India
KX377128	NGP_8	India
KX377129	NGP_10	India
KX377130	NGP_11	India
KY024579	RSBR15	Brasil
M55918	Cuxhaven_1	Alemania
U65414	704	Australia
U69548	ConnB	USA
	Nobilis_P4	Uruguay
	141404_	Uruguay
	471604	Uruguay
	471602	Uruguay
	181601	Uruguay
	71601	Uruguay
	51601	Uruguay
	451502	Uruguay
	361501	Uruguay

	171502	Uruguay
	211501	Uruguay
	201502	Uruguay
	361402	Uruguay
	361401	Uruguay
	171401	Uruguay
	M1403	Uruguay
	221402	Uruguay
	221401	Uruguay
	351201	Uruguay
	421103	Uruguay
	421102	Uruguay
	M0610B	Uruguay
	M0509	Uruguay
	M43	Uruguay
	M34	Uruguay
	M23	Uruguay

c) Secuencias de genomas completos codificantes

Nº de acceso	Nombre de muestra	País de origen
D31965	82-2	Japón
KJ728814	1	Taiwán
KJ728815	2	Taiwán
KJ728824	14	Taiwán
KJ728825	16	Taiwán
KJ728826	17	Taiwán
KJ728827	18	Taiwán
KJ728828	19	Taiwán
KJ728829	20	Taiwán
KJ728830	22	Taiwán
KJ728818	7	Taiwán
KJ728819	8	Taiwán
KJ728820	9	Taiwán
KJ728821	10	Taiwán
KJ728822	12	Taiwán
KJ728823	13	Taiwán
KX772161	1207PT05/2012	Taiwán
KX377124	NGP-1	India
KX377125	NGP-2	India
KX377126	NGP-4	India
KX377127	NGP-7	India
KX377128	NGP-8	India

KX377129	NGP-10	India
KX377130	NGP-11	India
KT276305	IR	Irán
KP780287	CAV/Vietnam/BN1/13	Vietnam
KP780288	CAV/Vietnam/HN1/13	Vietnam
KP780289	CAV/Vietnam/VP7/13	Vietnam
KP780290	CAV/Vietnam/VP8/13	Vietnam
KP780291	CAV/Vietnam/VP9/13	Vietnam
KP780292	CAV/Vietnam/VP10/13	Vietnam
AF527037	BL-5	Malasia
EF683159	3711/Chicken/Australia	Australia
AF227982	CAU269/7	Australia
U65414	704	Australia
AB027470	TR20	
DQ141670	SH11	China
DQ141671	SH16	China
DQ141672	HN9	China
DQ124934	BJ0401	China
DQ124935	AH6	China
DQ124936	AH4	China
AY843527	TJBD33	China
AY846844	TJBD40	China
AY839944	LF4	China
AF395114	BD-3	Bangladés
AF390038	3_1	Malasia
AF475908		China
AF285882	SMSC-1	Malasia
AF311892	98D02152	
AF311900	98D06073	
FJ172347	SDLY08	China
EF176599	C14	China
DQ991394	3_11	USA
KJ872514	CAV-18	Argentina
KF224926	GD-B-12	China
KF224927	GD-C-12	China
KF224928	GD-D-12	China
KF224929	GD-E-12	China
KF224930	GD-F-12	China
KF224931	GD-G-12	China
KF224932	GD-H-12	China
KF224933	GD-I-12	China
KF224934	GD-J-12	China
KF224935	GD-K-12	China
KF224936	GD-L-12	China
KF224937	GD-M-12	China
KF224938	GD-N-12	China

JX964755	GXC060821	China
JX260426	GD-1-12	China
JF507715	CIAV89-69	Corea del Sur
KU645516	HB1517	China
KU645517	SD1513	China
KU645518	JS1501	China
KU645519	SD1508	China
KU645520	HN1405	China
KU645521	SD1514	China
KU645522	SD1518	China
KU645523	SD1505	China
KU598851	SD1510	China
KU641013	LN1401	China
KU641014	JN1503	China
KU641015	SD1511	China
KU050677	GD-102	
KU050678	GD-103	
KU050679	GD-104	
KU050680	GD-101	
KU221054	SD1403	China
KJ872513	CAV-10	Argentina
KY053900	CAV/NAM/TANUVAS/09	India
KX447633	BS-C1	China
KX447634	BS-C2	China
KX447635	HB160430	China
KX447636	LY-1	China
KX447637	LY-2	China
KX811526	SD15	China
KY024579	RS/BR/15	Brasil
KU845734	FAdV-N22	China
KU845735	CIAV-F10	China
KU645506	SD1512	China
KU645507	SD1507	China
KU645508	SD1502	China
KU645509	JS1503	China
KU645510	SD1509	China
KU645511	LN1402	China
KU645512	HN1504	China
KU645513	BJ1406	China
KU645514	HB1404	China
KU645515	SD1515	China
KY486136	HLJ14101	China
KY486137	HLJ15108	China
KY486138	HLJ15109	China
KY486139	HLJ15125	China
KY486140	HLJ15140	China

KY486141	HLJ15165	China
KY486142	HLJ15166	China
KY486143	HLJ15169	China
KY486144	HLJ15170	China
KY486145	JL14023	China
KY486146	JL14024	China
KY486147	JL14026	China
KY486148	JL14028	China
KY486149	JL15120	China
KY486150	NX15091	China
KY486151	NX15140	China
KY486152	JS15165	China
KY486153	JS15166	China
KY486154	LN15169	China
KY486155	LN15170	China
AF313470	Del-Ros	
M55918	Cuxhaven-1	Alemania
	M34	Uruguay
	471602	Uruguay
	141404	Uruguay
	361402	Uruguay
	351201	Uruguay
	361501	Uruguay
	421102	Uruguay
	M06/10B	Uruguay
	M43	Uruguay
	M14/03	Uruguay
	Nobilis_P4	Uruguay

