

TESIS DE DOCTORADO

PEDECIBA BIOLOGÍA

**Caracterización genética y antigénica de las cepas del
virus de la bronquitis infecciosa aviar circulantes en
la industria avícola regional**

Mag. Ana Marandino

Tutor: Dr. Ruben Pérez

Co-Tutor: Dr. Ariel Vagnozzi

Sección Genética Evolutiva

Facultad de Ciencias, UdelaR

Índice

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. Virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar: clasificación taxonómica	3
1.2. Genoma viral y proteínas codificadas	4
1.3. Ciclo replicativo de IBV	7
1.4. Caracterización funcional y genética de IBV	10
1.5. Mecanismos de variabilidad en IBV	11
1.6. Bronquitis Infecciosa Aviar	12
1.7. Herramientas de control	13
1.8. Antecedentes del estudio de IBV en Uruguay y la región	14
1.9. Impacto de IBV en la industria avícola regional	16
2. Objetivos	18
3. Capítulos	19
3.1. Capítulo 1	20
3.2. Capítulo 2	30
3.3. Capítulo 3	45
3.4. Capítulo 4	69
3.5. Capítulo 5	81
4. Conclusiones	89
5. Perspectivas	90
6. Bibliografía	91

Resumen

El virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV) es responsable de la bronquitis infecciosa, una patología que afecta a aves de corral en la avicultura industrial de todo el mundo. IBV (*Coronaviridae*) presenta un genoma de ARN simple hebra, de polaridad positiva y 27,6 kb de longitud. El objetivo de esta tesis fue caracterizar genética y antigénicamente cepas de campo de IBV que circulan en la industria avícola uruguaya y argentina.

En el capítulo 1 de la tesis se describe el diseño, estandarización y validación de ensayos de PCR en tiempo real (RT-qPCR) para identificar los principales linajes sudamericanos de IBV (GI-11 y GI-16). Ambos ensayos emplean sondas TaqMan que se hibridan con marcadores únicos de la secuencia codificante de la proteína S1. Los ensayos detectaron correctamente todas las cepas evaluadas pertenecientes a ambos linajes y mostraron alta especificidad y ausencia de reactividad cruzada. A través de la realización de curvas estándar se obtuvieron adecuados coeficientes de determinación, eficiencias, y variabilidad intra e inter-ensayo. Estos ensayos constituyen una herramienta adecuada para el diagnóstico y tipificación de IBV y el análisis de su comportamiento epidemiológico.

En el capítulo 2 se diagnosticaron muestras uruguayas y argentinas de aves con sintomatología presuntiva de IBV y se caracterizaron genéticamente las cepas mediante secuenciación y análisis de la región codificante de S1. En más del 40% de las muestras analizadas se detectó el genoma de IBV. En la industria avícola uruguaya circulan únicamente cepas del linaje GI-11 de IBV en los últimos 7 años, en cambio en Argentina co-circulan los linajes GI-11 y GI-16, siendo este último el predominante. Según los análisis filodinámicos, el linaje GI-11 se habría originado en Sudamérica alrededor de 1952, mientras que el linaje GI-16 se habría originado en Eurasia alrededor de 1968, invadiendo posteriormente Sudamérica.

En el capítulo 3 se describe la obtención de genomas completos mediante técnicas de secuenciación masiva. Se estandarizaron protocolos de purificación viral y secuenciación genómica que resultaron muy eficientes. Los genomas argentinos y uruguayos de los

linajes GI-11 y GI-16 son extremadamente similares y difieren esencialmente en el ORF S. Las cepas argentinas y uruguayas del linaje GI-11 constituyen una forma recombinante circulante, que surgió por la transferencia del ORF S de una cepa GI-11 a una cepa GI-16. Esta forma recombinante no se extendió a Brasil, donde circulan cepas del linaje GI-11 con una historia evolutiva diferente. Las cepas sudamericanas GI-16 son el resultado de una invasión intercontinental y divergencia por diferenciación local. Se detectaron también eventos de recombinación esporádicos inter-linajes y con cepas vacunales.

En el capítulo 4 se realizó la caracterización antigénica de los linajes GI-11 y GI-16 mediante ensayos de virus neutralización en huevos embrionados. Se estableció que los linajes son serotipos diferentes con muy baja relación antigénica a pesar de su similitud genómica. Los serotipos GI-11 y GI-16 tienen además una muy baja relación antigénica con los serotipos vacunales Massachusetts, Arkansas y Connecticut, lo que hace necesario evaluar la relación antigénica de los linajes GI-11 y GI-16 y otras vacunas comerciales disponibles en el mercado, o utilizar vacunas homólogas a estas cepas.

En el capítulo 5 se adaptaron cepas uruguayas de los linajes GI-11 y GI-16 a huevos embrionados mediante 80 pasajes seriados. La virulencia en los embriones se incrementó con el número de pasaje. El genoma completo de los pasajes 1 y 80 de las cepas GI-11 y GI-16 presentaron cambios nucleotídicos y aminoacídicos que se concentraban en los ORFs 1a, 1b y S. El análisis de los cambios nucleotídicos y aminoacídicos en S1 cada 10 pasajes reveló que la atenuación es un proceso altamente dinámico. Los aislamientos uruguayos adaptados a crecer en embrión de pollo pueden servir de vacunas para controlar los brotes de IBV en la industria avícola sudamericana.

Los resultados obtenidos en esta tesis permitieron caracterizar genética y antigénicamente las cepas de IBV que circulan en la industria avícola regional. Estos hallazgos constituyen un aporte relevante para la comprensión de la epidemiología molecular de IBV y son la base para el desarrollo de herramientas biotecnológicas para su control efectivo.

1. Introducción

1.1. Virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar: clasificación taxonómica

El virus de la bronquitis infecciosa (IBV) pertenece al orden *Nidovirales* (del latín *nest* que significa anidado). Todos los miembros de este orden comparten la disposición de los marcos abiertos de lectura dentro de sus genomas, la presencia en las células infectadas de múltiples ARNm subgenómicos anidados y truncados en el extremo 5' (origen del nombre), y un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva que los incluye en el grupo IV de la clasificación de Baltimore (de Groot et al., 2012).

El orden *Nidovirales* está formado por cuatro familias: *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Toroviridae* y *Roniviridae*. IBV pertenece a la familia *Coronaviridae*, nombre que deriva de la apariencia de corona que tiene la envoltura viral cuando se observa los virus al microscopio electrónico. Los coronavirus infectan especies de aves y mamíferos, y se dividen en cuatro géneros: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus* (dentro del cual se encuentra IBV) y *Deltacoronavirus*. Esta clasificación se basa en análisis filogenéticos y en cálculos de distancias evolutivas de siete dominios altamente conservados de los genes virales (Figura 1) (de Groot et al., 2012; Lauber & Gorbalenya, 2012).



Figura 1. Árbol filogenético basado en el gen viral más conservado (gen 1). Se incluyen 21 virus que representan la diversidad de especies de los coronavirus. Alfacoronavirus 1 (Alpha-CoV1), Coronavirus Humano 229E (HCoV-229E), Coronavirus Humano NL63 (HCoV-NL63), Coronavirus del Murciélago Miniopterus 1 (BtCoV-1AB), Coronavirus del Murciélago Miniopterus HKU8 (BtCoV-HKU8), Virus de la Diarrea Epidémica Porcina (PED), Coronavirus del Murciélago Rhinolophus HKU2 (BtCoV-HKU2), Coronavirus del Murciélago Scotophilus 512 (BtCoV-512), Betacoronavirus 1 (Beta-cov1), Coronavirus Humano HKU1 (HCoV-HKU1), Virus de la Hepatitis del Ratón (MHV), Coronavirus del Murciélago Tylonycteris HKU4 (BtCoV-HKU4), Coronavirus del Murciélago Pipistrellus HKU5 (BtCoV-HKU5), Coronavirus del Murciélago Rousettus HKU9 (BtCoV-HKU9), Coronavirus Asociado al Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV), Coronavirus Asociado al Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo Humano (HCoV-EMC/2012), Virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), Coronavirus de la Ballena Beluga SW1 (BtCoV-SW1), Coronavirus del Bulbul HKU11 (ACoV-HKU11), Coronavirus del Zorzal HKU12 (ACoV-HKU12), y Coronavirus del Munia HKU13 (ACoVHKU13). Tomado de van Boheemen et al. (2012).

1.2. Genoma viral y proteínas codificadas

IBV posee un genoma de ARN simple hebra, con polaridad positiva y 27,6 kb de longitud. En ambos extremos del genoma se localizan regiones no traducidas denominadas 5' UTR y 3' UTR. Los UTRs poseen importantes funciones en la regulación de la replicación y transcripción del genoma viral (Lai et al., 1997).

Todos los coronavirus poseen un conjunto de genes en un orden invariable, que codifican para las cuatro proteínas estructurales y las proteínas asociadas a la replicación y transcripción viral (Lai et al., 1997). IBV contiene además un grupo de genes accesorios, que difieren entre los diferentes coronavirus, que codifican para pequeñas proteínas no estructurales, algunas de función desconocida y variables en presencia (Weiss et al., 2005; Reddy et al., 2015) (Figura 2).

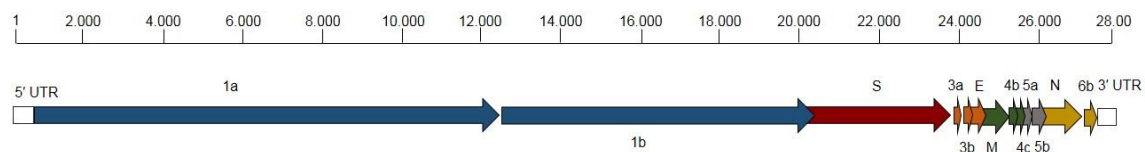


Figura 2. Representación esquemática del genoma de IBV. Este genoma tiene seis genes, muchos con más de un marco abierto de lectura. El gen 1 codifica para proteínas asociadas a la transcripción y replicación de los genes virales. El gen 2 codifica para la Glicoproteína de Superficie. El gen 3 codifica para proteínas no estructurales (ORFs 3a y 3b) y para la Pequeña Proteína de Membrana (ORF E). El gen 4 codifica para la Glicoproteína Integral de Membrana y en algunas cepas de IBV para proteínas no estructurales (ORFs 4b y 4c). El gen 5 codifica para las proteínas no estructurales 5a y 5b. El gen 6 codifica para la Proteína de Nucleocápside y en algunas cepas para la proteína no estructural 6b.

Este genoma codifica para cuatro proteínas estructurales: Glicoproteína de Superficie, Glicoproteína Integral de Membrana, Proteína Pequeña de Membrana y Proteína de Nucleocápside (Figura 3).

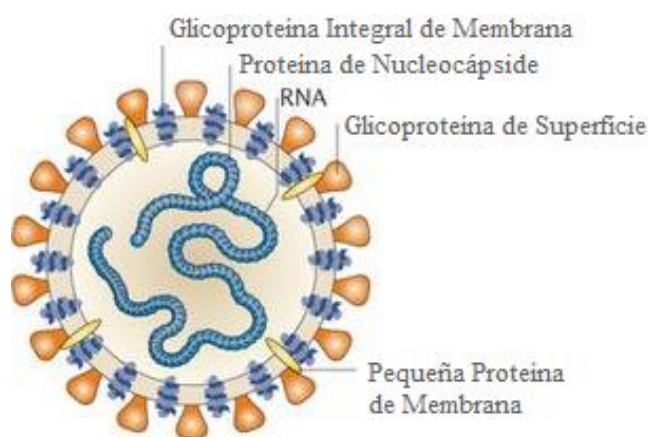


Figura 3. Representación esquemática de la partícula viral. Imagen tomada y modificada de www.nature.com.

La Glicoproteína de Superficie (S) es un polipéptido altamente glicosilado de aproximadamente 1140 aminoácidos (Godet et al., 1994). Esta proteína está anclada a la envoltura viral y se diferencia en tres regiones: el endodominio, el dominio transmembrana y el ectodominio. El ectodominio forma la mayor parte de la proteína (1070 aminoácidos), y tan solo 70 aminoácidos constituyen el dominio transmembrana y el endodominio (Figura 4).

La proteína S es codificada en forma de un precursor proteico (S_0), que es clivado post-traduccionalmente en S1 y S2 durante el primer paso de la infección (Vennema et al., 1990). Tres moléculas de S forman las espículas; los dominios S1 constituyen los bulbos de la espícula, mientras que los dominios S2 forman un tallo espiralado que atraviesa la membrana.

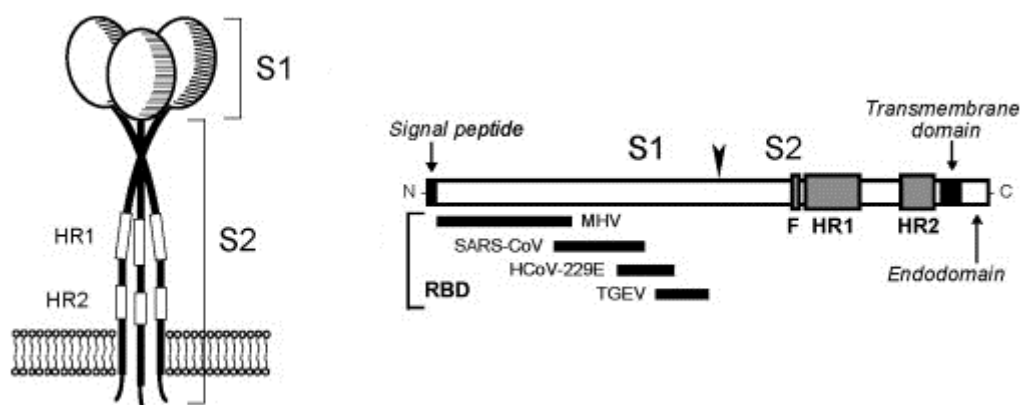


Figura 4. Izquierda: modelo del homotrímero de la proteína S. Derecha: mapa lineal de la proteína S en donde se muestra la porción amino terminal S1 y carboxilo terminal S2. La punta de flecha indica el sitio de clivaje S1-S2. En S1 se indica el péptido señal (*signal peptide*) y los dominios de unión al receptor (RBD) para MHV, SARS-CoV, HCoV-229E y TGEV. En S2 se indica las regiones HR (HR1 y HR2), el péptido de fusión (F), el dominio transmembrana (*transmembrane domain*) y el endodominio (*endodomain*). Tomado de Masters (2006).

La Proteína Integral de Membrana (M) es una glicoproteína de 225 aminoácidos que se ancla a la envoltura viral. El extremo carboxilo de esta proteína se proyecta al interior del virión e interactúa con el ARN viral, mientras que el extremo amino terminal está expuesto al exterior de la envoltura del virión. La mayor parte de M es hidrofóbica, por lo que se encuentra integrada a la envoltura (Armstrong et al., 1984).

La Proteína Pequeña de Membrana (E) es un polipéptido altamente hidrofóbico de 108 aminoácidos que se encuentra integrado a la membrana viral (Godet et al., 1992). Tanto E como M son necesarias para el ensamblaje del virión (Vennema et al., 1996).

La Nucleoproteína o Proteína de Nucleocápside (N) es una fosfoproteína de 409 aminoácidos (Williams et al., 1992). Esta proteína se asocia con el ARN viral en forma de dímero, formando una estructura helicoidal denominada nucleocápside.

1.3. Ciclo replicativo de IBV

1.3.1. Ingreso a la célula

IBV infecta inicialmente las células epiteliales de las vías respiratorias superiores de aves de corral. La unión de los viriones a la membrana plasmática de la célula diana está mediada por la proteína S. El receptor celular es el ácido N-acetilneuramínico $\alpha 2,3$ (ácido siálico) que se encuentra en la mayoría de los tipos celulares (Winter et al., 2006; Winter et al., 2008). La afinidad de IBV por este ácido explica la naturaleza pantrópica de IBV en el pollo, aunque no sería el único determinante de la susceptibilidad. Como el ácido siálico está presente en células que no son infectadas por IBV, y en diversos tipos celulares de especies de animales no susceptibles, se plantea que, al igual que otros coronavirus, IBV requiere para ingresar a las células un segundo receptor u otro factor del huésped aún no identificado (Cavanagh et al., 2007; Wickramasinghe et al., 2011).

La fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal se lleva a cabo por la acción del péptido de fusión, un dominio hidrofóbico de 20 aminoácidos de S2 que se ancla a la membrana endosomal (Bosch et al., 2003). La exposición del péptido de fusión ocurre como consecuencia del clivaje, realizado por la proteasa celular Furina, del precursor S₀ en S1 y S2.

1.3.2. Traducción y clivajes post-traduccionales del ORF 1

El ARN viral liberado en el citoplasma se emplea como ARNm para traducir las proteínas que constituyen el complejo de replicación/transcripción (RT). Este complejo multiproteico está codificado por el gen 1, el cual contiene dos grandes marcos abiertos de lectura (ORF 1a y ORF 1b) que se hayan superpuestos en un único nucleótido. El ORF

1a se traduce en la poliproteína, mientras que los ORF 1a y 1b dan lugar a la proteína pp1ab por un mecanismo de desplazamiento -1 del marco ribosomal (Brierley et al., 1992; Eleouet et al., 1995) (Figura 5).

Los polipéptidos pp1a y pp1ab son clivados por dos proteasas codificadas por el virus (PLpro y 3CLpro), en 15 proteínas maduras no estructurales (nsp), las cuales intervienen en la replicación y transcripción de los genes virales (Fang et al., 2010) (Figura 5).

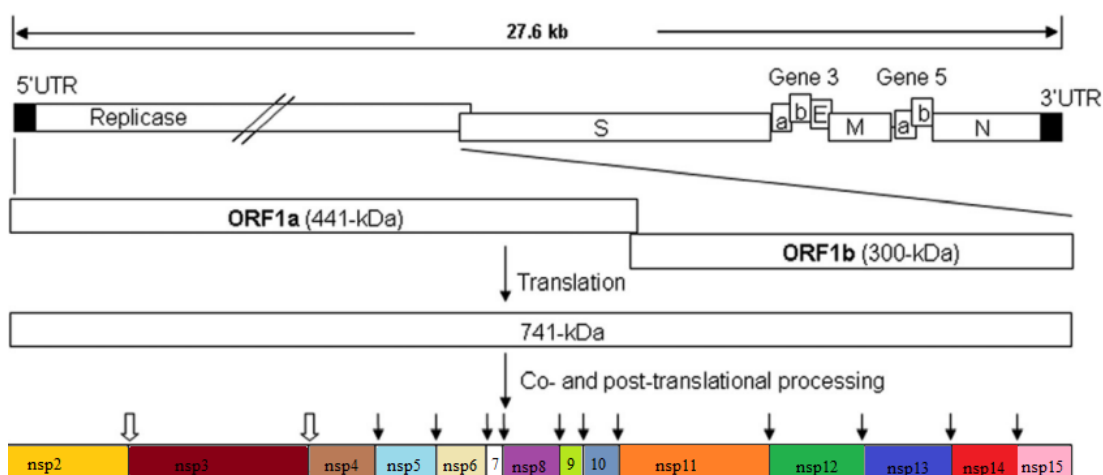


Figura 5. Representación esquemática de la traducción y de los clivajes post-traduccionales del ORF 1. El ORF 1 constituye las dos terceras partes del genoma de IBV, y codifica para los polipéptidos pp1a y pp1ab. Estos polipéptidos son procesados por dos proteasas virales, PLpro (nsp3) y 3CLpro (nsp5) en 15 proteínas maduras no estructurales (nsp). PLpro es responsable del clivaje entre nsp2-nsp3 y nsp3-nsp4 (flechas blancas). 3CLpro es la encargada de procesar las restantes proteínas (flechas negras). nsp7 y 8: proteínas de unión al ARN, nsp 9: estabilizadora de cadena nesciente durante la síntesis de ARN, nsp 10: proteína de la maquinaria de síntesis de ARN, nsp13: helicasa, nsp14: exonucleasa ExoN correctora de errores y CAP N7 metiltransferasa, nsp15: poliU endoribonucleasa, nps16: metiltransferasa. Tomado y modificado de Fang et al. (2010).

1.3.3. Replicación y transcripción

El complejo RT sintetiza nuevos ARNs genómicos virales, así como ARNm subgenómicos a partir de los cuales se traducen el resto de las proteínas virales.

La replicación y transcripción de los genes virales comienza cuando el complejo RT utiliza el ARN genómico viral como molde para sintetizar una copia de ARN

complementaria (ARN genómico de polaridad negativa), y cinco ARN subgenómicos de polaridad negativa. Los ARN subgenómicos son truncados en el extremo 3' al inicio de los diferentes genes y están provistos con una secuencia líder reguladora (Figura 6). Esta secuencia se adquiere por un mecanismo de transcripción discontinua en donde el complejo RT se trasloca al 5' UTR del genoma viral y copia esta secuencia.

Para sintetizar los ARNm subgenómicos y nuevos genomas virales, el complejo RT utiliza los ARNs subgenómicos de polaridad negativa y el ARN genómico de polaridad negativa como moldes (Figura 6).

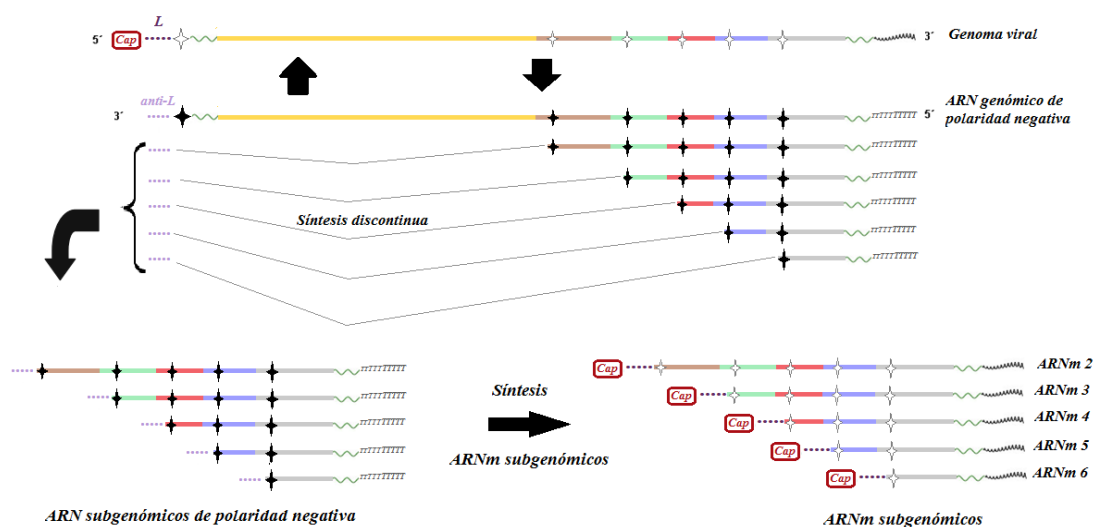


Figura 6: Replicación y transcripción del genoma de IBV. Se esquematiza la síntesis de nuevos genomas virales (replicación) y la síntesis de los cinco ARNm subgenómicos por un mecanismo de transcripción discontinua. Tomada de mi tesis de maestría

1.3.4. Traducción de proteínas virales, ensamblaje y liberación

Las proteínas virales son traducidas por ribosomas asociados al retículo endoplasmático. Aquellos genes que poseen un único ORF se traducen de manera CAP dependiente, al igual que el primer ORF de los genes que poseen más de un marco abierto de lectura (Tahara et al., 1994). Algunos ORFs internos, como el que codifica para la proteína E, se traducen en forma CAP independiente mediante IRES (*internal ribosomal entry site*) (Liu et al., 1992; Thiel et al., 1994).

El ensamblaje de la partícula viral comienza cuando la proteína N se asocia al ARN genómico viral y se transporta hacia la membrana del retículo endoplasmático, lugar

donde se anclan las proteínas virales S, E y M. La envoltura viral es adquirida por brotamiento de las partículas en el retículo endoplasmático. Los viriones maduros se transportan en grandes vesículas que se fusionan a la membrana celular para ser liberados de las células (Fung & Liu, 2014).

1.4. Caracterización funcional y genética de IBV

La caracterización de IBV puede realizarse mediante pruebas funcionales o analizando el genoma viral (De Wit, 2000). Las pruebas funcionales clasifican a los virus en protectotipos y serotipos, mientras que el análisis del genoma viral los clasifica en genotipos y linajes.

La clasificación en protectotipos implica ensayos de protección en pollos libres de patógenos específicos (SPF). Estos ensayos consisten en dos infecciones, separadas por un período de 28 días, con las dos variantes a clasificar. La evaluación de la protección conferida entre las variantes se realiza mediante diferentes técnicas, como la prueba de ciliostasis, la capacidad de aislamiento viral y la observación de sintomatología clínica. Se considera que dos variantes de IBV (A y B) son del mismo protectotipo cuando la primoinfección de un pollo con la variante A lo protege de una segunda infección con la variante B, y viceversa. Este tipo de clasificación proporciona una información directa y precisa acerca de los niveles de protección de una vacuna, pero es un método de clasificación laborioso, costoso y con requerimientos de infraestructura importante (de Wit et al., 2011).

La clasificación en serotipos se realiza mediante ensayos de virus neutralización (VN) en huevos embrionados o en cultivos celulares. La neutralización viral se define como la pérdida de la capacidad infectante del virus por la reacción con un anticuerpo. El procedimiento consiste en mezclar diluciones apropiadas de suero y virus, e inocular la solución en la cavidad alantoidea de huevos embrionados o en cultivos celulares primarios, donde el virus no neutralizado pueda producir un efecto reconocible (lesiones específicas o efecto citopático). Se considera que dos variantes (A y B) son del mismo serotipo cuando los títulos neutralizantes heterólogos (antisuero A con virus B, y antisuero B con virus A) difieren en al menos 20 veces de los títulos homólogos (antisuero A con virus A, antisuero B con virus B) en ambas direcciones (Hesselink, 1991). La

relación antigénica entre dos variantes puede también medirse mediante el cálculo del porcentaje de relación antigénica (Archetti & Horsfall, 1950). Este valor varía entre 0 y 100%, siendo 100% cuando dos cepas son antigénicamente idénticas y mayor a 50% cuando dos cepas están antigénicamente relacionadas.

La clasificación en genotipos se basa en el análisis total o parcial del genoma. La metodología más directa e informativa es la secuenciación, pero también se emplean metodología de caracterización indirectas basadas en las técnicas de RFLP y PCR en tiempo real. La caracterización genética más utilizada implica el análisis de la secuencia codificante de S1, la región más variable del genoma por codificar para los principales sitios antigénicos del virión. En base a estos análisis se han descritos decenas de grupos genéticos circulando en la industria avícola mundial. Recientemente se realizó una clasificación exhaustiva de todas las cepas de IBV que circulan o han circulado a nivel mundial, en base al análisis de la secuencia completa de S1 (Valastro et al., 2016). Este trabajo identificó seis genotipos principales (GI-GVI), siendo el genotipo GI el más diverso y subclasificado en 27 linajes (GI-1 a GI-27).

La caracterización genética basada en el análisis de genomas completos de IBV permite inferir en forma detallada la relación evolutiva de las variantes de este virus. Sin embargo existen pocos estudios basados en genomas completos debido a la extensa longitud del genoma de los coronavirus, aunque los enfoques actuales utilizando NGS (secuenciación profunda o de alto rendimiento) han reducido los requerimientos de tiempo y costo.

1.5. Mecanismos de variabilidad en IBV

Desde su descripción en los años 30 (Shalk et al., 1931), se han detectado decenas de variantes genéticas, y más de 60 variantes antigénicas o serotipos de IBV circulando en el mundo. Esta variabilidad se genera mediante dos mecanismos principales: la mutación y la recombinación.

Los coronavirus poseen una tasa de mutación del orden de 10^{-6} a 10^{-7} mutaciones por nucleótido copiado por ciclo de replicación (Eckerle et al., 2007; Eckerle et al., 2010), por lo que incorpora en forma errónea 1 nucleótido cada 1-10 millones de nucleótidos copiados durante un ciclo replicativo. Esta tasa de mutación es una de las más bajas dentro

de los virus ARN, y resulta fundamental para mantener la integridad de los largos genomas de los coronavirus. Esta baja tasa de mutación no está únicamente determinada por la fidelidad de copia de la ARN polimerasa ARN dependiente, sino que la acción de la proteína no estructural 14 (nsp14 o ExoN) aumenta la fidelidad de copia durante la replicación y transcripción (Eckerle et al., 2007).

El segundo mecanismo de generación de la variabilidad en IBV es la recombinación, principalmente mediada por elección de copia (*copy choice*). IBV posee una elevada tasa de recombinación genética, con valores cercanos al 25% durante una infección mixta de cepas, como resultado de su particular mecanismo de transcripción discontinua (Simon-Loriere & Holmes, 2011). Los eventos de recombinación se detectan frecuentemente en cepas de campo, tanto a nivel inter- como intra-génico (Kottier et al., 1995; Lee & Jackwood, 2000; Dolz et al., 2008).

1.6. Bronquitis Infecciosa Aviar

IBV es el causante de la Bronquitis Infecciosa Aviar (IB), una enfermedad aguda que afecta a aves de corral de todas las edades, particularmente severa en pollos de no más de dos semanas de edad (Crinion et al., 1970; Munner et al., 1987).

La transmisión del virus puede producirse de forma vertical u horizontal. Luego de infectar las células epiteliales de las vías respiratorias superiores, IBV se propaga hacia las células de tráquea y pulmones. Posteriormente, el virus pasa por vía sanguínea y por difusión, desde los sacos aéreos a otras superficies epiteliales, incluyendo el riñón, ovarios, oviducto, testículos, bolsa de Fabricius, tonsilas cecales y tracto digestivo, donde puede replicarse y lesionar a los tejidos infectados (Crinion et al., 1970; Kinde et al., 1991; Wang et al., 1996; Di Fabio et al., 2000).

La sintomatología de la enfermedad es variable y depende de factores tales como la cepa de virus infectante, la edad de las aves y su estado inmunitario. En general se manifiesta con síntomas respiratorios (Shalk et al., 1931), pero puede agravarse por infecciones bacterianas secundarias que generan un considerable aumento en la mortalidad media del lote (Goryo et al., 1994; Naqi et al., 2001). En gallinas ponedoras se produce también un descenso en la producción de huevos y un incremento en el número de huevos de mala

calidad (Criñion et al., 1970; Gelb et al., 1991). En el caso de gallinas reproductoras, además de la sintomatología respiratoria, ocurre un notable descenso de la fertilidad y muerte embrionaria (Gelb et al., 1991; Cavanagh et al., 1997).

Desde los años 60 se reportan casos de IBV que afectan gravemente el sistema renal y aumentan la mortalidad media del lote (cepas nefropatógenas). Las infecciones renales se caracterizan por un aumento de volumen y palidez de los riñones y la presencia de túbulos y uréteres con cristales de ácido úrico, especialmente en aves jóvenes (Winterfield et al., 1962).

1.7. Herramientas de control

1.7.1. Diagnóstico

El diagnóstico clínico de IBV no es sencillo debido a que otros patógenos aviares pueden presentar síntomas similares. Para un diagnóstico certero es conveniente utilizar métodos de diagnóstico complementarios. Desde hace algunos años se emplean técnicas de genética molecular en el diagnóstico rápido de la enfermedad que consisten en la amplificación por PCR de regiones genómicas del virus (Zwaagstra et al., 1992). En el año 2006 se desarrolló la primer metodología de diagnóstico de IBV basado en PCR en tiempo real, la cual consiste en la amplificación de un fragmento del 5'UTR del genoma viral, región sumamente conservada por su importancia en la regulación de la transcripción viral (Callison et al., 2006). Esta metodología se caracteriza por su rapidez, alta sensibilidad y especificidad, lo que cobra una gran importancia en este modelo viral debido al bajo título que presenta IBV durante una infección.

1.7.2. Vacunas

En la década de 1950 se comenzaron a utilizar vacunas a partir de cepas de campo atenuadas y en los 70 se desarrollaron vacunas inactivadas. Las actuales vacunas vivas brindan buena protección contra variantes de campo perteneciente al mismo protectotipo, pero los títulos protectivos comienzan a declinar alrededor de las nueve semanas después de la vacunación. En pollos de engorde, cuyos ciclos productivos generalmente no exceden los 60 días, la vacunación con vacunas vivas se efectúa a temprana edad para inducir suficiente protección para cubrir el período total de crianza. En ponedoras y

reproductoras se utilizan varias dosis de vacunas vivas en las primeras etapas de vida, y se refuerza con la aplicación de vacunas inactivadas en etapas previas a la producción. Con esto se pretende proteger al ave en todo su ciclo productivo y, en las reproductoras, transmitir además inmunidad pasiva a la progenie (Cavanagh et al., 2003).

En Uruguay, al igual que en la mayoría de los países sudamericanos, las vacunas atenuadas e inactivadas del serotipo Massachusetts son las únicas oficialmente autorizadas. Recientemente, en países sudamericanos como Argentina y Chile se incluyó cepas del serotipo 793B en el plan de vacunación.

1.8. Antecedentes del estudio de IBV en Uruguay y la región

Los primeros reportes de IBV en América del Sur se realizaron en Brasil en la década de 1950 (Hipólito, 1957) y en Chile en la década de 1970 (Hidalgo et al., 1976), y correspondieron a cepas del serotipo Massachusetts. Varios años más tarde, se identificaron en estos países variantes antigénicas diferentes a las descritas previamente en Estados Unidos, Europa y África (Hidalgo et al., 1986; Cubillos et al., 1991; Di Fabio et al., 2000).

Hasta el presente, se ha realizado la caracterización genética de cepas de IBV argentinas, brasileras, chilenas, colombianas, peruanas y uruguayas. Muchas de estas caracterizaciones utilizan diferentes regiones de S1 de tamaño variable, y emplean distinta nomenclatura para denominar a los mismos genogrupos (Tabla 1). Estos análisis mostraron la circulación de tres linajes en Argentina (Rimondi et al., 2009), un único grupo genético en Brasil, Chile y Perú (Chacón et al., 2011; Felipe et al., 2010; Villarreal et al., 2007; de Wit et al., 2017; Sesti et al., 2016), y cuatro linajes en Colombia (Alvarado et al., 2005). En Uruguay, en el marco de mi tesis de Maestría logramos identificar dos genotipos circulantes en nuestro país (Marandino, 2014). Estos genotipos fueron posteriormente denominados GI-11 y GI-16 (Valastro et al. 2016). Como esta clasificación se basa en secuencias completas de S1, no fueron tenidas en cuenta cepas sudamericanas con secuencias parciales de este gen.

Tabla 1. Genotipos circulantes en Sudamérica. Se detalla las publicaciones en donde fueron reportadas las secuencias, los años de aislamiento y la región de S1 analizada. Se muestra el nombre del grupo genético según la publicación y entre paréntesis la clasificación según Valastro et al. (2016).

	Publicación	Años	Amplicón analizado	Grupo genético (Linaje)
Brasil	Montassier et al., 2006	1988-2000	1-528	Genotipo brasileiro (GI-11)
	Villarreal et al., 2007	2002-2006	1-571	Genotipo brasileiro (GI-11)
	Felippe et al., 2010	2003-2009	229-556	Cluster D207 (GI-11)
	Chacón et al., 2011	2003-2009	1-536	Genotipo BR I (GI-11)
Argentina	Rimondi et al., 2009	2001-2008	134-722	Cluster A (GI-16) Cluster B Cluster C (GI-11)
	Marandino, 2014 (Tesis de Maestría)	2009-2011	1-1623	Genotipo SAI (GI-11) Genotipo A/SAII (GI-16)
Colombia	Alvarado et al., 2005	2003	1-310	Genotipo A Genotipo B Genotipo C (GI-16) Genotipo D
Chile	De Wit et al., 2017	2008-2010	737-1037 1-1565	Genotipo Q1 (GI-16)
Perú	Sesti et al., 2016	2014	79-679	Genotipo A/SAII (GI-16)
Uruguay	Marandino, 2014 (Tesis de Maestría)	2009-2011	1-1623	Genotipo SAI (GI-11) Genotipo A/SAII (GI-16)

Con respecto a la caracterización genética basada en genomas completos de IBV, se han secuenciado y analizado genomas de variantes europeas y asiáticas del linaje GI-16, pero hasta la fecha no se han analizado genomas completos de variantes sudamericanas de este linaje. Recientemente se depositaron en la base de datos del NCBI dos secuencias brasileras del linaje GI-11.

Con respecto a la caracterización antigénica, se han realizado ensayos de virus neutralización cruzada entre las cepas de los linajes GI-11 y GI-16, y la cepa vacunal Massachusetts. Los ensayos realizados con dos aislamientos brasileros del linaje GI-11 y un antisuero derivado de la cepa Massachusetts, mostró una baja relación antigénica entre estas variantes (29 a 33%) (Chacón et al., 2011). El mismo ensayo de virus neutralización realizado con un aislamiento asiático (CK/CH/LDL/97I) del linaje GI-16, reveló también una baja relación antigénica entre esta variante y el serotipo Massachusetts (Yu et al., 2001). No se han realizado análisis para determinar la relación antigénica existente entre los linajes GI-11 y GI-16, ni la relación antigénica entre estos y otras cepas vacunales.

Finalmente, se han realizado pruebas de protectotipos utilizando cepas GI-16 y las vacunas Massachusetts y 793B. Se evaluó en pollos SPF, a través de morbilidad, mortalidad y re-aislamiento viral de las aves, la protección conferida por la cepa vacunal Massachusetts al desafío del aislado CK/CH/LDL/97I, y los resultados indicaron que esta vacuna no confiere protección contra la cepa desafío (Liu et al., 2009).

Hasta la fecha, no hay publicaciones que describan la atenuación de cepas de los linajes GI-11 y GI-16.

1.9. Impacto de IBV en la industria avícola regional

Desde los años 60 la producción mundial de carnes se ha acelerado de forma notable, en particular la de especies de ciclo productivo corto como cerdos y aves. De acuerdo a proyecciones publicadas recientemente, la carne de ave crecerá en ese período un 19%, siendo no solo el tipo de carne que mayor incremento sufra, sino también transformándose en el tipo de carne más producida y consumida en el mundo (OECD/FAO, 2016).

Países sudamericanos como Brasil y Argentina siguen estas tendencias mundiales, y se encuentran entre los mayores productores de carne aviar a nivel mundial. Según

mediciones realizadas hasta abril de 2017, Brasil encabezó la lista de mayor exportador de carne de ave del mundo con 4.3 millones de toneladas, superando a Estados Unidos y la Unión Europea (USDA, 2017). En Argentina, en el período 2001-2014 la producción de carne aviar creció un 111%, lo cual se explica por un aumento del consumo interno en ese período y de las exportaciones (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 la continuidad en el incremento del consumo interno indican que la industria avícola del Uruguay se encuentra de frente a un importante momento de desarrollo, en el que se debe estar preparado para tomar las oportunidades que se presentan.

Sin embargo, estamos muy por debajo del esfuerzo e inversión que realizan los países del primer mundo en el aspecto sanitario de esta industria. El status sanitario es considerado el factor de mayor impacto en la avicultura ya que no solo incide sobre los parámetros zootécnicos, sino que también puede convertirse en un fundamento de restricciones comerciales en el mercado internacional. Patógenos que no afectan directamente a la salud humana pero sí golpean constante y gravemente la productividad y economía de la industria avícola, son siempre el mayor problema de la cadena de producción aviar. Esto fue claramente expresado en la 63ra Sesión General de la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), donde IBV fue declarado como uno de los patógenos más problemáticos relacionados a la avicultura industrial (Eterradossi, 1995).

2. Objetivos

Objetivo General: Caracterizar genética y antigénicamente cepas de campo de IBV que circulan en la industria avícola regional.

Objetivos Específicos:

- Diseñar metodologías para la diferenciación de los principales linajes sudamericanos.
- Caracterizar genéticamente cepas argentinas y uruguayas.
- Analizar la evolución genómica de los principales linajes sudamericanos.
- Caracterizar antigénicamente los linajes sudamericanos.
- Analizar los cambios genómicos asociados con pasajes sucesivos en huevos embrionados.

3. Capítulos

La presente tesis está organizada en 5 capítulos, que se basan en los cinco objetivos específicos. En cada capítulo se describe la metodología realizada, los resultados obtenidos y la discusión de los mismos.

- **Capítulo 1.** Diseño, estandarización y validación de ensayos de PCR en tiempo real (RT-qPCR) para identificar los linajes sudamericanos de IBV (GI-11 y GI-16).
- **Capítulo 2.** Identificación de IBV en muestras uruguayas y argentinas de aves con sintomatología presuntiva de la enfermedad. Caracterización genética de las cepas mediante secuenciación y análisis de la región codificante de S1.
- **Capítulo 3.** Obtención de genomas completos mediante técnicas de secuenciación masiva de cepas de los linajes GI-11 y GI-16. Análisis genómico comparativo con cepas de otros linajes.
- **Capítulo 4.** Determinación de la relación antigénica, de los linajes GI-11 y GI-16 entre sí y con cepas vacunales, mediante ensayos de virus neutralización.
- **Capítulo 5.** Análisis de los cambios genómicos asociados a la adaptación en huevos embrionados de cepas de los linajes GI-11 y GI-16.

3.1. Capítulo 1

Diseño, estandarización y validación de ensayos de RT-qPCR para la identificación específica de los linajes sudamericanos del virus de la bronquitis infecciosa aviar (GI-11 y GI-16)

3.1.1. Metodología

3.1.1.1. Diseño de cebadores y sondas

Se realizó un alineamiento utilizando todas las secuencias de S1 de los linajes GI-11 y GI-16 disponibles en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). En base a marcadores nucleotídicos característicos de cada linaje se diseñaron cebadores y sondas específicos.

El marcador nucleotídico característico del linaje GI-11 es la inserción ACTGGTCCT en la posición 429 del gen S, que codifica para los aminoácidos TGP (T es treonina, G es glicina y P es prolina). Esta inserción determina que la secuencia nucleotídica codificante de S1 sea de 1632 nucleótidos (544 aminoácidos), mientras que las cepas del linaje GI-16 tiene una secuencia nucleotídica de 1623 nucleótidos (541 aminoácidos).

El marcador característico del linaje GI-16 es una secuencia atípica del sitio de clivaje S1-S2. En la gran mayoría de las cepas de IBV que circulan en el mundo, inclusive el linaje GI-11, el sitio de clivaje es RXRR (R es arginina y X cualquier aminoácido). En cambio, en las secuencias del linaje GI-16 este sitio es RTGR (T es treonina y G es glicina).

3.1.1.2. Muestras utilizadas para el análisis de sensibilidad clínica

Se utilizaron 44 muestras para evaluar la capacidad de los RT-qPCR diseñados de diferenciar los linajes GI-11 y GI-16. Todas las muestras fueron diagnosticadas positivamente para IBV y genotipadas por secuenciación de la región codificante de S1 durante mi maestría (Tabla 2) (Marandino, 2014).

