TESIS DE MAESTRÍA

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Área Biología, Sub-área Genética

Desarrollo de metodologías de secuenciación masiva aplicadas al diagnóstico y caracterización de patógenos en la avicultura

Lic. Paula Perbolianachis

Director de Tesis: Dr. Ruben Pérez

Co-Directora de Tesis: Dra. Ana Marandino

Sección Genética Evolutiva

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Uruguay

Febrero de 2021

Índice

Índice I
Lista de abreviaturas IV
Resumen V
1. Introducción 1
1.1. Relevancia de las enfermedades infecciosas en el sector avícola 1
1.2. Principales patógenos virales en aves de corral 2
1.2.1. Virus respiratorios 2
1.2.2. Virus inmunosupresores 7
1.3. Técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico y la caracterización 11
1.4. Técnicas de Secuenciación Masiva 12
2. Hipótesis de trabajo 14
3. Objetivos 14
3.1. Objetivo general 14
3.2. Objetivos específicos 14
4. Materiales y Métodos 15
4.1. Estrategia de investigación 15
4.2. Obtención y análisis de secuencias 17
4.3. Diseño del panel de cebadores 18
Primera metodología 18
4.4. Generación de muestras artificiales 18
4.5. Evaluación de los paneles con muestras artificiales 22
4.5.1. Estandarización de ensayos de *singleplex* PCR 22
4.5.2. Estandarización de múltiplex PCR 23
4.5.3. Múltiplex PCR – *Next Generation Sequencing* 26
4.5.4. Ensamblaje de lecturas y análisis de secuencias 26
4.6. Aplicación de la múltiplex PCR-NGS a cepas de campo 27
4.6.1. Evaluación de métodos de extracción de ácidos nucleicos 27
4.6.2. Extracción de ácidos nucleicos de especímenes biológicos 28
4.6.3. Transcripción reversa 29
4.6.4. Múltiplex PCR – NGS 29
4.6.5. Ensamblaje de las secuencias obtenidas 30
4.7. Caracterización genética de las cepas 30
4.7.1. Análisis de secuencias consensos 30
4.7.2. Determinación de variantes nucleotídicas 30
4.8. Segunda estrategia metodológica de múltiplex PCR-NGS 31

5 Resultados ... 33
5.1. Evaluación del panel aviar ... 33
5.1.1. Estandarización de ensayos de *singleplex*-PCR ... 34
5.1.2. Estandarización de ensayos de múltiplex-PCR ... 34
5.1.3. Rendimiento en muestras artificiales ... 36
5.2. Aplicación a muestras de campo ... 38
5.2.1. Ensayos de extracción de ácidos nucleicos ... 38
5.2.2. Múltiplex PCR – NGS ... 39
5.2.2.1. Control de calidad de librerías para *NGS* ... 39
5.2.2.2. Determinación diagnóstica por técnicas moleculares ... 40
5.2.2.3. Caracterización de las secuencias ... 41
5.2.2.4. Caracterización genética de IBV ... 45
5.2.2.5. Caracterización genética de CAV ... 48
5.2.2.6. Caracterización genética de IBDV ... 50
5.2.2.7. Caracterización genética de ILTV ... 54
5.2.2.8. Caracterización genética de MDV ... 55
5.3. Segundo abordaje metodológico ... 56
6 Discusión ... 59
6.1. Ensayo diagnóstico basado en múltiplex PCR-NGS ... 59
6.1.1. Muestras artificiales ... 61
6.1.1.1. Diagnóstico en muestras artificiales ... 61
6.1.1.2. Ensayos de sensibilidad ... 62
6.2. Validación en especímenes biológicos ... 62
6.2.1. Puesta a punto de metodología de extracción ... 63
6.2.2. Muestras biológicas ... 63
6.2.2.1. Diagnóstico ... 63
6.2.2.2. Caracterización genética ... 65
6.3. Nueva metodología con cebadores con adaptadores ... 71
6.3.1. Fundamentación ... 71
6.3.2. Diseño del panel ... 72
6.3.3. Rendimiento en primeros abordajes ... 74
7 Conclusiones ... 76
8 Perspectivas ... 76
9 Bibliografía ... 77
10 Anexos ... 91
10.1. Extracción de ADN vacunal con *QIAamp® DNA Mini Kit* (*Qiagen*) ... 91
10.2. Extracción de ARN con *Quick-RNA™ Miniprep* (*Zymo Research*) ... 91

10.3. Extracción con *Quick-DNA/RNA^{TM} Pathogen Miniprep* (*Zymo Research*). 92
10.4. Retrotranscripción 93
10.5. Purificación de productos de PCR con *AMPure XP* (*Beckman*) 93
10.6. Juego de cebadores con secuencias adaptadoras 95

Lista de abreviaturas

µg	microgramo
µl	microlitro
µM	micromolar
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
AIV	virus de la influenza aviar
Ampv	metepneumovirus aviar
ARN	ácido ribonucleico
BHQ1	*Black Hole Quencher* 1
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
CAV	virus de la anemia infecciosa aviar
Ct	ciclo umbral
FAM	6-carboxifluoresceína
g	gramos
HEX	hexaclorofluoresceína
IBDV	virus de la bursitis infecciosa aviar
IBFQ	*Iowa blackfluorescent quencher*
IBV	virus de la bronquitis infecciosa aviar
ILTV	virus de la laringotraqueítis infecciosa
kb	kilobase
kg	kilogramos
kpb	mil pares de bases
MDV	virus de la Enfermedad de Marek
min	minutos
múltiplex PCR	PCR con múltiples juegos de cebadores
NDV	virus de la Enfermedad de Newcastle
ng	nanogramos
NGS	*next generation sequencing*, secuenciación masiva
°C	grados Celsius
ORF	marco abierto de lectura
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR en tiempo real (cuantitativo)
read	lectura de secuenciación
RFLP	análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción
RT	retrotranscripción
UV	ultra violeta
V_o	volumen inicial
ZEN	*quencher* interno

Resumen

El presente estudio describe el desarrollo de una nueva metodología de múltiplex PCR-secuenciación masiva para la simultánea detección y caracterización genética de patógenos virales que afectan a la producción avícola. Se diseñó un panel de cebadores para amplificar los virus respiratorios (virus de la influenza aviar, metapneumovirus aviar, virus de la bronquitis infecciosa, virus de la laringotraqueítis infecciosa, virus de la Enfermedad de Newcastle) e inmunosupresores (virus de la anemia infecciosa aviar, virus de la bursitis infecciosa aviar, virus de la Enfermedad de Marek) de mayor importancia clínica. Los amplicones se generaron en dos reacciones considerando la composición genómica de cada agente viral (ADN o ARN). Se secuenciaron conjuntamente los productos de amplificación obtenidos con los ensayos de múltiplex PCR de virus ADN y ARN en una plataforma Illumina. La factibilidad de este ensayo respecto a la identificación y la tipificación fue evaluada inicialmente con cepas vacunales de los diferentes agentes para luego aplicar a muestras de campo previamente diagnosticadas como positivas para alguno de los virus analizados. La metodología desarrollada fue sensible y efectiva, y resulta promisoria para futuros estudios de epidemiología molecular de virus que afectan la cría comercial de aves. Su aplicación en muestras de campo permitió la detección y caracterización de patógenos aviares como el virus de la Enfermedad de Marek y de la laringotraqueítis infecciosa por primera vez en Uruguay así como la detección de infecciones mixtas. El ensayo de múltiplex PCR seguido de secuenciación masiva es una herramienta potencial para el relevamiento y la tipificación en diagnósticos veterinarios. Este desarrollo puede aplicarse a otros patógenos incrementando el conocimiento de los microorganismos que afectan a la sanidad animal y humana.

1. Introducción

1.1. Relevancia de las enfermedades infecciosas en el sector avícola

Desde los años 60 el mercado mundial de carnes se ha acelerado de forma notable, en particular la de especies de ciclo productivo corto. La producción de carne de ave a nivel mundial creció en 2019 un 4% en comparación al año anterior y se estima que vuelva a crecer en el transcurso de 2020 en igual porcentaje (Gorga, 2019). Los principales productores en el año 2019 fueron China y Brasil, siendo Brasil quien lideró ampliamente las exportaciones con 3.8 millones de toneladas (USDA, 2020).

En Uruguay, el consumo de carne aviar representó 18,5 kg/habitante en el año 2019, sin observarse modificaciones sustanciales en los últimos 5 años. Este consumo constituyó el 21,3 % del consumo total de carne que fue liderada por la bovina (55,1 %) (INAC, 2019). Sin embargo, en los países limítrofes el consumo per cápita de carne aviar es superior, representando más de 40 kg/habitante (ABPA, 2020; MAGyP, 2019). La avicultura uruguaya tiene un amplio margen de crecimiento potencial mediante el incremento en las exportaciones y del consumo interno, para lo cual se requiere mantener y mejorar la cadena productiva avícola local.

Proyecciones recientemente publicadas indican que en el período comprendido entre 2020 y 2029 se incrementará el consumo de carne en un 12 %, con un crecimiento en el consumo mundial per cápita para el 2029 por encima del 1% en comparación con el período base, el cual se atribuye al mayor consumo de carne aviar (OECD-FAO, 2020). Acorde a las proyecciones, los países en desarrollo representarán la mayor parte del aumento total de la producción para 2029 y se prevé que la carne proveniente de aves de corral siga constituyendo el principal motor del crecimiento de la producción total de carne. Ésta carne es la seleccionada tanto por productores como consumidores debido a los bajos costos de producción, el ciclo productivo corto y bajos precios de los productos (OECD-FAO, 2020).

Los brotes de enfermedades en animales, las restricciones sanitarias y las políticas comerciales seguirán siendo los principales factores que impulsan la evolución y la dinámica de los mercados mundiales de la carne (OECD-FAO, 2020). Las enfermedades virales infecciosas respiratorias e inmunosupresoras conforman uno de los problemas sanitarios más persistentes en la industria avícola mundial y tienen el potencial de causar restricciones comerciales, así como dificultades sociales. La

influenza aviar de alta patogenicidad es un claro ejemplo de una enfermedad infecciosa que ha generado impactos negativos en la industria avícola (Fasina et al., 2008; Gashaw, 2020; OIE, 2020a).

Los animales infectados con agentes virales son potencialmente más susceptibles a otros patógenos virales, bacterianos y parasitarios lo que puede resultar en un aumento en la gravedad de los signos clínicos y en una respuesta inmune deficiente a la vacunación (Hoerr, 2010). Asimismo, las infecciones virales únicas o múltiples pueden inducir signos clínicos y/o lesiones similares, complicando las decisiones de diagnóstico y dificultando a los médicos veterinarios diferenciarlos clínicamente. Se necesita contar con técnicas de detección que sean rápidas, específicas y sensibles para diferenciar infecciones virales respiratorias e inmunosupresoras de aves de corral que conduzcan a la vigilancia de virus emergentes, al manejo de brotes y al control de enfermedades.

1.2. Principales patógenos virales en aves de corral

1.2.1. Virus respiratorios

La cría intensiva a las que están sometidas las aves de corral así como la susceptibilidad de las mismas, favorecen la transmisión de las enfermedades respiratorias. Los principales agentes virales involucrados en los síndromes respiratorio de aves son el virus de la bronquitis infecciosa aviar (*Infectious Bronchitis Virus*, IBV), el virus de la Enfermedad de Newcastle (*Newcastle Disease Virus*, NDV), el virus de la influenza aviar (*Avian Influenza Virus*, AIV), metapneumovirus aviar (*Avian Metapneumovirus*, aMPV) y el virus de la laringotraqueítis infecciosa (*Infectious Laryngotracheitis Virus*, ILTV). Actualmente, las enfermedades producto de infecciones con AIV, IBV, ILTV y NDV son de declaratoria obligatoria por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE) de vigor en 2020.

Las infecciones naturales mixtas con dos o más virus respiratorios son frecuentes en la producción intensiva de pollos (Zowalaty et al., 2011). Asimismo, las manifestaciones clínicas similares causadas por la infección de distintos virus respiratorios aviares dificultan en gran medida el diagnóstico etiológico.

1.2.1.1. Virus de la bronquitis infecciosa aviar

IBV pertenece al orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae* y subfamilia *Orthocoronavirinae* (ICTV, 2019). El nombre coronavirus deriva de la apariencia a una

corona solar de la envoltura viral cuando el virus es observado al microscopio electrónico. Los coronavirus infectan especies de aves y mamíferos, y la subfamilia *Orthocoronavirinae* se divide en cuatro géneros en base a criterios genéticos y antigénicos: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* (dentro del cual se encuentra IBV) y *Deltacoronavirus* (van Regenmortel et al., 2000; Woo et al., 2012).

IBV posee un genoma de ARN de cadena simple de sentido positivo de aproximadamente 27 kb. Codifica para cuatro proteínas estructurales, proteínas asociadas a la replicación y transcripción viral, y para un grupo de pequeñas proteínas no estructurales accesorias de función poco conocida y variables en presencia (Figura 1) (Lai & Cavanagh, 1997; Reddy et al., 2015; Weiss & Navas-Martin, 2005). Este virus afecta a aves de corral de todas las edades, siendo mucho más severo en pollos jóvenes, y causa lesiones en órganos respiratorios y urogenitales (Cavanagh, 2007). El virus se transmite por inhalación o contacto directo con objetos contaminados y la morbilidad suele ser del 100%; mientras que la mortalidad puede variar dependiendo del hospedador y la cepa viral infectante. Existen muchas variantes antigénicas diferentes del virus y, debido a la alta tasa de mutación, surgen nuevas variantes antigénicas en forma frecuente (Jackwood & de Wit, 2020). Si bien la inmunización vacunal contra IBV es vital en el control de la enfermedad, se reportan brotes en forma continua y sigue siendo considerada una epidemia a nivel mundial. La vigilancia de nuevas variantes genotípicas de IBV utilizando la secuencia de la glicoproteína de superficie (S) es de suma relevancia para desarrollar estrategias anti-IBV que sean efectivas (Zhou et al., 2017).

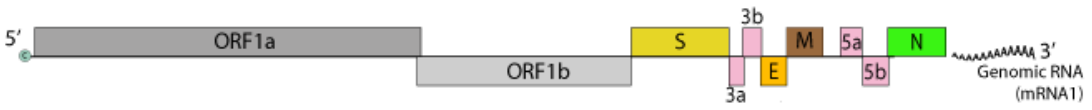


Figura 1. Representación esquemática del genoma de IBV. El gen 1 codifica para proteínas asociadas a la transcripción y replicación de los genes virales. El gen 2 codifica para la glicoproteína de superficie. El gen 3 codifica para proteínas no estructurales (ORFs 3a y 3b) y para la pequeña proteína de membrana (ORF E). El gen 4 codifica para la glicoproteína integral de membrana y en algunas cepas de IBV para proteínas no estructurales. El gen 5 codifica para las proteínas no estructurales 5a y 5b. El gen 6 codifica para la nucleoproteína y en algunas cepas para la proteína no estructural 6b. Ilustración tomada de https://viralzone.expasy.org/.

1.2.1.2. Virus de la Influenza aviar

La influenza aviar es causada por el virus de la influenza A, miembros de la familia *Orthomyxoviridae*, género *Alphainfluenzavirus* (ICTV, 2019). AIV posee ocho

segmentos de diferente tamaño de ARN monocatenario, de sentido negativo que codifican para al menos 10 proteínas virales (Figura 2) (Suarez, 2016). Los virus de la influenza A se han aislado de muchas especies animales, incluidos humanos, cerdos, caballos, mamíferos marinos y una amplia gama de aves domésticas y salvajes (Webster et al., 1992).

Los virus de la influenza A se clasifican en función de las propiedades antigénicas de las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) expresadas en la superficie de las partículas virales. Se han identificado dieciocho subtipos de HA y once de NA (CDC, 2019). AIV también se clasifica en dos categorías según la severidad de la enfermedad en pollos: de baja patogenicidad, responsable de infecciones asintomáticas o signos clínicos leves; y de alta patogenicidad, que se caracteriza por causar cuadros severos y altas tasas de mortalidad en las aves (Suarez, 2016). El reservorio natural de AIV son las aves silvestres, principalmente las acuáticas, que pueden transmitir el virus a las aves de corral a través del contacto directo (Suarez, 2016). AIV generalmente no es patogénico en las aves silvestres, sin embargo, puede causar una morbilidad y mortalidad significativas al transmitirse a otras especies, incluidas las aves y los mamíferos domésticos (Webster et al., 1992). Algunos subtipos de AIV pueden cruzar la barrera de las especies e infectar a los humanos (de Graaf & Fouchier, 2014; Medina & García-Sastre, 2011). Determinados subtipos de AIV pueden infectar directamente a los humanos y tienen el potencial de causar muertes y pandemias de influenza humana (Arzey et al., 2012; Cheng et al., 2011; Fouchier et al., 2004; Guan & Smith, 2013; Kalthoff et al., 2010; Tanner et al., 2015). No existen reportes de la presencia del virus de la influenza aviar en aves de corral de nuestro país (OIE, 2020b).

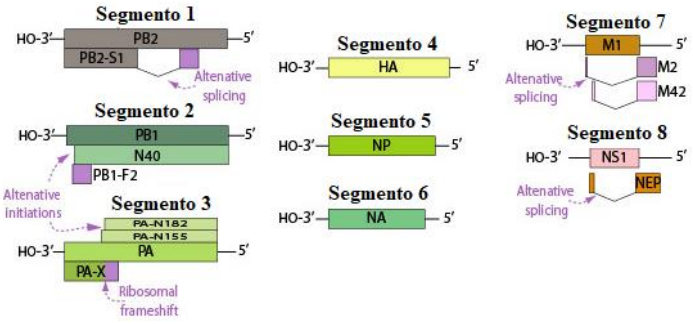


Figura 2. Se indican los segmentos genómicos PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M y NS de AIV. PB2, PB1 y PBA codifican para el complejo de la replicación. Los genes HA, NP, NA, M codifican para la hemaglutinina, la nucleocápside, la neuraminidasa y la proteína de la matriz,

respectivamente. El segmento genómico 8 codifica para proteínas no estructurales. Ilustración tomada de https://viralzone.expasy.org/.

1.2.1.3. Virus de la Enfermedad de Newcastle

NDV o paramyxovirus aviar 1 (APMV-1) pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, género *Orthoavulavirus*. Recientemente se conoce a NDV como *Avian orthoavulavirus-1* (AOAV-1) (ICTV, 2019). NDV posee un genoma de ARN simple hebra de sentido negativo, de aproximadamente 15 kb de longitud que codifica para seis proteínas (Figura 3) (Lamb & Parks, 2013).

Basados en estudios de patogenicidad en pollos libre de patógenos específicos en condiciones de laboratorio se han descrito los siguientes 5 patotipos (Beard & Hanson, 1984): i) velogénico viscerotrópico, virus responsables de enfermedades caracterizadas por infecciones letales agudas, generalmente con lesiones hemorrágicas en intestinos; ii) velogénico neurotrópico, cepas de NDV que causan alta mortalidad luego de enfermedades respiratorias y neurológicas, usualmente sin lesiones intestinales; iii) mesogénico, cepas que causan signos clínicos que afectan a los sistemas nervioso y respiratorio, de baja mortalidad; iv) lentogénico, de baja virulencia, causante de infecciones leves del sistema respiratorio; y v) asintomático entérico, causante de infecciones subclínicas del tracto gastrointestinal (Alexander, 2000).

Los países con producción avícola industrializada realizan grandes esfuerzos económicos para prevenir, evitar pérdidas importantes, erradicar o mantener el estatus libre de la Enfermedad de Newcastle (Leslie, 2000; Suarez et al., 2020). Es necesario efectuar una caracterización precisa de un brote de NDV a efectos del control sanitario y de la actividad comercial. En Uruguay, los problemas causados por NDV fueron mitigados mediante planes de bioseguridad y vacunación; el último episodio se reportó en el año 1984. Dada la ausencia de evidencia clínica de la afección posterior a 1984 y la serología negativa en los lotes de parrilleros no vacunados se aprobó la prohibición de la vacunación en estas aves (Decreto 177/000, 2000).

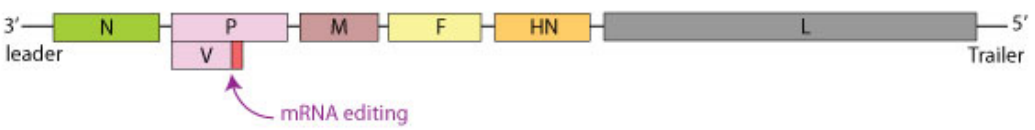


Figura 3. Representación esquemática del genoma de NDV. Se señalan los seis genes que codifican para la proteína de la nucleocápside (N), la fosfoproteína (P), la proteína de la matriz

(M), la proteína de fusión (F), la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la ARN polimerasa ARN dependiente (L), respectivamente. Ilustración tomada de https://viralzone.expasy.org/.

1.2.1.4. Metepneumovirus aviar

El metapneumovirus aviar, también conocido como *turkey rhinotracheitis virus*, es la especie tipo del género *Metapneumovirus*, clasificado en la familia *Pneumoviridae* dentro del orden *Mononegavirales* (ICTV, 2019). Posee un genoma de ARN de cadena simple, de sentido negativo de aproximadamente 14 kb de longitud (Suarez et al., 2020). La organización de los genes que codifican proteínas estructurales y no estructurales se presenta en la Figura 4. Se han diferenciado cuatro subgrupos principales basados en diferencias nucleotídica y en la secuencia de la proteína de unión G (Bäyon-Auboyer et al., 2000; Juhasz & Easton, 1994; Seal, 1998). El virus se ha detectado a nivel mundial y es considerado una importante amenaza de enfermedad, tanto para pavos como para pollos en muchas partes del mundo (Cook & Cavanagh, 2002; Seal, 1998).

Generalmente, la infección de aMPV en las ponedoras y reproductoras resulta únicamente en baja producción y mala calidad de la cáscara de los huevos. Sin embargo, en pollos de engorde las infecciones por aMPV a menudo se asocian con el síndrome de la cabeza hinchada (*swollen head síndrome*, SHS) que se caracteriza por la inflamación de los senos periorbitario e infraorbitario, tortícolis, desorientación y opistótonos, probablemente debido a los efectos del virus en el oído (Awang & Russell, 1990; Suarez et al., 2020). La infección con aMPV también causa una enfermedad leve del tracto respiratorio. Se observa una baja mortalidad en las infecciones no complicadas, pero puede incrementarse hasta un 25% como consecuencia de infecciones secundarias (bacterianas y/o virales) (Pattison et al., 1989).

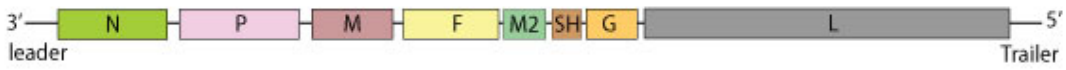


Figura 4. Representación esquemática de la organización genómica de aMPV. Los genes codifican las siguientes proteínas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M), proteína de fusión (F), proteínas de la segunda matriz (M2-1 y M2-2), pequeña proteína hidrófoba (SH), glucoproteína de superficie (G) y la ARN polimerasa dependiente de ARN de gran tamaño (L), respectivamente. Ilustración tomada de https://viralzone.expasy.org/.

1.2.1.5. Virus de la laringotraqueítis infecciosa

ILTV, también conocido como *Gallid alphaherpesvirus 1*, es un virus de la familia *Herpesviridae*, sub-familia *Alphaherpesvirinae* y género *Iltovirus* (ICTV, 2019). ILTV

posee un genoma de ADN de doble cadena de aproximadamente 150 kpb de longitud con 80 marcos abiertos de lectura (Figura 5) (Lee et al., 2011). Debido a la antigenicidad conservada de ILTV, la discriminación entre cepas se realiza principalmente a nivel genético con la amplificación por PCR de uno o múltiples genes virales seguido del análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) y/o secuenciación (García & Spatz, 2020).

Este virus puede causar graves pérdidas de producción debido a la mortalidad y/o la disminución de la producción de huevos. Se transmite fácilmente por aves y fómites infectados. La bioseguridad laxa, el transporte de aves infectadas y la propagación de desechos contaminados facilitan su propagación. Las formas epizoóticas graves de la infección se caracterizan por signos de dificultad respiratoria que incluyen el jadeo y la expectoración de moco sanguinolento, con alta morbilidad y mortalidad moderada. La infección se controla mediante la vacunación y la implementación de medidas de bioseguridad. Existen vacunas atenuadas y vacunas vectorizadas virales recombinantes que pueden usarse solas o combinadas. Debe considerarse un equilibrio entre la protección contra las enfermedades y los efectos secundarios de las vacunas (García & Spatz, 2020).

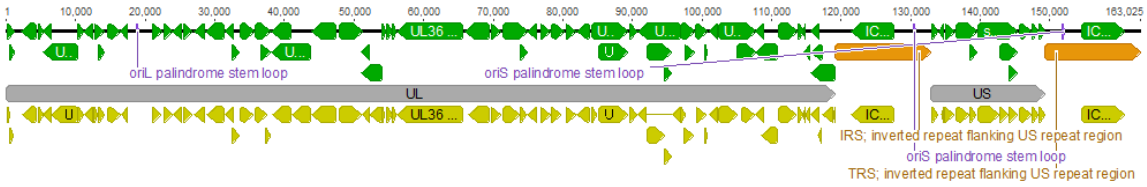


Figura 5. Organización genómica de ILTV. En verde se detallan los genes y en amarillo las secuencias codificantes.

1.2.2. Virus inmunosupresores

La inmunosupresión causa importantes pérdidas económicas en la avicultura mundial debido a que las aves inmunosuprimidas son más susceptibles a los patógenos virales y bacterianos, además de responder deficientemente a la vacunación, manifestar una menor eficiencia de conversión alimenticia y un retraso en el crecimiento (Zeng et al., 2015). Los factores causantes de la inmunosupresión aviar son múltiples, incluyendo las condiciones ambientales inadecuadas, presencia de toxinas en el alimento, estrés provocado por vacunación o por sobrepoblación de los galpones, y presencia de patógenos. Varios agentes virales infectan de forma directa a los órganos linfoides de

las aves. El virus de la bursitis infecciosa aviar (*Infectious Bursal Disease Virus*, IBDV), el virus de la anemia infecciosa (*Chicken Anemia Virus*, CAV) y el virus de la Enfermedad de Marek (*Marek's Disease Virus*, MDV) son ejemplos claros que se destacan por su prevalencia y agresividad a nivel mundial (Calnek, 2001; Sharma, 2000; Smyth et al., 2006).

1.2.2.1. Virus de la bursitis infecciosa aviar

IBDV es la única especie conocida del género *Avibirnavirus* dentro de la familia *Birnaviridae* (ICTV, 2019). El virus se conoce también como virus de Gumboro desde que se identificaron los primeros brotes en el área de Gumboro, Delaware, Estados Unidos (Cosgrove, 1962; Eterradossi & Saif, 2020). El genoma de IBDV está compuesto por dos segmentos de ARN doble hebra, el cual es característico de todos los birnavirus. El segmento genómico denominado A consta de alrededor de 3,3 kpb mientras que el segmento denominado B es de aproximadamente 2,9 kpb (Figura 6) (Eterradossi & Saif, 2020).

El IBDV causa una enfermedad inmunosupresora (bursitis infecciosa o Enfermedad de Gumboro) a través de la infección de los linfocitos B inmaduros en la bursa de Fabricius y de otros tejidos linfoides de los pollos. La inmunosupresión producto de IBDV puede promover una mayor susceptibilidad a infecciones secundarias por patógenos oportunistas que agravan la enfermedad así como provocar reacciones clínicas a partir de vacunas vivas atenuadas y reducir la eficacia de los programas de vacunación para otras enfermedades (Allan et al., 1972; Faragher et al., 1974; Jackwood, 2019; Rosenberger & Gelb, 1978). Las pérdidas económicas se deben principalmente a la morbilidad, la mortalidad, la baja eficiencia alimentaria, el crecimiento más lento, el peso desigual de las aves, los tiempos de comercialización más largos (Jackwood, 2019). Al momento se han descrito dos serotipos del virus, denominados serotipos 1 y 2, con variantes antigénicas en ambos. Sin embargo, solo los virus pertenecientes al serotipo 1 son patogénicos y está conformado por múltiples patotipos (Eterradossi & Saif, 2020). Actualmente, la Enfermedad de Gumboro es de declaración obligatoria por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE) de vigor en 2020.

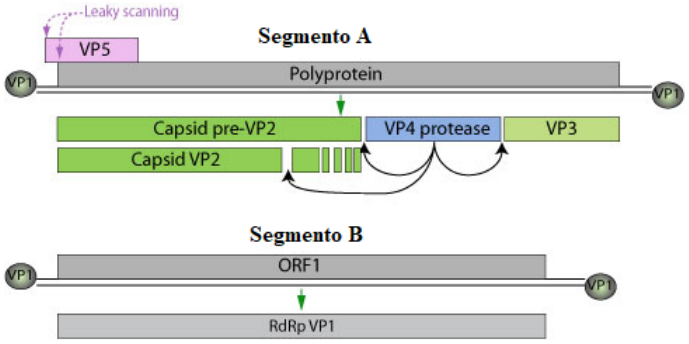


Figura 6. Esquema representativo de los segmentos genómicos A y B de IBDV. El segmento A presenta dos marcos abiertos de lectura parcialmente solapados codificantes de la proteína viral VP5 y la poliproteína que genera las proteínas virales VP2, VP3, VP4 y péptidos pequeños. El segmento B codifica para la proteína VP1 Ilustración tomada de https://viralzone.expasy.org/.

1.2.2.2. Virus de la anemia infecciosa aviar

Actualmente CAV es el único miembro del género *Gyrovirus* de la familia *Anelloviridae* (ICTV, 2019). Su genoma está compuesto por ADN simple hebra circular de polaridad negativa de aproximadamente 2,3 kb de longitud codificante de la proteína de la cápside (VP1), la proteína no estructural (VP2) y la proteína Apoptina (VP3) (Figura 7) (Schat & van Santen, 2020). Todas las cepas aisladas de CAV se agrupan en una única variante antigénica o serotipo (McNulty, 1991; Noteborn & Koch, 1995).

La infección en pollos recién nacidos que carecen de anticuerpos maternos puede causar atrofia grave del timo, reemplazo de células hematopoyéticas por tejido adiposo, anemia y dermatitis gangrenosa. La infección después de la desaparición de los anticuerpos maternos provoca una infección subclínica con inmunosupresión. Los pollos libres de patógenos específicos pueden ser positivos para el ADN viral en ausencia de anticuerpos y el virus puede reactivarse durante o después del desarrollo de la madurez sexual (Schat & van Santen, 2020).

Las medidas de bioseguridad así como las buenas prácticas de manejo y de la vacunación han sido las estrategias de control más confiable contra este virus (Fatoba & Adeleke, 2019).

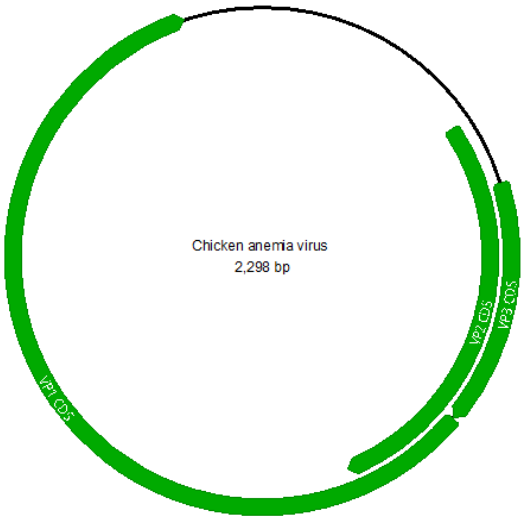


Figura 7. Representación esquemática del genoma de CAV. Está formado por tres marcos abiertos de lectura parcialmente solapados, codificantes de la proteína de la cápside VP1, la proteína no estructural VP2 y la proteína Apoptina VP3.

1.2.2.3. Virus de la Enfermedad de Marek

La Enfermedad de Marek es causada por el virus altamente contagioso *Gallid alphaherpesvirus 2*, tradicionalmente conocido como MDV, y se caracteriza por tumores linfoides generalizados de inicio rápido, inmunosupresión y parálisis (Nair et al., 2020). MDV pertenece al género *Mardivirus*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, familia *Herpesviridae* (ICTV, 2019). Posee un genoma lineal de ADN de doble cadena de aproximadamente 180 kpb de longitud compuesto por numerosos genes (Figura 8) (Nair et al., 2020).

