



## Tesis de Maestría

PEDECIBA – Área: Ciencias Biológicas – Sub-área: Genética

# Análisis del viroma aviar

Lic. Eddie Fuques Villalba

Orientadora: Dra. Yanina Panzera

Co-orientadora: Dra. Ana Marandino

Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología,  
Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias.

Montevideo – Julio de 2021



## **Agradecimientos**

- A las Dras. Yanina Panzera y Ana Marandino
- A los miembros del tribunal: Dra. Nélida Rodríguez, Dr. Ariel Vagnozzi y Dr. Rodrigo Puentes
- A la Sección Genética Evolutiva de la Facultad de Ciencias
- Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)
- A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC)
- A la Asociación Nacional de Innovación e Investigación (ANII)
- A Granjas HEPA
- A mi Familia, sin la cual nada hubiese sido posible

# Índice

Abreviaciones.....	V
Resumen.....	VII
1 Introducción .....	1
1.1 Las comunidades virales.....	1
1.2 Metodologías empleadas para la detección y caracterización de virus .....	2
1.3 La Era de la Metagenómica .....	4
1.4 Métodos de enriquecimiento de partículas virales .....	8
1.5 Análisis Bioinformáticos .....	11
1.6 Virus en la industria avícola .....	14
1.7 Antecedentes en Uruguay.....	18
2 Hipótesis de trabajo .....	20
3 Objetivos .....	20
3.1 Objetivo General .....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4 Materiales y métodos .....	21
4.1 Muestras.....	21
4.2 Protocolo de enriquecimiento de partículas virales .....	22
4.2.1 Filtrado y digestión con nucleasas .....	22
4.2.2 Extracción de ácidos nucleicos y eliminación del rRNA .....	23
4.2.3 Síntesis de cDNA doble hebra y amplificación por MDA.....	24
4.2.4 Consideraciones generales.....	24
4.3 Seguimiento del protocolo de enriquecimiento mediante qPCR .....	24
4.4 Secuenciación de alto rendimiento.....	27
4.5 Análisis bioinformático.....	28
4.5.1 Control de calidad y filtrado de <i>reads</i> .....	28
4.5.2 Detección y clasificación de <i>reads</i> virales .....	28
4.5.3 Ensamblados con genomas de referencia para los virus detectados .....	29
4.5.4 Comparación de las comunidades virales .....	30
4.5.5 Obtención de secuencias consenso y caracterización genética.....	30
5 Resultados .....	31
5.1 Evaluación del protocolo de enriquecimiento de partículas virales .....	31
5.1.1 Seguimiento mediante qPCR.....	31
5.1.2 Amplificación de ácidos nucleicos y secuenciación de alto rendimiento .....	34

5.1.3	Identificación de los genomas de CAV, IBV e IBDV .....	35
5.2	Aplicación de abordaje metagenómico en muestras de aves con sintomatología.....	35
5.2.1	Secuenciación de alto rendimiento.....	35
5.2.2	Identificación de <i>reads</i> pertenecientes a genomas virales .....	36
5.2.3	Clasificación a nivel de especie (ensamblados con genomas de referencia).....	39
5.3	Aplicación de abordaje metagenómico a muestras de aves con fenotipo sano.....	41
5.3.1	Secuenciación de alto rendimiento.....	41
5.3.2	Identificación de <i>reads</i> pertenecientes a genomas virales .....	42
5.3.3	Clasificación a nivel de especie (ensamblados con genomas de referencia).....	44
5.4	Comparación de las comunidades virales .....	46
5.5	Caracterización de las familias virales.....	48
5.5.1	<i>Adenoviridae</i> .....	48
5.5.2	<i>Anelloviridae</i> .....	51
5.5.3	<i>Birnaviridae</i> .....	58
5.5.4	<i>Caliciviridae</i> .....	60
5.5.5	<i>Coronaviridae</i> .....	61
5.5.6	<i>Genomoviridae</i> .....	64
5.5.7	<i>Parvoviridae</i> .....	65
5.5.8	<i>Picornaviridae</i> .....	67
6	Discusión .....	69
7	Conclusiones.....	90
8	Perspectivas .....	90
9	Bibliografía .....	91
10	Anexo I.....	107
11	Anexo II.....	108

## **Abreviaciones**

Ala: Alanina

Arg: Arginina

Asn: Asparagina

Asp: Ácido aspártico

AvGyV2: Gyrovirus aviar 2

CAV: Virus de la anemia infecciosa aviar

cDNA: DNA copia

Cys: Cisteína

DNA: Acido Desoxirribonucleico

ds-cDNA: DNA copia doble hebra

dsDNA: DNA doble hebra

dsRNA: RNA doble hebra

Gln: Glutamina

Glu: Ácido glutámico

Gly: Glicina

GyV3: Gyrovirus 3

GyV4: Gyrovirus 4

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus

IBV: Virus de la Bronquitis Infecciosa

IBDV: Virus de la enfermedad infecciosa de la bursa

Ile: Isoleucina

Leu: Leucina

MDA: Amplificación por desplazamiento múltiple

Met: Metionina

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

Nt: Nucleótidos

ORF: Marco abierto de lectura

Pro: Prolina

RFLP: Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción

rRNA: RNA ribosomal

RNA: Ácido Ribonucleico

SARS-CoV-2: Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo

Ser: Serina

SNP: Polimorfismo de un único nucleótido

ssDNA: DNA simple hebra

ssRNA: RNA simple hebra

Thr: Treonina

Tyr: Tirosina

Val: Valina

## Resumen

Los virus son los organismos más abundantes en el planeta y son responsables de muchas de las enfermedades que producen problemas en la producción y la salud (humana y animal). En general solemos identificar un virus asociado con un fenotipo enfermo, sin embargo, la diversidad fenotípica no puede ser explicada únicamente por la presencia de un virus determinado. La interacción virus-hospedero es una relación muy compleja con múltiples virus implicados, y otros microorganismos. Conocer el perfil de la comunidad viral (viroma) presente en una muestra biológica resulta fundamental para comprender en profundidad la epidemiología de una enfermedad. Estos estudios requieren la realización de abordajes metagenómicos.

Durante los últimos años, el área de la metagenómica ha experimentado un crecimiento significativo gracias al desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva o de alto rendimiento, así como de herramientas bioinformáticas que permitan analizar los grandes volúmenes de datos obtenidos. Sin embargo, la caracterización del viroma (especialmente en muestras biológicas de tejidos), presenta dificultades adicionales a la hora de la secuenciación debido a la gran abundancia de material genético proveniente del hospedero/bacterias en comparación con los genomas virales presentes. Por este motivo es necesaria la implementación de protocolos de enriquecimiento de partículas virales, que permitan aumentar la representación de los genomas virales en los resultados de secuenciación obtenidos.

Los patógenos virales son causantes de grandes pérdidas económicas, especialmente en sectores de la industria donde se practica la cría intensiva de animales. La industria avícola es un ejemplo de ello; las enfermedades respiratorias e inmunodepresoras provocadas por virus se encuentran entre las principales causas de disminución de producción. La identificación y caracterización de las especies virales circulantes resulta fundamental para una mejor comprensión de la epidemiología de estas enfermedades y la mejora de los planes de control a implementarse.

En el presente trabajo se implementó un protocolo de enriquecimiento de partículas virales a partir de una muestra de tejido de aves de corral con sintomatología respiratoria e inmunodepresión. Este protocolo fue evaluado y puesto a punto a

partir de una muestra co-infectante con tres virus de gran relevancia para la industria avícola (Virus de la Anemia Infecciosa, Virus de Gumboro, y Bronquitis Infecciosa Aviar). El homogeneizado de la muestra fue sometido a distintos protocolos de enriquecimiento de partículas virales y se evaluó cada paso utilizando métodos de detección y cuantificación (qPCR) de los tres virus y de componentes del genoma del hospedero (gen 18S y  $\beta$ -actina). Se logró disminuir la relación genoma del hospedero/genoma viral entre 3 y 6 órdenes de magnitud.

Una vez optimizado, el protocolo fue implementado en distintas matrices tanto de aves enfermas como sanas, y mediante la realización de un abordaje metagenómico utilizando tecnología Illumina fue posible caracterizar el viroma. En aves con sintomatología respiratoria e inmunodepresión fueron identificadas diversas especies virales pertenecientes a las familias *Adenoviridae*, *Anelloviridae*, *Birnaviridae*, *Coronaviridae* y *Picornaviridae*. Por su parte en las muestras de fenotipo sano se detectaron especies pertenecientes a las familias *Adenoviridae*, *Anelloviridae*, *Caliciviridae*, *Genomoviridae*, *Parvoviridae* y *Picornaviridae*.

Fue posible obtener y anotar el genoma completo de cuatro especies de Anellovirus pertenecientes al género Gyrovirus, tres de las cuales no habían sido reportadas hasta el momento en Uruguay. Además, es el primer reporte en el país de especies como Chicken Megrivirus, Chicken Calicivirus, Chicken Genomovirus, Chicken Parvovirus, y de tres especies del género Fowl Aviadenovirus. Análisis genéticos e inferencias filogenéticas realizadas a partir de las secuencias consenso obtenidas para estos virus permitieron analizar la variabilidad genética que las mismas presentan en comparación con cepas de las mismas especies circulantes en la región y en el mundo.

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen un aporte significativo para la comprensión de la diversidad viral circulante en aves de corral de la industria avícola uruguaya, brindando un panorama más profundo acerca de la situación epidemiológica en nuestro país. Además, el abordaje implementado presenta el potencial de ser aplicado en otros modelos como pueden ser muestras de otros animales o incluso humanos.



# 1 Introducción

## 1.1 Las comunidades virales

La comunidad de microorganismos (virus, bacterias y hongos) presentes en conjunto en un determinado hábitat se denomina Microbioma (<https://microbiologysociety.org/blog/what-is-a-microbiome.html>). Dichas comunidades tienen una influencia directa en el desarrollo, el crecimiento y la salud de los macroorganismos que las hospedan (Simon et al. 2019). Tal es así que la biología se encuentra atravesando un cambio de paradigma, en el que un fenotipo observado es el resultado de complejas interacciones producto de la expresión de los genomas del hospedero y de los microorganismos asociados (Simon et al. 2019). Esto ha dado lugar al surgimiento del concepto de Holobionte, el cual considera a los animales y las plantas como un conjunto de redes biomoleculares compuestas por un hospedero y sus microorganismos asociados (Bordenstein and Theis 2015). En el holobionte humano, el total de  $10^{13}$  células humanas se ve superado en número 10 veces por bacterias y 100 veces por virus (Mokili, Rohwer, and Dutilh 2012).

Los virus son parásitos intracelulares estrictos, y constituyen las entidades biológicas más abundantes del planeta. Pueden encontrarse dondequiera que exista vida celular, desde los océanos hasta los ambientes más extremos de la Biosfera (Y. Z. Zhang, Shi, and Holmes 2018; Dávila-Ramos et al. 2019), y son capaces de infectar los tres grandes dominios en los que se agrupan los seres vivos: Eukarya, Bacteria y Archaea (Le Romancer et al. 2007; Y. Z. Zhang, Shi, and Holmes 2018). En un momento dado, existen al menos  $10^{31}$  partículas virales en la mayoría de los ambientes, los cuales pueden comprender incluso los compartimentos internos de los seres vivos, como por ejemplo el tracto intestinal de los metazoos, donde el número de partículas virales detectables excede al número de células de 10 a 100 veces (Simmonds et al. 2017).

Además de su significativa abundancia, los virus presentan una enorme diversidad en cuanto a la naturaleza y organización de su genoma, sus secuencias génicas y proteínas codificadas, mecanismos de replicación, e interacción con la célula hospedera, ya sean antagónicos, comensales o mutualistas (Roossinck 2015; Simmonds et al. 2017). El estudio de las comunidades virales (viroma) ha cobrado

gran importancia durante las últimas décadas, y su crecimiento ha sido posible gracias al desarrollo de nuevas tecnologías genómicas y bioinformáticas que permitan detectar, analizar y descifrar la composición del viroma.