Tabla 2. Muestras utilizadas para el análisis de sensibilidad clínica

Nombre de la cepa	Año de aislamiento	Número de acceso	Linaje
UY/09/CA/01	2009	KM658245	GI-16
AR/09/BA/29	2009	KM658246	GI-16
AR/09/BA/34	2009	KM658247	GI-16
AR/09/BA/35	2009	KM658248	GI-16
AR/09/BA/36	2009	KM658249	GI-16
AR/09/BA/37	2009	KM658250	GI-16
AR/09/BA/38	2009	KM658251	GI-16
AR/09/BA/39	2009	KM658252	GI-16
AR/10/BA/30	2010	KM658253	GI-16
UY/11/CA/09	2011	KM658233	GI-11
UY/11/CA/11	2011	KM658234	GI-11
UY/11/CA/12	2011	KM658235	GI-11
UY/11/CA/13	2011	KM658236	GI-11
UY/11/CA/18	2011	KM658237	GI-11
UY/11/CA/19	2011	KM658238	GI-11
AR/11/BA/27	2011	KM658254	GI-16
AR/11/BA/28	2011	KM658255	GI-16
AR/11/BA/31	2011	KM658256	GI-16
AR/11/ER/33	2011	KM658244	GI-11
UY/12/CA/27	2012	KM658239	GI-11
UY/12/CA/30	2012	KM658240	GI-11
UY/12/CA/33	2012	KM658241	GI-11
UY/12/CA/36	2012	KM658242	GI-11
UY/12/CA/39	2012	KM658243	GI-11

3.1.1.3. Muestras utilizadas en el análisis de especificidad

El análisis de especificidad incluyó muestras negativas para IBV, cepas de los linajes GI-11 y GI-16, cepas de otros linajes de IBV (Massachusetts, 4/91, Arkansas, Connecticut, GA08) y otros patógenos aviares que pueden estar presentes en una muestra problema (virus de la bursitis infecciosa, virus de la enfermedad de Newcastle, reovirus aviar, metapneumovirus aviar, virus de la laringotraqueitis infecciosa y *Mycoplasma gallisepticum*) (Tabla 3).

Tabla 3. Muestras utilizadas para el análisis de especificidad

Patógeno ^a	Tipo	Tipo de muestra
IBV	Massachusetts	Vacuna IB (Fort Dodge, IA, USA)
	4/91	Vacuna Nobilis (Intervet, Boxmeer, Holland)
	GA98	Cepa de campo ^b
	ARK-DPI	Cepa de campo ^b
	Connecticut	Cepa de campo ^b
	SAI	Cepas de campo ^c
	A/SAII	Cepas de campo ^c
IBDV	D78	Vacuna Nobilis (Intervet)
NDV	Hitchner B1	Vacuna Nobilis (Intervet)
ARV	Strain 1133	Vacuna ChickVac Tenosynovitis (Fort Dodge)
aMPV	TRT Clone K	Vacuna Poulvac TRT (Fort Dodge)
ILTV	UL24	Vacuna LT-IVAX (Intervet)
MG	Strain F	Vacuna VAX-MG (Intervet)

^aIBV, Infectious bronchitis virus; IBDV, Infectious bursal disease virus; NDV, Newcastle disease virus; ARV, Avian reovirus; aMPV, Avian metapneumovirus; ILTV, Infectious laryngotracheitis virus; MG, *Mycoplasma gallisepticum*.

^bMuestras analizadas en el *Poultry Research and Diagnostic Laboratory*, Mississippi State University.

^cMuestras utilizadas en el ensayo de sensibilidad clínica.

3.1.1.4. Extracción de ARN

Los tejidos (tráquea y tonsilas cecales) fueron homogeneizados con PBS (pH 7,0) para conseguir suspensiones al 20% (p/v), y se centrifugaron a 2000 g durante 5 min a 4 °C. La extracción del ARN se realizó a partir del sobrenadante utilizando el *kit* “Quick-RNATM MiniPrep” (Zymo Research).

3.1.1.5. Transcripción reversa y ensayo de qPCR

La transcripción reversa se realizó con el *kit* “cDNA RevertAidTM H Minus First Strand” (Fermentas Life Sciences), 10 µl de ARN extraído y hexámeros al azar.

La PCR cuantitativa (qPCR) se llevó a cabo en una reacción de 20 µl que contenía 2 × HotRox Master Mix (Bioron), 0,3 µM de cada cebador, 0,1 µM de sonda y 1 µl de cDNA. La amplificación se realizó en un termociclado ABI Prism 7500 (Applied Biosystems) e incluyó una etapa de espera de 5 min a 50°C, una desnaturalización de 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60 °C, y un paso de 5 min a 70 °C.

3.1.1.6. Generación de los estándares de ARN

Se realizó la transcripción *in vitro* de dos fragmentos genómicos de IBV que incluían los amplicones de las qPCR. El fragmento para el ensayo específico de GI-11 se amplificó con los cebadores IBV-Sf1237 y IBV-Sr1795, mientras que para el fragmento de la cepa GI-16 se emplearon los cebadores IBV-S1 e IBV-S2 (Tabla 4). Los productos de PCR se purificaron utilizando el *kit* “PCR Clean-up” (Zymo Research) y posteriormente fueron clonados en un vector pJET1.2 (Fermentas Life Sciences Inc.). La extracción del ADN plasmídico se realizó con el *kit* “PureLink™ Quick Plasmid Miniprep” (Invitrogen) y los plásmidos fueron secuenciados para confirmar la presencia y orientación del inserto. Los plásmidos se linearizaron para evitar la formación de transcritos heterólogos con la enzima de restricción NcoI (Fermentas Life Sciences Inc.). La transcripción *in vitro* se realizó con el *kit* “TranscriptAid T7 High Yield Transcription” (Fermentas). Los transcritos fueron tratados con ADNasa I y purificados con el método de fenol:cloroformo.

La concentración y pureza del ARN se determinó por espectrofotometría utilizando un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), y la concentración fue calculada por el promedio de cinco medidas. La integridad del transcrito se evaluó en un BioAnalizador 2100 (Agilent Technologies). El número de copias de ARN/μL (Y) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Y = \frac{[ARN] \times NA}{LT \times 340}$$

$$LT \times 340$$

[ARN] es la concentración del transcrito expresada en g/μL, NA es el número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$ moléculas/mol), LT es el largo del transcrito expresado en nucleótidos y 340 es el peso molecular de un nucleótido y se expresa en g/mol.nt.

3.1.1.7. Generación de las curvas estándar

Las curvas estándar se generaron utilizando diluciones seriadas en base 10 que contenían 10^2 a 10^8 copias de ARN. Cada dilución se contaminó con ARN de una muestra negativa para IBV, con el fin de simular una situación real donde el ARN viral se encuentra en baja proporción en relación al ARN celular (principalmente ARN ribosomal). Estas

diluciones se analizaron por RT-qPCR en tres corridas independientes, y cada una se realizó por triplicado en cada ensayo. La mejor recta que describe la relación entre el Log_{10} (Nº de copias de ARN) y el Ct de cada dilución se obtuvo por el método de los mínimos cuadrados implementado por el programa PAST (PAleontological STatistics) versión 1.94b.

El desempeño analítico de los ensayos 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 $E = (10^{(-1/k)}) - 1$, 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 duplica el ADN molde de un ciclo a otro. El coeficiente de determinación (R^2) se calculó con el programa PAST versión 1.94b. Este coeficiente toma valores de 0 a 1, siendo 1 cuando todos los valores estimados caen sobre la recta de regresión. El rango dinámico de cada ensayos está delimitado por el número de copias de ARN entre los cuales se observa una relación lineal entre el Log_{10} del número de moléculas de ARN y el Ct. Finalmente, para medir la reproducibilidad de los ensayos 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: $C.V. = (S_{n-1}/X) \times 100$, donde X es la media de los Ct y S_{n-1} la desviación estándar.

3.1.2. Resultados

3.1.2.1. Ensayo de identificación del linaje GI-11

El ensayo de identificación del linaje GI-11 emplea una sonda TaqMan (SAI-Pb) que está marcada con el fluoróforo 6-carboxifluoresceína (FAM) (Tabla 4). Esta sonda hibrida con la inserción que se encuentra exclusivamente en la segunda región hipervariable de S1 del linaje GI-11. Los cebadores también fueron diseñados para reconocer únicamente secuencias conservadas del linaje GI-11 (Tabla 4). Una búsqueda con la herramienta BLAST del GenBank confirmó que la combinación de cebadores y sonda solo detecta las secuencias S1 de las cepas del linaje GI-11 ($n = 93$).

En el análisis de sensibilidad clínica, las doce muestras del linaje GI-11 fueron correctamente detectadas con este ensayo. Las muestras de campo negativas para IBV y los virus que no pertenecen al linaje GI-11 de IBV no mostraron señal fluorescente en el ensayo.

El ensayo mostró un rango dinámico lineal entre 10^1 y 10^7 copias de ARN/reacción, un R^2 de 0,9977 y una eficiencia del 97% (Figura 11). Los CV intra e inter-ensayo oscilaron entre 0,3% a 1,8% y 0,8% a 1,7%, respectivamente.

Tabla 4. Cebadores y sondas utilizadas en los ensayos de RT-qPCR para la detección específica de los linajes GI-11 y GI-16.

Cebador/sonda	Secuencia 5' → 3'	Polaridad	Tamaño del amplicón
IBV-Sf1237	GRTGGCTCYCGTATACAAA	+	581
IBV-Sr1795	GTTTGTATGTACTCATCTGTRAC	-	
IBV-S1	ACTGAACAAAAGACAGACTT	+	783
IBV-S2	CCATCTGAAAAATTRCCAGT	-	
SAI-Pv	FAM-AMTGGTCCTAGYRGTTTGT-TAMRA	+	116
SAI-Fw	CYATATTCGTATTTCTGCTATGAA	+	
SAI-Rv	TTATTAACACATTGAAGYGACTT	-	
A/SAII-Pv	VIC-AACGYCCCGTKCGA-MGB	-	132
A/SAII-Fw	CATCTCGTAATGAAACTGGTT	+	
A/SAII-Rv	CAAGATCATAACTAACATAAGGGC	-	

3.1.2.2. Ensayo de identificación del linaje GI-16

El ensayo de identificación del linaje GI-16 emplea una sonda TaqMan MGB (A / SAII-Pb) marcada con el fluoróforo 2'-cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína (VIC) (Tabla 4). Esta sonda hibrida con una secuencia en la región media del gen S que codifica un sitio de clivaje S1-S2 distintivo y exclusivo de las cepas asiáticas, europeas y sudamericanas del linaje GI-16. Los cebadores también fueron diseñados para reconocer únicamente secuencias conservadas del linaje GI-16 (Tabla 4). Una búsqueda por BLAST confirmó que la combinación de cebadores y sonda solo detecta las secuencias S1 de las cepas del linaje GI-11 ($n = 23$).

Las doce muestras del linaje GI-16 se detectaron correctamente con el ensayo de sensibilidad clínica. Las muestras de campo negativas para IBV y los virus que no pertenecen al linaje GI-16 de IBV no mostraron señal fluorescente en el ensayo.

El rango dinámico lineal del ensayo fue de 10^2 a 10^7 copias de ARN/reacción, el R^2 de 0,9992 y la eficiencia del 90% (Figura 11). Los CV intra e inter-ensayo oscilaron entre 0,5% y 2,1% y entre 0,9% y 2,7%, respectivamente.

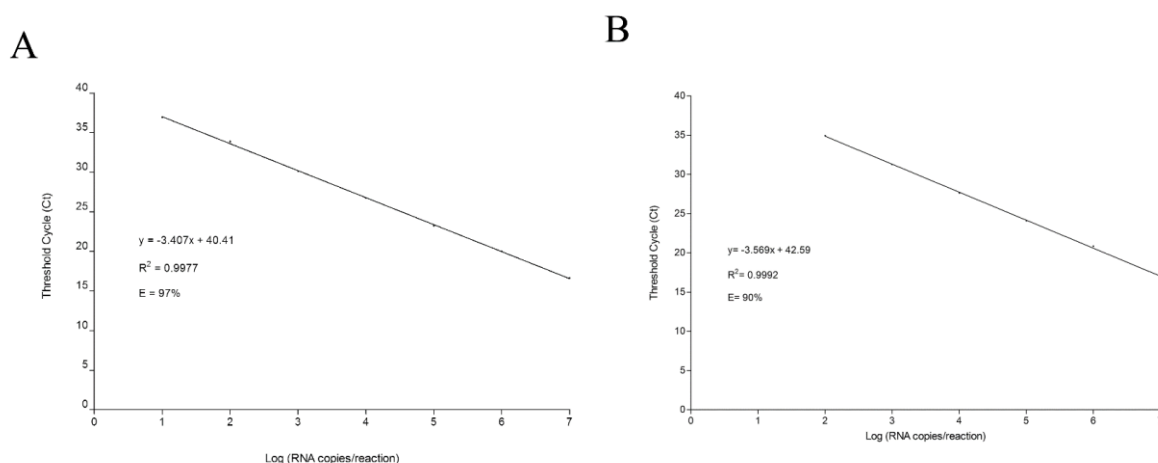


Figura 11. Curvas estándar de los ensayos de RTq-PCR diseñados para la detección específica de los linajes GI-11 (A) y GI-16 (B). Cada punto representa la media del Ct de nueve medidas (tres ensayos independientes con tres replicas cada uno) para su correspondiente valor de Log (copias de ARN/reacción). Se indican los valores de la eficiencia de la reacción (E) y el coeficiente de determinación (R^2) de la curva de regresión lineal.

3.1.3. Discusión

En la presente tesis se desarrollaron y evaluaron dos nuevos ensayos de RT-qPCR para la rápida detección de los linajes GI-11 y GI-16. Ambos ensayos fueron diseñados sobre la base de marcadores moleculares de cada linaje que son conservados a nivel nucleotídico y aminoacídico, indicativo de la acción de una fuerte selección purificante. En el ensayo del linaje GI-11 se utiliza una sonda Taqman convencional que funciona perfectamente en la detección de una inserción única en S1. Para la detección del linaje GI-16 se empleó una sonda TaqMan-MGB. Las sondas de tipo MGB forman dúplex muy estables con el ADN complementario, permitiendo el uso de sondas de poca longitud (Kumar et al., 1998), una característica importante para este ensayo en donde la secuencia diana es de pocos nucleótidos. El uso de diferentes fluoróforos en ambas sondas permite su realización conjunta (dúplex), aunque se logró una mejor sensibilidad mediante la utilización individual de cada ensayo; por esto se recomienda la utilización de los ensayos en forma separada, especialmente en ensayos de cuantificación de genomas virales.

Los resultados indicaron que los ensayos tienen alta especificidad y ausencia de reactividad cruzada con muestras negativas para IBV y otros patógenos aviares comunes. Todas las muestras diagnosticadas y caracterizadas por secuenciación de la región codificante de S1 se detectaron con los ensayos diseñados, lo que indica su correcta sensibilidad clínica. Los valores de los coeficientes de determinación y eficiencias, así como los de variabilidad intra e inter-ensayo, fueron adecuados y validaron el uso de estos ensayos entre 10^1 - 10^7 y 10^2 - 10^7 copias de ARN/reacción. La detección de pocas (10-100) copias de ARN por reacción asegura la detección específica de títulos virales bajos que pueden ocurrir durante la progresión de la infección. Estos ensayos pueden ser fácilmente automatizados para evaluar un gran número de muestras en un tiempo corto.

Las técnicas de RT-qPCR desarrolladas son herramientas útiles para monitorear la aparición y expansión de los linajes GI-11 y GI-16. Este es un aspecto interesante, considerando que los genotipos y linajes de IBV pueden presentar comportamientos espaciotemporales y epidemiológicos muy distintos. Algunos linajes emergentes de IBV permanecen restringidos a la región de origen, mientras que otros se propagan y se establecen en áreas geográficas relativamente cercanas, como ocurrió con el serotipo de

Georgia en Norteamérica (Ignjatović y Sapats, 2000). Otros linajes como Massachusetts (GI-1), QX (GI-19) y GI-16 son aún más interesantes ya que se han propagado en diferentes continentes (Bochkov et al., 2006; Meulemans et al., 2001; Worthington et al., 2008). Los factores que determinan la aparición y la dispersión de las cepas de IBV son poco conocidos, por lo que su monitoreo, utilizando ensayos de RT-qPCR, puede contribuir a comprender su dinámica y proporcionar una nueva visión de la base molecular de sus diferentes habilidades de dispersión.

Los ensayos desarrollados son una buena alternativa para realizar una evaluación rápida de la presencia de los linajes GI-11 y GI-16 en granjas avícolas. La tipificación de las cepas de IBV presente en un establecimiento es un paso importante para el control de la enfermedad, ya que el uso de vacunas que son significativamente divergentes de las cepas de campo podría tener un bajo grado de protección cruzada y no inducir una respuesta inmune protectora adecuada.

Recientemente se introdujeron cepas vacunales del serotipo 793/B en países sudamericanos como Argentina y Chile. Hasta la fecha, no hay estudios que muestren la relación antigénica existente entre 793/B y los linajes sudamericanos. La introducción de nuevas cepas vacunales que difieren de las cepas circulantes podría ejercer presiones selectivas que promueven la aparición o expansión de cepas de campo divergentes. Por lo tanto, la aplicación de los ensayos de RT-qPCR aquí desarrollados representa un instrumento sensible y directo para evaluar la efectividad de nuevos esquemas de vacunación sobre los virus GI-11 y GI-16. Estos ensayos permitirán, por ejemplo, monitorear el efecto de la introducción de la vacuna 793B mediante el estudio de los cambios de prevalencia de los diferentes linajes en países con y sin esta vacuna.

Otra aplicación importante de estos ensayos es la posibilidad de realizar la cuantificación exacta de genomas virales de un linaje específico, particularmente cuando hay co-infección con cepas de campo o vacunales. Esto es útil para estudios de co-infección, donde se pretenda establecer la carga viral en diversos tejidos y proporcionar información sobre la circulación intra-huésped de las cepas GI-11 y GI-16. Además, en los ensayos de protección, en donde la identificación y cuantificación precisa de la cepa de campo es

esencial y debe diferenciarse del virus vacunal que puede persistir en varios órganos del pollo hasta 163 días (Cavanagh y Gelb, 2008).

En conclusión, la posibilidad de caracterizar un gran número de muestras de una manera rápida, sensible y reproducible hace de estos ensayos una herramienta adecuada para el diagnóstico y tipificación de IBV, el análisis del comportamiento epidemiológico de las cepas GI-11 y GI-16, y la realización de otros estudios de investigación de estas cepas. Se espera que la aplicación de los ensayos mejore la vigilancia de IBV e impacte en nuestra comprensión de la epidemiología molecular y el control de estos dos relevantes linajes de IBV.

3.1.4. Publicación de resultados

Estos resultados fueron publicados (se anexa el artículo al final de la tesis):

Marandino A, Tomás G, Hernández M, Panzera Y, Craig M, Vagnozzi A, Vera F, Techera C, Grecco S, Banda A, Hernández D, Pérez R. 2016. “Development of RT-qPCR assays for the specific identification of two major genotypes of avian infectious bronchitis virus” *Journal of Virological Methods*. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.05.007

3.2. Capítulo 2

Diagnóstico y caracterización genética de cepas de campo de IBV uruguayas y argentinas

3.2.1. Metodología

3.2.1.1. Muestras

Se analizaron 71 muestras uruguayas de pollos con síntomas presuntivos de infección por IBV. Las muestras fueron remitidas al laboratorio desde julio del 2012 hasta junio del 2017 (5 en el 2012, 4 en el 2013, 20 en el 2014, 14 en el 2015, 17 en el 2016 y 10 en el 2017), y corresponden a tráqueas, tonsilas cecales y bursas. Los animales presentaron síntomas respiratorios, observándose también un descenso en la producción de huevos en aves ponedoras y reproductoras. Un brote en el año 2012 presentó características nefropatógenas. La colecta del material biológico la realizaron veterinarios especialistas en avicultura que colaboran con nuestro grupo de trabajo. Los tejidos se almacenaron a -80° C hasta su procesamiento.

También se analizaron 16 muestras argentinas provenientes del Laboratorio de Virología de Aves del INTA-Castelar, Argentina. Estas muestras fueron tomadas entre los años 2001 y 2015, diagnosticadas para IBV y caracterizadas mediante una secuenciación parcial de S1 por el grupo de trabajo de este laboratorio (Rimondi et al., 2009).

3.2.1.2. Diagnóstico de IBV

La extracción de ARN y la transcripción reversa se realizaron según lo detallado en las secciones 3.1.1.4 y 3.1.1.5 del capítulo anterior. El diagnóstico de IBV fue realizado con una metodología de qPCR (Callison et al., 2006). Como control interno del diagnóstico se utilizó un ensayo de qPCR para beta actina aviar, desarrollado durante mi tesis de maestría (Tabla 5).

Además, a cada muestra se le realizó el diagnóstico de los dos principales agentes virales inmunosupresores aviarios: virus de la bursitis infecciosa aviar (IBDV) y virus de la anemia infecciosa aviar (CAV). Este trabajo fue realizado en el marco de la tesis de doctorado de Gonzalo Tomás y la tesis de maestría de Claudia Techera.

3.2.1.3. Caracterización de las muestras por RT-qPCR

Todas las muestras uruguayas y argentinas positivas para IBV se analizaron con los ensayos de RT-qPCR para la detección específica de los linajes GI-11 y GI-16.

Tabla 5. Cebadores y sondas utilizadas en las reacciones de PCR en tiempo real y final.

Cebadores y sondas	Secuencia 5' → 3'	Polaridad	Posición en el genoma ^a
5' UTR			
IBV-F391 ^b	GCTTTTGAGCCTAGCGTT	+	391-409
IBV-R533 ^b	GCCATGTTG TCACTGTCTATTG	-	511-533
IBV 5' UTR ^b	VIC-CACCACCAGACCTGTCACCTC-TAMRA	+	444-465
gen S			
IBV-S1	ACTGAACAAAAGACAGACTT	+	20313-20332
IBV-S2	CCATCTGAAAAATTRCCAGT	-	21076-21095
IBV-S5	TTTGTYAATGGTACTGYACA	+	21001-21020
IBV-S4	CATAACTAACATAAGGGCAA	-	22008-22027
β-actina aviar			
β-act Fw	GAGAAATTGTGCGTGACATCA	+	3003-3023
β-act Rv	CCTGAACCTCTCATTGCCA	-	3136-3154
β-act Pb	FAM-TGCTCGAAA-ZEN-TCCAGTGCGACGTAG-3IABkFQ	-	3037-3060

^aPosición nucleotídica en el genoma de la cepa M41 de IBV (AY851295) o en el gen de β-actina aviar de *Gallus gallus* (X00182).

^bDescritos por Callison et al. (2006).

3.2.1.4 Amplificación de la región codificante de S1

La región codificante de la porción S1 de la Glicoproteína de Superficie se obtuvo por PCR en dos fragmentos solapantes: uno de 783 pb de la región 5' de S1 y otro de 1027 pb de la región 3', amplificados mediante los cebadores IBV-S1 e IBV-S2 y los cebadores IBV-S5 e IBV-S4, respectivamente (Tabla 5). La metodología utilizada se estandarizó durante mi tesis de maestría.

3.2.1.5. Secuenciación de los productos de PCR

Los amplicones fueron purificados según se detalla en la sección 3.1.1.6 del capítulo anterior. Las purificaciones se secuenciaron en ambas direcciones de forma automática en MACROGEN (<https://dna.macrogen.com>).

3.2.1.6. Ensamblaje y edición de secuencias nucleotídicas

Las secuencias obtenidas se ensamblaron y editaron con el programa *SeqMan* del paquete *Lasergene 7.0 (DNASTAR)*.

3.2.1.7. Alineamientos

Las secuencias uruguayas y argentinas obtenidas se alinearon con las secuencias de S1 de las cepas prototipo (cepa más antigua) de cada linaje (Valastro et al., 2016), y se alinearon con el algoritmo *MUSCLE* del programa MEGA

3.2.1.8. Determinación de secuencias recombinantes

Para determinar la presencia de recombinantes en el conjunto de secuencias obtenidas en este trabajo se utilizó el programa RDP4 (*Recombination Detection Program*). Este programa integra seis algoritmos (RDP, Bootscann, MaxChi, Chimaera, GeneConv y Sis-scan) 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 Bootscann) que comparan filogenias de distintas partes de la secuencia y detectan incongruencias en sus topologías, y ii- métodos de sustitución nucleotídica (MaxChi, Chimaera, GeneConv y Sis-scan) 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 100 pb y una significancia estadística de $p \leq 0,001$.

3.2.1.9. Análisis filogenéticos

Se determinó el modelo de sustitución en cada alineamiento mediante el paquete *jModelTest* (Posada, 2008). Estos datos fueron utilizados para inferir árboles filogenéticos con el método de máxima verosimilitud, implementado en el servidor <http://www.phylogeny.fr/>. Para obtener el valor de significancia de las ramas de los árboles se realizaron análisis de aLTR (*approximate Likelihood-Ratio Test*). Las filogenias se visualizaron y editaron con el programa FigTree versión 1.4.2 (Rambaut, 2014)

3.2.1.10. Análisis filodinámicos

Para realizar los análisis filodinámicos, se construyeron dos conjuntos de datos específicos de cada linaje. Se estimó la edad del ancestro común más reciente (tMRCA) de los linajes utilizando el modelo *Bayesian skyline plot* implementado en BEAST v.1.7.5 (Drummond et al., 2012). Se analizaron un total de 10.000 árboles, el largo de la cadena de Markov utilizado fue de 200.000.000 pasos, y se tomaron muestras cada 20.000. 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 incertidumbre del tMRCA fue calculada a través de los valores del intervalo de confianza del 95% (HPD 95%).

3.2.2. Resultados

3.2.2.1. Diagnóstico de muestras de campo

La metodología de diagnóstico de qPCR detectó el genoma viral en 29 de las 71 muestras uruguayas provenientes de animales con sintomatología clínica asociada a Bronquitis Infecciosa Aviar (Tabla 6). En todas las muestras negativas se amplificó el control interno, aunque 7 muestras positivas para IBV mostraron valores de Ct para beta actina más elevados que la mayoría (Tabla 6).

El 62% de las muestras positivas para IBV también fueron positivas para IBDV y/o CAV. Si se toman en cuenta únicamente los pollos parrilleros, este valor aumenta a 82%, y en el caso de ponedoras y reproductoras es de 33% (Tabla 6).

Las muestras argentinas, previamente diagnosticadas como positivas por PCR a tiempo final, también fueron analizadas con esta metodología y se corroboró que el genoma de IBV estaba presente en todas ellas (Tabla 7).

3.2.2.2. Caracterización genética de las muestras positivas para IBV

Todas las cepas uruguayas y argentinas de IBV fueron sometidas a los ensayos de RT-qPCR para la detección específica de los linajes GI-11 y GI-16. Veintiocho cepas uruguayas de IBV pertenecen al linaje GI-11, mientras que la cepa UY/12/CA/24 no se detectó con ninguno de los ensayos. De las 16 muestras argentinas, 1 pertenece al linaje GI-11 y 13 al linaje GI-16, mientras que las dos muestras clasificadas previamente como del genotipo B no se detectaron con ninguno de los ensayos.

En 15 muestras uruguayas, las 16 muestras argentinas y las cepas vacunales H120 (serotipo Massachusetts) y 4/91 (serotipo 793B) se amplificó la región codificante de S1. Los amplicones obtenidos se secuenciaron directamente y las secuencias se editaron y ensamblaron para obtener la totalidad de la región codificante de S1.

Tabla 6. Muestras uruguayas positivas para IBV por PCR en tiempo real. Se detalla el nombre de la muestra, el año en que fue colectada, el tipo de ave, la edad del animal, el linaje de IBV al que pertenece y la presencia de IBDV o CAV.

Muestra	Año de colecta	Tipo de ave	Edad	Linaje	IBDV/CAV
UY/12/CA/24 ^c	2012	Parrillero	38 días	GI-11	-
UY/12/CA/36	2012	Parrillero	39 días	GI-11	-
UY/12/CA/39	2012	Parrillero	39 días	GI-11	IBDV
UY/12/CA/40	2012	Parrillero	47 días	GI-11	IBDV
UY/14/CA/14-1	2014	Parrillero	28 días	GI-11	IBDV, CAV
UY/14/CA/14-3	2014	Parrillero	42 días	GI-11	IBDV, CAV
UY/14/CA/14-5	2014	Parrillero	47 días	GI-11	CAV
UY/14/CA/17-1	2014	Parrillero	45 días	GI-11	IBDV, CAV
UY/14/CA/17-2	2014	Parrillero	24 días	GI-11	-
UY/14/CA/22-2	2014	Parrillero	27 días	GI-11	IBDV, CAV
UY/14/CA/36-1 ^{ab}	2014	Parrillero	Nd	GI-11	IBDV, CAV
UY/14/CA/36-2 ^{ab}	2014	Parrillero	Nd	GI-11	CAV
UY/14/CA/38-2 ^b	2014	Parrillero	35 días	GI-11	-
UY/14/CA/43-1 ^{ab}	2014	Reproductora	27 semanas	GI-11	-
UY/14/CA/44-1 ^b	2014	Reproductora	28 semanas	GI-11	-
UY/15/CA/17-2	2015	Parrillero	42 días	GI-11	IBDV, CAV
UY/15/CA/29-1 ^{ab}	2015	Reproductora	Nd	GI-11	-
UY/15/CA/36-1	2015	Parrillero	Nd	GI-11	IBDV, CAV
UY/15/CA/45-2	2015	Ponedora	Nd	GI-11	CAV
UY/16/CA/07-1	2016	Parrillero	49 días	GI-11	IBVD, CAV
UY/16/CA/10-1	2016	Ponedora	42 semanas	GI-11	-
UY/16/CA/13-1 ^{ab}	2016	Ponedora	45 semanas	GI-11	-
UY/16/CA/18-1 ^b	2016	Parrillero	41 días	GI-11	IBDV, CAV
UY/16/CA/22-1 ^b	2016	Ponedora	9 semanas	GI-11	CAV
UY/16/CA/46-1 ^{ab}	2016	Ponedora	Nd	GI-11	-
UY/17/CA/18-1 ^b	2017	Ponedora	Nd	GI-11	-
UY/17/CA/18-2 ^{ab}	2017	Ponedora	80 semanas	GI-11	CAV
UY/17/CA/20-2 ^b	2017	Reproductora	Nd	GI-11	-
UY/17/CA/20-3 ^b	2017	Ponedora	9 semanas	GI-11	CAV

^aValores de Ct de beta actina mayores a 28 .

^bNo se logró amplificar la secuencia de S1.

^cCon características nefropatógenas en condiciones de campo.

Tabla 7. Muestras argentinas positivas para IBV por PCR en tiempo real. Se detalla el nombre de la muestra, el año y provincia en que fue colectada, y el linaje de IBV al que pertenece.

Muestra	Año de colecta	Provincia	Linaje
LDBI-5	2001	Buenos Aires	GI-11 ^a
LDBI-15	2001	Buenos Aires	GI-11 ^a
8Hu8	2011	Buenos Aires	GI-11
LDBI-20	2006	Buenos Aires	GI-16
LDBI-22	2006	Buenos Aires	GI-16
LDBI-23	2006	Buenos Aires	GI-16
A225	2012	Buenos Aires	GI-16
A255	2013	Buenos Aires	GI-16
A13	2013	Buenos Aires	GI-16
AR/13/BA/259b	2013	Buenos Aires	GI-16
AR/13/ER/19b	2013	Entre Ríos	GI-16
AR/13/ER/49b	2013	Entre Ríos	GI-16
AR/13/ER/53b	2013	Entre Ríos	GI-16
AR/13/ER/87b	2013	Entre Ríos	GI-16
AR/14/BA/266_06b	2014	Buenos Aires	GI-16
AR/15/ER/275_4b	2015	Entre Ríos	GI-16

^aCepas pertenecientes al genotipo B en base a una secuencia parcial de S1 (Rimondi et al., 2009).

Previo a la realización de los análisis filogenéticos se implementó una búsqueda de secuencias recombinantes con el programa RDP4. En el análisis se incluyeron todas las secuencias obtenidas y las secuencias prototipos de cada linaje de IBV. Los seis algoritmos identificaron dos secuencias nucleotídica de S1 recombinantes (Tabla 8).

Tabla 8. Cepas recombinantes en la secuencia de S1. Se indica las posiciones nucleotídicas de los sitios de recombinación y las posibles secuencias parentales.

Cepa Recombinante	Sitio/s de recombinación	Parental mayor	Parental menor
UY/15/CA/45-2	734	cepa vacunal 793B	UY/15/CA/45-2
UY/12/CA/24	234-497	UY/12/CA/36	cepa vacunal Mass

Las secuencias uruguayas y argentinas no-recombinantes de S1 y las secuencias prototipos de los 32 linajes definidos por Valastro et al. (2016) se incluyeron en un análisis

filogenético (Figura 12). Las cepas sudamericanas agrupan en dos de los 32 linajes: GI-11 y GI-16. Todas las cepas uruguayas y tres cepas argentinas pertenecen al linaje GI-11, incluidas dos cepas argentinas (LDBI-5 y LDBI-15) clasificadas dentro del genotipo “B” argentino en base a una secuencia parcial de S1 de 580 pb. Por otro lado, trece cepas argentinas pertenecen al linaje GI-16 según este análisis filogenético.

Hasta la fecha hay disponibles 51 secuencias completas de S1 de cepas pertenecientes al linaje GI-11, que incluyen las obtenidas en estas tesis, en mi tesis de maestría y secuencias brasileras depositadas en el GenBank. Estas cepas fueron aisladas entre los años 1975 y 2016 en Argentina, Brasil y Uruguay y muestran una distancia nucleotídica entre 82,5 y 99,9%. Para el linaje GI-16 hay disponibles 50 secuencias completas de S1, que incluyen las obtenidas en estas tesis, en mi tesis de maestría y secuencias chilenas, italianas y asiáticas depositadas en el GenBank. Estas cepas fueron aisladas entre los años 1986 y 2015 en Argentina, Chile, Uruguay, Italia, China y Taiwán, y muestran una distancia nucleotídica entre 92,3 y 99,9%.

Con el objetivo de analizar más en detalle las cepas del genotipo “B” argentino, se realizó un análisis filogenético basado en los primeros 500 pb de S1. En este árbol las cepas del genotipo “B” LDBI-5 y LDBI-15 forman un grupo monofilético muy emparentado con las típicas cepas del linaje GI-11, y presentan una divergencia nucleotídica entre 77,4 y 80,2% con las cepas de este linaje.

3.2.2.3. Análisis filodinámicos

A través de análisis de coalescencias se estimó la edad del ancestro común más reciente (tMRCA) de los linajes GI-11 y GI-16. Para el linaje GI-11 se utilizaron 137 secuencias de 528 pb datadas entre los años 1975 y 2016. Este análisis fue realizado con secuencias parciales de S1 para contar con un mayor número de secuencias y mayor

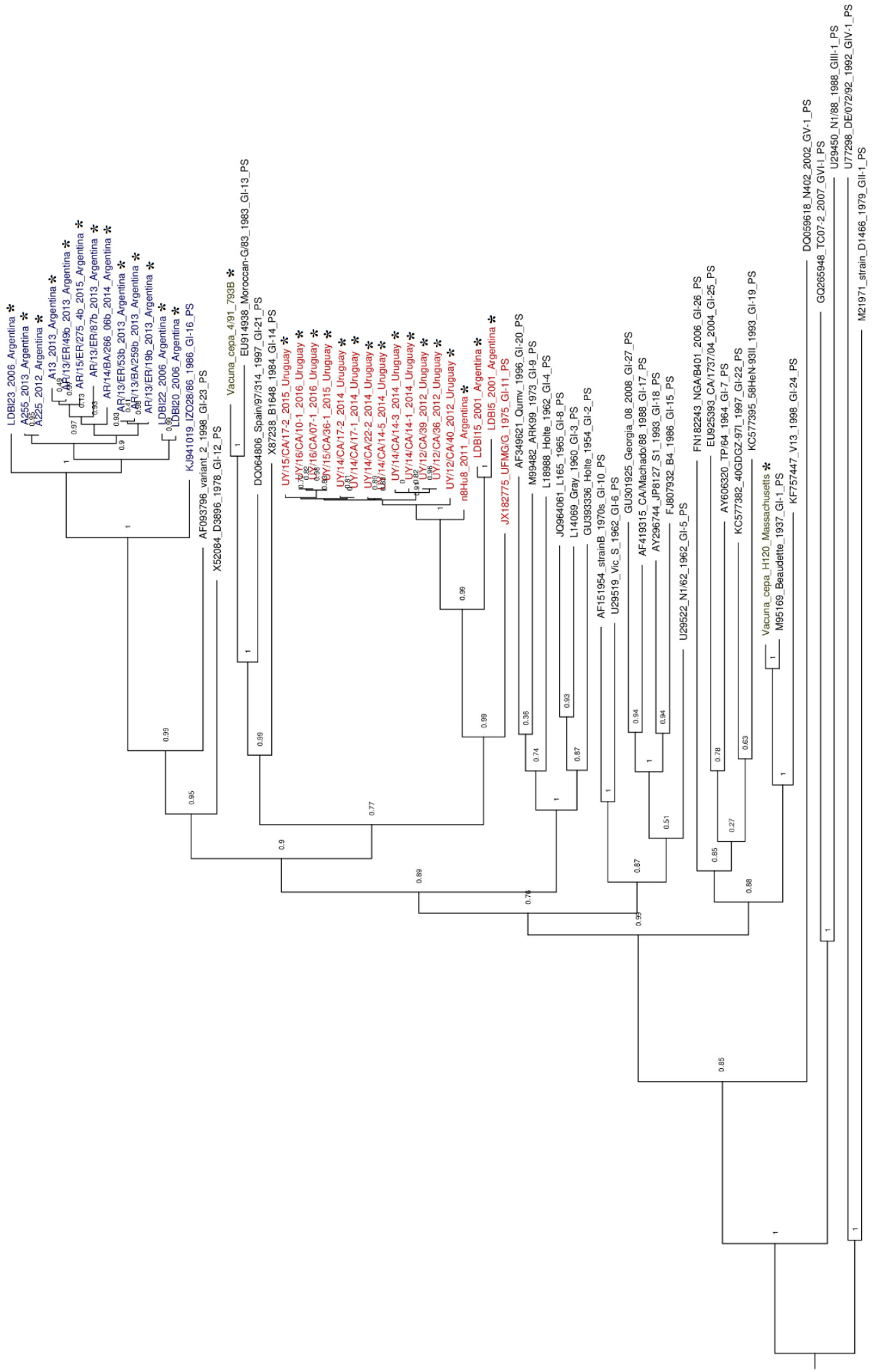


Figura 12. Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en la secuencia nucleotídica codificante de la región S1 de la Glicoproteína de Superficie. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó al conjunto de datos fue el GTR+I+G. Se marcan con un asterisco las cepas secuenciadas en este trabajo, en color rojo las cepas del linaje GI-11 y en azul las del linaje GI-16.

cantidad de años representados. Para el linaje GI-16 se emplearon un total de 50 secuencias de 1565 pb (secuencia completa de S1) datadas entre los años 1986 y 2015.

El tMRCA calculado para el linaje GI-11 es de 64 años, lo que indica que el ancestro de este linaje se habría originado en 1952. El intervalo de confianza está entre los 50-85 años, por lo que el origen estaría entre los años 1931 y 1966 con un 95% de confianza.

El tMRCA calculado para el linaje GI-16 es de 37 años, lo que indica que el ancestro de este linaje se habría originado en 1978. El intervalo de confianza está entre los 29-48 años, por lo que el origen estaría entre los años 1967 y 1986 con un 95% de confianza.

El ancestro común del linaje GI-11 es 27 años más antiguo que el linaje GI-16 si consideramos las medias geométricas de los tMRCA. Los intervalos de confianza del 95% de estas medidas no se solapan, por lo que se puede asegurar que el linaje GI-11 tiene un origen más antiguo que el linaje GI-16.

3.2.3. Discusión

Durante la primera etapa de este estudio se trabajó en la identificación de casos positivos de IBV por RT-qPCR para su posterior caracterización por secuenciación. Esta primera etapa es de gran importancia porque el diagnóstico clínico de la Bronquitis Infecciosa es dificultoso debido a su sintomatología poco específica. Los signos clínicos respiratorios asociados a esta patología, tales como tos, estornudos, exudados nasales y oculares, estridor y disnea, están presentes también en la enfermedad de Newcastle, la Laringotraqueitis Infecciosa y en las infecciones por Pneumovirus (Shalk et al., 1931). En las infecciones renales de IBV, caracterizadas por un aumento de volumen y palidez de los riñones y la presencia de túbulos y uréteres con cristales de ácido úrico, se observa un cuadro clínico similar al provocado por intoxicación con sal y por la enfermedad de Gumboro (Winterfield et al., 1962). Por lo tanto, la utilización de una metodología diagnóstica basada en qPCR, caracterizada por su alta sensibilidad y especificidad, es un instrumento importante para los veterinarios responsables de las granjas avícolas. Por esta razón, fue utilizada una metodología de qPCR (Callison et al., 2006), estandarizada y validada durante mi tesis de maestría, para el diagnóstico específico de IBV en muestras uruguayas colectadas de animales con sintomatología presuntiva de IBV.

La aplicación de esta metodología reveló que el genoma de IBV estaba presente en más del 40% de las muestras analizadas. Es posible que los síntomas clínicos de las aves negativas para IBV estén asociados a otra afección respiratoria con signos clínicos similares. Otra posibilidad es que las muestras presuntamente negativas tengan una carga viral muy baja en el momento de la toma de la muestra. La carga viral de una muestra depende de varios factores, entre ellos la edad del ave, la cepa de virus infectante y el órgano infectado (Alvarado et al., 2006).

Un alto porcentaje de los brotes analizados presentaron co-infección de IBV con un agente viral inmunosupresor (IBDV y/o CAV). Las infecciones primarias de las cepas de CAV o IBDV causan una depleción de linfocitos en los pollos, resultando en la inmunosupresión y el aumento de susceptibilidad de los pollos a diversos patógenos virales respiratorios como IBV. En este sentido, ya ha sido documentado que pollos co-infectados con CAV e IBDV, y posteriormente con IBV, presentan síntomas y lesiones

características de IBV más severas que aquellas presentes en pollos infectados únicamente con IBV (Toro et al., 2006). Por otro lado, las infecciones con CAV o IBDV afectan la protección generada por la vacunación. Si un animal es vacunado contra IBV y está previamente infectado con un agente inmunosupresor, se verá disminuida la respuesta inmune generada por la vacunación contra IBV, aumentando la susceptibilidad de las aves a este virus.

En la mitad de las muestras uruguayas diagnosticadas y caracterizadas por RT-qPCR no fue posible la amplificación de la región codificante de S1. Esto resalta la importancia de contar con una metodología sensible de qPCR para la tipificación de una cepa en linajes. En muchas de estas muestras se observó un Ct mayor en el control interno (Tabla 6), lo que probablemente indique que no fueron correctamente conservadas antes de su arribo al laboratorio.