Existe una amplia variación en el potencial patogénico de MDV, que se extiende desde muy baja virulencia a altamente virulento. La evolución en la patogenicidad en las últimas décadas condujo a la identificación de 4 patotipos del virus denominados suaves, virulentos, muy virulentos y muy virulentos plus (Nair et al., 2020). Este aumento de la patogenicidad está relacionado al incremento de la incidencia de tumores y a la aparición de síndromes neurológicos (Gimeno et al., 2002). El control de la enfermedad es un desafío debido a la naturaleza del virus, incluyendo su infección latente, la diseminación continua en las aves infectadas y la persistencia a largo plazo en el ambiente avícola. La vacunación y la mejora de la bioseguridad son fundamentales para el control de la Enfermedad de Marek (Nair et al., 2020).

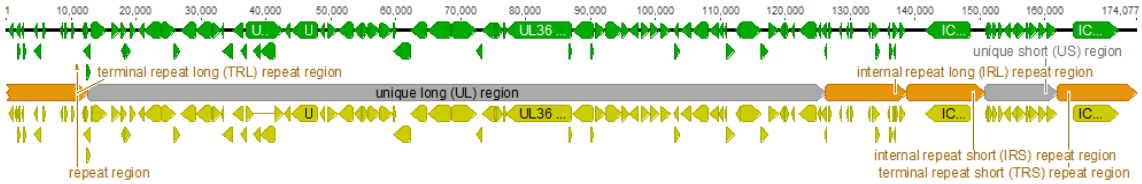


Figura 8. Esquema representativo de la estructura genómica de MDV. En verde se detallan los genes y en amarillo las secuencias codificantes.

1.3. Técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico y la caracterización

La detección y el diagnóstico diferencial de los virus respiratorios e inmunosupresores son de crucial importancia para la industria avícola. Los métodos convencionales, como el aislamiento del virus y las pruebas de neutralización del suero, suelen ser procedimientos laboriosos que requieren mucho tiempo (Zeng et al., 2015; Zuo et al., 2007). Con la finalidad de disminuir considerablemente los tiempos requeridos para un diagnóstico certero, que confiera la posibilidad de tomar las medidas de control necesarias para evitar la diseminación viral, es que se han implementado distintas técnicas de diagnóstico molecular que detectan virus aviares. Entre ellas, las técnicas de PCR a tiempo real (qPCR) son ampliamente utilizadas para el diagnóstico de virus que afectan la salud humana y animal por su capacidad de identificar, caracterizar y cuantificar los patógenos en forma rápida y sencilla (Andrade et al., 2018; Lu et al., 2020; Marandino et al., 2016; Techera et al., 2019; Tomás et al., 2012). Esta técnica se basa en la utilización de sondas específicas para marcadores nucleotídicos presentes en el sitio blanco de la sonda o analizando las curvas de disociación de los amplicones generados (Coleman & Tsongalis, 2017). Sin embargo, también se utilizan técnicas de PCR en tiempo final o la conjunción de PCR-RFLP (Hernández et al., 2011, 2012), ambas técnicas tienen la ventaja de no requerir equipos costosos para su ejecución pero presentan una sensibilidad menor respecto a la qPCR. Asimismo, otra técnica recientemente utilizada para el diagnóstico molecular viral en la industria avícola es la técnica de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (*loop-mediated isothermal amplification*, LAMP) que tiene el potencial de desarrollarse en el campo por ser de operación simple, reacción rápida y fácil detección (Chandrasekar et al., 2015; Han et al., 2019; Postel et al., 2010; Song et al., 2018).

Las técnicas moleculares de PCR en tiempo real y final están limitadas por su capacidad de detección de un número reducido de patógenos por reacción (Laamiri et al., 2018;

Tang et al., 2012; Zhang et al., 2019). Se han realizado esfuerzos para generar nuevas técnicas de detección rápida, rentable y de alto rendimiento para el diagnóstico simultáneo de infecciones virales respiratorias o inmunosupresoras en aves de corral. En esta línea, se han desarrollado técnicas de *Genome Lab GeXP* que integran ensayos de múltiplex RT-PCR/PCR con cebadores quimeras específicos de genes y cebadores universales marcados, resultando en productos marcados que son sometidos a la separación por electroforesis capilar (Li et al., 2018; Xie et al., 2014; Zeng et al., 2015). Otro abordaje de identificación simultánea de infecciones aviares mixtas es utilizando la tecnología *Luminex xTAG* la cual se basa en la hibridación de distintas microesferas marcadas con los productos de múltiplex PCR. Las microesferas magnéticas acopladas previamente a oligonucleótidos anti-TAG capturan el oligonucleótido coincidente presentado en el extremo 5´ de los amplicones de PCR (secuencia TAG). A continuación, se utiliza un lector de fluorescencia *Luminex* para realizar mediciones analíticas de los tipos de microesferas (Cong et al., 2018a; Cong et al., 2018b).

A pesar del desarrollo e implementación de las mencionadas técnicas moleculares de detección y/o caracterización viral es necesario, para una caracterización más profunda, la obtención de la secuencia de genes que contengan información filogenética que permitan identificar la variante viral infectante. Ello implica, por ejemplo, realizar una segunda ronda de amplificación correspondiente a las regiones genómicas necesarias y posterior secuenciación automática por Sanger (capilar). Finalmente se debe obtener y analizar las secuencias lo que genera un proceso que puede retrasar ampliamente los resultados.

1.4. Técnicas de Secuenciación Masiva

La adquisición de secuencias del genoma viral juega un papel crítico en la vigilancia, identificación y mitigación del riesgo de brotes de infección por virus (Houldcroft et al., 2017). El desarrollo de metodologías de secuenciación masiva (*next generation sequencing*, NGS) ha revolucionado la forma de obtener secuencias nucleotídicas para caracterizar diferentes organismos (Barzon et al., 2011; Capobianchi et al., 2013; Quiñones-Mateu et al., 2014). Estas técnicas se conocen también con los nombres de secuenciación profunda (*deep sequencing*) y secuenciación de segunda generación (*second generation*) (Quiñones-Mateu et al., 2014).

Las tecnologías de secuenciación profunda pueden generar información de tres a cuatro órdenes de magnitud superior que la secuenciación Sanger tradicional y son significativamente menos costosas, considerando el costo por nucleótido secuenciado (Liu et al., 2012; Loman et al., 2012). Se han desarrollado varios sistemas de secuenciación profunda, cada uno con características intrínsecas de rendimiento como el número de lecturas obtenidas, longitud de lectura, precisión, tiempo de ejecución, costo, entre otros (Quail et al., 2012).

A medida que se desarrolla la tecnología de secuenciación masiva, aumenta el número de aplicaciones tanto para las ciencias básicas como las aplicadas (Slatko et al., 2018). Algunos ejemplos de aplicación clínica incluyen estudios metagenómicos de patógenos, detección de mutaciones virales de baja frecuencia que confieren resistencia a medicamentos, medicina de precisión en el cáncer y estudios prenatales no invasivos (Breveglieri et al., 2019; Carpenter et al., 2019; Gu et al., 2019; Schlaberg et al., 2017; Simen et al., 2009; Tzou et al., 2018; Xuchao et al., 2019).

Un obstáculo para obtener información genómica del virus son las bajas cargas de ácido nucleico viral en las muestras clínicas frente al genoma del hospedero. Una fuente de enriquecimiento potencial es utilizar la técnica de NGS con una amplificación previa por PCR (No et al., 2019). La forma más simple para realizar diagnósticos y obtener secuencias informativas en un único paso es generar los amplicones de interés para el diagnóstico y la caracterización genética (múltiplex PCR), y posteriormente obtener la secuencia conjunta de todos estos amplicones por secuenciación masiva. Esto evita la generación de secuencias de otras regiones genómicas que no son informativas para el análisis, facilitando la interpretación de los resultados.

2. Hipótesis de trabajo

Las técnicas de secuenciación masiva pueden incorporarse como una herramienta biotecnológica adicional para complementar la identificación y caracterización de agentes infecciosos. Para la industria avícola en particular, la implementación de estas herramientas es un paso importante para la obtención de información epidemiológica y control de los patógenos que afectan la sanidad animal, reduciendo considerablemente los tiempos requeridos para el diagnóstico y la caracterización.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Desarrollar capacidades para el diagnóstico y caracterización genética de agentes virales aviares utilizando metodologías de secuenciación de última generación.

3.2. Objetivos específicos

- Estandarizar metodologías para la amplificación simultánea por PCR en tiempo final de diferentes regiones genómicas de virus aviares asociados a enfermedades inmunodepresoras y respiratorias en aves de corral.
- Estandarizar metodologías de secuenciación de última generación de los productos amplificados.
- Aplicar la metodología desarrollada en muestras de campo para establecer su desempeño en comparación con metodologías de PCR en tiempo final y en tiempo real ampliamente utilizadas en el laboratorio.

4. Materiales y Métodos

4.1. Estrategia de investigación

La estrategia utilizada en la presente Tesis radicó, en una primera instancia, en una búsqueda bibliográfica sobre regiones genómicas utilizadas en el diagnóstico y la caracterización genética de los diferentes agentes virales que afectan aves de corral. Se analizaron secuencias de genomas completos y parciales disponibles en GenBank de cada virus aviar para el análisis de sus secuencias genómicas. Se realizó una búsqueda de cebadores previamente publicados de cada virus y se evaluó *in silico* si eran específicos, efectivos y compatibles para amplificar las regiones blancos; en algunos casos fue necesario diseñar juegos de cebadores *de novo*.

Una vez obtenidos los cebadores, se continuó con su análisis mediante PCR en gradiente de temperatura empleando como molde cepas vacunales de cada agente viral u otro control positivo disponible en el laboratorio. Los controles se generaron por extracción de ácido nucleico con *kits* comerciales de las vacunas liofilizadas y reconstituidas en PBS o vacunas listas para su uso. En el caso de virus cuyos genomas están constituidos por ARN fue necesario retrotranscribirlos con hexanucleótidos al azar para la generación de ADN copia (ADNc) previo a la PCR.

Con las reacciones estandarizadas de PCR en tiempo final de cada juego de cebadores por separado (*singleplex* PCR), se procedió a realizar las múltiplex PCR en gradiente de temperaturas con la finalidad de evaluar su funcionamiento en conjunto. Las múltiplex PCR fueron divididas acorde a la composición genómica de cada agente viral en estudio, es decir, una múltiplex PCR de virus compuestos por genomas de ADN y otra de virus ARN. En esta etapa fue necesario generar muestras artificiales que oficien de controles positivos para todos los agentes virales implicados.

Las múltiplex PCR de muestras artificiales fueron sometidas a secuenciación masiva en la plataforma *Illumina MiSeq* del *Institut Pasteur* de Montevideo. Para ello, fue necesario generar las librerías de secuenciación requeridas por la plataforma. Se efectuó el análisis bioinformático de las lecturas (*reads*) generadas por cada virus, incluyendo la obtención de las secuencias consensos y la evaluación del número total de lecturas, profundidad y la longitud de cobertura por amplicón.

La metodología estandarizada primariamente con muestras artificiales fue aplicada a muestras aviares provenientes de establecimientos avícolas uruguayos con signos clínicos sugerentes de infección con virus respiratorios y/o inmunosupresores. En la Figura 9 se detalla el procedimiento de la metodología desarrollada para su aplicación a muestras biológicas.

A partir de un llamado de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de 2018 referente al fortalecimiento de equipamiento para investigación fue que la Universidad de la República adquirió la plataforma genómica MiniSeq. Esta plataforma permite secuenciar fragmentos de hasta 300 pb frente a los 600 pb que permite la plataforma MiSeq. Teniendo en cuenta que mi maestría se enfoca en generar una metodología diagnóstica de patógenos virales aviares por secuenciación masiva que fuera independiente de la generación de librerías por *kits* comerciales y que los amplicones generados en una primera instancia en las reacciones de múltiplex PCR son de aproximadamente 500 pb, es que propusimos diseñar nuevamente los cebadores de la metodología con el fin de generar, como máximo, fragmentos de 300 pb que sean utilizados por la plataforma MiniSeq que se empleará de aquí en adelante.

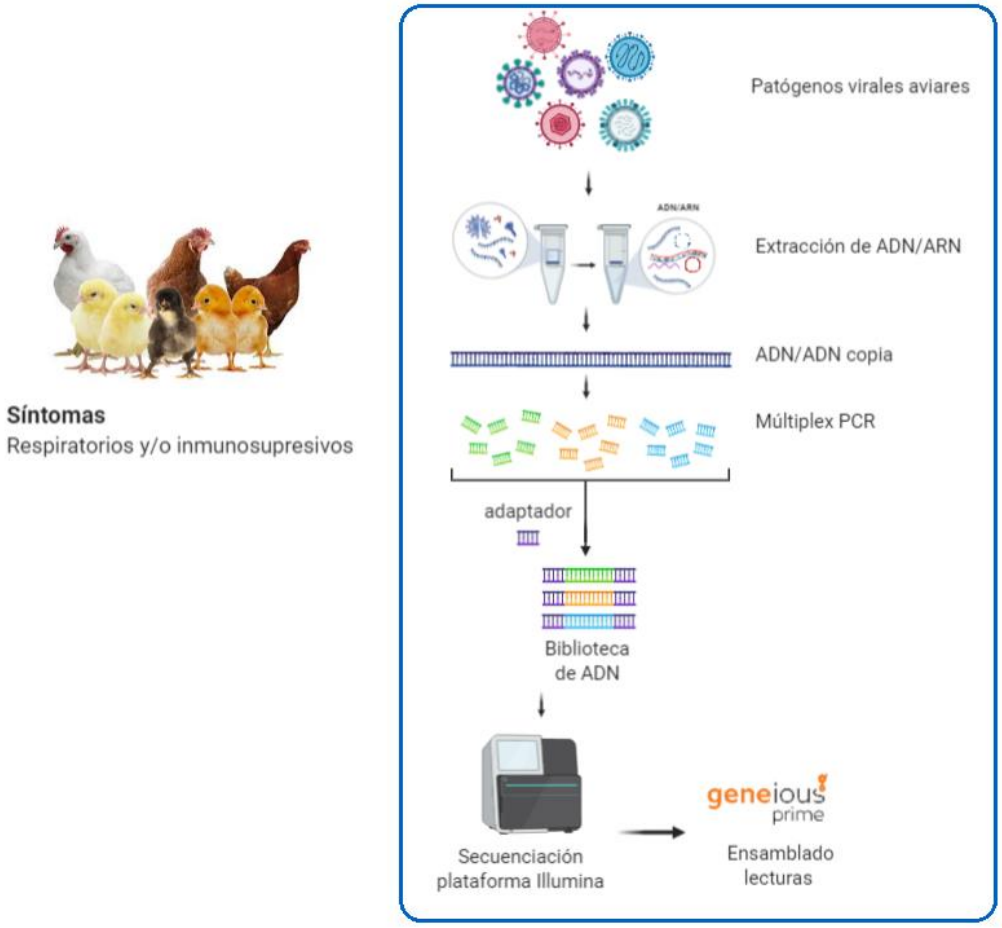


Figura 9. Descripción metodológica del ensayo desarrollado de múltiplex PCR acoplado a secuenciación masiva para la detección y caracterización de patógenos virales aviares respiratorios e inmunosupresores. Ilustración realizada en BioRender; imagen de pollos tomada de *Hybrid Poultry Farm*.

4.2. Obtención y análisis de secuencias

Con el objeto de contar con información de las diferentes variantes de todos los virus aviares en estudio, se realizó el análisis de un gran número de secuencias nucleotídicas. A tales efectos, se obtuvieron alineamientos con las secuencias disponibles en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) implementando la herramienta MAFFT (Katoh et al., 2002) en XSEDE v.7.402 del portal *Cipres Science Gateway* (Miller et al., 2010).

4.3. Diseño del panel de cebadores

Primera metodología

Se diseñaron y evaluaron 10 juegos de cebadores divididos en dos grupos (*pools*) para la detección de los principales virus respiratorios e inmunosupresores que afectan a la avicultura: AIV, aMPV, CAV, IBDV, IBV, ILTV, MDV y NDV. Los cebadores se obtuvieron de secuencias publicadas anteriormente o se diseñaron de *novo*. Para los virus IBDV e IBV se emplearon dos juegos de cebadores para disponer de distintas regiones genómicas. En el caso de IBDV cada juego de cebadores presenta especificidad por un segmento distinto del genoma viral, mientras que para IBV cada juego hibrida con los genes codificantes de la nucleoproteína viral (N) y de la glicoproteína de superficie (S).

Se evaluó la especificidad *in silico* de la totalidad de los cebadores con el algoritmo BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) que detecta homología con todas las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI. La herramienta OligoAnalyzer de la empresa *Integrated DNA Technologies* (https://www.idtdna.com) se utilizó para analizar las posibles estructuras secundarias y dimerizaciones de los cebadores, así como la compatibilidad de cada par de cebadores.

4.4. Generación de muestras artificiales

El rendimiento de la metodología para la detección y caracterización de los agentes virales se evaluó primariamente con vacunas comerciales (aMPV, CAV, IBDV, IBV, ILTV, MDV y NDV) y con un control de ARN de una cepa del virus de influenza (Tabla 1).

La extracción de ácido nucleico de las cepas vacunales de los virus constituidos por genomas de ADN se realizó con el *kit* comercial *QIAamp® DNA Mini Kit* (*Qiagen*), siguiendo el protocolo de *DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)* (Anexo 10.1). En el caso de CAV e ILTV se partió de 0.02 g de vacuna liofilizada resuspendida en 200 µl de PBS mientras que para MDV se usó una mezcla de 100 µl de vacuna y 100 µl de PBS.

La extracción de ácido nucleico de las cepas vacunales de los virus constituidos por genomas de ARN se realizó con el *kit* de extracción *Quick-RNA™ Miniprep* (*Zymo*

Research), siguiendo las recomendaciones del fabricante (anexo 10.2), partiendo de 0.02 g de vacuna liofilizada resuspendida en 200 µl de PBS. El ARN extraído fue retrotranscripto a ADNc con el *kit RevertAid*^{TM} *Reverse Transcriptase* (*Thermo Scientific*), utilizando 10 µl de ARN y hexanucleótidos al azar (anexo 10.4).

Los ácidos nucleicos extraídos, y eventualmente retrotranscriptos, se amplificaron por PCR o qPCR para evaluar el correcto procedimiento de extracción de ácidos nucleicos y generación de ADNc (Tabla 2). Las qPCR se realizaron en reacciones únicas de 20 µl que contenían *1× HotRox Master Mix* (*Bioron*), 3,5 mM $MgCl_2$, 0,3 µM de cada cebador, 0,1 µM de sonda y 1 µl de molde (ADN o ADNc). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador *ABI Prism 7500* (*Applied Biosystems*) e incluyeron una lectura pre-PCR de 1 minuto a 60°C, una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C, y una lectura post-PCR de 1 minuto a 60°C. La amplificación de aMPV fue realizada a tiempo final en un volumen de reacción de 15 µl que contenía 0,067 U/µl *Taq DNA Polymerase recombinant* de *Thermo Scientific*, Buffer 1×, 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM de cada cebador y 1 µl de ADNc de molde. El ciclado de la amplificación de aMPV incluyó una etapa de desnaturalización inicial a 95ºC por 5 minutos, 40 ciclos de 30 segundos a 95ºC, 30 segundos a 56ºC y 30 segundos a 72ºC. Se incluyó una etapa de extensión final a 72ºC durante 5 minutos.

El ADN y el ADNc provenientes de los controles positivos se utilizaron para generar muestras artificiales simulando muestras positivas para los virus en estudio, una con los virus de ADN y otra con los virus ARN. La concentración de cada genoma viral de estas muestras artificiales se ajustó de forma equivalente en base a los valores del ciclo umbral (Ct, *Cycle threshold*) resultantes de la (RT)-qPCR. Las concentraciones que producen un valor similar del Ct (Ct = 23) se consideraron equivalentes al momento de la generación de las muestras artificiales. Al no disponer de un ensayo validado de RT-qPCR de aMPV se seleccionó una concentración aproximada en función de la amplificación por PCR tradicional (Tabla 3).

Se generaron dos muestras artificiales adicionales provenientes de vacunas de virus ADN con diferentes concentraciones de genomas de CAV para evaluar la sensibilidad de la múltiplex PCR-NGS con respecto a un ensayo validado de detección de CAV por qPCR (Techera et al., 2019). Específicamente se disminuyó el número de copias del

genoma de CAV 100 y 10.000 veces respecto a ILTV y MDV para el análisis de sensibilidad de ambos ensayos moleculares de detección (Tabla 3).

Tabla 1. Cepas utilizadas como controles positivos para la estandarización de la metodología de múltiplex PCR-NGS.

Virus	Cepa	Vacuna
AIV[a]	-	-
aMPV	Clone K	Poulvac® TRT Zoetis
CAV	26P4	Nobilis®
IBDV	D78	Nobilis®
IBV	BR-I	Cevac® IBras L
ILTV	SA2 y A20	Pfizer
MDV	CVI988	Rispens
NDV	Hitchner B1	Nobilis®

[a] ADNc de un cepa del virus influenza aviar.

Tabla 2. Juegos de cebadores utilizados para la detección y cuantificación de los agentes virales en reacciones validadas de PCR en tiempo final y real.

Virus	Gen diana	Tamaño del amplicón (pb)	Oligonucleótido	Secuencia 5´→ 3´	Referencia
AIV	M	100	M25	AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG	Spackman et al. (2003)
			M124	TGCAAAAACATCTTCAAGTCTCTG	
			M64	FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BHQ1	
aMPV	F	385	F437	AGGCWGTRTCCACATTAG	Desarrollado en el laboratorio; sin publicar.
			R821	GGSAGTTGYACCATATAMAC	
CAV	VP2-VP3	127	CAV-F630	ACGCTAAGATCTGCAACTG	Techera et al. (2019)
			CAV-R756	TTACCCTGTACTCGGAGG	
			CAV-Pb	HEX-CAAGCCTCC-ZEN- CTCGAAGAAGC-3IABkFQ	
IBDV	VP5-VP2	111	F143	CMAGATCAAACCCAACAGATTGT	Techera et al. (2019)
			R253	CTCTGACCTGAGAGTGTGCTTCTC	
			S175	FAM-ACGGAGCCT-ZEN-TCTGATGCCAACAACC-IBFQ	
IBV	5´ UTR	143	IBV-F391	GCTTTTGAGCCTAGCGTT	Callison et al. (2006)
			IBV-R533	GCCATGTTGTCACTGTCTATTG	
			IBV 5´ UTR	VIC-CACCACCAGACCTGTCACCTC-TAMRA	
ILTV	Glicoproteína C	103	ILTV_qF_Gly-C	CCTTGCGTTTGAATTTTTCTG	Callison et al. (2007)
			ILTV_qR_Gly-C	TTCGTGGGTTAGAGGTCTGT	
			ILTV_Pb_Gly-C	FAM-CAGCTCGGTGACCCCATTCTA-BHQ1	
MDV	pp38	99	MDV_qF_pp38	CGCATACCGACTTTCGTCAA	Baigent et al. (2016)
			MDV_qR_pp38	GAGCTAACCGGAGAGGGAGA	
			MDV_Pb_pp38	FAM-GCTACCGCCTGAGCC-BHQ1	
NDV	M	121	M +4100	AGTGATGTGCTCGGACCTTC	Wise et al. (2004)
			M +4169	FAM-TTCTCTAGC-ZEN-GTGGGACAGCCTGC-3IABkFQ	
			M -4220	CCTGAGGAGAGGCATTTGCTA	

Tabla 3. Configuración de las muestras artificiales generadas para la evaluación de la metodología desarrollada.

Muestras Artificiales	Composición
ARN	Similar concentración de genomas de los virus ARN [a] (AIV, aMPV, IBDV, IBV y NDV).
ADN	Similar concentración de genomas de los virus ADN [a] (CAV, ILTV y MDV).
ADN CAV 1/100	Similar concentración de genomas de ILTV y MDV; con 100 veces menos de copias genómicas de CAV [a].
ADN CAV 1/10.000	Similar concentración de genomas de ILTV y MDV; con 10.000 veces menos de copias genómicas de CAV [a].

[a] Concentraciones basadas en el análisis de valores de Cts obtenidos por qPCR considerando iguales eficiencias de reacción.

4.5. Evaluación de los paneles con muestras artificiales

Las cuatro muestras artificiales generadas (Tabla 3) fueron empleadas para el subsecuente análisis de la metodología de múltiplex PCR acoplada a secuenciación masiva (múltiplex PCR-NGS, *Next Generation Sequencing*) con los paneles de cebadores seleccionados. Para ello fue necesario previamente evaluar y estandarizar cada juego de cebadores por separado (*singleplex* PCR) y proseguir con la puesta a punto de las reacciones de múltiplex PCR.

4.5.1. Estandarización de ensayos de *singleplex* PCR

Se estandarizaron las *singleplex* PCR empleando los controles positivos provenientes de la sección 4.4 y realizando las reacciones de PCR en gradiente de temperatura de hibridación de los cebadores. Se utilizó el termociclador con gradiente de temperatura "CG1/96" (*Corbett Research*); las concentraciones de los reactivos utilizadas en las reacciones de PCR y las condiciones del ciclado se detallan en las Tablas 4 y 5.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% teñidos con bromuro de etidio (0,4 µg/ml), sometidos a un campo eléctrico constante (90 voltios, 110 mA) en buffer TAE 1×. Los geles se visualizaron con un transiluminador de UV y se documentaron por medio de fotografía digital.

Tabla 4. Concentraciones de los reactivos de las reacciones de PCR en tiempo final de cada juego de cebadores.

Reactivos	**C_o**	**C_f**	**V_o (µl)/tubo**
H_2O			10,2
Buffer	10×	1×	1,5
$MgCl_2$	25 mM	2 mM	1,2
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,3
Taq polimerasa[a]	5 U/µl	0,067 U/µl	0,2
Cebador sentido	10 µM	0,2 µM	0,3
Cebador antisentido	10 µM	0,2 µM	0,3
ADNc/ADN			1

[a] *Taq DNA Polymerase recombinant* de *Thermo Scientific*.

Tabla 5. Protocolo de ciclados de las *singleplex* PCRs en gradiente de temperatura de hibridación de los cebadores.

Etapa	**Temperatura**	**Tiempo**	**Ciclos**
Desnaturalización inicial	95ºC	5 minutos	1
Desnaturalización	95ºC	30 segundos	35 ciclos
Hibridación	55, 57, 59, 61 y 63ºC	30 segundos	
Extensión	72ºC	50 segundos	
Extensión final	72ºC	5 minutos	1

4.5.2. Estandarización de múltiplex PCR

Durante la estandarización de la multiplex PCR para la detección y caracterización de virus ADN se evaluó el rendimiento de tres enzimas ADN polimerasas termoestables: *Taq DNA Polymerase recombinant* (*Thermo Scientific*), *DreamTaq DNA Polymerase* (*Thermo Scientific*) e *Immolase DNA polymerase* del *ImmoMix*™ (*Bioline*). Para cada caso se evaluó la amplificación múltiple en un gradiente de temperatura de hibridación de 61, 63 y 65°C; y se utilizaron como molde las muestras artificiales con cantidades equivalentes de copias genómicas virales (Tablas 6 y 7).

La estandarización de la múltiplex PCR de los virus cuyos genomas están constituidos por ARN implicó analizar distintas concentraciones de cebadores (Tabla 8). En ambas condiciones se empleó el mismo protocolo de ciclado en el que se evaluaron distintas temperaturas de hibridación de los cebadores empleando la muestra artificial generada uniendo los ADNc de virus compuestos por genomas de ARN (Tabla 9).

Todos los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio (0,4 µg/ml), sometidos a un campo eléctrico

constante (90 voltios, 110 mA) en buffer TAE 1× durante 90 minutos. Los geles se visualizaron con un transiluminador de UV y se documentaron por medio de fotografía digital. Eventualmente, la condición seleccionada se evaluó con el *Fragment Analyzer* para obtener mayor detalle de los distintos productos de PCR.

Tabla 6. Concentraciones de los reactivos de las reacciones de múltiplex PCR de los virus ADN con las enzimas comerciales *Taq DNA Polymerase recombinant* (*Thermo Scientific*), *DreamTaq DNA Polymerase* (*Thermo Scientific*) e *ImmoMix™* (*Bioline*).

Reactivos	**C_f**	**Enzimas analizadas**		
		Taq polimerase **V_o (µl)/tubo**	***DreamTaq*** **V_o (µl)/tubo**	***Immolase polymerase*** **V_o (µl)/tubo**
H_2O				7,5
Taq polimerasa[a]	0,067 U/µl	0,33	-	-
Buffer[a]	1×	2,5	-	-
$MgCl_2$[a]	2mM	2	-	-
DreamTaq[b]	1U	-	0,2	-
Buffer[b]	1×	-	2	-
ImmoMix™ [c]	1×	-	-	12,5
dNTPs	0,2 mM	0,5	0,5	-
MDV R pp38	0,2 µM	0,5	0,5	0,5
MDV F pp38	0,2 µM	0,5	0,5	0,5
CAV 7	0,2 µM	0,5	0,5	0,5
CAV 4	0,2 µM	0,5	0,5	0,5
ILTV ICP4 R4	0,2 µM	0,5	0,5	0,5
ILTV ICP4 1F	0,2 µM	0,5	0,5	0,5
ADN		2	2	2

[a] *Taq DNA Polymerase recombinant* de *Thermo Scientific.*
[b] *DreamTaq DNA Polymerase* (*Thermo Scientific*),10× *DreamTaq Buffer* contiene 20 mM de $MgCl_2$.
[c] *ImmoMix™* (*Bioline*), contiene 3mM de $MgCl_2$.

Tabla 7. Protocolo de ciclados de las múltiplex PCRs de virus compuestos por genomas de ADN en gradiente de temperatura de hibridación de los cebadores.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
a) Taq polimerase			
Desnaturalización inicial	95ºC	5 minutos	1
Desnaturalización	95ºC	30 segundos	35 ciclos
Hibridación	61, 63 y 65°C	30 segundos	
Extensión	72ºC	40 segundos	
Extensión final	72ºC	5 minutos	1
b) DreamTaq			
Desnaturalización inicial	95ºC	5 minutos	1
Desnaturalización	95ºC	30 segundos	35 ciclos
Hibridación	61, 63 y 65°C	30 segundos	
Extensión	72ºC	40 segundos	
Extensión final	72ºC	5 minutos	1
c) Immolase polymerase			
Desnaturalización inicial	95ºC	10 minutos	1
Desnaturalización	95ºC	30 segundos	35 ciclos
Hibridación	61, 63 y 65°C	30 segundos	
Extensión	72ºC	20 segundos	
Extensión final	72ºC	5 minutos	1

Tabla 8. Concentraciones analizadas durante la puesta a punto de la múltiplex PCR de los virus ARN en la que se utilizó el *kit* comercial *ImmoMix*^{TM} (*Bioline*).

	Condición 1		Condición 2	
Reactivos	**C_f**	**V_o (µl)/tubo**	**C_f**	**V_o (µl)/tubo**
H_2O		3,5		1,9
ImmoMix™	1×	12,5	1×	12,5
IBV Sf 1237	0,2 µM	0,5	0,4 µM	1
IBV Sr 1795	0,2 µM	0,5	0,4 µM	1
IBV N1	0,2 µM	0,5	0,2 µM	0,5
IBV N2	0,2 µM	0,5	0,2 µM	0,5
IBDV P3	0,2 µM	0,5	0,2 µM	0,5
IBDV P4	0,2 µM	0,5	0,2 µM	0,5
IBDV MBF	0,2 µM	0,5	0,2 µM	0,5
IBDV MBR	0,2 µM	0,5	0,2 µM	0,5
AIV NPr 1529	0,2 µM	0,5	0,32 µM	0,8
AIV NPf 1200	0,2 µM	0,5	0,32 µM	0,8
aMPV fGa	0,2 µM	0,5	0,2 µM	0,5
aMPV rGy	0,2 µM	0,5	0,2 µM	0,5
NDV Fw 455	0,2 µM	0,5	0,2 µM	0,5
NDV Rv 934	0,2 µM	0,5	0,2 µM	0,5
ADNc		2		2

Tabla 9. Protocolo de ciclados de las múltiplex PCRs de virus compuestos por genomas de ARN en gradiente de temperatura de hibridación de los cebadores.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95ºC	10 minutos	1
Desnaturalización	95ºC	30 segundos	35 ciclos
Hibridación	51, 53, 55, 57, 59 y 61ºC	30 segundos	
Extensión	72ºC	20 segundos	
Extensión final	72ºC	5 minutos	1

4.5.3. Múltiplex PCR – *Next Generation Sequencing*

Luego de estandarizadas las múltiplex PCR se procedió a aplicar la metodología de múltiplex PCR-NGS a las cuatro muestras artificiales generadas (Tabla 3). En el caso de los virus cuyos genomas están compuestos por ARN se realizaron dos múltiplex PCR (condición 2 de la Tabla 8) en las que se varió las temperaturas de hibridación de los cebadores (51 y 55°C). En cambio, las múltiplex PCR para la detección de virus ADN de las tres muestras artificiales se realizaron con la misma temperatura de hibridación de los cebadores (61°C).