10.4. Anexo 4: Secuencias usadas para análisis de coalescencia.

a) Todas las secuencias nucleotídicas completas de *vp1*

N° de acceso	Nombre de muestra	País de origen	Año
AF227982	CAU269/7	Australia	1988
DQ991394	01_4201	USA	2001
KX377124	NGP-1	India	2012
KX377125	NGP-2	India	2012
KX377127	NGP-7	India	2012
KX377128	NGP-8	India	2012
KX377129	NGP-10	India	2015
KX377130	NGP-11	India	2015
KU645506	SD1512	China	2015
KU645507	SD1507	China	2015
KU645508	SD1502	China	2015
KU645509	JS1503	China	2015
KU645510	SD1509	China	2015
KU645511	LN1402	China	2014
KU645512	HN1504	China	2015
KU645513	BJ1406	China	2014
KU645514	HB1404	China	2014
KU645515	SD1515	China	2015
KU645516	HB1517	China	2015
KU645518	JS1501	China	2015
KU645519	SD1508	China	2015
KU645520	HN1405	China	2014
KU645521	SD1514	China	2015

KU645522	SD1518	China	2015
KU645523	SD1505	China	2015
KU598851	SD1510	China	2015
KU641013	LN1401	China	2014
KU641015	SD1511	China	2015
KJ728821	10	Taiwán	2012
KJ728822	12	Taiwán	2012
KJ728826	17	Taiwán	2012
KJ728828	19	Taiwán	2012
KJ728829	20	Taiwán	2012
AM407843	CH-CK/05-05/GD/4960	China	2005
AM407844	CH-CK/05-05/GD/4964	China	2005
AM407875	CH-CK/05-04/GD/3088	China	2005
AM407878	CH-CK/05-05/GD/5840	China	2005
AM407846	CH-CK/05-01/GD/58	China	2005
AM407874	CH-CK/04-02/GD/1115	China	2004
AM407865	CH-SCK/04-01/GD/552	China	2004
AM407849	CH-CK/05-01/HN/520	China	2005
AM407871	CH-CK/05-05/GD/5652	China	2005
AM407868	CH-CK/05-05/GD/4661	China	2005
AM407881	CH-CK/04-12/GD/1139	China	2004
AM407826	CH-CK/05-04/GD/3586	China	2005
AM407820	CH-CK/05-01/GD/683	China	2005
AM407842	CH-CK/05-05/GD/4665	China	2005
AM407837	CH-CK/05-04/GD/3084	China	2005
AM407822	CH-CK/05-02/GD/1569	China	2005
KJ728814	1	Taiwán	2012
KJ728830	22	Taiwán	2012
KJ728815	2	Taiwán	2012
KJ728825	16	Taiwán	2012
AM407839	CH-CK/05-05/GD/4347	China	2005
AM407872	CH-CK/05-05/GD/5842	China	2005
JX964755	GXC060821	China	2006
AM407861	CH-CK/05-12/GD/22035	China	2005
KM496304	SC-LS	China	2014
KM496305	SC-MS	China	2014
KM496309	SC-NC2	China	2013
KM496310	SC-PS	China	2013
KM496301	SC-DL1	China	2014
KM496302	SC-DL2	China	2014
KM496306	SC-MZ	China	2013
AM407825	CH-CK/05-04/GD/3592	China	2005
KP780287	CAV/Vietnam/BN1/13	Vietnam	2013
KP780288	CAV/Vietnam/HN1/13	Vietnam	2013
KP780290	CAV/Vietnam/VP8/13	Vietnam	2013
KP780291	CAV/Vietnam/VP9/13	Vietnam	2013

KJ728818	7	Taiwán	2012
KM496303	SC-HY	China	2014
KJ728823	13	Taiwán	2012
KF224933	GD-I-12	China	2011
KF224937	GD-M-12	China	2012
KF224929	GD-E-12	China	2012
KF224931	GD-G-12	China	2011
KF224926	GD-B-12	China	2011
KF224930	GD-F-12	China	2012
KF224934	GD-J-12	China	2012
KF224936	GD-L-12	China	2012
KF224938	GD-N-12	China	2012
KF224927	GD-C-12	China	2012
KF224932	GD-H-12	China	2012
KP090251	NAM227	India	2010
KP120758	CAVNAMKS1	India	2009
KP120760	CAVNAMKS7	India	2010
KM226337	A1/76	Japón	1976
FJ172347	SDLY08	China	2008
KP120759	CAVNAMKS6	India	2010
KP120755	CAVNAMKS5	India	2010
FJ883782	INDAP07	India	2007
FJ883781	INDTN06	India	2006
FJ896818	INDKA06	India	2006
KM458184	CAV/ZPOM8/13	Polonia	2013
KM458183	CAV/SLA12/13	Polonia	2014
KM458182	CAV/SLA3/13	Polonia	2013
KM458181	CAV/SLA2/13	Polonia	2013
KM458178	CAV/OPL3/13	Polonia	2013
KM458176	CAV/MPL3/13	Polonia	2013
KM458175	CAV/MPL2/13	Polonia	2013
KM458174	CAV/LUB5W8/13	Polonia	2013
KM458173	CAV/LUB5W1/13	Polonia	2013
KM458172	CAV/LOD5/13	Polonia	2013
JF712621	India	India	2009
KM226338	AO/77	Japón	1977
KJ004672	EsCAV/F11	Japón	2013
KJ004671	EsCAV/F8	Japón	2013
AM407827	CH-CK/05-05/GD/5258	China	2005
AM407863	CH-SCK/05-01/GD/656	China	2005
KP090256	CAVVP1NAMM01	India	2011
KJ728820	9	Taiwán	2012
KJ728819	8	Taiwán	2012
AJ888525	CAV/Abeokuta.NIE/19.04/117	Nigeria	2004
AJ888524	CAV/Abeokuta.NIE/19.04/118	Nigeria	2004
	361501	Uruguay	2015