En dos de las 15 muestras de campo uruguayas en las que se amplificó la secuencia completa de S1 (UY/12/CA/24 y UY/15/CA/45-2), se detectaron eventos de recombinación. Los eventos de recombinación inter- o intra-génico ocurren frecuentemente en cepas de campo de IBV (Kottier et al., 1995; Lee & Jackwood, 2000; Dolz et al., 2008). Esta alta frecuencia es consecuencia de varios factores: i) la presencia de una maquinaria de replicación que se disocia y reasocia al ARN molde durante la síntesis discontinua de ARNm subgenómicos, ii) el gran tamaño del genoma de IBV, y iii) la alta disponibilidad de moléculas de ARN aceptoras de recombinación (ARN de longitud completa y ARN subgenómicos). La co-circulación de más de un linaje en una región y el amplio uso de vacunas a virus vivo puede también contribuir a un aumento de la frecuencia de recombinación entre cepas heterólogas (Kusters et al., 1990; Wang et al., 1993; Jia et al., 1995; Lee & Jackwood, 2000; Bochkov et al., 2007).

En la cepa UY/12/CA/24 se detectaron dos puntos de recombinación que dieron lugar a una secuencia de S1 del linaje GI-11 con un fragmento de 263 nt derivado de la cepa vacunal Massachusetts (linaje GI-1). Los animales a partir de los cuales se aisló esta cepa presentaron un cuadro nefropatógeno en condiciones de campo. Las cepas de campo Massachusetts han sido reportadas como cepas nefropatógenas (Li & Yang, 2001). Como ya se mencionó, este cuadro clínico puede ser también provocado por otros factores como

la intoxicación con sal o la enfermedad de Gumboro. El diagnóstico de Gumboro para esta muestra fue negativo al igual que para Anemia Infecciosa. En el próximo capítulo se estudiará el tropismo de esta cepa en condiciones experimentales y se analizará su genoma completo.

La secuencia de S1 de la cepa recombinante UY/15/CA/45-2 está formada por un fragmento 5' de 734 nt de una cepa del linaje GI-11 y un fragmento 3' de 899 nt de la cepa vacunal 793B (linaje GI-13). Resulta sorprendente la identidad de esta última secuencia parental ya que hasta la fecha no se ha detectado la circulación del linaje GI-13 en Uruguay ni está autorizada oficialmente la cepa vacunal 793B.

En ambos eventos de recombinación estuvieron involucradas cepas vacunales, resultado que apoya las nuevas tendencias de no utilizar vacunas a virus vivo heterólogas a las cepas de IBV que circulan en el campo, ya que los genomas de estas vacunas pueden actuar como moléculas aceptoras de recombinación y generar nuevas variantes genéticas.

Las secuencias completas de S1 no recombinantes de variantes uruguayas y argentinas se analizaron filogenéticamente con las secuencias prototipos de los 32 linajes, y se estableció su pertenencia a los linajes GI-11 y GI-16. El mismo resultado se obtuvo con los ensayos de RT-qPCR para la detección específica de estos linajes.

Por primera vez se analizó la secuencia completa de S1 de cepas caracterizadas dentro del genotipo B. Este genotipo fue descrito en Argentina en base al análisis de las regiones hipervariables 1 y 2 de S1 (500 pb aprox.), como un genotipo altamente relacionado al genotipo C (actualmente denominado GI-11) (Rimondi et al., 2009). La filogenia basada en secuencias completas de S1 muestra que estas cepas pertenecen realmente al linaje GI-11 (Figura 12). Estas cepas presentan mayor divergencia con las típicas cepas GI-11 en las dos primeras regiones hipervariables de S1, pero son similares en el resto de S1, razón por la que no son detectadas con el ensayo de RT-qPCR específico de GI-11. Este resultado resalta la importancia de analizar la secuencia completa de S1 para caracterizar una cepa de IBV.

En Uruguay desde el año 2011 se han detectado únicamente cepas del linaje GI-11, y este escenario epidemiológico es el mismo que se observa en Brasil. GI-11 es un linaje muy

restringido geográficamente ya que solo se reportó en Argentina, Brasil y Uruguay. Argentina tiene una situación epidemiológica diferente a Uruguay y Brasil, en donde co-circulan los linajes GI-11 y GI-16. El linaje GI-16 es el predominante en Argentina desde el año 2013, y parece asociarse con un incremento en el número de reportes de brotes problemáticos; las cepas GI-11 son menos frecuentes y se encuentran en forma esporádica. GI-16 también está presente en otros países sudamericanos como Chile y Perú (Sesti et al., 2016; de Wit et al., 2017), además de ser uno de los linajes de IBV más distribuidos en el mundo conjuntamente con GI-1 (Massachusetts), GI-13 (793B) y GI-19 (QX) (Valastro et al., 2016).

Según los análisis filodinámicos, el linaje GI-11 se habría originado en Sudamérica alrededor de 1952. Previo a la aparición de este genotipo circulaban en Sudamérica cepas del serotipo Massachusetts (Hipólito, 1957, Hidalgo et al., 1976). Como las vacunas comerciales de este serotipo se introdujeron en Sudamérica recién a principio de la década de 1980s, las cepas de campo del serotipo Massachusetts co-circularon con cepas de este linaje en los años previos a la vacunación. Es probable que los planes de control con vacunas del tipo Massachusetts colaboraron con un control eficaz de las variantes de campo de este serotipo, pero no tan eficazmente con el control de las variantes del linaje GI-11. Podemos especular que la fuerte presión inmunológica contra las variantes Massachusetts habría proporcionado una ventaja adaptativa al linaje GI-11, contribuyendo a su dispersión en Argentina, Brasil y Uruguay.

El linaje GI-16 se habría originado en Eurasia alrededor de 1968, invadiendo posteriormente Sudamérica. Esta expansión intercontinental es un evento poco frecuente en IBV, habiéndose descrito solamente en ciertos linajes, tales como GI-1, GI-13 y GI-19 (Valastro et al., 2016).

Los resultados obtenidos en esta tesis se ajustan a los encontrados anteriormente en nuestro continente (ver Tabla 1), que muestran dos linajes de IBV no vacunales circulando en América del Sur. Estos linajes tienen diferentes historias evolutivas y han persistido en el continente durante muchos años.

3.2.4. Publicación de resultados

Los análisis filogenéticos y filodinámicos de las muestras uruguayas y argentinas obtenidas hasta el año 2013, que incluyeron secuencias obtenidas durante el desarrollo de mi maestría y doctorado, ya fueron publicados (se anexa el artículo al final de la tesis):

Marandino A, Pereda A, Tomás G, Hernández M, Iraola G, Craig MI, Hernández D, Banda A, Villegas P, Panzera Y, Pérez R. 2015. “Phylodynamics analysis of infectious bronchitis virus in South America”. *Journal of General Virology*. doi: 10.1099/vir.0.000077.

Nos encontramos redactando un manuscrito que incluye el análisis de las nuevas secuencias y la caracterización antigénica que se presenta en el capítulo 4.

3.3. Capítulo 3

Caracterización genómica de cepas sudamericanas

de los linajes GI-11 y GI-16

3.3.1. Metodología

3.3.1.1. Muestras

El genoma completo de IBV fue secuenciado en 5 cepas argentinas y 8 uruguayas, colectadas entre los años 2006 y 2015 (Tabla 9). Estas muestras fueron clasificadas en linajes por RT-qPCR y en base al análisis de la secuencia de S1.

Tabla 9. Cepas de IBV argentinas y uruguayas a las que se les secuenció y analizó su genoma.

Muestra	Año de colecta	País	Linaje
UY/09/CA/01	2009	Uruguay	GI-11
UY/11/CA/18	2011	Uruguay	GI-11
UY/12/CA/24	2012	Uruguay	Recombinante GI-11-Mass
UY/12/CA/33	2012	Uruguay	GI-11
UY/12/CA/35	2012	Uruguay	GI-11
UY/14/CA/14-3	2014	Uruguay	GI-11
UY/14/CA/17	2014	Uruguay	GI-11
UY/15/CA/36-1	2015	Uruguay	GI-11
LDBI-20	2006	Argentina	GI-16
LDBI-22	2006	Argentina	GI-16
8Hu8	2011	Argentina	GI-11
A255	2013	Argentina	GI-16
A13	2013	Argentina	GI-16

Todas las muestras provienen de brotes con síntomas respiratorios, a excepción de UY/12/CA/24 que presentó características nefropatógenas en condiciones de campo. El tropismo nefropatógeno de esta cepa fue confirmado en condiciones experimentales durante esta tesis (ver anexo del capítulo).

3.3.1.2. Purificación de partículas virales

Se estandarizaron dos protocolos de purificación de partículas virales de IBV para la secuenciación directa de sus genomas mediante metodologías de NGS (Figura 13). Se pueden identificar tres etapas en ambos protocolos:

- i- aislamientos viral en cavidad alantoidea de huevos embrionados comerciales de 9 días de edad, y obtención de 40 mL de líquido alantoideo enriquecido en partículas de IBV a las 72 hs post-infección.
- ii- concentración del líquido alantoideo en un colchón de sacarosa 20% (peso-volumen) mediante ultracentrifugación a 100.000g durante dos horas. El pellet obtenido fue resuspendido en 1200 µL de PBS.
- iii- purificación viral mediante filtración (protocolo 1) o en gradiente de sacarosa (protocolo 2).

La filtración de la resuspensión del pellet obtenido en el paso ii fue realizada con filtros de membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.45.

El gradiente de sacarosa continuo (30–55%) se logró mediante un protocolo de congelación de descongelación de las soluciones de sacarosa (Luthe, 1983). La ultracentrifugación fue realizada a 100.000g durante cuatro horas a 4°C.

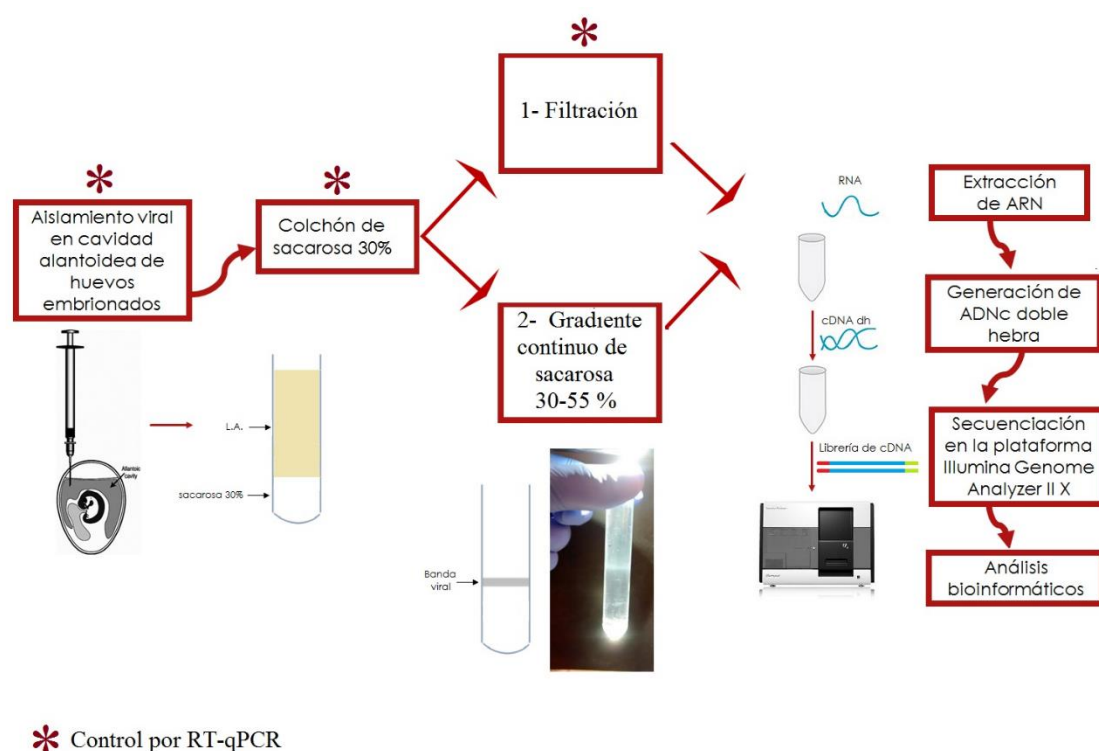


Figura 13. Protocolos de purificación de partículas virales de IBV, construcción de librerías y secuenciación.

3.3.1.3. Evaluación de las diferentes etapas de purificación mediante RT-qPCR

El enriquecimiento del genoma viral respecto al ARN de pollo se avaluó mediante un ensayo de cuantificación relativa por RT-qPCR que se diseñó y estandarizó en esta tesis. El genoma viral se detectó y cuantificó utilizando el ensayo de diagnóstico de IBV descrito en el capítulo 2. Para la detección y cuantificación del ARN de pollo se diseñó un ensayo que amplifica una región de 120 pb del ARN ribosomal 18S (Tabla 10).

Las curvas estándar de estos ensayos requirieron 8 diluciones seriadas en base 10 de producto de PCR purificado. Los productos de PCR se amplificaron con los mismos cebadores de la qPCR y una concentración inicial de amplicón purificado de 2 ng/μL. La eficiencia de cada curva se calculó con la fórmula $E = (10^{(-1/k)})$, donde k es la pendiente de la curva estándar. La relación genoma IBV:ARNr 18S se calculó mediante la fórmula $r = \hat{E} (Ct IBV - Ct ARNr)$, siendo $\hat{E}$ el promedio de los valores de eficiencias de estos ensayos. El valor r se estimó para todas las muestras en las tres etapas de los protocolos; este

cálculo es más certero cuanto más similares son los valores de E de los dos ensayos. (Figura 13).

Tabla 10. Cebadores y sonda del ensayo de qPCR para la detección y cuantificación del ARNr 18S.

Cebadores y sonda	Secuencia 5' → 3'	Polaridad
ARNr 18S Fw	CTCAGCTTGTGTCTACCCTAC	+
ARNr 18S Rv	CTTATGACCCGCACTTACTGG	-
ARNr 18S Pb	FAM-CAATCCCCG-ZEN-ATCCCCATCACGAA-3IABkFQ	+

3.3.1.4. Extracción de ARN y secuenciación

La extracción de ARN se realizó utilizando el *kit* “Quick-RNA™ MiniPrep” (Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.) y 200 µl de partículas virales purificadas. La síntesis del ADNc doble hebra se realizó con el *kit* “Maxima H Minus Doble-Stranded cDNA” (Fermentas Life Sciences Inc., Hanover, MD, EE.UU.) y 13 µl de ARN extraído. Para preparar las librerías, se utilizó el *kit* “Nextera XT DNA Samples Preparation” (Illumina, USA) a partir de 1 ng de ADNc doble hebra. Las librerías se purificaron con esferas magnéticas “AMPure XP” (Benchman, USA) y se cuantificó en Qubit con el *kit* “Qubit dsDNA HS assay” (Invitrogen, USA). La calidad y longitud de las librerías se evaluaron con el *kit* “Agilent high-sensitivity DNA” (Agilent, USA) utilizando un Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent, EE.UU.). La secuenciación fue realizada en la plataforma Illumina MiSeq del Instituto de Pasteur de Montevideo.

3.3.1.5. Ensamblaje genómico y análisis de las secuencias

Las lecturas generadas por el secuenciador Illumina se analizaron con el programa SeqMan Pro del paquete DNASTAR. El ensamblaje se realizó utilizando cepas de referencia anotadas. Para los primeros ensamblajes se utilizó la cepa de referencia con mayor similitud (número de acceso KP780179), mientras que en los posteriores también se tuvieron en cuenta los genomas que se iban obteniendo en esta tesis. Las secuencias se inspeccionaron visualmente y se optimizaron manualmente.

La predicción de ORFs se realizó en el servidor <http://covdb.microbiology.hku.hk> y <http://www.jcvi.org/vigor/> (Huang et al., 2008; Wang et al., 2010).

Los alineamientos, la detección de recombinación, la búsqueda de los mejores modelos de sustitución y las filogenias fueron realizados según se detalla en el capítulo 2.

3.3.2. Resultados

3.3.2.1. Purificación de partículas virales

En 13 muestras (5 argentinas y 8 uruguayas) se aisló IBV en cavidad alantoidea de huevos embrionados. En 8 de estos 13 líquidos alantoideos se purificó las partículas virales mediante gradiente de sacarosa. En la mayoría de los gradientes la purificación se observó en el tubo de ultracentrifugación como una banda clara y blanquecina (Figura 13). En los restantes 5 líquidos alantoideos la purificación se realizó mediante filtración (Tabla 11).

Tabla 11. Muestras argentinas y uruguayas positivas para IBV a las que se les secuenció y analizó su genoma. Se indica la metodología utilizada para la purificación y el enriquecimiento del genoma viral respecto al ARNr 18S (valor r). LA: Líquido alantoideo, c: colchón de sacarosa, g: gradiente de sacarosa, f: filtración.

Muestra	Metodología	r (LA)	r (c)	r (g/f)
UY/09/CA/01	Gradiente	6.3	9.2	16.2
UY/11/CA/18	Gradiente	5.8	8.9	15.1
UY/12/CA/24	Gradiente	4.5	9.1	14.9
UY/12/CA/33	Gradiente	7.2	10.2	16.3
UY/12/CA/35	Filtrado	6.2	9.5	11.1
UY/14/CA/14-3	Gradiente	5.9	8.5	16.2
UY/14/CA/17	Filtrado	5.9	8.5	10.1
UY/15/CA/36-1	Gradiente	7.2	10.2	15.3
LDBI-20	Gradiente	4.5	8.2	14.9
LDBI-22	Filtrado	6.8	9.6	10.5
8Hu8	Gradiente	6.7	10.4	14.8
A255	Filtrado	5.6	9.6	10.4
A13	Filtrado	5.4	7.9	9.8

3.3.2.2. Evaluación de la purificación mediante RT-qPCR

La eficiencia del ensayo de qPCR para la detección de IBV fue de 101%, mientras que para el ensayo de detección del ARNr 18S fue de 103%. Con estos datos y los Ct obtenidos a partir del líquido alantoideo, del colchón de sacarosa y la banda obtenida en el gradiente o el producto del filtrado se estimó el nivel de enriquecimiento del genoma viral respecto al ARNr 18S para cada muestra (Tabla 11).

En las purificaciones virales realizadas con gradiente de sacarosa, se detectaron de 15 a 16 veces más de genoma viral que de ARNr 18S. En cambio, los valores para los purificados mediante filtrado fueron cercanos a 10.

Por otro lado, los *reads* (lecturas) de las muestras UY/09/CA/01 y UY/11/CA/18 se mapearon también contra el genoma de pollo. En este análisis se encontró que el 4 y 2% de los *reads* pertenecía a ARN del huésped, mientras que el 86% era de IBV de un total de 2.3×10^6 y 3.7×10^6 *reads*, respectivamente.

3.3.2.3. Obtención de los genomas y anotación

Los genomas de las 13 muestras fueron ensamblados correctamente e incluyeron las secuencias codificantes, los UTRs y la cola poli-A. Los genomas completos argentinos y uruguayos del linaje GI-11 tienen un tamaño de 27.621, excluyendo la cola poli (A). El tamaño del genomas de las cepas del linaje GI-16 es de 27.638 nucleótidos. Todas las cepas argentinas y uruguayas tienen trece ORFs (1a-1b-S-3a-3b-E-M-4b-4c-5a-5b-N-6b). Los ORFs tienen la misma longitud, excepto los ORF 1a y S que difieren en 24 y 36 nucleótidos entre las cepas de diferentes linajes.

3.3.2.4. Clasificación de las cepas

Se construyó una base de datos con todas las secuencias de genomas completos de IBV disponibles en la base de datos del GenBank y los obtenidos en este trabajo ($n = 279$). Cada secuencia fue clasificada en genotipos y linajes mediante el análisis filogenético de la secuencia de S1, utilizando las secuencias prototipos descritas por Valastro et al. (2016) (Figura 14). Se excluyeron de este análisis las secuencias recombinantes en S1 ($n = 32$). Hasta la fecha se han secuenciado cepas de 18 de los 32 linajes de IBV. En la mayoría de estos linajes hay secuenciados dos genomas en promedio, mientras que otros linajes como el GI-1 y GI-19 están muy representados (Tabla 12). Las cepas uruguayas y argentinas pertenecen a los linajes GI-11 y GI-16, al igual que se observó en el capítulo 2.

Adicionalmente, dos secuencias brasileras fueron clasificadas en el linaje GI-11, mientras que una secuencia italiana y una china fueron clasificadas en el linaje GI-16.

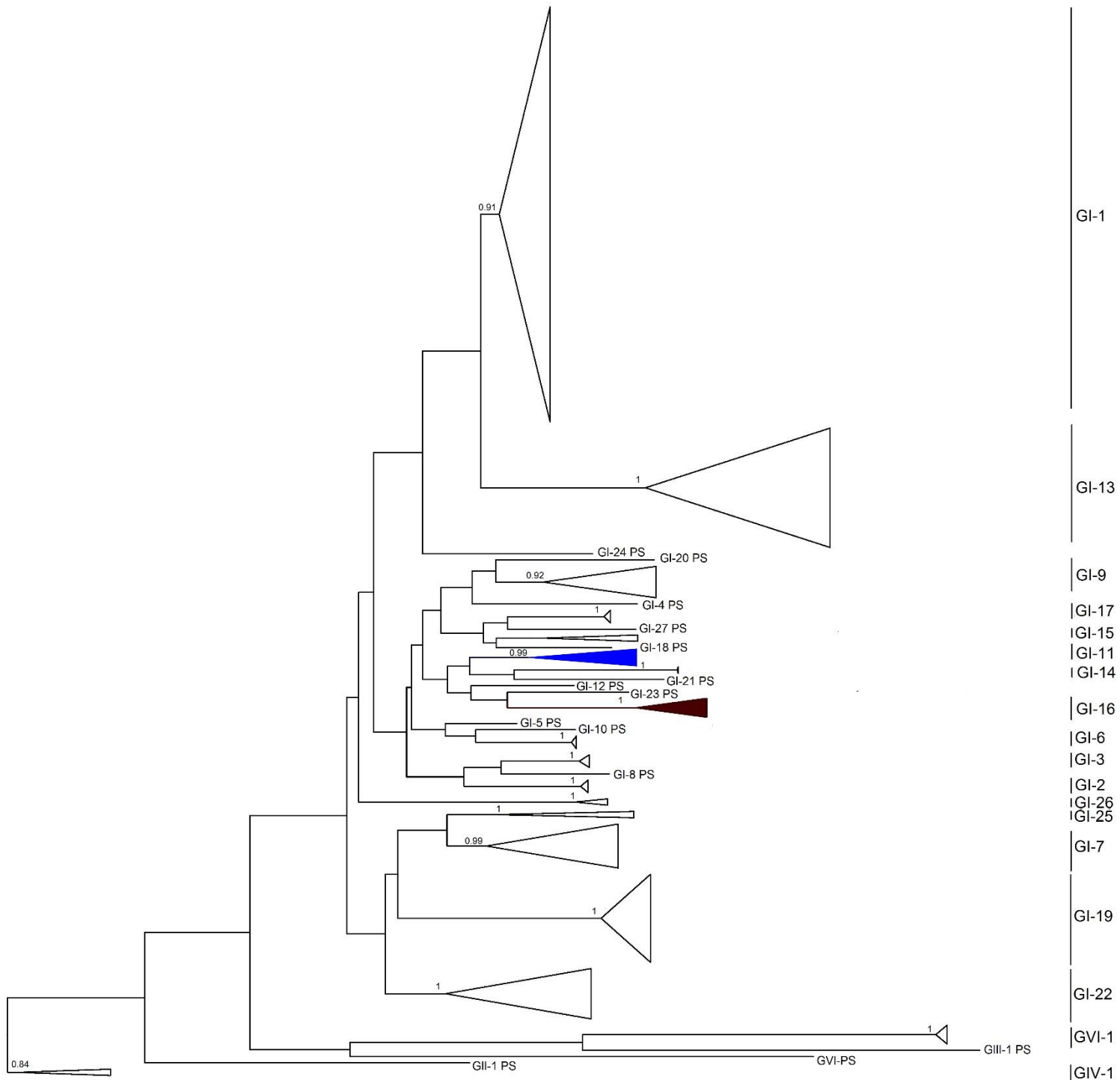


Figura 14. Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en la secuencia nucleotídica codificante de la región S1 de la Glicoproteína de Superficie. Se incluyen todas las secuencias de S1 no recombinantes extraídas de los genomas completos de IBV y las secuencias prototipos de cada linaje. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó al conjunto de datos fue el GTR+I+G.

Tabla 12. Número de genomas completos secuenciados por linajes de IBV.

Linaje	Nº de genomas
GI-1	67
GI-2	2
GI-3	2
GI-6	2
GI-7	8
GI-9	6
GI-11	11
GI-13	20
GI-14	1
GI-15	2
GI-16	6
GI-17	2
GI-19	108
GI-22	2
GI-25	1
GI-26	1
GIV-1	3
GVI-1	3
Total 247	

3.3.2.5. Detección de recombinantes esporádicos intra-ORF

Se analizaron todos los ORFs de los genomas de IBV obtenidos en este trabajo para la detección de recombinación intra-ORF. En cuatro cepas, tres argentinas y una uruguaya, se detectaron eventos de recombinación esporádicos o únicos (Tabla 13).

La secuencia del ORF1a de la cepa UY/12/CA/24 es una secuencia recombinante con dos puntos de recombinación, y tiene como secuencias parentales a una cepa del linaje GI-11 y la cepa vacunal H120 (serotipo Massachusetts). Esta cepa también presenta dos puntos de recombinación en el ORF S, tal como se describió en el capítulo anterior.

Las secuencias del ORF S de las cepas argentinas 8Hu8 (linaje GI-11) y A13 (linaje GI-16) son recombinantes, ambas con un punto de recombinación en la posición 1631. El extremo 3' del gen S de la cepa 8Hu8 deriva de una cepa del linaje GI-16, mientras que el de la cepa A13 de una del linaje GI-11 (Tabla 13).

Tabla 13. Cepas argentinas y uruguayas recombinantes. Se indica el gen en dónde está ubicado el punto de recombinación y las regiones derivadas de las diferentes cepas parentales.

Cepa Recombinante	ORF	Región 1 / Parental	Región 2 / Parental	Región 3 / Parental
8Hu8	S	1-1631 / GI-11	1632-3485 / GI-16	
A13	S	1-1631 / GI-16	1632-3485 / GI-11	
LDBI20	N	1-279 / GI-16	279-1230 / Massachusetts	
UY/12/CA/24	1 ^a	1-535 / GI-11	536-2040 / vacuna H120	2041-11875 / GI-11
UY/12/CA/24	S	1-234 / GI-11	235-497 / vacuna H120	498-3485 / GI-11

3.3.2.6. Análisis filogenéticos de los diferentes ORFs

Se realizaron análisis filogenéticos basados en los diferentes ORFs de IBV utilizando todas las secuencias obtenidas y un conjunto de secuencias no recombinantes representativas de la variabilidad del virus (Figura 15). Se excluyeron de este análisis las secuencias de los ORFs recombinantes (Tabla 13). Los ORFs contiguos y con las mismas relaciones filogenéticas se consideraron como unidades individuales para los análisis.

En la filogenia del ORF1a, las cepas argentinas y uruguayas de los linajes GI-11 y GI-16 se agrupan juntas con un rango de identidad nucleotídica de 96,8-99,8%. Las cepa asiática e italiana del linaje GI-16 y las cepas brasileras del linaje GI-11 tienen diferentes posiciones en el árbol, y comparten una identidad nucleotídica con las cepas argentinas y uruguayas de 93,8-94,4%, 92,2-93,2% y 90,7-94%, respectivamente (Figura 15A).

En la filogenia del ORF1b, las cepas argentinas, uruguayas y euroasiáticas de los linajes GI-11 y GI-16 forman un grupo monofilético, con una identidad nucleotídica de 96,8-99,9%. Las cepas brasileras ocupan una posición diferente en la filogenia y presentan una identidad nucleotídica con los linajes GI-11 (cepas argentinas y uruguayas) y GI-16 de 92,9-93,9% (Figura 15B).

En la filogenia basada en la mayor parte del ORF S (exceptuando los últimos 437 nt) todas las cepas del linaje GI-11 (no recombinantes para este ORF) se agrupan juntas con una identidad nucleotídica que varía entre 91,7 y 99,9% (Figura 15C). Las cepas uruguayas, argentinas y euroasiáticas del linaje GI-16 agrupan en otro grupo monofilético, tal como sucede en la filogenia de la secuencia de S1 (Figura 14), y tienen

una identidad nucleotídica que varía entre 94,5 y 99,4%. La identidad nucleotídica entre las secuencias de ambos linajes se encuentra entre 80,9 y 82,3%.

En la filogenia basada en los últimos 437 nt del ORF S, al igual de lo que se observó en el ORF 1b, las cepas argentinas, uruguayas y euroasiáticas de los linajes GI-11 y GI-16 forman un grupo monofilético, con una identidad nucleotídica de 96-100% (Figura 15D). Las cepas brasileras ocupan una posición diferente en la filogenia y comparten una identidad nucleotídica de 84,2-85,3%.

Los árboles filogenéticos basados en los ORFs 3a, 3b, E, M, 5a y 5b tienen la misma topología y por lo tanto se concatenaron para producir una única filogenia (Figura 15E). Como se observó en las filogenias de las figuras 15 B y D, las cepas uruguayas, argentinas y euroasiáticas de los linajes GI-11 y GI-16 constituyen un grupo monofilético con una identidad nucleotídica de 94,3-100%. Las cepas brasileras ocupan una posición diferente en la filogenia y presentan una identidad nucleotídica con 86,9- 88,3% con el resto de las cepas mencionadas.

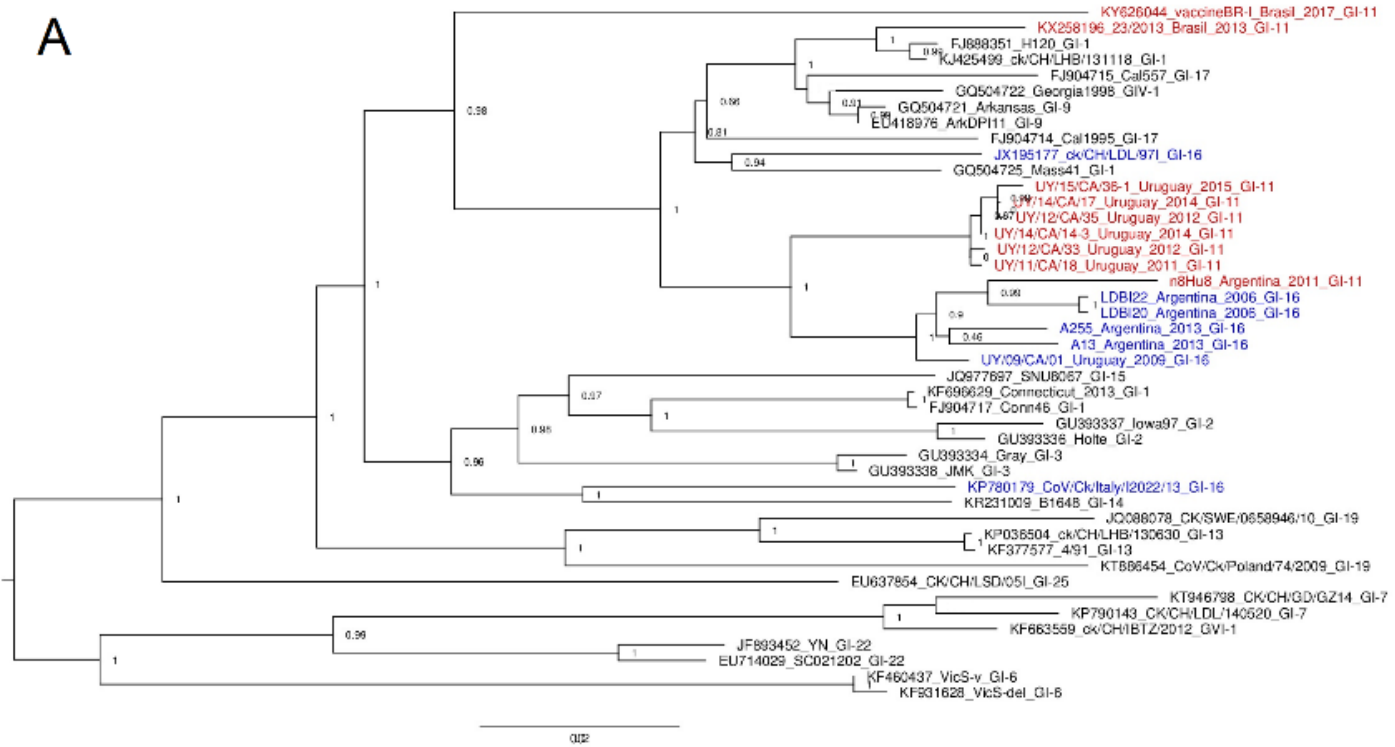
En la filogenia del ORF N, las cepas argentinas y uruguayas de los dos linajes forman un grupo monofilético, con una identidad nucleotídica de 96-100%. Este grupo se asocia con las cepas euroasiáticas con una identidad nucleotídica de 92-94%. Las cepas brasileras ocupan una posición diferente en la filogenia y comparten una identidad nucleotídica de 89,1-90,1% con las cepas uruguayas y argentinas (Figura 15F).

3.3.2.7. Eventos de recombinación ancestrales en las cepas sudamericanas

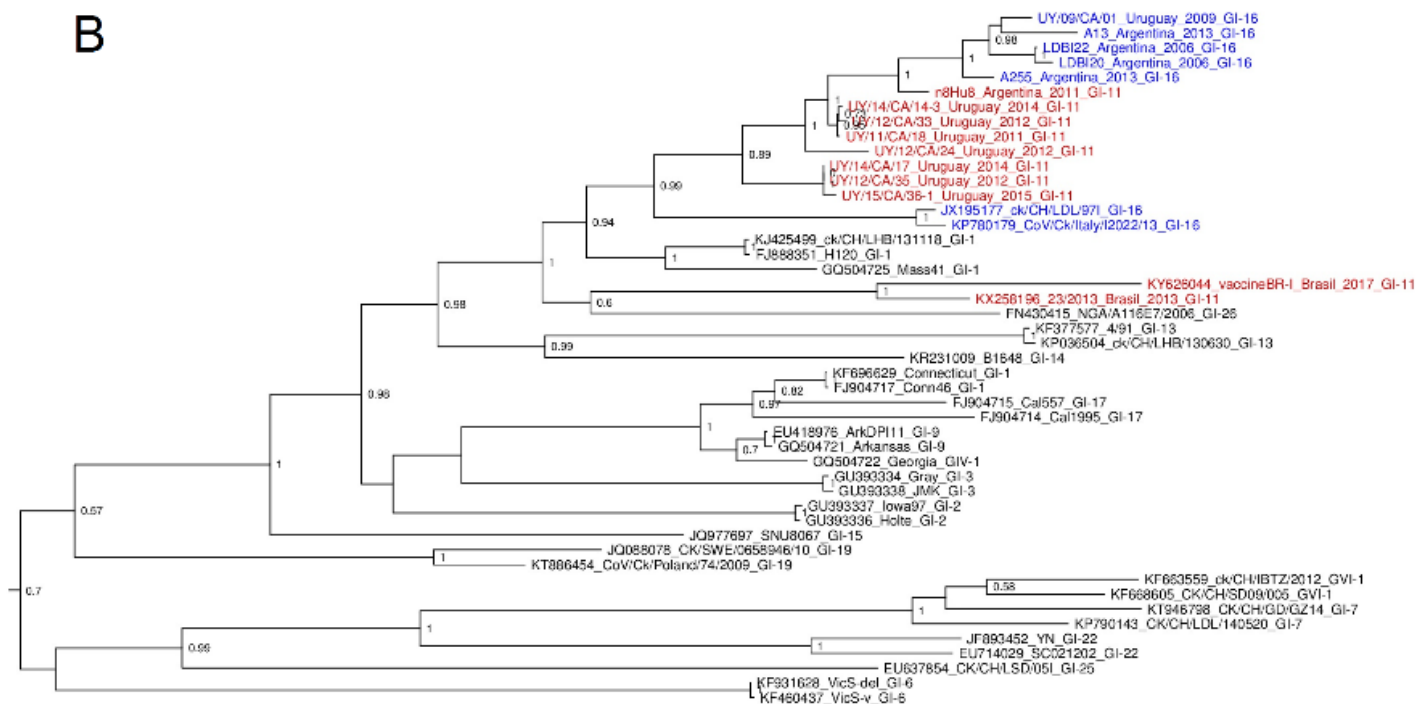
Las incongruencias filogenéticas presentes en las cepas uruguayas y argentinas indican posibles eventos de recombinación ancestrales y circulantes en alta frecuencia. Estos eventos fueron confirmados con el programa RDP4, y con el mismo programa se determinó la posición de los puntos de recombinación. Hay dos puntos de recombinación en las cepas uruguayas y argentinas del linaje GI-11, al inicio y al final del ORF S (posiciones 20330 y 23369), cuyas secuencias parentales son conocidas. La secuencia parental de los ORFs 1b y 3a, 3b, E, M, 4b, 4c, 5a, 5b y N derivan de cepas del linaje GI-16, mientras que la secuencia parental de la mayor parte del ORF S proviene de cepas brasileras del linaje GI-11 (Figura 16). Este evento de recombinación ancestral originó

una forma recombinante circulante (CRF) sudamericana representada por las cepas argentinas y uruguayas del linaje GI-11