Se purificaron los productos de múltiplex PCR con las esferas magnéticas *AMPure XP* (*Beckman*) (Anexo 10.5) y se cuantificó el ADN en el fluorómetro *Qubit* con el *kit Qubit dsDNA HS* (*High Sensitivity*) (*Invitrogen*).

Las librerías se generaron por tagmentación del ADN doble hebra y adición de las secuencias adaptadoras en los extremos de los fragmentos con el *kit* comercial *Nextera XT DNA Sample Preparation kit* (*Illumina*) a partir de 1 ng de los productos purificados de múltiplex PCR. Las librerías indexadas se purificaron con *AMPure XP* (*Beckman*) y se cuantificaron en *Qubit* con el *kit Qubit dsDNA HS* (*High Sensitivity*) (*Invitrogen*). Se cargaron las librerías en el cartucho *MiSeq Reagent Kit v2* (*500 cycle*) (*Illumina*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó en la plataforma *Illumina MiSeq* del *Institut Pasteur* de Montevideo a cargo del Dr. Gonzalo Greif. Cada lectura pareada (*paired-end*) se asignó a su muestra correspondiente de acuerdo con el índex previamente integrado.

4.5.4. Ensamblaje de lecturas y análisis de secuencias

Las lecturas de secuencias obtenidas por la plataforma MiSeq se analizaron con el programa Geneious Prime 2019.2.1 (https://www.geneious.com). Las secuencias adaptadoras de cada extremo de las lecturas crudas fueron eliminadas (*trimming*). Se

excluyeron del análisis las lecturas menores de 50 pb y las de baja calidad con valores de calidad menores a 30. Las lecturas resultantes se ensamblaron sobre una plantilla personalizada y anotada, elaborada mediante la concatenación de las secuencias de los amplicones específicos de las cepas de los ocho virus (AB829738.1, AF499929.1, AF499930.1, AJ890284.1, DQ530348.1, EU104908.1, JN872151.1, KY626044.1 y NC_039231.1). Se realizó el ensamblaje con los parámetros predeterminados del Geneious Prime 2019.2.1 (https://www.geneious.com). Las secuencias se inspeccionaron visualmente y se modificaron manualmente. El algoritmo BLASTn se empleó para la búsqueda de similitud de secuencias en las bases de datos públicas.

4.6. Aplicación de la múltiplex PCR-NGS a cepas de campo

Se aplicó la metodología estandarizada con los controles positivos de todos los agentes virales involucrados en este estudio a muestras uruguayas de campo con signos clínicos respiratorios y/o de inmunosupresión. Para ello, se consideró el tropismo de cada agente viral con el fin de seleccionar los órganos que se analizarán en su búsqueda.

Contemplando la composición genómica de los agentes virales fue necesaria, en una primera instancia, la puesta a punto de una metodología de extracción de ácidos nucleicos con *kits* comerciales que permitan la extracción simultánea de ADN y ARN.

4.6.1. Evaluación de métodos de extracción de ácidos nucleicos

Se evaluó el rendimiento de extracción de ácidos nucleicos con los *kits* comerciales *Quick-RNA^{TM} Miniprep* (*Zymo Research*) y *Quick-DNA/RNA^{TM} Pathogen Miniprep* (*Zymo Research*). Se destaca que, en el caso de la extracción con el *kit Quick-RNA^{TM} Miniprep* (*Zymo Research*), se suprimió el paso opcional de digestión enzimática con la enzima *DNasaI*, pudiéndose extraer teóricamente el genoma de los virus de ADN. La mayor parte del ADN genómico aviar es removido con la primera columna del *kit*. Se realizó la extracción de ácidos nucleicos utilizando ambos *kits* comerciales a partir de dos muestras diferentes:

- 0,1 g de una bursa de Fabricius sana a lo que se le incorporó 100 µl de una mezcla compuesta por las cepas vacunales de CAV, IBDV, IBV, ILTV y MDV (Tabla 1).

- 0,062 g de la bursa de Fabricius de una cepa de campo que se encuentra al menos coinfectada con CAV, IBDV e IBV. En el caso de esta muestra se realizaron dos

extracciones con el *Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep* (*Zymo Research*) partiendo de 200 y 400 µl de la bursa de Fabricius homogeneizada.

4.6.2. Extracción de ácidos nucleicos de especímenes biológicos

La colecta del material biológico fue realizada entre los años 2011 y 2019 por veterinarios especialistas en avicultura que colaboran con nuestro grupo de trabajo. Las muestras fueron remitidas al laboratorio con los registros correspondientes y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Se seleccionaron seis muestras de campo provenientes de establecimientos agrícolas de Uruguay en base a su diagnóstico positivo previo para algunos de los virus en estudio por PCR en tiempo real y final (Tabla 10). A partir de estas muestras tipificadas se evaluó la capacidad de detección y caracterización de la metodología de múltiplex PCR-NGS.

Los órganos procesados fueron tráquea, tonsilas cecales y bursa de Fabricius (Tabla 10). La extracción de ácidos nucleicos de las muestras biológicas se realizó con el *kit Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep* (*Zymo Research*) a partir de 200 µl de tejidos homogeneizados en 800 µl de *DNA/RNA Shield™* (provisto por el *kit*). Por cada muestra de campo se realizaron dos extracciones en paralelo, una a partir de la tráquea y/o mucosa de la tráquea y otra a partir de la unión de bursa de Fabricius y tonsilas cecales. Esto se hizo para contemplar la extracción de los virus respiratorios e inmunosupresores acorde a sus tropismos.

Se determinó la concentración del ácido nucleico extraído de cada muestra biológica con el espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*).

Tabla 10. Especímenes utilizados en este estudio que fueron previamente tipificados por técnicas moleculares convencionales (PCR y qPCR) abocadas a la detección de AIV, aMPV, CAV, IBDV, IBV, NDV. Sin diagnóstico previo de ILTV y MDV.

Muestra biológica	Diagnóstico positivo	Tejidos procesados en este estudio
421103	CAV, IBDV, IBV	Tráquea, Bursa
171502	CAV, IBDV, IBV	Tráquea, Bursa, Tonsilas cecales
361501	CAV, IBDV, IBV	Tráquea, Bursa, Tonsilas cecales
201703	CAV, IBDV	Tráquea, Bursa, Tonsilas cecales
371701	IBDV	Tráquea, Bursa, Tonsilas cecales
031901	CAV, IBDV	Tráquea, Bursa, Tonsilas cecales

4.6.3. Transcripción reversa

Fue necesario realizar la transcripción reversa para la detección y caracterización de virus compuestos por genomas de ARN. Para ello, el ARN extraído de las muestras biológicas fue retrotranscripto a ADNc con el *kit RevertAid™ Reverse Transcriptase* (*Thermo Scientific*), hexanucleótidos al azar y 5 µl de cada extracción de ácido nucleico proveniente de tráquea y del *pool* de órganos linfoides (anexo 10.4).

4.6.4. Múltiplex PCR – NGS

Los virus de las cepas de campo se amplificaron utilizando los paneles personalizados empleando en ambos ensayos el *ImmoMix™* (*Bioline*) (Tabla 6 y condición 2 de la Tabla 8). Se empleó como molde 1 µl del ADN o ADNc proveniente de tráquea y 1 µl ADN o ADNc del *pool* de órganos linfoides para las múltiplex PCR de virus ADN y ARN respectivamente. El proceso de ciclado consistió en una incubación a 95°C durante 10 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación de los cebadores a 61°C (virus de ADN) o 51/55°C (virus de ARN) durante 30 segundos, y extensión a 72°C por 20 segundos.

Los productos de múltiplex PCR de los virus de ADN y ARN se purificaron utilizando las esferas magnéticas AMPure XP (Beckman), y se cuantificó el ADN con el espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*) con el fin de combinar a igual concentración de ADN ambos productos por espécimen biológico. Los productos combinados fueron cuantificados con el fluorómetro *Qubit* utilizando el *kit Qubit dsDNA HS* (*High Sensitivity*) (*Invitrogen*) para generar las librerías con los *kit* comerciales *Nextera XT DNA Sample Preparation kit* (*Illumina*) o *Nextera™ DNA Flex Library Prep Kit* (*Illumina*) a partir de 1 ng y 100 ng de los productos purificados, respectivamente. Las librerías indexadas se purificaron con las perlas *AMPure XP* (*Beckman*) y se cuantificaron en *Qubit* con el *kit Qubit dsDNA HS* (*High Sensitivity*) (*Invitrogen*). Se evaluó la calidad y la longitud de cada librería con el *kit Standard Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit* utilizando el *Fragment Analyzer 5200* (*Agilent*). La secuenciación se realizó en la plataforma genómica *Illumina MiniSeq* (*Illumina*) de la Universidad de la República con el cartucho *MiniSeq™ Mid Output Reagent Cartridge* (*300-cycles, paired-end reads*).

4.6.5. Ensamblaje de las secuencias obtenidas

El análisis de las lecturas crudas (*raw reads*) obtenidas por cada muestra biológica en la plataforma Illumina se realizó en el Geneious Prime 2019.2.1 (https://www.geneious.com). Los *reads* fueron primariamente procesados con la herramienta *BBDuk* para la remoción de los adaptadores, de las lecturas de baja calidad (valores de calidad <20) y de las que constaban de tamaños menores a 30 pb de longitud. Se efectuó el alineamiento de los *reads* resultantes con la plantilla de referencia mencionada en el apartado 4.5.4 empleando el algoritmo Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012), con límite de probabilidad de error designado en 0.05 y con la eliminación de al menos 10 pb de cada extremo (5´y 3´). Posteriormente, se guardó y anotó la secuencia consenso para volver a realizar el ensamblado antes mencionado sobre ella.

4.7. Caracterización genética de las cepas

4.7.1. Análisis de secuencias consensos

Se realizaron análisis filogenéticos basados en las secuencias parciales de las regiones contempladas en el estudio de CAV, IBDV e IBV. En estos análisis se compararon las secuencias consensos de todas las cepas de campo y vacunales obtenidas por NGS y secuencias de referencias obtenidas de la base de datos del NCBI. Para ello se realizaron alineamientos con el algoritmo MUSCLE del programa MEGA6 (Tamura et al., 2013) y se determinó el modelo de sustitución de cada alineamiento con el programa jModelTest versión 2.1.6 (Darriba et al., 2012) del CIPRES Science Gateway (http://www.phylo.org/). Estos datos se utilizaron para inferir árboles filogenéticos en el servidor http://www.phylogeny.fr/ con el método de máxima verosimilitud. Para las pruebas estadísticas de soporte de las ramas se utilizó el método aLRT (*approximate Likelihood-Ratio Test*). Las filogenias obtenidas se visualizaron y editaron con el programa FigTree versión 1.4.4 (Rambaut, 2018).

La caracterización genética de ILTV y MDV se realizó en base a la similitud de homología.

4.7.2. Determinación de variantes nucleotídicas

El estudio de las variaciones nucleotídicas intra-hospedero fue realizado con el software Geneious Prime 2019.2.1 (https://www.geneious.com) configurando frecuencias de

variantes mínimas de 0,1 y el resto de parámetros por defecto. Como datos de partida se emplearon los archivos generados del mapeo de las secuencias limpias (BBDuk) con las secuencias consensos de cada muestra obtenida de la secuenciación masiva.

4.8. Segunda estrategia metodológica de múltiplex PCR-NGS

Con el ímpetu de generar una estrategia de múltiplex PCR-NGS que sea independiente de la realización de librerías de secuenciación fue que se realizó un nuevo abordaje metodológico que implicaba una caracterización de más regiones genómicas virales, en particular para los virus ADN de genomas grandes. Para ello, se diseñaron cebadores quiméricos que incluían, en cada extremo 5´, la secuencia del adaptador de Illumina (Figura 10). Se realizaron múltiples alineamientos que abarcaron las regiones genéticas de interés para el diseño de la región específica de cada cebador. Los cebadores fueron diseñados con el fin que amplifiquen regiones menores a 300 pb y que, entre distintos juegos, haya zonas de solapamiento para reconstruir la secuencia completa de la región de interés. Para disminuir la posibilidad de productos de amplificación inespecíficos, las regiones específicas de los cebadores quiméricos fueron diseñadas para que tuviesen temperaturas de hibridación superiores a 61°C. Todos los cebadores se analizaron *in silico* acorde a lo detallado en la Sección 4.3, sus secuencias pueden apreciarse en el Anexo 10.6.

La evaluación de la eficiencia fue realizada con dos librerías. La primera se realizó partiendo de la unión de 16 productos de PCR correspondientes a las amplificaciones de todos los juegos de cebadores de MDV gL, MDV IL-8, MDV Meq y 3 juegos de cebadores de CAV (Anexo 10.6.). La segunda librería fue realizada partiendo de una múltiplex PCR en las siguientes condiciones de reacción: 1× *ImmoMix*^{TM} (*Bioline*) y 0,2 μM de cada cebador IA CAV F563, IA CAV R820, IA MDV gL F19968, IA MDV gL R20204, IA MDV vIL8 F139866, IA MDV vIL8 R140117, IA MDV Meq F136509 e IA MDV Meq R 136982 (Anexo 10.6.), en volumen final de 25 μl. El ciclado de la amplificación incluyó una etapa de desnaturalización inicial a 95ºC por 10 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 95ºC, 30 segundos a 64ºC y 15 segundos a 72ºC. Se incluyó una etapa de extensión final a 72ºC durante 5 minutos.

Se purificaron los amplicones con las esferas magnéticas *AMPure XP* (*Beckman*) (Anexo 10.5.) y se cuantificó el ADN en el fluorómetro *Qubit* con el *kit Qubit dsDNA*

HS (*High Sensitivity*) (*Invitrogen*). El indexado de las librerías se realizó partiendo de 100 ng de los amplicones purificados y comenzando en el paso *ADN Tagmented Amplify* del *kit Nextera™ DNA Flex Library Prep Kit* (*Illumina*). Las librerías indexadas se purificaron con las perlas *AMPure XP* (*Beckman*) y se cuantificaron en *Qubit* con el *kit Qubit dsDNA HS* (*High Sensitivity*) (*Invitrogen*). Se evaluó la calidad y la longitud de cada librería con el *kit Standard Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit* utilizando el *Fragment Analyzer 5200* (*Agilent*). La secuenciación fue realizada en la plataforma genómica *Illumina MiniSeq* (*Illumina*) de la Universidad de la República con el cartucho *MiniSeq™ Mid Output Reagent Cartridge* (*300-cycles, paired-end reads*).

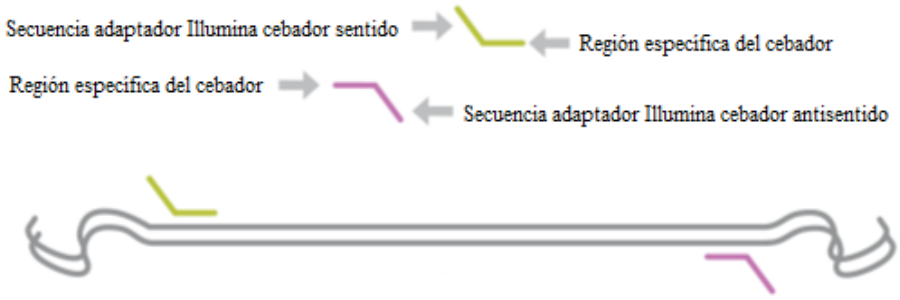


Figura 10. Representación de cebadores quiméricos para la secuenciación independiente de *kits* comerciales de preparación de librerías Illumina. Imagen modificada de *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf).*

5 Resultados

5.1. Evaluación del panel aviar

El panel generado consistió en 10 juegos de cebadores que identifican ocho virus aviares responsables de enfermedades respiratorias e inmunosupresoras en aves de corral. Los cebadores fueron seleccionados de la literatura o diseñados *de novo* en este trabajo (Tabla 11) e hibridan en regiones conservadas de los genomas virales, algunos de ellos incluyen bases degeneradas para la detección de las variantes genéticas existentes. La búsqueda nucleotídica de los cebadores con la herramienta BLAST indicó únicamente homología con las regiones genómicas esperadas de los virus en base a los cuales fueron diseñados. El análisis *in silico* de formación de dímeros y heterodímeros resultó adecuado para efectuar las reacciones de múltiplex PCR.

Tabla 11. Lista de juego de cebadores diseñados y utilizados en este estudio. AIV: virus de la influenza aviar, aMPV: metapneumovirus aviar, CAV virus de la anemia infecciosa, IBDV: virus de la bursitis infecciosa o Gumboro, IBV: virus de la bronquitis infecciosa, ILTV: virus de la laringotraqueítis infecciosa, MDV: virus de la Enfermedad de Marek, y NDV: virus de la Enfermedad de Newcastle.

Virus diana	Gen blanco	Cebador	Secuencia nucleotídica (5´-3´)	Tamaño (pb)	Referencia
AIV	NP	NPf 1200	CAGRTACTGGGCHATAAGRAC	330	Lee et al. (2001)
		NPr 1529	GCATTGTCTCCGAAGAAATAAG		Lee et al. (2001)
aMPV	G	fGa	CCGGGACAAGTATCTCTATGG	448	Mayahi et al. (2017)
		rGy	TCTCGCTGACAAATTGGTCCTGA		Mayahi et al. (2017)
CAV	vp1	7	CCATCGCCGGTGAGTTRAT	438	En este estudio
		4	GTTGCTCGTCGGGTCTCAT		Techera et al. (2019)
IBDV	vp2	P3	GCCCAGAGTCTACACCATAACTGC	492	Liu et al. (1998)
		P4	GCGACCGTAACGACAGATCC		Liu et al. (1998)
IBDV	vp1	MBF	AGTGGCTCCTCTTCTTGATGATTCTAC	372	Hernández et al. (2011)
		MBR	TGTGTTGGGTAGTATTTAGGGAAGTAC		Hernández et al. (2011)
IBV	N	N2	GTCTTGTCCCGCGTGTA	438	Zwaagstra et al. (1992)
		N1	ACCCTTACCAGCAACCC		Zwaagstra et al. (1992)
IBV	S	Sf 1237	GRTGGCTCYCGTATACAAA	581	Marandino et al. (2016)
		Sr 1795	GTTTGTATGTACTCATCTGTRAC		Marandino et al. (2016)
ILTV	ICP4	ICP4 1F	ACTGATAGCTTTTCGTACAGCACG	487	Chacón & Ferreira (2009)
		ICP4 R4	GAGACGGTCTTTGCTGGTCCTC		En este estudio
MDV	pp38	F pp38	CCAGCATATAAGAACGCATTGTTGC	417	En este estudio
		R pp38	TTCCAATAAAGGGTGATGGGAAGG		En este estudio
NDV	M	Fw455	CTGTAGGGTTGTGGCAAACAA	480	En este estudio
		Rv934	GCTGTCCCACTGCTAGAGAA		En este estudio

5.1.1. Estandarización de ensayos de *singleplex*-PCR

Se estandarizaron las reacciones de PCR con un único juego de cebadores observándose amplificación en un amplio rango de las temperaturas de hibridación. Las temperaturas óptimas de amplificación para los virus ARN rondaron los 55°C, mientras que en las *singleplex*-PCR de virus ADN se encontraron en el entorno de los 61°C.

5.1.2. Estandarización de ensayos de múltiplex-PCR

La fase de estandarización de las múltiplex-PCR implicó el análisis de distintos protocolos de ciclado, concentraciones de cebadores y de varias enzimas ADN polimerasas dependientes de ADN debido al bajo o nulo rendimiento de algunas de ellas en las amplificaciones múltiples.

Respecto a las polimerasas analizadas durante la estandarización de la múltiplex-PCR de virus ADN, se obtuvieron únicamente buenos resultados en la amplificación simultánea de los tres productos de PCR con el *kit* comercial *ImmoMix*^{TM} (*Bioline*) a distintas temperaturas de hibridación de los cebadores siendo óptimas a 61°C (Figura 11).

I- II-

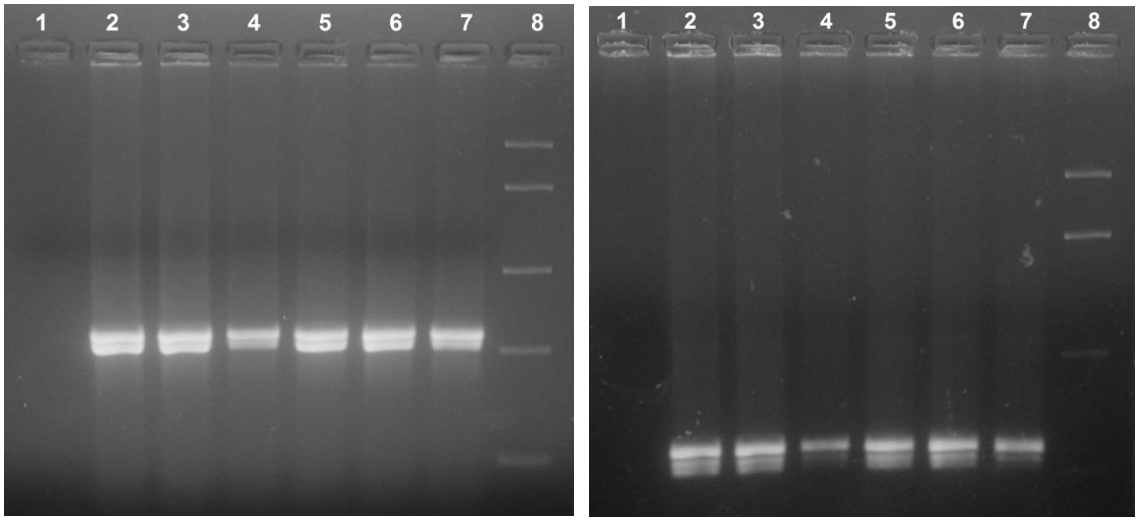


Figura 11. Visualización de productos de PCR con gradiente de temperatura de hibridación de las reacciones de múltiplex PCR de virus de ADN empleando *ImmoMix*^{TM} (*Bioline*). Geles de agarosa 2%. I- 60 min de electroforesis; II- 90 min de electroforesis. 1- Control negativo de PCR; 2- muestra A: 61ºC; 3- muestra A: 63ºC; 4- muestra A: 65ºC; 5- muestra B: 61ºC; 6- muestra B: 63ºC; 7- muestra B: 65ºC; 8- Marcador de peso molecular *FastRuler Middle Range DNA Ladder* (*Thermo Scientific*): 5000, 2000, 850, 400, 100 pb.

Se estandarizó la múltiplex-PCR de virus ARN obteniéndose los mejores resultados con la condición 2 de la Tabla 8 respecto a la concentración de cada juego de cebadores. Sin embargo, no se pudo discriminar debidamente la presencia de los 7 productos de PCR; no obstante, se observa cualitativamente mayor amplificación con una temperatura de hibridación de 51ºC (Figura 12).

I- II-

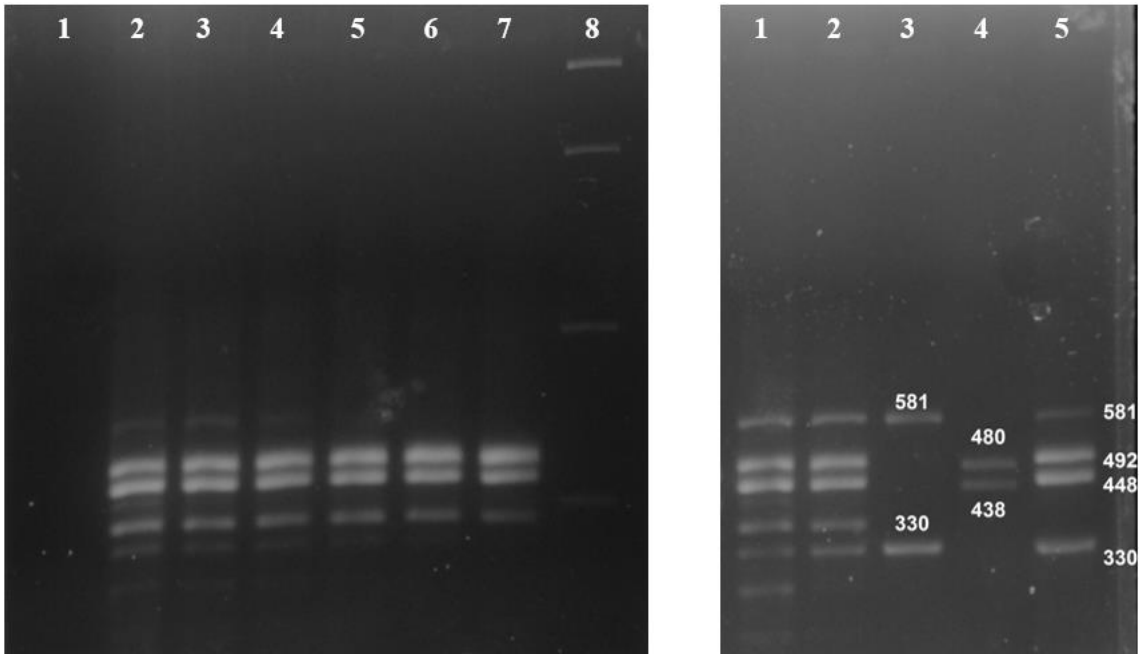
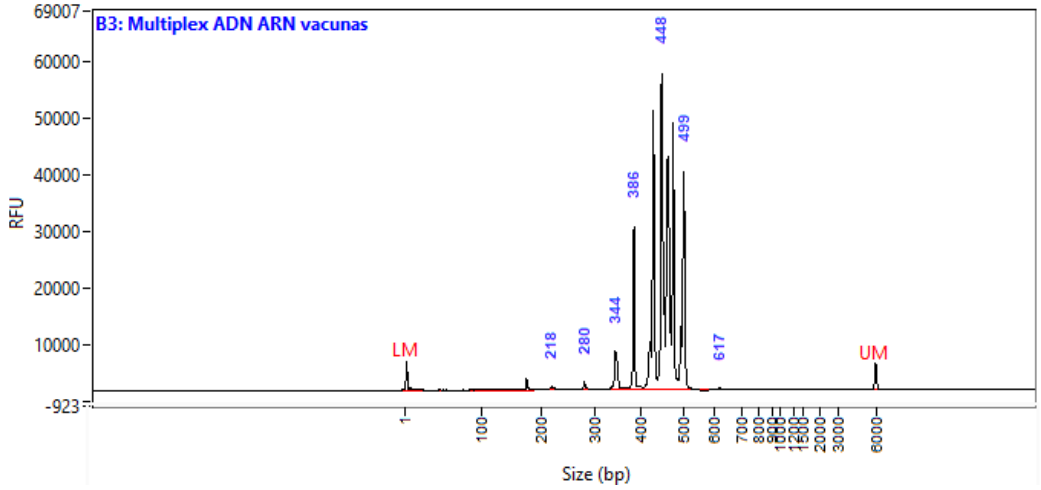


Figura 12. Visualización de productos de múltiplex PCR de virus ARN con gradiente de temperatura de hibridación. Geles de agarosa 2%. I- Condición 1 de concentraciones de cebadores de la múltiplex-PCR. 1- Control negativo de PCR; 2- 51ºC; 3- 53ºC; 4- 55ºC; 5- 57ºC; 6- 59ºC; 7- 61ºC; 8- Marcador de peso molecular *FastRuler Middle Range DNA Ladder* (*Thermo Scientific*): 5000, 2000, 850, 400, 100pb. II- Condición 2 de concentraciones de cebadores de la múltiplex-PCR. 1- Múltiplex-PCR 51ºC; 2- Múltiplex-PCR 55ºC; 3-5 Marcadores de peso molecular, se señala en la imagen los tamaños en pares de bases.

Al analizar en el *Fragment Analyzer* la unión de los productos de múltiplex PCR (ADN y ARN) obtenidos con las condiciones estandarizadas empleando la muestra artificial se constató la presencia de numerosos amplicones en el rango de 300 a 600pb (Figura 13).

A



B

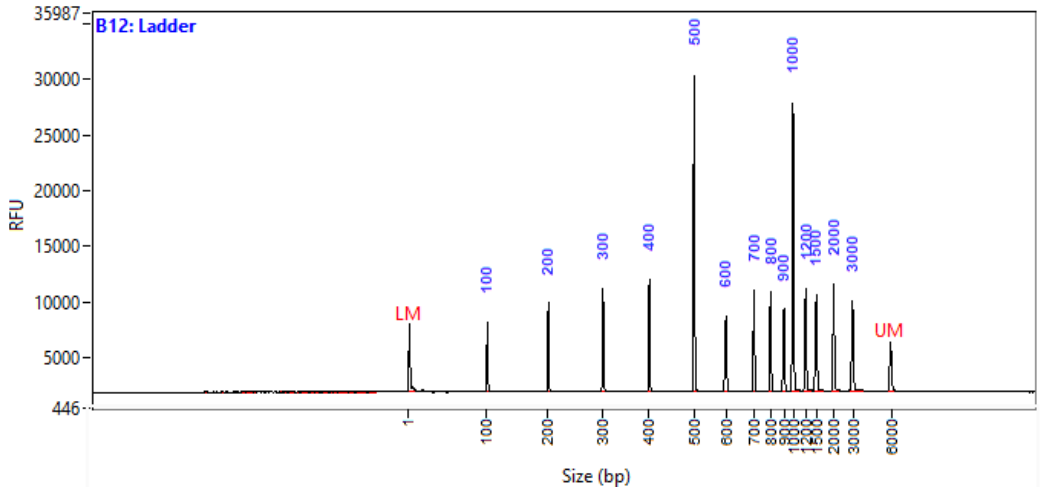


Figura 13. Electroferogramas obtenidos de la conjunción de las múltiplex PCRs de la muestra artificial **(A)** y el marcador de peso molecular **(B)**. En el eje de las Y se grafican las unidades relativas de fluorescencia (RFU) y en el eje de las X el tamaño estimado en pares de bases que se correlaciona con el tiempo de corrida.

5.1.3. Rendimiento en muestras artificiales

El análisis de multiplex PCR-NGS de las muestras artificiales evidencia la detección específica de las secuencias dianas de todos los virus incluidos en el panel (Tablas 12 y 13). La amplitud de cobertura (*breadth of coverage*), porcentaje de cada región del genoma diana que fue cubierta por las lecturas de secuenciación, fue del 100% para todas las regiones genómicas analizadas. La identidad en ambos ensamblajes para cada región genómica analizada con la secuencia de referencia fue entre 96 y 99,3 %. Se observaron diferencias en la homogeneidad de cobertura media específica para los diferentes virus (es decir, el número promedio de veces que se lee la secuencia del

amplicón), la cual varía de 1.839 a 295.729 y 38 a 294.067 de para las librerías de virus ARN 51 y 55, respectivamente (Tabla 12). La cobertura media de la muestra artificial compuesta por virus ADN en concentraciones equivalentes varió de 126.998 a 230.688 (Tabla 13). En consecuencia, los virus de ADN tienen una cobertura media mayor que los virus de ARN. El amplicón de ILTV tuvo los valores más altos con 230.688, mientras que el producto de PCR del fragmento del gen N de IBV presentó los valores más bajos, 38 y 1.839, para los virus ARN 55 y 51, respectivamente (Tablas 12 y 13).

La comparación del ensayo de multiplex PCR-NGS con un ensayo diagnóstico validado de qPCR en la que se utilizaron muestras artificiales, que contenían los tres virus ADN con cantidades decrecientes de número de copias del genoma CAV (Tabla 3), mostró que la detección viral siempre ocurría con el ensayo de múltiplex-NGS pero no con el ensayo de qPCR que daba negativo o con bajo número de copias (Tabla 14). La amplitud de cobertura de CAV en estas muestras resultó del 100% con el ensayo de múltiplex-NGS.

Tabla 12. Cobertura media por virus obtenida aplicando el ensayo de multiplex PCR-NGS a las muestras artificiales positivas para los virus ARN.