	361402	Uruguay	2014
AJ888529	CAV/Lanlate.NIE/11.02/12	Nigeria	2002
AJ888528	CAV/Lanlate.NIE/11.02/71	Nigeria	2002
KY024579	RS/BR/15	Brasil	2015
KU095829	Tunisia-1328-09	Túnez	2009
KU845735	CAV-F10	China	2015
AM407864	CH-CK/04-01/GD/98	China	2004
KF224935	GD-K-12	China	2012
KJ728827	18	Taiwán	2012
KM458179	CAV/POD1/13	Polonia	2013
KM458177	CAV/OPL1/13	Polonia	2013
KJ872513	CAV-10	Argentina	2007
KJ004667	G5/79	Japón	1979
KJ004668	HY/80	Japón	1980
AJ888522	CAV/Ejioku.NIE/11.02/107	Nigeria	2002
KJ620989	VRDC/CAV/TN/C1/08	India	2008
AJ888521	CAV/Ibadan.NIE/14.04/116	Nigeria	2004
KJ004669	NI/77	Japón	1977
KJ872514	CAV-18	Argentina	2007
D31965	82-2	Japón	1982
	M06/10B	Uruguay	2010
	421103	Uruguay	2011
	M43	Uruguay	2007
	71601	Uruguay	2016
	M05/09	Uruguay	2009
	M14/03	Uruguay	2014
	471604	Uruguay	2016
	471602	Uruguay	2016
	451502	Uruguay	2015
	221402	Uruguay	2014
	221401	Uruguay	2014
	211501	Uruguay	2015
	201502	Uruguay	2015
	181601	Uruguay	2016
	171502	Uruguay	2015
	171401	Uruguay	2014
	141404	Uruguay	2014
	51601	Uruguay	2016
	351201	Uruguay	2012

b) Secuencias nucleotídicas completas de *vp1* que pertenecen al clado II

N° de acceso	Nombre de muestra	País de origen	Año
KY024579	RS/BR/15	Brasil	2015
KU095829	Tunisia-1328-09	Túnez	2009

KU845735	CAV-F10	China	2015
AM407864	CH-CK/04-01/GD/98	China	2004
KF224935	GD-K-12	China	2012
KJ728827	18	Taiwán	2012
KM458179	CAV/POD1/13	Polonia	2013
KM458177	CAV/OPL1/13	Polonia	2013
KJ872513	CAV-10	Argentina	2007
KJ004667	G5/79	Japón	1979
KJ004668	HY/80	Japón	1980
AJ888522	CAV/Ejioku.NIE/11.02/107	Nigeria	2002
KJ620989	VRDC/CAV/TN/C1/08	India	2008
AJ888521	CAV/Ibadan.NIE/14.04/116	Nigeria	2004
KJ004669	NI/77	Japón	1977
KJ872514	CAV-18	Argentina	2007
D31965	82-2	Japón	1982
	M06/10B	Uruguay	2010
	421103	Uruguay	2011
	M43	Uruguay	2007
	71601	Uruguay	2016
	M05/09	Uruguay	2009
	M14/03	Uruguay	2014
	471604	Uruguay	2016
	471602	Uruguay	2016
	451502	Uruguay	2015
	221402	Uruguay	2014
	221401	Uruguay	2014
	211501	Uruguay	2015
	201502	Uruguay	2015
	181601	Uruguay	2016
	171502	Uruguay	2015
	171401	Uruguay	2014
	141404	Uruguay	2014
	51601	Uruguay	2016
	351201	Uruguay	2012

c) Secuencias nucleotídicas completas de *vp1* que pertenecen al clado III

N° de acceso	Nombre de muestra	País de origen	Año
DQ991394	01_4201	USA	2001
KX377124	NGP-1	India	2012
KX377125	NGP-2	India	2012
KX377127	NGP-7	India	2012
KX377128	NGP-8	India	2012
KX377129	NGP-10	India	2015
KX377130	NGP-11	India	2015

KU645506	SD1512	China	2015
KU645507	SD1507	China	2015
KU645508	SD1502	China	2015
KU645509	JS1503	China	2015
KU645510	SD1509	China	2015
KU645511	LN1402	China	2014
KU645512	HN1504	China	2015
KU645513	BJ1406	China	2014
KU645514	HB1404	China	2014
KU645515	SD1515	China	2015
KU645516	HB1517	China	2015
KU645518	JS1501	China	2015
KU645519	SD1508	China	2015
KU645520	HN1405	China	2014
KU645521	SD1514	China	2015
KU645522	SD1518	China	2015
KU645523	SD1505	China	2015
KU598851	SD1510	China	2015
KU641013	LN1401	China	2014
KU641015	SD1511	China	2015
KJ728821	10	Taiwán	2012
KJ728822	12	Taiwán	2012
KJ728826	17	Taiwán	2012
KJ728828	19	Taiwán	2012
KJ728829	20	Taiwán	2012
AM407843	CH-CK/05-05/GD/4960	China	2005
AM407844	CH-CK/05-05/GD/4964	China	2005
AM407875	CH-CK/05-04/GD/3088	China	2005
AM407878	CH-CK/05-05/GD/5840	China	2005
AM407846	CH-CK/05-01/GD/58	China	2005
AM407874	CH-CK/04-02/GD/1115	China	2004
AM407865	CH-SCK/04-01/GD/552	China	2004
AM407849	CH-CK/05-01/HN/520	China	2005
AM407871	CH-CK/05-05/GD/5652	China	2005
AM407868	CH-CK/05-05/GD/4661	China	2005
AM407881	CH-CK/04-12/GD/1139	China	2004
AM407826	CH-CK/05-04/GD/3586	China	2005
AM407820	CH-CK/05-01/GD/683	China	2005
AM407842	CH-CK/05-05/GD/4665	China	2005
AM407837	CH-CK/05-04/GD/3084	China	2005
AM407822	CH-CK/05-02/GD/1569	China	2005
KJ728814	1	Taiwán	2012
KJ728830	22	Taiwán	2012
KJ728815	2	Taiwán	2012
KJ728825	16	Taiwán	2012
AM407839	CH-CK/05-05/GD/4347	China	2005