## **1.2 Metodologías empleadas para la detección y caracterización de virus**

Diversas técnicas han sido implementadas a lo largo de la historia para la detección y caracterización de virus. Desde la invención de las técnicas de cultivo celular en 1907 y la propagación de poliovirus en células animales en 1909, el cultivo de virus ha sido la técnica estándar para la detección y el descubrimiento de virus durante todo el siglo XX (Leland and Ginocchio 2007; Hamza et al. 2011). Si bien estas técnicas significaron un gran avance en el estudio de los patógenos virales, las mismas presentan ciertas limitaciones. La propagación de virus en cultivo celular requiere la reconstrucción de ciertas condiciones que logren reproducir aquellas presentes en el contexto virus–hospedero (Delwart 2007), por lo cual muchos de los virus no son cultivables. Además, la implementación de estas metodologías resulta costosa y requiere de personal capacitado. Alternativamente a la propagación en cultivo celular, otras técnicas han sido implementadas para la identificación de virus. La microscopía electrónica, desarrollada en 1933, proporcionó la primera prueba visual de un virus. Sin embargo, esta técnica carece de especificidad y sensibilidad, y sólo proporciona información morfológica acerca de las partículas virales. Por su parte, las técnicas serológicas permitieron el uso de anticuerpos para la identificación de nuevas variantes, mediante el uso de suero de pacientes previamente infectados para identificar partículas virales que luego puedan ser cultivadas o caracterizadas mediante microscopía electrónica. Tal es el caso del virus de la Hepatitis C (Kuo et al. 1989). La limitante de este método radica en la dificultad de obtener suero con un alto título de anticuerpos específicos, además de la capacidad de los virus para evadir el reconocimiento por parte de los anticuerpos (J. L. Mokili, Rohwer, and Dutilh 2012).

Dado que la amplia mayoría de los virus no son fácilmente cultivables, y que no todos presentan un efecto distinguible en las células infectadas (efecto citopático), el estudio del universo viral requirió del desarrollo de métodos independientes de cultivo, que permitan un mayor espectro de detección. El advenimiento de las

técnicas moleculares proporcionó herramientas de vital importancia para la identificación y la caracterización de los patógenos virales, ampliando así de forma significativa los conocimientos acerca de su abundancia y variabilidad. El acceso a la información genética de los genomas virales gracias a la tecnología de secuenciación Sanger permitió el desarrollo de las denominadas técnicas dependientes de secuencia. Entre ellas se encuentran la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y el uso de microarreglos (Elnifro et al. 2000; Wang et al. 2016).

La técnica de PCR es una herramienta ampliamente utilizada para el diagnóstico de patógenos virales. La elevada sensibilidad y especificidad que brinda hacen posible la detección de virus aún en condiciones de baja carga viral, así como la caracterización de distintas variantes circulantes. A su vez, la técnica de PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés), permitió la cuantificación tanto absoluta (número total de copias del genoma) como relativa (cantidad en relación con otro genoma) de los genomas virales presentes en una muestra determinada.

Si bien la PCR es una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico y la caracterización de virus específicos previamente conocidos, esta técnica ha permitido también la identificación de especies genéticamente distantes e incluso de virus no reportados hasta el momento. Ejemplos de ello son el caso del virus de la Hepatitis E (Reyes et al. 1990) y la identificación de cepas altamente divergentes del virus de inmunodeficiencia humana (Mokili et al. 2002).

Por su parte, los ensayos con microarreglos fueron implementados por primera vez en 1995 para medir los niveles de expresión de múltiples genes en simultáneo (Schena et al. 1995). Para el análisis de comunidades virales, diversos estudios han utilizado sondas que pueden hibridar con secuencias de genomas virales conocidas, y potencialmente con secuencias que presenten determinado grado de identidad nucleotídica. En el año 2003 durante el brote mundial de Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS, por sus siglas en inglés), este tipo de ensayos permitió la identificación del virus responsable de esta enfermedad, denominado SARS-CoV (Wang et al. 2003).

La gran limitante de este tipo de metodologías al momento de estudiar comunidades virales es que está restringido a determinadas especies virales, e incluso a determinadas variantes específicas dentro de estas especies, dado que la amplia variabilidad genética que presentan los virus puede superar la identidad nucleotídica necesaria para la hibridación de las secuencias que se estén empleando para detectarlos. Esta limitante no ocurre en el caso de las bacterias, donde la secuenciación del fragmento 16S de la subunidad menor del gen del RNA ribosomal (rRNA) ha demostrado ser un blanco de gran utilidad para la detección tanto de organismos previamente conocidos como nuevos (Lane et al. 1985; Pace et al. 1986). De manera similar, los hongos comparten una región genómica conservada, denominada espaciador transcrito interno (ITS, por sus siglas en inglés), empleada como marcador universal para la secuenciación y el análisis de comunidades fungi (Schoch et al. 2012). En cambio, los genomas virales no comparten la presencia de un gen con estas características, el cual pueda ser calificado como un marcador filogenético universal (Rohwer and Edwards 2002).

### **1.3 La Era de la Metagenómica**

El conocimiento acerca de la existencia de una gran variedad de microorganismos coexistiendo en un mismo hábitat, despertó el interés por parte de la comunidad científica en analizar la composición del conjunto de los genomas que se encuentran presentes en un determinado tipo de muestra. Surge así el concepto de metagenómica. Según el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano de Estados Unidos, la metagenómica es “el estudio de una colección del material genético (genomas) de una comunidad mixta de organismos, y suele referirse al estudio de las comunidades microbianas”. Desde los comienzos del siglo XXI la rama de la metagenómica es un área en constante crecimiento, donde el número de publicaciones científicas por año acerca del tema se mantiene en aumento (Figura 1). Este crecimiento se encuentra estrechamente relacionado con los avances tecnológicos desarrollados tanto a nivel de metodologías de secuenciación como a nivel de análisis bioinformático de los datos obtenidos.

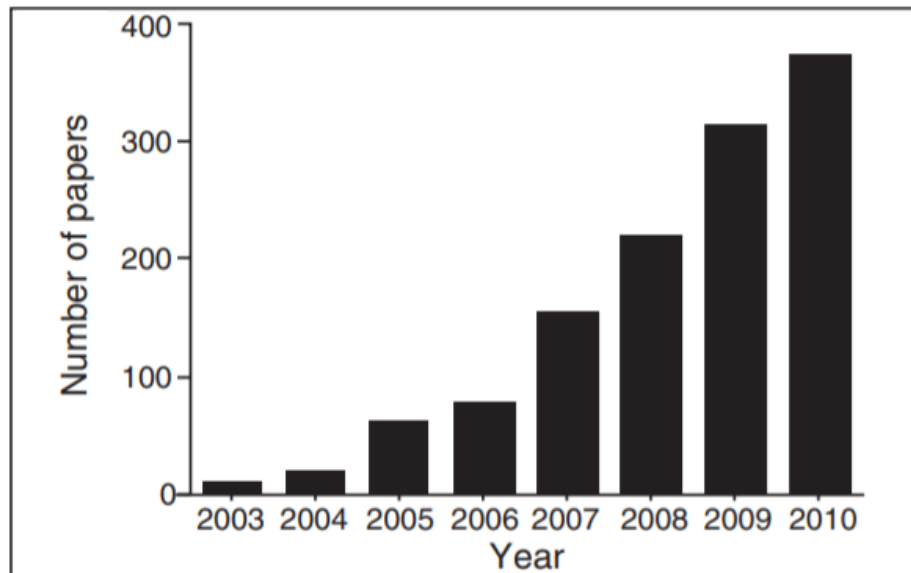
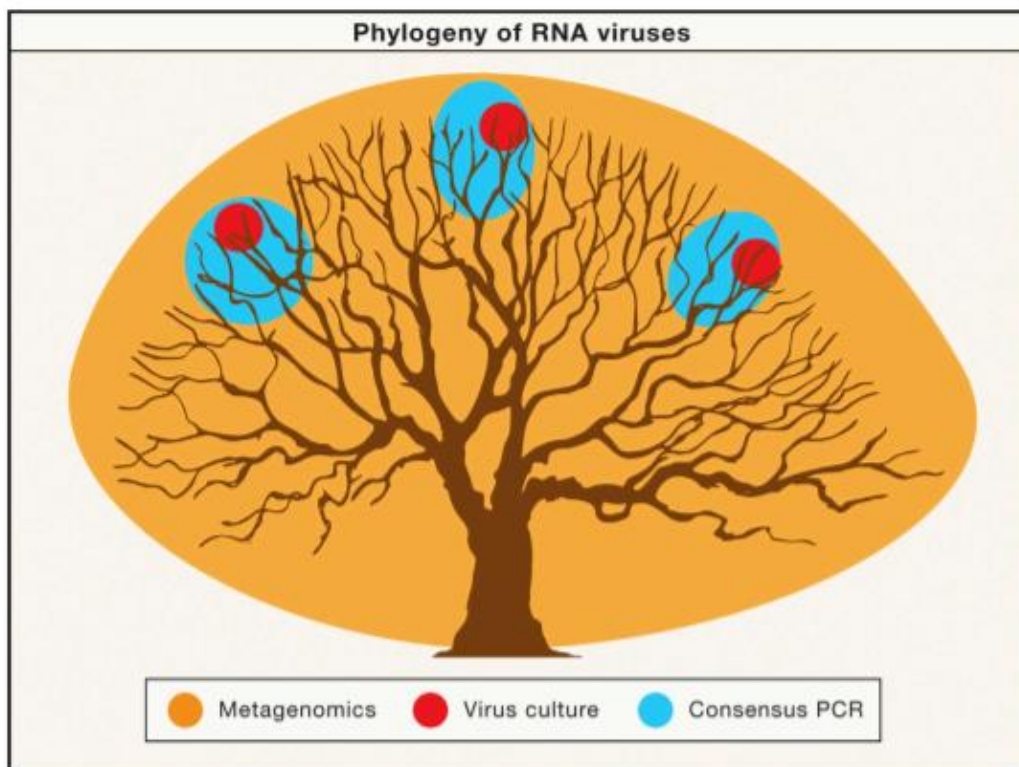


Figura 1. Número de publicaciones en el área de la metagenómica entre 2003 y 2010. Tomado y modificado de J. L. Mokili, Rohwer, and Dutilh 2012.

Los abordajes metagenómicos fueron aplicados por primera vez para el estudio de las comunidades virales en el año 2002 por Breitbart y colaboradores, con el fin de analizar el viroma presente en aguas marinas. Dicho trabajo implicó la fragmentación del DNA presente en la muestra, ligado de adaptadores, amplificación por PCR, inserción en vectores de clonación, y secuenciación de los distintos fragmentos mediante secuenciación Sanger (Breitbart et al. 2002). De esta forma, las denominadas “bibliotecas de clones” fueron implementadas para analizar la comunidad viral en hábitats como aguas termales (Schoenfeld et al. 2008), y suelos (Fierer et al. 2007). Si bien esta metodología tiene la ventaja de no depender del conocimiento previo de secuencias virales para su obtención, presenta una clara limitante asociada al número de amplicones que puedan ser secuenciados en cada muestra.

A la luz de estas limitaciones, el principal punto de inflexión que marcaría un antes y un después en el estudio de las comunidades de microorganismos, fue el desarrollo de las técnicas denominadas de secuenciación masiva o de alto rendimiento. Las mismas tienen la capacidad de generar millones de datos de secuencia (denominadas lecturas o *reads*) en forma simultánea y a una velocidad sin precedentes hasta entonces. Mediante la preparación de bibliotecas (independientes de un paso de clonación) y la secuenciación denominada *shotgun*, es posible obtener directamente desde una muestra secuencias que constituyen una

representación del conjunto de genomas que se encuentran presentes. Gracias a ello, la metagenómica permitió ampliar significativamente el conocimiento acerca de la complejidad y diversidad de las especies virales existentes, en relación con los abordajes metodológicos previamente implementados (Figura 2). Además, mientras que la mayoría de las metodologías empleadas para análisis metagenómicos dependientes de clonación hasta ese entonces estaban limitadas al estudio de genomas de DNA doble hebra (dsDNA, por sus siglas en inglés), las tecnologías de secuenciación masiva pueden ser aplicadas al estudio de genomas de DNA simple hebra (ssDNA, por sus siglas en inglés) y de RNA (J. L. Mokili, Rohwer, and Dutilh 2012). Este hecho resulta de gran importancia para el estudio de los viromas, ya que los virus presentan genomas cuya composición (DNA o RNA, doble o simple hebra) varía entre las distintas familias virales.



*Figura 2. Diferentes abordajes utilizados para la detección de virus. El árbol representa la diversidad filogenética total de los virus con genoma de RNA. Las zonas coloreadas indican la diversidad abarcada por los distintos abordajes: cultivo celular (rojo), PCR (celeste) y metagenómica (amarillo). Tomado de Zhang et al. 2018.*

Las técnicas de secuenciación masiva desarrolladas hasta el momento pueden clasificarse en dos categorías: de segunda generación y de tercera generación. Dentro de las tecnologías de segunda generación se encuentran plataformas como Illumina/Solexa, Roche 454, MGISEQ, BGISEQ y Ion Torrent (Quail et al. 2012; Jeon et al. 2019; Xiao and Zhou 2020), mientras que dentro de las tecnologías de tercera generación se encuentran las plataformas PacBio y Oxford Nanopore (Amarasinghe et al. 2020). Algunas de las principales diferencias que presentan estas plataformas de secuenciación se basan en factores como el mecanismo por el cual se obtienen las secuencias, las características de los datos obtenidos (largo de las lecturas) y la fidelidad (tasa de error al asignar bases) que presentan. Esta última constituye uno de los factores determinantes al momento de planificar cualquier metodología que implique obtención de secuencias de material genético.