	AIV	aMPV	IBDV A[a]	IBDV B[b]	IBV N	IBV S	NDV
ARN 51	34.335	295.729	104.295	75.931	1.839	38.062	20.993
ARN 55	25.199	294.067	112.206	73.554	38	33.577	31.522

[a] Correspondiente a la región amplificada del gen vp2.
[b] Correspondiente a la región amplificada del gen vp1.

Tabla 13. Cobertura media por virus obtenida de aplicar la metodología de múltiplex PCR-NGS a tres muestras artificiales de ADN: CAV (1:1): número de copias genómicas equimolares; CAV (1:100) y CAV (1:10.000) corresponde a cantidades decreciente de CAV respecto a ILTV y MDV.

	CAV	ILTV	MDV
CAV (1:1)	126.998	230.688	224.841
CAV (1:100)	14.520	219.827	226.585
CAV (1:10000)	23	215.557	219.544

Tabla 14. Detección de CAV en muestras artificiales de ADN con las técnicas de qPCR y multiplex PCR-NGS.

Muestra artificial de ADN	qPCR CAV	Múltiplex PCR-NGS
Concentraciones iguales	Positivo (Ct 27,13)	Detectado
CAV 1/100	Positivo (Ct 34,02)	Detectado
CAV 1/10.000	No detectado	Detectado

5.2. Aplicación a muestras de campo

5.2.1. Ensayos de extracción de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos virales de ambas muestras procesadas y analizadas por (RT)-qPCR se recuperaron adecuadamente con los *kits* comerciales *Quick-RNA™ Miniprep* (*Zymo Research*) y *Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep* (*Zymo Research*) (Sección 4.6.1; Figura 14). Específicamente, la variación del Ct (ΔCt) obtenida de la muestra constituida por la bursa de Fabricius sana con cepas vacunales utilizando los mencionados *kits* de extracción osciló entre 0,3 y 2,3. En el caso de la bursa de Fabricius infectada al menos con CAV, IBDV e IBV, el ΔCt presentó valores entre 0,02 y 0,82 para los *kit Quick-RNA™ Miniprep* (*Zymo Research*) y *Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep* (*Zymo Research*). Al duplicar el volumen de partida de la muestra infectada para realizar la extracción con el *kit Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep* (*Zymo Research*) IBV dejó de detectarse y los ΔCt tuvieron valores de 0,2 y 4,06. Con estos resultados de desempeño de ambos *kits* comerciales se decidió realizar las extracciones de ácido nucleico de las muestras biológicas con el *kit Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep* (*Zymo Research*), a partir de 200 µl, ya que de forma simultánea purifica ADN y ARN de patógenos.

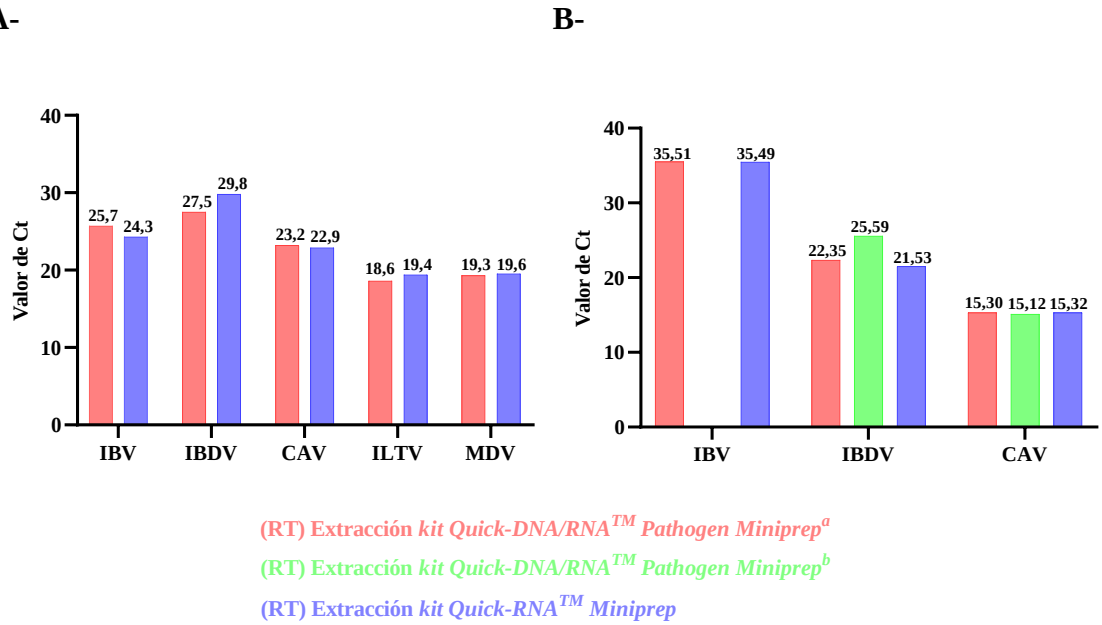


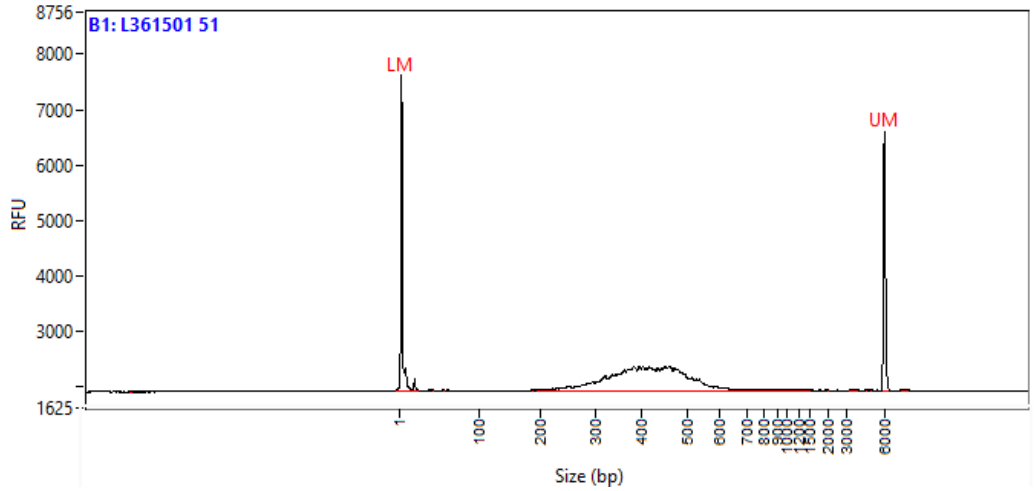
Figura 14. Representación gráfica de los valores de Ct obtenidos en las reacciones de (RT)-qPCR a de los ácidos nucleicos extraídos con los *kits* comerciales *Quick-RNA™ Miniprep* (*Zymo Research*) y *Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep* (*Zymo Research*) de las muestras A- bursa de Fabricius sana infectada con cepas vacunales de CAV, IBDV, IBV, ILTV y MDV; y B- bursa de Fabricius coinfectada al menos con CAV, IBDV e IBV. *Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep*[a], extracción realizada a partir de 200 µl de muestra homogeneizada, según recomienda el protocolo; *Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep*[b], partiendo de 400 µl.

5.2.2. Múltiplex PCR – NGS

5.2.2.1. Control de calidad de librerías para *NGS*

Una vez generadas las librerías a partir de los productos de múltiplex PCR, se analizó su calidad e integridad utilizando el *Fragment Analyzer*. Este análisis evidenció que los fragmentos con adaptadores siguen una distribución gaussiana en todas las muestras, con fragmentos de tamaños estimados promedio de 400pb (Figura 15).

A



B

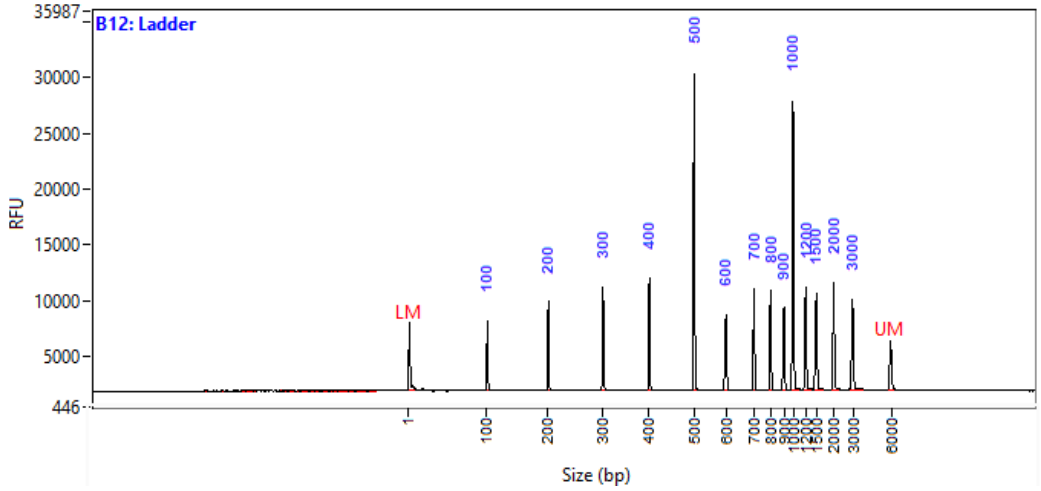


Figura 15. Resultado de la calidad de una librería analizada mediante *Fragment Analyzer*. Electroferogramas obtenidos con la muestra 361501 como ejemplo **(A)** y con el marcador de peso molecular **(B)**. En el eje de las Y se grafican las unidades relativas de fluorescencia (RFU) y en el eje de las X el tamaño estimado en pares de bases que se correlaciona con el tiempo de corrida.

5.2.2.2. Determinación diagnóstica por técnicas moleculares

En la Tabla 15 se representa la detección molecular de la técnica de múltiplex PCR-NGS de las seis muestras biológicas analizadas representando los valores de cobertura media obtenidos para cada agente viral. En ninguna de ellas se detectó la presencia de material genético de AIV, aMPV ni NDV. En todos los especímenes analizados se obtuvo una amplitud de cobertura del 100% para las regiones genómicas detectadas.

Tabla 15. Cobertura media obtenida por virus aplicando el ensayo de multiplex PCR-NGS a seis muestras biológicas de campo.

	Valores de cobertura media									
	Virus respiratorios						Virus inmunosupresores			
Espécimen	**AIV**	**aMPV**	**IBV N**	**IBV S**	**ILTV**	**NDV**	**CAV**	**IBDV A[a]**	**IBDV B[b]**	**MDV**
421103 51	ND	ND	6.817	8	935	ND	151.323	165.312	172.648	ND
421103 55	ND	ND	11.213	37	655	ND	108.188	243.942	124.691	ND
171502 51	ND	ND	71	43	448	ND	154.589	6.317	7.752	ND
171502 55	ND	ND	3.231	1.437	1.450	ND	329.848	127.780	18.108	ND
361501	ND	ND	414	104	ND	ND	499.961	46.819	143.497	228.631
201703	ND	ND	8	ND	ND	ND	573.163	11.171	23.867	15.145
371701	ND	ND	ND	ND	ND	ND	29.157	14.492	43.912	9.657
031901	ND	ND	54	3	2.445	ND	541.411	3.358	533	ND

ND representa la falta de detección del material genético viral por la técnica empleada.
[a] Correspondiente a la región amplificada del gen vp2.
[b] Correspondiente a la región amplificada del gen vp1.

Las muestras biológicas 421103 y 171502 tuvieron la misma capacidad de detección al realizar la múltiplex PCR de virus de ARN con temperaturas de hibridación de cebadores de 51 y 55°C, a pesar de obtenerse distintos valores de coberturas medias (Tabla 15). Ambas muestras fueron positivas para CAV, IBDV, IBV e ILTV; y negativas para MDV (Tabla 15). Las dos muestras fueron previamente tipificadas en el laboratorio por qPCR positivas para CAV, IBDV e IBV (Tabla 10), sin evaluarse la presencia de ILTV debido a la falta, en su momento, de una técnica validada para su diagnóstico. Tras obtener cobertura de ILTV mediante la metodología de múltiplex PCR-NGS en ambas muestras biológicas, se realizó el ensayo de qPCR validado (Callison et al., 2007) y resultó negativo.

En el año 2015 la cepa 361501 fue diagnóstica por qPCR positiva para CAV, IBDV e IBV, siendo negativas para AIV, aMPV y NDV (Tabla 10). En el mencionado año no se

contaba con ensayos diagnósticos validados para MDV ni ILTV. Por otra parte, esta muestra fue positiva por la metodología de múltiplex PCR-NGS para CAV, IBDV, IBV y MDV; y negativa para AIV, aMPV, ILTV y NDV (Tabla 15). El diagnóstico de MDV fue corroborado con el análisis de la secuencia obtenido por dicha metodología y, posteriormente, con un ensayo validado de qPCR (Baigent et al., 2016) que resultó positivo con un Ct de 25,17.

Se tipificó a la muestra 201703 con la técnica múltiplex PCR-NGS como positiva para CAV, IBDV, IBV y MDV; y negativa para negativa para AIV, aMPV, ILTV y NDV (Tabla 15). Esta muestra había sido previamente diagnosticada en el laboratorio como positiva para CAV e IBDV, pero negativa para AIV, aMPV, IBV, NDV (Tabla 10). La cobertura media de detección de IBV fue de tan solo 8 *reads* para la región del gen N y ninguno para la región del gen S (Tabla 15).

La muestra 371701 fue previamente tipificada por metodologías de PCR y qPCR, siendo positiva para IBDV y negativa para AIV, aMPV, CAV, IBV y NDV (Tabla 10). Por contraparte, la metodología desarrollada de múltiplex PCR-NGS indicó que esta muestra biológica era positiva para CAV, IBDV y MDV, no detectándose la presencia de AIV, aMPV, IBV, ILTV ni NDV. Las lecturas de CAV tuvieron una cobertura media de 29.157, la mínima cobertura de CAV observada en todas las muestras biológicas (Tabla 15).

El espécimen 031901 fue inicialmente diagnosticado con CAV e IBDV (Tabla 10). Sin embargo, con la metodología de múltiplex PCR-NGS, esta muestra biológica manifestó una infección mixta con CAV, IBDV, IBV e ILTV. La representación de IBV en la secuenciación correspondió a coberturas medias de 54 para la región N y de 3 para la región S (Tabla 15).

5.2.2.3. Caracterización de las secuencias

Se observó variación genética intra hospedero en las muestras analizadas en varias bases, alcanzando frecuencias de más del 10% en determinadas posiciones. Estas variaciones se constituyeron por cambios de nucleótidos y/o variaciones de dos nucleótidos ligados. En algunos casos las variaciones implicaban cambios a nivel de la secuencia aminoacídica codificante. En las Tablas 16 a la 21 se especifican las variantes intra-hospedero observadas por espécimen biológico.

Tabla 16. Variantes nucleotídicas detectadas en la muestra 371701 mediante múltiplex PCR-NGS. Se denota la cobertura, la frecuencia, la posición en la secuencia codificante (CDS) de cada variante así como si generan cambios en el codón y secuencia aminoacídica codificante.

Cambio	Cobertura	Frecuencia de variante	Posición CDS [a,b]	Cambio en el codón	Cambio aminoacídico
CAV					
R → A	12286	47.9%	432	CAR → CAA	No
R → G	12286	52.0%	432	CAR → CAG	No
Y → C	12507	48.0%	435	AAY → AAC	No
Y → T	12507	52.0%	435	AAY → AAT	No
T → A	26459	11.0%	480	GCT → GCA	No
A → G	27396	28.1%	486	CCA → CCG	No
K → A	32424	24.2%	507	GCK → GCA	No
K → G	32424	27.6%	507	GCK → GCG	No
K → T	32424	48.1%	507	GCK → GCT	No
T → G	36275	31.8%	534	TCT → TCG	No
C → T	36973	28.0%	543	TTC → TTT	No
T → C	36860	28.1%	549	AAT → AAC	No
G → A	43249	10.6%	585	CGG → CGA	No
G → C	43249	27.5%	585	CGG → CGC	No
Y → C	43903	51.6%	603	CAY → CAC	No
Y → T	43903	48.3%	603	CAY → CAT	No
G → T	6908	25.4%	792	GCG → GCT	No
IBDV segmento A					
A → T	11858	12.9%	990	AGA → AGT	R → S

[a] Posición de CAV según secuencia completa del gen vp1 vacuna Nobilis P4. [b] Posición de IBDV gen vp2 perteneciente al segmento A según AF508177.1.

Tabla 17. Variantes nucleotídicas detectadas en la muestra 421103 mediante múltiplex PCR-NGS. Se denota la cobertura, la frecuencia, la posición en la secuencia codificante (CDS) de cada variante así como si generan cambios en el codón y secuencia aminoacídica codificante. La múltiplex PCR de virus ARN fue realizada con dos temperaturas de hibridación de los cebadores, 51 y 55°C.

Cambio	Cobertura	Frecuencia de variante	Posición CDS [a,b]	Cambio en el codón	Cambio aminoacídico
CAV 51					
G → C	81107	23.5%	456	CCG → CCC	No
A → C	112982	17.3%	474	CCA → CCC	No
T → A	158152	15.2%	507	GCT → GCA	No
A → T	35025	20.9%	792	GCA → GCT	No
ILTV 51					
Y → C	1185	44.1%	380	GYG → GCG	X → A
Y → T	1185	55.9%	380	GYG → GTG	X → V
CAV 55					
G → C	61093	23.9%	456	CCG → CCC	No
A → C	87282	19.1%	474	CCA → CCC	No
T → A	122039	17.0%	507	GCT → GCA	No
A → T	27973	22.8%	792	GCA → GCT	No

ILTV 55					
Y → C	842	47.4%	380	GYG → GCG	X → A
Y → T	842	52.6%	380	GYG → GTG	X → V

[a] Posición según secuencia completa del gen vp1 de la vacuna Nobilis P4 de CAV. [b] Posición según secuencia completa del gen icp4 de ILTV de la cepa JN969100.1.

Tabla 18. Variantes nucleotídicas detectadas en la muestra 201703 mediante múltiplex PCR-NGS. Se denota la cobertura, la frecuencia, la posición en la secuencia codificante (CDS) de cada variante así como si generan cambios en el codón y secuencia aminoacídica codificante.

Cambio	Cobertura	Frecuencia de variante	Posición CDS [a,b]	Cambio en el codón	Cambio aminoacídico
CAV					
C → A	245001	26.2%	415	CAA → AAA	Q → K
C → G	297577	26.9%	430	CAG → GAG	Q → E
T → G	535313	26.2%	480	GCT → GCG	No
G → A	485373	25.6%	723	AAG → AAA	No
G → C	66494	15.4%	795	ACG → ACC	No
IBDV segmento A					
S → C	11341	46.8%	984	TCS → TCC	No
S → G	11341	52.9%	984	TCS → TCG	
W → A	9999	49.6%	990	AGW → AGA	X → R
W → T	9999	49.6%	990	AGW → AGT	X → S
G → A	5312	35.6%	1050	ACG → ACA	No
R → A	3993	43.6%	1056	GTR → GTA	No
R → G	3993	56.3%	1056	GTR → GTG	

[a] Posición según secuencia completa del gen vp1 de la vacuna Nobilis P4 de CAV. [b] Posición de IBDV gen vp2 perteneciente al segmento A según AF508177.1.

Tabla 19. Variantes nucleotídicas detectadas en la muestra 361501 mediante múltiplex PCR-NGS. Se denota la cobertura, la frecuencia, la posición en la secuencia codificante (CDS) de cada variante así como si generan cambios en el codón y secuencia aminoacídica codificante.

Cambio	Cobertura	Frecuencia de variante	Posición CDS [a-d]	Cambio en el codón	Cambio aminoacídico
CAV					
W → A	201799	57.2%	420	TCW→ TCA	No
W → T	201799	42.4%	420	TCW → TCT	No
R → A	248100	56.1%	432	CAR → CAA	No
R → G	248100	43.8%	432	CAR → CAG	No
G → A	251984	37.8%	762	GAG→ GAA	No
G → C	90709	33.2%	795	ACG → ACC	No
IBDV segmento A					
R → A	54877	45.4%	934	GRT → GAT	X → D
R → G	54877	54.5%	934	GRT → GGT	X → G
IBDV segmento B					
TTA→CTC	110713 → 111644	18.6% → 18.8%	277	TTA → CTC	No

IBV N					
T → C	426	15.5%	136	TCA → CCA	S → P
YY → CC	454 → 486	47.3% → 48.0%	142	YYG → CCG	X → P
YY → TT	454 → 486	51.3% → 52.1%	142	YYG → TTG	X → L
Y → C	490	46.9%	146	CYT → CCT	X → P
Y → T	490	53.1%	146	CYT → CTT	X → L
R → A	449	49.9%	160	RGC → AGC	X → S
R → G	449	49.7%	160	RGC → GGC	X → G
Y → C	182	45.6%	333	GAY→ GAC	No
Y → T	182	54.4%	333	GAY→ GAT	No

[a] Posición según secuencia completa del gen vp1 de la vacuna Nobilis P4 de CAV. [b] Posición de IBDV gen vp2 perteneciente al segmento A según AF508177.1. [c] Posición de IBDV gen vp1 perteneciente al segmento B según AY099457.1. [d] Posición del gen N de IBV según KY626044.1.

Tabla 20. Variantes nucleotídicas detectadas en la muestra 031901 mediante múltiplex PCR-NGS. Se denota la cobertura, la frecuencia, la posición en la secuencia codificante (CDS) de cada variante así como si generan cambios en el codón y secuencia aminoacídica codificante.

Cambio	Cobertura	Frecuencia de variante	Posición CDS [a]	Cambio en el codón	Cambio aminoacídico
IBDV segmento A					
A → G	4265	11.8%	913	ATC → GTC	I → V
A → G	4492	14.1%	925	AAA → GAA	K → E
A → G	4079	32.1%	936	ATA → ATG	I → M
A → G	3926	20.0%	948	AAA → AAG	No
C → T	3264	14.0%	962	GCT → GTT	A → V
A → G	3069	13.8%	971	CAG → CGG	Q → R
A → G	2763	14.1%	984	TCA → TCG	No
A → G	2427	15.3%	1008	ACA → ACG	No
A → G	2418	10.6%	1009	ATC → GTC	I → V
A → G	1864	14.1%	1029	CCA → CCG	No
A → G	1594	13.0%	1048	ACA → GCA	T → A
AA → GG	1124 → 1135	16.3%	1064	GAA → GGG	E → G
A → G	1046	29.3%	1066	AGA → GGA	R → G
A → G	469	21.3%	1077	ACA → ACG	No

[a] Posición de IBDV gen vp1 perteneciente al segmento B según AY099457.1

Tabla 21. Variantes nucleotídicas detectadas en la muestra 171502 mediante múltiplex PCR-NGS. Se denota la cobertura, la frecuencia, la posición en la secuencia codificante (CDS) de cada variante así como si generan cambios en el codón y secuencia aminoacídica codificante. La múltiplex PCR de virus ARN fue realizada con dos temperaturas de hibridación de los cebadores, 51 y 55°C.

Cambio	Cobertura	Frecuencia de variante	Posición CDS [a,b]	Cambio en el codón	Cambio aminoacídico
CAV 51					
A → G	92141	17.4%	432	CAA → CAG	No
C → T	93453	17.4%	435	AAC → AAT	No
ILTV 51					

T → C	639	11.1%	420	GTT → GTC	No
R → A	564	55.3%	511	RAA → AAA	X → K
R → G	564	44.7%	511	RAA → GAA	X → E
W → A	429	41.3%	547	WAG → AAG	X → K
W → T	429	58.7%	547	Codón de terminación	
CAV 55					
A → G	161076	13.1%	432	CAA → CAG	No
C → T	163115	13.1%	435	AAC → AAT	No
ILTV 55					
R → A	1895	58.6%	511	RAA → AAA	X → K
R → G	1895	41.2%	511	RAA → GAA	X → E
W → A	1456	38.5%	547	WAG → AAG	X → K
W → T	1456	61.1%	547	Codón de terminación	

[a] Posición según secuencia completa del gen vp1 de la vacuna Nobilis P4 de CAV. [b] Posición según secuencia completa del gen icp4 de ILTV de la cepa JN969100.1.

5.2.2.4. Caracterización genética de IBV

La caracterización genética de IBV con el ensayo de múltiplex PCR-NGS se basa en el análisis de la región nucleotídica parcial de la proteína S. Se realizó una inferencia filogenética conformada por 58 secuencias parciales de la región codificante de S1 que incluyó las 5 secuencias obtenidas en este estudio (muestras 421103, 171502, 361502, 031901 y la cepa vacunal BR-I) y secuencias disponibles en la base de datos del NCBI de genotipos y linajes del genotipo I de IBV (Figura 16). Las secuencias sudamericanas se agrupan en dos linajes del genotipo I, linaje 11 y 16. La cepa vacunal BR-1 de IBV, utilizada en la estandarización del ensayo de múltiplex PCR-NGS, aparece incluida en el genotipo 1 (linaje 11) con la secuencia de dicha cepa publicada en la base de datos y las restantes secuencias obtenidas en este trabajo. Se destaca que las cepas 421103, 171502 y 361501 fueron previamente secuenciadas en nuestro laboratorio en el marco de las Tesis de Maestría y Doctorado de la Dra. Marandino. Estas secuencias se encontraron estrechamente relacionadas en el análisis filogenético realizado con las obtenidas empleando la metodología de múltiplex PCR-NGS (Figura 16)

Respecto al gen N (codificante de la nucleoproteína viral) se realizó el estudio filogenético con 48 secuencias, incluyendo las 6 secuencias obtenidas en este estudio (muestras 421103, 171502, 361502, 201703, 031901 y la cepa vacunal BR-I) y secuencias disponibles en la base de datos. Los datos de estas secuencias se especifican en la filogenia de la Figura 17. Con las secuencias del gen N no se conforman los genotipo descritos anteriormente de IBV representados por las secuencias codificante de

una región de S. Sin embargo, se observa que las dos cepas uruguayas secuenciadas en este trabajo y las obtenidas por la Dra. Marandino forman un grupo monofilético (421103 y 361501).

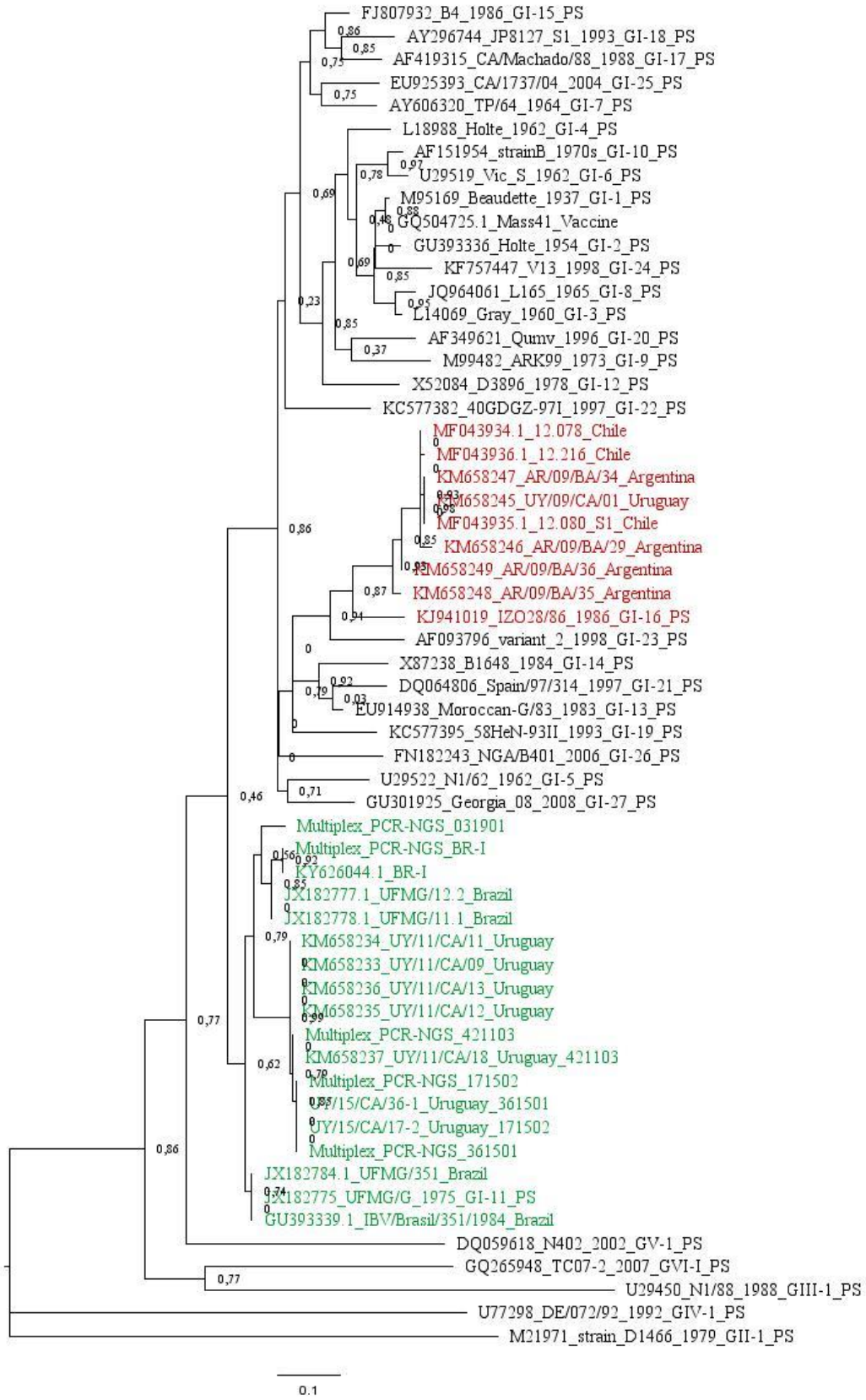


Figura 16. Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en la secuencia nucleotídica parcial codificante de la región S1 de la glicoproteína de superficie de IBV. Las secuencias que se encuentran en color verde representan al genotipo I linaje 11 mientras que las secuencias en color rojo pertenecen al genotipo I linaje 16.

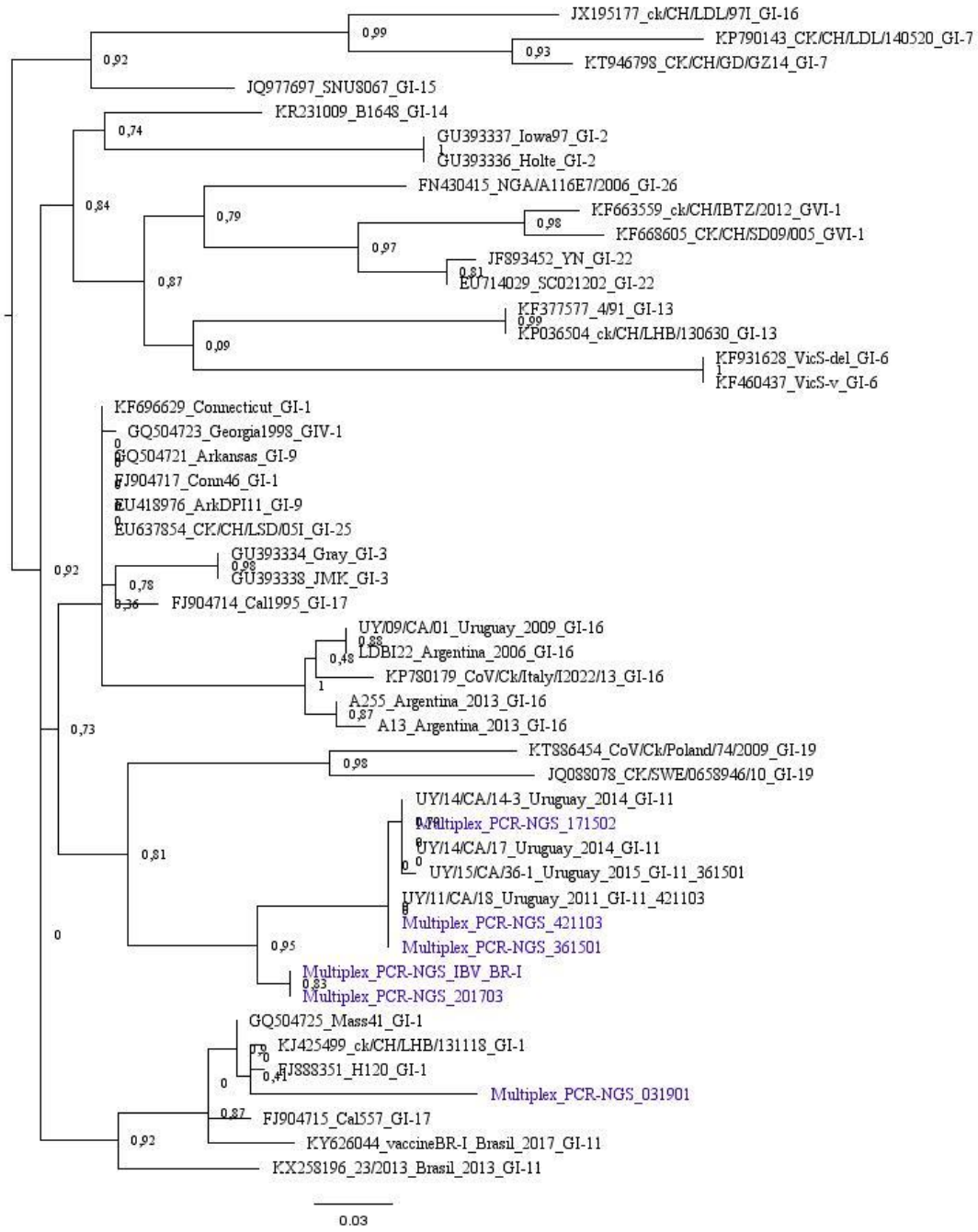


Figura 17. Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en la secuencia nucleotídica parcial codificante de la nucleoproteína de IBV. El modelo de evolución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el GTR+I+G. Las secuencias que se encuentra en color azul son las obtenidas con la metodología de múltiplex PCR-NGS.