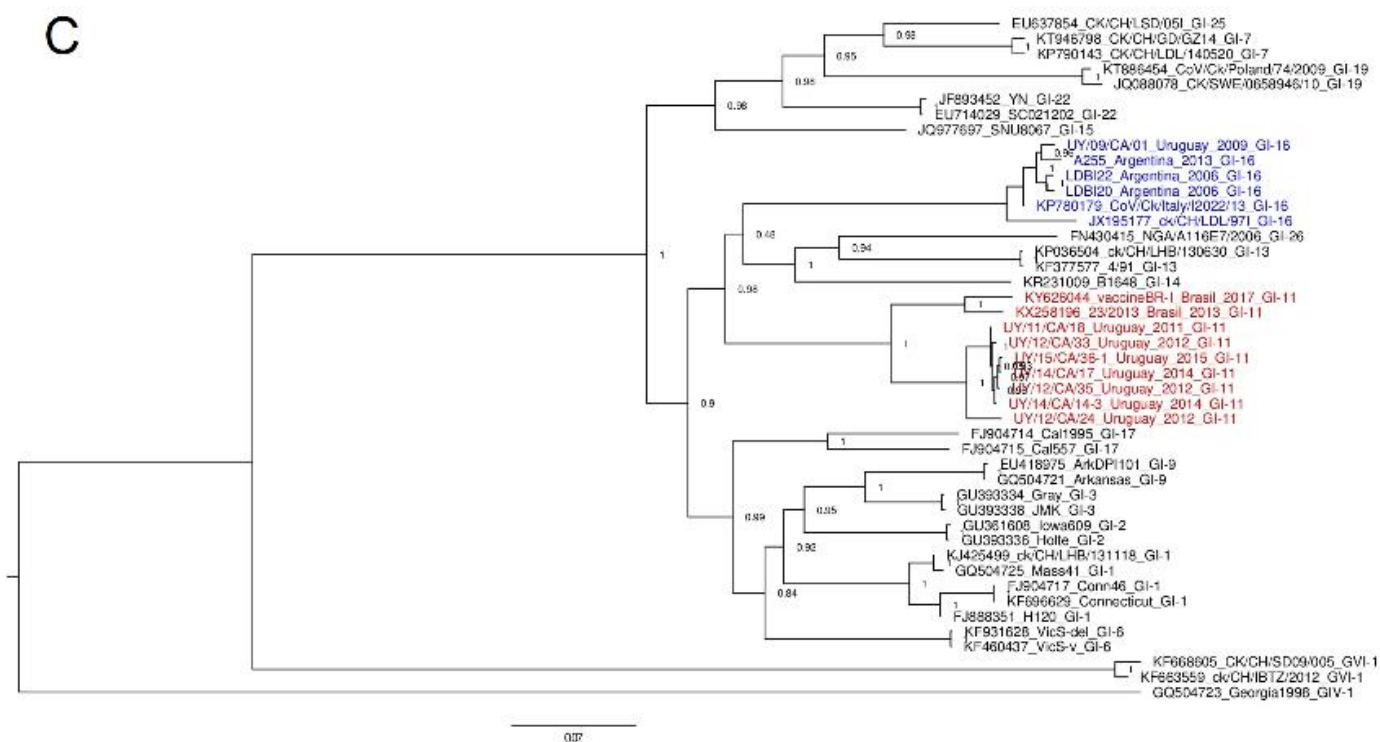
A



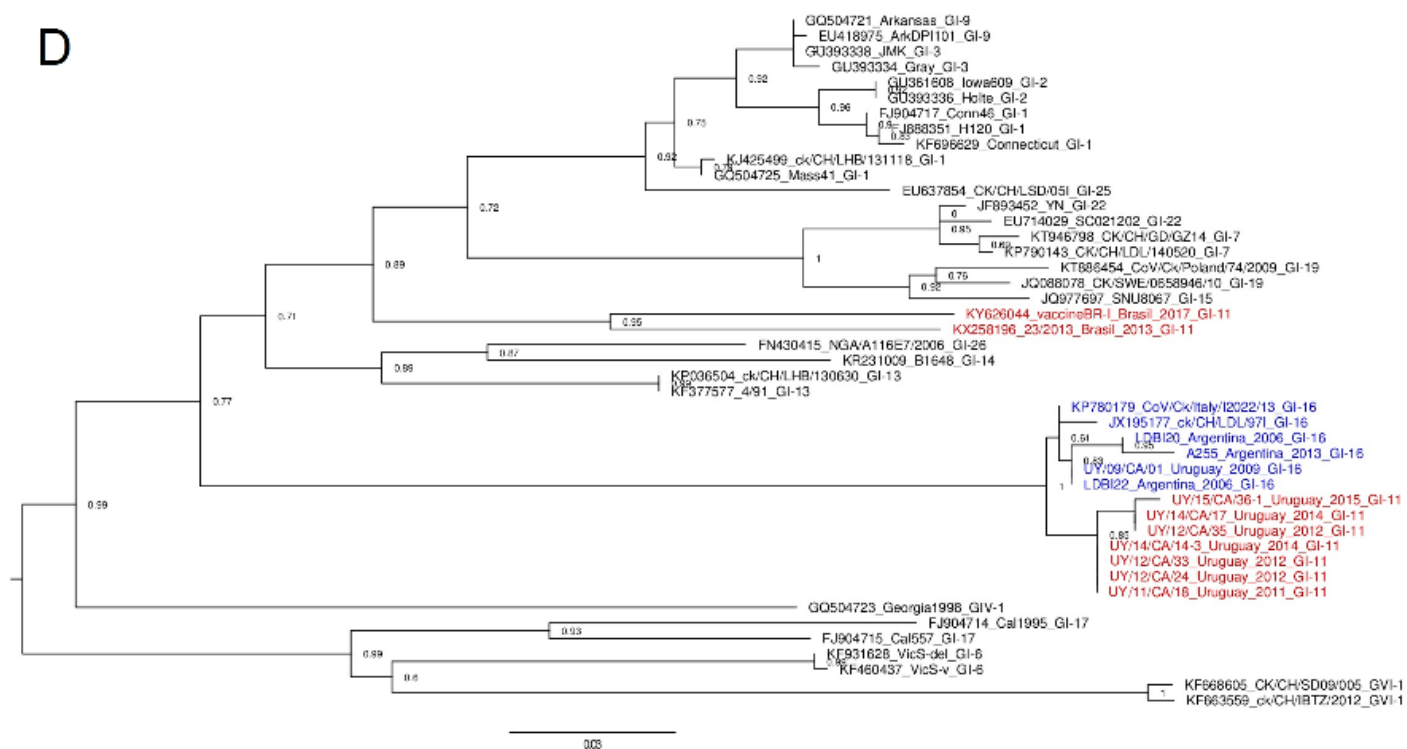
B



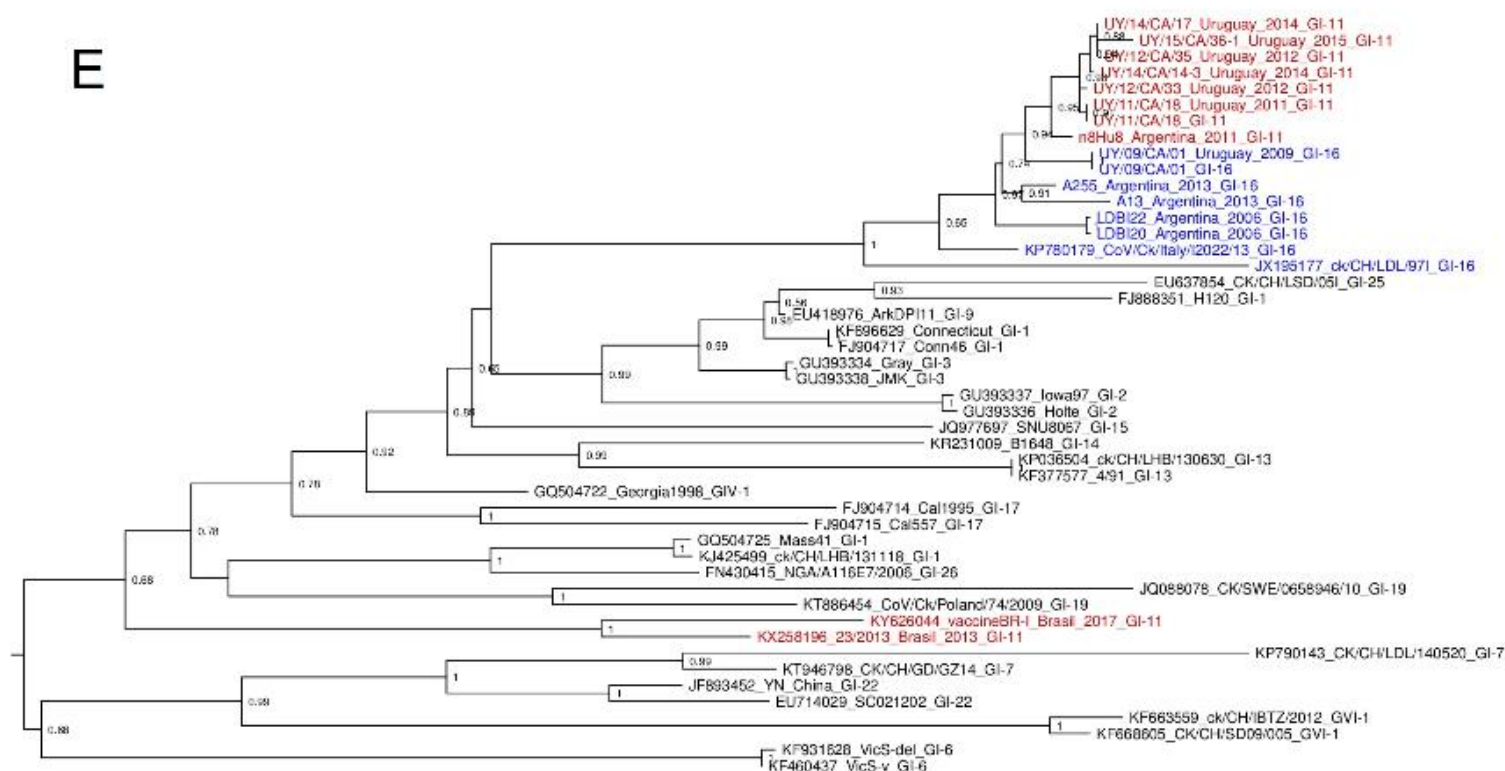
C



D



E



F

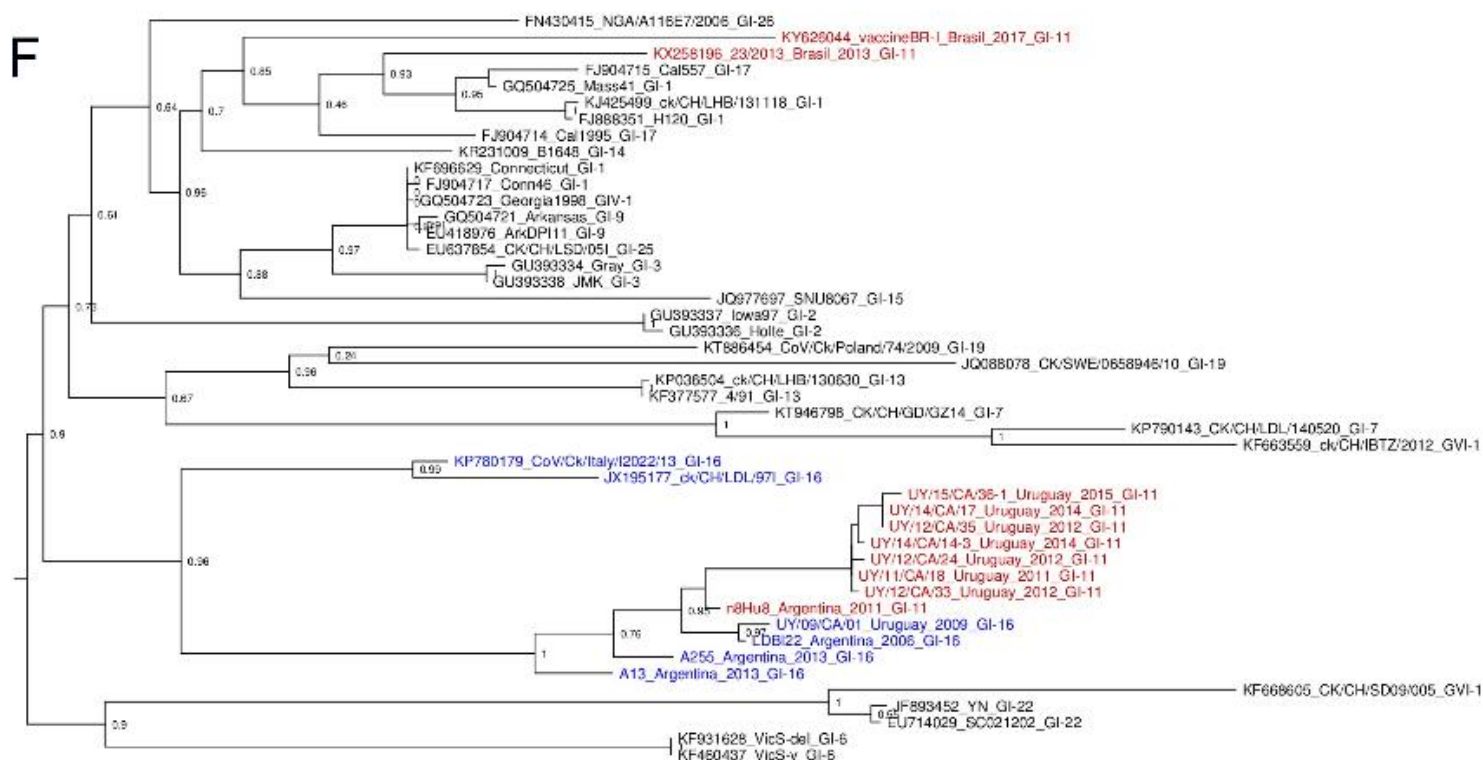


Figura 15. Árboles filogenéticos obtenidos por máxima verosimilitud y los modelos evolutivos de sustitución JC (A), GTR+I+G (B, C y D), y HKY+I+G (E y F). Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron utilizando el ORF1a (A), ORF1b (B), ORF S excluyendo los últimos 437 nt (C), los últimos 437 nt del gen S (D), ORFs 3a, 3b, E, M, 5a and 5b (E), y ORF N (F).

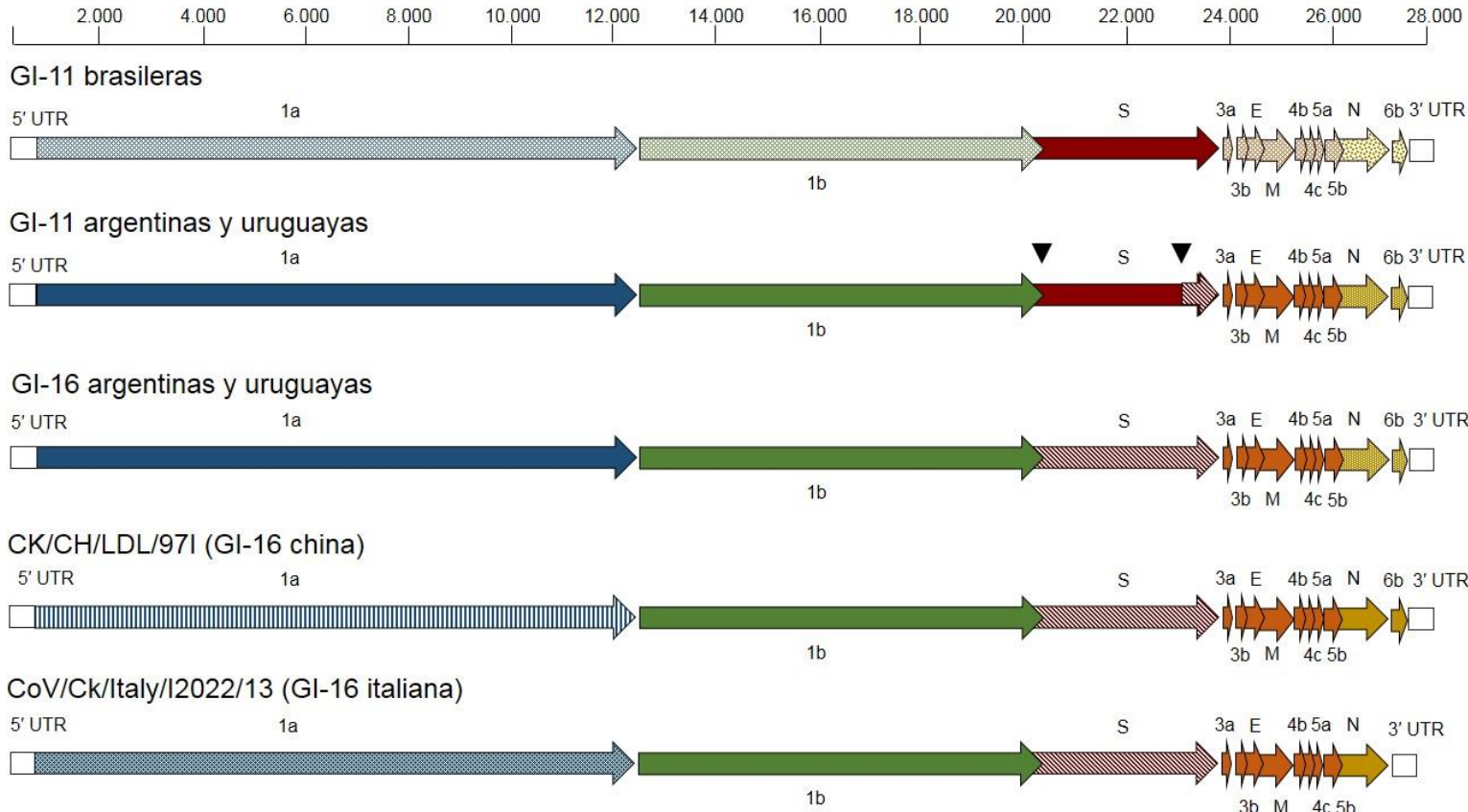


Figura 16. Organización genómica de las cepas de los linaje GI-11 y GI-16. Las diferentes tramas de un mismo color indican divergencia nucleotídica. Se identificaron dos puntos de recombinación en las cepas uruguayas y argentinas del linaje GI-11 señalados con una punta de flecha.

3.3.3. Discusión

3.3.3.1. Metodologías para la secuenciación de genomas de IBV

La metodología de secuenciación tradicional aplicada a los genomas del IBV es particularmente laboriosa porque los coronavirus tienen los genomas de ARN conocidos más largos (Lai & Cavanagh, 1997). Se requiere la amplificación de más de 30 fragmentos de PCR solapados seguidos por secuenciación de Sanger para cubrir los cerca de 28 kb del genoma (Abro et al., 2012; Mondal & Cardona, 2007). Los enfoques de secuenciación profunda o masiva reducen drásticamente los requerimientos de tiempo y costo para la obtención de la secuencia genómica. Las ventajas adicionales de esta metodología son el aumento significativo en la cobertura y profundidad de secuencias que permiten estudiar eventos de co-infección, recombinación y diversidad de cuasiespecies (Isakov et al., 2015; Pérez et al., 2014).

Se han realizado relativamente pocos trabajos de secuenciación de genomas de IBV utilizando estas metodologías (Abolnik, 2015, Naguib et al., 2016, Quinteros et al., 2015, Reddy et al., 2015). Estos trabajos utilizan un primer paso de enriquecimiento viral en la cavidad alantoidea de huevos embrionados y diferentes protocolos para purificar partículas o genomas de IBV, incluyendo tratamiento con RNasa del fluido alantoideo, gradiente de sacarosa o amplificación del genoma con *kits* comerciales. La purificación de partículas de IBV con colchón y gradiente de sacarosa o con filtración, seguida de secuenciación con la tecnología Illumina, permitieron obtener secuencias genómicas con buena efectividad y valores de cobertura extremadamente altos. Aunque tanto la realización de un gradiente de sacarosa como la filtración fueron efectivas, se observaron diferencias en los resultados obtenidos. La metodología por filtración es más sencilla y rápida, pero el gradiente de sacarosa incrementa la proporción del genoma viral con relación al genoma huésped.

3.3.3.2. Evolución de los genomas de los linajes GI-11 y GI-16

Los protocolos de purificación y secuenciación aquí estandarizados permitieron obtener los primeros 13 genomas completos (UTRs y secuencias codificantes) de cepas de IBV uruguayas y argentinas de los linajes GI-11 y GI-16. Las cepas sudamericanas tienen un

genoma con trece ORFs (Figura 16), incluyendo los ORFs 4b, 4c y 6b que son muy variables, tanto en presencia como en su secuencia de nucleótidos. La misma organización se observó en la cepa asiática del linaje GI-16, pero la cepa europea de este linaje carece del ORF que codifica para la proteína putativa 6b. El papel del ORF6b sigue siendo incierto en IBV, pero el homólogo de SARS coronavirus codifica para una proteína que se localiza en las membranas del retículo endoplasmático e induce la apoptosis (Ye et al., 2010). Esta proteína participa también en la aceleración de la replicación del coronavirus murino, incrementando la virulencia de virus atenuados (Tangudu et al., 2007).

La diferencia primordial entre las secuencias uruguayas y argentinas de los linajes GI-11 y GI-16 se encuentra en la mayor parte del ORF S. El resto del genoma, incluido los últimos 437 nucleótidos del ORF S, es sorprendentemente similar entre todas las cepas analizadas de Uruguay y Argentina.

La comparación de los genomas aquí obtenidos con cepas de diferentes linajes permitió profundizar sobre el origen y evolución global de este virus. El ORF1b y los ORFs 3a, 3b, E, M, 4b, 4c, 5a y 5b son muy semejantes a los de las cepas euroasiáticas del linaje GI-16, evidenciando un origen común entre las cepas uruguayas/argentinas de ambos linajes (GI-11 y GI-16). La similitud con las cepas euroasiáticas se reduce cuando analizamos el ORF N y, particularmente, cuando consideramos sólo al ORF1a (Figuras 15 y 16). A pesar del nivel de divergencia en estos ORFs que podría sugerir que fueron captados por las cepas argentinas/uruguayas de otros linajes, no se observan similitudes en la base de datos que sustenten un evento de transferencia de este tipo. Debemos destacar que el ORF1a es particularmente variable en IBV, como se refleja en la alta divergencia que existe entre las cepas euroasiáticas del linaje GI-16. Es posible que los ORFs 1a y N en IBV presenten altas tasas de sustitución asociada a dispersión intra e inter-continental. La semejanza entre las cepas argentinas/uruguayas del linaje GI-11 y las cepas brasileiras de este mismo linaje es solo evidente en la mayor parte del ORF S si exceptuamos zonas que son extremadamente conservadas en IBV. Esto evidencia que los genomas de este linaje son muy variables en la mayor parte de su genoma.

En base a los resultados de este capítulo y a los análisis filodinámicos del capítulo 2 proponemos el siguiente escenario evolutivo para explicar el patrón de variabilidad en las

cepas de los linajes GI-11 y GI-16. El linaje GI-16 se originó y se propagó en Eurasia en los años 70, antes de ser introducido en nuestro continente. Esta dispersión euro-asiática implicó divergencia de secuencias (ORF1a) y cambios en la estructura del genoma (ORF 6b). Una vez introducido en Sudamérica, una cepa del linaje GI-16 originó cepas del linaje GI-11 mediante la adquisición del ORF S de cepas de este linaje (que circula en nuestro continente desde los años 50), aunque conservó el resto del genoma similar a las cepas euroasiáticas invasoras. La similitud entre las cepas argentinas y uruguayas de ambos linajes sugiere que este evento de recombinación ancestral tuvo un único origen y ocurrió en nuestro continente. Las cepas del linaje GI-11 que se originaron por este proceso de recombinación ancestral se expandieron exitosamente en Argentina y Uruguay para generar las cepas circulantes en la actualidad, representando una forma recombinante circulantes o CRF muy exitosa para el virus. La historia evolutiva de las cepas argentinas/uruguayas y brasileras del linaje GI-11 es diferente y, aunque evidentemente son similares en el ORF S y por esto son clasificadas como pertenecientes a un sólo linaje, no comparten el mismo origen evolutivo del resto de su genoma. Es posible que las cepas brasileras sean las representantes del linaje GI-11 original que brindó el ORF S al linaje GI-16 durante el evento de recombinación ancestral ocurrido en Sudamérica.

Como consecuencia de todos estos procesos, las cepas en Sudamérica tienen tres genomas diferentes que pertenecen a dos linajes definidos en base a su similitud en S1. Encontramos cepas originales del linaje GI-16 que han divergido por altas tasas de sustitución en regiones particulares de su genoma (ORF 1a y N) sin evidencias claras de recombinación, cepas brasileras del linaje GI-11 con genomas claramente diferentes al de las cepas GI-16, y cepas recombinantes entre ambos linajes que pertenecen al linaje GI-11 por haber conservado únicamente el ORF S de este linaje. Estas cepas recombinantes estarían restringidas a Argentina y Uruguay, lo cual es coherente con los datos epidemiológicos existentes. De acuerdo a los relevamientos realizados (Chacón et al., 2011; Marandino et al., 2015; Rimondi et al., 2009), en Brasil solo circulan cepas de los linajes GI-11, mientras que en Argentina y Uruguay co-circulan ambos linajes, requisito fundamental para que hayan ocurrido eventos de recombinación.

La historia evolutiva de los linajes GI-11 y GI-16 resulta sorprendente y evidencia un escenario complejo que deberá ser confirmado con el análisis de nuevas cepas de diferentes territorios y colectadas en distintos momentos.

3.3.3.3. Genomas recombinantes esporádicos

Como ya se discutió en el capítulo 2, los eventos de recombinación son muy relevantes para la evolución de IBV. Además de cumplir un papel esencial en el surgimiento de los linajes argentinos y uruguayos que circulan actualmente (recombinación ancestral), son relevantes en el surgimiento de variantes genómicas recombinantes esporádicas. En esta tesis se identificó que cuatro de los 13 genomas secuenciados estuvieron sometidos a por lo menos un evento de recombinación, dos de ellos involucraron cepas vacunales y los otros dos cepas de campo de los linajes GI-11 y GI-16.

Las cepas argentinas 8Hu8 (linaje GI-11) y A13 (linaje GI-16) presentan un ORF S recombinante GI-11/GI-16 y GI-16/GI-11, respectivamente. El sitio de recombinación en ambas cepas es muy cercano a la región codificante del sitio de clivaje S1-S2, y por lo tanto, la proteína S1 persiste como una sola unidad. Se han analizado decenas de secuencias de S1 de cepas sudamericanas de los linajes GI-11 y GI-16 (Marandino et al., 2015; Rimondi et al., 2009), y únicamente se detectó una cepa con un punto de recombinación que interrumpe la región codificante de S1. Este hecho sugiere que la región codificante S1 es seleccionada positivamente y se transmite como una unidad intacta para evitar interrumpir las interacciones intramoleculares de la proteínas (Lefevre et al., 2007).

La cepa argentina LDBI20 (linaje GI-16) y la cepa uruguaya UY/12/CA/24 presentan fragmentos genómicos procedentes de la cepa vacunal Massachusetts. La cepa LDBI20 presenta el extremo 3' del ORFN derivado de esta cepa vacunal. Mientras que la cepa UY/12/CA/24 posee regiones del ORF1a y S de la cepa vacunal H120 del serotipo Massachusetts. Como ya se discutió en el capítulo 2, la utilización de vacunas vivas heterólogas a las cepas de IBV que circulan en el campo aumenta la frecuencia de generación de variantes recombinantes, ya que los genomas vacunales pueden actuar como moléculas aceptoras o donadoras de recombinación. Las consecuencias de estos eventos pueden ser variables, por ejemplo en cuanto a la patogenicidad o virulencia de

las nuevas variantes recombinantes. La cepa UY/12/CA/24 mostró características nefropatógenas en condiciones de campo y experimentales que no fueron reportadas en el parental mayor (una cepa uruguaya del linaje GI-11), con la que comparte más del 93% del genoma. Las cepas Massachusetts no atenuadas han sido asociadas con brotes nefropatógenos en condiciones de campo, demostrándose experimentalmente que causan nefritis y elevada mortalidad cuando son inoculados experimentalmente en pollos SPF (Cavanagh, 2007; Li & Yang, 2001; Winterfield, 1984).

Los experimentos realizados en esta tesis indican que la cepa UY/12/CA/24 infecta las células renales con un alto título viral, a diferencia de la cepa UY/11/CA/18 (Figura 14). Estas cepas solo difieren genéticamente en pequeñas regiones de los ORFs 1a y S. Se requieren estudios adicionales para entender más el carácter nefropatógeno de la cepa UY/12/CA/24. Es importante encontrar un modelo de infección en donde se puedan reproducir las patologías respiratorias y nefropatógenas que se observan en el campo, ya que los animales infectados en esta tesis no mostraron sintomatología típica de IBV. Otros experimentos que utilizaron cepas sudamericanas de estos linajes tampoco han logrado este cometido (datos no publicados). Para sortear este problema se podrían utilizar pollos SPF de corta edad (de 1 a 7 días) y utilizar otros marcadores de patología como histopatología y ciliostasis.

Los determinantes genéticos de la nefropatogenicidad de IBV no han sido dilucidados. La proteína S es la principal responsable de tropismo celular en los coronavirus. Se ha demostrado para muchos coronavirus (virus de la hepatitis murina, coronavirus felino, virus de la gastroenteritis transmisible porcino) que la sustitución del ectodominio de la proteína S resulta en un virus capaz de crecer en cultivo celular susceptible para el virus donador de S. En IBV se ha descrito que el reemplazo del ORFS de la cepa Beaudette (única cepa capaz de replicarse en células Vero) con el de una cepa Massachusetts genera un virus con baja capacidad de crecer en células Vero (Cavanagh, 2007).

Sin embargo, el tropismo de los coronavirus no está determinada únicamente por la proteína S. Cuando el gen S de la cepa no hepatotrópica JHM de IBV fue reemplazado por el de la cepa hepatotrópica A59, el virus recombinante causó una mínima infección en el hígado (Navas & Weiss, 2003). En el virus de la hepatitis del ratón, la delección de

todos los genes que codifican para proteínas no estructurales, a excepción del gen 1, genera virus capaces de replicar en ratones pero que a diferencia del virus salvajes no son letales (De Haan et al., 2002). En este mismo virus, sustituciones puntuales de aminoácidos del ORF1a volvieron patogénico a un virus atenuado (Sperry et al., 2005).

La cepa nefropatógena UY/12/CA/24 y la respiratoria UY/11/CA/18 comparten la mayor parte del genoma y solo difieren en regiones de los ORFs 1a y S, que cómo se describió han sido relacionados con el tropismo y la patogenicidad de los coronavirus. Se necesitan nuevos enfoques metodológicos para comprobar cuál o cuáles de estas regiones genómicas están relacionadas con la nefropatogenicidad.

3.3.3.4. Dinámica singular de IBV en Sudamérica

Como se ha discutido, los resultados de este capítulo revelan que la dinámica de IBV en América del Sur es singular, e implica dos linajes principales en donde la migración, la recombinación y la diferenciación local han tenido un rol relevante. El linaje GI-16 ha mostrado una capacidad de expansión sorprendente entre y dentro de los continentes que es poco frecuente en IBV. Esta expansión estuvo acompañada por cambios mutacionales, pérdida y adquisición de ORFs, y por recombinación. Los eventos de recombinación esporádicos son interesantes, particularmente cuando ocurre con cepas vacunales por la información que nos pueden brindar, pero su impacto evolutivo no parece muy relevante, ya que sólo hemos detectado eventos únicos que no se han extendido en las poblaciones virales. Sin embargo, cepas del linaje GI-16 crearon una forma recombinante circulante que ha sido extremadamente exitosa en Sudamérica, el linaje GI-11 circulante en Argentina y Uruguay. La creación de este linaje implicó el ORF S por lo que se produjo un cambio de linaje aunque mantuvo la mayor parte del genoma ancestral. Evidentemente, este genoma ancestral parece ser muy exitoso porque fue capaz de desplazar a las cepas originales del genotipo GI-11 del cual adquirieron el ORF S. Aunque falta establecer si esta forma recombinante se ha extendido a Brasil, los resultados que se tienen hasta este momento muestran que las cepas del linaje GI-11 brasileras tienen una historia evolutiva diferente. Será necesario analizar más cepas de este país para dilucidar la epidemiología molecular de IBV en el continente Sudamericano. Los nuevos análisis deberán realizarse

utilizando el genoma entero ya que hemos evidenciado que estos genomas pueden ser verdaderos mosaicos con diferentes historias evolutivas.

3.3.4. Publicación de resultados

Los análisis de los dos primeros genomas uruguayos y sudamericanos secuenciados fueron publicados (se anexa el artículo al final de la tesis):

Ana Marandino, Gonzalo Tomás, Yanina Panzera, Gonzalo Greif, Adriana Parodi-Talice, Martín Hernández, Claudia Techera, Diego Hernández, Ruben Pérez. 2017. Whole-genome characterization of Uruguayan strains of avian infectious bronchitis virus reveals extensive recombination between the two major South American lineages. *Infection, Genetics and Evolution*, 54: 245-250.

Nos encontramos redactando un manuscrito que incluye el análisis del resto de los genomas obtenidos en esta tesis.

Anexo: Análisis del tropismo de la cepa UY/12/CA/24

Metodología

Se realizaron infecciones experimentales con las cepas UY/12/CA/24 (nefropatógena en condiciones de campo) y UY/11/CA/18 (con características respiratorias en condiciones de campo), utilizando dos grupos de pollos de n=6. Un tercer grupo actuó como control negativo (sin infección). Se utilizaron pollos comerciales, nacidos en condiciones experimentales, no vacunados y de 24 días de edad (sin inmunidad materna). La infección fue realizada a través de los cornetes nasales y con aislamientos virales (en líquidos alantoideos) con una carga genómica de 150000 copias genómicas/μL. Se sacrificaron dos animales por grupo a los 4, 8 y 12 días post-infección, y se colectó tráquea, tonsilas cecales, bursa y riñón. Se realizaron extracciones de ARN a partir de cada tejido, y el ARN total extraído fue cuantificado con NanoDrop. Todas las extracciones de ARN se llevaron a una misma concentración y el número de copias genómicas de IBV de cada una fue estimada a través del ensayo de detección y cuantificación por RT-qPCR.

Resultados

Los animales infectados no mostraron sintomatología evidente característica de IBV (ni respiratoria ni nefropatógena). Se logró cuantificar la carga genómica de IBV por RT-qPCR en los diferentes tejidos a los 4, 8 y 12 días post-infección (Figura 14). Los animales no infectados mostraron una carga genómica de 0 en todos los tejidos.

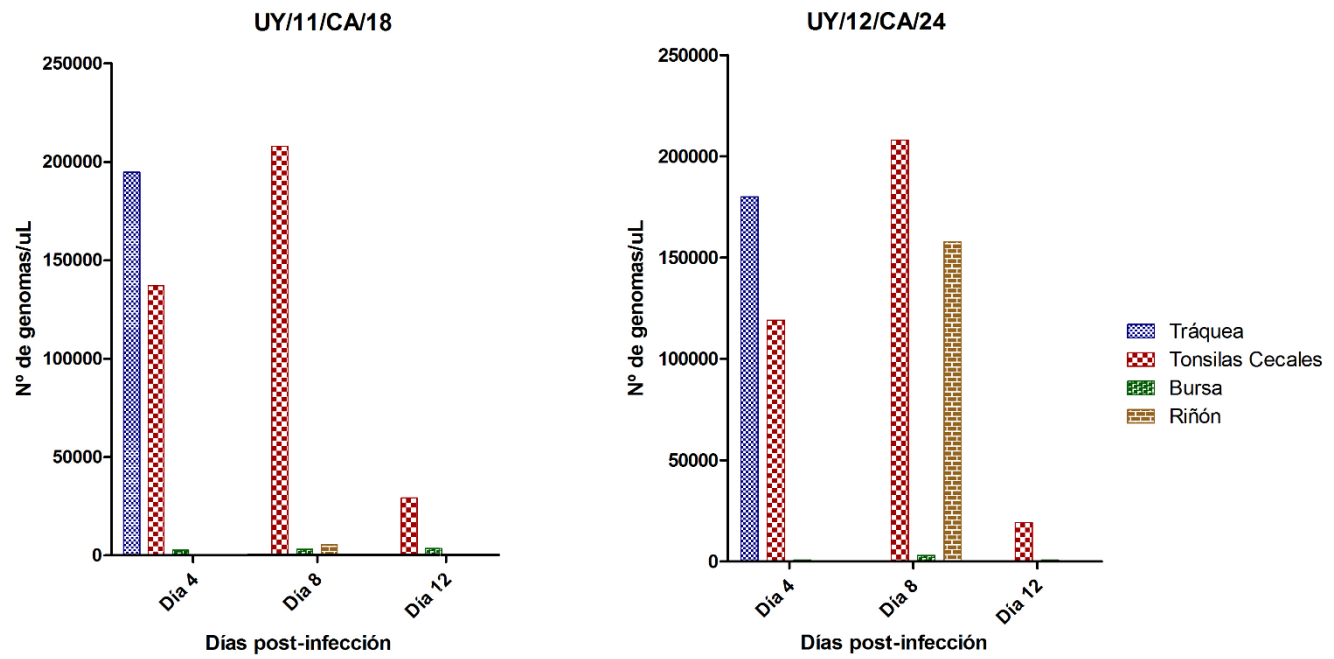


Figura 17. Progreso de la infección de las cepas UY/11/CA/18 y UY/12/CA/24 en diferentes tejidos susceptibles (medida en copias de ARN genómico de IBV por reacción).

3.4. Capítulo 4

Caracterización antigénica los linajes GI-11 y GI-16

3.4.1. Metodología

3.4.1.1. Aislamientos

Se seleccionaron dos aislamientos uruguayos para la realización de los ensayos antigénicos: UY/12/CA/18 perteneciente al linaje GI-11 y UY/09/CA/01 perteneciente al linaje GI-16. Se testeó la ausencia de los siguientes virus aviares en el líquido alantoideo: Virus de Gumboro, Virus de la anemia infecciosa, Adenovirus aviar, Reovirus aviar.

A partir de estos aislamientos se realizaron pasajes en huevos embrionados SPF de 10 días de edad (Rosenbusch S.A.) hasta observar lesiones claras, constantes y características de IBV. Todas las experiencias con huevos SPF las realicé en el Laboratorio de Aves y Porcino, Instituto de Virología, INTA Castelar. Las inoculaciones se realizaron vía cavidad alantoidea con 0.2 mL de inóculo.

3.4.1.2. Titulación

Las titulaciones de los aislamientos UY/12/CA/18 y UY/09/CA/01 se hicieron en huevos embrionados SPF de 10 días de edad. Se realizaron 9 diluciones seriadas en base 10 (de 10^{-3} a 10^{-11}) y se inocularon 0,1 mL de cada dilución en 5 huevos embrionados. Se comprobó la viabilidad de los embriones diariamente y se descartaron los embriones muertos a las 24 horas post-inoculación. A los 7 días post-inoculación fueron sacrificados los embriones vivos (incubación a 4°C por dos horas) y se procedió a la apertura del huevo y visualización de lesiones de todos los embriones. Se calculó la dosis infectiva de embrión de pollo 50% (CEID₅₀), definida como la dilución del virus que produce lesiones en un 50% de los embriones infectados. En general el 50% del efecto buscado no corresponde exactamente a una de las diluciones de trabajo, por lo que es necesario hacer una interpolación matemática para definirla, y en este trabajo utilizamos el método de Reed and Muench (Reed and Muench, 1938). Este método se basa en que el número de unidades de prueba afectadas varía proporcionalmente al log₁₀ de la dilución, y que en la zona cercana al 50% de efecto varía linealmente con la dosis.

3.4.1.3. Producción de sueros hiperinmunes

Se produjeron sueros hiperinmunes en pollos SPF contra los dos aislamientos titulados (Figura 18). Para cada aislamiento se inocularon vía intratraqueal 10 pollos SPF de 21 días con 10^6 CEID₅₀. A los 15 días se realizó una segunda inoculación intravenosa con la misma dosis. A los 14 días de la segunda inoculación se realizó el sacrificio y sangrado de los pollos. Estos procedimientos se realizaron en cabinas de bioseguridad. Para obtener el suero, la sangre fue incubada 10 hs a 4°C y centrifugada por 15 minutos a 1500 rpm. Los sueros se inactivaron a 56°C por 30 minutos y fueron evaluados por la técnica de ELISA (IDEXX IBV Ab test) mediante el valor A/P ($A/P = (\text{Absorbancia media de la muestra} - \text{Absorbancia media del control negativo}) / (\text{Absorbancia media del control positivo} - \text{Absorbancia media del control negativo})$). Valores de A/P mayores a 0.2 corresponden a sueros positivos.

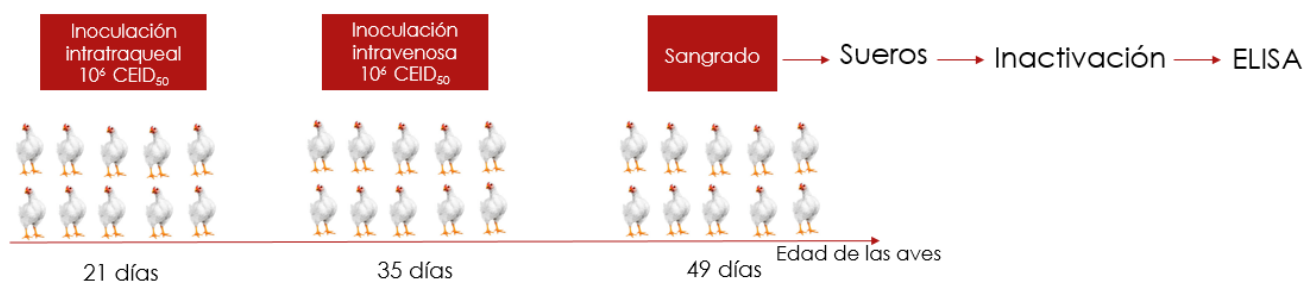


Figura 18. Estrategia utilizada para la obtención y evaluación de suero hiperinmunes.

3.4.1.4. Relación antigénica entre GI-11 y GI-16

Para evaluar la relación antigénica existente entre los linajes sudamericanos se realizó una Virus Neutralización (VN) cruzada, que consistió en dos ensayos de VN homólogas (virus GI-11 – suero GI-11, virus GI-16 – suero GI-16) y dos heterólogas (virus GI-11 – suero GI-16, virus GI-16 – suero GI-11) con el método beta. Se realizaron diluciones seriadas en base 4 del suero y se incubaron una hora a temperatura ambiente con 10^3 CEID₅₀ de virus. Cada mix suero-virus fue inoculado en 5 huevos embrionados SPF de 10 días de edad. A los 7 días post-inoculación se observaron los embriones y se calculó el título neutralizante (TN) con el método de Reed and Muench (Figura 19). Definimos TN como

el inverso de la dilución de suero en la que se observa lesiones en un 50% de los embriones).

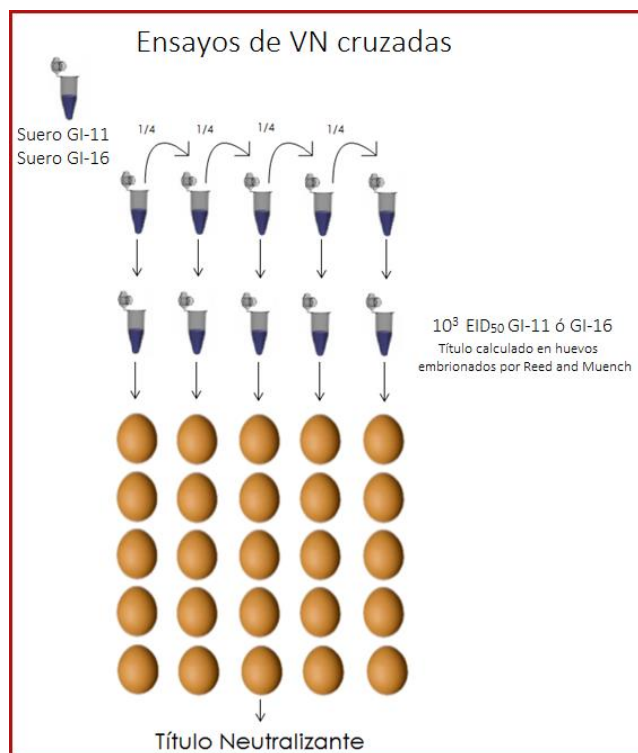


Figura 19. Protocolo utilizado para los ensayos de VN beta.

El porcentaje de relación antigénica (r) entre las cepas de los linajes GI-11 y GI-16 se calculó según Archetti & Horsfall (1950) como se muestra en la siguiente fórmula.

$$r = \sqrt{r_1 \times r_2} \times 100$$

$$r_1 = \frac{\text{TN heterólogo con virus 2}}{\text{TN homólogo}} \quad r_2 = \frac{\text{TN heterólogo con virus 1}}{\text{TN homólogo}}$$

El valor r varía entre 0 y 100%, siendo 100% cuando dos cepas son idénticas antigénicamente. Se considera que dos cepas están relacionadas antigénicamente cuando este valor es mayor a 50%.

Para medir la relación antigénica también se consideró la definición de Hesselink (1991): dos cepas (1 y 2) son del mismo serotipo cuando los títulos neutralizantes heterólogos (antisuero 1-virus 2, antisuero 2-virus 1) difieren menos de 20 veces de los títulos homólogos en ambas direcciones.

3.4.1.5. Relación antigénica entre GI-11 y GI-16 y las cepas vacunales norteamericanas

A través de ensayos de VN en una dirección (método beta) se estableció la relación antigénica entre las cepas UY/11/CA/18 y UY/09/CA/01, y las tres principales cepas vacunales norteamericanas: Connecticut, Arkansas y Massachusetts.

Para esto se incubaron diluciones seriadas en base 4 del suero con 10^3 CEID₅₀ de virus, y cada mix suero-virus fue inoculado en 5 huevos embrionados SPF. Se realizaron seis VN, utilizando los virus GI-11 y GI-16 y los sueros comerciales Massachusetts, Connecticut y Arkansas (Charles River). Los tres sueros comerciales se utilizaron con el mismo título homólogo.

3.4.2. Resultados

3.4.2.1. Aislamientos

El tercer pasaje de los aislamientos uruguayos GI-11 y GI-16 produjo lesiones características de IBV en los embriones: enanismo, alteraciones en las patas y plumas rizadas. En el caso de GI-11 se observó además hemorragia y muerte del embrión a los 5 o 6 días post-inoculación (Figura 20). En estos aislamientos no se detectó la presencia del genoma del Virus de Gumboro, Virus de la anemia infecciosa, Adenovirus aviar y Reovirus aviar.



Figura 20. Lesiones producidas por las cepas uruguayas GI-11 y GI-16 en embriones SPF.

3.4.2.2. Titulación

Las cepas GI-11 y GI-16 presentaron un título de $10^{10,5}$ CEID₅₀/mL y $10^{8,84}$ CEID₅₀/mL, respectivamente (Tablas 14 y 15).

Tabla 14. Cálculo del título viral (CEID₅₀/mL) de la cepa uruguaya GI-11 en huevos embrionados SPF por el método de Reed and Muench.

Log ₁₀ (Dilución)	Nº de embriones		Valor acumulado		Relación ^c	%	10 ^{10,5} CEID ₅₀ /mL
	Afectados	No Afectados	Afectados ^a	No Afectados ^b			
-5	5	0	25	0	25/25	100	
-6	5	0	20	0	20/20	100	
-7	5	0	15	0	15/15	100	
-8	5	0	10	0	10/10	100	
-9	3	2	5	2	5/7	71.4	
-10	2	3	2	5	2/7	28.6	

^aSumatoria de Nº de embriones Afectados desde la mayor dilución a la menor. ^bSumatoria de Nº de embriones No Afectados desde la menor dilución a la mayor. ^cRelación de Valor acumulado Afectados:Total de Valor Acumulado (Afectados + No Afectados).

Tabla 15. Cálculo del título viral (CEID₅₀/mL) de la cepa uruguaya GI-16 en huevos embrionados SPF por el método de Reed and Muench.