Mientras que la tasa de error en la asignación de bases para las tecnologías de segunda generación se ubica entre un 0,1% y un 1% (Petrackova et al. 2019), las tecnologías de tercera generación presentan una tasa de error que se encuentra entre el 5% y el 20% (Xiao and Zhou 2020). La gran diferencia en las tasas de error que presentan estas tecnologías hace que actualmente las técnicas de segunda generación (particularmente las plataformas Illumina) sean ampliamente utilizadas en una gran variedad de abordajes metodológicos, incluyendo los análisis metagenómicos.

Si bien inicialmente la gran mayoría de los abordajes metagenómicos realizados implicaban el análisis de muestras ambientales, el desarrollo de estas técnicas ha permitido que durante la última década se haya producido un considerable aumento del uso de la capacidad de diagnóstico de estos abordajes en áreas como la horticultura, la medicina veterinaria, y la salud humana (Blomström 2011; Belák et al. 2013; Miller et al. 2013; Kehoe et al. 2014).

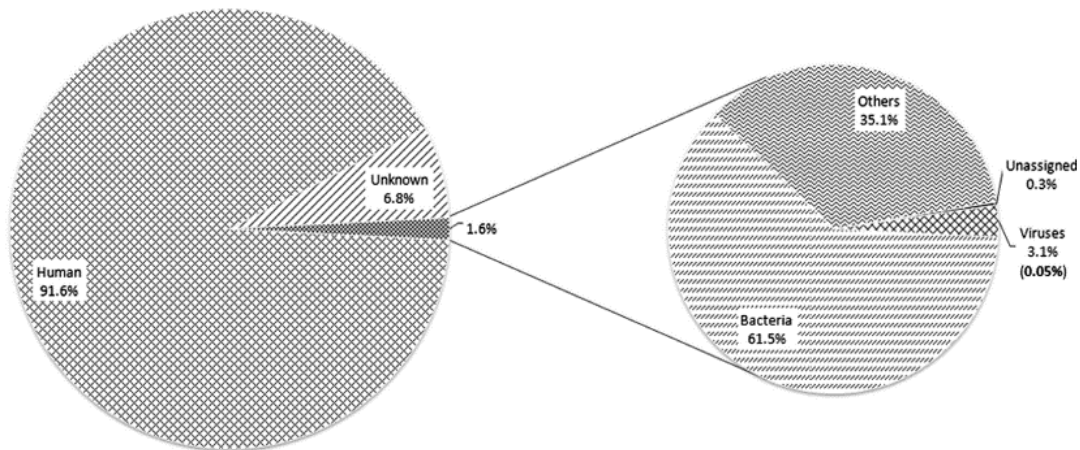
Históricamente, las enfermedades causadas por virus han sido descubiertas previo a la identificación de los agentes causantes. El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), la poliomielitis, el cáncer cervical, y el linfoma de Burkitts, fueron descritos antes que sus agentes causantes (J. L. Mokili, Rohwer, and Dutilh 2012). En el caso de la poliomielitis, fue descrita en la antigua literatura Egipcia alrededor de 3700 AC, mientras que el virus fue descubierto en 1909 (Kristensson 1999). Sin embargo, las perspectivas a futuro parecen indicar que los abordajes

metagenómicos producirán una excesiva cantidad de información genética de virus desconocidos, algunos de los cuales pueden no estar asociados a una determinada patología en concreto. De esta forma el descubrimiento de los virus comenzará a preceder la caracterización de las enfermedades que éstos causan, mucho antes de que la patogenicidad de los agentes virales sea definida (J. L. Mokili, Rohwer, and Dutilh 2012).

#### **1.4 Métodos de enriquecimiento de partículas virales**

Si bien la aplicación de abordajes metagenómicos para la detección de virus en muestras biológicas (no ambientales) presenta un gran potencial para la caracterización de comunidades virales, la complejidad de este tipo de muestras trae consigo distintas dificultades adicionales a la hora de su análisis. Dado que los virus presentan un genoma mucho menor en tamaño en comparación con los pertenecientes a bacterias y al hospedero, los genomas virales representan un pequeño porcentaje del material genético total presente en una muestra biológica (Kleiner, Hooper, and Duerkop 2015). Por este motivo, la secuenciación de los ácidos nucleicos obtenidos directamente a partir de una muestra biológica da como resultado una gran cantidad de material genético derivado principalmente del hospedero y las bacterias que se encuentran presentes, lo cual dificulta la detección de virus (Figura 3) (Yang et al. 2011; Lewandowska et al. 2017). La magnitud de este tipo de inconvenientes depende del tipo de muestra analizada, siendo las muestras provenientes de tejido las que presentan mayor complejidad debido a la gran cantidad de células (y por lo tanto material genético) pertenecientes al hospedero, en comparación con muestras menos complejas como aquellas correspondientes a fluidos corporales (Daly et al. 2011). Por este motivo es necesario el desarrollo de protocolos denominados de enriquecimiento de partículas virales, que constituyen una serie de pasos previos a la preparación de bibliotecas y que tienen como fin aumentar la representación de *reads* provenientes de genomas virales en los resultados de secuenciación.





**Figura 3. Composición de los reads obtenidos mediante secuenciación masiva a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo en humanos. Tomado de Yang et al. 2011.**

Algunos de estos métodos se basan en características físicas de las partículas virales como su tamaño, la estabilidad de su cápside y su densidad. El uso de filtros de jeringa (de 0,22  $\mu\text{m}$  o de 0,45  $\mu\text{m}$ ) constituye un primer método de exclusión por tamaño. Las partículas virales, cuyo tamaño, en general, se encuentra entre 20 y 300 nm (Grgacic and Anderson 2006), es significativamente menor al de la gran mayoría de bacterias, así como al de las células provenientes del hospedero.

Adicionalmente, es posible liberar el material genético perteneciente al hospedero contenido en las células mediante el lisado durante varios ciclos de congelado-descongelado, dejando el mismo expuesto a la digestión por parte de enzimas endonucleasas como DNasas y RNasas (Hall et al. 2014). Los genomas virales permanecen en su gran mayoría protegidos de la degradación gracias a la gran estabilidad de su cápside (Allander et al. 2001; Daly et al. 2011; Hall et al. 2014).

El enriquecimiento de partículas virales también puede realizarse mediante ultra centrifugación con gradiente de densidad. Este método se basa en la diferencia de densidad que presentan los virus con respecto a los demás componentes presentes en una muestra biológica, donde la densidad de los virus es menor. El solvente utilizado, la velocidad de centrifugación y el gradiente seleccionado dependen enteramente de la densidad de los virus que deseen purificarse (Vega-Thurber et al. 2009). Si bien los gradientes de Cloruro de Cesio (CsCl) y de Sacarosa han demostrado ser eficientes para remover DNA proveniente del hospedero y de

bacterias (X. Jiang et al. 1992; Delwart 2007; Vega-Thurber et al. 2009; Kleiner, Hooper, and Duerkop 2015), mediante este tipo de técnicas sólo es posible seleccionar virus dentro de un determinado rango de densidad (Kleiner, Hooper, and Duerkop 2015)

Además de las anteriormente mencionadas, dificultades adicionales pueden presentarse para la obtención de datos de secuencia provenientes de genomas virales cuando se trata del análisis de virus con genoma compuesto por RNA. Esto se debe a la presencia de una gran cantidad de moléculas de RNA producidas por el hospedero. Se estima que entre el 90% y el 95% del RNA presente en una célula determinada, corresponde a RNA ribosomal (rRNA) y a RNA de transferencia (tRNA), incluso en células infectadas por virus (Lodish H, Berk A, Zipursky SL 2000). Con el fin de sortear este problema, se han implementado diversos kits comerciales que permiten reducir la cantidad de rRNA presente (Delwart 2007). En general, estos kits funcionan mediante al uso de sondas de hibridación que reconocen las secuencias de estos RNAs, la síntesis de una hebra de cDNA complementario, y la degradación mediante una enzima RNasa H que reconoce dicho híbrido y lo degrada. Si bien esta técnica resulta efectiva para la eliminación de rRNA, el grado de eficiencia depende del tipo de muestra, y no siempre una buena eficiencia se ve reflejada en el aumento del número de *reads* correspondientes a genomas virales en los datos de secuenciación (Rosseel et al. 2015).

Finalmente, para la construcción de bibliotecas de secuenciación masiva, es necesario contar con determinada cantidad de partida/concentración de material genético. La misma depende de diversos factores como la plataforma de secuenciación seleccionada, o el kit comercial de preparación de bibliotecas que se emplee. Esta concentración puede ser difícil de obtener a partir de muestras ambientales, e incluso a partir de algunas muestras biológicas, especialmente luego de realizado el proceso riguroso de enriquecimiento de partículas virales. Por este motivo, se han desarrollado diversas metodologías para poder aumentar la cantidad de DNA (o cDNA, para el caso del estudio de virus con genoma de RNA) presente de forma aleatoria. Es decir, la realización de una amplificación independiente de secuencia que permita obtener la cantidad de material genético necesaria para la construcción de bibliotecas. Estas metodologías incluyen: amplificación de un solo cebador independiente de secuencia (SISPA, por sus siglas en inglés, originalmente

llamada PCR randómica) (Djikeng et al. 2008); *linker amplification shotgun libraries* (LASL) (Breitbart et al. 2002); y amplificación de desplazamiento múltiple (MDA, por sus siglas en inglés) (Yokouchi et al. 2006). De esta forma se han desarrollado diversos kits comerciales que utilizan algunos de estos métodos (mayoritariamente MDA) para la amplificación al azar del material genético.

Diversos protocolos de enriquecimiento de partículas virales han sido probados y comparados en diversos tipos de muestras y para distintos virus, utilizando distintas combinaciones de las metodologías previamente mencionadas (Vega-Thurber et al. 2009; Hall et al. 2014; Kleiner, Hooper, and Duerkop 2015; Rosseel et al. 2015). A pesar de las dificultades que implica la realización de abordajes metagenómicos para el estudio de las comunidades virales en muestras biológicas, los virus presentan ciertas características que los convierten en organismos muy adecuados para su análisis mediante secuenciación masiva. Las características físicas mencionadas (densidad, tamaño, cápside resistente) hacen posible la realización de los métodos de enriquecimiento anteriormente expuestos. Además, el pequeño tamaño de sus genomas, puede significar una gran ventaja para el uso de distintas técnicas bioinformáticas, así como para la obtención de genomas completos (Vega-Thurber et al. 2009).

## 1.5 Análisis Bioinformáticos

La gran cantidad de datos obtenidos mediante las tecnologías de secuenciación masiva hizo necesario el desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas capaces de procesar, analizar e interpretar los resultados obtenidos. Los *reads* producidos durante la secuenciación se encuentran contenidos en archivos de texto plano denominados fastq, donde además de la secuencia de cada *read* se encuentran los valores de calidad de cada base nucleotídica, los cuales son una medida de la probabilidad de que la base asignada en esa posición sea errónea. De esta forma un valor de calidad de 20 significa una probabilidad de 1 en 100 de que la base en cuestión haya sido asignada erróneamente, o lo que es lo mismo, un 99% de certeza al asignar esa base nucleotídica. Asimismo, un valor de calidad de 30 corresponde a una probabilidad de error al asignar la base de 1 en 1000, o un 99.9% de certeza al asignar la misma. Los datos crudos contenidos en los archivos fastq deben ser

sometidos en primer lugar a un proceso de limpieza (*trimming*) con el fin de remover las secuencias pertenecientes a adaptadores, así como la remoción de las bases nucleotídicas de baja calidad. Distintos programas han sido desarrollados para el control de calidad de los *reads* obtenidos por secuenciación masiva, como FastQC (Andrews S. 2010) y PRINSEQ (Schmieder and Edwards 2011). Este último permite además del control de calidad, realizar el proceso de *trimming*, al igual que otros programas que han sido desarrollados con este fin como Trimmomatic (Bolger, Lohse, and Usadel 2014) y Cutadapt (Martin 2014).

Para el estudio de comunidades virales, luego del proceso de *trimming* los *reads* pueden someterse a un proceso de filtrado, que involucra la remoción de aquellos *reads* que correspondan al genoma del hospedero en cuestión. Si bien los protocolos de enriquecimiento de partículas virales realizados durante el procesamiento de la muestra en el laboratorio tienden a disminuir la presencia del genoma del hospedero/bacteria en los datos de secuenciación, aún gran parte de las secuencias obtenidas normalmente corresponden al genoma del hospedero. Este paso de filtrado disminuye notoriamente el volumen de datos, y el costo computacional de los análisis posteriores (Nooij et al. 2018).