5.2.2.5. Caracterización genética de CAV

La caracterización genética de CAV del ensayo de múltiplex PCR-NGS se basa en el análisis de la secuencia parcial del gen vp1 que codifica para la proteína estructural de la cápside viral.

Se realizó un análisis filogenético por máxima verosimilitud con 66 secuencias del gen vp1 que comprendieron las secuencias obtenidas en este trabajo (421103, 171502, 361501, 201703, 371701, 031901 y la cepa vacunal Nobilis P4) y representantes de los 4 clados que conforman a CAV cuyos datos se especifican en la filogenia de la Figura 18.

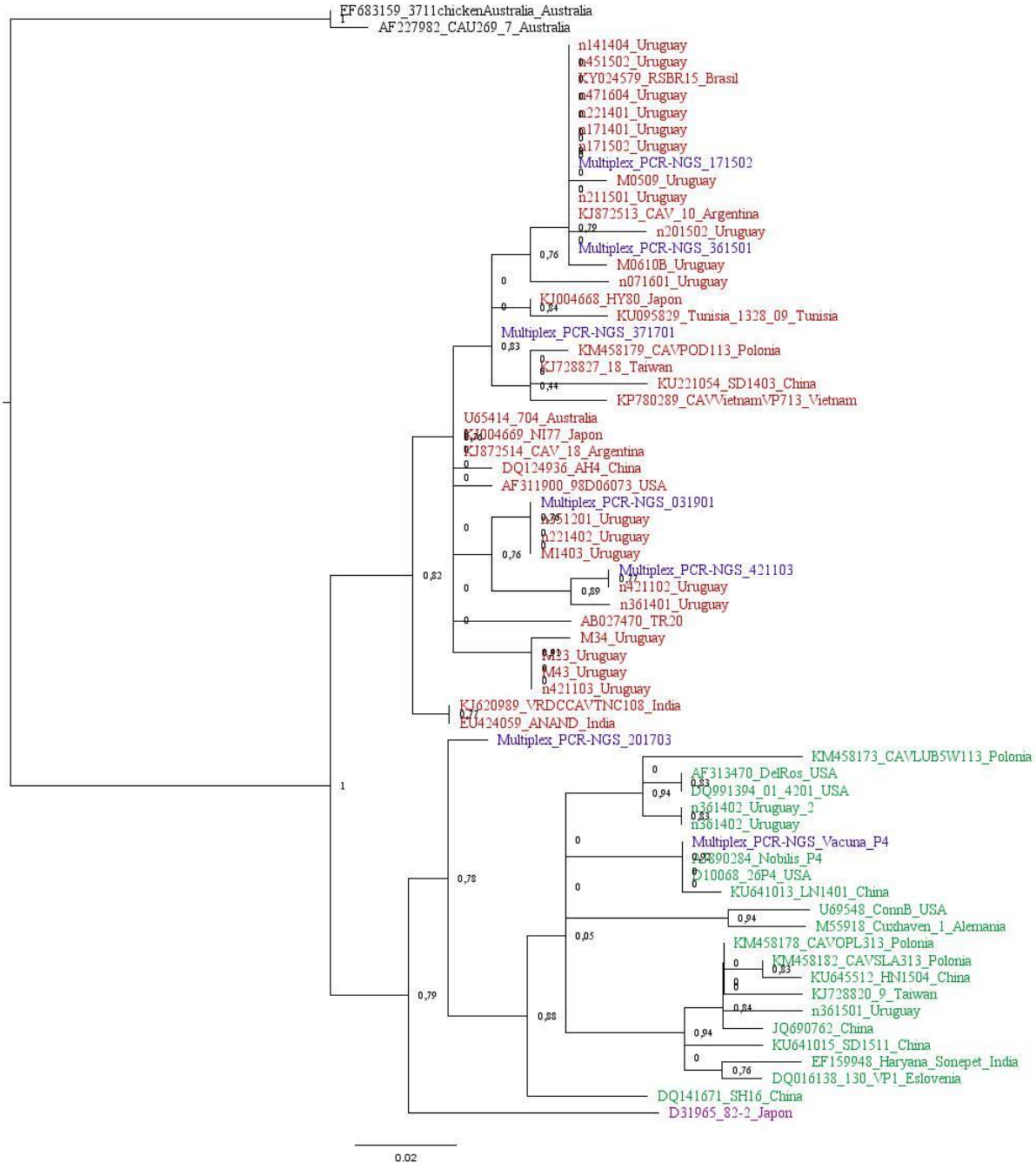


Figura 18. Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en secuencias nucleotídicas parciales del gen vp1 de cepas representantes de los distintos clados de CAV y las secuencias obtenidas por múltiplex PCR-NGS. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el HKY+I+G. Las secuencias que se encuentra en color azul son las obtenidas con la metodología de múltiplex PCR-NGS; las que se encuentran en color

negro son del clado I; las de color rojo representan al clado II, las de color verde pertenecen al clado III; y la violeta al clado IV.

La cepa vacunal secuenciada mediante múltiplex PCR-NGS agrupó en el clado III junto a la misma cepa vacunal publicada en la base de datos del NCBI. Las 6 cepas uruguayas obtenidas en este trabajo se agruparon en los clados II y III, el cual está constituido por cepas que se encuentran a nivel mundial. Los especímenes 421103, 171502 y 361501 fueron anteriormente caracterizados en nuestro laboratorio. Las cepas 421103 y 171502 se agrupan filogenéticamente junto a las mismas cepas caracterizadas previamente en el laboratorio a partir de otras estrategias metodológicas; la cepa 361501 presenta una incongruencia ya que agrupa en un clado diferente (Figura 18).

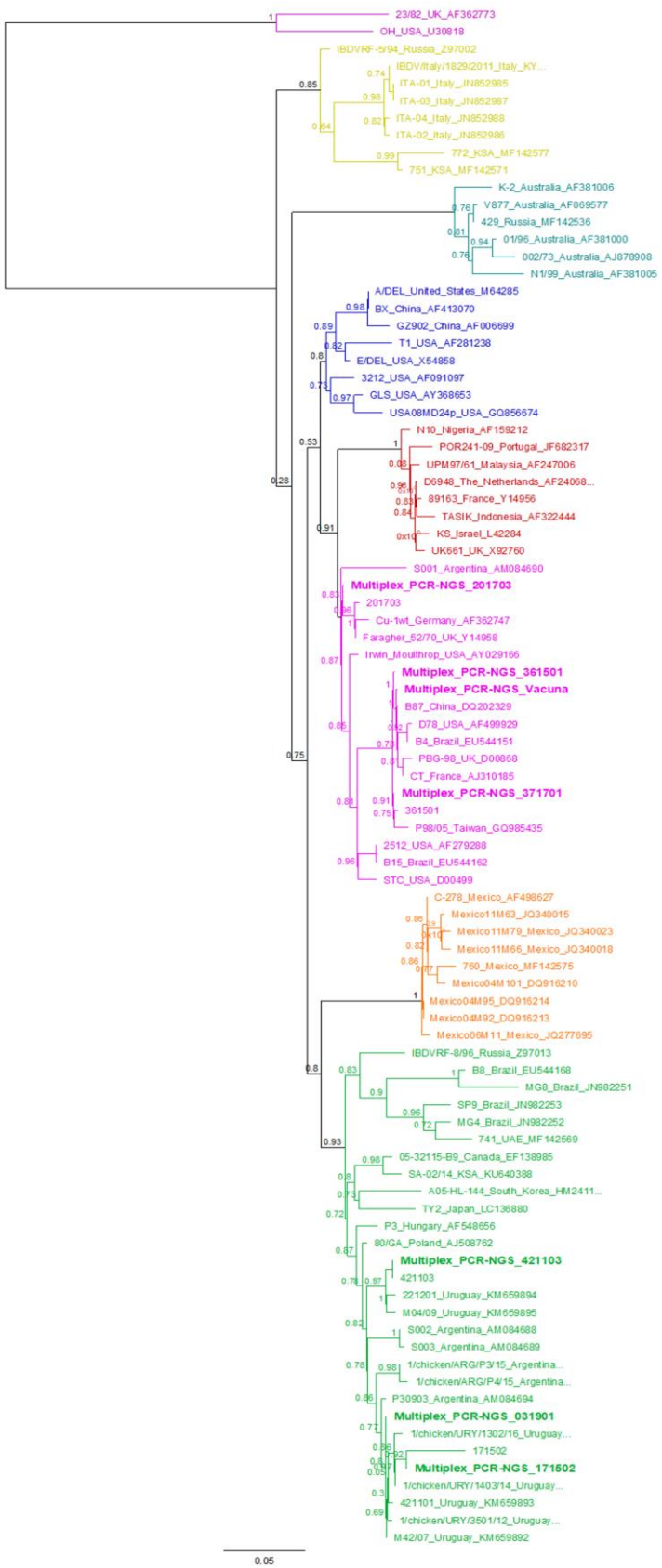
5.2.2.6. Caracterización genética de IBDV

La caracterización genética efectuada con el ensayo de múltiplex PCR-NGS para IBDV se basa en el análisis de una región nucleotídica parcial de ambos segmentos genómicos. Se realizaron dos inferencias filogenéticas que abarcan la región hipervariable del gen vp2 (segmento A) y secuencias parciales del gen vp1 (segmento B) que incluyeron las 7 secuencias obtenidas en este estudio (muestras 421103, 171502, 361502, 201703, 371701, 031901 y la cepa vacunal) y representantes a los distintos linajes bien definidos de IBDV disponibles en la base de datos del NCBI. La filogenia de vp2 se conformó por un total de 89 secuencias parciales y la de vp1 por 165 secuencias.

El análisis filogenético de la región hipervariable de vp2 evidenció los siete genogrupos descritos anteriormente (G1-G7 de la Figura 19). Todas las cepas uruguayas agruparon con las cepas no-hipervirulentas. Específicamente las muestras 361501, 201703 y 371701 formaron parte del clado de las cepas clásicas o genogrupo 1 (G1) junto con la cepa vacunal D78 secuenciada en este trabajo. Las restantes cepas (421103, 171502 y 031901) agruparon dentro del genogrupo *distinct* o G4. Las cepas de IBDV 421103, 171502, 361501 y 201703 fueron previamente secuenciadas en el laboratorio por Sanger y presentaron resultados similares a las muestras secuenciadas por múltiplex PCR-NGS (Figura 19).

En la filogenia de la Figura 20, correspondiente a la región parcial del gen vp1, se conformaron los linajes hipervirulentos y no-hipervirulentos característicos de IBDV.

Todas las cepas secuenciadas formaron parte del clado de las cepas no-hipervirulentas, siendo las muestras 421103, 171502 y 031901 pertenecientes al grupo monofilético comprendido por cepas *distinct* de IBDV. La cepa de campo 421103 secuenciada por la técnica de múltiplex PCR-NGS fue previamente secuenciada en el laboratorio por secuenciación Sanger tradicional, en la filogenia ambas secuencias se encontraron estrechamente relacionadas entre sí (Figura 20).



Serotipo 2

G6

G7

Variante (G2)

Hipervirulenta (G3)

Clásica (G1)

G5

Distinct (G4)

Figura 19. Árbol filogenético basado en máxima verosimilitud de un fragmento de la región hipervariable de vp2. Se representan a los 7 genogrupos y a las cepas del serotipo 2. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el GTR+I+G.

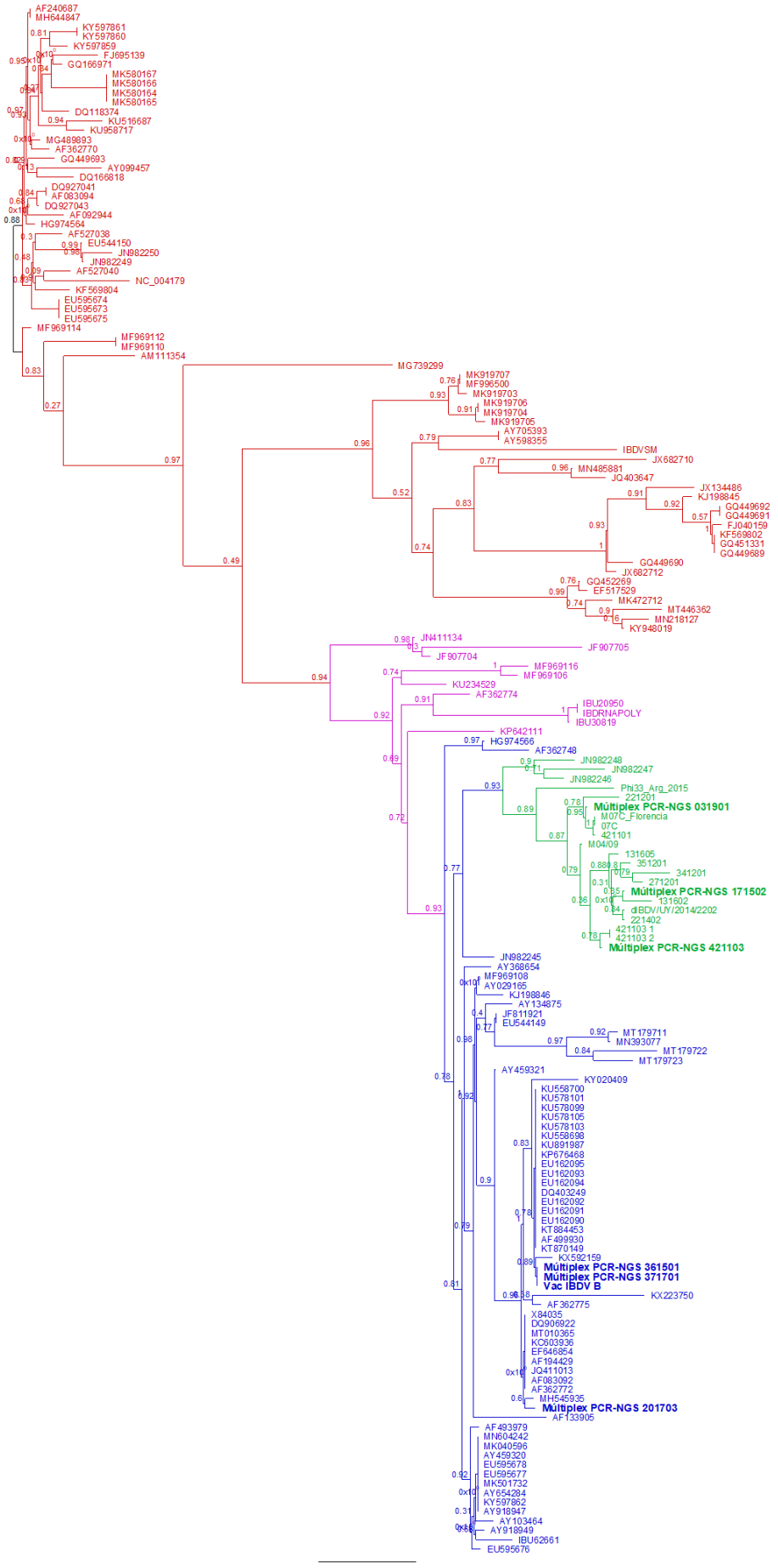

AF240687
MH644847
KY597861
KY597860
KY597859
FJ695139
GQ166971
MK580167
MK580166
MK580164
MK580165
DQ118374
KU516687
KU958717
MG489893
AF362770
GQ449693
AY099457
DQ166818
DQ927041
AF083094
DQ927043
AF092944
HG974564
AF527038
EU544150
JN982250
JN982249
AF527040
NC_004179
KF569804
EU595674
EU595673
EU595675
MF969114
MF969112
MF969110
AM111354
MG739299
MK919707
MF996500
MK919703
MK919706
MK919704
MK919705
AY705393
AY598355
IBDVSM
JX682710
MN485881
JQ403647
JX134486
KJ198845
GQ449692
GQ449691
FJ040159
KF569802
GQ451331
GQ449689
GQ449690
JX682712
GQ452269
EF517529
MK472712
MT446362
MN218127
KY948019
JN411134
JF907705
JF907704
MF969116
MF969106
KU234529
AF362774
IBU20950
IBDRNAPOLY
IBU30819
KP642111
HG974566
AF362748
JN982248
JN982247
JN982246
Phi33_Arg_2015
221201
Múltiplex PCR-NGS 031901
M07C_Florencia
07C
421101
M04/09
131605
351201
341201
271201
Múltiplex PCR-NGS 171502
131602
dIBDV/UY/2014/2202
221402
421103.1
421103.2
Múltiplex PCR-NGS 421103
JN982245
AY368654
MF969108
AY029165
KJ198846
AY134875
JF811921
EU544149
MT179711
MN393077
MT179722
MT179723
AY459321
KY020409
KU558700
KU578101
KU578099
KU578105
KU578103
KU558698
KU891987
KP676468
EU162095
EU162093
EU162094
DQ403249
EU162092
EU162091
EU162090
KT884453
AF499930
KT870149
KX592159
Múltiplex PCR-NGS 361501
Múltiplex PCR-NGS 371701
Vac IBDV B
KX223750
AF362775
X84035
DQ906922
MT010365
KC603936
EF646854
AF194429
JQ411013
AF083092
AF362772
MH545935
Múltiplex PCR-NGS 201703
AF133905
AF493979
MN604242
MK040596
AY459320
EU595678
EU595677
MK501732
AY654284
KY597862
AY918947
AY103464
AY918949
IBU62661
EU595676
0.03

Figura 20. Análisis filogenético por máxima verosimilitud basadas en secuencias nucleotídicas parciales de la región secuenciada del segmento genómico B de IBDV donde se destacan las cepas secuenciadas en este trabajo. El cladograma representa a las cepas hipervirulentas (rojo), cepas no-hipervirulentas (azul), las cepas no-hipervirulentas *distinct* (verde) y cepas pertenecientes al serotipo 2 (fucsia). El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el GTR+I+G.

5.2.2.7. Caracterización genética de ILTV

En la región analizada del gen ICP4 de ILTV se observó poca variación entre las cepas biológicas analizadas (Figura 21). La muestra biológica 031901 y la cepa vacunal secuenciadas por múltiplex PCR-NGS fueron idénticas a nivel nucleotídico. Asimismo, la identidad nucleotídica fue completa entre esta vacuna y las cepas vacunales Laryngo Vac, LT Blen y Fort Dodge, las cuales son de origen embrionario de pollo (*chicken embryo origin*, CEO). Las cepas 421103 y 171502 tienen dos y cuatro cambios, respectivamente, con respecto a la región de la cepa vacunal secuenciada por múltiplex PCR-NGS. Todas las cepas secuenciadas en este trabajo presentan una deleción de 12 nucleótidos respecto a la cepa vacunal de origen de cultivo tisular (*tissue culture origin*, TCO) IVAX y las cepas atenuadas SA2 y A20 de ILTV (Figura 21). Para estas cepas, los 12 nucleótidos adicionales corresponden a una duplicación en tándem.

La cepa 031901 fue 100% idéntica a las vacunas CEO mientras que las cepas 421103 y 171502 presentaron 99,8 y 99,4% de similitud, respectivamente, con las cepas CEO correspondientes. Sin embargo, estas dos muestras presentaron una identidad de alrededor del 96% con las vacunas TCO.

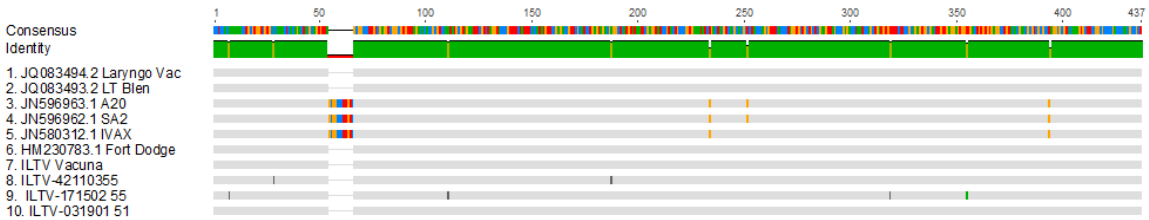
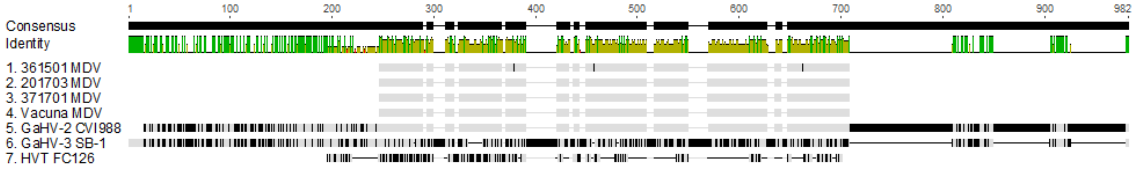


Figura 21. Alineamiento de las secuencias consensos parciales obtenidas en este trabajo del gen ICP4 de ILTV, cepas vacunales de origen embrionario de pollos (Laryngo-Vac, LT-Blen y Fort Dodge), una cepa vacunal de origen de cultivo tisular (IVAX) y cepas atenuadas (A20 y SA2). El sombreado gris representa identidad de secuencia en la posición.

5.2.2.8. Caracterización genética de MDV

La variabilidad genética de la región obtenida para MDV fue relativamente baja para todas las cepas de campo secuenciadas (Figura 22). Las cepas 201703, 371701 y la vacunal CVI988 secuenciadas por la técnica presentaron una identidad del 100 % en la región analizada respecto a la secuencia disponible en la base de datos del NCBI de la cepa CVI988. La cepa que presento una divergencia nucleotídica del 0,8 % con la vacunal fue la 361501. Las tres diferencias nucleotídicas, localizadas respecto a la secuencia codificante del gen pp38 en las posiciones 320, 487 y 526, fueron no sinónimas (Figura 22). Específicamente la cepa 361501 tenía glutamina, asparagina e isoleucina en las posiciones 107, 163 y 176, respectivamente, mientras que las restantes cepas presentaron arginina, aspártico y valina.

A-



B-

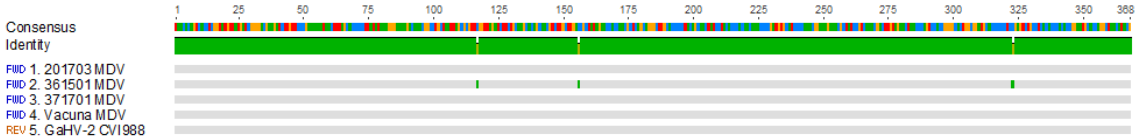


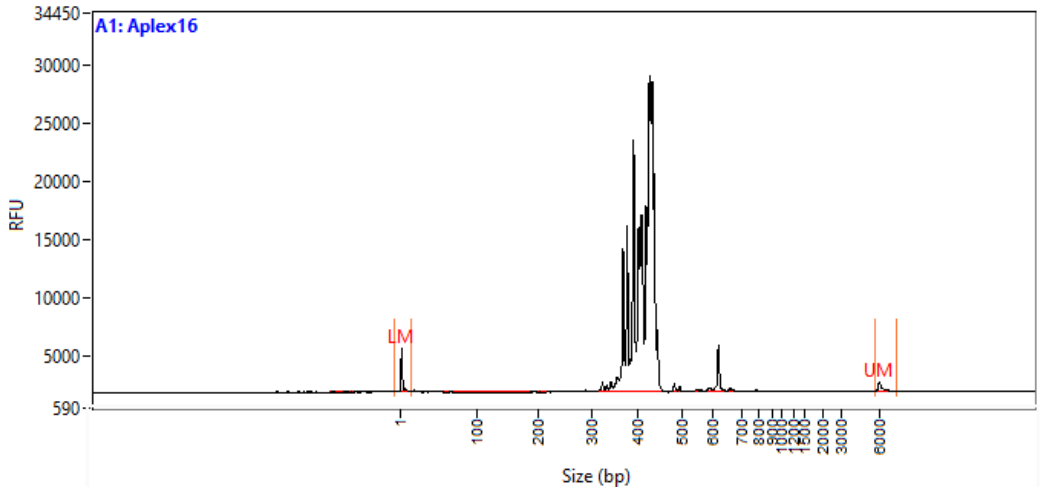
Figura 22. Alineamiento de las secuencias consensos parciales obtenidas en este trabajo del gen pp38 de MDV (201703, 361501, 37 1701) en conjunto con A- la secuencia completa de pp38 de las cepas vacunas disponibles (CVI988, SB-1 y FC126) y B- con la región correspondiente de la cepa vacunal CVI988. El sombreado gris representa identidad de secuencia en la posición.

5.3. Segundo abordaje metodológico

Al momento se diseñaron un total de 54 juegos de cebadores con adaptadores que amplifican regiones genómicas de MDV, ILTV, CAV, IBDV y NDV. Específicamente y respecto a CAV se diseñaron 4 juegos de cebadores que amplifican una región de 752 pb de vp1. Se diseñaron una totalidad de 18 juegos de cebadores que abarcan la amplificación completa de los genes de MDV codificantes de la glicoproteína L (gL), la interleucina 8 viral (vIL-8), pp38 y la oncoproteína Meq. Se obtuvieron una totalidad de 25 juegos de cebadores de ILTV que abarcaron los genes completos codificantes de ICP4, la glicoproteína G (gG), la glicoproteína M (gM), la timidina quinasa (Tk); y regiones parciales específicas de la glicoproteína J (gJ). Fueron 2 los juegos de cebadores tenidos en cuenta para NDV, los cuales son específicos de la proteína de fusión F. Referente a IBDV, se diseñaron 5 juegos de cebadores que abarcan regiones parciales de ambos segmentos genómicos. Las secuencias de todos los cebadores quiméricos se detallan en el Anexo 10.6..

En la Figura 23 se representa la calidad de las librerías indexadas generadas a partir de la unión de 16 productos de PCR individuales (Aplex16) correspondiente a las amplificaciones de CAV y MDV gL, vIL-8 y Meq (Anexo 10.6.) y de la múltiplex PCR (Mplex) efectuada con los cebadores IA CAV F563/R820, IA MDV gL F19968/R20204, IA MDV vIL8 F139866/R140117, IA MDV Meq F136509/R136982 (Anexo 10.6.). En ella se observa una distribución no gaussiana con tamaños discretos entre 300 y 500 pb.

A-



B-

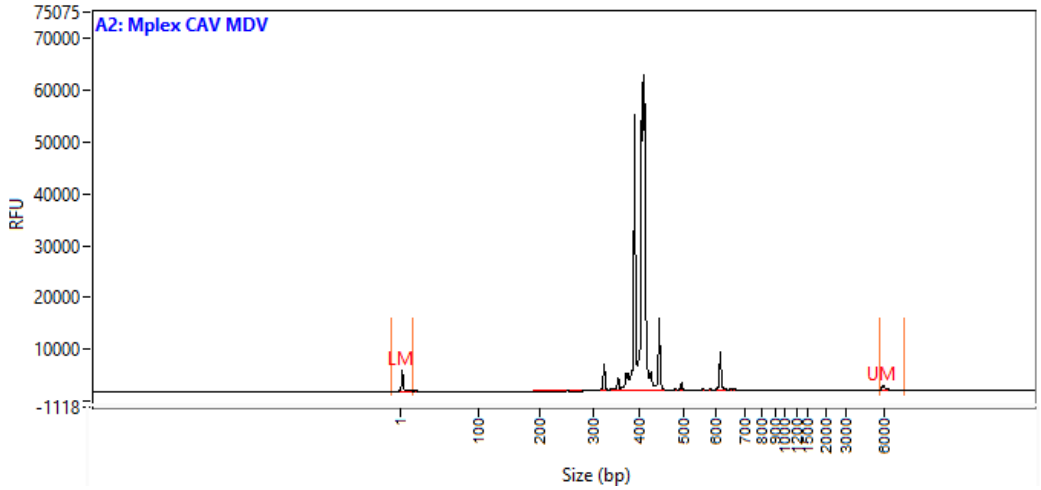
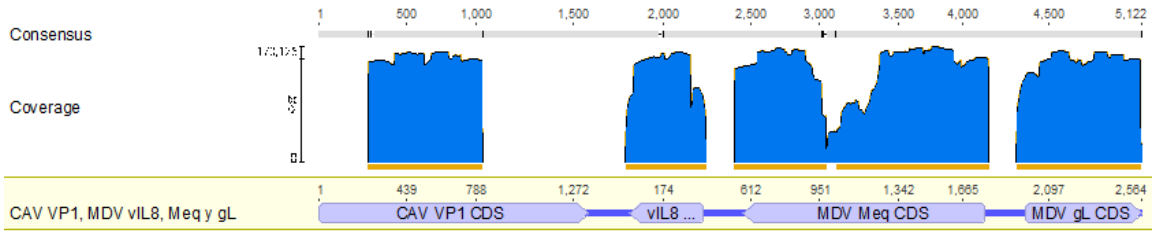


Figura 23. Electroferogramas representando la calidad de las librerías A- Aplex16 y B- Mplex CAV MDV analizadas mediante Fragment Analyzer. En el eje de las Y se grafican las unidades relativas de fluorescencia (RFU) y en el eje de las X el tamaño estimado en pares de bases que se correlaciona con el tiempo de corrida.

El análisis de la secuencia proveniente de la librería indexada Aplex16 presentó una amplitud de cobertura completa para las regiones codificantes de los genes vIL-8, Meq y gL de MDV así como para la región codificante parcial de CAV VP1 (Figura 24). Las coberturas medias se encontraron entre 44.066 y 69.279 (Tabla 22).

Para la librería indexada Mplex, se obtuvo una amplitud de cobertura del 100% para cada uno de los amplicones incluidos en la múltiplex PCR (Figura 24). Las coberturas medias de cada región secuenciada tomaron valores de entre 156.673 y 227.593 (Tabla 22).

A-



B-

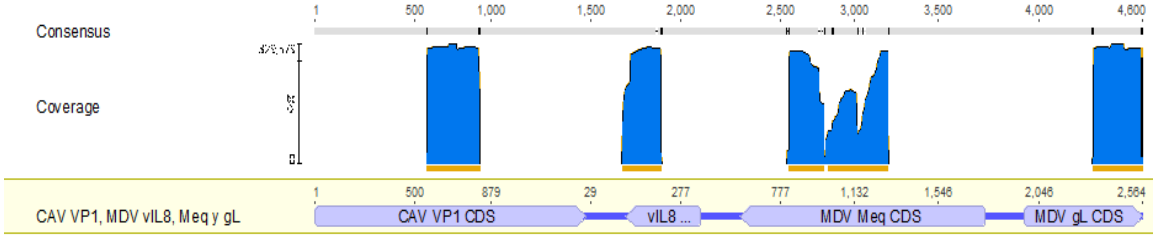


Figura 24. Diagrama de cobertura implementado en el software Geneious Prime de las muestras A- Aplex16 y B- Mplex. Se denota las secuencias completas codificantes de CAV VP1, MDV vIL8, MDV Meq y MDV gL en el mapeo.

Tabla 22. Coberturas promedio obtenidas a partir de las librerías indexadas Aplex16 y Mplex.