Log ₁₀ (Dilución)	Nº de embriones		Valor acumulado		Relación	%	10 ^{8,84} CEID ₅₀ /mL
	Afectados	No Afectados	Afectados	No Afectados			
-4	5	0	22	0	22/22	100	
-5	5	0	17	0	17/17	100	
-6	5	0	12	0	12/12	100	
-7	4	1	7	1	7/8	87.5	
-8	2	3	3	4	3/7	42.9	
-9	1	3	1	7	1/8	12.5	

3.4.2.3. Relación antigénica entre GI-11 y GI-16

Para realizar los ensayos de VN se seleccionó el suero de cada cepa que presentó mayor reactividad en el ELISA. El valor de A/P del mejor suero para GI-11 fue de 0,602, mientras que el de GI-16 fue de 0.403. Cada suero se enfrentó a su cepa homóloga y heteróloga a través de un ensayo de VN beta. Se realizaron controles negativos (huevos embrionados sin inocular) y positivos (huevos embrionados inoculados con 10³ CEID₅₀ de virus). Los resultados de las VN se muestran en la Figura 21, y los valores calculados de los títulos neutralizantes y el porcentaje de relación antigénica en la Tabla 16.

Según la definición de Hesselink, los virus GI-11 y GI-16 son serotipos diferentes porque los títulos neutralizantes heterólogos difieren en más de 20 veces de los títulos homólogos (en ambas direcciones).

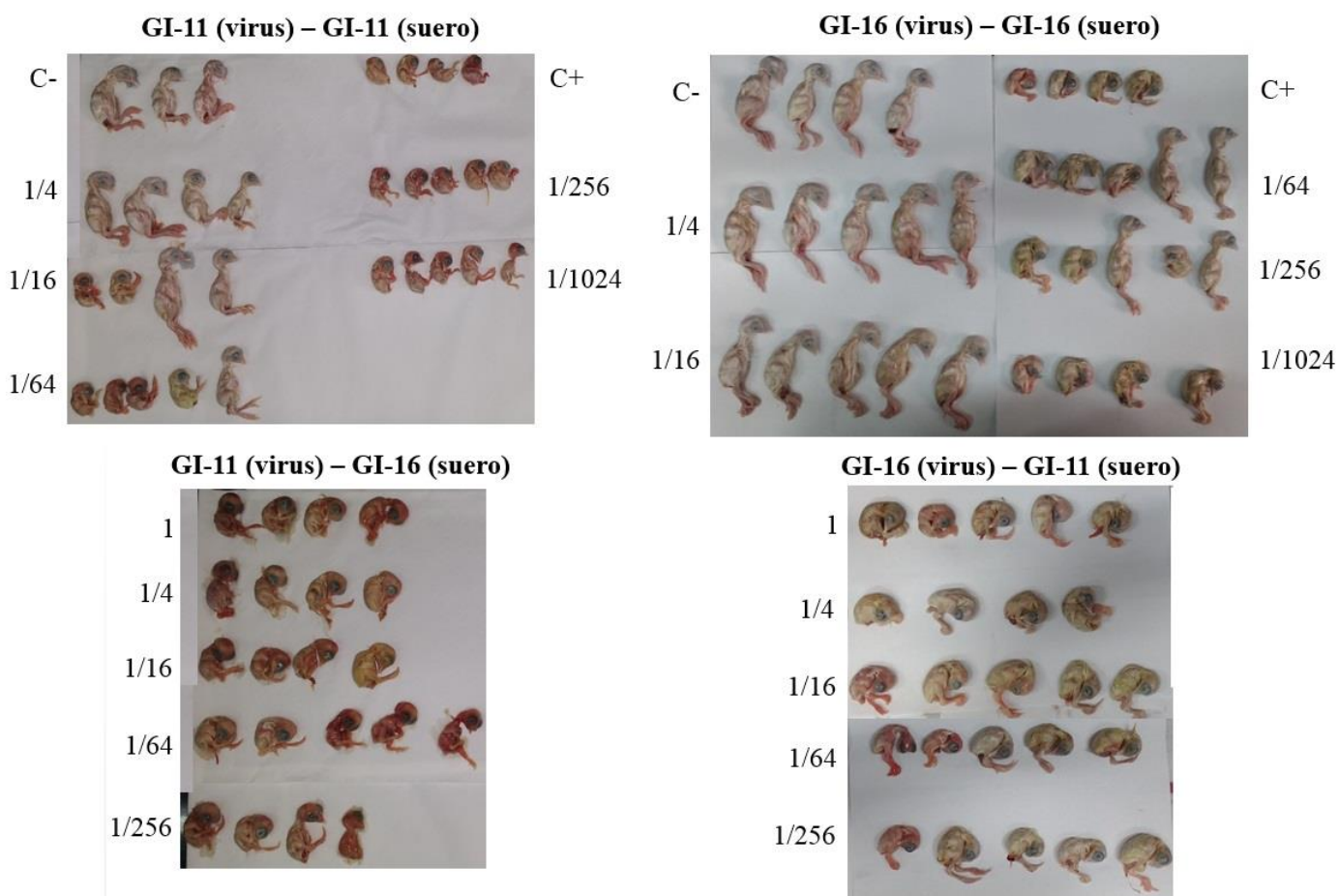


Figura 21. Ensayos de VN homólogas y heterólogas entre cepas uruguayas de los linajes GI-11 y GI-16.

Tabla 16. Valores de los títulos neutralizantes (TN) y del porcentaje de relación antigénica (r).

		SUERO	
		GI-11	GI-16
VIRUS	GI-11	22	<1
	GI-16	<1	85
r < 2,3%			

3.4.2.4. Relación antigénica entre GI-11 y GI-16 y las cepas vacunales de origen norteamericano.

En la Figura 22 se muestran los ensayos de VN en una dirección, utilizando los aislamientos virales titulados (GI-11 y GI-16) y los sueros comerciales Arkansas Connecticut y Massachusetts. En la Tabla 17 se muestran los títulos neutralizantes calculados para estas VN.

Figura 22. Ensayos de VN utilizando el virus GI-11 y los sueros comerciales Arkansas (A), Connecticut (B) y Massachusetts (C).

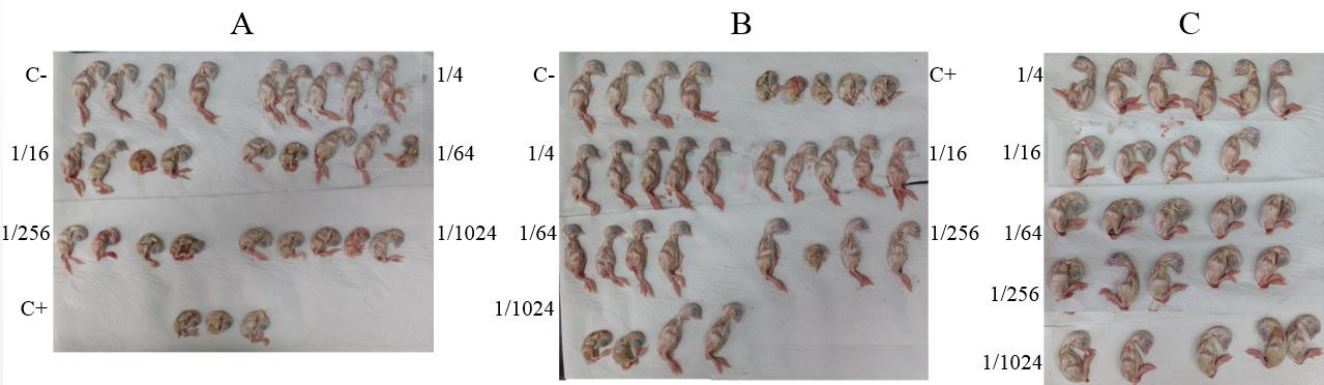


Figura 23. Ensayos de VN utilizando el virus GI-16 y los sueros comerciales Arkansas (A), Connecticut (B) y Massachusetts (C).

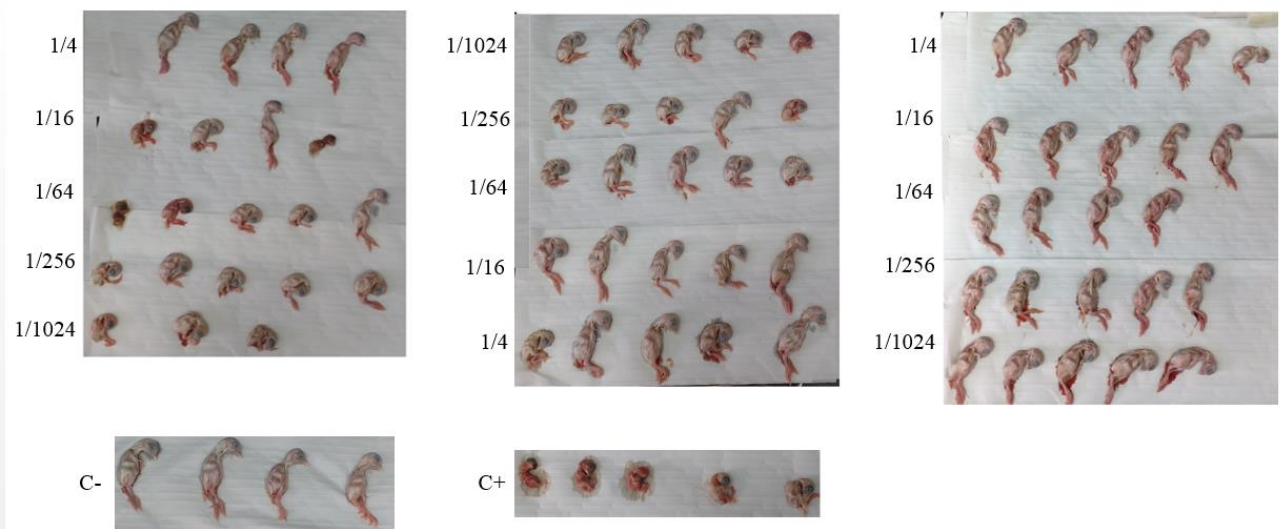


Tabla 17. Valores de los títulos neutralizantes entre los virus GI-11 y GI-16 y los sueros Arkansas, Connecticut y Massachusetts.

		SUERO		
		Arkansas	Connecticut	Massachusetts
VIRUS	GI-11	17	589	>1024
	GI-16	10	40	>1024

3.4.3. Discusión

Las cepas de IBV se pueden clasificar genéticamente en genotipos y linajes, mediante pruebas de protección en protectotipos, y antigénicamente en serotipos (De Wit, 2000).

La relación entre estas tres clasificaciones no está bien definida. En algunos casos el cambio de pocos aminoácidos de S1, particularmente aquellos que conforman los epítopes neutralizantes del virus, alcanza para variar el serotipo (Cavanagh et al., 1992), mientras que en otros casos la antigenicidad no cambia a pesar de variar muchos residuos. En general, cepas de diferentes serotipos no tienen protección cruzada. Esto se debe a que la inmunidad mediada por anticuerpos neutralizantes juega un papel relevante en los ensayos de protección cruzada, pero en menor medida también lo hace la respuesta inmune mediadas por células (Boots et al., 1992; Ignjatovic y Galli, 1995).

Suele pasar que una menor homología en la secuencia de S1 de dos cepas (por ejemplo, una vacuna y una cepa de campo) resulte en una menor protección cruzada (Cavanagh et al., 1997; Cook et al., 2001; Meir et al., 2004; Gelb et al., 2005; Abdel-Moneim et al., 2006; Ladman et al., 2006). Sin embargo, esta relación no siempre se cumple; existen cepas similares en la secuencia S1 que presentan un bajo nivel de protección cruzada (Meir et al., 2004; Abdel-Moneim et al., 2006), y cepas con alto nivel de protección cruzada que tienen una baja homología en la secuencia S1 (Meir et al., 2004) (Figura 24).

Las cepas de los linajes GI-11 y GI-16 tienen una baja homología en la secuencia de nucleótidos de S1, lo que sugería una baja relación antigénica, aunque este aspecto nunca había sido estudiado. Por primera vez en este trabajo se realizaron ensayos de virus neutralización entre cepas de estos linajes que revelaron que se tratan de serotipos diferentes y que comparten una muy baja relación antigénica. Este resultado tiene una implicancia importante en el control por vacunación de estas variantes, ya que seguramente se necesiten diferentes estrategias o planes de vacunación para controlar los dos linajes que co-circulan en nuestro continente.

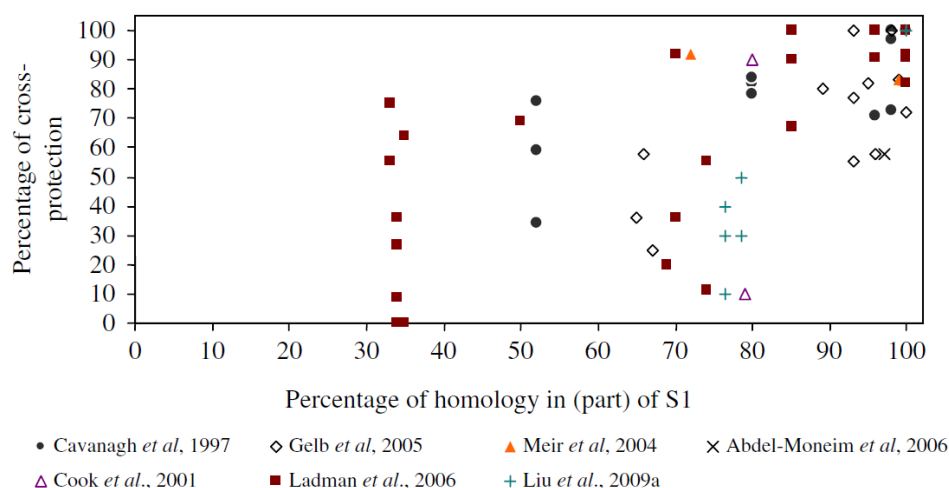


Figura 24. Correlación entre el porcentaje de homología de S1 y el nivel de protección cruzada entre cepas de IBV reportadas en siete publicaciones. Tomado de de Wit et al. (2011).

El análisis de los linajes GI-11 y GI-16 en Sudamérica es particularmente interesante ya que, a pesar de pertenecer a serotipos diferentes, son prácticamente idénticos en más del 94% de sus genomas y únicamente difieren en el ORF S. Estas diferencias antigénicas entre cepas con genomas tan semejantes no habían sido descritas anteriormente en IBV. Este hallazgo contrasta con el hecho de que, a pesar que la mayoría de los epitopes de los coronavirus se han mapeado en la proteína S, también ocurren en otras proteínas como en la proteína N de IBV (Boots et al., 1991; Boots et al., 1992; Seah et al., 2000), del coronavirus del pavo (Akin et al., 2001) y del coronavirus murino (Molenkamp & Spaan, 1997), y en la proteína M de IBV (Xing et al., 2009) y de los coronavirus porcino y bovino (Saif et al., 2012). Es evidente que la variabilidad en la proteína S es suficiente por sí sola, para explicar diferencias antigénicas notorias entre algunas cepas como las aquí estudiadas.

Estudios previos evaluaron la relación antigénica entre cepas de los linajes GI-11 y GI-16, y la cepa vacunal Massachusetts, a través de ensayos de virus neutralización cruzada. Ensayos realizados con dos aislamientos brasileños del linaje GI-11 y un antisero comercial derivado de la cepa Massachusetts, mostraron una baja relación antigénica entre estas variantes (Chacón et al., 2011). El mismo ensayo de virus neutralización realizado con un aislamiento asiático del linaje GI-16 (cepa CK/CH/LDL/97I), reveló también una baja relación antigénica entre esta variante y el serotipo Massachusetts (Yu

et al., 2001). Adicionalmente, se evaluó en pollos SPF, a través de morbilidad, mortalidad y re-aislamiento viral de las aves, la protección conferida por la cepa vacunal Massachusetts al desafío del aislado CK/CH/LDL/97I, y los resultados indicaron que esta vacuna no confiere protección contra la cepa desafío (Liu et al., 2009).

Sin embargo, hasta este trabajo no se había evaluado la capacidad de otros sueros vacunales de neutralizar a los serotipos GI-11 y GI-16. Hay diversas vacunas comerciales de IBV que se administran en la industria avícola mundial. Las principales cepas vacunales de origen norteamericano son Massachusetts, Connecticut, Arkansas y Delaware. Mientras que las de origen europeo y asiático son D274, D1466, QX y 793B.

En Uruguay, al igual que en la mayoría de los países sudamericanos, las vacunas atenuadas e inactivadas del serotipo Massachusetts son las únicas oficialmente autorizadas. Recientemente, en Argentina y Chile se incluyeron cepas del serotipo 793B en el plan de vacunación. No existen en el mercado vacunas con cepas atenuadas de los linajes GI-11 y GI-16.

Uno de los mayores inconvenientes en realizar ensayos de virus neutralización cruzada con cepas vacunales es la imposibilidad de ingresar a un país vacunas que no están autorizadas, así como cepas de campo que no circulen en la avicultura del país. Por este motivo realizamos ensayos de VN en una dirección, utilizando sueros vacunales comerciales de las principales vacunas de origen norteamericano, y las comparamos con las VN cruzadas Massachusetts-GI-11 y GI-16 ya realizadas (Chacón et al., 2011; Yu et al., 2001). Los resultados indicaron que todos los sueros testados presentan baja capacidad neutralizante contra cepas de los linajes GI-11 y GI-16, siendo esta capacidad incluso menor con los sueros Arkansas y Connecticut que con el Massachusetts. Por lo tanto, planes de vacunación con vacunas del serotipo Massachusetts, y particularmente con las del serotipo Connecticut o Arkansas, no son la opción más adecuada para controlar las infecciones causadas por ambos linajes Sudamericanos.

En base a estos resultados, es necesario evaluar la relación antigénica de los linajes GI-11 y GI-16 y otras vacunas comerciales disponibles en el mercado, como por ejemplo la del serotipo 793/B. En el caso de encontrar una vacuna relacionada antigénicamente con uno o ambos linajes sudamericanos también se debe considerar las ventajas y desventajas

de utilizar cepas heterólogas a las que circulan en el campo. La ventaja más importante es contar con una cepa atenuada comercial que se puede introducir en el mercado en un corto tiempo. La principal desventaja de la utilización de cepas heterólogas es que pueden actuar como donadoras o aceptoras de recombinación y generar nuevas variantes genéticas. En base a esto consideramos que es de gran importancia para la industria avícola de nuestro continente la atenuación de cepas de los linajes GI-11 y GI-16 para el desarrollo de nuevas vacunas.

3.5. Capítulo 5

Adaptación a embriones de pollos de dos cepas de los linajes GI-11 y GI-16

3.5.1. Metodología

3.5.1.1. Pasajes seriados

Se seleccionaron dos aislamientos de IBV, UY/11/CA/18 y UY/09/CA/01, pertenecientes a los linajes GI-11 y GI-16, respectivamente. Se realizaron un total de 80 pasajes seriados en huevos embrionados. Se inocularon 3 huevos embrionados por pasaje y cada pasaje tuvo una duración de 3 o 4 días. Todas las inoculaciones se realizaron con una dilución 1/10 del líquido alantoideo en PBS con antibióticos y antimicóticos.

Cada 10 pasajes se realizaron dos tipos de controles para corroborar la presencia y replicación viral y la adaptación al nuevo hospedero. Por un lado, se inocularon 3 embriones adicionales que se crecieron hasta los 7 días post-infección para la observación de lesiones características de IBV y mortalidad. Adicionalmente, se detectó la presencia del genoma viral en el líquido alantoideo a través de las RT-qPCR específicas para GI-11 y GI-16 desarrolladas en el capítulo 1. Este último ensayo también controlaba la posible contaminación cruzada entre las dos cepas.

3.5.1.2. Cambios nucleotídicos y aminoacídicos

Se secuenció el genoma completo de IBV en los pasajes 1 y 80 de cada cepa para analizar los cambios nucleotídicos y aminoacídicos derivados del proceso de adaptación a embriones de pollo. La purificación de las partículas virales se realizó por gradiente de sacarosa, y la secuenciación de los genomas mediante NGS, según la metodología detallada en el capítulo 3. Adicionalmente, se secuenció con la metodología de Sanger la región codificante de S1 cada 10 pasajes. Esta metodología se realizó según se detalló en el capítulo 2.

Después del ensamblaje y la edición de secuencias, se identificaron los cambios nucleotídicos y aminoacídicos en los genomas en los diferentes pasajes secuenciados.

Estos cambios genómicos se compararon con los reportados en trabajos anteriores (Ammayappan et al., 2009; Feng et al., 2015).

3.5.2. Resultados

3.5.2.1. Pasajes seriados

Se realizaron 80 pasajes de cada cepa. En los pasajes 10 y 20 de ambas cepas se observaron lesiones características de IBV a los 7 días post-inoculación: enanismo, alteraciones en las patas y plumas rizadas. En el caso de la cepa GI-11 se observó además hemorragia y a veces muerte del embrión a los 6 días post-inoculación. A partir del pasaje 28 de la cepa GI-11 y el 32 de la cepa GI-16 se comenzó a detectar mortalidad en los embriones después del día 4 o 5 post-inoculación. A partir del pasaje 39 de la cepa GI-11 y 47 de la cepa GI-16 se observó constantemente muerte del embrión en el día 3 post-inoculación (Figura 25).

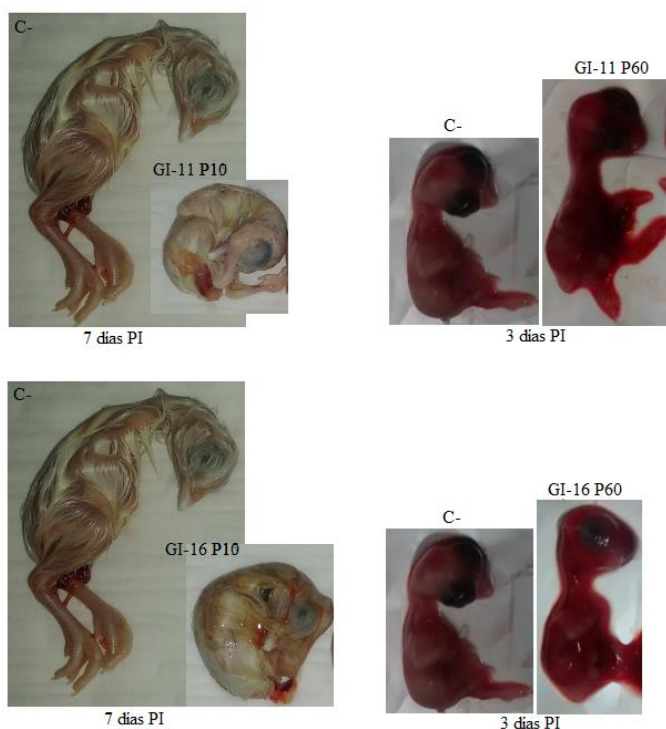


Figura 25. Lesiones observadas en los embriones en el pasaje 10 y 60 de cada cepa a los 7 y 3 días post-inoculación.

3.5.2.2. Cambios nucleotídicos y aminoacídicos

Después de 80 pasajes, se acumularon un total de 29 cambios nucleotídicos en el genoma de la cepa GI-11: 7 cambios sinónimos, 20 no-sinónimos y 2 no-codificantes. En el caso

de la cepa GI-16 se identificaron 35 cambios nucleotídicos, 9 sinónimos, 24 no-sinónimos y 2 no-codificantes (Tabla 18).

Tabla 18. Cambios nucleotídicos y aminoacídicos acumulados en los genomas de las cepas UY/11/CA/18 y UY/09/CA/01 después de 80 pasajes en huevos embrionados.

UY/11/CA/18			
Región	Posición nt	Cambio nt	Cambio aa
5 UTR	58	T – A	-
	343	A – T	-
ORF 1a	1182	T – G	F – L
	2380	G – C	D – H
	6288	G – T	E – D
	8541	G – A	-
	8990	A – G	H – Y
	8992	C – T	H – Y
	9737	C – T	S – F
	10532	C – T	T – I
	11402	C – T	T – I
ORF 1b	13849	A – G	E – G
	17529	C – T	H – Y
	20268	G – C	D – H
ORF S	20592	C – T	-
	20594	C – T	A – V
	20665	G – C	G – R
	20666	G – C	G – R
	20906	A – C	K – T
	21118	A – C	S – R
	22501	G – T	V – F
	22996	C – T	H – Y
	23154	C – T	-
	23539	G – A	A – T
ORF E	24277	C – T	S – F
	24437	C – T	-
ORF M	25046	A – T	Q – L

UY/09/CA/01			
Región	Posición nt	Cambio nt	Cambio aa
5 UTR	32	T - C	-
	76	T - C	-
ORF 1a	1425	C - T	-
	3349	G - A	V – I
	3745	G - A	V – I
	5025	T - C	-
	5720	C - T	A – V
	5804	C - T	T – I
	8334	T - C	-
	8457	A - G	-
	8511	C - T	-
	10768	G - A	V – I
	10899	G - A	-
	11686	G - A	E – K
	13061	G - T	L – F
ORF 1b	17553	C - T	H – Y
	18132	G - A	G – S
ORF S	20416	G - A	-
	20510	C - A	-
	20707	G - T	K – N
	20760	C - T	A – V
	20997	G - A	G – E
	21158	C - T	L – F
	21179	T - C	C – R
	21234	G - A	R – K
	21632	G - A	V – I
	21707	C - T	P – S
	21971	C - T	L – F
	22428	G - T	R – I
	22433	T - C	Y – H
ORF 3a	23990	T - C	-
ORF E	24292	C - T	S – F
ORF M	24551	T - C	Y – H
	25067	G - A	G – E
ORF N	26191	G - A	G – R

En ambas cepas, la mayoría de los cambios se concentran en los ORFs 1a, 1b y S, al igual de lo que se observa en las otras dos cepas de IBV cuyos genomas virulento y atenuado están secuenciado (Figura 26).



Figura 26. Se indican con puntos la posición nucleotídica en donde se observaron cambios no sinónimos en las cepas secuenciadas en esta tesis y en las cepas atenuadas YX10 (Feng et al., 2015) y ArkDPI (Ammayappan et al., 2009).

Por otro lado, se secuenció la región codificante de S1 cada 10 pasajes en las dos cepas uruguayas. En la cepa GI-11 se observaron cambios en 12 posiciones nucleotídicas, pero el 75% de estos cambios revierten al estado original en el siguiente pasaje secuenciado. En la cepa GI-16 se observaron cambios en 11 posiciones nucleotídicas, y en el 45% hubo una reversión (Tabla 19).

Tabla 19. Cambios nucleotídicos y aminoacídicos acumulados en los genomas de las cepas UY/11/CA/18 y UY/09/CA/01 cada 10 pasajes seriados en huevos embrionados. En color rojo se indican los cambios que reversion al estado original.

UY/11/CA/18 (GI-11)			
Pasaje	Posición nt	Cambio nt	Cambio aa
10	-	-	-
20	-	-	-
30	689	A - G	-
40	690	T - A	D - G
	691	T - A	-
	693	A - T	S - T
	698	A - G	K - R
50	281	C - T	A - V
	352	G - C	G - R
	353	G - C	G - R
	580	G - A	G - S
	593	A - C	K - T
	689	A - G	-
	690	T - A	G - D
	691	T - A	-
	693	A - T	T - S
	698	A - G	R - K
60	279	C - T	-
	281	T - C	V - A
	352	C - G	R - A
	580	A - G	S - G
	593	C - A	T - K
70	805	A - C	S - R
80	-	-	-

UY/09/CA/01 (GI-16)			
Pasaje	Posición nt	Cambio nt	Cambio aa
10	189	G - A	-
	283	G - C	G - R
	533	C - T	A - V
	770	G - A	G - E
	931	C - T	L - F
20	1007	G - A	R - K
30	-	-	-
40	283	C - A	-
	480	G - T	K - N
	587	A - C	A - D
	1007	A - G	K - R
	1405	G - A	V - I
	1480	C - T	P - S
50	283	A - C	-
	480	T - G	N - K
	587	C - A	D - A
	1007	G - A	R - K
	1405	A - G	I - V
	1480	C - T	P - S
60	1007	A - G	K - R
70	952	T - C	C - R
80	-	-	-

3.5.3. Discusión

Hay una amplia variedad de serotipos y linajes de IBV circulando en el mundo, y para muchos de ellos se han producido vacunas homólogas, en base a que el mejor efecto protector se logra con la inmunización con cepas vacunales homólogas a las cepas desafío (Hofstad, 1981; Feng et al., 2015). En la industria avícola sudamericana circulan dos serotipos principales (GI-11 y GI-16) y hasta la fecha no hay publicaciones relacionadas con la atenuación de cepas de estos serotipos.

La mayoría de las vacunas atenuadas de IBV se producen mediante sucesivos pasajes por cavidad alantoidea de huevos embrionados de 9 a 11 días de edad. La adaptación del virus para crecer en un nuevo ambiente provoca la pérdida de la virulencia en pollos adultos pero conserva su capacidad replicativa e inmunogénica. La atenuación de IBV puede ocurrir después de 50 a 110 pasajes en huevos embrionados (Ammayappan et al., 2009; Feng et al., 2015; Geerligs et al., 2011; Huang & Wang, 2006; Huang et al., 2007; Liu et al., 2009a; Liu et al., 2009b; Phillips et al., 2012). Un trabajo reciente estudió la atenuación de una cepa de IBV del linaje 19 después de 5, 25, 58, 75, 90 y 102 pasajes. La inoculación de los pasajes 75, 90 y 102 en pollos SPF no produjo patología en los animales infectados. Sin embargo se observó que el pasaje excesivo de esta cepa disminuye la inmunogenicidad, llevando a una baja protección; en los experimentos de protección con cepas homólogas los pollos inmunizados con el pasaje 102 mostraron tasas de morbilidad y mortalidad del 41,6% y 8,3%, respectivamente (Feng et al., 2015)

En la presente tesis realizamos 80 pasajes sucesivos en huevos embrionados de dos cepas uruguayas de IBV pertenecientes a los principales serotipos sudamericanos. Durante este proceso se observó como la virulencia en los embriones se incrementaba a medida que aumentó el número de pasaje (Figura 25). Se ha visto que la virulencia y patogenicidad de las cepas de IBV en embriones y pollos están estrechamente relacionadas con su nivel de pasaje. Los virus en los pasajes iniciales raramente causan la muerte de embriones, y a medida que los pasajes aumentan se visualizan lesiones más graves y muerte en los embriones y pérdida de la patogenicidad en los pollos adultos (Feng et al., 2015). Los aislamientos uruguayos adaptados a crecer en embrión de pollo pueden servir de vacunas para controlar los brotes de IBV en la industria avícola sudamericana. Para ello es

necesario comprobar la atenuación de las cepas mediante la inoculación del pasaje 80 de cada aislamiento en pollos SPF para demostrar la pérdida de patogenicidad. Previamente se debe encontrar un protocolo de infección adecuado con las cepas sudamericanas GI-11 y GI-16, ya que hasta la fecha no se ha podido reproducir síntomas característicos de IBV en infecciones experimentales con estas cepas.

Muchos estudios de atenuación y patogenicidad de IBV se han limitado al estudio de los cambios nucleotídicos y aminoacídicos asociados al gen S, ya que esta proteína cumple un papel importante en el tropismo tisular, la unión a la célula huésped y la inducción de anticuerpos neutralizantes (Huang & Wang, 2007; Liu et al., 2007). Otros trabajos solo relevan los cambios en los ORFs codificantes de las proteínas estructurales (Huang et al., 2007; Liu et al., 2009b). Relativamente pocos estudios han analizado los cambios en todo el genoma asociados a la atenuación de una cepa (Ammayappan et al., 2009; Feng et al., 2015; Phillips et al., 2012). En el presente trabajo se secuenció el genoma completo de los pasajes 1 y 80 de las cepas GI-11 y GI-16. Se encontraron cambios nucleotídicos y aminoacídicos a lo largo de todo el genoma, aunque la mayoría de los cambios se concentran en los ORFs 1a, 1b y S, al igual que sucede en otros genomas patogénicos y atenuados secuenciados (Figura 26). En el capítulo 3 ya se discutió como a través de experimentos de genética reversa se ha demostrado la importancia de estos ORFs en la patogenia y atenuación de los coronavirus (Cavanagh, 2007; Sperry et al., 2005), aunque no son los únicos ORFs determinantes (De Haan et al., 2002). Trabajos anteriores describieron que un alto porcentaje de los cambios en el ORF 1a de las cepas atenuadas se concentraban en la región codificante de la proteína no estructural nsp3 (Ammayappan et al., 2009; Phillips et al., 2012). Nsp 3 es una proteína compleja con múltiples dominios; tiene aproximadamente 1.600 aminoácidos de longitud y consta de un dominio ácido de función desconocida, un dominio ADP-ribosa fosfatasa, la proteasa viral PLpro y dominios transmembrana. En el caso de los genomas uruguayos adaptados a embriones de pollo también se observan cambios en la región nsp3, dos en la cepa GI-11 y cinco en la GI-16.

El análisis de los cambios nucleotídicos y aminoacídicos en S1 cada 10 pasajes reveló que la atenuación es un proceso altamente dinámico, basado en la gran capacidad de

cambio que tiene IBV. Los resultados indican que un alto porcentaje de los cambios revierten en el siguiente pasaje secuenciado (Tabla 19). Estos cambios son el resultado de la acción de la deriva genética y de las presiones selectivas que actúan sobre los residuos aminoacídicos. Los cambios revertantes podrían ser neutros y entonces la reversión es azarosa, o pueden volverse selectivamente negativos cuando se producen cambios en otros aminoácidos de S1 o en otras proteínas que interaccionan con S1 (cambios co-adaptados). En este estudio no detectamos un patrón en cuanto a la cantidad de cambios observados en los diferentes pasajes. En la cepa GI-16 la mayoría de los cambios no revertantes en S1 se dan en los primeros 10 pasajes, mientras que en la cepa GI-11 no se observa ningún cambio en los primeros 10 pasajes.

La identificación de cambios específicos involucrados en la atenuación de estas cepas requerirá una mayor investigación por genética reversa y estudios en animales para verificar la función exacta de las sustituciones aminoacídicas en el genoma del IBV. La identificación de los cambios asociados a la atenuación es fundamental para el desarrollo de vacunas de IBV más seguras mediante la modificación precisa de su genoma por genética reversa. Dichas vacunas deben ser genéticamente estables y sin reversión a la virulencia, con un buen potencial de inmunogenicidad y con posibilidad de administración in ovo, ya que las vacunas de IBV atenuadas en huevos embrionados son altamente virulentas para los embriones.

4. Conclusiones

- Se diseñaron, estandarizaron y validaron ensayos de RT-qPCR para la identificación de los principales linajes sudamericanos de IBV (GI-11 y GI-16) que mostraron alta especificidad, sensibilidad y muy buenos valores de desempeño analítico.
- En la industria avícola uruguaya únicamente circulan cepas del linaje GI-11 de IBV en los últimos 7 años. En cambio en Argentina co-circulan los linajes GI-11 y GI-16, siendo este último el predominante.
- El análisis de la secuencia completa de S1 de cepas del genotipo “B” argentino mostró que estas cepas pertenecen al linaje GI-11.
- Los protocolos de purificación viral y secuenciación de genomas completos de IBV estandarizados resultaron muy eficientes para obtener la secuencia genómica completa de diferentes aislamientos.
- La migración, recombinación y diferenciación local han tenido un rol importante en la evolución genómica de los dos principales linajes sudamericanos de IBV.
- Las secuencias genómicas de las cepas argentinas y uruguayas de los linajes GI-11 y GI-16 son extremadamente similares y difieren esencialmente en el ORF S.
- Las cepas argentinas y uruguayas del linaje GI-11 constituyen una forma recombinante circulante sudamericana que ha sido extremadamente exitosa.
- Esta forma recombinante no se extendió a Brasil, donde circulan cepas del linaje GI-11 con una historia evolutiva diferente.
- Se detectaron eventos de recombinación esporádicos (inter-linajes y con cepas vacunales) que no parecen tener un impacto evolutivo relevante.
- El virus recombinante esporádico GI-11-Massachusetts (UY/12/CA/24) presenta un tropismo preferencial por las células renales, a diferencia de las típicas cepas GI-11 uruguayas.
- Los linajes GI-11 y GI-16 son serotipos diferentes y comparten una muy baja relación antigénica, a pesar que son prácticamente idénticos en más del 94% de sus genomas.
- Los serotipos GI-11 y GI-16 tienen una muy baja relación antigénica con los serotipos vacunales Massachusetts, Arkansas y Connecticut.

- Se adaptaron cepas uruguayas de los serotipos GI-11 y GI-16 a crecer en embriones de pollos, las cuales podrían servir de vacunas atenuadas para controlar los brotes de IBV en la industria avícola sudamericana.
- Como resultado de esta adaptación a embriones de pollos se encontraron cambios nucleotídicos y aminoacídicos a lo largo de todo el genoma que se concentran en los ORFs 1a, 1b y S.

5. Perspectivas

- Continuar con el diagnóstico y caracterización de muestras de campo de IBV.
- Secuenciar y analizar más genomas completos de IBV de los linajes sudamericanos, incluyendo cepas del genotipo “B” argentino y nuevas del linaje GI-11, así como cepas de otros países de América del Sur.
- Adaptar cepas de los linajes GI-11 y GI-16 a cultivos celulares primarios (por ejemplo derivados de células de riñón de embrión de pollo) para facilitar estudios *in vitro* de estas cepas.
- Estudiar la dinámica poblacional de IBV a través de análisis de cuasiespecies en distintos tejidos.
- Analizar la relación antigénica existente entre los linajes GI-11 y GI-16 y otras cepas vacunales que no se incluyeron en esta tesis, por ejemplo la 793/B.
- Comprobar la atenuación de los aislamientos virales adaptados a embriones de pollo, mediante infecciones experimentales en pollos SPF.

6. Bibliografía

- Abdel-Moneim, A.S., El-Kady, M.F., Ladman, B.S., Gelb J. 2006. S1 gene sequence analysis of a nephropathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. *Virol J.* 3:78.
- Abolnik, C., 2015. Genomic and single nucleotide polymorphism analysis of infectious bronchitis coronavirus. *Infect Genet Evol.*, 32, 416–424.
- Abro, S. H., Renström, L. H. M., Ullman, K., Isaksson, M., Zohari, S., Jansson, D. S., Balak, S., Baule, C. 2012. Emergence of novel strains of avian infectious bronchitis virus in Sweden. *Veterinary Microbiology* 155(2-4), 237–246.
- Acevedo, A.M., Perera, C.L., Vega, A., Ríos, L., Coronado, L., Relova, D., Frías, M.T., Ganges, L., Núñez, J.I., Pérez, L.J. 2013. A duplex SYBR Green I-based real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of Massachusetts and non-Massachusetts serotypes of infectious bronchitis virus. *Mol. Cell. Probes* 27, 184–92.
- Adzhar, A., Gough, R. E., Haydon, D., Shaw, K., Britton, P., & Cavanagh, D. 1997. Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain. *Avian Pathology* 26(3), 625–640.
- Aho P. 2011. Lower input prices in 2012. En: *Broiler Economics*. Aviagen Poultry Bulletin 19.
- Akin, A., Lin, T., Wi, C., Bryan, T., Hooper, T., Schrader, D. 2001. Nucleocapsid protein gene sequence analysis reveals close genomic relationship between turkey coronavirus and avian infectious bronchitis virus. *Acta. Virol.* 45: 31-38.
- Alvarado, I.R., Villegas, P., Mossos, N., Jackwood, M.W. 2005. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Colombia during 2003. *Avian Dis.* 49:494-499.
- Alvarado, I.R., Villegas, P., El-Attrache, J., Jackwood, M.W. 2006. Detection of Massachusetts and Arkansas serotypes of infectious bronchitis virus in broilers. *Avian Dis.* 50:292-297.
- Ammayappan, A., Upadhyay, C., Gelb, J., Vakharia, V.N. 2008. Complete genomic sequence analysis of infectious bronchitis virus Ark DPI strain and its evolution by recombination. *Virol J.* 5:157.
- Andreasen, J., Jackwood, M., Hilt, D. 1991. Polymerase chainreaction amplification of the genome of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 35:216-220.
- Andrews, S., 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Armstrong, J., Niemann, H., Smeekens, S. 1984. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. *Nature.* 308:751-752.

- Basak, A., Zhong, M., Munzer, J.S., Chrétien, M., Seidah, N.G. 2001. Implication of the proprotein convertases furin, PC5 and PC7 in the cleavage of surface glycoproteins of Hong Kong, Ebola and respiratory syncytial viruses: a comparative analysis with fluorogenic peptides. *Biochem J.* 353:537-545.
- Berry, D., Cruickshank, J., Chu, H., Wells, R. 1964. The structure of infectious bronchitis virus. *Virology.* 23:403-407.
- Blankenberg, D., Gordon, A., Von Kuster, G., Coraor, N., Taylor, J., Nekrutenko, A., et al., 2010. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics*, 26(14), 1783–1785.
- Bochkov, Y.A., Batchenko, G.V., Shcherbakova, L.O., Borisov, A.V., Drygin, V.V. 2006. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. *Avian Pathol.* 35:379-393.
- Bochkov, Y.A., Tosi, G., Massi, P., Drygin, V.V. 2007. Phylogenetic analysis of partial S1 and N gene sequences of infectious bronchitis virus isolates from Italy revealed genetic diversity and recombination. *Virus Genes.* 351:65-71.
- Boots, A., Kusters, J., Van Noort, J., Zwaagstra, K., Rijke, E., Van der Zeijst, B., Hensen E. 1991. Localization of a T-cell epitope within the nucleocapsid protein of avian coronavirus. *Immunology.* 74:8-13.
- Boots, A., Benaissa, B., Hesselink, W., Rijke, E., Schrier, C., Hensen, E. 1992. Induction of anti-viral immune responses by immunization with recombinant-DNA encoded avian coronavirus nucleocapsid protein. *Vaccine.* 10:119-124.
- Bosch, B.J., van der Zee, R., de Haan, C.A., Rottier, P.J. 2003 *J Virol.* The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. 77:8801-8811.
- Bosshart, H., Humphrey, J., Deignan, E., Davidson, J., Drazba, J., Yuan, L., Oorschot, V., Peters, P.J., Bonifacino, J.S. 1994. The cytoplasmic domain mediates localization of furin to the trans-Golgi network en route to the endosomal/lysosomal system. *J Cell Biol.* 126:1157-1172.
- Brierley, I., Jenner, A., Inglis, S. 1992. Mutational analysis of the “slippery sequence” component of a coronavirus ribosomal frameshifting signal. *J Mol Biol.* 227:463-479.
- Brown, J.D., Stallknecht, D.E., Beck, J.R., Suarez, D.L., Swayne, D.E. 2006. Susceptibility of North American ducks and gulls to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *Emerg Infect Dis.* 12:1663-1670.
- Buh Gasparic, M., Cankar, K., Zel, J., Gruden, K. 2008. Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 8, 26.
- Bustin, S.A. 2004. Data analysis and interpretation. In: A–Z of Quantitative PCR. Bustin, S.A. (Ed.) International University Line, California, pp. 439–492.