Una vez realizados el *trimming* y filtrado, los *reads* deben ser ensamblados. Este es un proceso mediante el cual los *reads* se alinean y combinan para reconstruir la secuencia original (de mayor tamaño) a partir de la cual fueron secuenciados. Existen dos tipos de ensamblados: utilizando un genoma de referencia (cuando se conoce el genoma de la especie que se quiere reconstruir), o valiéndose únicamente de la secuencia de los *reads* (ensamblaje *de novo*). En este último caso, los *reads* cuya secuencia se solapa pasan a formar fragmentos de secuencias de tamaño superior denominados *contigs*. Tanto para el ensamblaje *de novo* como para el que emplea un genoma de referencia, se han desarrollado diversos algoritmos, la gran mayoría de ellos basados en los llamados gráficos de de Bruijn (Pevzner, Tang, and Tesler 2004; Bankevich et al. 2012). Existen diversos programas que son utilizados para la realización de ensamblados, entre los cuales se destacan SPAdes para el caso de ensamblajes *de novo* (Bankevich et al. 2012), o *Bowtie* y *BWA* para el caso de ensamblajes con genomas de referencia (Langmead et al. 2009; H. Li and Durbin 2009).

Los ensamblajes realizados son almacenados en archivos de texto plano llamados sam, los cuales contienen para cada *read* información como la posición en la cual alinean (mapean) en el genoma (si es que mapean) y la identidad con respecto al mismo (número de desajustes o *missmatches*). A su vez, mediante el uso de herramientas bioinformáticas, es posible obtener algunos parámetros acerca del ensamblado, para poder evaluar las características del mismo. Uno de los principales datos es la cobertura (*coverage o breadth*) del ensamblado, la cual corresponde al porcentaje del genoma en cuestión que ha sido secuenciado, es decir qué porcentaje del genoma es cubierto por los *reads* (Figura 4). Otro parámetro de interés es la profundidad de cobertura (*Depth of coverage*) en cada posición del genoma. Esto significa el número de veces que una posición determinada del genoma ha sido secuenciada, y se corresponde con el número de *reads* que han mapeado en una posición determinada del genoma (Figura 4). Habitualmente, el valor de cobertura suele estar acompañado de la profundidad promedio (*average Depth*) del ensamblado a lo largo de todo el genoma.

Alternativamente a los archivos sam, pueden obtenerse archivos bam, que incluyen la misma información que los archivos sam pero en formato binario y por ende ocupan menos espacio de almacenamiento. Tanto los archivos bam como sam pueden ser analizados mediante el uso de programas que permitan una visualización gráfica del ensamblado. Algunos de ellos son UGENE (Okonechnikov et al. 2012), Tablet (Milne et al. 2013) y SeqMan NGen (DNASTAR. Madison, WI).

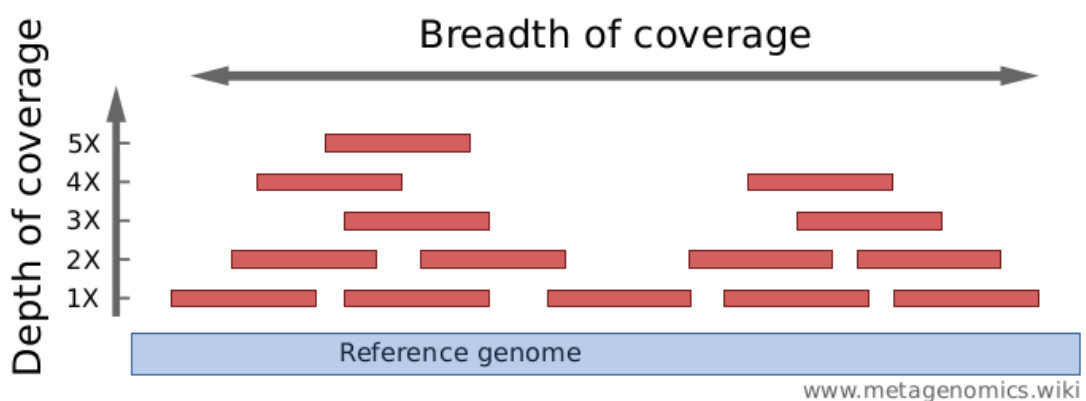


Figura 4. Ensamblado utilizando genoma de referencia (*reference genome*). Sobre el genoma de referencia (*celeste*) se encuentran los *reads* que mapean con el mismo (*barras rojas*). La doble flecha horizontal indica la cobertura, mientras que la flecha vertical indica la profundidad de cobertura. Tomado de [www.metagenomics.wiki](http://www.metagenomics.wiki)

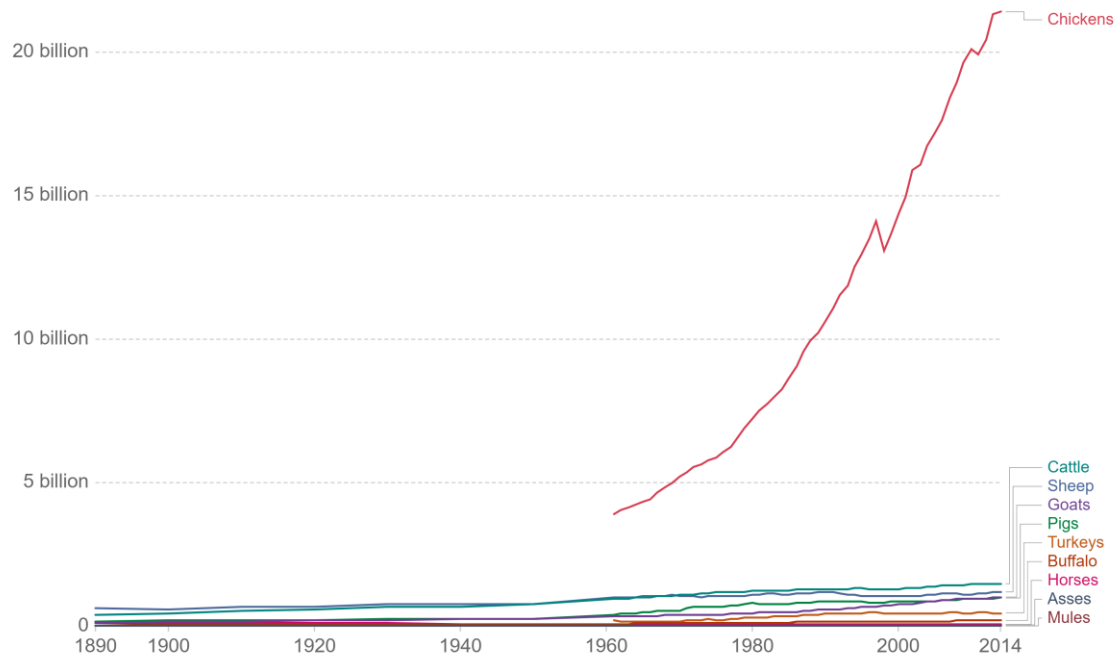
Finalmente, de los ensamblados realizados puede obtenerse una secuencia consenso, en formato fasta, análoga a las que pueden ser obtenidas mediante la tecnología de secuenciación Sanger. Estas secuencias pueden ser utilizadas para analizar variabilidad genética y para la realización de inferencias filogenéticas. También es posible realizar la anotación de las secuencias consenso. Esto significa identificar los marcos abiertos de lectura (ORFs, por sus siglas en inglés) que presenta el genoma, así como otras secuencias identificables en él (como regiones reguladoras, repetidos, etc). En general, la manera en la que varios programas informáticos realizan la anotación de genomas es transportando las anotaciones presentes en otros genomas previamente anotados.

Actualmente se han desarrollado más de 40 diferentes flujos de trabajo para la detección de *reads* pertenecientes a genomas virales y su clasificación taxonómica, a partir de datos obtenidos mediante secuenciación masiva. La gran mayoría de éstos se basa en el mapeo de *reads* contra una base de datos de genomas virales y su posterior clasificación a distintos niveles taxonómicos. Adicionalmente, algunos de ellos también son capaces de realizar el filtrado de *reads* no virales, utilizando el genoma humano como hospedero (Nooij et al. 2018).

## **1.6 Virus en la industria avícola**

El avance de las técnicas de secuenciación masiva y el rápido desarrollo de herramientas computacionales han ofrecido nuevas oportunidades para la vigilancia de las enfermedades infecciosas emergentes tanto a nivel de cantidad como de calidad (Kwok et al. 2020). Este tipo de enfermedades son responsables de grandes niveles de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, siendo la mayoría de ellas (60,3%) causadas por patógenos zoonóticos (K. E. Jones et al. 2008). A su vez, la cría intensiva de animales para su comercialización, consumo y producción de alimentos en proximidad con los humanos pueden generar el ambiente propicio para la transmisión de estas enfermedades (B. A. Jones et al. 2013). Este tipo de prácticas se encuentra en aumento constante, debido al incremento en la demanda de alimentos provocado por el crecimiento poblacional (Kwok et al. 2020). Particularmente, la industria avícola es quien presenta el mayor número de

individuos a nivel mundial, superando ampliamente el resto de los animales criados para su consumo y producción de alimentos (Figura 5).



*Figura 5. Número total de animales criados para el consumo y la producción de alimentos, entre 1890 y 2014. Gráfico tomado y modificado de <http://www.ourworldindata.org>, según datos obtenidos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).*

Este incremento de población y de densidad, facilita la transmisión de enfermedades tanto entre los animales como entre animales y humanos, y más aun teniendo en cuenta las condiciones intensivas en las que las aves son criadas (Figura 6). Dos ejemplos conocidos del potencial zoonótico de los patógenos virales circulantes en la industria avícola, son los correspondientes a los brotes de cepas de Influenza Aviar A altamente patogénicas en humanos en 2003 (subtipo H7N7) y en 2005 (subtipo H5N1), en Europa y Asia respectivamente (Koopmans et al. 2004; Sims et al. 2004).



Figura 6. Establecimiento típico para la cría intensiva de aves. Tomado de <https://www.poultry.care>.

El estatus sanitario es considerado el factor de mayor impacto en la avicultura ya que no solo incide sobre los parámetros zootécnicos, sino que también puede convertirse en un fundamento de restricciones comerciales en el mercado internacional. Patógenos que no afectan directamente a la salud humana pero sí golpean constante y gravemente la productividad y economía de la industria avícola, son siempre el mayor problema de la cadena de producción aviar. Contrariamente a lo que se suele pensar, los problemas sanitarios mediáticos como el de Influenza Aviar no necesariamente ocasionan las mayores pérdidas productivas en la industria avícola. Los grandes compromisos económicos están relacionados a dolencias que no son tan explosivas, pero ocurren persistentemente en la mayoría de los lugares del mundo en donde se practica la cría intensiva de aves. Uno de los principales ejemplos son las enfermedades inmunodepresoras, producidas por agentes como el Virus de la Anemia del Pollo (CAV), el virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (virus de Gumboro o IBDV), o el virus de la Enfermedad de Marek (MDV). Por su parte, otro ejemplo importante lo conforman las enfermedades respiratorias, ocasionadas por patógenos como el Virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), el virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV) y el propio virus de Influenza Aviar (AIV). Las infecciones producidas por estos virus suelen ser muy complejas debido a la sinergia que los mismos presentan, donde la inmunodepresión generada



por uno de ellos puede significar la puerta de entrada para el ingreso de varios patógenos (Toro et al. 2006). Debido a esto, la co-infección de virus inmunodepresores y/o respiratorios es un evento muy común. Esto genera en muchos casos la aparición de fenotipos complejos, con una variedad de síntomas clínicos que no se pueden explicar por la sola presencia de un agente viral.

A su vez, la respuesta inmune a muchas de las vacunas, incluidas MDV, NDV y laringotraqueitis, es obstaculizada cuando éstas se aplican en aves infectadas con otros virus como CAV. La vacunación contra NDV o MDV utilizando cepas atenuadas puede incluso generar reacciones severas si las aves están previamente infectadas con CAV (Adair 2000). Del mismo modo, una infección con CAV puede disminuir la inmunidad para otros patógenos aviares y puede aumentar la susceptibilidad de las aves a diversos patógenos, no solo virales sino también bacterianos (Schat 2009).

Los abordajes metagenómicos han sido utilizados para caracterizar las comunidades virales asociadas a pollos presentes en muestras de diversos tipos como materia fecal (Lima et al. 2019); hisopados de cloaca (Á. Boros et al. 2016); de tejidos como intestino (Day et al. 2015; Devaney et al. 2016) o proventrículo (Kim et al. 2015); y de hisopados de tráquea y nasal (Sajnani et al. 2018). Si bien la mayoría de los estudios han sido realizados en pollos con algún tipo de sintomatología clínica, también se han realizado estudios del viroma en pollos con fenotipo sano, en la superficie de la piel y en muestras de intestino (Denesvre et al. 2015; Shah et al. 2016). Los resultados de estos trabajos muestran que entre las familias virales más comúnmente encontradas en aves de corral se encuentran *Picornaviridae*, *Parvoviridae*, *Astroviridae* y *Anelloviridae*.