AM407872	CH-CK/05-05/GD/5842	China	2005
JX964755	GXC060821	China	2006
AM407861	CH-CK/05-12/GD/22035	China	2005
KM496304	SC-LS	China	2014
KM496305	SC-MS	China	2014
KM496309	SC-NC2	China	2013
KM496310	SC-PS	China	2013
KM496301	SC-DL1	China	2014
KM496302	SC-DL2	China	2014
KM496306	SC-MZ	China	2013
AM407825	CH-CK/05-04/GD/3592	China	2005
KP780287	CAV/Vietnam/BN1/13	Vietnam	2013
KP780288	CAV/Vietnam/HN1/13	Vietnam	2013
KP780290	CAV/Vietnam/VP8/13	Vietnam	2013
KP780291	CAV/Vietnam/VP9/13	Vietnam	2013
KJ728818	7	Taiwán	2012
KM496303	SC-HY	China	2014
KJ728823	13	Taiwán	2012
KF224933	GD-I-12	China	2011
KF224937	GD-M-12	China	2012
KF224929	GD-E-12	China	2012
KF224931	GD-G-12	China	2011
KF224926	GD-B-12	China	2011
KF224930	GD-F-12	China	2012
KF224934	GD-J-12	China	2012
KF224936	GD-L-12	China	2012
KF224938	GD-N-12	China	2012
KF224927	GD-C-12	China	2012
KF224932	GD-H-12	China	2012
KP090251	NAM227	India	2010
KP120758	CAVNAMKS1	India	2009
KP120760	CAVNAMKS7	India	2010
KM226337	A1/76	Japón	1976
FJ172347	SDLY08	China	2008
KP120759	CAVNAMKS6	India	2010
KP120755	CAVNAMKS5	India	2010
FJ883782	INDAP07	India	2007
FJ883781	INDTN06	India	2006
FJ896818	INDKA06	India	2006
KM458184	CAV/ZPOM8/13	Polonia	2013
KM458183	CAV/SLA12/13	Polonia	2014
KM458182	CAV/SLA3/13	Polonia	2013
KM458181	CAV/SLA2/13	Polonia	2013
KM458178	CAV/OPL3/13	Polonia	2013
KM458176	CAV/MPL3/13	Polonia	2013
KM458175	CAV/MPL2/13	Polonia	2013

KM458174	CAV/LUB5W8/13	Polonia	2013
KM458173	CAV/LUB5W1/13	Polonia	2013
KM458172	CAV/LOD5/13	Polonia	2013
JF712621	India	India	2009
KM226338	AO/77	Japón	1977
KJ004672	EsCAV/F11	Japón	2013
KJ004671	EsCAV/F8	Japón	2013
AM407827	CH-CK/05-05/GD/5258	China	2005
AM407863	CH-SCK/05-01/GD/656	China	2005
KP090256	CAVVP1NAMM01	India	2011
KJ728820	9	Taiwán	2012
KJ728819	8	Taiwán	2012
AJ888525	CAV/Abeokuta.NIE/19.04/117	Nigeria	2004
AJ888524	CAV/Abeokuta.NIE/19.04/118	Nigeria	2004
	361501	Uruguay	2015
	361402	Uruguay	2014
AJ888529	CAV/Lanlate.NIE/11.02/12	Nigeria	2002
AJ888528	CAV/Lanlate.NIE/11.02/71	Nigeria	2002

d) Todas las secuencias nucleotídicas parciales de *vp1*

N° de acceso	Nombre de muestra	País de origen	Año
KJ620990	VRDC-CAV-TN-C6-10	India	2010
KU645518	JS1501	China	2015
KU598851	SD1510	China	2015
AM407843	CH_CK-05-05-GD-4960	China	2005
AM407844	CH_CK-05-05-GD-4964	China	2005
AM407875	CH_CK-05-04-GD-3088	China	2005
AM407878	CH_CK-05-05-GD-5840	China	2005
AM407846	CH_CK-05-01-GD-58	China	2005
AM407874	CH_CK-04-02-GD-1115	China	2004
AM407865	CH_SCK-04-01-GD-552	China	2004
AM407849	CH_CK-05-01-HN/520	China	2005
AM407871	CH_CK/05-05/GD/5652	China	2005
AM407868	CH_CK/05-05/GD/4661	China	2005
AM407881	CH_CK/04-12/GD/1139	China	2004
AM407826	CH_CK/05-04/GD/3586	China	2005
AM407820	CH_CK/05-01/GD/683	China	2005
AM407842	CH_CK/05-05/GD/4665	China	2005
AM407837	CH_CK/05-04/GD/3084	China	2005
AM407822	CH_CK/05-02/GD/1569	China	2005
KJ728814	1	Taiwán	2012
KJ728830_	22	Taiwán	2012
KJ728815	2	Taiwán	2012
AM407839	CH_CK/05-05/GD/4347	China	2005

AM407872	CH_CK/05-05/GD/5842	China	2005
AM407861	CH_CK/05-12/GD/22035	China	2005
KM496306	SC-MZ	China	2013
AM407825	CH_CK/05-04/GD/3592	China	2005
KP780287	CAVVietnamBN113	Vietnam	2013
KP780288	CAVVietnamHN113	Vietnam	2013
KP780290	CAVVietnamVP813	Vietnam	2013
KP780291	CAVVietnamVP913	Vietnam	2013
KF224936	GD-L-12	China	2012
KF224938	GD-N-12	China	2012
KF224932	GD-H-12	China	2012
KM226337	A1/76	Japón	1976
KM458184	CAV/ZPOM8/13	Polonia	2013
KM458183	CAV/SLA12/13	Polonia	2014
KM458182	CAV/SLA3/13	Polonia	2013
KM458181	CAV/SLA2/13	Polonia	2013
KM458178	CAV/OPL3/13	Polonia	2013
KM458176	CAV/MPL3/13	Polonia	2013
KM458175	CAV/MPL2/13	Polonia	2013
KM458174	CAV/LUB5W8/13	Polonia	2013
KM458173	CAVLUB5W113	Polonia	2013
KM226338	AO/77	Japón	1977
KJ004672	EsCAV/F11	Japón	2013
KJ004671	EsCAV/F8	Japón	2013
AM407827	CH_CK/05-05/GD/5258	China	2005
AM407863	CH_SCK/05-01/GD/656	China	2005
AJ888525	CAV/Abeokuta.NIE/19.04/117	Nigeria	2004
AJ888524	CAV/Abeokuta.NIE/19.04/118	Nigeria	2004
AJ888529	CAV/Lanlate.NIE/11.02/12	Nigeria	2002
AJ888528	CAV/Lanlate.NIE/11.02/71	Nigeria	2002
KJ620991	VRDC-CAV-TN-C7-10	India	2010
KJ620992	VRDC-CAV-CHD-C2-09	India	2009
KJ620993	VRDC-CAV-VC-C3-09	India	2009
KJ620994	VRDC-CAV-CHD-C4-09	India	2009
KJ620995	VRDC-CAV-MH-C5-09	India	2009
KJ620996	VRDC-CAV-TN-C8-10	India	2010
KJ621023	VRDC-CAV-MH-BR-C37-12	India	2012
KJ126838	HK1-13	Japón	2013
KJ865877	CAV15	Brasil	2006
KJ865869	CAV632	Brasil	2009
KJ865876	CAV263	Brasil	2006
FR850022	AN-China-95	China	2010
FR850023	JS-China96	China	2010
FR850027	JS-China-81	China	2010
FR850028	JS-China-80	China	2010
HQ872025	HU-China-13	China	2010