	Cobertura media Aplex16		**Cobertura media Mplex**
MDV Gl	56181	**MDV gL**	219704
MDV Meq	69279	**MDV Meq**	54957
MDV vIL8	44066	**MDV vIL8**	156673
CAV VP1	60244	**CAV VP1**	227593

6 Discusión

6.1. Ensayo diagnóstico basado en múltiplex PCR-NGS

Los principales agentes virales responsables de enfermedades respiratorias e inmunosupresoras en la avicultura son AIV, aMPV, CAV, IBDV, IBV, ILTV, MDV y NDV. Estos virus representan una amenaza considerable para la cría comercial de aves por su alta incidencia, la severidad de la infección y su distribución mundial (Cook & Cavanagh, 2002; Eterradossi & Saif, 2020; García & Spatz, 2020; Jackwood, 2019; Jackwood & de Wit, 2020; Nair et al., 2020; Schat & van Santen, 2020; Seal, 1998; Suarez, 2016; Suarez et al., 2020). La diversidad de patógenos virales fomenta el desarrollo de metodologías que permitan detectarlos en un único ensayo con independencia del conocimiento de los virus circulantes en la avicultura local. Esto permite disminuir los costos de ensayos diagnósticos adicionales, los tiempos de manipulación e implementar un control rápido y apropiado de la enfermedad (Laamiri et al., 2016). Debido a las condiciones de cría intensiva a la cual están sometidas las aves de corral, es posible que se infecten con dos o más patógenos virales. Las infecciones mixtas pueden inducir síndromes clínicos y lesiones más graves que dificultan considerablemente efectuar un diagnóstico certero (Adair, 2000; Cong et al., 2018a; Cong et al., 2018b). La generación de ensayos que permitan detectar múltiples agentes virales mejoran en gran medida los diagnósticos clínicos (Cong et al., 2018b). Durante las últimas décadas, las metodologías diagnósticas por PCR han constituido la técnica *gold standard* para la detección molecular de muchos patógenos virales, fúngicos, parasitarios y bacterianos, superando en sensibilidad y especificidad al aislamiento del virus y los métodos de cultivo bacteriano (Espy et al., 2006; Hodinka et al., 2013; Yang & Rothman, 2004). Los avances recientes en NGS han brindado la oportunidad de combinar la técnica de PCR con la secuenciación masiva para generar nuevas metodologías de diagnóstico e investigación. De esta manera se obtiene un enriquecimiento de las regiones genómicas de interés con la técnica de PCR, lo que disminuye la proporción de ácidos nucleicos del hospedero previo a la secuenciación masiva, obteniéndose mayor número de *reads* específicos de los patógenos virales.

En el presente trabajo se diseñó un ensayo de múltiplex PCR-NGS que permite incrementar significativamente el número de amplicones en las reacciones de múltiplex PCR, en comparación con las técnicas convencionales de múltiplex PCR en tiempo final y real. La detección molecular se basa en la obtención y análisis de secuencias mediante

técnicas de secuenciación de segunda generación que confieren la capacidad de caracterizar genéticamente a las cepas infectantes.

Un adecuado diseño de cebadores es fundamental para amplificar las secuencias blanco en forma eficiente y analizar su variabilidad (Cong et al., 2018a). En nuestro ensayo, los cebadores se diseñaron y seleccionaron de la bibliografía para amplificar secuencias relativamente conservadas y asegurar así su detección. En el caso de AIV, se seleccionó un par de cebadores que hibridan en regiones conservadas de la nucleoproteína presente en todos los subtipos (Lee et al., 2001). Los cebadores seleccionados de aMPV están enfocados a detectar los cuatro subtipos descritos (A-D) (Mayahi et al., 2017). Una región conservada del gen M de NDV, codificante de la proteína de la matriz, fue seleccionada como diana del ensayo debido a su identidad en los distintos genotipos caracterizados. Se seleccionó la región hipervariable del gen vp1 de CAV, codificante de la proteína estructural de la cápside viral, que es con la que actualmente se caracteriza genéticamente a las cepas (Techera et al., 2019). Para ILTV, se optó por una región del gen ICP4 (*infected-cell polypeptide 4*) que interviene en la regulación de la expresión génica viral (Chacón & Ferreira, 2009). Se diseñó un par de cebadores que amplifican una región del gen codificante de la fosfoproteína pp38 de MDV, la cual juega un papel en la reactivación viral en el período latente y en la transformación. Finalmente, se seleccionaron dos regiones blancos para IBDV e IBV. En el caso de IBDV, se escogieron regiones de los genes vp1 y vp2, los cuales se encuentran en los segmentos B y A respectivamente. El gen vp1 codifica para la ARN polimerasa dependiente de ARN viral mientras que el producto de vp2 codifica para el principal componente de la cápside viral (Hernández et al., 2011; Liu et al., 1998). Respecto a IBV, los dos juegos de cebadores se seleccionaron acorde a la función diagnóstica mediante una región del gen N (codificante de la nucleoproteína) y en base a la caracterización genética de cepas a través de una región del gen S (codificante de la glicoproteína de superficie) (Marandino et al., 2016; Zwaagstra et al., 1992). Debido a la elevada tasa de recombinación genética de los coronavirus (Simon-Loriere & Holmes, 2011) es informativo incluir dos genes en el panel para detectar estos eventos. Este panel proporciona una alta especificidad y sensibilidad, ya que tiene el potencial de permitir la amplificación de los distintos tipos virales diana seleccionados.

6.1.1. Muestras artificiales

6.1.1.1. Diagnóstico en muestras artificiales

La estandarización de la múltiplex PCR de virus ADN fue muy satisfactoria con el reactivo ImmoMix^{TM} (Bioline) que tiene una especificidad extremadamente alta en reacciones múltiples (Figura 11). Por el contrario, la estandarización de la múltiplex PCR de virus ARN presentó mayores dificultades, posiblemente asociadas a la inestabilidad del ARN y al proceso de retrotranscripción, así como a la temperatura de hibridación de los cebadores durante la PCR y la cantidad de amplicones involucrados. Para la obtención de mejoras cualitativas se requirió variar las concentraciones de los cebadores (Figura 12). Sin embargo, la observación de la totalidad de los productos de múltiplex PCR en su conjunto (virus ADN y ARN) por electroforesis capilar manifestó la presencia de numerosos amplicones en el rango de tamaños esperados sugiriendo, en una primera instancia, la presencia de todos ellos (Figura 13).

La primera prueba experimental del panel se realizó utilizando siete cepas vacunales bien caracterizadas y una cepa aislada de AIV. Todos los virus de las muestras artificiales de ADN y ARN fueron identificados a pesar de las diferencias en su arquitectura genómica, ya que se incluyeron virus ADN monocatenario circular (CAV), ADN bicatenario (ILTV, MVD), ARN monocatenario (aMPV, IBV, NDV), ARN monocatenario segmentado (AIV) y ARN bicatenario segmentado (IBDV) (Figuras 1 a la 8; Tablas 12 y 13).

Idealmente, todos los amplicones de virus ARN deberían haber presentado valores de cobertura media similares dada la composición cuasi-equimolar que se planteó en la muestra artificial de virus ARN. Sin embargo, la cobertura media varió en gran medida y los valores fueron bajos para algunos de los virus analizados (Tabla 12). Esto podría ser el resultado de múltiples factores, incluyendo la estructura del genoma, la calidad de la muestra, el número de copias genómicas del patógeno, la retrotranscripción, la eficiencia y amplificación desigual de los cebadores, y la interacción de múltiples amplicones durante la reacción de múltiplex-PCR. La cobertura media reducida detectada en el gen N de IBV en la muestra artificial de ARN también podría deberse a la disminución de la eficiencia de amplificación en la PCR individual de la cepa BR1 vacunal con respecto a la cepa vacunal Massachusetts (datos no mostrados).

Los virus de ADN presentaron valores de cobertura con una distribución más homogénea probablemente debido a que su genoma es más estable, no requiere un paso intermedio de retrotranscripción y el número de amplicones por reacción es reducido respecto a los virus de ARN (Tabla 13).

A pesar de las diferencias en la cobertura media de algunos agentes virales en las muestras artificiales, el procedimiento fue suficiente para identificar con precisión todos los patógenos con amplitud de cobertura (*breadth of coverage*) total.

6.1.1.2. Ensayos de sensibilidad

La sensibilidad de detección con la metodología de múltiplex PCR-NGS es mayor que la de los ensayos moleculares que involucran únicamente a las reacciones de PCR a tiempo final y real. Esto fue evidenciado con la muestra artificial de CAV compuesta por el menor número de copias genómicas (CAV1/10.000, Tabla 3), la cual fue detectada con la metodología de múltiplex PCR-NGS pero no así por el ensayo diagnóstico validado de qPCR que tiene un rango dinámico lineal establecido entre 10^2 y 10^8 copias de ADN por reacción (Techera et al., 2019) (Tablas 13 y 14). Es difícil determinar el límite inferior de la metodología de múltiplex PCR-NGS ya que depende de la profundidad asignada previo a la corrida de secuenciación en el equipo de secuenciación. Sin embargo, el aumento de la sensibilidad y la especificidad proporcionadas por la amplificación dirigida sugieren que la metodología puede emplearse directamente en la investigación de enfermedades virales sospechosas en las que la viremia tiende a ser breve y el punto de tiempo de carga máxima del virus suele pasar desapercibido (Carroll et al., 2015; Racsa et al., 2016).

6.2. Validación en especímenes biológicos

A diferencia de otros ensayos publicados de diagnósticos múltiples que se basan en la detección de distintos agentes virales respiratorios o inmunosupresores de forma separada (Cong et al., 2018a; Cong et al., 2018b; Xie et al., 2014; Zeng et al., 2015), la metodología de múltiplex PCR-NGS está enfocada a detectarlos en forma simultánea al incluir órganos respiratorios y linfoides en el estudio.

Previo a aplicar el ensayo de múltiplex PCR-NGS a muestras de campo fue necesario estandarizar una metodología de extracción de ácidos nucleicos para detectar los distintos agentes infecciosos.

6.2.1. Puesta a punto de metodología de extracción

En este trabajo se puso a punto la extracción de ácidos nucleicos a través del análisis comparativo de dos *kits* comerciales de extracción que son menos laboriosos y disminuyen significativamente los tiempos de ejecución en comparación con el método de extracción convencional por TRIzol. Los *kits* de extracción comerciales producen ADN y/o ARN de alta calidad que son adecuados para aplicaciones moleculares posteriores.

El rendimiento de los *kits* comerciales *Quick-RNA™ Miniprep* y *Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep* fue satisfactorio en las dos muestras analizadas; esto se estableció mediante RT-qPCR (Figura 14). Debido a que el *kit Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep* es específico del aislamiento de ADN y ARN de diversos patógenos menores de 200 kb y tiene un costo menor, se lo seleccionó para la extracción de ácidos nucleicos de los especímenes biológicos.

Para realizar la detección y caracterización de los virus aviares respiratorios e inmunosupresores, se debió considerar el tropismo de los mismos previo a la extracción de ácidos nucleicos. Se optimizó el procesamiento de las muestras para que se reduzcan los costos, además de hacerla menos laboriosa y reducir los tiempos requeridos. Para ello, se realizaron dos extracciones de ácidos nucleicos por muestra biológica. Una de ellas enfocada en los órganos respiratorios que, en este trabajo, comprendió la tráquea y su mucosa; mientras que la restante se focalizó en los órganos linfoides del ave realizando la conjunción, siempre que fuese posible, de tonsilas cecales, bursa de Fabricius y bazo.

6.2.2. Muestras biológicas

6.2.2.1. Diagnóstico

Las librerías generadas tras realizar las múltiplex PCR de virus ADN y ARN de seis muestras biológicas fueron de buena calidad, lo que permitió continuar con la secuenciación de segunda generación en la plataforma Illumina MiniSeq (Universidad de la República) (Figura 15).

El ensayo de NGS dirigido detecta específicamente los virus y proporciona suficiente cobertura sobre las secuencias de fondo indeseadas, disminuyendo de manera efectiva el obstáculo creado por el genoma del hospedero para la aplicación de NGS como una

prueba de diagnóstico clínico de rutina (Anis et al., 2018). Lo antes mencionado fue ampliamente corroborado en este estudio.

Evaluando específicamente la detección molecular, el ensayo fue eficiente y práctico para detectar diferentes cepas de los principales virus respiratorios e inmunosupresores que afectan la producción avícola (Tabla 15). De las muestras seleccionadas para aplicar la metodología de múltiplex PCR-NGS se contaba con un diagnóstico previo basado en algunos ensayos de PCR en tiempo final y real (Tabla 10). En este aspecto, se obtuvo concordancia del 100% identificando conjuntamente la presencia de otros agentes virales por muestra. Esto demuestra que el ensayo de múltiplex PCR-NGS es de alto rendimiento y adecuado para estudios de epidemiología molecular. La falta de detección de Influenza y de Metapneumovirus Aviar se encontró dentro de lo esperado debido a que dichas enfermedades no han sido reportadas en Uruguay según datos de la OIE (OIE, 2020b). La falta de detección del virus de la Enfermedad de Newcastle en los especímenes biológicos analizados por múltiplex PCR-NGS está de acuerdo con el último reporte en nuestro país de la enfermedad en el año 1984 (OIE, 2020b).

Tres muestras biológicas fueron tipificadas por múltiplex PCR-NGS positivas para ILTV, convirtiéndose en las primeras muestras en que se detectó la presencia de este virus en nuestro laboratorio, siendo todas negativas con el ensayo validado de qPCR (Callison et al., 2007). Se evidencia un aumento de la sensibilidad con la técnica desarrollada respecto a los ensayos de PCR en tiempo real al evaluar: i) los resultados obtenidos respecto a ILTV, ii) los ensayos de sensibilidad con la muestra artificial de CAV 1/10.000 y iii) la cepa que fue únicamente positiva por múltiplex PCR-NGS para CAV.

Al igual que para ILTV, se detectó por primera vez en el laboratorio la presencia de MDV con la técnica de múltiplex PCR-NGS en tres muestras. La muestra con mayor cobertura media fue también positiva para MDV mediante qPCR (Baigent et al., 2016), confirmando la presencia del genoma viral.

La muestra 201703 presentó únicamente cobertura para la región N de IBV; sin detectarse *reads* para la región del gen S. La cobertura media obtenida de 8 para el gen N es baja en los análisis que involucran el enriquecimiento por PCR y posterior secuenciación masiva. Este hecho, en conjunto con la falta de detección por la metodología tradicional de RT-qPCR, sugiere que probablemente se debiera de

considerar un umbral de *reads* para definir si una muestra es positiva para un determinado patógeno viral que dependerá de la profundidad teórica asignada de secuenciación. A modo de ejemplo, en este trabajo sugerimos que cualquier muestra con un promedio de cobertura menor a 20 y una profundidad de secuenciación asignada de 5.000× debe ser considerada como negativa para el patógeno en cuestión. No podemos descartar que los *reads* obtenidos se hayan originado por contaminación de la muestra en los distintos procedimientos moleculares realizados. Para evitar cualquier tipo de contaminación se extremaron los cuidados en la construcción de las siguientes librerías realizadas. Independientemente, si los *reads* obtenidos no fueron producto de una contaminación cruzada, podrían deberse al mayor enriquecimiento del gen N frente al S por los ARN subgenómicos productos de la transcripción viral discontinua o al mejor rendimiento de los cebadores del gen N.

En todas las cepas biológicas se detectaron infecciones mixtas con la metodología desarrollada. Las infecciones mixtas pueden conducir a un agravamiento de la sintomatología clínica presentada en un determinado galpón constituyendo problemas de mayor severidad para la industria. Este hecho pone en evidencia la necesidad de contar con protocolos diagnósticos para la detección de múltiples patógenos, como los ensayos de múltiplex PCR. Las ventajas de estos abordajes metodológicos en comparación con los protocolos de reacción individual son la posibilidad de detección de múltiples secuencias de ácido nucleico en un solo tubo de PCR que conlleva el ahorro de tiempo, costos y mano de obra (Cong et al., 2018a). Sin embargo, la interpretación de estos resultados se basa en tamaños de amplicones que limita la multiplicidad en una reacción y no pueden cumplir los requisitos para el diagnóstico molecular de alto rendimiento (Cong et al., 2018a). Esta limitación se supera con la múltiplex PCR acoplada a secuenciación masiva cuyo análisis se basa en las secuencias resultantes.

6.2.2.2. Caracterización genética

La caracterización genética de las cepas infectantes de CAV, IBDV, IBV, ILTV, MDV en la múltiplex PCR corresponde al análisis de sus secuencias nucleotídicas. Teniendo en cuenta la falta de detección de cepas de campo de AIV, aMPV y NDV en Uruguay (OIE, 2020b), no fue necesario por el momento incorporar regiones que permitan realizar una caracterización genética. En caso de diagnosticar con el ensayo de múltiplex PCR-NGS algunos de ellos, se requerirá una caracterización genotípica más

profunda en vista a la gravedad que imparten para la sanidad aviar y la potencial transmisión zoonótica al humano de AIV. Asimismo, es requerimiento de la OIE su notificación inmediata una vez detectados por el país.

6.2.2.2.1. Virus de la laringotraqueítis infecciosa

La regulación de la expresión génica de ILTV en las etapas tempranas y tardías de la infección está dada por el gen ICP4. El análisis de secuencia de ICP4 es utilizado frecuentemente para determinar el origen genotípico de las cepas de ILTV en infecciones de campo, lo que permite a los productores evaluar la eficacia de los protocolos y los métodos de vacunación (Chang et al., 1997; Johnson et al., 1995; Madsen et al., 2013). Debido a que ICP4 presenta regiones muy conservadas y otras con menor porcentaje de similitud, es considerado una buena diana para realizar análisis y diferenciación de cepas infectantes (Johnson et al., 1995). Al momento, se han estandarizado distintas metodologías para genotipar cepas de ILTV que involucran la amplificación por PCR de uno o múltiples genes virales, seguido del análisis de RFLP y/o secuenciación (García & Spatz, 2020). La secuenciación parcial y el análisis del gen ICP4 aportaron resultados comparables al estudio de PCR-RFLP, lo que sustenta y fomenta el uso de la secuenciación parcial del gen ICP4 para la diferenciación de cepas (Chacón & Ferreira, 2009). En esta Tesis se detectó ILTV en tres especímenes aviares de los seis analizados por múltiplex PCR-NGS. Específicamente, se obtuvo amplitud de cobertura completa para la región parcial analizada del gen ICP4 de las muestras biológicas 421103, 171502 y 031901 a pesar de encontrarse, para cada una de ellas, por debajo del límite de detección de la técnica de qPCR validada. El espécimen aviar 031901 no presentó diferencias nucleotídicas en la región secuenciada del gen ICP4 respecto a las cepas vacunales CEO. Sin embargo, se observaron pocas diferencias en las muestras 421103 y 171502 lo que, en conjunto con los 12 nucleótidos adicionales presentes en la vacuna TCO, sugieren una caracterización genética relacionada con las vacunas CEO con potencial origen a partir de una de ellas. Dada la falta de información de las manifestaciones clínicas de los lotes y de la inmunización realizada respecto a ILTV, no se puede afirmar que las mencionadas cepas provienen de una cepa vacunal CEO que revirtió su virulencia o, de lo contrario, que sean cepas de campo típicas. Se destaca que, la alta identidad genética de las secuencias analizadas en este trabajo concuerdan con lo previamente reportado (Chacón & Ferreira, 2009; Neff et al., 2008) y

que la secuenciación de genes adicionales o incluso el análisis del genoma completo de las cepas, proporcionaría más información sobre su origen.

Asimismo, las variantes intra-hospedero de las cepas 421103 y 171502 no advirtieron cambios significativos entre el análisis de los resultados a partir de las dos librerías realizadas, en la que se modificó únicamente la temperatura de hibridación de los cebadores de la múltiplex PCR de virus ARN, lo cual era de esperarse dado que se utilizaron las mismas extracciones de ADN para los ensayos y no se varió ningún parámetro de la múltiplex PCR de virus ADN (Tablas 17 y 21). La secuencia de la muestra 421103 presentó algunas variantes nucleotídicas en determinadas posiciones. Respecto a la muestra 171502, se observó solamente una variante minoritaria intra-hospedero con frecuencia del 11% en una librería (múltiplex PCR-NGS a 51°C), la cual no fue detectada en la restante. Sin embargo, al analizar visualmente el mapeo de los *reads* en los resultados de NGS de ambas librerías, se pudo apreciar la existencia de la variante que no superó la representación en el 10% de los *reads* en la posición. Al igual que con la cepa 421103, la muestra biológica 171502 presentó varias variantes en posiciones genómicas determinadas. El genoma de ILTV está estructurado por una región única larga (*unique long*, UL) y una región única corta (*unique short*, US), la cual está flanqueada por repeticiones invertidas denominadas secuencia repetida interna (*internal repeat region*, IRS) y secuencia repetida terminal (*terminal repeat* región, TRS). Tanto IRS como TRS codifican para una copia del gen ICP4 (Thureen & Keeler, 2006) (Figura 25). Considerando la naturaleza repetida del gen ICP4 en el genoma de ILTV es que se sugiere que la amplia proporción observada de variantes en posiciones determinadas de las cepas 421103 y 171502 representan variaciones genéticas entre los genes ICP4 codificados por cada región IRS y TRS. En otras palabras, las variaciones descritas corresponderían a posiciones distintas dentro del genoma completo de ILTV. Por tal motivo, la codificación de un codón de terminación prematuro por una variante detectada de la muestra 171502 no simbolizaría un producto viral trunco de ICP4 que impidiese regular la expresión génica sino que, con la información codificada por otra región del genoma, se generaría el producto ICP4 correctamente.

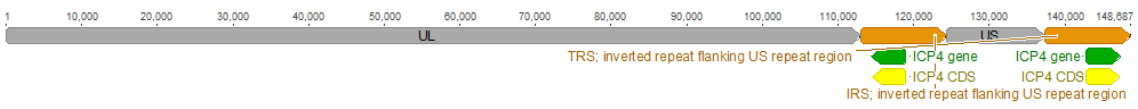


Figura 25. Representación esquemática del genoma de ILTV donde se denota presencia de dos genes de ICP4 en regiones distantes.

6.2.2.2.2. Virus de la Enfermedad de Marek

Actualmente hay tres cepas de vacuna comercialmente disponibles contra MDV: vacuna viva atenuada de serotipo 1 (*Gallid alphaherpesvirus 2*) representada por la cepa CVI988 (*Rispens*), la cepa SB-1 de serotipo 2 (*Gallid alphaherpesvirus 3*) y herpesvirus de serotipo 3 de pavo (*Turkey herpesvirus*, HVT). Las vacunas pueden estar en presentación mono, bi y trivalente dependiendo de los serotipos incluidos en las mismas. Los serotipos 2 y 3 se consideran no virulentos y generan una respuesta inmune que protege contra algunas cepas de campo del serotipo 1 (Baigent et al., 2016).

En la presente Tesis se realizaron análisis nucleotídicos y de sus secuencias deducidas de aminoácidos de una región parcial de pp38 a través de la obtención de secuencias por múltiplex PCR-NGS de muestras biológicas. Se requiere a pp38 para establecer una infección citolítica en los linfocitos B, para producir un nivel adecuado de células T infectadas de forma latente y para mantener el estado transformado de los linfocitos mediante la prevención de la apoptosis. Además, presenta un rol importante en la reactivación viral en el período de latente y en la transformación celular (Gimeno et al., 2005).

Mediante los análisis efectuados se sugiere que dos cepas, la 201703 y la 371701, provienen de la cepa vacunal CVI988 debido a la falta de diferenciación en la región de estudio. La restante cepa en la que se detectó MDV fue la 361501, la cual sí presentó diferencias nucleotídicas frente a la cepa vacunal CVI988 en las posiciones 320, 487 y 526 que conducen a cambios a nivel de la secuencia aminoacídica deducida (Figura 22). Existe una sola variación nucletídica en la posición 320 del gen pp38 entre la cepa CVI988 (representada por un residuo de guanina en esta posición) y todas las cepas virulentas (que tienen un residuo de adenina) (Cui et al., 1991; Spatz, Petherbridge, et al., 2007; Spatz, Zhao, et al., 2007), convirtiéndose en un biomarcador robusto para diferenciar CVI988 de las cepas virulentas (Baigent et al., 2016). Asimismo, la posición 109 puede también considerarse como una característica de virulencia (Abd-Ellatieff et al., 2018; Lachheb et al., 2020) la cual no fue detectada en la cepa 361501.

Por lo antes expuesto, la cepa 361501 es la única que pertenecería a una cepa virulenta de MDV por presentar el característico marcador aminoacídico en la posición 107. Sin embargo, no se pudo relacionar las posiciones aminoacídicas 163 y 176 como biomarcadores para distinguir entre la cepa CVI988 y las cepas virulentas de MDV. La

caracterización de cepas vacunales y cepas de campo virulentas de MDV es comercialmente importante para confirmar si la vacunación fue exitosa, diagnosticar la enfermedad de Marek e investigar las causas del fracaso de la vacuna (Baigent et al., 2016; de Boer et al., 1986; Landman & Verschuren, 2003; Witter et al., 2005).

6.2.2.2.3. Virus de la anemia infecciosa aviar

Las cepas de campo y vacunales de CAV pueden distinguirse por estudios filogenéticos (Eltahir et al., 2011; Li et al., 2017). Con la región seleccionada en la metodología de múltiplex PCR-NGS se observó la formación de los cuatro clados en que se divide CAV (I al IV), sugiriendo que el análisis de esta región es suficiente para caracterizar correctamente las cepas de campo. La composición de aminoácidos de CAV es muy conservada, y solo VP1 muestra variaciones significativas en las regiones comprendidas entre los residuos 139 y 151 (Renshaw et al., 1996). Se ha observado que los aminoácidos en las posiciones 139 y 144 se encuentran ligados y tienen ciertas funciones en el crecimiento y la propagación viral (Simionatto et al., 2006). La secuencia codificante de esta región hipervariable está considerada dentro del panel personalizado con el único juego de cebadores de CAV utilizado.

Las cepas uruguayas en estudio se tipificaron dentro de los clados II y III de CAV, consistente con la amplia distribución geográfica de los mismos (Figura 18). Los clados I y IV al momento están conformados por cepas obtenidas de Australia y Japón, respectivamente. A lo largo de distintas posiciones de la región hipervariable del gen vp1 de la cepa 361501 se obtuvo una secuencia consenso degenerada por variaciones ampliamente representadas por posición. La discordancia filogenética obtenida en dicha cepa con la secuencia previamente obtenida en el laboratorio se podría deber a una co-infección evidenciada por incluir con la metodología de múltiplex PCR-NGS distintos tejidos en forma simultánea, a diferencia de la secuencia previamente obtenida en el laboratorio con otros procedimientos.

6.2.2.2.4. Virus de la bursitis infecciosa aviar

La evolución genómica de IBDV es debida principalmente a mutación, seguido por reordenamientos genómicos y recombinación. Estos mecanismos producen una gran variabilidad genética en los distintos linajes evolutivos presentes en las poblaciones virales. El análisis de la secuencia nucleotídica permite detectar reordenamientos, eventos de recombinación y nuevos linajes (Tomás et al., 2020). Al abordar el análisis

de regiones de los segmentos A y B de IBDV es que la metodología desarrollada puede evidenciar los reordenamientos genómicos así como las distintas mutaciones que conducen a los linajes. Actualmente las cepas de IBDV se caracterizan en siete genogrupos, donde las cepas clásicas, variantes e hipervirulentas conforman a los genogrupos G1, G2 y G3, respectivamente.

La aplicación de la metodología de múltiplex PCR-NGS a especímenes biológicos y a una cepa vacunal evidenció las relaciones filogenéticas de los genogrupos de IBDV (Figuras 19 y 20). Las cepas uruguayas secuenciadas en este trabajo se tipificaron como no-hipervirulentas encontrándose en dos genogrupos distintos, G1 (clásicas) y G4 (*distinct*), conforme con la previa información genética disponible de las algunas de las cepas. Las cepas del G4, también conocidas como *distinct*, están siendo representadas en Asia, Europa, América del Norte y del Sur, incluyendo numerosas cepas uruguayas y argentinas (Tomás et al., 2020).

En el caso de la cepa 371701, no se contaba con la secuenciación automática por Sanger tradicional debido a la baja carga viral de la muestra. Sin embargo, con la metodología aplicada de múltiplex PCR-NGS se pudo obtener las secuencias parciales y tipificarlas por ambos segmentos como una cepa clásica (G1).

Asimismo, y contemplando que existen marcadores aminoacídicos específicos para la caracterización de las cepas de IBDV, la obtención de las secuencias nucleotídicas por la técnica de múltiplex PCR-NGS permite, adicionalmente, obtener la secuencia deducida generando una mayor caracterización de las cepas infectantes.

6.2.2.2.5. Virus de la bronquitis infecciosa aviar

En IBV, la mayoría de los eventos de mutación y de recombinación involucran al gen S (Lin & Chen, 2017). Los análisis de los genes S y N se utilizan para la identificación de genotipos y explorar la evolución filogenética y epidemiológica de las cepas (Adzhar et al., 1997; Kant et al., 1992; Liu et al., 2006).

La filogenia basada en las secuencias parciales incluidas en la múltiplex PCR-NGS del gen S1 de IBV muestra que las cepas analizadas pertenecen todas al linaje 11 del genotipo I, encontrándose una concordancia en la agrupación filogenética frente a las cepas previamente secuenciadas en nuestro laboratorio por otras metodologías (Figura 16). Asimismo, los resultados de esta Tesis con relación al gen N de IBV se ajustan a

los encontrados con las cepas previamente secuenciadas con excepción de la cepa 201703 (Figura 17). Como se ha mencionado, obtuvimos *reads* únicamente para la región N de IBV de esta cepa (201703). Biológicamente esto pudo deberse al enriquecimiento de transcriptos sub-genómicos del gen N respecto al S durante el ciclo replicativo; y técnicamente se podría deber a la contaminación con la cepa vacunal empleada como control en los ensayos (BR-I) y/o amplificación diferencial en el transcurso de la múltiplex PCR efectuada.

Considerando que los distintos serotipos de IBV tienen un bajo grado de protección cruzada, los análisis genéticos tienen el potencial de brindar información para seleccionar los programas de vacunación más adecuados (Cavanagh, 2003; Farsang et al., 2002).

6.3. Nueva metodología con cebadores con adaptadores

6.3.1. Fundamentación

La nueva metodología en vías de desarrollo fue primariamente planteada dado el robusto rendimiento de los resultados obtenidos al momento con la primera múltiplex PCR-NGS estandarizada y los requerimientos máximos de tamaños de los fragmentos de ADN por el nuevo secuenciador MiniSeq, recientemente incorporado por la UdelaR. Los cartuchos de secuenciación con máximo rendimiento disponibles para dicha plataforma genómica son de 300 ciclos. El número de ciclos se refiere al número máximo de bases que se pueden secuenciar con un *kit* en particular, constituyendo los ciclos necesarios para la lectura de los índices de código de barra independientes del número de ciclos seleccionados. Es decir, un cartucho de secuenciación de 300 ciclos implica que se puede secuenciar un máximo de 300 bases del fragmento de interés en formato 1×300bp o 2×150bp. Por tal motivo, la nueva metodología de múltiplex PCR-NGS que se está desarrollando involucra la amplificación de fragmentos de hasta 300 pb, con la particularidad de ser independientes, gracias a los cebadores quiméricos con secuencias adaptadoras de Illumina, del procedimiento de generación de librerías por *kits* comerciales. Este hecho disminuye considerablemente los tiempos requeridos y los costos de preparación de muestras para la secuenciación masiva, siendo únicamente el paso de incorporación de los índices de código de barra requerido por cada muestra procesada.

6.3.2. Diseño del panel

La nueva múltiplex PCR involucra un número superior de cebadores, actualmente conformado por 54 juegos de cebadores a los que se les adicionarán aproximadamente 10 juegos más y así abarcar todos los agentes virales seleccionados en este estudio para su diagnóstico y caracterización. Este incremento significativo se basa particularmente en aumentar la capacidad de caracterización genética de las cepas infectantes.