Sin embargo, el número de trabajos realizados hasta la fecha en muestras aviares continúa siendo bajo, y la caracterización de comunidades virales en estos organismos permanece aún poco clara. Especialmente, en órganos de gran relevancia como aquellos vinculados con la generación de la respuesta inmune (órganos linfoides primarios y secundarios), que son blanco de un diverso número de agentes virales.

## 1.7 Antecedentes en Uruguay

El grupo de investigación Genética de Microorganismos perteneciente a la Sección Genética Evolutiva de la Facultad de Ciencias ha sido pionero en el desarrollo y la implementación de herramientas de biología molecular que permiten la identificación, caracterización y el análisis de la variabilidad genética de agentes patógenos virales en aves de corral. Las primeras metodologías implementadas corresponden a la aplicación de ensayos de PCR convencional para el diagnóstico y la caracterización directa por secuenciación Sanger e indirecta por RFLP (polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción) de patógenos como IBDV e IBV (Hernández et al. 2006, 2010, 2011, 2015; Marandino et al. 2015). A su vez, se desarrollaron y validaron métodos rápidos de diagnóstico, caracterización y cuantificación de carga viral para virus como IBV, IBDV y CAV mediante ensayos de qPCR utilizando sondas TaqMan (Tomás et al. 2012, 2017; Marandino et al. 2016; Techera et al. 2019).

El grupo también cuenta con experiencia en la implementación de tecnologías de secuenciación masiva en varios modelos virales (Panzera et al. 2021 (a);(b); Pérez et al. 2014; Romanutti et al. 2020). En patógenos aviarios, mediante la combinación de metodologías de amplificación de la carga viral por inoculación en huevos embrionados y posterior implementación de protocolos de purificación de las partículas virales, se ha logrado la caracterización de genomas completos de virus de gran tamaño como IBV (Marandino et al. 2017). Además, se ha hecho uso de una técnica de ultra-plex RT-PCR y posterior secuenciación masiva para la identificación simultánea de 8 diferentes virus aviarios, algunos vinculados a patologías inmunodepresoras (IBDV, CAV y MDV) y otros a respiratorias (IBV, AIV, Laringotraqueitis, Metapneumovirus y NVD) (tesis de maestría Perbolianachis 2021).

El relevamiento durante años en nuestro país de los principales patógenos virales que producen enfermedades inmunodepresoras y respiratorias indica que nuestra industria avícola no está libre de muchos de ellos. La determinación precisa de las enfermedades infecciosas regionales causadas por agentes específicos proporciona información fundamental para que las autoridades locales optimicen las estrategias de prevención de salud pública y maximicen los recursos limitados disponibles, especialmente en los países en desarrollo (Yang et al. 2011). La caracterización

completa del viroma en muestras provenientes de aves de corral tanto con un fenotipo enfermo como sano es una herramienta fundamental para lograr una mayor comprensión de las patologías, para conocer las interacciones entre los diferentes virus, algunos ya conocidos y otros nuevos, y para generar información epidemiológica que permita mejorar las estrategias de control de los patógenos virales.

## **2 Hipótesis de trabajo**

Las comunidades virales presentes en aves de corral de la industria avícola uruguaya son complejas y están presentes no sólo en aves de fenotipo enfermo, sino también en aquellas que no presentan sintomatología clínica. La diversidad de virus circulantes en aves comerciales se encuentra subestimada en nuestro país.

## **3 Objetivos**

### **3.1 Objetivo General**

Caracterizar la comunidad viral (viroma) presente en muestras biológicas provenientes de aves de corral.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Optimizar un protocolo de enriquecimiento de partículas/genomas virales en muestras biológicas de origen animal (tejido de aves de corral), evaluando los distintos pasos del mismo mediante técnicas moleculares.
- Aplicar el protocolo de enriquecimiento en muestras de aves de corral con fenotipo enfermo y sano.
- Caracterizar y comparar la comunidad viral presente en las muestras con y sin sintomatología clínica.

## 4 Materiales y métodos

### 4.1 Muestras

En el presente trabajo se analizaron dos matrices/tejidos (bursa de Fabricius y tráquea) de muestras de pollos Broilers colectadas en diferentes granjas situadas en el departamento de Canelones, Uruguay, entre los años 2015 y 2020 (Tabla 1).

Para el seguimiento y la puesta a punto de un protocolo de enriquecimiento de partículas virales, se utilizó una matriz (bursa de Fabricius) correspondiente a una muestra (361501) donde previamente se había detectado mediante qPCR la presencia de CAV, IBV e IBDV. La elección de esta matriz con co-infección de estos tres virus se debe al hecho de que los mismos presentan una composición genómica diferente entre sí (DNA doble hebra circular, RNA simple hebra y RNA doble hebra bi-segmentado para CAV, IBV e IBDV respectivamente). Además, también presentan diferencias en cuanto a la estructura del virión, donde IBV cuenta con la presencia de una envoltura mientras que CAV e IBDV carecen de la misma (virus no envueltos). Mediante la implementación de ensayos de qPCR desarrollados previamente en nuestro laboratorio, se realizó el seguimiento de la eficiencia de cada uno de los pasos del protocolo de enriquecimiento de partículas virales.

Una vez realizado el seguimiento, el protocolo fue implementado en otra matriz (tráquea) de la misma muestra, y en la misma matriz de otra muestra que también presentaba un fenotipo enfermo (181601). Finalmente, ambas matrices (bursa y tráquea) fueron analizadas en dos muestras provenientes de aves que no presentaban ninguna sintomatología al momento del muestreo (fenotipo sano).

Tabla 1. Muestras analizadas en el presente trabajo

\*Se indica la matriz utilizada para realizar el seguimiento del protocolo de enriquecimiento de partículas virales.

Nombre/Matriz	Año de Colección	Signos y síntomas	Diagnóstico Previo (qPCR)
361501/Bursa*	2015	Tos, estornudos, depresión. Disminución en la tasa de conversión.	CAV, IBV, IBDV
361501/Tráquea	2015	Tos, estornudos, depresión. Disminución en la tasa de conversión.	CAV, IBV, IBDV
181601/Bursa	2016	Tos, estornudos, depresión. Disminución en la tasa de conversión.	CAV, IBV, IBDV
182001/Bursa	2020	Sin síntomas	-
182001/Tráquea	2020	Sin síntomas	-
182002/Bursa	2020	Sin síntomas	-
182002/Tráquea	2020	Sin síntomas	-

## 4.2 Protocolo de enriquecimiento de partículas virales

### 4.2.1 Filtrado y digestión con nucleasas

Con el objetivo de maximizar la presencia de los genomas virales en las muestras analizadas, se llevó a cabo un protocolo de enriquecimiento de partículas virales. En primer lugar, se realizó un homogeneizado del tejido en 2 mL de buffer fosfato salino (1X PBS). Para el caso de las muestras con sintomatología clínica (361501 y 181601), los tejidos analizados fueron procesados por separado, mientras que para el caso de las muestras con fenotipo sano (1820021 y 182002) se realizó un pool que contenía ambas matrices (bursa y tráquea) y fueron procesadas en conjunto para cada una de las muestras.

Los homogeneizados fueron filtrados utilizando filtros de jeringa con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  con el fin de reducir la cantidad de bacterias. Estos filtrados fueron sometidos a una digestión en un mix de nucleasas (DNasas y RNasas) por 1 hora a 37°C (Tabla 2), mediante la cual se pretende degradar la mayor cantidad posible de material genético libre perteneciente al hospedero, mientras que el material genético viral permanece protegido del alcance de las nucleasas en el interior de las partículas virales. Las enzimas utilizadas fueron: DNasa I 1 U/ $\mu\text{L}$  (Zymo Research, USA), RNase I 10 U/ $\mu\text{L}$  (ThermoFisher Scientific, USA) y ShortCut Rnase III (New England Biolabs, UK). La reacción de digestión fue detenida con EDTA 0.5 M e incubación por 5 minutos a 65°C.

Tabla 2. Condiciones de la reacción de digestión de ácidos nucleicos realizada

Reactivo	Volumen por reacción ( $\mu\text{L}$ )
ShortCut Buffer 10x (NEB,USA)	32
MnCl <sub>2</sub> (200mM)	32
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	32
DNasa I (1 U/mL)	5
RNasa I (10 U/mL)	6
RNasa III (2000 U/mL)	8
H <sub>2</sub> O	5
Producto del filtrado	200
<b>Volumen total</b>	<b>320</b>

#### 4.2.2 Extracción de ácidos nucleicos y eliminación del rRNA

La extracción de ácidos nucleicos, de DNA y RNA de las distintas matrices fue realizada por separado, utilizando los kits Zymo Quick-DNA™ Miniprep Kit (Zymo Research, USA) y Quick-RNA™ Miniprep Kit (Qiagen, Germany) respectivamente, y a partir de 200  $\mu\text{l}$  de muestra.

El RNA extraído luego de la digestión con nucleasas fue sometido a un protocolo de eliminación del rRNA. Para el mismo se utilizó el *kit* NEBNext® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (New England BioLabs, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante y partiendo de 12  $\mu\text{L}$  de producto de extracción de RNA.

### **4.2.3 Síntesis de cDNA doble hebra y amplificación por MDA**

El RNA obtenido fue utilizado para generar el cDNA doble hebra (ds-cDNA, por sus siglas en inglés) necesario para la construcción de bibliotecas, mediante el uso del kit Maxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, USA) con random primers y 13µL de RNA extraído.

Posteriormente, el cDNA doble hebra y el DNA fueron sometidos a un paso de Amplificación por Desplazamiento Múltiple (MDA) con el fin de aumentar la cantidad total de material genético presente. Para ello se empleó el kit REPLI-g Mini kit (Qiagen, Germany) partiendo de 5 µL de DNA/dscDNA. Los ácidos nucleicos fueron purificados usando AMPure XP (Beckman Coulter, USA) y cuantificados utilizando un fluorómetro Qubit y el kit Qubit™ DNA-HS Assay kit (ThermoFisher Scientific, USA).

### **4.2.4 Consideraciones generales**

Diversas variantes del protocolo de enriquecimiento de partículas virales fueron implementadas durante el desarrollo del presente trabajo: uso de filtros de 0,22 µm, distintas condiciones de digestión (concentraciones de nucleasas y tiempos de incubación), ultra centrifugación en colchón de sacarosa, uso y no uso de eliminación del rRNA. Las mismas fueron evaluadas mediante qPCR de la misma forma que se detalla en el siguiente punto. No obstante, la metodología y los resultados mostrados en este trabajo corresponden al protocolo a partir del cual se obtuvieron mejores resultados a nivel de la relación genoma viral/genoma del hospedero.

### **4.3 Seguimiento del protocolo de enriquecimiento mediante qPCR**

Para la matriz 361501/Bursa se analizó la eficiencia de cada uno de los pasos del protocolo de enriquecimiento de partículas virales mediante ensayos de qPCR. Se realizó la extracción de RNA luego de los procesos de homogeneizado, filtrado, digestión con nucleasas y eliminación de rRNA, para la generación de cDNA y posterior detección por qPCR de los genomas de CAV, IBV, IBDV y del genoma del hospedero (mediante detección del gen 18S y β actina).



Los genomas de CAV y de IBDV fueron detectados utilizando cebadores y sondas según Techera et al. 2019, mientras que el genoma de IBV fue detectado según Callison et al. 2006. Por su parte, dos componentes genómicos del hospedero fueron detectados. Estos son un fragmento del gen de  $\beta$ -actina (ensayo previamente puesto a punto en el laboratorio), y un fragmento del gen 18S rRNA (según tesis de doctorado Ana Marandino 2018) (Tabla 3). Todos los ensayos de qPCR fueron realizados por duplicado. El ciclado empleado para dichos ensayos consistió en un paso de lectura pre-PCR de 2 minutos a 50°C, una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C (15 segundos) e hibridación y extensión a 60°C (1 minuto), y finalmente un paso de lectura post-PCR de 5 minutos a 70°C.

Tabla 3. Cebadores y sondas utilizados en las reacciones de qPCR implementadas en el presente trabajo.