- Callison, S.A., Hilt, D.A., Boynton, T.O., Sample, B.F., Robison, R., Swayne, D.E., Jackwood, M.W. 2006. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *J Virol Methods* 138:60-65.
- Cavanagh, D., Davis, P.J., Pappin, D.J., Binns, M.M., Boursnell, M.E., Brown, T.D. 1986. Coronavirus IBV: partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-Arg at the cleavage site of the spike precursor propolypeptide of IBV strains Beaudette and M41. *Virus Res.* 4:133-143.
- Cavanagh, D. & Davis, P.J. (1986). Coronavirus IBV: removal of spike glycopolypeptide S1 by urea abolishes infectivity and haemagglutination but not attachment to cells. *Journal of General Virology* 67, 1443-1448.
- Cavanagh, D., Davis, P. J., & Cook, J. K. (1992a). Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. *Avian Pathology* 21(3), 401–408.
- Cavanagh, D., Davis, P.J., Cook, J.K.A., Li, D., Kant, A. & Koch, G. (1992b). Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* 21(1), 33-43.
- Cavanagh, D., Naqui, S. 1997. Infectious Bronchitis. En: *Diseases of Poultry*, Tenth Edition. 511–526.
- Cavanagh, D., Elus, M.M., Cook, J.K. 1997. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathol.* 26:63-74.
- Cavanagh, D., K. Mawditt, A. Adzhar, R. E. Gough, J. P. Picault, C. J. Naylor, D. Haydon, K. Shaw, and P. Britton. 1998. Does IBV change slowly despite the capacity of the spike protein to vary greatly? *Adv Exp Med Biol.* 440:729-734.
- Cavanagh, D. 2003. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.* 32:567-582.
- Cavanagh, D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res.* 38:281-297.
- Cavanagh, D., & Gelb, J.B. 2008. Infectious bronchitis. In: *Diseases of poultry*. Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE (Ed.) Wiley-Blackwell Publishing, Iowa. pp. 117e35.
- Chacón, J., Nogueira, J., Assayag, M., Peloso, C., Pedroso, A., Piantino, A. 2011. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Pathol.* 40:153-162.
- Chen, H.W., Huang, Y.P., Wang, C.H. 2009. Identification of Taiwan and China-like recombinant avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. *Virus Res.* 140:121-129.
- Chen, H., Zhang, J., Ma, Y., Ma, L.N., Ding, Y., Liu, X., Cai, X., Ma, L., Zhang, Y., Liu, Y. 2010. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the rapid

- detection of infectious bronchitis virus in infected chicken tissues. *Mol. Cell. Probes* 24, 104–6.
- Chu, V.C., McElroy, L.J., Ferguson, A.D., Bauman, B.E., Whittaker, G.R. 2006. Avian infectious bronchitis virus enters cells via the endocytic pathway. *Adv Exp Med Biol.* 581:309-312.
- Cobb, S. P. 2011. The spread of pathogens through trade in poultry meat: overview and recent developments. *Revue Scientifique et Technique* 30(1), 149–64.
- Collisson, E.W., Pei, J., Dzielawa, J., Seo, S.H. 2000. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. *Dev Comp Immunol.* 24:187-200.
- Cologna, R., & Hogue, B. G. 1998. Coronavirus nucleocapsid protein. RNA interactions. *Advances in experimental medicine and biology* 440, 355–359.
- Cook, J., Orbell, S.J., Woods, M.A., Huggins, M.B.. 1996 A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated 4/91 (793B). *Vet Rec* 1996;138(8):178–80.
- Cook, J., Orbell, S.J., Woods, M.A., Huggins, M.B. 1999. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.* 28:477–485.
- Cook, J., Chesher, J., Baxendale, W., Greenwood, N., Huggins, M.B., Orbell, S.J. 2001. Protection of chickens against renal damage caused by a nephropathogenic infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 30:423-426.
- Cook, J., Jackwood, M., Jones, R.C. 2012. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* 41:239–250.
- Crinion, P., Ball, R., Hofstad, M. 1970. Pathogenesis of oviduct lesions in immature chickens following exposure to infectious bronchitis virus at one day old. *Avian Dis.* 14:32-41.
- Cubillos, A., Ulloa, J., Cubillos, V., Cook, J.K. 1991. Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. *Avian Pathol.* 20:85-99.
- de Groot, 2012. Family Coronaviridae. In *Virus Taxonomy*, 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Edited by A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens & E. J. Lefkowitz. San Diego, CA: Elsevier Academic Press. pp. 806–828.
- de Haan C.A., Masters P.S., Shen X., Weiss S., Rottier P.J. 2002 The group-specific murine coronavirus genes are not essential but their deletion by reverse genetics is attenuating in the natural host, *Virology*. 296:177–89.
- de Wit JJ. 2000. Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 29:71-93.

- de Wit, J. J., Cook, J. K. a, & van der Heijden, H. M. J. F. 2011. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathology* 40(3), 223–235.
- Desouzart O. 2009. La alta calidad de las carnes de aves y sus efectos en la evolución del mercado. V Intestinal Health Food Safety Seminar – Brasil.
- Di Fabio, J., Rossini, L.I., Orbell, S.J., Paul, G., Huggins, M.B., Malo, A., Silva, B.G., Cook, J.K. 2000. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. *Avian Dis.* 44:582-589.
- Dolz, R., Pujols, J., Ordóñez, G., Porta, R., Majo, N. 2008. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus in Spain over a fourteen year period. *Virology.* 374:50-59.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 29:1969-1973.
- Eckerle, L.D, Becker, M.M., Halpin, R.A., Li, K., Venter, E., Lu, X., Scherbakova, S., Graham, R.L., Baric, R.S., Stockwell, T.B., Spiro, D.J., Denison, M.R. 2010. Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLOS Pathog.* 6:e1000896.
- Eckerle, L.D., Lu, X., Sperry, S.M., Choi, L., Denison, M.R. 2007. High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exonuclease mutants. *J Virol.* 22:12135-12144.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797.
- Eleouet, J., Rasschaert, D., Lambert, P. 1995. Complete sequence (20 kilobases) of the polyprotein-encoding gene 1 of transmissible gastroenteritis virus. *Virology.* 206:817-822.
- Errea E. 2011. Carne aviar: situación y perspectivas. *Anuario OPYPA* 2011. 97-105. (<http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,7,594,O,S,0,MNU;E;66;8;MNU>)
- Fan, H., Ooi, A., Tan, Y. W., Wang, S., Fang, S., Liu, D. X., & Lescar, J. 2005. The nucleocapsid protein of coronavirus infectious bronchitis virus: crystal structure of its N-terminal domain and multimerization properties. *Structure* 13(12), 1859–1868.
- Fang, S.G., Shen, H., Wang, J., Tay, F.P., Liu, D.X.. 2008. Proteolytic processing of polyproteins 1a and 1ab between non-structural proteins 10 and 11/12 of Coronavirus infectious bronchitis virus is dispensable for viral replication in cultured cells. *Virology.* 2008. 379:175-80.
- FAO Statistical Yearbook. 2010. B10 - Producción de carne bovina, ovina y caprina; B11 - Producción de carne de cerdo y de pollo. (<http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/ess-yearbook2010/yearbook2010-production/es/>).

- Farsang, A., Ros, C., Renström, L. H. M., Baule, C., Soós, T., & Belák, S. 2002. Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain. *Avian Pathology* 31(3), 229–236.
- Felippe, P.A., da Silva, L.H., Santos, M.M., Spilki, F.R., Arns CW. 2010. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Dis.* 54:1191-1196.
- Franzo, G., Listorti, V., Naylor, C.J., Lupini, C., Laconi, A., Felice, V., et al., 2015. Molecular investigation of a full-length genome of a Q1-like IBV strain isolated in Italy in 2013. *Virus Res.*, 210, 77–80.
- Fu, K., & Baric, R. S. 1992. Evidence for variable rates of recombination in the MHV genome. *Virology* 189(1), 88–102.
- Gelb, J., Wolff, J., Moran, C. 1991. Variant Serotypes of Infectious Bronchitis Virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian Dis.* 35: 82-87.
- Gelb, J., Weisman, Y., Ladman, B.S., Meir, R.. 2005. S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). *Avian Pathol.* 34:194-203.
- Gelb, J., Jackwood, M. 2008. Infectious Bronchitis. In DE Swayne (ed.). *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*, 5th ed. American Association of Avian Pathologists (pp. 146-149). Athens, USA.
- Ginzinger, D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* 30, 503–12.
- Godet, M., Grosclaude, J., Delmas, B., Laude, H. 1994. Major receptor-binding and neutralization determinants are located within the same domain of the transmissible gastroenteritis virus (coronavirus) spike protein. *J Virol.* 68:8008-8016.
- Godet, M., L'Haridon, R., Vautherot, J., Laude, H. 1992. TGEV coronavirus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology.* 188:666-675.
- Goecks, J., Nekrutenko, A., Taylor, J., 2010. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.*, 11(8), R86.
- Gorbalenya, A., Donchenko, A., Blinov, V., Koonin, E. 1989. Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold. *FEBS Lett.* 243:103-114.
- Goryo, M., Umemura, T., Itakura, C. 1984. Concurrence of nephrosis-nephritis due to infectious bronchitis virus and infectious bursal disease in broiler chickens. *Avian Pathol.* 13:191-200.
- Gough, R.E., Randall, C.J., Dagless, M., Alexander, D.J., Cox, W.J., Pearson, D. 1992. A “new” strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Vet Rec.* 130:493-494.

- Guindon, S., & Gascuel, O. 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology* 52(5), 696–704.
- Han, Z., Sun, C., Yan, B., Zhang, X., Wang, Y., Li, C., Zhang, Q., Ma, Y., Shao, Y., Liu, Q., Kong, X., Liu, S. 2011. A 15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious bronchitis coronavirus in China. *Infect Genet Evol.* 11:190-200.
- Hesselink, W.G. 1991. Serotyping avian infectious bronchitis virus: selection of a unified method. In E.F. Kaleta & U. Heffels-Redmann (Eds.). *Proceedings of the 2nd International Symposium on Infectious Bronchitis* (pp. 87-97). Rauschholzhausen, Germany.
- Hidalgo, H., Gallardo, R., Toro, H. 1986. Antigenic and pathogenic properties of 3 isolates of infectious bronchitis virus recovered from inoculated birds. *Zentralbl Veterinarmed B.* 331:26-35.
- Hidalgo, H., Gallardo, R., & Rosende, S. 1976. Isolation of infectious bronchitis virus from broiler chickens in Chile. *Avian Diseases* 20(3), 601–603.
- Hipólito, O. 1957. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. *Arquivo Escola Veterinária Universidade de Minas Gerais.* 10:131-151.
- Hiscox, J. A., Wurm, T., Wilson, L., Britton, P., Cavanagh, D., & Brooks, G. 2001. The Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Nucleoprotein Localizes to the Nucleolus. *Journal of Virology* 75(1), 506–512.
- Hofstad, M.S. 1981. Cross-immunity in chickens using seven isolates of avian infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 25(3):650–4, 1981-07-01.[20]
- Hosseini, P., Sokolow, S. H., Vandegrift, K. J., Kilpatrick, a M., & Daszak, P. 2010. Predictive power of air travel and socio-economic data for early pandemic spread. *PloS one* 5(9), e12763.
- Huang, Y.P., Lee, H.C., Cheng, M.C., Wang, C.H. 2004. S1 and N gene analysis of avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. *Avian Dis.* 48:581-589.
- Huang, Y., Lau, S., Woo, P., Yuen, K. 2008. CoVDB: a comprehensive database for comparative analysis of coronavirus genes and genomes. *Nucleic Acids Res.*, 36, 504–511.
- Ignjatovic, J. & Galli, L. 1994. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. *Arch virol.* 138:117-134.
- Ignjatovic, J., Sapats, S. 2000. Avian infectious bronchitis virus. *Rev Sci Tech.* 19:493-508.
- Ignjatovic, J., Sapats, S. 2005. Identification of previously unknown antigenic epitopes on the S and N proteins of avian infectious bronchitis virus. *Arch Virol.* 150:1813-1831.

- Ignjatovic, J., Gould, G., Sapats, S. 2006. Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. *Arch Virol.* 151:1567-1585.
- Isakov, O., Bordería, A.V., Golan, D., Hamenahem, A., Celniker, G., Yoffe, L., et al., 2015. Deep sequencing analysis of viral infection and evolution allows rapid and detailed characterization of viral mutant spectrum. *Bioinformatics*, 31(13), 2141–2150.
- Jackwood, M. W., Hilt, D. A., Callison, S. A., Lee, C. W., Plaza, H., & Wade, E. 2001. Spike glycoprotein cleavage recognition site analysis of infectious bronchitis virus. *Avian Diseases* 45(2), 366–372.
- Jia, W., Karaca, K., Parrish, C.R., Naqi, S.A. 1995. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Arch Virol.* 140:259-271.
- Kant, A., Koch, G., van Roozelaar, D. J., Kusters, J. G., Poelwijk, F. a, & van der Zeijst, B. A. 1992. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolypeptide. *Journal of General Virology* 73(3), 591–596.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30(14), 3059–3066.
- Keelapang, P., Sriburi, R., Supasa, S., Panyadee, N., Songjaeng, A., Jairungsri, A., Puttikhunt, C., Kasinrerk, W., Malasit, P., Sittisombut, N. 2004. Alterations of pr-M cleavage and virus export in pr-M junction chimeric dengue viruses. *J Virol.* 78:2367-2381.
- Kinde, H., Daft, B., Castro, A., Bickford, A., Gelb, J., Reynolds, J. 1991. Viral pathogenesis of a nephrotropic infectious bronchitis virus isolated from commercial pullets. *Avian Dis.* 35:415-421.
- Kottier, S.A., Cavanagh, D., Britton, P. 1995. Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology.* 213:569-80.
- Krueger F., 2012. Trim Galore. Babraham Bioinformatics. http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/
- Kumar, S., Reed, M. W., Gamper Jr, H. B., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Foti, M., West, J., Meyer Jr, R. B., Schweitzer, B. I. 1998. Solution structure of a highly stable DNA duplex conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 26, 831-838.
- Kusters, J.G., Jager, E.J., Niesters, H.G., van der Zeijst, B.A. 1990. Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Vaccine.* 8:605-608.

- Ladman, B.S., Loupos, A.B., Gelb. 2006. Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. *Avian Pathol.* 35:127-133.
- Lai, M., Cavanagh, C.. 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res.* 48:1-100.
- Lauber, C., Gorbalenya, A.E. 2012. Partitioning the genetic diversity of a virus family: approach and evaluation through a case study of picornaviruses. *J. Virol.* 86:3890-3904.
- Lee, C.W. & Jackwood, M.W. 2000. Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV. *Arch Virol.* 145:2135-2148.
- Lefevre, P., Lett, J.M., Reynaud, B., Martin, D.P. 2007. Avoidance of protein fold disruption in natural virus recombinants. *PLoS Pathog.*, 3(11), e181.
- Liu, S., Z. Han, J. Chen, X. Liu, Y. Shao, X. Kong, G. Tong, J. Rong. 2007. *Avian Pathol* 36, 231–234.
- Liu, D., Inglis, S. 1992. Internal entry of ribosomes on a tricistronic mRNA encoded by infectious bronchitis virus. *J Virol.* 66:6143-6154.
- Liu, S., Chen, J., Chen, J., Kong, X., Shao, Y., Han, Z., Feng, L., Cai X, Gu S, Liu M. 2005. Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (*Pavo cristatus*) and teal (*Anas*). *J Gen Virol.* 86:719-725.
- Liu, S., & Kong, X. 2004. A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. *Avian Pathology* 33(3), 321–327.
- Liu, S. W., Zhang, Q. X., Chen, J. D., Han, Z. X., Liu, X., Feng, L., Shao, Y., Rong, J., Kong, X., Tong, G. Z. 2006. Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. *Archives of Virology* 151(6), 1133–1148.
- Liu, S., Zhang, X., Wang, Y., Li, C., Han, Z., Shao, Y., Li, H., Kong, X. 2009a. Molecular characterization and pathogenicity of infectious bronchitis coronaviruses: complicated evolution and epidemiology in china caused by cocirculation of multiple types of infectious bronchitis coronaviruses. *Intervirology* 52(4), 223–234.
- Liu, S., Zhang, X., Wang, Y., Li, C., Liu, Q., Han, Z., Zhang, Q., Kong, X., Tong, G. 2009b. Evaluation of the protection conferred by commercial vaccines and attenuated heterologous isolates in China against the CK/CH/LDL/97I strain of infectious bronchitis coronavirus. *Veterinary Journal* 179(1), 130–136.
- Lu, X., Lu, Y., Denison, M. 1996. Intracellular and in vitro-translated 27-kDa proteins contain the 3C-like proteinase activity of the coronavirus MHV-A59. *Virology.* 222:375-382.

- Marandino, A. 2014 Diagnóstico y caracterización genética del virus de la bronquitis infecciosa aviar en la industria avícola regional. Tesis de maestría. PEDECIBA Biología. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/handle/123456789/4029>
- Martin, D.P., Lemey, P., Posada, D. 2011. Analysing recombination in nucleotide sequences. *Mol Ecol Resour.* 11:943-955.
- Martin, D.P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., Muhire, B. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.*, 1(1), vev003.
- Mase, M., Inoue, T., Yamaguchi, S., Imada, T. 2008. Existence of avian infectious bronchitis virus with a European-prevalent 4/91 genotype in Japan. *J Vet Med Sci.* 70:1341-1344.
- Masters, P.S. 2006. The molecular biology of Coronavirus. *Adv Virus Res.* 63:153-292.
- McKinley, E. T., Jackwood, M. W., Hilt, D. A., Kissinger, J. C., Robertson, J. S., Lemke, C., & Paterson, A. H. 2011. Attenuated live vaccine usage affects accurate measures of virus diversity and mutation rates in avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virus Research* 158(1-2), 225–234.
- Meir, R., Rosenblut, E., Perl, S., Kass, N., Ayali, G., Perk, S., Hemsani, E. 2004. Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. *Avian Dis.* 48:635-641.
- Meulemans, G., Boschmans, M., Decaesstecker, M., Berg, T.P., Denis, P., Cavanagh, D. 2001. Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986 to 1995. *Avian Pathol.* 30:411-421.
- Mockett, A.P., Cavanagh, D., Brown, T.D. 1984. Monoclonal antibodies to the S1 spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M41. *J Gen Virol.*, 65(12), 2281–2286.
- Molenkamp, R. and Spaan, W.J. 1997. Identification of a specific interaction between the coronavirus mouse hepatitis virus A59 nucleocapsid protein and packaging signal. *Virology.* 239: 78-86.
- Molloy, S.S., Thomas, L., VanSlyke, J.K., Stenberg, P.E., Thomas, G. 1994. Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J.* 13:18-33.
- Mondal, S.P., Cardona, C.J. 2007. Genotypic and phenotypic characterization of the California 99 (Cal99) variant of infectious bronchitis virus. *Virus Genes*, 34(3), 327–341.
- Montassier, M., Brentano, L., Richtzenhain, L.J., Montassier, H.J. 2006. Genetic diversity on S1 glycoprotein of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Brazil between 1988-2000. In U. Heffels-Redmann & E.F. Kaleta (Eds.). *Proceedings of the Vth International Symposium on Corona- and Pneumovirus Infections* (pp. 119-131). Rausholzhausen, Germany.

- Moore, K., Jackwood, M., Hilt, D.A. 1997. Identification of amino acids involved in a serotype and neutralisation specific epitope within the S1 subunit of avian infectious bronchitis virus. *Arch Virol.* 142:2249-2256.
- Munner, M., Newman, J., Halvorsen, D., Siva-Nandan, V., Com, C. 1987. Effect of Avian Infectious Bronchitis Virus (Arkansas strain) on vaccinated laying chickens. *Avian Dis.* 31: 820-828.
- Naguib, M.M., Hoper, D., Arafa, A.S., Setta, A.M., Abed, M., Monne, I., et al., 2016. Full virus from Sudan reveals distinct spots of recombination. *Infect Genet Evol.*, 46, 42–49.
- Naqui, S., Thompson, G., Rauman, R., Mohammed, H. 2001. The Exacerbating effect of infectious bronchitis virus infection on the infectious bursal disease virus induced suppression of opsonization by *Escherichia coli* antibody in chickens. *Avian Dis.* 45:52-62.
- Navas S., Weiss S.R. 2003. Murine coronavirus-induced hepatitis: JHM genetic background eliminates A59 spike-determined hepatotropism, *J. Virol.* 77:4972–4978.
- Pérez, R., Calleros, L., Marandino, A., Sarute, N., Iraola, G., Grecco, S., et al. 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.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7), 1253–1256.
- Qian, D.H., Zhu, G.J., Wu, L.Z., Hua, G.X. 2006. Isolation and characterization of a coronavirus from pigeons with pancreatitis. *Am J Vet Res.* 67:1575-1579.
- Quinteros, J.A., Markham, P.F., Lee, S.W., Hewson, K.A., Hartley, C.A, Legione, A.R., et al. 2015. Analysis of the complete genomic sequences of two virus subpopulations of the Australian infectious bronchitis virus vaccine VicS. *Avian Pathol.*, 44(3), 182–191.
- Rambaut, A., 2012. FigTree version 1.4.0. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Reddy, V., Theuns, S., Roukaerts, I., Zeller, M., Matthijnsens, J., Nauwynck, H.J.. 2015. Genetic characterization of the Belgian nephropathogenic infectious bronchitis virus (NIBV) reference strain B1648. *Viruses*, 7(8), 4488–4506.
- Rimondi, A., Craig, M., Vagnozzi, A., König, G., Delamer, M., Pereda, A. 2009. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001-2008). *Avian Pathol.* 38:149-153.
- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., et al., 2011. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.*, 29(1), 24–26.

- Roh, H.J., Hilt, D.A., Williams, S.M., Jackwood, M.W. 2013. Evaluation of infectious bronchitis virus Arkansas-type vaccine failure in commercial broilers. *Avian Dis.* 57, 248–59.
- Roh, H.J., Hilt, D.A., Jackwood, M.W. 2014. Detection of infectious bronchitis virus with the use of real-time quantitative reverse transcriptase-PCR and correlation with virus detection in embryonated eggs. *Avian Dis.* 58, 398–403.
- Saito, T., Munakata, Y., Fu, Y., Fujii, H., Koder, T., Miyagawa, E., Ishii, K., Sasaki, T. 2003. Evaluation of anti-parvovirus B19 activity in sera by assay using quantitative polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 107:81-87.
- Salanueva, I., Carrascosa, J., Risco, C. 1999. Structural maturation of the transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Virol.* 73:7952-7964.
- Seah, J., Yu, L., Kwang, J. 2000. Localisation of linear B-cell epitopes on infectious bronchitis virus nucleocapsid protein. *Vet Microbiol.* 75:11-16.
- Seo, S., Wang, L., Smith, R., & Collisson EW. 1997. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection. *Journal of Virology* 71(10), 7889-7894.
- Shalk, A. & Hawn, M. 1931. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J Am Vet Med Assoc.* 78:413.
- Simon-Loriere, E., Holmes, E.C. 2011. Why do RNA viruses recombine? *Nat Rev Microbiol.* 9:617-26.
- Sjaak de Wit, J.J., Cook, J.K. a, van der Heijden, H.M.J.F. 2011. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 40, 223–35.
- Sperry S., Kazi L., Graham R., Baric B., Weiss S., Denison M. 2005. Single amino acid substitutions in non-structural ORF1BNSP14 and ORF2a 30 kDa proteins of the murine coronavirus MHV-A59 are attenuating in mice, *J. Virol.* 79:3391–3400.
- Stern, D. F., & Sefton, B. M. 1982. Coronavirus proteins: biogenesis of avian infectious bronchitis virus virion proteins. *Journal of Virology* 44(3), 794–803.
- Stöver, B. C., & Müller, K. F. 2010. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC bioinformatics* 11, 7.
- Subbiah, M., Khatrar, S.K., Collins, P.L., Samal, S.K. 2011. Mutations in the fusion protein cleavage site of avian paramyxovirus serotype 2 increase cleavability and syncytium formation but do not increase viral virulence in chickens. *J Virol.* 85:5394-5405.
- Sun, L., Zhang, G.H., Jiang, J.W., Fu, J.D., Ren, T., Cao, W.S., Xin, C.A., Liao, M., Liu, W.J. 2007. A Massachusetts prototype like coronavirus isolated from wild peafowls is pathogenic to chickens. *Virus Res.*130:121-128.

- Tahara, S., Dietlin, T., Bergmann, C. 1994. Coronavirus translational regulation: Leader affects mRNA efficiency. *Virology*. 202:621-630.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–9.
- Tangudu, C., Olivares, H., Netland, J., Perlman, S., Gallagher, T. 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 6 accelerates murine coronavirus infections. *J Virol.*, 81(3), 1220–1229.
- Thiel, V., Siddell, S. 1994. Internal ribosome entry in the coding region of murine hepatitis virus mRNA 5. *J Gen Virol.* 75:3041-3046.
- Thor, S.W., Hilt, D.A, Kissinger, J.C., Paterson, A.H., Jackwood, M.W. 2011. Recombination in avian gamma-coronavirus infectious bronchitis virus. *Viruses*, 3(9), 1777–1799.
- Tibbles, K., Brierley, I., Cavanagh, D., Brown, T. 1996. Characterization in vitro of an autocatalytic processing activity associated with the predicted 3C-like proteinase domain of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J Virol.* 70:1923-1930.
- Toffan, A., Bonci, M., Bano, L., Bano, L., Valastro, V., Vascellari, M., Capua, I., Terregino, C. 2013. Diagnostic and clinical observation on the infectious bronchitis virus strain Q1 in Italy. *Vet. Ital.* 49, 347–55.
- Tomás, G., Hernández, M., Marandino, A., Panzera, Y., Maya, L., Hernández, D., Pereda, A., Banda, A., Villegas, P., Aguirre, S., Pérez, R., 2012. Development and validation of a TaqMan-MGB real-time RT-PCR assay for simultaneous detection and characterization of infectious bursal disease virus. *J. Virol. Methods* 185:101–107.
- Toro, H., Santen, V. L. Van, Jackwood, M. W., Santen, A. C. V. L. Van, & B, M. W. J. 2012. Genetic Diversity and Selection Regulates Evolution of Infectious Bronchitis Virus. *Avian Diseases* 56(3), 449–455.
- USDA. 2014. Livestock and poultry: world markets and trade. <http://www.fas.usda.gov/data/livestock-and-poultry-world-markets-and-trade>
- Valastro, V., Holmes, E.C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M.W., Cattoli, G., et al., 2016. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infect Genet Evol.*, 39, 349–64.
- van Santen, V.L., Kaltenboeck, B., Joiner, K.S., Macklin, K.S., Norton, R.A. 2004. Real-time quantitative PCR-based serum neutralization test for detection and titration of neutralizing antibodies to chicken anemia virus. *J Virol Methods.* 1152:123-135.
- van Boheemen, S., de Graaf, M., Lauber, C., Bestebroer, T.M., Raj, V.S., Zaki, A.M., Osterhaus, A.D., Haagmans, B.L., Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J., Fouchier, R.A. 2012. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio.* 3:e00473-12.

- Vennema, H., Godeke, G., Rossen. 1996. Nucleocaps envelope protein genes. *EMBO J.* 15:2020-2028.
- Vennema, H., Heijnen, L., Zijderveld, A., Horzinek, M.C., Spaan, W.J.M. 1990. Intracellular transport of recombinant coronavirus spike proteins: Implications for virus assembly. *J Virol.* 64:339-346.
- Vigerust, D.J., Shepherd, V.L. 2007. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends Microbiol.* 15:211-218
- Villarreal, L.Y., Brandão, P.E., Chacón, J.L., Saldenberg, A.B., Assayag, M.S., Jones, R.C., Ferreira, A.J. 2007. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. *Avian Dis.* 51:974-978.
- Wang, L., Junker, D., Collisson, E.W. 1993. Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Virology.* 192:710-716.
- Wang, C., Hsieh, M., Chang, P. 1996. Isolation, pathogenicity, and H-120 protection efficacy of Infectious Bronchitis Viruses isolated in Taiwan. *Avian Dis.* 40:620-625.
- Wang, S. Sundaram, J.P., Spiro, D. 2010. VIGOR, an annotation program for small viral genomes. *BMC Bioinformatics.* 11:451.
- Weiss, S., Navas, S. 2005. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Bio Rev.* 69:635-664.
- Wickramasinghe, I.N., de Vries, R.P., Gröne, A., de Haan, C.A., Verheije, M.H. 2011. Binding of avian coronavirus spike proteins to host factors reflects virus tropism and pathogenicity. *J Virol.* 85:8903-8912.
- Williams, A., Wang, L., Sneed, L., Collisson, E. 1992. Comparative analysis of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. *Virus Res.* 25:213-222.
- Winter, C., Herrler, G., Neumann, U. 2008. Infection of the tracheal epithelium by infectious bronchitis virus is sialic acid dependent. *Microbes Infect.* 10:367-373.
- Winter C, Weß S, Cavanagh D, Neumann U, Herrler G. 2006. Sialic acid is a receptor determinant for infection of cells by avian Infectious bronchitis virus. *J Gen Virol.* 87:1209-1216.
- Winterfield R, Hitchner S. 1962. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am J Vet Res.* 23:1273-1279.
- Worthington KJ, Currie RJ, Jones RC. 2008. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathol.* 37:247-57.
- Xu, G., Liu, X.Y., Zhao, Y., Chen, Y., Zhao, J., Zhang, G.Z. 2016. Characterization and analysis of an infectious bronchitis virus strain isolated from southern China in 2018. *Virol J.* 13, 40.

- Ye, Z.D., Wong, C.K., Li, P., Xie, Y. 2010. The role of SARS-CoV protein, ORF-6, in the induction of host cell death. *Hong Kong Med J.*, 16(4), 22–26.
- Yu L, Jiang Y, Low S, Wang Z, Nam SJ, Liu W, Kwangac J. 2001. Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis.* 452:416-424.
- Zwaagstra K, van Der Zeijst B, Austers J. 1992. Rapid detection and identification of avian infection bronchitis virus. *J Clin Microbiol.* 30:79-84.



Development of RT-qPCR assays for the specific identification of two major genotypes of avian infectious bronchitis virus



Ana Marandino^a, Gonzalo Tomás^a, Martín Hernández^a, Yanina Panzera^a,
María Isabel Craig^b, Ariel Vagnozzi^b, Federico Vera^c, Claudia Techera^a, Sofía Grecco^a,
Alejandro Banda^d, Diego Hernández^a, Ruben Pérez^{a,*}

^a Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

^b Instituto de Virología, CICVyA, INTA-Castelar, CC 25 (1712) Castelar, Buenos Aires, Argentina

^c Laboratorio Sanidad Aviar, INTA- E.E.A, Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina

^d Poultry Research and Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, Pearl, MS 39288, USA

A B S T R A C T

Article history:

Received 20 January 2016

Received in revised form 10 May 2016

Accepted 11 May 2016

Available online 12 May 2016

Keywords:

Infectious bronchitis

IBV

RT-qPCR

Genotype

Infectious bronchitis virus (*Gammacoronavirus*, *Coronaviridae*) is a genetically variable RNA virus (27.6 kb) that causes one of the most persistent respiratory disease in poultry. The virus is classified in genotypes with different epidemiological relevance and clinical implications. The present study reports the development and validation of specific RT-qPCR assays for the detection of two major IBV genotypes: South America I (SAI) and Asia/South America II (A/SAII). The SAI genotype is an exclusive and widespread South American lineage while the A/SAII genotype is distributed in Asia, Europe and South America. Both identification assays employ TaqMan probes that hybridize with unique sequences in the spike glycoprotein gene. The assays successfully detected all the assessed strains belonging to both genotypes, showing high specificity and absence of cross-reactivity. Using serial dilutions of in vitro-transcribed RNA we obtained acceptable determination coefficients, PCR efficiencies and relatively small intra- and inter-assay variability. The assays demonstrated a wide dynamic range between 10^1 – 10^7 and 10^2 – 10^7 RNA copies/reaction for SAI and A/SAII strains, respectively. The possibility to characterize a large number of samples in a rapid, sensitive and reproducible way makes these techniques suitable tools for routine testing, IBV control, and epidemiological research in poultry.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Infectious bronchitis (IB) is still one of the most persistent respiratory diseases of chickens despite intensive control and research efforts that have been made since its first description in 1931 (Shalk and Hawn, 1931). Notable, in regions where there is no highly pathogenic avian influenza virus or velogenic Newcastle disease virus, IBV is the cause of the major economic losses to the poultry industry (Cook et al., 2012).

The etiologic agent of IB is the infectious bronchitis virus (IBV) belonging to the genus *Gammacoronavirus* within the *Coronaviridae* family (de Groot, 2012). IBV has a positive-sense single-stranded RNA viral genome (27.6 kb) that encodes four structural proteins: the spike glycoprotein, the membrane glycoprotein, the envelope protein, and the phosphorylated nucleocapsid protein (Stern and

Sefton, 1982). The spike glycoprotein (S) is post-translationally cleaved into the amino-terminal S1 and carboxyl-terminal S2 subunits by a cellular protease during viral maturation (Lai and Cavanagh, 1997). The S1 subunit contains epitopes and determinants for virus neutralizing antibodies, cell attachment and serotype specificity (Ignjatovic and Galli, 1994). The S2 subunit anchors the S1 protein to the membrane and is involved in membrane fusion.

The IBV genome has high rates of mutation and recombination, leading to the continuous emergence of novel genetic and antigenic variants worldwide (genotypes and serotypes) (Gough et al., 1992; Liu and Kong, 2004). Few emergent variants are able to persist for extended periods and spread in new geographic areas to become of evolutionary and economic importance. The South America I (SAI) and Asia/South America II (A/SAII) genotypes are good examples of successful variants that have been widely circulating for decades (Marandino et al., 2015). The SAI genotype is an exclusive South American lineage that emerged in the 1960s and spread in Argentina, Brazil and Uruguay (Chacon et al., 2011;

* Corresponding author.

E-mail address: rperez@fcien.edu.uy (R. Pérez).

Felippe et al., 2010; Marandino et al., 2015; Rimondi et al., 2009; Villarreal et al., 2007). The A/SAII genotype probably emerged in Asia around 1995 and spread in Asia (China and Taiwan), Europa (Italy) and South America (Argentina, Colombia, Chile and Uruguay) (Alvarado et al., 2005; Han et al., 2011; Huang et al., 2004; Liu et al., 2009a; Marandino et al., 2015; Toffan et al., 2013; Yu et al., 2010). The SAI and A/SAII genotypes are genetically divergent and strongly differ from vaccine strains (Massachusetts type) licensed for use in most countries. These two genotypes are particularly relevant in South America where they are responsible for most outbreaks in commercial flocks (Alvarado et al., 2005; Marandino et al., 2015; Rimondi et al., 2009). This scenario causes major economic losses in countries with high production levels, including Brazil and Argentina, which are among the world's top producers of broiler meat (USDA, 2014).

Genotyping is the most common classification method for IBV strains and has currently replaced serotype and protectotype analysis worldwide (Sjaak de Wit et al., 2011). Establishing the genotype of field strains is essential to perform epidemiological and evolutionary studies, and provides information to select the most appropriate vaccine to control the disease (Farsang et al., 2002; Kant et al., 1992; Liu et al., 2006). The identification of the IBV genotype can be performed using amplification of the S1 region followed by nucleotide sequence or molecular typing techniques (e.g., restriction fragment length polymorphisms, probe-based or high-resolution melting PCR). The real-time or quantitative PCR (qPCR) assays have proven to be one of the most effective tools in the simultaneous detection and characterization of a variety of viral pathogens with high degree of analytical sensitivity (Callison et al., 2006; Chen et al., 2010; Tomás et al., 2012). A RT-qPCR based method has been recently developed for the differentiation of Massachusetts, Arkansas, Connecticut and DE072/GA98 genotypes (Acevedo et al., 2013; Roh et al., 2013, 2014), but there is not assays to identify SAI and A/SAII genotypes.

The present study reports the development and validation of specific RT-qPCR assays for the detection of the SAI and A/SAII genotypes in the poultry industry worldwide.

2. Materials and methods

2.1. Primers and probes design

Multiple sequence alignments were carried out with sequences of the SAI and A/SAII genotypes in the GenBank database using the MUSCLE algorithm implemented in MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011) (Tables S1 and S2). Sequences belonging to each genotype were identified by phylogenetic clustering and unique nucleotide markers in the S1 sequences as described by Marandino et al. (2015). TaqMan probes and primers were designed to match perfectly with the SAI or A/SAII genotypes and analyzed with OligoAnalyzer Tool (<https://www.idtdna.com>).

A BLAST search was performed to predict *in silico* primer and probe sequence specificity and to evaluate the occurrence of non-specific homology with other IBV genotypes and with chicken genome.

2.2. Samples

2.2.1. IBV samples for analytical testing

The IBV field strains UY/11/CA/12 (SAI genotype) and UY/09/CA/01 (A/SAII genotype) were used to standardize and test the analytical performance of the developed RT-qPCR assays. These strains were previously classified into SAI and A/SAII genotypes by sequencing the complete S1 region (Marandino et al., 2015).

Table 1

Argentine and Uruguayan field samples employed in this study.

SAI sample	Year	A/SAII sample	Year
UY/11/CA/09 ^a	2011	UY/09/CA/01 ^a	2009
UY/11/CA/11 ^a	2011	AR/09/BA/29 ^a	2009
UY/11/CA/12 ^a	2011	AR/09/BA/34 ^a	2009
UY/11/CA/13 ^a	2011	AR/09/BA/35 ^a	2009
UY/11/CA/18 ^a	2011	AR/09/BA/36 ^a	2009
UY/11/CA/19 ^a	2011	AR/09/BA/37 ^a	2009
AR/11/ER/33 ^a	2011	AR/09/BA/38 ^a	2009
UY/12/CA/27 ^a	2012	AR/09/BA/39 ^a	2009
UY/12/CA/30 ^a	2012	AR/10/BA/30 ^a	2010
UY/12/CA/33 ^a	2012	AR/11/BA/27 ^a	2011
UY/12/CA/36 ^a	2012	AR/11/BA/28 ^a	2011
UY/12/CA/39 ^a	2012	AR/11/BA/31 ^a	2011
UY/14/CA/01 ^b	2014	AR/13/ER/249.08 ^b	2013
UY/14/CA/03 ^b	2014	AR/13/BA/259 ^b	2013
UY/14/CA/05 ^b	2014	AR/13/ER/04 ^b	2013
UY/14/CA/06 ^b	2014	AR/13/ER/19 ^b	2013
UY/14/CA/07 ^b	2014	AR/13/ER/49 ^b	2013
UY/14/CA/08 ^b	2014	AR/13/ER/53 ^b	2013
UY/15/CA/01 ^b	2015	AR/13/ER/87 ^b	2013
UY/15/CA/02 ^b	2015	AR/14/BA/266.06 ^b	2014
UY/16/CA/01 ^b	2016	AR/14/BA/267 ^b	2014
UY/16/CA/02 ^b	2016	AR/15/ER/275.4 ^b	2015

^a Field samples analyzed in Marandino et al. (2015).

^b Field samples diagnosed and characterized in this study.

2.2.2. IBV samples for clinical sensitivity testing

Forty-four IBV field samples were used as template to evaluate the genotyping capacity of the RT-qPCR assays (Table 1). All samples were previously diagnosed by RT-qPCR (Callison et al., 2006) and differentiated into the SAI and A/SAII genotypes by sequencing the complete S1 region (Table 1). Each genotype was represented by 22 Uruguayan and Argentine field strains. Samples were repeatedly tested (at least three times) in different qPCR runs.

2.2.3. Samples for specificity testing

Specificity of the assays was assessed by screening IBV-negative samples, IBV strains used for clinical sensitivity testing (Table 1), IBV genotypes (Massachusetts, 4/91, GA98, Arkansas and Connecticut) and common avian pathogens (Infectious bursal disease virus, Newcastle disease virus, Avian reovirus, Avian metapneumovirus, Infectious laryngotracheitis virus and Mycoplasma gallisepticum) (Table S3).

2.3. RNA extraction from vaccine virus and tissues

Trachea and cecal tonsils samples were homogenized in PBS (pH7.0) together to achieve 20% (w/v) suspensions, and centrifuged at 2000g for 5 min at 4 °C. Supernatant was passed through a sterile 0.22 µm cellulose acetate syringe filter (Whatman Inc., Dassel, Germany). RNA extraction was performed using Quick-RNATM MiniPrep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) and 200 µl of tissue homogenate. The extracted RNA was eluted in 35 µl of RNase-free water.

2.4. Reverse transcription and qPCR assays

Reverse transcription was carried out using the RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas Life Sciences Inc, Hanover, MD, USA) and 10 µl of extracted RNA. The whole IBV genome was reverse-transcribed to complementary DNA (cDNA) using random hexamer primers in 20 µl of reaction volume.

Quantitative PCR was carried out in a 20 µl reaction containing 2 × HotRox Master Mix (Bioron, Ludwigshafen, Germany), 0.6 µM each primer, 0.2 µM probe, and 1 µl cDNA. Thermocycling was performed on the ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and consisted of a 5 min hold stage at 50 °C, followed by a

10 min denaturation at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C, ending with a 5 min at 70 °C final step. Fluorescent measurements from specific reporter fluorophores were collected at the hold stage, at the 60 °C step of each cycle, and at the end of the run.

2.5. Generation of standard RNA for analytical testing

In order to obtain a template for *in vitro* transcription, two genomic fragments encompassing the qPCR amplicons were obtained from SAI and A/SAII strains. The SAI genomic fragment was amplified using the newly designed primers IBV-Sf1237 and IBV-Sr1795; the A/SAII genomic fragment was amplified using the primers IBV-S1 and IBV-S2 (Table 2). PCR products were purified using QIAquick purification kit (Qiagen) and cloned separately into a pJET1.2 vector (Fermentas Life Sciences Inc.). Plasmids were recovered using the PureLink™ Quick Plasmid Miniprep kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and sequenced to confirm presence and orientation of the insert. NcoI restriction enzyme (Fermentas Life Sciences Inc.) was used to obtain linearized plasmids before *in vitro* transcription with the TranscriptAid™ T7 High Yield Transcription kit (Fermentas Life Sciences Inc.). Transcribed RNA was treated with RNase-free DNase and purified with phenol:chloroform. RNA concentration and purity was determined by spectrophotometry using a NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), determining the average concentration after five measures. Integrity of the transcribed RNA was assessed with a 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The copy number of RNA molecules was determined by the following formula: $Y \text{ (RNA copies/}\mu\text{l)} = [\text{RNA concentration (g/}\mu\text{l)} / (\text{nt transcript length} \times 340)] \times 6.022 \times 10^{23}$.