HQ872031	AN-China-36	China	2010
HQ872032	AN-China-34	China	2010
HQ872033	JS-China-70	China	2010
HQ872034	JS-China-78	China	2010
HQ872035	JS-China-32	China	2010
HQ872038	JS-China-83	China	2010
HQ872039	JS-China-9	China	2010
HQ872040	JS-China-14	China	2010
HQ872047	JS-China-73	China	2010
HM018719	09D243	Corea del Sur	2009
HM018720	CN-MJfarm	Corea del Sur	2009
HM018721	JB-AH4-6	Corea del Sur	2009
HM018722	JB-YKS19-20	Corea del Sur	2009
HM018723	CN-BR-37	Corea del Sur	2009
HM018725	09D301	Corea del Sur	2009
HM018726	09D354	Corea del Sur	2009
HM018727	CN-HJH	Corea del Sur	2009
HM018728	HKYJ-DP-1	Corea del Sur	2009
HM018729	09D359	Corea del Sur	2009
HM018730	09Q174	Corea del Sur	2009
HM018731	09D318	Corea del Sur	2009
HM018733	CN-SHCK	Corea del Sur	2009
HM018734	CN-KRfarm	Corea del Sur	2009
HM018735	HKYJ-DP-3	Corea del Sur	2009
HM018736	HKYK-KC-2	Corea del Sur	2009
HM018737	CN-KKT	Corea del Sur	2009
HM018738	SHJE6B	Corea del Sur	2009
HM018739	CN-TBfarm	Corea del Sur	2009
HM018740	SHJE2	Corea del Sur	2009
AF311892	98D02152	USA	1997
AF395114	BD-3	Bangladés	1999
DQ016139	469	Eslovenia	2001
DQ016140	69	Eslovenia	2000
DQ991394	01_4201	USA	2001
FJ172347	SDLY08	China	2008
FJ883781	INDTN06	India	2006
FJ883782	INDAP07	India	2007
FJ896818	INDKA06	India	2006
JF712621	India	India	2009
JX260426	GD-1-12	China	2012
JX964755	GXC060821	China	2006
KF224926	GD-B-12	China	2011
KF224927	GD-C-12	China	2012
KF224928	GD-D-12	China	2012
KF224929	GD-E-12	China	2012
KF224930	GD-F-12	China	2012

KF224931	GD-G-12	China	2011
KF224933	GD-I-12	China	2011
KF224934	GD-J-12	China	2012
KF224937	GD-M-12	China	2012
KJ728818	7	Taiwán	2012
KJ728819	8	Taiwán	2012
KJ728820	9	Taiwán	2012
KJ728821	10	Taiwán	2012
KJ728822	12	Taiwán	2012
KJ728823	13	Taiwán	2012
KJ728825	16	Taiwán	2012
KJ728826	17	Taiwán	2012
KJ728828	19	Taiwán	2012
KJ728829	20	Taiwán	2012
KM226341	KY80	Japón	1980
KM458172	CAVL0D513	Polonia	2013
KM458174	CAVLUB5W813	Polonia	2013
KM458175	CAVMPL213	Polonia	2013
KM458176	CAVMPL313	Polonia	2013
KM458178	CAVOPL313	Polonia	2013
KM458181	CAVSLA213	Polonia	2013
KM458182	CAVSLA313	Polonia	2013
KM458183	CAVSLA1213	Polonia	2014
KM458184	CAVZPOM813	Polonia	2013
KM458185	CAV3995	Polonia	1995
KM496301	SC-DL1	China	2014
KM496302	SC-DL2	China	2014
KM496303	SC-HY	China	2014
KM496304	SC-LS	China	2014
KM496305	SC-MS	China	2014
KM496308	SC-NC1	China	2013
KM496309	SC-NC2	China	2013
KM496310	SC-PS	China	2013
KP090251	NAM227	India	2010
KP090253	EABCOM	India	2012
KP090254	NAMCCAV	India	2012
KP090256	CAVVP1NAMM01	India	2011
KP120755	CAVNAMKS5	India	2010
KP120756	CAVNAMKS4	India	2009
KP120757	CAVNAMKS3	India	2009
KP120758	CAVNAMKS1	India	2009
KP120759	CAVNAMKS6	India	2010
KP120760	CAVNAMKS7	India	2010
KP780287	CAVVietnamBN113	Vietnam	2013
KP780288	CAVVietnamHN113	Vietnam	2013
KU641013	LN1401	China	2014

KU641015	SD1511	China	2015
KU645506	SD1512	China	2015
KU645507	SD1507	China	2015
KU645508	SD1502	China	2015
KU645509	JS1503	China	2015
KU645510	SD1509	China	2015
KU645511	LN1402	China	2014
KU645512	HN1504	China	2015
KU645513	BJ1406	China	2014
KU645514	HB1404	China	2014
KU645515	SD1515	China	2015
KU645516	HB1517	China	2015
KU645519	SD1508	China	2015
KU645521	SD1514	China	2015
KU645520	HN1405	China	2014
KU645522	SD1518	China	2015
KU645523	SD1505	China	2015
KX377124	NGP-1	India	2012
KX377125	NGP-2	India	2012
	361501	Uruguay	2015
	361402	Uruguay	2014
KX377127	NGP-7	India	2012
KX377128	NGP-8	India	2012
KX377129	NGP-10	India	2015
KX377130	NGP-11	India	2015
AF311900	98D06073	USA	1997
AJ888521	CAV/Ibadan.NIE/14.04/116	Nigeria	2004
AJ888522	CAV/Ejioku.NIE/11.02/107	Nigeria	2002
AM407864	CH-CK/04-01/GD/98	China	2004
EU871767	Arg439	Argentina	2007
EU871768	ArgAN-1	Argentina	2007
EU871769	Arg628	Argentina	2007
EU871770	Arg609	Argentina	2007
EU871771	Arg655	Argentina	2007
EU871772	Arg673	Argentina	2007
EU871773	Arg513	Argentina	2007
EU871774	ArgA008	Argentina	2007
EU871775	ArgA006	Argentina	2007
EU871776	Arg684	Argentina	2007
EU871777	Arg728	Argentina	2007
EU871778	Arg729	Argentina	2007
EU871779	ArgA0018R	Argentina	2007
EU871780	ArgA0010-28	Argentina	2007
EU871781	ArgA0010-34	Argentina	2007
EU871782	Arg753	Argentina	2007
EU871783	ArgA0021-3	Argentina	2008