	Cebadores y sonda	Secuencia 5' → 3'	Polaridad	Amplicón (pb)
<b>CAV</b>	CAV-F630 <sup>a</sup>	ACGCTAAGATCTGCAACTG	+	127
	CAV-R756 <sup>a</sup>	TTACCCTGTACTIONCGGAGG	-	
	CAV-Pb <sup>a</sup>	HEX-CAAGCCTCC-ZEN-CTCGAAGAAGC-3IABkFQ	+	
<b>IBDV</b>	F143 <sup>a</sup>	CMAGATCAAACCCAACAGATTGT	+	111
	R253 <sup>a</sup>	CTCTGACCTGAGAGTGTGCTTCTC	-	
	S175 <sup>a</sup>	FAM-ACGGAGCCT-ZEN-TCTGATGCCAACAACC-IBFQ	+	
<b>IBV</b>	IBV5'GU391 <sup>b</sup>	GCTTTTGAGCCTAGCGTT	+	143
	IBV5'GL533 <sup>b</sup>	GCCATGTTGTCACTGTCTATTG	-	
	IBV5'G probe <sup>b</sup>	FAMCACCACCAGAACCTGTACCTC-BHQ1	+	
<b>18s</b>	ARNr 18S Fw <sup>c</sup>	CTCAGCTTGTGTCTACCCTAC	+	120
	ARNr 18S Rv <sup>c</sup>	CTTATGACCCGCACTTACTGG	-	
	ARNr 18S Pb <sup>c</sup>	FAM-CAATCCCCG-ZEN-ATCCCCATCACGAA-3IABkFQ	-	
<b>β-actina</b>	β-act Fw <sup>d</sup>	GAGAAATTGTGCGTGACATCA	+	152
	β-act Rv <sup>d</sup>	CCTGAACCTCTCATTGCCA	-	
	β-act Pb <sup>d</sup>	FAM-TGCTCGAAA-ZEN-TCCAGTGCGACGTAG-3IABkFQ	+	

<sup>a</sup>Descritos por Techera et al. (2019).

<sup>b</sup>Descritos por Callison et al. (2006).

<sup>c</sup>Tesis de doctorado Ana Marandino.

<sup>d</sup>Tesis de maestría Ana Marandino.

Para la cuantificación relativa de la presencia de los genomas virales con respecto a el genoma del hospedero se utilizó la siguiente fórmula (según tesis de doctorado Ana Marandino 2018):

$$r = \hat{E}(Ct_{virus} - Ct_{host})$$

Donde  $r$  es la relación de enriquecimiento o relación hospedero-virus,  $\hat{E}$  la eficiencia promedio de los ensayos de qPCR, y  $Ct$  el valor umbral de ciclo para cada reacción de qPCR de los genes del hospedero (*host*) y de los distintos virus. Estos valores de  $Ct$  corresponden a la media de los obtenidos por duplicado para cada ensayo de qPCR. Los valores de las eficiencias empleados, previamente determinados por nuestro laboratorio, son: 97,2% para CAV, 100% para IBDV, 101% para IBV, 103% para 18S y 102% para  $\beta$ -actina (Techera et al. 2019; tesis de doctorado Marandino 2018). El cálculo de los valores de enriquecimiento es más certero cuanto más similares son los valores de eficiencia de los ensayos. Para su empleo en la fórmula, estas eficiencias se expresan siguiendo el criterio que establece que una eficiencia de 100% corresponde a un valor de 2.

#### 4.4 Secuenciación de alto rendimiento

La construcción de bibliotecas se llevó a cabo con el kit Nextera DNA Flex Library Preparation kit (Illumina, USA) a partir de 1 ng de DNA y ds-cDNA doble hebra. La purificación de las mismas se realizó con esferas magnéticas AMPure XP (Benchman, USA) y se cuantificó en Qubit con el kit Qubit™ DNA-HS Assay kit (ThermoFisher Scientific, USA). El control de calidad y largo de las bibliotecas fue realizado en un equipo Fragment Analyzer 5200 (Agilent Technologies, USA) con el kit Standard Sensitivity NGS Analysis Kit (Agilent Technologies, USA).

El pool de bibliotecas fue secuenciado en un equipo Miniseq de Illumina ubicado en la Plataforma Genómica de la Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay. El kit de secuenciación utilizado fue el Mid Output Reagent Cartridge (300 ciclos, generando *reads* pair-end de 150 pb) según el protocolo estándar de Illumina. Los *reads* crudos obtenidos fueron sometidos al proceso de de-multiplexing automático de la plataforma Illumina, con las opciones por defecto.

## 4.5 Análisis bioinformático

### 4.5.1 Control de calidad y filtrado de *reads*

El control de calidad de los *reads* obtenidos fue llevado a cabo con el programa fastqc / PRINSEQ v0.20.4 (Schmieder and Edwards 2011). El proceso de *trimming* (remoción de *reads* de baja calidad) fue llevado a cabo con el programa Trim Galore ([https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)) con sus opciones por defecto. Además, fue necesario realizar la remoción de *reads* de baja complejidad (constituidos en su mayor parte por homopolímeros). Este proceso fue realizado con el programa PRINSEQ, utilizando el criterio denominado DUST, el cual está adaptado del algoritmo utilizado para enmascarar regiones de baja complejidad durante el pre-proceso de búsqueda de la herramienta BLAST. El criterio DUST asigna un valor (*score*) de 0 a 100 para una determinada secuencia dependiendo de su complejidad. De esta manera, una secuencia de homopolímeros (ej. TTTTTTTTTT) va a tener un *score* de 100, una secuencia de dinucleótidos repetidos (ej. ATATATATAT) presentará un *score* de alrededor de 49, y una secuencia de trinucleótidos repetidos (ej. TAGTAGTAGTAG) tendrá un *score* alrededor de 32. Siguiendo este criterio, se removieron aquellos *reads* con un DUST *score* mayor a 90. Finalmente, para el filtrado de *reads* pertenecientes al genoma del hospedero, se utilizó un genoma de referencia de *Gallus gallus* (número de acceso GCF\_000002315.6) obtenido de la base de datos del NCBI y los paquetes BWA (H. Li and Durbin 2009) y SAMtools (H. Li et al. 2009).

### 4.5.2 Detección y clasificación de *reads* virales

Los archivos fastq obtenidos luego de los procesos mencionados en el punto anterior, fueron sometidos a distintas estrategias para la detección de *reads* pertenecientes a genomas virales. En primer lugar, como parte de la optimización del protocolo de enriquecimiento de partículas virales se llevó a cabo la detección de la presencia de los genomas de CAV, IBV e IBDV en la muestra 361501/Bursa. Para ello se realizaron ensamblajes con genomas de referencia utilizando el programa BWA y los genomas virales descargados de la base de datos del *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) con los siguientes números de acceso:

NC\_001427.1 (CAV), MF421320 (IBV), NC\_004178.1 Y NC\_004179.1 (IBDV, segmentos A y B respectivamente).

Una vez puesto a punto el protocolo implementado, todos los datos obtenidos para cada matriz (incluso 361501/Bursa) fueron analizados con el programa ViromeScan (Rampelli et al. 2016), el cual realiza el mapeo de los *reads* contenidos en los archivos fastq contra una base de datos de genomas de virus de Eucariotas que el propio programa contiene.

Alternativamente, se realizó un ensamblaje *de novo* con el programa SPAdes v3.12.0 (Bankevich et al. 2012) utilizando valores de k-mers de 33, 55 y 71. Fueron seleccionados aquellos *contigs* con un largo mayor a 500 pb y un k-mer *coverage* mayor o igual a 5. Los *contigs* resultantes fueron clasificados utilizando la herramienta DIAMOND (Buchfink, Xie, and Huson 2014) y una base de datos de proteínas virales no redundante obtenida de RefSeq (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/release/>).

#### 4.5.3 Ensamblados con genomas de referencia para los virus detectados

Basándose en los resultados obtenidos con el software ViromeScan, se tomaron en cuenta los virus para los cuales se obtuvo un mínimo de 50 *reads* mapeados. Para cada uno de ellos, se realizó un ensamblado utilizando un genoma de referencia con el programa BWA. Los genomas fueron descargados de la base de datos del *GenBank* y sus números de acceso corresponden a: MF421320 (IBV), NC\_004178.1 Y NC\_004179.1 (IBDV, segmentos A y B respectivamente), NC\_001427.1 (CAV), NC\_015396.1 (Avian Gyrovirus 2), NC\_017091.1 (Gyrovirus 3), NC\_018401.1 (Gyrovirus 4), KY012057.1 (Fowl aviadenovirus D), NC\_039235 (Chicken Megrivirus), NC\_024765 (chicken picornavirus 1), NC\_023861 (Sicinivirus 1), NC\_024452.1 (Glliform aveparvovirus). Los gráficos de cobertura se generaron utilizando el script de Python weeSAM (<https://bioinformatics.cvr.ac.uk/weesam-version-1-5/>).

#### 4.5.4 Comparación de las comunidades virales

Con el fin de analizar a nivel taxonómico el perfil de las comunidades virales presentes en las distintas matrices, se llevó a cabo un análisis de agrupamiento jerárquico. El mismo se realizó con el paquete ggplot2 del programa RStudio, utilizando los valores de *reads* mapeados para cada especie viral obtenidos tras los ensamblajes con genomas de referencia descritos en el apartado anterior.

#### 4.5.5 Obtención de secuencias consenso y caracterización genética

A partir de los ensamblados realizados, fueron obtenidas secuencias consenso de los genomas totales o parciales utilizando el programa UGENE v37.0 (Okonechnikov et al. 2012). Las anotaciones de estos genomas fueron generadas con el programa VAPiD (Shean et al. 2019). Por su parte, los cálculos de distancia genética (*p-distance*) entre las secuencias se realizaron con el programa MEGA7 (Kumar, Stecher, and Tamura 2016).

Para la realización de análisis filogenéticos, diferentes sets de datos fueron generados con secuencias representativas obtenidas de la base de datos de *GenBank* y las secuencias generadas en este trabajo (Anexo II). Los alineamientos de múltiples secuencias se llevaron a cabo con el programa MEGA7 (Kumar, Stecher, and Tamura 2016). Para cada set de datos, la selección del mejor modelo de sustitución se realizó con el programa jModelTest 2.1 (Darriba et al. 2015) según el Criterio de Información Akaike (AIC, por sus siglas en inglés). Las inferencias filogenéticas se realizaron utilizando el método de Máxima Verosimilitud (ML, por sus siglas en inglés) con el programa MEGA7 (Kumar, Stecher, and Tamura 2016). El soporte estadístico fue obtenido mediante el análisis de Bootstrap de 1000 pseudo réplicas. Los árboles filogenéticos fueron visualizados y editados con el programa FigTree v1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

## 5 Resultados

### 5.1 Evaluación del protocolo de enriquecimiento de partículas virales

#### 5.1.1 Seguimiento mediante qPCR

Para la evaluación del protocolo de enriquecimiento de partículas virales, se realizó el procesamiento de la muestra 361501/Bursa (co-infectante), y se llevó a cabo el seguimiento de cada uno de los pasos del protocolo de enriquecimiento. Dicho protocolo consistió en extraer el DNA y el RNA luego de cada uno de los pasos del protocolo, para la realización de qPCR con el fin de poder evaluar la eficiencia de los distintos pasos. Con los valores de Ct obtenidos se realizó el cálculo del valor r para determinar la relación entre los genomas de los distintos virus (CAV, IBV, IBDV) y el genoma del hospedero (mediante los genes 18S y  $\beta$ -actina).

Para el caso de CAV, tanto los pasos de filtrado como digestión lograron reducir la relación gen 18S/virus. En total, se observó una disminución de 3 órdenes de magnitud en dicho valor (Figura 7). Por su parte, para la relación gen  $\beta$ -actina/virus, tras el filtrado se observó una disminución de un orden de magnitud del valor r, y no se observaron cambios tras la digestión (Figura 7). Para ambas relaciones, los valores de r obtenidos luego del paso de digestión corresponden a valores entre 0 y 1 (0,9 y 0,01 para la relación con los genes 18s y  $\beta$ -actina, respectivamente).