El genoma de MDV codifica para más de 200 genes. Muchos de ellos son genes únicos para las cepas de MDV, entre los que se encuentran la interleucina 8 viral (vIL-8), la oncoproteína Meq y la fosfoproteína pp38. Estos genes tienen implicancia en la oncogenicidad y patogenicidad viral (Tian et al., 2011). La base molecular del aumento de la virulencia del MDV aún es desconocido. Sin embargo, mutaciones en algunas regiones del genoma viral como las encontradas en Meq, pp38, vIL-8 y UL-1, codificante de la glicoproteína L (gL), han sido identificado como factores de virulencia (Cui et al., 2005; Shaikh et al., 2013; Shamblin et al., 2004; Tian et al., 2011). Por tal motivo, la nueva metodología de múltiplex PCR-NGS incorpora el análisis de la secuencia completa codificante de Meq, pp38, vIL-8 y gL para una mayor caracterización de las cepas infectantes mediante la detección de mutaciones puntuales e inserciones/deleciones.

Debido a la antigenicidad conservada de ILTV, la discriminación molecular entre las diferentes cepas se ha realizado principalmente a nivel del genoma. Principalmente la genotipificación de ILTV se efectúa mediante el análisis de PCR-RFLP y/o de secuenciación de distintas regiones para determinar si los genotipos virales de regiones geográficamente distintas corresponden a la vacuna, a los aislados de campo o a ambos (García & Spatz, 2020). La nueva metodología de múltiplex PCR-NGS implica el estudio de la secuencia completa de los genes codificantes de ICP4, la glicoproteína G (gG), la glicoproteína M (gM), la timidina quinasa (Tk); y regiones parciales específicas de la glicoproteína J (gJ). El gen codificante de la glicoproteína J (gJ) permitió en Argentina diferenciar entre cepas de campo y entre cepas vacunales, reconociéndose cinco haplotipos distintos (Craig et al., 2017). Los restantes genes seleccionados también se han utilizado previamente en estudios para la caracterización de cepas (Oldoni et al., 2008). El análisis simultáneo de cuatro genes completos codificantes de gG, gM, Tk e ICP4, y de regiones parciales del gen gJ brindará una mejor

caracterización de las cepas circulantes que la obtenida simplemente con la región parcial de ICP4 empleada en la primer múltiplex PCR-NGS desarrollada en esta Tesis.

El diagnóstico y la caracterización genética de CAV en la nueva metodología refieren a una región parcial del gen vp1 codificante de la cápside viral que, a diferencia de la primera metodología, abarca una región más extensa constituida por 754 pb. Esta región comprende la región hipervariable de vp1 utilizada ampliamente para la caracterización de cepas y permite obtener mayor información genética para contemplar más diferencias entre las mismas. De igual forma, la nueva metodología de múltiplex PCR-NGS de IBDV está enfocada a regiones parciales de ambos segmentos genómicos, correspondientes a vp1 y a la región hipervariable de vp2, y utilizados para caracterizar acorde a Tomás y colaboradores (2020).

Respecto a NDV se seleccionaron de la bibliografía dos juegos de cebadores que hibridan en el gen F, codificante de la proteína de Fusión. La proteína F es sintetizada como un precursor proteico F_0 que posteriormente es clivado en las subunidades F1 y F2, permaneciendo unidas entre sí de forma covalente por un puente disulfuro, necesario para la infectividad de la progenie viral (Nagai et al., 1976). Las cepas virulentas (mesogénicas y velogénicas) presentan dos pares de aminoácidos básicos en los residuos 112-113 y 115-116 en el extremo carboxilo terminal de la proteína F2 y fenilalanina en la posición 117 en el extremo amino terminal de la proteína F1 (secuencia consenso ^{112}R/K-R-Q-R/K-R↓F^{117}). Mientras que las cepas de baja patogenicidad (no virulentas y lentogénicas) presentan únicamente dos aminoácidos básicos en las posiciones 113 y 116, además de un residuo de leucina en posición 117 (secuencia consenso ^{112}G/E-K/R-Q-G/E-R↓L^{117}) (de Leeuw et al., 2005; Glickman et al., 1988; Meulemans et al., 2002). La presencia de múltiples aminoácidos básicos en las cepas virulentas permite la escisión intracelular por proteasas tipo furina presentes en una amplia gama de células y tejidos del hospedero, resultando en infecciones sistémicas. En tanto, el procesamiento de las cepas lentogénicas ocurre extracelularmente por proteasas tipo tripsina que se encuentran en el epitelio respiratorio e intestinal (Fujii et al., 1999; Nagai et al., 1976; Ogasawara et al., 1992). Los cebadores seleccionados de la bibliografía para la técnica de múltiplex PCR-NGS abarcan la región hipervariable del gen F con la que se puede determinar el motivo del sitio de clivaje del precursor proteico y realizar análisis filogenéticos para determinar su caracterización genética acorde a lo publicado por Liu y colaboradores (2019).

6.3.3. Rendimiento en primeros abordajes

Se efectuó una primera evaluación del rendimiento de secuenciación profunda de la metodología con los cebadores quiméricos. Para ello se analizaron dos muestras conformadas por la unión de 16 juegos de cebadores (Aplex16) y se efectuó una múltiplex PCR reducida con 4 juegos de cebadores (Mplex). Las librerías indexadas de ambas mostraron una distribución diferencial respecto a las librerías de muestras biológicas realizadas con *kits* comerciales (Figuras 15 y 23). Esta diferenciación refiere a la falta de tagmentación de las librerías indexadas que fueron generadas con los cebadores quiméricos, generando fragmentos discretos del tamaño esperado.

Es importante señalar que en este primer abordaje metodológico se utilizó, para la incorporación de los índices de código de barra, el *mix* de PCR del *kit Nextera™ DNA Flex Library Prep Kit* (*Illumina*) debido a su amplia disponibilidad en el laboratorio. Sin embargo, para efectuar este paso de indexado de la muestra a partir de la múltiplex PCR con los cebadores quiméricos se debiera de emplear una enzima ADN polimerasa termoestable con actividad exonucleasa 3´→5´ (correctora de prueba).

Tanto para Aplex16 como Mplex se obtuvo una amplitud de cobertura completa en cada región analizada, demostrando que se secuenció adecuadamente a partir de ambos extremos de cada fragmento (*paired-end sequencing*) con coberturas homogéneas a lo largo del mismo (Figura 24), diferenciándose de la generación de las librerías con *kits* comerciales que presentan una distribución en forma de campana con menor cobertura hacia los extremos.

El abordaje de esta nueva metodología consiste en las siguientes etapas: procesamiento de la muestra; extracción de ácidos nucleicos; retrotranscripción para detección de virus ARN; múltiplex PCR con el panel personalizado conformado por secuencias específicas del virus y secuencias adaptadoras de Illumina en los extremos 5´; purificación de productos de múltiplex PCR, cuantificación con el fluorómetro Qubit; incorporación de los índices de código de barra a cada extremo de los amplicones con una ADN polimerasa de alta fidelidad de copia; purificación de la segunda reacción de PCR; nueva cuantificación con el fluorómetro Qubit; evaluación de la calidad de las librerías; realización de *pool* de muestras de forma equimolar; desnaturalización del *pool* de librerías; secuenciación en plataforma Illumina con cartuchos de 300 ciclos.

El análisis de variantes minoritarias con ambas metodología de múltiplex PCR tiene el potencial de detectar, por ejemplo, resistencias a tratamientos veterinarios y realizar estudios genéticos más profundos que involucren las comunidades virales.

7 Conclusiones

A nuestro conocimiento, el abordaje metodológico de múltiplex PCR acoplado a secuenciación masiva es el primero en utilizarse con el fin de diagnosticar y genotipar de forma simultánea distintos patógenos aviares virales que producen afecciones respiratorias e inmunosupresoras en la avicultura. La mencionada técnica se caracteriza por el alto rendimiento, ser rápida y conveniente. Adicionalmente, tiene el potencial de ser utilizada como alternativa para los laboratorios de diagnóstico en los estudios epidemiológicos, en la detección de los principales virus aviares respiratorios e inmunosupresores, además de poder emplearse para vigilancia o monitoreo de evolución de brotes en establecimientos de nuestro país.

La técnica de múltiplex PCR-NGS, a diferencia de abordajes metagenómicos, no tiene la capacidad de detectar la presencia por secuenciación de agentes virales no conocidos al momento ni otros patógenos descritos que no se incluyan su diagnóstico y/o caracterización en el panel diseñado. En caso de querer incorporarlos al análisis se deben generar los cebadores específicos y volver a poner a punto la metodología.

La segunda metodología de múltiplex PCR-NGS con cebadores quiméricos abarca mayor número de regiones genómicas de cada agente viral lo que permitirá una mayor caracterización de las cepas virales.

8 Perspectivas

- Aplicar la metodología desarrollada a nuevas muestras biológicas para diagnosticar y caracterizar genéticamente cepas virales aviares de forma simultánea.

- Diseñar cebadores quiméricos de AIV, aMPV e IBV para la nueva metodología de múltiplex PCR-NGS. Esta metodología es libre de la utilización de *kits* comerciales para la generación de las librerías previo a la secuenciación en una plataforma de Illumina.

- Considerar agilizar tiempos de manipulación y potenciales eventos de contaminaciones con una *OneStep*-múltiplex PCR en tempo final. En este caso, el procedimiento de retrotranscripción para la amplificación de virus compuestos por genomas de ARN se efectúa previo a la múltiplex PCR en el mismo tubo.

- Aplicar la segunda metodología de múltiplex PCR-NGS a cepas de campo para el diagnóstico y tipificación de las cepas infectantes.

9 Bibliografía

Abd-Ellatieff, H. A., Abou Rawash, A. A., Ellakany, H. F., Goda, W. M., Suzuki, T., & Yanai, T. (2018). Molecular characterization and phylogenetic analysis of a virulent Marek's disease virus field strain in broiler chickens in Japan. *Avian Pathology*, *47*(1), 47–57. https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1362497

ABPA. (2020). *Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2020*.

Adair, B. (2000). Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Developmental & Comparative Immunology*, *24*(2–3), 247–255. https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00076-2

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. https://doi.org/10.1080/03079459708419239

Alexander, D. J. (2000). Newcastle disease and other avian paramyxovirus. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, *19*(2), 443–462. https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1231

Allan, W., Faragher, J., & Cullen, G. (1972). Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunised against Newcastle disease. *Veterinary Record*, *90*(18), 511–512. https://doi.org/10.1136/vr.90.18.511

Andrade, E., Rocha, D., Fontana-Maurell, M., Costa, E., Ribeiro, M., de Godoy, D. T., Ferreira, A. G. P., Tanuri, A., Alvarez, P., & Brindeiro, R. (2018). One-step real-time PCR assay for detection and quantification of RNA HCV to monitor patients under treatment in Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *22*(5), 418–423. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.08.003

Anis, E., Hawkins, I. K., Ilha, M. R. S., Woldemeskel, M. W., Saliki, J. T., & Wilkes, R. P. (2018). Evaluation of Targeted Next-Generation Sequencing for Detection of Bovine Pathogens in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(7). https://doi.org/10.1128/JCM.00399-18

Arzey, G. G., Kirkland, P. D., Arzey, K. E., Frost, M., Maywood, P., Conaty, S., Hurt, A. C., Deng, Y.-M., Iannello, P., Barr, I., Dwyer, D. E., Ratnamohan, M., McPhie, K., & Selleck, P. (2012). Influenza Virus A (H10N7) in Chickens and Poultry Abattoir Workers, Australia. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(5), 814–816. https://doi.org/10.3201/eid1805.111852

Awang, I. P. R., & Russell, P. H. (1990). Turkey avian paramyxovirus type 3 infections in poultry. *World's Poultry Science Journal*, *46*(3), 211–218. https://doi.org/10.1079/WPS19900021

Baigent, S. J., Nair, V. K., & Le Galludec, H. (2016). Real-time PCR for differential quantification of CVI988 vaccine virus and virulent strains of Marek's disease virus. *Journal of Virological Methods*, *233*, 23–36. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.03.002

Barzon, L., Lavezzo, E., Militello, V., Toppo, S., & Palù, G. (2011). Applications of Next-Generation Sequencing Technologies to Diagnostic Virology. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(11), 7861–7884.

https://doi.org/10.3390/ijms12117861

Bäyon-Auboyer, M.-H., Arnauld, C., Toquin, D., & Eterradossi, N. (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup The EMBL/GenBank/DDBJ accession numbers of the F, L and G sequences of Fr/85/1 and Fr/85/2 are AJ400728, AJ400729, AJ251085, AJ40. *Journal of General Virology*, *81*(11), 2723–2733. https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-11-2723

Beard, C., & Hanson, R. (1984). *Newcastle disease.* (M. Hofstad, H. Barnes, B. Calnek, W. Reid, & H. Yoder (eds.); 8th ed.). Diseases of Poultry. Iowa State University Press, Ames.

Breveglieri, G., D'Aversa, E., Finotti, A., & Borgatti, M. (2019). Non-invasive Prenatal Testing Using Fetal DNA. *Molecular Diagnosis & Therapy*, *23*(2), 291–299. https://doi.org/10.1007/s40291-019-00385-2

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. *Journal of Virological Methods*, *138*(1–2), 60–65. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.07.018

Callison, S. A., Riblet, S. M., Oldoni, I., Sun, S., Zavala, G., Williams, S., Resurreccion, R. S., Spackman, E., & García, M. (2007). Development and validation of a real-time Taqman® PCR assay for the detection and quantitation of infectious laryngotracheitis virus in poultry. *Journal of Virological Methods*, *139*(1), 31–38. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.09.001

Calnek, B. W. (2001). *Pathogenesis of Marek's Disease Virus Infection* (pp. 25–55). https://doi.org/10.1007/978-3-642-56863-3_2

Capobianchi, M. R., Giombini, E., & Rozera, G. (2013). Next-generation sequencing technology in clinical virology. *Clinical Microbiology and Infection*, *19*(1), 15–22. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12056

Carpenter, M. L., Tan, S. K., Watson, T., Bacher, R., Nagesh, V., Watts, A., Bentley, G., Weber, J., Huang, C., Sahoo, M. K., Hinterwirth, A., Doan, T., Carter, T., Dong, Q., Gourguechon, S., Harness, E., Kermes, S., Radhakrishnan, S., Wang, G., … Pinsky, B. A. (2019). Metagenomic Next-Generation Sequencing for Identification and Quantitation of Transplant-Related DNA Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, *57*(12). https://doi.org/10.1128/JCM.01113-19

Carroll, M. W., Matthews, D. A., Hiscox, J. A., Elmore, M. J., Pollakis, G., Rambaut, A., Hewson, R., García-Dorival, I., Bore, J. A., Koundouno, R., Abdellati, S., Afrough, B., Aiyepada, J., Akhilomen, P., Asogun, D., Atkinson, B., Badusche, M., Bah, A., Bate, S., … Günther, S. (2015). Temporal and spatial analysis of the 2014–2015 Ebola virus outbreak in West Africa. *Nature*, *524*(7563), 97–101. https://doi.org/10.1038/nature14594

Cavanagh, D. (2003). Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathology*, *32*(6), 567–582. https://doi.org/10.1080/03079450310001621198

Cavanagh, D. (2007). Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Veterinary*

Research, *38*(2), 281–297. https://doi.org/10.1051/vetres:2006055

CDC. (2019). *Influenza Type A Viruses*. Centers for Disease Control and Prevention. https://www.cdc.gov/flu/avianflu/influenza-a-virus-subtypes.htm

Chacón, J. L., & Ferreira, A. J. P. (2009). Differentiation of field isolates and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus by DNA sequencing. *Vaccine*, *27*(48), 6731–6738. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.08.083

Chacón, J. L., Mizuma, M. Y., & Piantino Ferreira, A. J. (2010). Characterization by restriction fragment length polymorphism and sequence analysis of field and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus involved in severe outbreaks. *Avian Pathology*, *39*(6), 425–433. https://doi.org/10.1080/03079457.2010.516386

Chandrasekar, A., Raja, A., Dhinakar Raj, G., Thangavelu, A., & Kumanan, K. (2015). Rapid Detection of Avian Infectious Bronchitis Virus by Reverse Transcriptase-Loop Mediated Isothermal Amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, *85*(3), 815–820. https://doi.org/10.1007/s40011-015-0490-4

Chang, P.-C., Lee, Y.-L., Shien, J.-H., & Shieh, H. K. (1997). Rapid differentiation of vaccine strains and field isolates of infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism of PCR products. *Journal of Virological Methods*, *66*(2), 179–186. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00050-5

Cheng, V. C. C., Chan, J. F. W., Wen, X., Wu, W. L., Que, T. L., Chen, H., Chan, K. H., & Yuen, K. Y. (2011). Infection of immunocompromised patients by avian H9N2 influenza A virus. *Journal of Infection*, *62*(5), 394–399. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2011.02.007

Choi, E.-J., La, T.-M., Choi, I.-S., Song, C.-S., Park, S.-Y., Lee, J.-B., & Lee, S.-W. (2016). Genotyping of infectious laryngotracheitis virus using allelic variations from multiple genomic regions. *Avian Pathology*, *45*(4), 443–449. https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1155692

Coleman, W. B., & Tsongalis, G. J. (2017). Laboratory Approaches in Molecular Pathology—The Polymerase Chain Reaction. In *Diagnostic Molecular Pathology* (pp. 15–23). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800886-7.00002-9

Cong, F., Zhu, Y., Liu, X., Li, X., Chen, M., Huang, R., & Guo, P. (2018). Development of an xTAG-multiplex PCR array for the detection of four avian respiratory viruses. *Molecular and Cellular Probes*, *37*, 1–5. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2017.10.002

Cong, F., Zhu, Y., Wang, J., Lian, Y., Liu, X., Xiao, L., Huang, R., Zhang, Y., Chen, M., & Guo, P. (2018). A multiplex xTAG assay for the simultaneous detection of five chicken immunosuppressive viruses. *BMC Veterinary Research*, *14*(1), 347. https://doi.org/10.1186/s12917-018-1663-1

Cook, J. K. A., & Cavanagh, D. (2002). Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian Pathology*, *31*(2), 117–132. https://doi.org/10.1080/03079450120118603

Cosgrove, A. S. (1962). An Apparently New Disease of Chickens: Avian Nephrosis. *Avian Diseases*, *6*(3), 385. https://doi.org/10.2307/1587909

Craig, M. I., Rojas, M. F., van der Ploeg, C. A., Olivera, V., Vagnozzi, A. E., Perez, A. M., & König, G. A. (2017). Molecular Characterization and Cluster Analysis of Field Isolates of Avian Infectious Laryngotracheitis Virus from Argentina. *Frontiers in Veterinary Science*, *4*. https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00212

Cui, X., Lee, L. F., Hunt, H. D., Reed, W. M., Lupiani, B., & Reddy, S. M. (2005). A Marek's Disease Virus vIL-8 Deletion Mutant Has Attenuated Virulence and Confers Protection Against Challenge with a Very Virulent Plus Strain. *Avian Diseases*, *49*(2), 199–206. https://doi.org/10.1637/7277-091004

Cui, Z. Z., Lee, L. F., Liu, J. L., & Kung, H. J. (1991). Structural analysis and transcriptional mapping of the Marek's disease virus gene encoding pp38, an antigen associated with transformed cells. *Journal of Virology*, *65*(12), 6509–6515. https://doi.org/10.1128/JVI.65.12.6509-6515.1991

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, *9*(8), 772–772. https://doi.org/10.1038/nmeth.2109

de Boer, G. F., Groenendal, J. E., Boerrigter, H. M., Kok, G. L., & Pol, J. M. A. (1986). Protective Efficacy of Marek's Disease Virus (MDV) CVI-988 CEF 65 Clone C against Challenge Infection with Three Very Virulent MDV Strains. *Avian Diseases*, *30*(2), 276. https://doi.org/10.2307/1590529

de Graaf, M., & Fouchier, R. A. M. (2014). Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *The EMBO Journal*, *33*(8), 823–841. https://doi.org/10.1002/embj.201387442

de Leeuw, O. S., Koch, G., Hartog, L., Ravenshorst, N., & Peeters, B. P. H. (2005). Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin–neuraminidase protein. *Journal of General Virology*, *86*(6), 1759–1769. https://doi.org/10.1099/vir.0.80822-0

Decreto177/000. (2000). *Enfermedades exóticas. Producción avícola*. https://www.impo.com.uy/bases/decretos/177-2000

Eltahir, Y. M., Qian, K., Jin, W., & Qin, A. (2011). Analysis of chicken anemia virus genome: evidence of intersubtype recombination. *Virology Journal*, *8*(1), 512. https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-512

Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D. C., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill, F. R., & Smith, T. F. (2006). Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, *19*(1), 165–256. https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.165-256.2006

Eterradossi, N., & Saif, Y. M. (2020). Infectious Bursal Disease. In *Diseases of Poultry* (pp. 257–283). https://doi.org/doi:10.1002/9781119371199.ch7

Faragher, J., Allan, W., & Wyeth, P. (1974). Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease. *Veterinary Record*, *95*(17), 385–388. https://doi.org/10.1136/vr.95.17.385

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. https://doi.org/10.1080/03079450220136530

Fasina, F. O., Sirdar, M. M., & Bisschop, S. P. R. (2008). The financial cost implications of the highly pathogenic notifiable avian influenza H5N1 in Nigeria. *Onderstepoort J Vet Res*, *75*(1). https://doi.org/10.4102/ojvr.v75i1.86

Fatoba, A. J., & Adeleke, M. A. (2019). Chicken anemia virus: A deadly pathogen of poultry. *Acta Virologica*, *63*(01), 19–25. https://doi.org/10.4149/av_2019_110

Fouchier, R. A. M., Schneeberger, P. M., Rozendaal, F. W., Broekman, J. M., Kemink, S. A. G., Munster, V., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G. F., Schutten, M., van Doornum, G. J. J., Koch, G., Bosman, A., Koopmans, M., & Osterhaus, A. D. M. E. (2004). Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(5), 1356–1361. https://doi.org/10.1073/pnas.0308352100

Fujii, Y., Sakaguchi, T., Kiyotani, K., & Yoshida, T. (1999). Comparison of Substrate Specificities against the Fusion Glycoprotein of Virulent Newcastle Disease Virus between a Chick Embryo Fibroblast Processing Protease and Mammalian Subtilisin-Like Proteases. *Microbiology and Immunology*, *43*(2), 133–140. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1999.tb02384.x

García, M., & Spatz, S. (2020). Infectious Laryngotracheitis. In *Diseases of Poultry* (pp. 189–209). https://doi.org/doi:10.1002/9781119371199.ch5

Gashaw, M. (2020). A Review on Avian Influenza and its Economic and Public Health Impact. *International Journal of Veterinary Science & Technology*, *4*(1), 015–027.

Gimeno, I. M., Witter, R. L., Hunt, H. D., Reddy, S. M., Lee, L. F., & Silva, R. F. (2005). The pp38 Gene of Marek's Disease Virus (MDV) Is Necessary for Cytolytic Infection of B Cells and Maintenance of the Transformed State but Not for Cytolytic Infection of the Feather Follicle Epithelium and Horizontal Spread of MDV. *Journal of Virology*, *79*(7), 4545–4549. https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.4545-4549.2005

Gimeno, Isabel M, Witter, R. L., & Neumann, U. (2002). Neuropathotyping: a new system to classify Marek's disease virus. *Avian Diseases*, *46*(4), 909–918. https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0909:NANSTC]2.0.CO;2

Glickman, R. L., Syddall, R. J., Iorio, R. M., Sheehan, J. P., & Bratt, M. A. (1988). Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *Journal of Virology*, *62*(1), 354–356. https://doi.org/10.1128/JVI.62.1.354-356.1988

Gorga, L. (2019). *Comportamiento de la cadena avícola. Anuario OPYPA. Montevideo, Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca*. *ISSN 1510 3943*.

Gu, W., Miller, S., & Chiu, C. Y. (2019). Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *14*(1), 319–338. https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751

Guan, Y., & Smith, G. J. D. (2013). The emergence and diversification of panzootic H5N1 influenza viruses. *Virus Research*, *178*(1), 35–43. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.05.012

Han, C., Niu, X., Liu, L., Li, J., Li, J., Yao, S., Song, X., Gao, H., Gao, Y., Qi, X., Zeng, X., Wang, Y., & Wang, X. (2019). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of chicken anemia virus. *Poultry Science*, *98*(3), 1176–1180. https://doi.org/10.3382/ps/pey495

Hernández, M., Tomás, G., Hernández, D., Villegas, P., Banda, A., Maya, L., Panzera, Y., & Pérez, R. (2011). Novel Multiplex RT-PCR/RFLP Diagnostic Test to Differentiate Low- from High-Pathogenic Strains and to Detect Reassortant Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Diseases*, *55*(3), 368–374. https://doi.org/10.1637/9672-013111-Reg.1

Hernández, M., Tomás, G., Marandino, A., Panzera, Y., Hernández, D., Villegas, P., Banda, A., & Pérez, R. (2012). Desarrollo de tecnología diagnóstica en sanidad aviar para la detección y caracterización de los virus de la Bronquitis Infecciosa y de Gumboro. *INIA-FPTA, 19.*

Hodinka, R. L., Hodinka, R. L., Kaiser, L., Gilligan, P., & Kaiser, L. (2013). Point-Counterpoint: Is the Era of Viral Culture Over in the Clinical Microbiology Laboratory? *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(1), 2–8. https://doi.org/10.1128/JCM.02593-12

Hoerr, F. J. (2010). Clinical Aspects of Immunosuppression in Poultry. *Avian Diseases*, *54*(1), 2–15. https://doi.org/10.1637/8909-043009-Review.1

Houldcroft, C. J., Beale, M. A., & Breuer, J. (2017). Clinical and biological insights from viral genome sequencing. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(3), 183–192. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.182

ICTV. (2019). Virus Taxonomy: 2019 Release. *International Committee on Taxonomy of Viruses*.

INAC. (2019). *Consumo de carnes en Uruguay. Informe 2019. Instituto Nacional de Carnes. Repositorio online*. http://www.inac.uy/innovaportal/v/18275/10/innova.front/consumo (consultado en octubre de 2020)

Jackwood, D. (2019). *Infectious Bursal Disease Virus*. Elsevier. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20975-8

Jackwood, M., & de Wit, S. (2020). Infectious Bronchitis. In *Diseases of Poultry* (pp. 167–188). https://doi.org/doi:10.1002/9781119371199.ch4

Johnson, M. A., Tyack, S. G., Prideaux, C., Kongsuwan, K., & Sheppard, M. (1995). Nucleotide sequence of infectious laryngotracheitis virus (gallid herpesvirus 1) ICP4 gene. *Virus Research*, *35*(2), 193–204. https://doi.org/10.1016/0168-1702(94)00096-U

Juhasz, K., & Easton, A. J. (1994). Extensive Sequence Variation in the Attachment (G) Protein Gene of Avian Pneumovirus: Evidence for Two Distinct Subgroups. *Journal of General Virology*, *75*(11), 2873–2880. https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-11-2873

Kalthoff, D., Globig, A., & Beer, M. (2010). (Highly pathogenic) avian influenza as a zoonotic agent. *Veterinary Microbiology*, *140*(3–4), 237–245. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.022

Kant, A., Koch, G., van Roozelaar, D. J., Kusters, J. G., Poelwijk, F. A. J., & van der Zeijst, B. A. M. (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. https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-3-591

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. https://doi.org/10.1093/nar/gkf436

Laamiri, N., Aouini, R., Marnissi, B., Ghram, A., & Hmila, I. (2018). A multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of four most common avian respiratory viruses. *Virology*, *515*, 29–37. https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.11.021

Laamiri, N., Fällgren, P., Zohari, S., Ben Ali, J., Ghram, A., Leijon, M., & Hmila, I. (2016). Accurate Detection of Avian Respiratory Viruses by Use of Multiplex PCR-Based Luminex Suspension Microarray Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, *54*(11), 2716–2725. https://doi.org/10.1128/JCM.00610-16

Lachheb, J., Mastour, H., Nsiri, J., Kaboudi, K., Choura, I., Ammouna, F., Amara, A., & Ghram, A. (2020). Newly detected mutations in the Meq oncogene and molecular pathotyping of very virulent Marek's disease herpesvirus in Tunisia. *Archives of Virology*, *165*(11), 2589–2597. https://doi.org/10.1007/s00705-020-04790-5

Lai, M. M. C., & Cavanagh, D. (1997). *The Molecular Biology of Coronaviruses* (pp. 1–100). https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60286-9

Lamb, R., & Parks, G. (2013). *Paramyxoviridae* (M. Knipe & P. Howley (eds.); 6th ed.). Fields virology, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Landman, W. J. M., & Verschuren, S. B. E. (2003). Titration of Marek's Disease Cell-Associated Vaccine Virus (CVI 988) of Reconstituted Vaccine and Vaccine Ampoules from Dutch Hatcheries. *Avian Diseases*, *47*(4), 1458–1465. https://doi.org/10.1637/7034

Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, *9*(4), 357–359. https://doi.org/10.1038/nmeth.1923

Lee, M. S., Chang, P.-C., Shien, J.-H., Cheng, M.-C., & Shieh, H. K. (2001). Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, *97*(1–2), 13–22. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00301-9

Lee, S.-W., Markham, P. F., Markham, J. F., Petermann, I., Noormohammadi, A. H., Browning, G. F., Ficorilli, N. P., Hartley, C. A., & Devlin, J. M. (2011). First complete genome sequence of infectious laryngotracheitis virus. *BMC Genomics*, *12*(1), 197. https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-197

Leslie, J. (2000). Newcastle disease: outbreak losses and control policy costs. *Veterinary Record*, *146*(21), 603–606. https://doi.org/10.1136/vr.146.21.603

Li, M., Xie, Z., Xie, Z., Liu, J., Xie, L., Deng, X., Luo, S., Fan, Q., Huang, L., Huang, J., Zhang, Y., Zeng, T., & Wang, S. (2018). Simultaneous detection of eight avian influenza A virus subtypes by multiplex reverse transcription-PCR using a GeXP analyser. *Scientific Reports*, *8*(1), 6183. https://doi.org/10.1038/s41598-018-24620-8

Li, Y., Fang, L., Cui, S., Fu, J., Li, X., Zhang, H., Cui, Z., Chang, S., Shi, W., & Zhao, P. (2017). Genomic Characterization of Recent Chicken Anemia Virus Isolates in China. *Frontiers in Microbiology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00401

Lin, S.-Y., & Chen, H.-W. (2017). Infectious Bronchitis Virus Variants: Molecular Analysis and Pathogenicity Investigation. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(10), 2030. https://doi.org/10.3390/ijms18102030

Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., & Law, M. (2012). Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*, 1–11. https://doi.org/10.1155/2012/251364

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. *Archives of Virology*, *151*(6), 1133–1148. https://doi.org/10.1007/s00705-005-0695-6

Liu, X., Giambrone, J. J., & Dormitorio, T. (1998). Simplified sample processing combined with a sensitive nested polymerase chain reaction assay for detection of infectious bursal disease virus in the bursa of Fabricus. *Avian Diseases*, *42*(3), 480–485. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9777148

Liu, Y., Sun, C., Chi, M., Wen, H., Zhao, L., Song, Y., Liu, N., & Wang, Z. (2019). Genetic characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus from China. *Infection, Genetics and Evolution*, *75*, 103958. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103958

Loman, N. J., Misra, R. V, Dallman, T. J., Constantinidou, C., Gharbia, S. E., Wain, J., & Pallen, M. J. (2012). Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nature Biotechnology*, *30*(5), 434–439. https://doi.org/10.1038/nbt.2198

Lu, X., Wang, L., Sakthivel, S. K., Whitaker, B., Murray, J., Kamili, S., Lynch, B., Malapati, L., Burke, S. A., Harcourt, J., Tamin, A., Thornburg, N. J., Villanueva, J. M., & Lindstrom, S. (2020). US CDC Real-Time Reverse Transcription PCR Panel for Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerging Infectious Diseases*, *26*(8), 1654–1665. https://doi.org/10.3201/eid2608.201246

Madsen, J. M., Zimmermann, N. G., Timmons, J., & Tablante, N. L. (2013). Prevalence and Differentiation of Diseases in Maryland Backyard Flocks. *Avian Diseases*, *57*(3), 587–594. https://doi.org/10.1637/10423-101612-Reg.1

MAGyP. (2019). Boletín avícola 2019. Año XXII Nº 82. *Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Argentina*.