EU871784	ArgA0021-4	Argentina	2008
FR850021	AN-China-92	China	2010
FR850030	JS-China-90	China	2010
HM018710	09D367	Corea del Sur	2009
HM018711	JBKYS	Corea del Sur	2009
HM018712	JBLCK2	Corea del Sur	2009
HM018713	HKYJ-HI-4A	Corea del Sur	2009
HM018714	HKYJ-HI-1D	Corea del Sur	2009
HM018715	HH-D	Corea del Sur	2009
HM018716	103farm-8	Corea del Sur	2009
HM018717	CN-YJS	Corea del Sur	2009
HM018718	JB-BJS1	Corea del Sur	2009
HQ872024	JS-China-11	China	2010
HQ872026	HU-China-8	China	2010
HQ872037	JS-China-84	China	2010
KC691410	CMB12077	Camboya	2012
KC691411	CMB11090	Camboya	2011
KC691412	CMB11091	Camboya	2011
KF224935	GD-K-12	China	2012
KJ004667	G5/79	Japón	1979
KJ004668	HY/80	Japón	1980
KJ004669	NI/77	Japón	1977
KJ620989	VRDC/CAV/TN/C1/08	India	2008
KJ620989	VRDCCA VTNC108	India	2008
KJ728827	18	Taiwán	2012
KJ865863	CAV1086	Brasil	2010
KJ865864	CAV1029	Brasil	2010
KJ865865	CAV1013	Brasil	2010
KJ865866	CAV976	Brasil	2010
KJ865868	CAV740	Brasil	2009
KJ865871	CAV584	Brasil	2009
KJ865872	CAV240	Brasil	2008
KJ865875	CAV1136	Brasil	2006
KJ872513	CAV-10	Argentina	2007
KJ872514	CAV-18	Argentina	2007
KM458177	CAV/OPL1/13	Polonia	2013
KM458179	CAV/POD1/13	Polonia	2013
KM458179	CAVPOD11	Polonia	2013
KP780289	CAVVietnamVP713	Vietnam	2013
KP780292	CAVVietnamVP1013	Vietnam	2013
KT390283	STH33	Sudáfrica	2006
KU095829	Tunez-1328-09	Túnez	2009
KU095829	Tunisia-1328-09	Túnez	2009
KU195690	IR2-CAV-VP1	Irán	2013
KU195691	IR3-CAV-VP1	Irán	2013
KU195692	IR4-CAV-VP1	Irán	2013

KU195693	IR5-CAV-VP1	Irán	2013
KU845734	FAdV-N22	China	2015
KU845735	ClAV-F10	China	2015
KY024579	RSBR15	Brasil	2015
	31501	Uruguay	2015
	51601	Uruguay	2016
	71601	Uruguay	2016
	141404	Uruguay	2014
	171401	Uruguay	2014
	171502	Uruguay	2015
	181601	Uruguay	2016
	201502	Uruguay	2015
	211501	Uruguay	2015
	221401	Uruguay	2014
	221402	Uruguay	2014
	351201	Uruguay	2012
	421103	Uruguay	2011
	451502	Uruguay	2015
	471602	Uruguay	2016
	471604	Uruguay	2016
	M05-09	Uruguay	2009
	M0610B	Uruguay	2010
	M1403	Uruguay	2014
	M23	Uruguay	2005
	M34	Uruguay	2005
	M43	Uruguay	2007
AF227982	CAU269/7	Australia	1988
D31965	82-2	Japón	1982

e) Secuencias nucleotídicas parciales de *vp1* que pertenecen al clado II

N° de acceso	Nombre de muestra	País de origen	Año
AF311900	98D06073	USA	1997
AJ888521	CAV/Ibadan.NIE/14.04/116	Nigeria	2004
AJ888522	CAV/Ejioku.NIE/11.02/107	Nigeria	2002
AM407864	CH-CK/04-01/GD/98	China	2004
EU871767	Arg439	Argentina	2007
EU871768	ArgAN-1	Argentina	2007
EU871769	Arg628	Argentina	2007
EU871770	Arg609	Argentina	2007
EU871771	Arg655	Argentina	2007
EU871772	Arg673	Argentina	2007
EU871773	Arg513	Argentina	2007
EU871774	ArgA008	Argentina	2007
EU871775	ArgA006	Argentina	2007