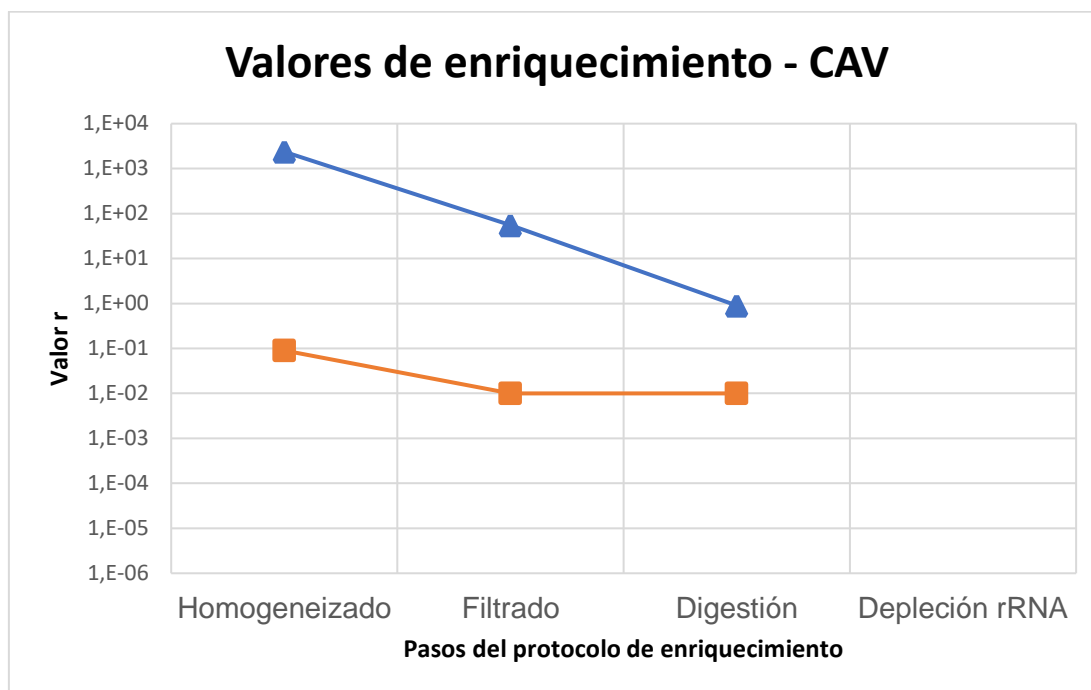


Figura 7. Variación de los valores de enriquecimiento  $r$  para el genoma de CAV en relación con los genes del hospedero 18S (—▲—) y  $\beta$ -actina(—■—).

Para el caso de IBV, se observó la misma tendencia que para CAV en relación con el gen 18S, tanto filtrado como digestión lograron disminuir el valor  $r$  en un total de 3 órdenes de magnitud. Posteriormente, la eliminación del rRNA provocó un decaimiento del valor  $r$  en otros 3 órdenes de magnitud (Figura 8), alcanzando un valor final de 0,26.

En cuanto a la comparación con el gen  $\beta$ -actina, si bien tras el filtrado se observó una disminución del valor  $r$ , el mismo aumentó tras el paso de digestión. Finalmente se vio una disminución de un orden de magnitud luego del paso de eliminación de rRNA (Figura 8), llegando a un valor de 1,2.



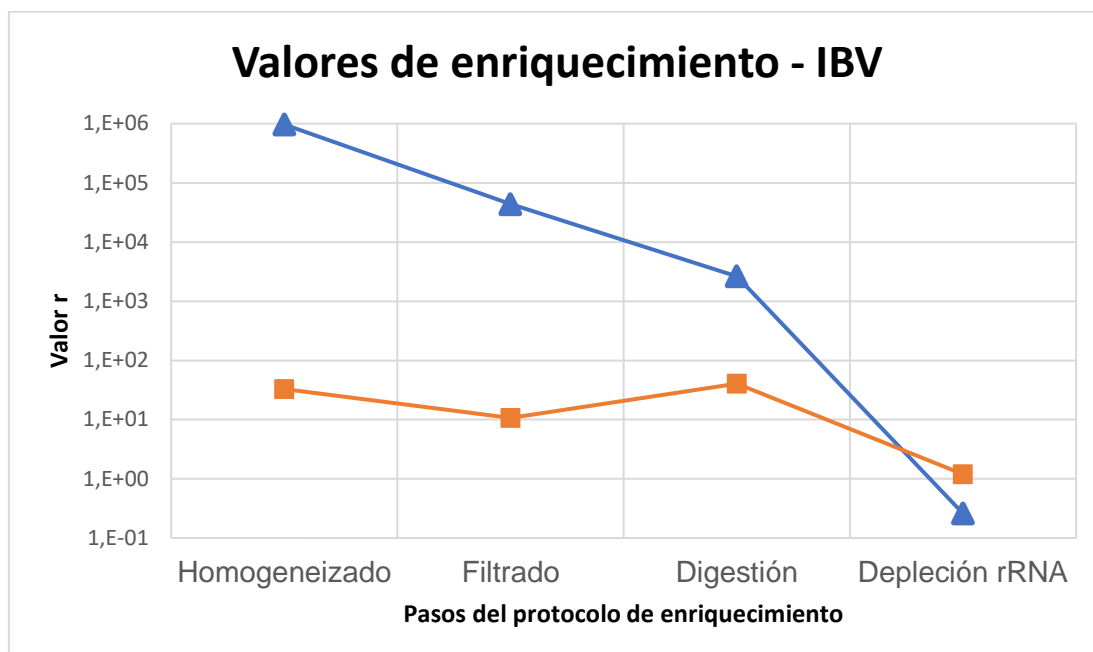


Figura 8. Variación de los valores de enriquecimiento  $r$  para el genoma de IBV en relación con los genes del hospedero 18S (-▲-) y  $\beta$ -actina(-■-).

Por su parte, los valores de enriquecimiento correspondientes al genoma de IBDV disminuyeron tras los pasos de filtrado, digestión con nucleasas y eliminación de rRNA en la comparación con el gen 18S. Al igual que para el caso de IBV, en total se vio una disminución de este valor en 6 órdenes de magnitud, llegando a un valor de 0,086 (Figura 9)

Para los valores de  $r$  correspondientes a la comparación de IBDV con el gen  $\beta$ -actina, también se observó disminución luego de filtrado, aumento tras digestión, y disminución de un orden de magnitud luego de eliminación de rRNA (Figura 9). El valor final de  $r$  obtenido fue de 0,4.

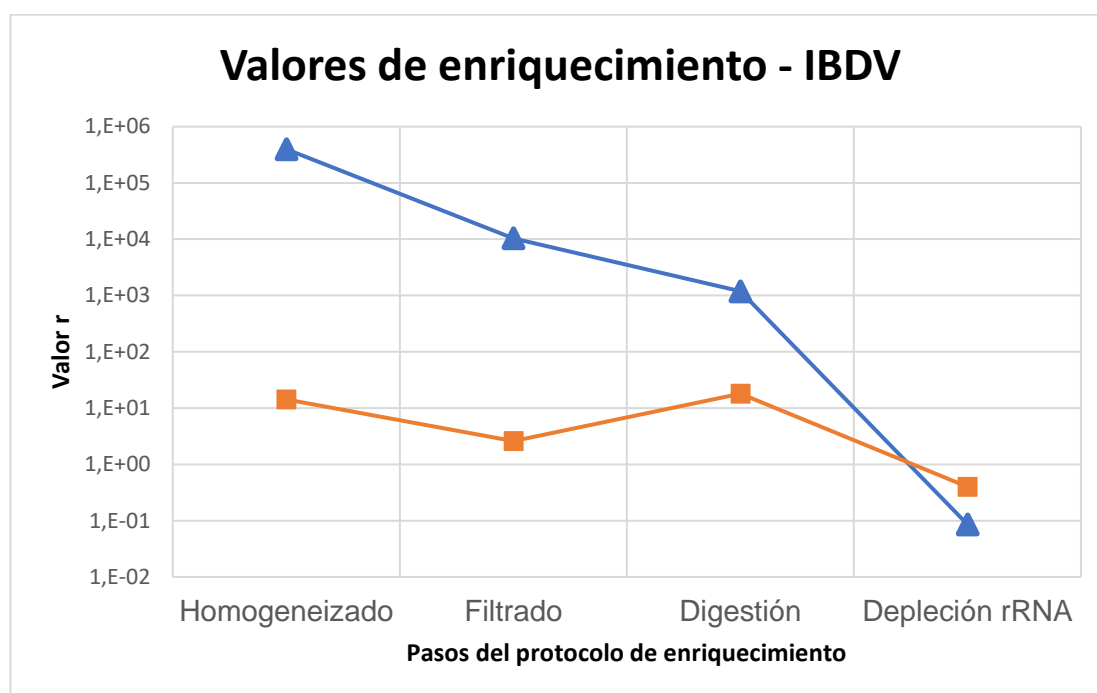


Figura 9. Variación de los valores de enriquecimiento  $r$  para el genoma de IBDV en relación con los genes del hospedero 18S (—▲—) y  $\beta$ -actina(—■—).

### 5.1.2 Amplificación de ácidos nucleicos y secuenciación de alto rendimiento

Para el caso de la muestra de RNA, se llevó a cabo una amplificación por MDA del material genético presente en la muestra luego del paso de eliminación de rRNA. Sin embargo, la concentración obtenida estuvo por debajo de los niveles detectables por el aparato Qubit, no siendo suficiente para la construcción de bibliotecas. Por lo tanto, al igual que para la muestra de DNA se realizó la amplificación por MDA y posterior construcción de bibliotecas a partir del material genético obtenido luego del paso de digestión con nucleasas, sin el paso de remoción del rRNA.

Los datos de secuenciación obtenidos para la muestra 361501/Bursa (DNA y RNA) fueron sometidos a los procesos de *trimming* y filtrado de genoma del hospedero (Tabla 4).

Tabla 4. Datos crudos obtenidos en la secuenciación, y datos obtenidos luego de los procesos de *trimming* y filtrado con genoma del hospedero para la muestra 361501 de bursa. Los valores corresponden al número de reads en cada uno de los archivos *fastq* (reads pareados).

Muestra	Reads totales	Reads luego de control de calidad	Reads luego de filtrado con genoma del hospedero (%)
361501/Bursa - DNA	2.303.408	2.296.076	1.036.516 (45,1)
361501/Bursa - RNA	2.729.011	2.700.763	43.408 (1,6)

### 5.1.3 Identificación de los genomas de CAV, IBV e IBDV

Para la puesta a punto del protocolo de enriquecimiento de partículas virales aplicado a la matriz 361501/Bursa, luego de los procesos de *trimming* y filtrado los *reads* resultantes fueron analizados para la detección de los genomas de CAV, IBV e IBDV. Para ello se realizaron distintos ensamblados utilizando los genomas de estos virus como referencia. Fue posible identificar *reads* pertenecientes a los tres genomas virales previamente detectados mediante qPCR en dicha matriz (Tabla 5).

Tabla 5. Resultado de los ensamblados realizados con los genomas de referencia de CAV, IBV e IBDV para los reads de la matriz 361501/Bursa.

Especie	Número de reads	Cobertura (%)
CAV	1.144.432	100
IBV	3.237	88,8
IBDV (Segmento A y B)	58 (36 y 22)	8,7

## 5.2 Aplicación de abordaje metagenómico en muestras de aves con sintomatología

### 5.2.1 Secuenciación de alto rendimiento

Además de la matriz utilizada para la optimización del protocolo de enriquecimiento de partículas virales, dos matrices provenientes de aves de fenotipo enfermo fueron seleccionadas para la implementación del abordaje metagenómico planteado en este trabajo. Una de ellas proviene de aves del mismo galpón que la primera muestra, pero corresponde a una matriz/tejido distinto (361501/Tráquea), mientras que la segunda, de otro galpón, proviene de bursa (181601/Bursa). Los

resultados de la secuenciación, y de los distintos pasos del filtrado de *reads*, se muestran en la Tabla 6.

*Tabla 6 Datos crudos obtenidos en la secuenciación, y datos obtenidos luego de los procesos de trimming y filtrado con genoma del hospedero.*

Muestra	Reads totales	Reads luego de control de calidad	Reads luego de filtrado con genoma del hospedero (%)
361501/Tráquea - DNA	2.511.478	2.497.105	1.658.503 (66,4)
361501/Traquea - RNA	2.933.511	2.873.959	1.053.256 (36,6)
181601/Bursa - DNA	3.287.018	3.281.210	580.996 (17,7)
181601/Bursa - RNA	3.207.719	3.109.933	215.646 (6,9)

### 5.2.2 Identificación de *reads* pertenecientes a genomas virales

Con los *reads* obtenidos luego de los procesos de *trimming* y filtrado, se utilizó el programa ViromeScan seguido de un ensamblaje *de novo* y posterior mapeo de *contigs* contra una base de datos de proteínas virales, para la identificación de genomas virales en las distintas matrices analizadas.

Para la matriz 361501/Bursa, utilizada para la puesta a punto del protocolo, se identificaron un total de 1.172.422 *reads* virales en la muestra de DNA, y 14.325 en la muestra de RNA. Los *reads* fueron identificados como pertenecientes a las familias *Anelloviridae* y *Coronaviridae* (Figura 10a). En el ensamblaje *de novo* realizado se obtuvieron un total de 106 y 61 *contigs* en las muestras de DNA y RNA, respectivamente. Tras la clasificación de los mismos utilizando el programa DIAMOND, en la muestra de DNA se identificaron 3 *contigs* pertenecientes a la familia *Anelloviridae* (con un promedio del logaritmo del *e-value* de -251,73). Para la muestra de RNA, 8 *contigs* fueron identificados como pertenecientes a la familia *Coronaviridae* (logaritmo del *e-value* promedio: -142,09), 4 a la familia *Anelloviridae* (logaritmo del *e-value* promedio: -109,17) y uno perteneciente a la familia *Birnaviridae* (logaritmo del *e-value*: -49,26).