Marandino, A., Tomás, G., Hernández, M., Panzera, Y., Craig, M. I., 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*,

235, 21–25. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.05.007

Mayahi, M., Momtaz, H., Jafari, R. A., & Zamani, P. (2017). Detection and subtyping avian metapneumovirus from turkeys in Iran. *Veterinary Research Forum : An International Quarterly Journal*, *8*(2), 105–108. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28785384

McNulty, M. S. (1991). Chicken anaemia agent: A review. *Avian Pathology*, *20*(2), 187–203. https://doi.org/10.1080/03079459108418756

Medina, R. A., & García-Sastre, A. (2011). Influenza A viruses: new research developments. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(8), 590–603. https://doi.org/10.1038/nrmicro2613

Meulemans, G., Berg, T. P. van den, Decaesstecker, M., & Boschmans, M. (2002). Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. *Avian Pathology*, *31*(5), 515–519. https://doi.org/10.1080/0307945021000005897

Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010*. https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129

Nagai, Y., Klenk, H.-D., & Rott, R. (1976). Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology*, *72*(2), 494–508. https://doi.org/10.1016/0042-6822(76)90178-1

Nair, V., Gimeno, I., Dunn, J., Zavala, G., Williams, S. M., Reece, R. L., & Hafner, S. (2020). Neoplastic Diseases. In *Diseases of Poultry* (pp. 548–715). https://doi.org/doi:10.1002/9781119371199.ch15

Neff, C., Sudler, C., & Hoop, R. K. (2008). Characterization of Western European Field Isolates and Vaccine Strains of Avian Infectious Laryngotracheitis Virus by Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequence Analysis. *Avian Diseases*, *52*(2), 278–283. https://doi.org/10.1637/8168-110107-Reg.1

Nguyen, T. T., Kwon, H.-J., Kim, I.-H., Hong, S.-M., Seong, W.-J., Jang, J.-W., & Kim, J.-H. (2013). Multiplex nested RT-PCR for detecting avian influenza virus, infectious bronchitis virus and Newcastle disease virus. *Journal of Virological Methods*, *188*(1–2), 41–46. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.12.004

No, J. S., Kim, W.-K., Cho, S., Lee, S.-H., Kim, J.-A., Lee, D., Song, D. H., Gu, S. H., Jeong, S. T., Wiley, M. R., Palacios, G., & Song, J.-W. (2019). Comparison of targeted next-generation sequencing for whole-genome sequencing of Hantaan orthohantavirus in Apodemus agrarius lung tissues. *Scientific Reports*, *9*(1), 16631. https://doi.org/10.1038/s41598-019-53043-2

Noteborn, M. N., & Koch, G. (1995). Chicken anaemia virus infection: Molecular basis of pathogenicity. *Avian Pathology*, *24*(1), 11–31. https://doi.org/10.1080/03079459508419046

OECD-FAO. (2020). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029*. OECD. https://doi.org/10.1787/1112c23b-en

Ogasawara, T., Gotoh, B., Suzuki, H., Asaka, J., Shimokata, K., Rott, R., & Nagai, Y. (1992). Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. *The EMBO Journal*, *11*(2), 467–472.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1371460

OIE. (2020a). *Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI). Report N° 15: September 11 to October 1, 2020. World Animal Health Information and Analysis Department*.

OIE. (2020b). *World Animal Health Information Information Database*. https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalsituation

Oldoni, I., Rodríguez-Avila, A., Riblet, S., & García, M. (2008). Characterization of Infectious Laryngotracheitis Virus (ILTV) Isolates from Commercial Poultry by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). *Avian Diseases*, *52*(1), 59–63. https://doi.org/10.1637/8054-070607-Reg

Pattison, M., Chettle, N., Randall, C., & Wyeth, P. (1989). Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens. *Veterinary Record*, *125*(9), 229–231. https://doi.org/10.1136/vr.125.9.229

Postel, A., Letzel, T., Frischmann, S., Grund, C., Beer, M., & Harder, T. (2010). Evaluation of Two Commercial Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays for Detection of Avian Influenza H5 and H7 Hemagglutinin Genes. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *22*(1), 61–66. https://doi.org/10.1177/104063871002200110

Quail, M., Smith, M. E., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., Bertoni, A., Swerdlow, H. P., & Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, *13*(1), 341. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341

Quiñones-Mateu, M. E., Avila, S., Reyes-Teran, G., & Martinez, M. A. (2014). Deep sequencing: Becoming a critical tool in clinical virology. *Journal of Clinical Virology*, *61*(1), 9–19. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.06.013

Racsa, L. D., Kraft, C. S., Olinger, G. G., & Hensley, L. E. (2016). Viral Hemorrhagic Fever Diagnostics. *Clinical Infectious Diseases*, *62*(2), 214–219. https://doi.org/10.1093/cid/civ792

Rambaut, A. (2018). *FigTree 1.4.4 software. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh*.

Reddy, V., Theuns, S., Roukaerts, I., Zeller, M., Matthijnssens, J., & Nauwynck, H. (2015). Genetic Characterization of the Belgian Nephropathogenic Infectious Bronchitis Virus (NIBV) Reference Strain B1648. *Viruses*, *7*(8), 4488–4506. https://doi.org/10.3390/v7082827

Renshaw, R. W., Soiné, C., Weinkle, T., O'Connell, P. H., Ohashi, K., Watson, S., Lucio, B., Harrington, S., & Schat, K. A. (1996). A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. *Journal of Virology*, *70*(12), 8872–8878. https://doi.org/10.1128/JVI.70.12.8872-8878.1996

Rosenberger, J. K., & Gelb, J. (1978). Response to Several Avian Respiratory Viruses As Affected by Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Diseases*, *22*(1), 95. https://doi.org/10.2307/1589512

Schat, K. A., & van Santen, V. L. (2020). Chicken Infectious Anemia and Circovirus Infections in Commercial Flocks. In *Diseases of Poultry* (pp. 284–320). https://doi.org/doi:10.1002/9781119371199.ch8

Schlaberg, R., Chiu, C. Y., Miller, S., Procop, G. W., & Weinstock, G. (2017). Validation of Metagenomic Next-Generation Sequencing Tests for Universal Pathogen Detection. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *141*(6), 776–786. https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0539-RA

Seal, B. S. (1998). Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. *Virus Research*, *58*(1–2), 45–52. https://doi.org/10.1016/S0168-1702(98)00098-7

Shaikh, S. A. R., Katneni, U. K., Dong, H., Gaddamanugu, S., Tavlarides-Hontz, P., Jarosinski, K. W., Osterrieder, N., & Parcells, M. S. (2013). A Deletion in the Glycoprotein L (gL) Gene of U.S. Marek's Disease Virus (MDV) Field Strains Is Insufficient to Confer Increased Pathogenicity to the Bacterial Artificial Chromosome (BAC)–Based Strain, RB-1B. *Avian Diseases*, *57*(2s1), 509–518. https://doi.org/10.1637/10450-112012-Reg.1

Shamblin, C. E., Greene, N., Arumugaswami, V., Dienglewicz, R. L., & Parcells, M. S. (2004). Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen pp38- and transformation antigen Meq-encoding genes: association of meq mutations with MDVs of high virulence. *Veterinary Microbiology*, *102*(3–4), 147–167. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.06.007

Sharma, J. (2000). Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental & Comparative Immunology*, *24*(2–3), 223–235. https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00074-9

Simen, B. B., Simons, J. F., Hullsiek, K. H., Novak, R. M., MacArthur, R. D., Baxter, J. D., Huang, C., Lubeski, C., Turenchalk, G. S., Braverman, M. S., Desany, B., Rothberg, J. M., Egholm, M., & Kozal, M. J. (2009). Low-Abundance Drug-Resistant Viral Variants in Chronically HIV-Infected, Antiretroviral Treatment–Naive Patients Significantly Impact Treatment Outcomes. *Journal of Infectious Diseases*, *199*(5), 693–701. https://doi.org/10.1086/596736

Simionatto, S., Lima-Rosa, C. A. da V., Binneck, E., Ravazzolo, A. P., & Canal, C. W. (2006). Characterization and Phylogenetic Analysis of Brazilian Chicken Anaemia Virus. *Virus Genes*, *33*(1), 5–10. https://doi.org/10.1007/s11262-005-0033-9

Simon-Loriere, E., & Holmes, E. C. (2011). Why do RNA viruses recombine? *Nature Reviews Microbiology*, *9*(8), 617–626. https://doi.org/10.1038/nrmicro2614

Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, *122*(1), e59. https://doi.org/10.1002/cpmb.59

Smyth, J. A., Moffett, D. A., Connor, T. J., & McNulty, M. S. (2006). Chicken anaemia virus inoculated by the oral route causes lymphocyte depletion in the thymus in 3-week-old and 6-week-old chickens. *Avian Pathology*, *35*(3), 254–259. https://doi.org/10.1080/03079450600717349

Song, H., Bae, Y., Park, S., Kwon, H., Lee, H., & Joh, S. (2018). Loop-mediated

isothermal amplification assay for detection of four immunosuppressive viruses in chicken. *Journal of Virological Methods*, *256*, 6–11. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.02.013

Spackman, E., Senne, D. A., Bulaga, L. L., Myers, T. J., Perdue, M. L., Garber, L. P., Lohman, K., Daum, L. T., & Suarez, D. L. (2003). Development of Real-Time RT-PCR for the Detection of Avian Influenza Virus. *Avian Diseases*, *47*(s3), 1079–1082. https://doi.org/10.1637/0005-2086-47.s3.1079

Spatz, S. J., Petherbridge, L., Zhao, Y., & Nair, V. (2007). Comparative full-length sequence analysis of oncogenic and vaccine (Rispens) strains of Marek's disease virus. *Journal of General Virology*, *88*(4), 1080–1096. https://doi.org/10.1099/vir.0.82600-0

Spatz, S. J., Zhao, Y., Petherbridge, L., Smith, L. P., Baigent, S. J., & Nair, V. (2007). Comparative sequence analysis of a highly oncogenic but horizontal spread-defective clone of Marek's disease virus. *Virus Genes*, *35*(3), 753–766. https://doi.org/10.1007/s11262-007-0157-1

Suarez, D. L. (2016). Influenza A virus. In *Animal Influenza* (pp. 1–30). John Wiley & Sons, Inc. https://doi.org/10.1002/9781118924341.ch1

Suarez, D. L., Miller, P. J., Koch, G., Mundt, E., & Rautenschlein, S. (2020). Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Avian Metapneumovirus Infections. In *Diseases of Poultry* (pp. 109–166). Wiley. https://doi.org/10.1002/9781119371199.ch3

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725–2729. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197

Tang, Q., Wang, J., Bao, J., Sun, H., Sun, Y., Liu, J., & Pu, J. (2012). A multiplex RT-PCR assay for detection and differentiation of avian H3, H5, and H9 subtype influenza viruses and Newcastle disease viruses. *Journal of Virological Methods*, *181*(2), 164–169. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.02.003

Tanner, W. D., Torth, D. J. A., & Gundlapalli, A. V. (2015). The pandemic potential of avian influenza A(H7N9) virus: a review. *Epidemiology and Infection*, *143*(16), 3359–3374. https://doi.org/10.1017/S0950268815001570

Techera, C., Tomás, G., Panzera, Y., Banda, A., Perbolianachis, P., Pérez, R., & Marandino, A. (2019). Development of real-time PCR assays for single and simultaneous detection of infectious bursal disease virus and chicken anemia virus. *Molecular and Cellular Probes*, *43*, 58–63. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2018.11.004

Thureen, D. R., & Keeler, C. L. (2006). Psittacid Herpesvirus 1 and Infectious Laryngotracheitis Virus: Comparative Genome Sequence Analysis of Two Avian Alphaherpesviruses. *Journal of Virology*, *80*(16), 7863–7872. https://doi.org/10.1128/JVI.00134-06

Tian, M., Zhao, Y., Lin, Y., Zou, N., Liu, C., Liu, P., Cao, S., Wen, X., & Huang, Y. (2011). Comparative analysis of oncogenic genes revealed unique evolutionary features of field Marek's disease virus prevalent in recent years in China. *Virology Journal*, *8*(1), 121. https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-121

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. *Journal of Virological Methods*, *185*(1), 101–107. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.06.012

Tomás, G., Marandino, A., Techera, C., Olivera, V., Perbolianachis, P., Fuques, E., Grecco, S., Hernández, M., Hernández, D., Calleros, L., Craig, M. I., Panzera, Y., Vagnozzi, A., & Pérez, R. (2020). Origin and global spreading of an ancestral lineage of the infectious bursal disease virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, *67*(3), 1198–1212. https://doi.org/10.1111/tbed.13453

Tzou, P. L., Ariyaratne, P., Varghese, V., Lee, C., Rakhmanaliev, E., Villy, C., Yee, M., Tan, K., Michel, G., Pinsky, B. A., & Shafer, R. W. (2018). Comparison of an In Vitro Diagnostic Next-Generation Sequencing Assay with Sanger Sequencing for HIV-1 Genotypic Resistance Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(6). https://doi.org/10.1128/JCM.00105-18

USDA. (2020). *Livestock and Poultry: World Markets and Trade. Oct 9, 2020. United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service*.

van Regenmortel, M. H., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., & Wickner, R. B. (2000). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press*.

Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., & Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*, *56*(1), 152–179. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1579108

Weiss, S. R., & Navas-Martin, S. (2005). Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *69*(4), 635–664. https://doi.org/10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005

Wise, M. G., Suarez, D. L., Seal, B. S., Pedersen, J. C., Senne, D. A., King, D. J., Kapczynski, D. R., & Spackman, E. (2004). Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for Detection of Newcastle Disease Virus RNA in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(1), 329–338. https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.329-338.2004

Witter, R. L., Calnek, B. W., Buscaglia, C., Gimeno, I. M., & Schat, K. A. (2005). Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology. *Avian Pathology*, *34*(2), 75–90. https://doi.org/10.1080/03079450500059255

Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Lam, C. S. F., Lau, C. C. Y., Tsang, A. K. L., Lau, J. H. N., Bai, R., Teng, J. L. L., Tsang, C. C. C., Wang, M., Zheng, B.-J., Chan, K.-H., & Yuen, K.-Y. (2012). Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses

as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi. *Journal of Virology*, *86*(7), 3995–4008. https://doi.org/10.1128/JVI.06540-11

Xie, Z., Luo, S., Xie, L., Liu, J., Pang, Y., Deng, X., Xie, Z., Fan, Q., & Khan, M. I. (2014). Simultaneous typing of nine avian respiratory pathogens using a novel GeXP analyzer-based multiplex PCR assay. *Journal of Virological Methods*, *207*, 188–195. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.07.007

Xuchao, Z., Zhiyong, L., Shengyue, W., Shun, L., Yong, S., Ying, C., Jianming, Y., Weiping, L., Yingyong, H., Yangqiu, L., Yi, L., Jun, H., Xiufeng, L., Jianyong, S., Yanhong, T., Zheng, W., Li, F., Hui, L., Xiaojun, Z., … On, behalf of C. S. (2019). Application of next-generation sequencing technology to precision medicine in cancer: joint consensus of the Tumor Biomarker Committee of the Chinese Society of Clinical Oncology. *Cancer Biology & Medicine*, *16*(1), 189. https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0142

Yang, S., & Rothman, R. E. (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet Infectious Diseases*, *4*(6), 337–348. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01044-8

Zeng, T., Xie, Z., Xie, L., Deng, X., Xie, Z., Luo, S., Huang, L., & Huang, J. (2015). Simultaneous detection of eight immunosuppressive chicken viruses using a GeXP analyser-based multiplex PCR assay. *Virology Journal*, *12*(1), 226. https://doi.org/10.1186/s12985-015-0455-5

Zhang, Z., Liu, D., Hu, J., Sun, W., Liu, K., Li, J., Xu, H., Liu, J., He, L., Jiang, D., Gu, M., Hu, S., Wang, X., Liu, X., & Liu, X. (2019). Multiplex one-step real-time PCR assay for rapid simultaneous detection of velogenic and mesogenic Newcastle disease virus and H5-subtype avian influenza virus. *Archives of Virology*, *164*(4), 1111–1119. https://doi.org/10.1007/s00705-019-04180-6

Zhou, H., Zhang, M., Tian, X., Shao, H., Qian, K., Ye, J., & Qin, A. (2017). Identification of a novel recombinant virulent avian infectious bronchitis virus. *Veterinary Microbiology*, *199*, 120–127. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.038

Zowalaty, M. E. El, Chander, Y., Redig, P. T., El Latif, H. K. A., Sayed, M. A. El, & Goyal, S. M. (2011). Selective Isolation of Avian Influenza Virus (AIV) from Cloacal Samples Containing AIV and Newcastle Disease Virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *23*(2), 330–332. https://doi.org/10.1177/104063871102300222

Zuo, T. R., Zhao, Z. Y., Wei, P., Wei, X. X., Li, Y., & Mo, M. L. (2007). Isolation and identification of a field isolate of Marek's disease virus with acute oncogenicity. *Chinese Journal of Virology*, *23*, 218–223.

Zwaagstra, K. A., van der Zeijst, B. A., & Kusters, J. G. (1992). Rapid detection and identification of avian infectious bronchitis virus. *Journal of Clinical Microbiology*, *30*(1), 79–84. https://doi.org/10.1128/JCM.30.1.79-84.1992

10 Anexos

10.1. Extracción de ADN vacunal con *QIAamp® DNA Mini Kit* (*Qiagen*)

Protocolo de *DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol):*

- Resuspender 0,02 g de vacuna liofilizada en 200 µl de PBS; en caso de ser vacuna pronta para su uso se partió de 100 µl de vacuna en 100 µl de PBS.
- Colocar la suspensión en un tubo de 1,5 ml y agregar 20 µl de proteinasa K.
- Adicionar 200 µl de *Buffer AL* a la muestra. Mezclar con *vortex* por 15 segundos.
- Incubar a 56° por 10 minutos y centrifugar brevemente para remover las gotas de las paredes del tubo.
- Adicionar 200 µl de etanol (96-100%) y mezclar con *vortex* por 15 segundos.
- Colocar la solución del paso anterior en una columna *QIAamp Mini spin column* (en un tubo colector de 2 ml) y centrifugar a 6000 g por 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo colector y descartar el filtrado.
- Adicionar 500 µl de *Buffer AW1* y centrifugar a 6000 g por 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo colector y descartar el filtrado.
- Adicionar 500 µl de *Buffer AW2* y centrifugar a máxima velocidad por 3 minutos.
- Secar la columna centrifugando a máxima velocidad por 1 minuto.
- Colocar la columna a un nuevo tubo de 1.5 ml y adicionar 100 µl de *Buffer AE*. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos y centrifugar a 6000g por 1 minuto.
- Almacenar el ADN a -20°C.

10.2. Extracción de ARN con *Quick-RNA™ Miniprep* (*Zymo Research*)

A partir de vacuna:

- Resuspender 0,02 g de vacuna liofilizada en 200 µl de PBS.

A partir de las muestras mencionadas en el apartado 4.6.1:

- Homogeneizar el tejido con 600 µl de *Lysis Buffer*.
- Centrifugar la suspensión a 3.000 g durante 3 minutos para eliminar restos de tejido.

- Transferir el sobrenadante a la columna *Spin-Away™ Filter* (en un tubo colector) y centrifugar a 12.000 g por un minuto para remover el ADN genómico.
- Agregar un volumen de etanol (95-100%) a la muestra en el *RNA Lysis Buffer*. Homogeneizar bien.
- Transferir la mezcla a la columna *Zymo-Spin™ IIICG Column* (en un tubo colector), centrifugar a 12.000 g durante 30 segundos y descartar el filtrado.
- Agregar a la columna 400 µl de *RNA Wash Buffer*, centrifugar a 12.000 g durante 30 segundos y descartar el filtrado.
- Sólo para las muestras vacunales: preparar una mezcla con 5 µl de *DNaseI* y 75 µl de *DNA Digestion Buffer*. Adicionar directamente a la columna 80 µl de la mezcla e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos. Centrifugar a 12.000 g por 30 segundos.
- Agregar a la columna 400 µl de *RNA Prep Buffer* y centrifugar a 12.000 g por 30 segundos.
- Agregar a la columna 700 µl de *RNA Wash Buffer* y centrifugar a 12.000g por 30 segundos.
- Agregar a la columna 400 µl de *RNA Wash Buffer* y centrifugar a 12.000g por 2 minutos para asegurar la remoción completa del *RNA Wash Buffer*.
- Colocar la columna en un nuevo tubo de 1,5 ml y adicionar a la matriz de la misma 35 µl de *DNase/RNase-Free Water* y centrifugar a 12.000 g por 30 segundos.
- Almacenar el ARN a -20°C.

10.3. Extracción con *Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep* (*Zymo Research*)

- Agregar 800 µl de *DNA/RNA Shield™* a la muestra biológica. Homogeneizar la muestra
- Centrifugar la suspensión a 10.000 g durante 1 minuto para eliminar restos de tejido.
- Transferir 200 µl del sobrenadante a un tubo libre de nucleasas.
- Agregue 2 µl de *Proteinase K* a los 200 µl de muestra. Mezclar bien.

- Adicionar 400 µl de *Pathogen DNA/RNA Buffer*. Mezclar bien e incube a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Transferir la mezcla a la columna *Zymo-Spin™ IIC Column* (en un tubo colector) y centrifugar a 10.000 g durante 30 segundos. Descartar el filtrado.
- Adicionar 500 µl de *Pathogen DNA/RNA Wash Buffer* a la columna y centrifugar a 10.000 g durante 30 segundos. Descartar el filtrado y repetir este paso.
- Adicionar 500 µl de etanol (95-100%) a la columna y centrifugar a 10.000 g por 1 minuto para eliminar restos de residuos de etanol. Descartar el tubo colector y transferir la columna a un nuevo tubo libre de nucleasas.
- Adicionar 50 µl de *DNase/RNase-Free Water* a la matriz de la columna y centrifugar a 10.000g por 30 segundos para eluir el ADN/ARN.

10.4. Retrotranscripción

- Agregar a un tubo de 0,2 ml, siempre en hielo:
  - 10 µl del ARN extraído.
  - 1 µl de hexámeros al azar (0,2 µg/µl).
  - 1,5 µl de H_2O calidad biología molecular.
- Mezclar y realizar una centrifugación breve.
- Incubar la muestra 5 minutos a 95°C (desnaturalización) y pasar inmediatamente a hielo. Realizar una centrifugación breve.
- Agregar al tubo 7,5 µl de una mezcla compuesta por:
  - 4 µl Buffer de reacción 5×.
  - 2 µl dNTPs (10 mM).
  - 0,5 µl del inhibidor de robonucleasas *Ribolock* (20 U/µl).
  - 1 µl retrotranscriptasa *RevertAidTM Minus M-MulV* (200 U/µl).
- Mezclar y realizar una centrifugación breve.
- Incubar 10 minutos a 25°C.
- Incubar 1 hora a 42°C.
- Detener la reacción incubando 10 minutos a 70°C.

10.5. Purificación de productos de PCR con *AMPure XP* (*Beckman*)

- Adicionar 1,8 µl de *AMPure XP* por cada 1 µl de muestra. Homogeneizar para permitir que los fragmentos de ADN se unan a las perlas paramagnéticas.

- Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Coloque los tubos en el soporte magnético (*MagnaRack*) y espere hasta que clarifique por la separación de las perlas magnéticas de la solución (~2 minutos).
- Retire y descarte el sobrenadante sin perturbar las perlas magnéticas.
- Lavar dos veces de la siguiente manera:
    - Con los tubos en el *MagnaRack* adicionar 200 µl de etanol 70% sin mezclar.
    - Incubar durante 30 segundos.
    - Retirar y descarte el sobrenadante sin perturbar las perlas magnéticas.
- Retirar las trazas de etanol.
- Secar en el soporte magnético (~5 minutos).
- Remueva los tubos del *MagnaRack* y adicione 30 µl a agua calidad biología molecular o *Buffer TE* a las perlas magnéticas. Pipetear 10 veces para resuspender.
- Incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
- Coloque los tubos en el *MagnaRack* y espere hasta que clarifique (~2 minutos).
- Transferir 30 µl del sobrenadante a un nuevo tubo.

10.6. Juego de cebadores con secuencias adaptadoras

Diana	Cebador	Secuencia nucleotídica (5´-3´)	Tamaño amplicón (pb)[a]	Referencia
CAV				
	F67	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTCAAGCGACTTCGACGAA	251	En este estudio
	R317	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAGATCTTGGCGACTCTCG		En este estudio
	F253	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTAAAAACAGYACAGCSGGG	277	En este estudio
	R529	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCGTKGGCTGCATCATCATTA		En este estudio
	F382	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCCATCGCCGGTGAGTTRAT	271	En este estudio
	R652	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCATTCTTAGTGGCAAGGAGCTGA		En este estudio
	F563	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGACCCTGCAAGACATGGGTCG	258	En este estudio
	R820	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTTGCTCGTCGGGTCTCAT		En este estudio
ILTV gJ				
	F132484	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGGTCTTAGTTAACGCCTCTCTG	220	En este estudio
	R132703	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATGTTGAGAGACGTGAGCCC		En este estudio
	F132643	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGTACATTGGGGAGTGCTACTC	260	En este estudio
	R132902	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGGCGAATAATTGGCAATAACG		En este estudio
	F132824	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTCTGACGGGTTCTTGGTTAAG	267	En este estudio
	R133090	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATAGAGTCGTCCCTGGGAAC		En este estudio
ILTV gG				
	F130910	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTATAAAGTGTACCCGCTGACC	291	En este estudio
	R131200	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTTCGGTGCGACCAGAGTAG		En este estudio
	F131148	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCACCACGATTGAGGTGACGG	291	En este estudio
	R131438	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACACGTAACTACCAAGTTCCAC		En este estudio
	F131359	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGGATACCTGATTTCGACAAGC	283	En este estudio
	R131641	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCGAGGCTACGTCATAAGATG		En este estudio

	F131601	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGACGAGGCGTCAGACTT	291	En este estudio
	R131891	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAAAACACTCTCGGGTGGCTA		En este estudio
ILTV gM				
	F94435	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTTTATTTGCGTTATGCGTAATCT	287	En este estudio
	R94721	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAACTCATCCCAACTGGAAGC		En este estudio
	F 94679	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCCTAGAATTCCTGCCGCAG	251	En este estudio
	R94929	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGACCGTGAATTTTGGAGTCAG		En este estudio
	F94881	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATTGCCCCAAGTGTAGAAGC	294	En este estudio
	R95174	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAGACAGCTTACGCTATCAGC		En este estudio
	F95072	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTACTGGTCAGGTGTCTTTCC	288	En este estudio
	R95359	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACTATGGCGGTGTGGATACTC		En este estudio
	F95314	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGCCAAGAGTAACGTATATCGC	277	En este estudio
	R95590	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGCATGTGGCTGATTGAAG		En este estudio
	F95448	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGCGTTGCTGGCTTAAGG	286	En este estudio
	R95733	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCACAGTTGTTCTCCAGGAG		En este estudio
ILTV Tk				
	F33274	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAAGCAAGGAAATGAGTAAAGGAC	287	En este estudio
	R33560	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCACGGGGAAAGATTAAAAACTG		En este estudio
	F33489	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCACAAGTTTTTCAATACCGTCGC	278	En este estudio
	R33766	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGTAACTCGTACATCTGCCTC		En este estudio
	F33678	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTTAAGGCTTCTTGCTCCTTC	284	En este estudio
	R33961	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGTTTCCCTGTTGCACAATATC		En este estudio
	F33862	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAATGTTGGAGTGTGTTGGAAT	285	En este estudio
	R34146	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAACTTGAATGTCGGGAGGC		En este estudio
	F34098	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTCATCTGAACTTCCGCTACG	271	En este estudio
	R34368	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCGAGAACGATGACTCCGAC		En este estudio
	F34236	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCTAAGTATAGACGGCAACCTC	285	En este estudio
	R34520	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCTCCACCCCCTTCAAAGAC		En este estudio
ILTV ICP4				

	F150585	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTTCAGACTCCAGCTCATCTG	270	Chacón et al. (2010)
	R150854	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAATTTTGCTGGGATCGGAC		En este estudio
	F150742	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGATATTGTGGGAGGCACTTC	265	En este estudio
	R151006	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGATTGCGGGGAGTGTGATAA		En este estudio
	F150970	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCCTCTCGCATTGCTACTTG	291	En este estudio
	R151260	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTACCACCAAGGGTCAGTGAC		En este estudio
	F148906	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGATGATGACACCCACCAC	283	En este estudio
	R149188	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACCTTTACGGGTCTCAAAGTC		En este estudio
	F149103	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCGATGAACAGGAGCCATTATC	275	En este estudio
	R149377	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTTCTTCTCGGGGCGGACAT		En este estudio
	F149267	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGCTTACCAGATTCATTACCTCC	261	En este estudio
	R149527	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAAGTTTTTGCCATGGGGAC		Choi et al. (2016)
MDV gL				
	F19575	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCCTTTCACACATCCCAACAG	271	En este estudio
	R19845	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCTTAATAAAAATGCCCGTGGGA		En este estudio
	F19756	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGCTCGACTGCCTTCCGAAC	281	En este estudio
	R20036	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCTAAGAGGTCCATTGGGTCC		En este estudio
	F19968	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCTGTGAAGGTGGGACTTCTTAC	237	En este estudio
	R20204	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGCATTGGCTCGTCGGCT		En este estudio
MDV vIL8				
	F139304	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGACCCAATAACAGGGAAATCG	264	En este estudio
	R139567	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACATGCCAGAGACGAAACCC		En este estudio
	F139467	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGGTAAGTAGGGGAAGAGAACTC	275	En este estudio
	R139741	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCACGTCAACAGCGATAATAGGC		En este estudio
	F139641	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTAGGCATATCACTGGAGAGTCTC	277	En este estudio
	R139917	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGGGTCCACACATACCTTCC		En este estudio
	F139866	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCCCTTTTGTAGCTTTGCTCTC	252	En este estudio
	R140117	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTGCCTTCTTTTAATTACAGGAGG		En este estudio
MDV Meq				

	F136009	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGCACGGTACAGGTGTAAAGAG	288	En este estudio
	R136296	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCATGYTTCATGGAGTTTGTCTAC		En este estudio
	F136183	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTATCTGAGGAGGAGAAACAGA	224	En este estudio
	R136406	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTAGGGCAAACTGGCTCATG		En este estudio
	F136338	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTCGAGATCTAAGGACTGAGWGC	216	En este estudio
	R136553	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGGTACAGATAGGAGGTTGGG		En este estudio
	F136509	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTAACGCTCCACATTGCTCC	474	En este estudio
	R136982	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACAATGCAGGGAAGATGCC		En este estudio
	F136913	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATCTGTACTCCCCATTCCCT	242	En este estudio
	R137154	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCCGAATACAAGGAATCCTGT		En este estudio
	F137016	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGGGGACGGTTTACGCTCA	251	En este estudio
	R137266	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCATAGACGATGTGCTGCTGAG		En este estudio
MDV pp38				
	R127241	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCGCTTAATCTCCGCCTCCAAC	292	Tian et al. (2011)
	F127532	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGTCAGAGAATGCAACAATGC		En este estudio
	R127478	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAGAACAGATCAATGTAACCAGC	224	En este estudio
	F127701	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCAGTGCGAAGGAGGAACATA		En este estudio
	R127646	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAACAGCTTGCTCTGCTTCG	270	En este estudio
	F127915	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTATTCCAATAAAGGGTGATGGGA		En este estudio
	R127867	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTTAGCTCCTGGCATTCTATCG	269	En este estudio
	F128135	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTGACGGCGTCTTGGGTCG		En este estudio
	R127973	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCTGGACCCGATCCAAAGC	274	En este estudio
	F128246	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCATCTTCAACCCACAGCCATCC		Tian et al. (2011)
NDV F				
	Fw1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTCTACCAGGATCCCAGCAC	263	Nguyen et al. (2013)
	R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATGCCTCTAATGGGGCTTTT		Nguyen et al. (2013)
	Fw2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGTCAATCATAGTCAAGTTGCTCC	210	Zhang et al. (2019)
	R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAACCCCAAGAGCTACACTGCC		Zhang et al. (2019)
IBDV B				

	Fw1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGATCCGCTTGCCAGCCCYAG	290	En este estudio
	Rv1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACAGGTARATCATCTGCTTRAGTA		En este estudio
	Fw2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACAYCGCCCKAGCAAGGA	265	En este estudio
	Rv2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCTCTCAAARGTGTACCCAAG		En este estudio
	Fw3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGRAGTGGGACCTACATGGG	268	En este estudio
	Rv3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGTCCACTTGATGACTTGAGG		En este estudio
IBDV A				
	Fw1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTACCARTTCTCATCACAGTACCA	292	En este estudio
	Rv1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCAGTTTGATGGATGTGATTGG		En este estudio
	Fw1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCARACAATGGGCTRACGGC	287	En este estudio
	Rv2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAGCTCGAAGTTRCTCACCC		En este estudio

[a]Tamaño según AJ890284.1, DQ530348.1 y JQ083494.2