2.6. Standard curve generation for analytical testing

To generate standard curves for genotype identification assays, 10-fold serial dilution containing 2×10^1 – 2×10^8 RNA copies were analyzed in three independent runs by RT-qPCR. In order to take into account the diagnostic context of the sample matrix, each dilution was spiked in total RNA extracts (750 ng/ μl) from IBV-negative trachea and analyzed in three independent runs by RT-qPCR. The log dilution series of IBV RNA and negative controls containing nuclease-free water were tested in triplicates in each run. Standard curves for each assay were generated by plotting threshold cycle (Ct) values per three replicates per standard dilution versus the logarithm of the RNA copy number. The amplification efficiency of the assays was calculated from the equation $E = (10^{(-1/k)}) - 1$, where (k) is the slope of the linear regression line (Ginzinger, 2002; Pfaffl, 2001). An efficiency of 1 corresponds to 100% amplification efficiency. The coefficient of determination (R^2) was assessed and considered to be suitable when it was not lower than 0.980 in a single run (Buh Gasparic et al., 2008; Bustin, 2004). The coefficient of variations (CVs) of Ct values were assessed separately for each standard RNA dilution by analyzing three replicates on the same analytical run (intra-assay) and three repeated analyses along different analytical runs (inter-assay).

3. Results

3.1. SAI identification assay

SAI identification assay employs a TaqMan probe (SAI-Pb) that is labeled with the fluorescent dye 6-carboxyfluorescein (FAM) (Table 2). This probe hybridizes with an insertion (GGTAGCGGT), which is exclusively found in the second S1 hypervariable region of the SAI genotype. Primers were designed to anneal exactly to

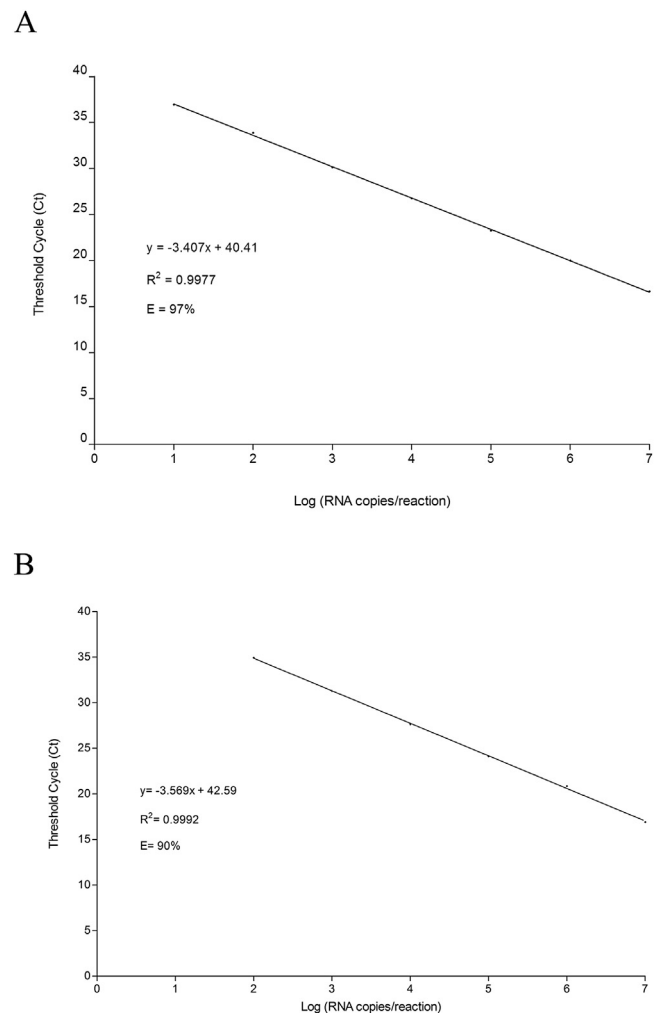


Fig. 1. Standard curves of the developed RT-qPCR assays for the detection of the SAI (A) and A/SAII (B) genotypes. Each point represents the mean Ct of nine different measures (three independent reactions, three replicates each). The coefficient of determination (R^2) and the amplification efficiency (E) of each assay are indicated.

sequences conserved in the SAI genotype (Table 2). The combination of primers and probe only match perfectly with all the S1 sequences of SAI strains deposited in GenBank ($n = 101$).

All SAI samples were correctly detected with the SAI identification assay. IBV-negative field samples and non-IBV SAI viruses did not show fluorescent signal in the assay.

The assay showed a linear dynamic range of 10^1 – 10^7 RNA copies/reaction, with an average R^2 of 0.9977, and an efficiency of 97% (Fig. 1). The intra- and inter-assay CVs ranged from 0.3% to 1.8% and 0.8% to 1.7%, respectively.

3.2. A/SAII identification assay

A/SAII identification assay employs a minor groove-binding (MGB) TaqMan probe (A/SAII-Pb) labeled with the fluorescent dye 2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein (VIC) (Table 2). This probe hybridizes with a sequence in the middle region of the S gene that encodes a distinctive and exclusive cleavage recognition site (Arg-Thr-Gly-Arg) of Asiatic, European and South American strains of the A/SAII genotype. Primers were designed to anneal exactly to sequences conserved in the A/SAII strains (Table 2). The combination of primers and probe only match perfectly to all the S1 sequences of A/SAII strains deposited in GenBank ($n = 23$).

Table 2
Primers and probes used in this study.

Primer/probe	Sequence 5'→3'	Polarity	Amplicon size
IBV-Sf1237	GRTGGCTCYCGTATACAAA	+	581
IBV-Sr1795	GTTTGTATGTACTCATCTGTRAC	–	
IBV-S1 ^a	ACTGAACAAAAGACAGACTT	+	
IBV-S2 ^a	CCATCTGAAAAATTRCCAGT	–	783
SAI-Pb	FAM-AMTGGTCCTAGYRGTTTGT-TAMRA	+	
SAI-Fw	CYATATTCGTATTCTGCTATGAA	+	
SAI-Rv	TTATTAACACATTGAAGYGACTT	–	116
A/SAII-Pb	VIC-AACGYCCCGTKCGA-MGB-NFQ	–	
A/SAII-Fw	CATCTCGTAATGAAACTGGTT	+	
A/SAII-Rv	CAAGATCATACTAACATAAGGGC	–	
			132

TAMRA, tetramethylrhodamine.
NFQ, non-fluorescent quencher.

^a Zwaagstra et al. (1992).

All A/SAII samples were successfully detected with A/SAII probe. IBV-negative field samples and non-IBV A/SAII viruses did not show fluorescent signal in the assay.

The linear dynamic range of the A/SAII detection assay was from 10^2 to 10^7 RNA copies/reaction, with an average R^2 of 0.9992, and an efficiency of 90% (Fig. 1). The intra- and inter-assay CVs ranged from 0.5% to 2.1% and from 0.9% to 2.7%, respectively.

4. Discussion

The present study developed and assessed two novel RT-qPCR assays for the rapid detection of SAI and A/SAII genotypes. Both assays were designed based on strong molecular markers that are highly conserved at the nucleotide and amino acid level of each genotype strain, which is indicative of a strong purifying selection (Marandino et al., 2015). The SAI genotype uses a typical Taqman probe that works perfectly in detecting a unique insertion in the S1 coding region. To detect the A/SAII genotype, the developed assay was designed using a TaqMan-MGB probe. These types of probes form extremely stable duplexes with complementary DNA and permit the use of highly specific probes (Kumar et al., 1998), a desirable feature in the present assay that targets a sequence with few nucleotide variants. The use of different fluorophores in both Taqman probes allows multiplexing of the assays, but a better sensitivity is achieved by using them individually.

Results indicated that the assays have high specificity and absence of cross-reactivity with IBV-negative samples and common avian pathogens. All samples diagnosed as IBV positive with the RT-qPCR assay described by Callison et al. (2006) were correctly detected and characterized with the SAI or A/SAII assays, indicating a good clinical sensitivity of both assays. The acceptable determination coefficients, PCR efficiencies and relatively small intra- and inter-assay variability validated the use of these assays between 10^1 – 10^7 and 10^2 – 10^7 RNA copies/reaction for SAI and A/SAII strains, respectively. The detection of as few as 100 RNA copies per reaction ensures the specific detection of low viral titers that may occur during the progression of the infection. These assays are feasible for being fully automated and for assessing large number of samples in a short time. The two assays can be implemented in a single tube reaction (one-step RT-PCR), but obtaining cDNA in a separated tube enables the use of the same RT reaction to perform other assays (e.g. SAI and A/SAII genotyping, amplification of other genomic regions and diagnosis of other pathogens).

The present RT-qPCR techniques are useful tools for monitoring the emergence and expansion of SAI and A/SAII genotypes. This is an interesting aspect, considering that IBV genotypes may exhibit very distinct spatiotemporal and epidemiological behaviors. Some emergent IBV genotypes remain restricted to the region of origin while others spread and established in relatively close geographic areas, as occurred with the Georgia serotype in North

America, (Ignjatovic and Sapats, 2000; Ignjatovic et al., 2006). The Massachusetts, QX and A/SAII genotypes are even more interesting because they could spread among different continents (Bochkov et al., 2006; Meulemans et al., 2001; Worthington et al., 2008). As factors that determine the emergence and dispersion of the IBV strains are poorly understood, the monitoring of genotypes using RT-qPCR assays may contribute to understand their dynamics and provide new insight into the molecular basis of their different spreading abilities.

The assays here developed are excellent alternatives to rapidly assess the presence of the SAI and A/SAII IBV genotypes in poultry farms. Genotype identification is an important step in the control of the disease because the use of vaccines that are significantly divergent from the field strains might have a low degree of cross protection and being unable to induce a suitable protective immune response. The SAI and A/SAII strains show low nucleotide and amino acid similarity in the S1 sequences and clustered separately from the Massachusetts vaccine strains in phylogenetic trees, suggesting a limited level of cross-protection (Marandino et al., 2015). Conventional serotyping testing and in vivo protection studies showed that South American strains of the SAI genotype and Asiatic strains of the A/SAII genotype were not completely neutralized by antisera specific to Massachusetts strains (Chacon et al., 2011; Liu et al., 2009b; Yu et al., 2010). A commercial vaccine with a different serotype (4/91) has become recently available in South America, and is used together with Massachusetts vaccines to control IBV. Although the 4/91 serotype is quite divergent from the SAI and A/SAII genotypes, the joint implementation with a Massachusetts vaccine seems to provide a good protection against challenge with the A/SAII strains (Vagnozzi, 2014). However, using vaccines that differ from the circulating genotypes can have negative consequences when acting as a selective pressure that promote the emergence or expansion of divergent field strains. The application of the RT-qPCR assays here developed in field samples serves as a sensitive and direct instrument to evaluate the effectiveness of the new vaccination scheme over SAI and A/SAII field viruses. We encourage the implementation of these assays to monitor the effect of the introduction of the 4/91 vaccine by comparing the prevalence of the different genotypes in countries with and without this vaccine. The combination of diagnostic and genetic characterization of the genotypes would be a valuable tool for governmental organizations that authorize the introduction of new vaccines.

Another important application of these assays is the possibility to perform the accurate quantification of viral genomes of a specific genotype, particularly when there is co-infection with field or vaccine strains. This could be useful for establishing the virus load in diverse tissues and to provide information about the intra-host circulation of different strains. In protection assays, the precise identification and quantification of the field strain is essential and has to be differentiated from the vaccine virus, which might persist

in various internal chicken organs for 163 days (Cavanagh and Gelb, 2008).

In conclusion, the possibility to characterize a large number of samples in a rapid, sensitive and reproducible way makes these assays a suitable tool for routine testing, IBV control and research in poultry. It is expected that the application of the assays will improve IBV surveillance and have an impact on our understanding of the molecular epidemiology and control of these two relevant IBV genotypes.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria under project number 319 of the Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria, the Comisión Sectorial de Investigación Científica, Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, and the Agencia Nacional de Investigación e Innovación. We thank Granjas Hepa Ltda. and the Poultry Diagnostic and Research Center of the University of Georgia for collaboration.

References

- Acevedo, A.M., Perera, C.L., Vega, A., Ríos, L., Coronado, L., Relova, D., Frías, M.T., Ganges, L., Núñez, J.I., Pérez, L.J., 2013. A duplex SYBR Green I-based real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of Massachusetts and non-Massachusetts serotypes of infectious bronchitis virus. *Mol. Cell. Probes* 27, 184–192.
- Alvarado, I.R., Villegas, P., Mossos, N., Jackwood, M.W., 2005. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Colombia during 2003. *Avian Dis.* 49, 494–499.
- Bochkov, Y.A., Batchenko, G.V., Shcherbakova, L.O., Borisov, A.V., Drygin, V.V., 2006. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. *Avian Pathol.* 35, 379–393.
- Buh Gasparic, M., Cankar, K., Zel, J., Gruden, K., 2008. Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 8, 26.
- Bustin, S.A., 2004. Data analysis and interpretation. In: Bustin, S.A. (Ed.), *A-Z of Quantitative PCR*. International University Line, California, pp. 439–492.
- Callison, S., Hilt, D., Boynton, T.O., Sample, B.F., Robison, R., Swayne, D.E., Jackwood, M.W., 2006. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *J. Virol. Methods* 138, 60–65.
- Cavanagh, D., Gelb, J.B., 2008. Infectious bronchitis. In: Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E. (Eds.), *Diseases of Poultry*. Wiley-Blackwell Publishing, Iowa (117e35).
- Chacon, J.L., Rodrigues, J.N., Assayag Junior, M.S., Peloso, C., Pedrosa, A.C., Ferreira, A.J.P., 2011. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Pathol.* 40, 153–162.
- Chen, H., Zhang, J., Ma, Y., Ma, L.N., Ding, Y., Liu, X., Cai, X., Ma, L., Zhang, Y., Liu, Y., 2010. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of infectious bronchitis virus in infected chicken tissues. *Mol. Cell Probes* 24, 104–106.
- Cook, J.K.A., Jackwood, M., Jones, R.C., 2012. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* 41, 239–250.
- Farsang, A., Ros, C., Renström, L.H.M., Baule, C., Soós, T., Belák, S., 2002. Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain. *Avian Pathol.* 31, 229–236.
- Felippe, P.A.N., da Silva, L.H.A., Santos, M.M.A.B., Spilki, F.R., Arns, C.W., 2010. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Dis.* 54, 1191–1196.
- Ginzinger, D.G., 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* 30, 503–512.
- Gough, R.E., Randall, C.J., Dagless, M., Alexander, D.J., Cox, W.J., Pearson, D., 1992. A “new” strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Vet. Rec.* 130, 493–494.
- Han, Z., Sun, C., Yan, B., Zhang, X., Wang, Y., Li, C., Zhang, Q., Ma, Y., Shao, Y., Liu, Q., Kong, X., Liu, S., 2011. A 15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious bronchitis coronavirus in China. *Infect. Genet. Evol.* 11, 190–200.
- Huang, Y., Lee, H., Cheng, M., Wang, C.-H., 2004. S1 and N gene analysis of avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. *Avian Dis.* 48, 581–589.
- Ignjatovic, J., Galli, L., 1994. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. *Arch. Virol.* 138, 117–134.
- Ignjatovic, J., Sapats, S., 2000. Avian infectious bronchitis virus. *Rev. Sci. Tech.* 19, 493–508.
- Ignjatovic, J., Gould, G., Sapats, S., 2006. Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. *Arch. Virol.* 151, 1567–1585.
- Kant, A., Koch, G., van Roozelaar, D.J., Kusters, J.G., Poelwijk, F., van der Zeijst, B., 1992. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. *J. Gen. Virol.* 73 (Pt 3), 591–596.
- Kumar, S., Reed, M.W., Gamper Jr., H.B., Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A., Foti, M., West, J., Meyer Jr., R.B., Schweitzer, B.L., 1998. Solution structure of a highly stable DNA duplex conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 26, 831–838.
- Lai, M.M., Cavanagh, D., 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 48, 1–100.
- Liu, S., Kong, X., 2004. A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. *Avian Pathol.* 33, 321–327.
- Liu, S., Zhang, X., Chen, J.D., Han, Z.X., Liu, X., Feng, L., Shao, Y.H., Rong, J.G., Kong, X.G., Tong, G.Z., 2006. Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. *Arch. Virol.* 151, 1133–1148.
- Liu, S., Zhang, X., Wang, Y., Li, C., Han, Z., Shao, Y., Li, H., Kong, X., 2009a. Molecular characterization and pathogenicity of infectious bronchitis coronaviruses: complicated evolution and epidemiology in china caused by cocirculation of multiple types of infectious bronchitis coronaviruses. *Intervirology* 52, 223–234.
- Liu, S., Zhang, X., Wang, Y., Li, C., Liu, Q., Han, Z., Zhang, Q., Kong, X., Tong, G., 2009b. Evaluation of the protection conferred by commercial vaccines and attenuated heterologous isolates in China against the CK/CH/LDL/971 strain of infectious bronchitis coronavirus. *Vet. J.* 179, 130–136.
- Marandino, A., Pereda, A., Tomás, G., Hernández, M., Iraola, G., Craig, M.I., Hernández, D., Banda, A., Villegas, P., Panzera, Y., Pérez, R., 2015. Phylodynamic analysis of avian infectious bronchitis virus in South America. *J. Gen. Virol.* 96, 1340–1346.
- Meulemans, G., Boschmans, M., Decaesstecker, M., Berg, T.P., Denis, P., Cavanagh, D., 2001. Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986–1995. *Avian Pathol.* 30, 411–421.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Rimondi, A., Craig, M.I., Vagnozzi, A., König, G., Delamer, M., Pereda, A., 2009. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001–2008). *Avian Pathol.* 38, 149–153.
- Roh, H.J., Hilt, D.A., Williams, S.M., Jackwood, M.W., 2013. Evaluation of infectious bronchitis virus Arkansas-type vaccine failure in commercial broilers. *Avian Dis.* 57, 248–259.
- Roh, H.J., Hilt, D.A., Jackwood, M.W., 2014. Detection of infectious bronchitis virus with the use of real-time quantitative reverse transcriptase-PCR and correlation with virus detection in embryonated eggs. *Avian Dis.* 58, 398–403.
- Shalk, A., Hawn, M., 1931. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 78, 413.
- Sjaak de Wit, J.J., Cook, J.K., van der Heijden, H.M., 2011. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 40, 223–235.
- Stern, D.F., Sefton, B.M., 1982. Coronavirus proteins: biogenesis of avian infectious bronchitis virus virion proteins. *J. Virol.* 44, 794–803.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Toffan, A., Bonci, M., Bano, L., Bano, L., Valastro, V., Vascellari, M., Capua, I., Terregino, C., 2013. Diagnostic and clinical observation on the infectious bronchitis virus strain Q1 in Italy. *Vet. Ital.* 49, 347–355.
- Tomás, G., Hernández, M., Marandino, A., Panzera, Y., Maya, L., Hernández, D., Pereda, A., Banda, A., Villegas, P., Aguirre, S., Pérez, R., 2012. Development and validation of a TaqMan-MGB real-time RT-PCR assay for simultaneous detection and characterization of infectious bursal disease virus. *J. Virol. Methods* 185, 101–107.
- USDA, 2014. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. <http://www.fas.usda.gov/data/livestock-and-poultry-world-markets-and-trade>.
- Vagnozzi, A., 2014. Bronquitis Infecciosa 2013: Discusión de los resultados de las pruebas realizadas en el Instituto de Virología de INTA Castelar. Reunión mensual de GTA.
- Villarreal, L.Y.B., Brandão, P.E., Chacón, J.L., Saldenberg, A.B.S., Assayag, M.S., Jones, R.C., Ferreira, A.J.P., 2007. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. *Avian Dis.* 51, 974–978.
- Worthington, K.J., Currie, R.J.W., Jones, R.C., 2008. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathol.* 37, 247–257.
- Yu, L., Jiang, Y., Low, S., Wang, Z., Nam, S.J., Liu, W., Jiang, A.Y., Low, B.S., Wang, A.Z., Nam, B.S.J., Liu, A.W., Kwagac, J., 2010. Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis.* 45, 416–424.
- Zwaagstra, K., van Der Zeijst, B., Austers, J., 1992. Rapid detection and identification of avian infection bronchitis virus. *J. Clin. Microbiol.* 30, 79–84.
- de Groot, R., 2012. Family Coronaviridae. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy*, the 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San, Diego, pp. 806–828.

Short Communication

Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus in South America

Ana Marandino,¹ Ariel Pereda,² Gonzalo Tomás,¹ Martín Hernández,¹ Gregorio Iraola,^{1,3} María Isabel Craig,² Diego Hernández,¹ Alejandro Banda,⁴ Pedro Villegas,⁵ Yanina Panzera¹ and Ruben Pérez¹

Correspondence

Ruben Pérez
rperez@fcien.edu.uy

¹Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

²Instituto de Virología, CICVyA, INTA-Castelar, CC 25 (1712) Castelar, Buenos Aires, Argentina

³Unidad de Bioinformática, Instituto Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay

⁴Poultry Research and Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, PO Box 97813, Pearl, MS 39288, USA

⁵College of Veterinary Medicine, Poultry Diagnostic and Research Center, University of Georgia, 953 College Station Road, Athens, GA 30602-4875, USA

Infectious bronchitis virus (IBV) is a coronavirus of chickens that causes great economic losses to the global poultry industry. The present study focuses on South American IBVs and their genetic relationships with global strains. We obtained full-length sequences of the S1 coding region and N gene of IBV field isolates from Uruguay and Argentina, and performed Phylogenetic analysis to characterize the strains and estimate the time of the most recent common ancestor. We identified two major South American genotypes, which were here denoted South America I (SAI) and Asia/South America II (A/SAII). The SAI genotype is an exclusive South American lineage that emerged in the 1960s. The A/SAII genotype may have emerged in Asia in approximately 1995 before being introduced into South America. Both SAI and A/SAII genotype strains clearly differ from the Massachusetts strains that are included in the vaccine formulations being used in most South American countries.

Received 7 October 2014
Accepted 31 January 2015

Infectious bronchitis (IB) is a globally distributed avian disease that represents one of the most persistent sanitary problems to the commercial poultry industry. The intensive production of high-density bird populations promotes IB transmission and, in spite of intensive control programmes, outbreaks are extremely frequent in commercial flocks (USDA, 2014).

The aetiological agent of IB is the infectious bronchitis virus (IBV), belonging to the genus *Gammacoronavirus* within the *Coronaviridae* family (de Groot, 2012). The IBV positive-sense ssRNA genome (27.6 kb) encodes four structural proteins: the spike (S) glycoprotein, the membrane glycoprotein, the envelope protein and the phosphorylated nucleocapsid (N) protein (Stern & Sefton, 1982). The S and N proteins are the major inducers of immune response. The S glycoprotein is post-translationally cleaved, at a cleavage recognition site sequence in the amino-terminal S1 and

carboxy-terminal S2 subunits by a cellular protease during viral maturation (Lai & Cavanagh, 1997). The S1 subunit contains epitopes and determinants for virus-neutralizing antibodies, cell attachment and serotype specificity (Ignjatovic & Galli, 1994). The S2 subunit anchors the S1 protein to the membrane and is involved in membrane fusion. The N protein plays a role in regulation of IBV replication (Fan *et al.*, 2005), grouping virus particles, and inducing T-cell-mediated immune responses (Collisson *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 1997).

IBV is highly variable and evolves rapidly by mutation and recombination (Cavanagh *et al.*, 1992; Kottier *et al.*, 1995; Lee & Jackwood, 2000), leading to the continuous emergence of new genetic and antigenic variants worldwide (genotypes and serotypes) (Gough *et al.*, 1992; Liu & Kong, 2004). However, few variants are able to persist for extended time periods and spread in new territories to become of evolutionary and economic importance. The monitoring of IBV populations from different geographical locations is important in order to map IBV genetic diversity and identify the origin and spreading of relevant genotypes.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the IBV sequences determined in this study are KM658209–KM658256.

Three supplementary tables are available with the online Supplementary Material.

Analyses of the S and N genes have been widely employed to identify IBV genotypes and explore phylogenetic and epidemiological evolution of IBV strains (Adzhar *et al.*, 1997; Kant *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2006). Most studies use for genotyping the coding region of the S1 subunit as the main inducer of protective immunity (de Wit *et al.*, 2011). Genetic analyses are also useful for the selection of the most appropriate vaccination programmes using attenuated and inactivated IBV strains (Farsang *et al.*, 2002), a particularly important issue because IBV serotypes have a low degree of cross-protection (Cavanagh, 2003). In several parts of the world, including most South American countries, a single strain type (Massachusetts) is included in the officially authorized vaccines, but additional strain types (e.g. Connecticut, Arkansas, D207, D3896, 4/91) are permitted elsewhere.

The origin, emergence and expansion of IBV genotypes within and across continents have not been previously analysed despite the virus's relevance for the poultry industry and the evolutionary importance of coronavirus. Most studies deal with genetic variation in particular geographical regions or countries, without performing Phylodynamic analysis to explore the temporal behaviour of IBV (Han *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2006). IBV dynamics in South America is particularly poorly understood. The first IBV isolates (Massachusetts-type) were reported in Brazil in the 1950s (Hipólito, 1957) and in Chile in the 1970s (Hidalgo *et al.*, 1976). Other IBV genotypes have been identified in Brazil, Argentina and Colombia through sequence analysis of partial-length S1 coding region of different size and position (Alvarado *et al.*, 2005; Chacon *et al.*, 2011; Felipe *et al.*, 2010; Rimondi *et al.*, 2009; Villarreal *et al.*, 2007). However, the full-length S1 coding region and N gene in South American strains have not yet been analysed, and there are no comparative studies of the strains that are circulating among the countries. To our knowledge, the present study provides the first integrative analysis that focuses on South American IBV strains, their phylogenetic relationships with genotypes circulating worldwide and their emergence and expansion in the continent.

A total of 24 samples were collected from different outbreaks in commercial broilers with respiratory signs, during 2009–2012 in Uruguay and Argentina (Table S1, available in the online Supplementary Material). IBV presence was confirmed by real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) (Callison *et al.*, 2006). Tissues were processed as described by Rimondi *et al.* (2009). The complete S1 coding region and N gene were obtained by RT-PCR using new or previously described primers (Table S2) and standard conditions (Hernández *et al.*, 2006).

A full-length S1 dataset was built using the nucleotide sequence of the S1 subunit (position from ATG start codon to the cleavage recognition site) of global reference strains ($n=30$), the Argentine and Uruguayan strains here obtained ($n=24$), and Brazilian IBV sequences ($n=19$) that were recently deposited in GenBank. Partial-length S1

datasets were built using different portions of the S1 coding region. A full-length N gene dataset was built using global reference strains ($n=24$), and the Argentine and Uruguayan strains here obtained ($n=24$).

Sequences were aligned using MAFFT (Katoh *et al.*, 2002), and the best-fit model of nucleotide substitution was selected under the Akaike information criterion and Bayesian information criterion as implemented in jModelTest (Posada, 2008). Maximum-likelihood trees were inferred using PhyML (Guindon & Gascuel, 2003). Phylogenetic trees were visualized and edited with TreeGraph2 (Stöver & Müller, 2010).

For Phylodynamic analysis, two genotype-specific datasets were built with partial-length S1 sequences (positions 1–528); partial sequences were used in order to include all South American strains available in GenBank. The Bayesian skyline plot model implemented in BEAST v.1.7.5 was used for estimating population parameters without a prior function for demographic dynamics (Drummond *et al.*, 2012). Four independent Markov chain Monte Carlo runs were performed using the HKY+I+G model with base frequencies estimated from the data. A chain length of 200 000 000 with a burn in consisting of 2 000 000 steps was enough to ensure convergence, as evidenced by effective sample size values higher than 200 for each sampled parameter. Plots were generated using in-house R scripts.

The full-length S1 coding region and N gene were amplified and sequenced in all samples. In the phylogenetic analysis based on the S1 coding region, the South American strains group in three well-supported clades that we here denoted South America I (SAI), Asia/South America II (A/SAII) and Massachusetts-like genotypes (Fig. 1).

The SAI genotype comprises 24 Argentine, Brazilian and Uruguayan strains. The nucleotide and amino acid identities within this genotype vary from 86.9 to 100 % and from 83.9 to 99.9 %, respectively. The time to the most recent common ancestor (tMRCA) of the SAI genotype was 48 years (Fig. 2). Accordingly, the SAI genotype is an exclusive South American lineage that emerged in approximately 1964 (Figs. 1 and 2). Strains of the SAI genotype would have been co-circulating with Massachusetts-like strains that have been reported in South America since the 1950s (Hidalgo *et al.*, 1976; Hipólito, 1957). The SAI genotype was extremely successful and spread in most South American territories (Argentina, Brazil and Uruguay).

The A/SAII genotype comprises most Argentine, one Uruguayan, and Chinese and Taiwanese strains. The nucleotide and amino acid identities vary from 97.9 to 99.9 % and from 95.1 to 100 %, respectively. With respect to the SAI genotype, nucleotide identities vary from 79.3 to 83.3 % and amino acid identities vary from 71.6 to 78.1 %. The Asiatic variants of the A/SAII genotype belong to the recently described genogroup denoted the CK/CH/LDL/971-type (Han *et al.*, 2011). Strains of this genogroup were first detected in China in 1996 (Yu *et al.*, 2001), and were

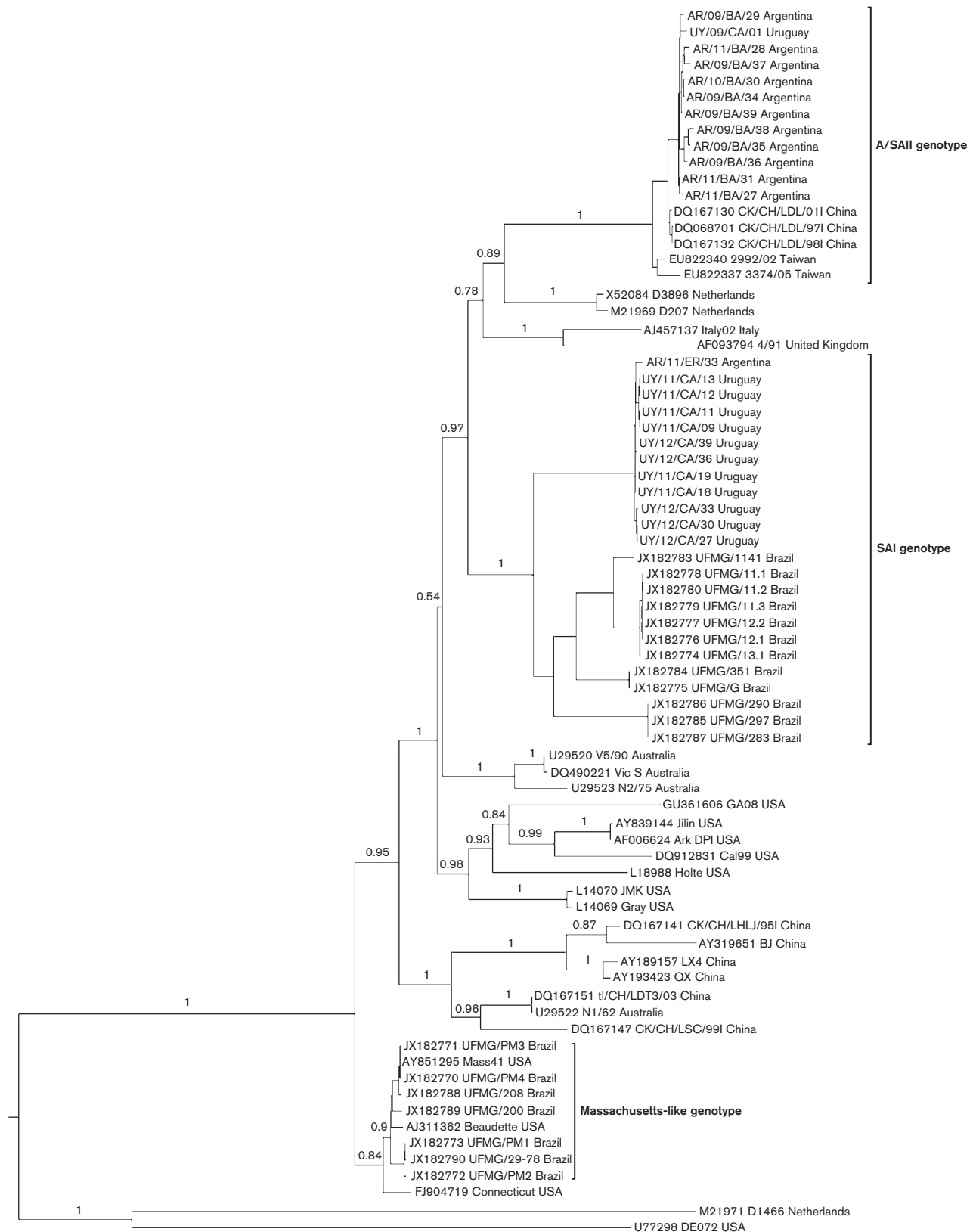


Fig. 1. Phylogenetic tree inferred by using the maximum-likelihood method with GTR+I+G substitution model. Phylogenetic reconstruction was carried out using the full-length S1 coding region of South American IBV strains and reference strains. Mapping uncertainties for internal nodes are shown as approximate likelihood ratio test values.

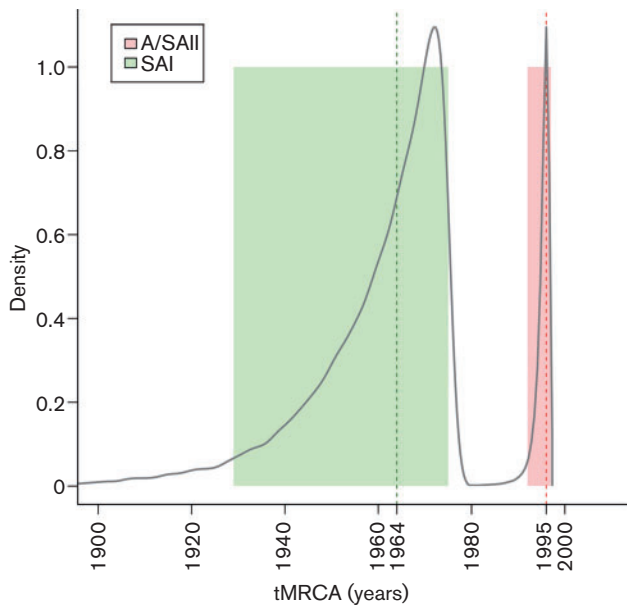


Fig. 2. Posterior probability densities for the tMRCA inferences for SAI and A/SAII genotypes. The SAI genotype dataset ($n=81$) comprised strains collected from 1975 to 2012, and the A/SAII genotype dataset ($n=25$) comprised strains collected from 1996 to 2011. Vertical dashed lines represent the mean estimated time for each ancestor and coloured boxes reflect the 95% high probability density values.

systematically isolated in Asia during 1996–2002 associated with proventriculitis and nephritis (Huang *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009a). According to the estimates of the tMRCA, the A/SAII genotype emerged in approximately 1995 (Fig. 2). This date is very close to the first detection of this genotype in Asia but long before the first record in South America (2006). This fact and the basal location of Asiatic strains in the phylogenetic tree (Fig. 1) support that the A/SAII originated in Asia and was later introduced into South America. Although there is evidence of the spread of IBV strains among close geographical regions (Ignjatovic *et al.*, 2006; Ignjatović & Sapats, 2000; Meulemans *et al.*, 2001), the long-distance intercontinental dispersion is unusual. One possible way could be through the commercial trade between countries (Cobb, 2011; Hosseini *et al.*, 2010). However, there is no official record of 1-day-old chicks or other poultry product trade from Asia to South America. Alternatively, the introduction of the Asian strain could have taken an indirect route, as supported by the recent detection of this genotype in Italy (Toffan *et al.*, 2013). The role of birds in dissemination of the new IBV variants still remains unclear. Even though wild species can be IBV carriers, there is no evidence that IBV strains infected migratory birds and were transmitted over long distances as occurs with influenza virus (Brown *et al.*, 2006).

The Massachusetts-like genotype includes seven Brazilian field strains and Massachusetts-type vaccine strains, and

has nucleotide and amino acid identity values varying from 97.5 to 99.9%, and from 95.8 to 99.8%, respectively. The sequence similarity is less than 79% with respect to the SAI and A/SAII genotypes.

The phylogenetic analysis based on partial-length S1 sequences shows that the SAI genotype was not detected outside Argentina, Brazil and Uruguay, and that the strains of the A/SAII genotype seem to be circulating in Chile and Colombia but not in Brazil. Vaccine-type strains (Massachusetts, Connecticut and Arkansas) were detected in Brazil, Argentina and Colombia. Some field strains could not be assigned to the SAI and A/SAII genotypes or to any vaccine-type and might represent novel South American genotypes (Table S3). As previous studies in South America did not analyse full-length S1 sequences, the comparison between strains and the detection of new genotypes is severely hindered. Analyses of different parts of S1 may also result in distinct levels of homology, leading to misinterpretation of the relationship between virus strains (de Wit *et al.*, 2011), and could avoid the identification of recombinant S1 sequences (Dolz *et al.*, 2008; Jia *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1993). As we obtained the complete S1 coding region, it was possible to make comparisons with partial sequences from other countries to describe a more comprehensive scenario of the South American IBV variability, highlighting the benefits of characterizing complete sequences rather than focusing on smaller coding regions.

The presence of relevant amino acid differences in S1 sequences between the SAI and A/SAII genotypes also supports their different ancestral origins. The A/SAII genotype has a characteristic deletion of three amino acid residues (T/NGP), with respect to the SAI genotype, within the second hypervariable region of the S protein. Insertions and deletions in S1, particularly in the hypervariable regions, are described frequently and have an important role in the generation of IBV genetic diversity (Abro *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2009a). The SAI genotype has the most common cleavage recognition site sequence (Arg-Ser/Leu-Arg-Arg). Both Asiatic and South American A/SAII strains share a distinctive and exclusive cleavage recognition site (Arg-Thr-Gly-Arg) with yet-unknown functional implications (Jackwood *et al.*, 2001).

In the phylogenetic analysis based on the full-length N gene, the SAI and South American A/SAII strains form a well-supported monophyletic group (Fig. 3). The nucleotide and amino acid identity vary values from 95.9 to 100% and from 95.3 to 100%, respectively. The South American and the Asiatic strains of the A/SAII genotype do not cluster together, revealing a phylogenetic incongruence. This differential clustering suggests that, after the Asian strain introduction, the A/SAII genotype underwent a recombination event that transferred the N gene of the SAI genotype to the Asiatic strains. Recombination events are frequently described in IBV field strains (Dolz *et al.*, 2008; Lee & Jackwood, 2000) as a consequence of the large genome size, a replication machinery that dissociates and

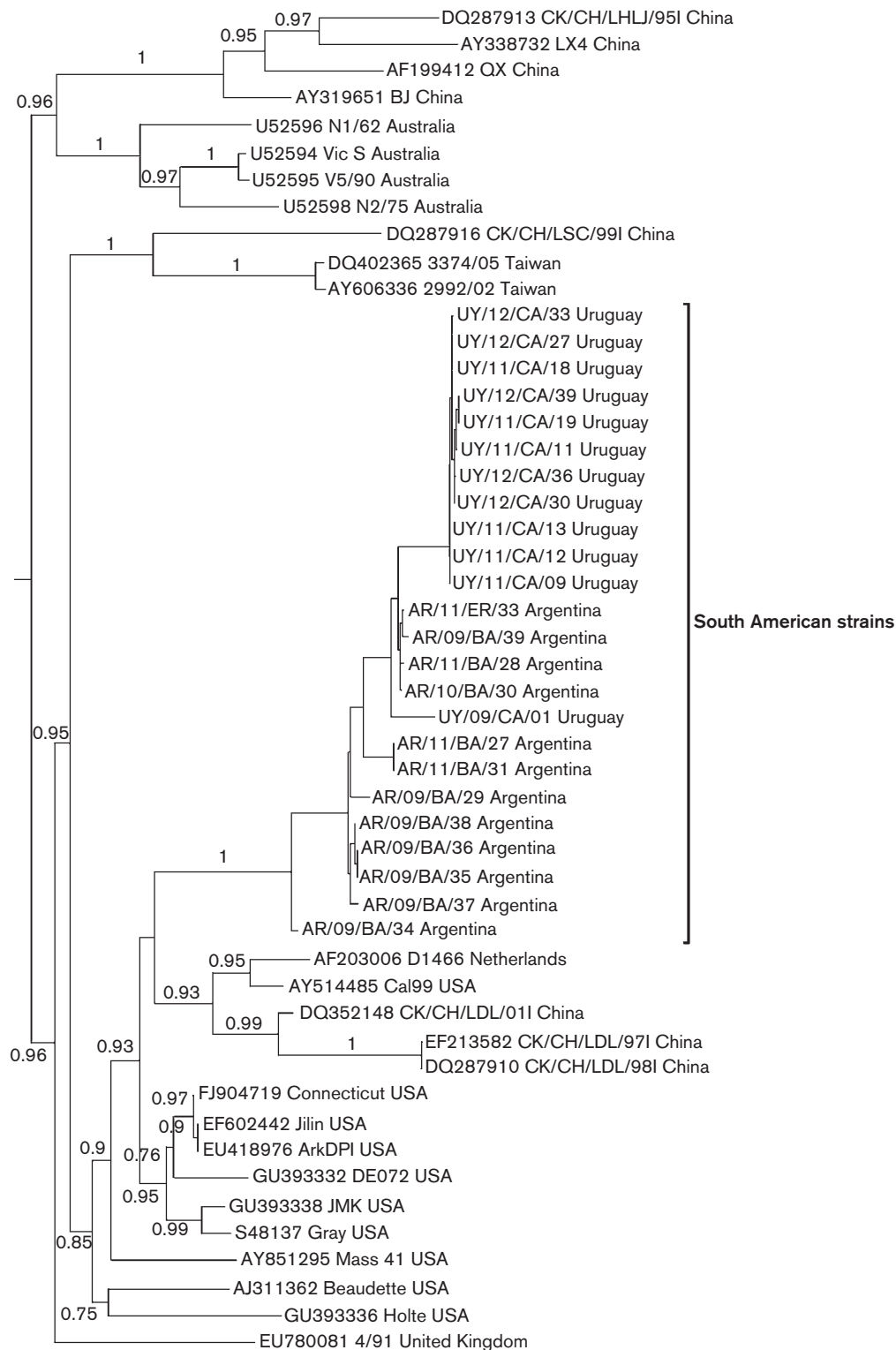


Fig. 3. Phylogenetic tree inferred by using the maximum-likelihood method with GTR+I+G substitution model. Phylogenetic reconstruction was carried out using the full-length N gene sequence of South American IBV strains and reference strains. Mapping uncertainties for internal nodes are shown as approximate likelihood ratio test values.

reassociates from the template RNA, and the availability of full-length and subgenomic-length strands for template switching (Fu & Baric, 1992).

The SAI and A/SAII genotype strains clearly differ from the Massachusetts strains that are included in the vaccine formulations of most South American countries (Figs. 1 and 3). The Massachusetts-like genotype clusters separately in the phylogenetic tree and shows low nucleotide and amino acid similarity with the SAI and A/SAII genotypes in both the S1 and N sequences, suggesting a limited level of cross-protection.