EU871776	Arg684	Argentina	2007
EU871777	Arg728	Argentina	2007
EU871778	Arg729	Argentina	2007
EU871779	ArgA0018R	Argentina	2007
EU871780	ArgA0010-28	Argentina	2007
EU871781	ArgA0010-34	Argentina	2007
EU871782	Arg753	Argentina	2007
EU871783	ArgA0021-3	Argentina	2008
EU871784	ArgA0021-4	Argentina	2008
FR850021	AN-China-92	China	2010
FR850030	JS-China-90	China	2010
HM018710	09D367	Corea del Sur	2009
HM018711	JBKYS	Corea del Sur	2009
HM018712	JBLCK2	Corea del Sur	2009
HM018713	HKYJ-HI-4A	Corea del Sur	2009
HM018714	HKYJ-HI-1D	Corea del Sur	2009
HM018715	HH-D	Corea del Sur	2009
HM018716	103farm-8	Corea del Sur	2009
HM018717	CN-YJS	Corea del Sur	2009
HM018718	JB-BJS1	Corea del Sur	2009
HQ872024	JS-China-11	China	2010
HQ872026	HU-China-8	China	2010
HQ872037	JS-China-84	China	2010
KC691410	CMB12077	Camboya	2012
KC691411	CMB11090	Camboya	2011
KC691412	CMB11091	Camboya	2011
KF224935	GD-K-12	China	2012
KJ004667	G5/79	Japón	1979
KJ004668	HY/80	Japón	1980
KJ004669	NI/77	Japón	1977
KJ620989	VRDC/CAV/TN/C1/08	India	2008
KJ620989	VRDCCAVTNC108	India	2008
KJ728827	18	Taiwán	2012
KJ865863	CAV1086	Brasil	2010
KJ865864	CAV1029	Brasil	2010
KJ865865	CAV1013	Brasil	2010
KJ865866	CAV976	Brasil	2010
KJ865868	CAV740	Brasil	2009
KJ865871	CAV584	Brasil	2009
KJ865872	CAV240	Brasil	2008
KJ865875	CAV1136	Brasil	2006
KJ872513	CAV-10	Argentina	2007
KJ872514	CAV-18	Argentina	2007
KM458177	CAV/OPL1/13	Polonia	2013
KM458179	CAV/POD1/13	Polonia	2013
KM458179	CAVPOD11	Polonia	2013

KP780289	CAVVietnamVP713	Vietnam	2013
KP780292	CAVVietnamVP1013	Vietnam	2013
KT390283	STH33	Sudáfrica	2006
KU095829	Tunez-1328-09	Túnez	2009
KU095829	Tunisia-1328-09	Túnez	2009
KU195690	IR2-CAV-VP1	Irán	2013
KU195691	IR3-CAV-VP1	Irán	2013
KU195692	IR4-CAV-VP1	Irán	2013
KU195693	IR5-CAV-VP1	Irán	2013
KU845734	FAdV-N22	China	2015
KU845735	ClAV-F10	China	2015
KY024579	RSBR15	Brasil	2015
	31501	Uruguay	2015
	51601	Uruguay	2016
	71601	Uruguay	2016
	141404	Uruguay	2014
	171401	Uruguay	2014
	171502	Uruguay	2015
	181601	Uruguay	2016
	201502	Uruguay	2015
	211501	Uruguay	2015
	221401	Uruguay	2014
	221402	Uruguay	2014
	351201	Uruguay	2012
	421103	Uruguay	2011
	451502	Uruguay	2015
	471602	Uruguay	2016
	471604	Uruguay	2016
	M05-09	Uruguay	2009
	M0610B	Uruguay	2010
	M1403	Uruguay	2014
	M23	Uruguay	2005
	M34	Uruguay	2005
	M43	Uruguay	2007

f) Secuencias nucleotídicas parciales de *vp1* que pertenecen al clado III

N° de acceso	Nombre de muestra	País de origen	Año
KJ620990	VRDC-CAV-TN-C6-10	India	2010
KU645518	JS1501	China	2015
KU598851	SD1510	China	2015
AM407843	CH_CK-05-05-GD-4960	China	2005
AM407844	CH_CK-05-05-GD-4964	China	2005
AM407875	CH_CK-05-04-GD-3088	China	2005
AM407878	CH_CK-05-05-GD-5840	China	2005

AM407846	CH_CK-05-01-GD-58	China	2005
AM407874	CH_CK-04-02-GD-1115	China	2004
AM407865	CH_SCK-04-01-GD-552	China	2004
AM407849	CH_CK-05-01-HN/520	China	2005
AM407871	CH_CK/05-05/GD/5652	China	2005
AM407868	CH_CK/05-05/GD/4661	China	2005
AM407881	CH_CK/04-12/GD/1139	China	2004
AM407826	CH_CK/05-04/GD/3586	China	2005
AM407820	CH_CK/05-01/GD/683	China	2005
AM407842	CH_CK/05-05/GD/4665	China	2005
AM407837	CH_CK/05-04/GD/3084	China	2005
AM407822	CH_CK/05-02/GD/1569	China	2005
KJ728814	1	Taiwán	2012
KJ728830_	22	Taiwán	2012
KJ728815	2	Taiwán	2012
AM407839	CH_CK/05-05/GD/4347	China	2005
AM407872	CH_CK/05-05/GD/5842	China	2005
AM407861	CH_CK/05-12/GD/22035	China	2005
KM496306	SC-MZ	China	2013
AM407825	CH_CK/05-04/GD/3592	China	2005
KP780287	CAV/VietnamBN113	Vietnam	2013
KP780288	CAV/VietnamHN113	Vietnam	2013
KP780290	CAV/VietnamVP813	Vietnam	2013
KP780291	CAV/VietnamVP913	Vietnam	2013
KF224936	GD-L-12	China	2012
KF224938	GD-N-12	China	2012
KF224932	GD-H-12	China	2012
KM226337	A1/76	Japón	1976
KM458184	CAV/ZPOM8/13	Polonia	2013
KM458183	CAV/SLA12/13	Polonia	2014
KM458182	CAV/SLA3/13	Polonia	2013
KM458181	CAV/SLA2/13	Polonia	2013
KM458178	CAV/OPL3/13	Polonia	2013
KM458176	CAV/MPL3/13	Polonia	2013
KM458175	CAV/MPL2/13	Polonia	2013
KM458174	CAV/LUB5W8/13	Polonia	2013
KM458173	CAVLUB5W113	Polonia	2013
KM226338	AO/77	Japón	1977
KJ004672	EsCAV/F11	Japón	2013
KJ004671	EsCAV/F8	Japón	2013
AM407827	CH_CK/05-05/GD/5258	China	2005
AM407863	CH_SCK/05-01/GD/656	China	2005
AJ888525	CAV/Abeokuta.NIE/19.04/117	Nigeria	2004
AJ888524	CAV/Abeokuta.NIE/19.04/118	Nigeria	2004
AJ888529	CAV/Lanlate.NIE/11.02/12	Nigeria	2002
AJ888528	CAV/Lanlate.NIE/11.02/71	Nigeria	2002

KJ620991	VRDC-CAV-TN-C7-10	India	2010
KJ620992	VRDC-CAV-CHD-C2-09	India	2009
KJ620993	VRDC-CAV-VC-C3-09	India	2009
KJ620994	VRDC-CAV-CHD-C4-09	India	2009
KJ620995	VRDC-CAV-MH-C5-09	India	2009
KJ620996	VRDC-CAV-TN-C8-10	India	2010
KJ621023	VRDC-CAV-MH-BR-C37-12	India	2012
KJ126838	HK1-13	Japón	2013
KJ865877	CAV15	Brasil	2006
KJ865869	CAV632	Brasil	2009
KJ865876	CAV263	Brasil	2006
FR850022	AN-China-95	China	2010
FR850023	JS-China96	China	2010
FR850027	JS-China-81	China	2010
FR850028	JS-China-80	China	2010
HQ872025	HU-China-13	China	2010
HQ872031	AN-China-36	China	2010
HQ872032	AN-China-34	China	2010
HQ872033	JS-China-70	China	2010
HQ872034	JS-China-78	China	2010
HQ872035	JS-China-32	China	2010
HQ872038	JS-China-83	China	2010
HQ872039	JS-China-9	China	2010
HQ872040	JS-China-14	China	2010
HQ872047	JS-China-73	China	2010
HM018719	09D243	Corea del Sur	2009
HM018720	CN-MJfarm	Corea del Sur	2009
HM018721	JB-AH4-6	Corea del Sur	2009
HM018722	JB-YKS19-20	Corea del Sur	2009
HM018723	CN-BR-37	Corea del Sur	2009
HM018725	09D301	Corea del Sur	2009
HM018726	09D354	Corea del Sur	2009
HM018727	CN-HJH	Corea del Sur	2009
HM018728	HKYJ-DP-1	Corea del Sur	2009
HM018729	09D359	Corea del Sur	2009
HM018730	09Q174	Corea del Sur	2009
HM018731	09D318	Corea del Sur	2009
HM018733	CN-SHCK	Corea del Sur	2009
HM018734	CN-KRfarm	Corea del Sur	2009
HM018735	HKYJ-DP-3	Corea del Sur	2009
HM018736	HKYK-KC-2	Corea del Sur	2009
HM018737	CN-KKT	Corea del Sur	2009
HM018738	SHJE6B	Corea del Sur	2009
HM018739	CN-TBfarm	Corea del Sur	2009
HM018740	SHJE2	Corea del Sur	2009
AF311892	98D02152	USA	1997

AF395114	BD-3	Bangladés	1999
DQ016139	469	Eslovenia	2001
DQ016140	69	Eslovenia	2000
DQ991394	01_4201	USA	2001
FJ172347	SDLY08	China	2008
FJ883781	INDTN06	India	2006
FJ883782	INDAP07	India	2007
FJ896818	INDKA06	India	2006
JF712621	India	India	2009
JX260426	GD-1-12	China	2012
JX964755	GXC060821	China	2006
KF224926	GD-B-12	China	2011
KF224927	GD-C-12	China	2012
KF224928	GD-D-12	China	2012
KF224929	GD-E-12	China	2012
KF224930	GD-F-12	China	2012
KF224931	GD-G-12	China	2011
KF224933	GD-I-12	China	2011
KF224934	GD-J-12	China	2012
KF224937	GD-M-12	China	2012
KJ728818	7	Taiwán	2012
KJ728819	8	Taiwán	2012
KJ728820	9	Taiwán	2012
KJ728821	10	Taiwán	2012
KJ728822	12	Taiwán	2012
KJ728823	13	Taiwán	2012
KJ728825	16	Taiwán	2012
KJ728826	17	Taiwán	2012
KJ728828	19	Taiwán	2012
KJ728829	20	Taiwán	2012
KM226341	KY80	Japón	1980
KM458172	CAVL0D513	Polonia	2013
KM458174	CAVLUB5W813	Polonia	2013
KM458175	CAVMPL213	Polonia	2013
KM458176	CAVMPL313	Polonia	2013
KM458178	CAVOPL313	Polonia	2013
KM458181	CAVSLA213	Polonia	2013
KM458182	CAVSLA313	Polonia	2013
KM458183	CAVSLA1213	Polonia	2014
KM458184	CAVZPOM813	Polonia	2013
KM458185	CAV3995	Polonia	1995
KM496301	SC-DL1	China	2014
KM496302	SC-DL2	China	2014
KM496303	SC-HY	China	2014
KM496304	SC-LS	China	2014
KM496305	SC-MS	China	2014

KM496308	SC-NC1	China	2013
KM496309	SC-NC2	China	2013
KM496310	SC-PS	China	2013
KP090251	NAM227	India	2010
KP090253	EABCOM	India	2012
KP090254	NAMCCAV	India	2012
KP090256	CAVVP1NAMM01	India	2011
KP120755	CAVNAMKS5	India	2010
KP120756	CAVNAMKS4	India	2009
KP120757	CAVNAMKS3	India	2009
KP120758	CAVNAMKS1	India	2009
KP120759	CAVNAMKS6	India	2010
KP120760	CAVNAMKS7	India	2010
KP780287	CAVVietnamBN113	Vietnam	2013
KP780288	CAVVietnamHN113	Vietnam	2013
KU641013	LN1401	China	2014
KU641015	SD1511	China	2015
KU645506	SD1512	China	2015
KU645507	SD1507	China	2015
KU645508	SD1502	China	2015
KU645509	JS1503	China	2015
KU645510	SD1509	China	2015
KU645511	LN1402	China	2014
KU645512	HN1504	China	2015
KU645513	BJ1406	China	2014
KU645514	HB1404	China	2014
KU645515	SD1515	China	2015
KU645516	HB1517	China	2015
KU645519	SD1508	China	2015
KU645521	SD1514	China	2015
KU645520	HN1405	China	2014
KU645522	SD1518	China	2015
KU645523	SD1505	China	2015
KX377124	NGP-1	India	2012
KX377125	NGP-2	India	2012
	361501	Uruguay	2015
	361402	Uruguay	2014
KX377127	NGP-7	India	2012
KX377128	NGP-8	India	2012
KX377129	NGP-10	India	2015
KX377130	NGP-11	India	2015