Conventional serotype testing and *in vivo* protection studies have been performed between strains belonging to the Massachusetts and South American genotypes. Brazilian strains, here assigned to the SAI genotype, and Asiatic strains of the A/SAII genotype were not completely neutralized by antisera specific to a Massachusetts strain (Chacon *et al.*, 2011; Liu, *et al.*, 2009b; Yu *et al.*, 2001). However, the differences in the N gene of Asiatic and South American strains of A/SAII genotype (Fig. 3) open the possibility of a dissimilar antigenic behaviour.

The inadequate immune response provided by Massachusetts strain vaccination may have resulted in the high substitution rates here observed, 5.34×10^{-3} and 1.81×10^{-3} nucleotides per site per year for the SAI and A/SAII genotypes, respectively. Intermediate or low levels of immunity result in the highest rate of emergence of viral variants because solid immunity severely limits virus replication and, thus, the generation of genetic variants (Toro *et al.*, 2012). In the absence of a specific vaccine, the substitution rate of the 793/B-type IBV was reported as 3×10^{-3} nucleotides per site per year (Cavanagh *et al.*, 1998). On the other hand, evaluation of Massachusetts and Connecticut strains collected over 41 and 25 years, indicated that substitution rates ranged from 10^{-4} to 10^{-6} nucleotides per site per year, where attenuated live vaccines of these genotypes were routinely used (McKinley *et al.*, 2011).

Together, our results reveal that the dynamic in South America is unusual as it involves two main genotypes with different evolutionary histories that have persisted in the continent for several years and acquired a notorious wide geographical distribution. The ability of the SAI and A/SAII genotypes to evade the immune response of Massachusetts-type vaccines may explain their successful spreading in all South American countries.

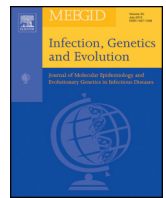
Acknowledgements

This study was supported by grants from the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria), the Comisión Sectorial de Investigación Científica, Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas and the Agencia Nacional de Investigación e Innovación. We thank Granjas Hepa and the Asociación Colombiana de Médicos Veterinarios y Zootecnistas Especialistas en Avicultura for collaboration.

References

- Abro, S. H., Renström, L. H. M., Ullman, K., Isaksson, M., Zohari, S., Jansson, D. S., Belák, S. & Baule, C. (2012). Emergence of novel strains of avian infectious bronchitis virus in Sweden. *Vet Microbiol* 155, 237–246.
- Adzhar, A., Gough, R. E., Haydon, D., Shaw, K., Britton, P. & Cavanagh, D. (1997). Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain. *Avian Pathol* 26, 625–640.
- Alvarado, I. R., Villegas, P., Mossos, N. & Jackwood, M. W. (2005). Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Colombia during 2003. *Avian Dis* 49, 494–499.
- Brown, J. D., Stallknecht, D. E., Beck, J. R., Suarez, D. L. & Swayne, D. E. (2006). Susceptibility of North American ducks and gulls to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *Emerg Infect Dis* 12, 1663–1670.
- Callison, S. A., Hilt, D. A., Boynton, T. O., Sample, B. F., Robison, R., Swayne, D. E. & Jackwood, M. W. (2006). Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *J Virol Methods* 138, 60–65.
- Cavanagh, D. (2003). Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol* 32, 567–582.
- Cavanagh, D., Davis, P. J. & Cook, J. K. (1992). Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. *Avian Pathol* 21, 401–408.
- Cavanagh, D., Mawditt, K., Adzhar, A., Gough, R. E., Picault, J. P., Naylor, C. J., Haydon, D., Shaw, K. & Britton, P. (1998). Does IBV change slowly despite the capacity of the spike protein to vary greatly? *Adv Exp Med Biol* 440, 729–734.
- Chacón, J. L., Rodrigues, J. N., Assayag, M. S., Jr, Peloso, C., Pedrosa, A. C. & Ferreira, A. J. P. (2011). Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Pathol* 40, 153–162.
- Cobb, S. P. (2011). The spread of pathogens through trade in poultry meat: overview and recent developments. *Rev Sci Tech* 30, 149–164.
- Collisson, E. W., Pei, J., Zielawa, J. & Seo, S. H. (2000). Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. *Dev Comp Immunol* 24, 187–200.
- de Groot, R. (2012). Family Coronaviridae. In *Virus Taxonomy, 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. pp. 806–828. Edited by A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens & E. J. Lefkowitz. San Diego, CA: Elsevier Academic Press.
- de Wit, J. J. S., Cook, J. K. A. & van der Heijden, H. M. J. F. (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol* 40, 223–235.
- Dolz, R., Pujols, J., Ordóñez, G., Porta, R. & Majó, N. (2008). Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus in Spain over a fourteen-year period. *Virology* 374, 50–59.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D. & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUTi and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 29, 1969–1973.
- Fan, H., Ooi, A., Tan, Y. W., Wang, S., Fang, S., Liu, D. X. & Lescar, J. (2005). The nucleocapsid protein of coronavirus infectious bronchitis virus: crystal structure of its N-terminal domain and multimerization properties. *Structure* 13, 1859–1868.
- Farsang, A., Ros, C., Renström, L. H. M., Baule, C., Soós, T. & Belák, S. (2002). Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain. *Avian Pathol* 31, 229–236.
- Felippe, P. A., da Silva, L. H., Santos, M. M. A. B., Spilki, F. R. & Arns, C. W. (2010). Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus

- isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Dis* **54**, 1191–1196.
- Fu, K. & Baric, R. S. (1992). Evidence for variable rates of recombination in the MHV genome. *Virology* **189**, 88–102.
- Gough, R. E., Randall, C. J., Dagless, M., Alexander, D. J., Cox, W. J. & Pearson, D. (1992). A 'new' strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Vet Rec* **130**, 493–494.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**, 696–704.
- Han, Z., Sun, C., Yan, B., Zhang, X., Wang, Y., Li, C., Zhang, Q., Ma, Y., Shao, Y. & Liu, Q. (2011). A 15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious bronchitis coronavirus in China. *Infect Genet Evol* **11**, 190–200.
- Hernández, M., Banda, A., Hernández, D., Panzera, F. & Pérez, R. (2006). Detection of very virulent strains of infectious bursal disease virus (vIBDV) in commercial broilers from Uruguay. *Avian Dis* **50**, 624–631.
- Hidalgo, H., Gallardo, R. & Rosende, S. (1976). Isolation of infectious bronchitis virus from broiler chickens in Chile. *Avian Dis* **20**, 601–603.
- Hipólito, O. (1957). [Isolation and identification of the virus of infectious bronchitis of chickens in Brazil]. *Arq. Esc. Vet. Univ. Minas Gerais* **10**, 131–151 (in Portuguese).
- Hosseini, P., Sokolow, S. H., Vandegrift, K. J., Kilpatrick, A. M. & Daszak, P. (2010). Predictive power of air travel and socio-economic data for early pandemic spread. *PLoS ONE* **5**, e12763.
- Huang, Y.-P., Lee, H.-C., Cheng, M.-C. & Wang, C.-H. (2004). S1 and N gene analysis of avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. *Avian Dis* **48**, 581–589.
- Ignjatovic, J. & Galli, L. (1994). The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. *Arch Virol* **138**, 117–134.
- Ignjatović, J. & Sapats, S. (2000). Avian infectious bronchitis virus. *Rev Sci Tech* **19**, 493–508.
- Ignjatovic, J., Gould, G. & Sapats, S. (2006). Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. *Arch Virol* **151**, 1567–1585.
- Jackwood, M. W., Hilt, D. A., Callison, S. A., Lee, C. W., Plaza, H. & Wade, E. (2001). Spike glycoprotein cleavage recognition site analysis of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* **45**, 366–372.
- Jia, W., Karaca, K., Parrish, C. R. & Naqi, S. A. (1995). A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Arch Virol* **140**, 259–271.
- Kant, A., Koch, G., van Roozelaar, D. J., Kusters, J. G., Poelwijk, F. A. & van der Zeijst, B. A. (1992). Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. *J Gen Virol* **73**, 591–596.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* **30**, 3059–3066.
- Kottier, S. A., Cavanagh, D. & Britton, P. (1995). Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology* **213**, 569–580.
- Lai, M. M. & Cavanagh, D. (1997). The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* **48**, 1–100.
- Lee, C. W. & Jackwood, M. W. (2000). Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV. *Arch Virol* **145**, 2135–2148.
- Liu, S. & Kong, X. (2004). A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. *Avian Pathol* **33**, 321–327.
- Liu, S. W., Zhang, Q. X., Chen, J. D., Han, Z. X., Liu, X., Feng, L., Shao, Y. H., Rong, J. G., Kong, X. G. & Tong, G. Z. (2006). Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. *Arch Virol* **151**, 1133–1148.
- Liu, S., Zhang, X., Wang, Y., Li, C., Han, Z., Shao, Y., Li, H. & Kong, X. (2009a). Molecular characterization and pathogenicity of infectious bronchitis coronaviruses: complicated evolution and epidemiology in China caused by cocirculation of multiple types of infectious bronchitis coronaviruses. *Intervirology* **52**, 223–234.
- Liu, S., Zhang, X., Wang, Y., Li, C., Liu, Q., Han, Z., Zhang, Q., Kong, X. & Tong, G. (2009b). Evaluation of the protection conferred by commercial vaccines and attenuated heterologous isolates in China against the CK/CH/LDL/971 strain of infectious bronchitis coronavirus. *Vet J* **179**, 130–136.
- McKinley, E. T., Jackwood, M. W., Hilt, D. A., Kissinger, J. C., Robertson, J. S., Lemke, C. & Paterson, A. H. (2011). Attenuated live vaccine usage affects accurate measures of virus diversity and mutation rates in avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virus Res* **158**, 225–234.
- Meulemans, G., Boschmans, M., Decaesstecker, M., van den Berg, T. P., Denis, P. & Cavanagh, D. (2001). Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986 to 1995. *Avian Pathol* **30**, 411–421.
- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* **25**, 1253–1256.
- Rimondi, A., Craig, M. I., Vagnozzi, A., König, G., Delamer, M. & Pereda, A. (2009). Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001–2008). *Avian Pathol* **38**, 149–153.
- Seo, S. H., Wang, L., Smith, R. & Collisson, E. W. (1997). The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection. *J Virol* **71**, 7889–7894.
- Stern, D. F. & Sefton, B. M. (1982). Coronavirus proteins: biogenesis of avian infectious bronchitis virus virion proteins. *J Virol* **44**, 794–803.
- Stöver, B. C. & Müller, K. F. (2010). TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* **11**, 7.
- Toffan, A., Bonci, M., Bano, L., Bano, L., Valastro, V., Vascellari, M., Capua, I. & Terregino, C. (2013). Diagnostic and clinical observation on the infectious bronchitis virus strain Q1 in Italy. *Vet Ital* **49**, 347–355.
- Toro, H., van Santen, V. L. & Jackwood, M. W. (2012). Genetic diversity and selection regulates evolution of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* **56**, 449–455.
- USDA (2014). Livestock and poultry: world markets and trade. <http://www.fas.usda.gov/data/livestock-and-poultry-world-markets-and-trade>
- Villarreal, L. Y., Brandão, P. E., Chacón, J. L., Saldenberg, A. B. S., Assayag, M. S., Jones, R. C. & Ferreira, A. J. (2007). Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. *Avian Dis* **51**, 974–978.
- Wang, L., Junker, D. & Collisson, E. W. (1993). Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Virology* **192**, 710–716.
- Yu, L., Jiang, Y., Low, S., Wang, Z., Nam, S. J., Liu, W. & Kwang, J. (2001). Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis* **45**, 416–424.



Research paper

Whole-genome characterization of Uruguayan strains of avian infectious bronchitis virus reveals extensive recombination between the two major South American lineages



Ana Marandino^a, Gonzalo Tomás^a, Yanina Panzera^a, Gonzalo Greif^b, Adriana Parodi-Talice^{a,b}, Martín Hernández^a, Claudia Techera^a, Diego Hernández^a, Ruben Pérez^{a,*}

^a Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^b Unidad de Biología Molecular, Instituto Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 May 2017

Received in revised form 4 July 2017

Accepted 6 July 2017

Available online 10 July 2017

Keywords:

Infectious bronchitis virus

Genomic evolution

Lineage

South America

High-throughput sequencing

ABSTRACT

Infectious bronchitis virus (*Gammacoronavirus*, *Coronaviridae*) is a genetically variable RNA virus that causes one of the most persistent respiratory diseases in poultry. The virus is classified in genotypes and lineages with different epidemiological relevance. Two lineages of the GI genotype (11 and 16) have been widely circulating for decades in South America. GI-11 is an exclusive South American lineage while the GI-16 lineage is distributed in Asia, Europe and South America. Here, we obtained the whole genome of two Uruguayan strains of the GI-11 and GI-16 lineages using Illumina high-throughput sequencing. The strains here sequenced are the first obtained in South America for the infectious bronchitis virus and provide new insights into the origin, spreading and evolution of viral variants. The complete genome of the GI-11 and GI-16 strains have 27,621 and 27,638 nucleotides, respectively, and possess the same genomic organization. Phylogenetic incongruence analysis reveals that both strains have a mosaic genome that arose by recombination between Euro Asiatic strains of the GI-16 lineage and ancestral South American GI-11 viruses. The recombination occurred in South America and produced two viral variants that have retained the full-length S1 sequences of the parental lineages but are extremely similar in the rest of their genomes. These recombinant virus have been extraordinary successful, persisting in the continent for several years with a notorious wide geographic distribution. Our findings reveal a singular viral dynamics and emphasize the importance of complete genomic characterization to understand the emergence and evolutionary history of viral variants.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Infectious bronchitis (IB) is still one of the most persistent respiratory diseases of chickens despite intensive control and research efforts made since its first description in 1931 (Shalk and Hawn, 1931). In regions where there is no highly pathogenic avian influenza virus or velogenic Newcastle disease virus, infectious bronchitis virus (IBV) is the cause of the major economic losses to the poultry industry (Cook et al., 2012).

IBV belongs to the genus *Gammacoronavirus* within the *Coronaviridae* family (de Groot, 2012). The positive-sense single-stranded RNA viral genome (27.6 kb) contains six genes and at least ten open reading frames (ORFs) in the order 1a-1b-S-3a-3b-E-M-5a-5b-N. The 1a and 1b ORFs code for the 1ab polyprotein using a ribosomal frame-shift event at the end of ORF 1a; the large 1ab polyprotein is then post-translationally cleaved into 15 non-structural polypeptides, which are required for RNA replication and transcription. ORFs S, E,

M and N encode four major structural proteins: the spike (S) glycoprotein, the small envelope (E) protein, the membrane (M) glycoprotein and the nucleocapsid (N) protein, respectively. ORFs 3a, 3b, 5a and 5b encode small non-structural proteins, which are not essential to viral replication (Cavanagh, 2007).

The IBV genome has high rates of mutation and recombination, leading to the continuous emergence of novel genetic and antigenic variants worldwide (Gough et al., 1992; Liu and Kong, 2004). Strain classification and evolutionary analysis of IBV variants are usually accomplished by the phylogenetic analysis of the complete coding region of the S1 subunit, a highly variable region of the S protein. The S1 subunit carries most of the virus-neutralizing epitopes and has a direct implication in protective immunity (Cavanagh and Davis, 1986; Cavanagh et al., 1992; Mockett et al., 1984). The most recent comprehensive classification identified six main genotypes (GI–GVI), 32 viral lineages (1–32) and a number of inter-lineage recombinants in global strains (Valastro et al., 2016).

Two lineages of the GI genotype (11 and 16), also called South America I (SAI) and Asia/South America II (A/SAII) genotypes, have been widely circulating for decades in South America

* Corresponding author.

E-mail address: rperez@fcien.edu.uy (R. Pérez).

(Alvarado et al., 2005; Marandino et al., 2015; Rimondi et al., 2009). These lineages are responsible for most outbreaks in commercial flocks and cause major economic losses in countries with high production levels, such as Brazil and Argentina, which are among the world's top producers of broiler meat (USDA, 2014). GI-11 is an exclusive South American lineage that emerged in the 1960s and is now apparently restricted to Argentina, Brazil and Uruguay (Chacon et al., 2011; Felipe et al., 2010; Marandino et al., 2015; Villarreal et al., 2007). The GI-16 lineage contains viruses collected in South America (Argentina, Chile, Colombia, Peru and Uruguay), Asia (China and Taiwan) and Europe (Italy, Russia and Slovenia) (Alvarado et al., 2005; Han et al., 2011; Huang et al., 2004; Liu et al., 2009; Marandino et al., 2015; Sesti et al., 2014; Tataje-Lavanda et al., 2016; Toffan et al., 2013; Valastro et al., 2016). Strains of this lineage were first reported in China in 1996, but an Italian strain from 1986 was later described (Valastro et al., 2016).

In order to understand IBV biology, in addition to the analysis of the S1 region, it is desirable to obtain complete genome sequences of different viral population. Genomic studies provide information about the origin and spread of IBV genetic variants (Naguib et al., 2016) and help to identify the genetic changes associated with inter and intra-continental spreading. So far, there are not genomes available for any South American strains of IBV. In the present study, we obtained full-length genome of two South American strains of the GI-11 and GI-16 lineages, and performed phylogenetic analyses to determine the evolutionary relationships between these strains and worldwide field strains.

2. Materials and methods

2.1. Strains

The UY/11/CA/18 and UY/09/CA/01 strains were isolated from IBV outbreaks in commercial broilers during 2009 and 2011 from Uruguay. These strains were previously classified within the GI-11 and GI-16 lineage by full-length S1 analysis using Sanger sequencing (Marandino et al., 2015; Valastro et al., 2016).

2.2. Propagation and purification of IBV particles

The strains were propagated in 10-day-old embryonated chicken eggs by allantoic route inoculation to obtain large quantity of IBV virions. Forty mL of allantoic fluid was harvested 72 h post inoculation and then concentrated through a 20% (wt/vol) sucrose cushion. Viral pellets were re-suspended in 1200 µl of phosphate buffered saline (PBS) and the virus suspension was layered over a continuous gradient of 30 to 55% (wt/vol) sucrose in PBS. The gradient was centrifuged at 100,000g for 4 h at 4 °C.

2.3. RNA extraction and Illumina sequencing

RNA extraction was performed using the Quick-RNA™ MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) and 200 µl of purified viral particles. The extracted RNA was eluted in 35 µl of RNase-free water. Reverse transcription was carried out using the Maxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis kit (Fermentas Life Sciences Inc., Hanover, MD, USA) and 13 µl of extracted RNA. Viral RNA enrichment was determined by quantitative PCR (Callison et al., 2006). Nextera XT DNA Sample Preparation kit (Illumina, USA) was used from 1 ng of double strand cDNA. After 12 PCR cycles, the final library was purified with AMPure XP (Benchman, USA) and quantified with the Qubit dsDNA HS assay kit (Invitrogen, USA). Quality and length of the library were assessed with the Agilent high-sensitivity DNA kit (Agilent, USA) using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA). Sequencing was performed on an Illumina MiSeq (Illumina, USA) platform at the Institute Pasteur, Montevideo, Uruguay.

2.4. Genome assembly and annotation

The raw reads generated by the Illumina sequencer were analyzed using the Galaxy web-based platform (Goecks et al., 2010). Paired-end reads were converted to FASTQ Sanger format using FASTQ Groomer (Blankenberg et al., 2010). The read quality was assessed by FastQC (Andrews, 2010) and adapter sequences were trimmed and low-quality reads were removed from the raw reads using Trim Galore (Krueger, 2012). Reads were mapped to the closest genomic reference IBV strains (accession numbers: EU418976 and KP780179) using Burrows-Wheeler Alignment tools with Galaxy's default settings. Alignments were visually inspected and manually optimized using Integrative Genomics Viewer (IGV) (Robinson et al., 2011). The sequences were deposited in the GenBank database under the accession numbers MF421319 and MF421320. The ORF prediction was carried out in <http://covdb.microbiology.hku.hk> and <http://www.jcvi.org/vigor/> (Huang et al., 2008; Wang et al., 2010).

2.5. Genome sequence analysis

Sequences were aligned using MUSCLE algorithm implemented in MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011). The best-fit model of nucleotide substitution was selected under the Akaike information criterion and Bayesian information criterion as implemented in jModelTest.

Identification of potential recombinant and parental sequences and localization of possible recombinant breakpoints were performed using the RDP4 program, which implements seven distinct algorithms for characterization of recombinant sequences (Martin et al., 2015).

Maximum-likelihood trees, with approximate likelihood ratio tests for internal nodes support, were inferred using PhyML. Phylogenetic trees were visualized and edited with Figtree (Rambaut, 2012).

3. Results

3.1. Purification of IBV particles and genome sequencing

Purified virions were obtained from the UY/11/CA/18 and UY/09/CA/01 strains by gradient centrifugation; viral particles were observed as a single clear band and obtained by fractionation of the gradient. The virion-extracted RNA had a concentration of 9.83×10^6 RNA copies/µl for the UY/11/CA/18 strain and 1.35×10^6 RNA copies/µl for the UY/09/CA/01. The Illumina sequencer for these strains generated 2.3×10^6 and 3.7×10^6 reads, respectively; a low percentage of these reads matched with chicken genome (2.15 and 3.83%), while 86.4 and 86.8% of them matched with a reference IBV strain (quality control statistics is available as Supplementary material). The reads were assembled and the genome sequence of both strains were obtained; the sequences included the coding genome, the UTRs, and the poly-A tail. The complete genome sequence of UY/11/CA/18 and UY/09/CA/01 strains have a size of 27,621 and 27,638 nucleotides respectively, excluding the poly(A)-tail. Both South America strains have thirteen ORFs (1a-1b-S-3a-3b-E-M-4b-4c-5a-5b-N-6b). The ORFs have the same length, except for the ORFs 1a and S that differ in 24 and 36 nucleotides, respectively.

3.2. Strain classification

A full-length genome dataset was built using complete IBV genomes available in the GenBank database ($n = 158$).

Strain classification in genotypes and lineages was performed by S1 phylogenetic analysis with non-recombinant S1 sequences retrieved from the complete genomes and prototype IBV strains following Valastro et al. (2016) (Supplementary Fig. 1). The UY/11/CA/18 and UY/09/CA/01 strains clustered within the GI-11 and GI-16 lineages, respectively.

Fig. 1. Phylogenetic trees obtained with the maximum-likelihood method and JC model (a), GTR model with gamma distribution and invariant sites (b and c), and HKY model with gamma distribution and invariant sites (d and e). Phylogenetic reconstruction was carried out using the ORF1a (a), ORF1b (b), S1 sequence (c), S2 sequence and ORFs 3a, 3b, E, M, 5a and 5b (d) and ORF N (e). Mapping uncertainties for internal nodes are shown as approximate likelihood ratio test values. Strains of GI-16 and GI-11 lineages are labeled with an asterisk. This analysis was performed using a sub-sampled non-recombinant data set with representatives of the IBV variability.

The phylogenetic trees based on the S2 coding region and ORFs 3a, 3b, E, M, 5a and 5b (region IV) have the same topology for the GI-11 and GI-16 lineages and were then concatenated to produce a single phylogeny. As observed for the ORF1b phylogeny, the GI-11 and GI-16 strains cluster together in a monophyletic group with 94–98% nucleotide identity (Fig. 1d).

The phylogenetic tree based on the ORF N (region V), encoding the N protein, showed that the South American strains form a monophyletic group, with a nucleotide identity of 97%. The Asiatic and European strains of GI-16 lineage form another monophyletic group clearly separated from the South American strains (Fig. 1e).

The full-length sequence of the UY/11/CA/18, UY/09/CA/01, CK/CH/LDL/971 and CoV/Ck/Italy/I2022/13 strains were further examined for the detection of recombinant events. Six RDP4 algorithms detected four recombinant breakpoints in South American strains, located at the end of ORF1a (nt 12,319), at both ends of the S1 coding region (nt 20,330 and 21,854) and the beginning of the ORF N (nt 25,900) (Fig. 2).

4. Discussion

The traditional sequencing methodology for IBV genomes requires the producing of several overlapping PCR fragments followed by Sanger sequencing (Abro et al., 2012; Mondal and Cardona, 2007). This approach is particularly laborious because coronaviruses have the largest known RNA genomes (Lai and Cavanagh, 1997). High-throughput or deep sequencing approaches drastically reduced time and cost requirements for genomic sequencing. Additional advantages of this methodology are the significant increase in sequence coverage and depth that permit to study co-infection, recombination, and quasispecies diversity (Isakov et al., 2015; Pérez et al., 2014).

Relatively few studies have used high-throughput sequencing to obtain IBV genomes (Abolnik, 2015; Naguib et al., 2016; Quinteros et al., 2015; Reddy et al., 2015). All methods use viral enrichment in allantoic cavity of embryonated chicken eggs and different protocols to purify IBV particles, including RNase treatment of allantoic fluid, sucrose gradient or genome amplification with commercial kits. The purification of IBV particles with sucrose cushion and gradient along with Illumina sequencing technology were here used with good effectivity

and extremely high coverage values. This standardized protocol allowed the straightforward obtaining of the full-length genome of the UY/11/CA/18 and UY/09/CA/01 strains, including the coding genome and UTR regions. These strains were classified as belonging to the GI-11 and GI-16 lineages, supporting previous analysis using S1 analysis with Sanger sequencing (Marandino et al., 2015).

The GI-11 and GI-16 lineages are good examples of successful genetic variants that have been widely circulating for decades in South America (Marandino et al., 2015). GI-16 is also one of the four most distributed lineages of IBV, together with GI-1 (Massachusetts), GI-13 (793B) and GI-19 (QX) (Valastro et al., 2016). Despite their wide distribution, extended field persistence, and economical relevance, the genomic evolution of these lineages is poorly understood. The strains here sequenced are the first obtained in South America and provide meaningful contributions toward our understanding of IBV variability in the continent.

South American strains have a genome with thirteen ORFs (Fig. 2), including the ORFs 4b, 4c and 6b which are quite variable in both presence and absence, and in their nucleotide sequence. The same organization was observed in the Asiatic strain of the GI-16 lineage but the European strain of this lineage lacks the ORF for the 6b putative protein. The role of ORF6b in IBV remain uncertain but the ORF6b homologue of SARS coronavirus was identified as an endoplasmic reticulum/Golgi membrane-localized protein that induces apoptosis (Ye et al., 2010). This protein accelerated the replication of murine coronavirus, increasing the virulence of the original attenuated virus (Tangudu et al., 2007).

The different clustering observed in the phylogenetic analysis shows that the UY/11/CA/18 and UY/09/CA/01 strains have a mosaic genome formed by regions with different evolutionary relationships. The region III (S1 sequence) is clearly divergent between them and lead to the classification of the strains in different lineages (GI-11 and GI-16) (Fig. 1c). Region II (ORF1b) and region IV (S2 sequence and ORFs 3a, 3b, E, M, 5a, 5b) of the South American genomes examined in this study are closely related with Euro-Asiatic strains of GI-16 lineage (Fig. 1b and d). Region I (ORF1a) and region V (ORF N) differ from other IBV strains and probably came from the ancestral South American GI-11 virus (Fig. 1a and e).

Our findings suggest that the mosaic genome of South American strains here analyzed arose by recombination between the GI-11 and

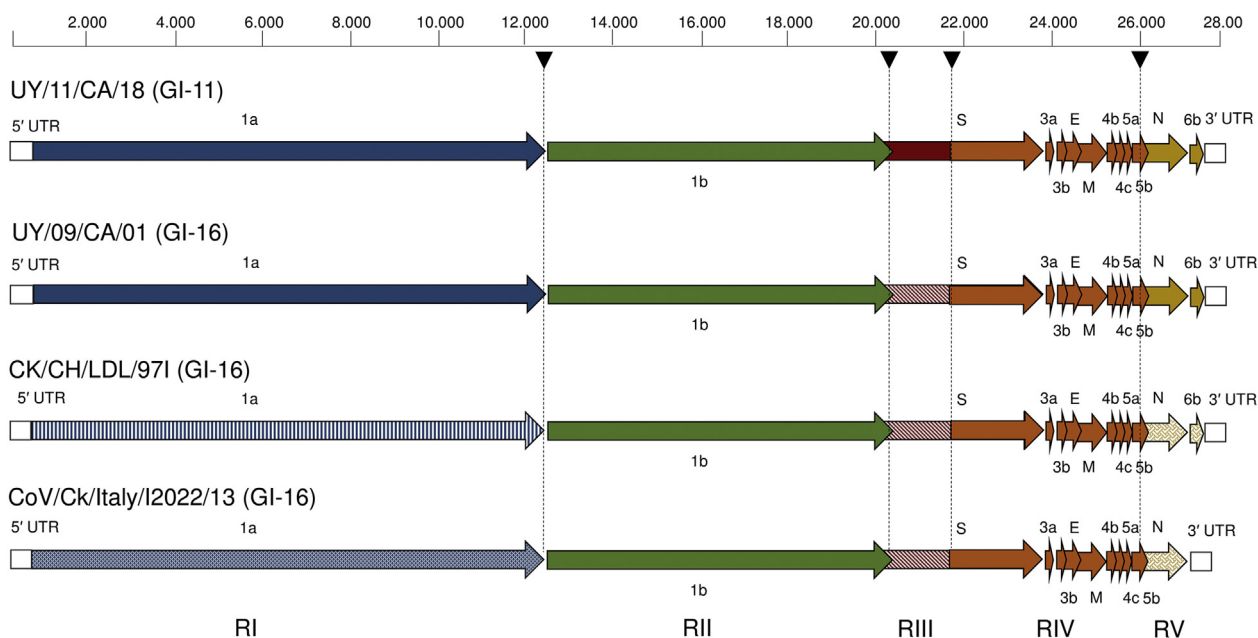


Fig. 2. Genomic organization of the GI-16 and GI-11 strains. Essential (1a, 1b, S, 3a, 3b, E, M, 5a, 5b and N) and non-essential ORFs (4b, 4c and 6b) are indicated. European strain does not have ORF6b. Recombinant points involved in the emergence of the South American strains are labeled with a head arrow. The five regions of the South American mosaic genomes are delimited by recombinant points (indicated with different colors). Divergence of the sequences are indicated by different shade of the same color. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

GI-16 lineages. Recombination is frequently described in IBV field strains (Dolz et al., 2008; Kottier et al., 1995; Lee and Jackwood, 2000) as a result of the large genome size, a replication machinery that dissociates and reassociates from the template RNA (site-assisted copy choice recombination), and the availability of full-length and subgenomic-length strands for template switching (Fu and Baric, 1992). Most recombination studies in IBV have been conducted using the S1 coding region, but relatively few analysis have been performed in a genomic context (Ammayappan and Vakharia, 2009; Thor et al., 2011; Xu et al., 2016).

The recombination in these South American strains involved four recombinant points that delimit the five genomic regions and were then involved in the generation of the mosaic genomes (Fig. 2). Notable, these breakpoints do not disrupt protein coding regions and two of them are located within genes in inter-ORF regions. Intragenic breakpoints are not very frequent in coronaviruses as recombination generally occurs at intergenic regions by specific template-switching events during the discontinuous transcription of subgenomic mRNAs (Simon-Loriere and Holmes, 2011).

We propose the following evolutionary scenario to explain the pattern of variability in the strains of the GI-16 and GI-11 lineages. This proposal supports the emergence and spreading of the GI-16 lineage in Eurasia before being introduced in South America (Marandino et al., 2015; Yu et al., 2001). This Euro Asiatic spreading of the GI-16 lineage involved sequence divergence (Fig. 1a) (Franzo et al., 2015), and changes in the structure of the genome as evidenced by the differences in the presence of the 6b ORF between the Chinese and Italian strains (Fig. 2).

In South America, the strain of the GI-16 lineage would have experienced extensive recombination with GI-11 ancestral strains to produce two recombinant lineages that have retained the S1 sequences of the parental viruses. Notable, both strains remain extremely similar in the rest of their chimeric genome that is comprised by the ORF1b, S2, 3a, 3b, E, M, 4b, 4c, 5a and 5b of the GI-16 Euro-Asiatic strains, and the 1a, N and 6b of a South American ancestral strain of the GI-11 lineage.

Our findings underscore the fact that different S1 lineages can exist with virtually identical genomes originated by recombination between ancestral strains. It is notable that the S1 protein had persisted as a single unit without the detection of recombination within the S1 coding region in all the strain already analyzed (Marandino et al., 2015). The fact that recombinant breakpoints occur outside the S1 region suggests that the S1 coding region is positively selected and transmitted as an intact unit to avoid disrupting favorable intra-protein interactions (Lefeuve et al., 2007). S1 is a predominant determinant of antigenicity of IBV and its variability could be related to the evasion of the immune response produced by the vaccine used for IBV control. Most South American countries apply vaccines with the Massachusetts serotype (GI-1 lineage) that is highly divergent from the field strains here analyzed (Fig. 1) (Marandino et al., 2015). In this context, the selection exerted by the continuous use of the Massachusetts vaccine, together with gene flow and local differentiation, have been driven forces for the successful persistence of the GI-11 and GI-16 lineages in South America.

Together, our results reveals that IBV dynamics in South America is singular as it involves two main lineages that have emerged by the transferring of genomic regions between viruses of different origin without disrupting the S1 coding region. These recombinant virus have been extraordinary successful, persisting in the continent for several years with a notorious wide geographic distribution. Our results reveal an interesting recombination pattern that emphasizes the importance of complete genomic characterization to understand viral emergence and evolutionary history.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.07.009>.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria – INIA Uruguay – under project number 319 of the Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), the Comisión Sectorial de Investigación Científica (Grant: CSIC I + D 594, 2012), Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, and the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Grant: POS_NAC_2013_1_11865). We thank Granjas Hepa Ltda. for collaboration.

References

- Abolnik, C., 2015. Genomic and single nucleotide polymorphism analysis of infectious bronchitis coronavirus. *Infect. Genet. Evol.* 32, 416–424.
- Abro, S.H., Renström, L.H.M., Ullman, K., Isaksson, M., Zohari, S., Jansson, D.S., et al., 2012. Emergence of novel strains of avian infectious bronchitis virus in Sweden. *Vet. Microbiol.* 155 (2–4), 237–246.
- Alvarado, A.I.R., Villegas, P., Mossos, N., Jackwood, M.W., 2005. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Colombia during 2003. *Avian Dis.* 49 (4), 494–499.
- Ammayappan, A., Vakharia, V.N., 2009. Complete nucleotide analysis of the structural genome of the infectious bronchitis virus strain Md27 reveals its mosaic nature. *Viruses* 1 (3), 1166–1177.
- Andrews, S., 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Blankenberg, D., Gordon, A., Von Kuster, G., Coraor, N., Taylor, J., Nekrutenko, A., et al., 2010. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics* 26 (14), 1783–1785.
- Callison, S., Hilt, D., Boynton, T.O., Sample, B.F., Robison, R., Swayne, D.E., et al., 2006. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *J. Virol. Methods* 138 (1–2), 60–65.
- Cavanagh, D., 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.* 38 (2), 281–297.
- Cavanagh, D., Davis, P.J., 1986. Coronavirus IBV: removal of spike glycopolyptide S1 by urea abolishes infectivity and haemagglutination but not attachment to cells. *J. Gen. Virol.* 67 (7), 1443–1448.
- Cavanagh, D., Davis, P.J., Cook, J.K., Li, D., Kant, A., Koch, G., 1992. Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 21 (1), 33–43.
- Chacon, J.L., Rodrigues, J.N., Assayag, M.S., Peloso, C., Pedrosa, A.C., Ferreira, A., 2011. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Pathol.* 40 (2), 153–162.
- Cook, J.K.A., Jackwood, M., Jones, R.C., 2012. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* 41 (3), 239–250.
- Dolz, R., Pujols, J., Ordóñez, G., Porta, R., Majó, N., 2008. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus in Spain over a fourteen-year period. *Virology* 374 (1), 50–59.
- Felippe, A., Silva, L., Santos, M., Spilki, F.R., Arns, C.W., 2010. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Dis.* 54 (4), 1191–1196.
- Franzo, G., Listorti, V., Naylor, C.J., Lupini, C., Laconi, A., Felice, V., et al., 2015. Molecular investigation of a full-length genome of a Q1-like IBV strain isolated in Italy in 2013. *Virus Res.* 210, 77–80.
- Fu, K., Baric, R.S., 1992. Evidence for variable rates of recombination in the MHV genome. *Virology* 189, 88–102.
- Goecks, J., Nekrutenko, A., Taylor, J., 2010. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* 11 (8), R86.
- Gough, R.E., Randall, C.J., Dagless, M., Alexander, D.J., Cox, W.J., Pearson, D., 1992. A “new” strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Vet. Rec.* 130 (22), 493–494.
- de Groot, 2012. Family Coronaviridae. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy*, 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp. 806–828.
- Han, Z., Sun, C., Yan, B., Zhang, X., Wang, Y., Li, C., et al., 2011. A 15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious bronchitis coronavirus in China. *Infect. Genet. Evol.* 11 (1), 190–200.
- Huang, Y.P., Lee, H.C., Cheng, M.C., Wang, C.H., 2004. S1 and N gene analysis of avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. *Avian Dis.* 48 (3), 581–589.
- Huang, Y., Lau, S., Woo, P., Yuen, K., 2008. CoVDB: a comprehensive database for comparative analysis of coronavirus genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 36, 504–511.
- Isakov, O., Borderia, A.V., Golan, D., Hamenahem, A., Celniker, G., Yoffe, L., et al., 2015. Deep sequencing analysis of viral infection and evolution allows rapid and detailed characterization of viral mutant spectrum. *Bioinformatics* 31 (13), 2141–2150.
- Kottier, S., Cavanagh, D., Britton, P., 1995. Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology* 213 (2), 569–580.
- Krueger, F., 2012. Trim Galore. Babraham Bioinformatics. http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/.
- Lai, M.M., Cavanagh, D., 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 48, 1–100.

- Lee, C.W., Jackwood, M.W., 2000. Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV. *Arch. Virol.* 145 (10), 2135–2148.
- Lefevre, P., Lett, J.M., Reynaud, B., Martin, D.P., 2007. Avoidance of protein fold disruption in natural virus recombinants. *PLoS Pathog.* 3 (11), e181.
- Liu, S., Kong, X., 2004. A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. *Avian Pathol.* 33 (3), 321–327.
- Liu, S., Zhang, X., Wang, Y., Li, C., Han, Z., Shao, Y., 2009. Molecular characterization and pathogenicity of infectious bronchitis coronaviruses: complicated evolution and epidemiology in China caused by cocirculation of multiple types of infectious bronchitis coronaviruses. *Intervirology* 52 (4), 223–234.
- Marandino, A., Pereda, A., Tomás, G., Hernández, M., Iraola, G., et al., 2015. Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus in South America. *J. Gen. Virol.* 96 (6), 1340–1346.
- Martin, D.P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., Muhire, B., 2015. RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1 (1), vev003.
- Mockett, A.P., Cavanagh, D., Brown, T.D., 1984. Monoclonal antibodies to the S1 spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M41. *J. Gen. Virol.* 65 (12), 2281–2286.
- Mondal, S.P., Cardona, C.J., 2007. Genotypic and phenotypic characterization of the California 99 (Cal99) variant of infectious bronchitis virus. *Virus Genes* 34 (3), 327–341.
- Naguib, M.M., Hoper, D., Arafat, A.S., Setta, A.M., Abed, M., Monne, I., et al., 2016. Full virus from Sudan reveals distinct spots of recombination. *Infect. Genet. Evol.* 46, 42–49.
- Pérez, R., Calleros, L., Marandino, A., Sarute, N., Iraola, G., Grecco, S., et al., 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.
- Quinteros, J.A., Markham, P.F., Lee, S.W., Hewson, K.A., Hartley, C.A., Legione, A.R., et al., 2015. Analysis of the complete genomic sequences of two virus subpopulations of the Australian infectious bronchitis virus vaccine VicS. *Avian Pathol.* 44 (3), 182–191.
- Rambaut, A., 2012. FigTree version 1.4.0. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Reddy, V., Theuns, S., Roukaerts, I., Zeller, M., Matthijnsens, J., Nauwynck, H.J., 2015. Genetic characterization of the Belgian nephropathogenic infectious bronchitis virus (NIBV) reference strain B1648. *Viruses* 7 (8), 4488–4506.
- Rimondi, A., Craig, M.I., Vagnozzi, A., König, G., Delamer, M., Pereda, A., 2009. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001–2008). *Avian Pathol.* 38 (2), 149–153.
- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., et al., 2011. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 29 (1), 24–26.
- Sesti, L., Sara, L., Alvarado, L., Mató, T., Palya, V., de Wit, J.J., 2014. Diagnostic, epidemiology and control of the Q1 infectious bronchitis virus (IBV) variant strain in Peru, Colombia, Argentina and Chile. *Proceedings of the VIII International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens*, Rauschholzhausen, Germany, pp. 56–64.
- Shalk, A., Hawin, M., 1931. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 78, 413.
- Simon-Lorière, E., Holmes, E.C., 2011. Why do RNA viruses recombine? *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (8), 617–626.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28 (10), 2731–2739.
- Tangudu, C., Olivares, H., Netland, J., Perlman, S., Gallagher, T., 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 6 accelerates murine coronavirus infections. *J. Virol.* 81 (3), 1220–1229.
- Tataje-Lavanda, L., Montalván, Á., Bueno, C., Requena, D., Fernández-Díaz, M., 2016. First evidence of detection of Asia/South America II (A/SaII) infectious bronchitis virus in a commercial broiler flock in Peru. *Vet. Rec. Case Rep.* 4, e000292.
- Thor, S.W., Hilt, D.A., Kissinger, J.C., Paterson, A.H., Jackwood, M.W., 2011. Recombination in avian gamma-coronavirus infectious bronchitis virus. *Viruses* 3 (9), 1777–1799.
- Toffan, A., Bonci, M., Bano, L., Valastro, V., Vascellari, M., Capua, I., 2013. Diagnostic and clinical observation on the infectious bronchitis virus strain Q1 in Italy. *Vet. Ital.* 49 (4), 347–355.
- USDA, 2014. Livestock and poultry: world markets and trade. <http://www.fas.usda.gov/data/livestock-and-poultry-world-markets-and-trade>.
- Valastro, V., Holmes, E.C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M.W., Cattoli, G., et al., 2016. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: an attempt to harmonize virus classification. *Infect. Genet. Evol.* 39, 349–364.
- Villarreal, A., Brandão, P.E., Chacón, J.L., Saldenberg, A., Assayag, M.S., Ferreira, A., 2007. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. *Avian Dis.* 51 (4), 974–978.
- Wang, S., Sundaram, J.P., Spiro, D., 2010. VIGOR, an annotation program for small viral genomes. *BMC Bioinf.* 11, 451.
- Xu, G., Liu, X.Y., Zhao, Y., Chen, Y., Zhao, J., Zhang, G.Z., 2016. Characterization and analysis of an infectious bronchitis virus strain isolated from southern China in 2018. *Virol. J.* 13, 40.
- Ye, Z.D., Wong, C.K., Li, P., Xie, Y., 2010. The role of SARS-CoV protein, ORF-6, in the induction of host cell death. *Hong Kong Med. J.* 16 (4), 22–26.
- Yu, L., Jiang, Y., Low, S., Wang, Z., Nam, S.J., Liu, W., et al., 2001. Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis.* 45 (2), 416–424.