Para el caso de la matriz 361501/Tráquea el análisis con el programa ViromeScan identificó 715.760 *reads* pertenecientes a virus de Eucariotas en la muestra de DNA, y 242.878 en la muestra de RNA. Los mismos fueron clasificados como

pertenecientes a las familias *Adenoviridae*, *Anelloviridae* y *Coronaviridae* (Figura 10b). Tras el ensamblaje *de novo* se obtuvieron 93 contigs en los datos obtenidos a partir de DNA y 134 en los correspondientes a la muestra de RNA. Ocho de ellos fueron clasificados dentro de la familia *Anelloviridae* (promedio del logaritmo del *e-value* de -163,96) y 24 dentro de la familia *Coronaviridae* (logaritmo del *e-value* promedio: -96,01), en las muestras de DNA y RNA respectivamente.

Por su parte, en la matriz 181601/Bursa, según el programa ViromeScan se identificaron 37.178 *reads* correspondientes a virus de Eucariotas en la muestra de DNA y 4.454 en la muestra de RNA. Las familias virales que comprenden estos *reads* son: *Adenoviridae* y *Anelloviridae* en la muestra de DNA, *Coronaviridae* y *Picornaviridae* en la muestra de RNA (Figura 10c). Mediante el ensamblaje *de novo* se obtuvieron un total de 142 *contigs* para la muestra correspondiente a DNA, y 226 para la muestra de RNA. Estos fueron identificados como pertenecientes a las familias *Adenoviridae* (4 *contigs*, promedio del logaritmo del *e-value* -243,67), *Anelloviridae* (3 *contigs*, promedio del logaritmo del *e-value* -190,47) y *Coronaviridae* (16 *contigs*, promedio del logaritmo del *e-value* -93,16).

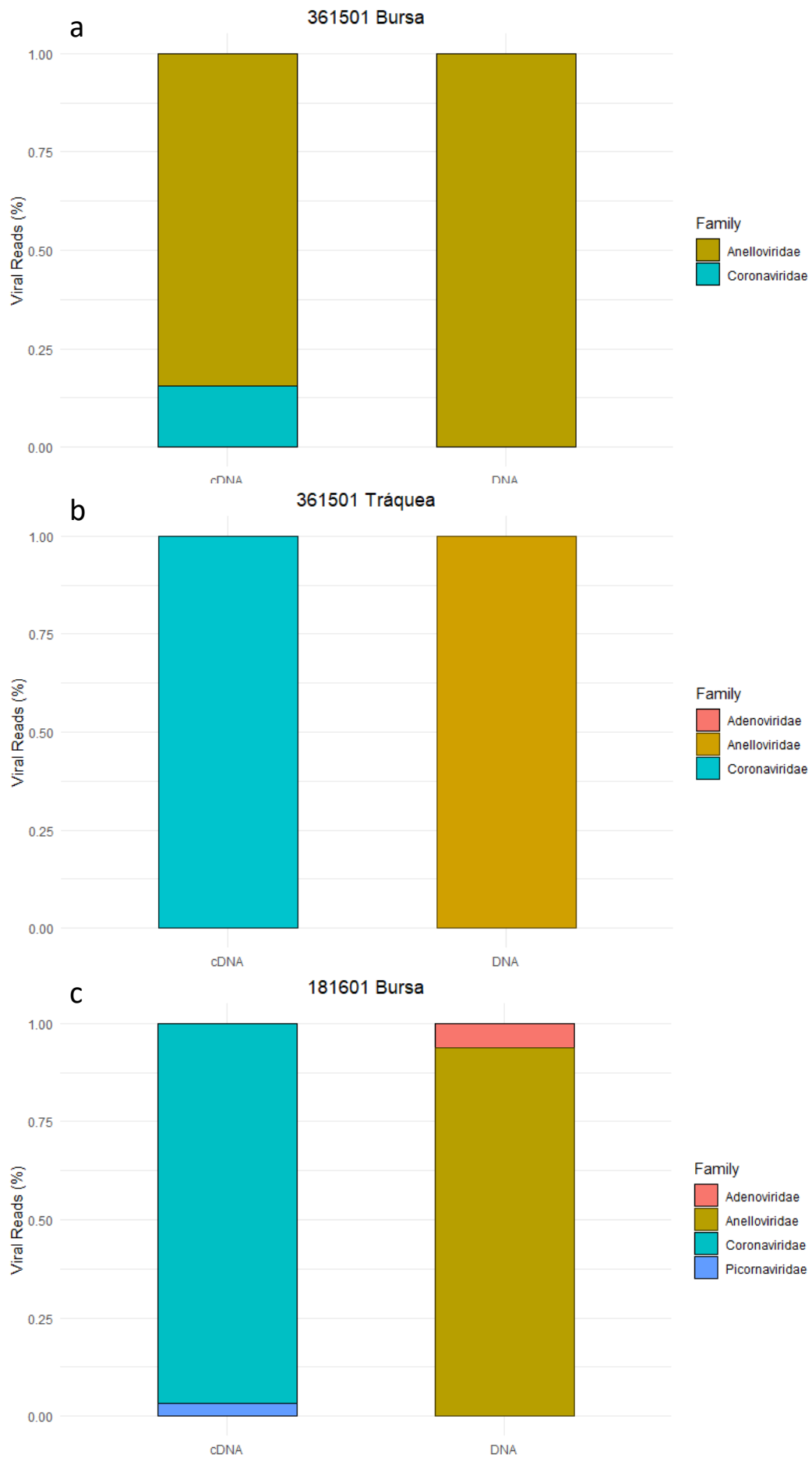


Figura 10. Distribución según familias de los reads correspondientes a genomas virales obtenidos con el programa ViromeScan para las matrices 361501/Bursa (a), 361501/Tráquea (b) y 181601/Bursa (c). A la izquierda se muestran los reads correspondientes a la muestra de RNA (cDNA), mientras que a la derecha los pertenecientes a la muestra de DNA.

### 5.2.3 Clasificación a nivel de especie (ensamblados con genomas de referencia)

Basado en los resultados obtenidos mediante el programa ViromeScan y en la clasificación de *contigs*, se realizaron ensamblados utilizando genomas de referencia en aquellos casos donde se pudo obtener una clasificación taxonómica al nivel de especie. De esta forma se pudieron identificar diversas especies virales presentes en las distintas matrices analizadas.

Para la matriz 361501/Bursa, en la muestra de DNA además de los virus previamente detectados (CAV, IBD e IBDV) se detectó la presencia de otras tres especies pertenecientes a la familia *Anelloviridae*, género Gyrovirus: Gyrovirus Aviar 2 (AvGyV2), Gyrovirus 3 (GyV3) y Gyrovirus 4 (GyV4) (Figura 11a, Anexo I). Al igual que para CAV, se obtuvo una cobertura del 100% del genoma para estas tres especies.

En la matriz 361501/Tráquea (muestra de DNA) se identificaron las mismas cuatro especies pertenecientes a la familia *Anelloviridae*, género Gyrovirus: CAV, AvGyV2, GyV3 y GyV4. En esta misma muestra para la familia *Adenoviridae* se identificó la especie Fowl Aviadenovirus E (FAdV-E). Por su parte en la muestra de RNA, para la familia *Coronaviridae* se identificó el Virus de la Bronquitis Infecciosa. Se obtuvo una cobertura del 100% del genoma para las cuatro especies de Gyrovirus y para IBV (Figura 11b, Anexo I).

Por su parte en la matriz 181601/Bursa (muestra de DNA) se detectaron dos especies de la familia *Anelloviridae* (CAV y AvGyV2) y una de la familia *Adenoviridae* (Fowl Aviadenovirus D o FAdV-D). En la muestra de RNA se identificó una especie de la familia *Coronaviridae* (IBV) y una de la familia *Picornaviridae* (Megrivirus de pollo o *Chicken megrivirus*). Los ensamblados utilizando los distintos genomas de referencia para estas especies (Figura 11c, Anexo I), permitieron la obtención de los genomas completos de CAV y de AvGyV2.

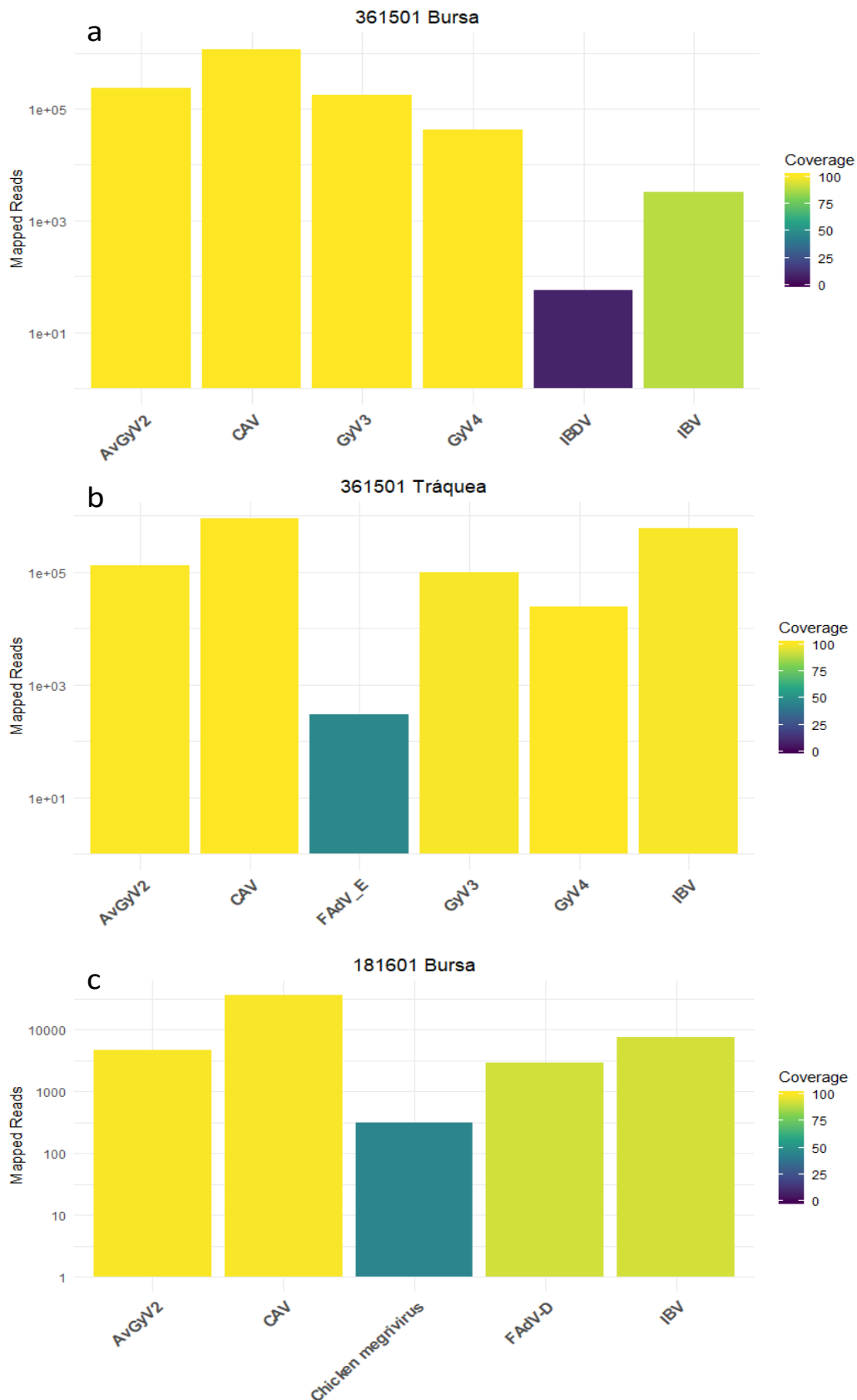


Figura 11. Resultado de los ensamblados con genomas de referencia utilizando el programa BWA para los virus detectados en las matrices 361501/Bursa (a), 361501/Tráquea (b) y 181601/Bursa (c). Para cada una de las especies virales, se indica el número de reads mapeados (en escala logarítmica). El color de las barras indica el porcentaje del genoma cubierto por reads en el ensamblado.



Para aquellas especies virales en las que fue posible obtener el 100% del genoma, se obtuvieron además algunos valores estadísticos que determinan las características del ensamblado (Tabla 7). Estos son: la profundidad promedio (*Average Depth*) que corresponde al promedio de veces que fue secuenciada cada base del genoma (con su correspondiente desvío estándar); el porcentaje de posiciones en el genoma que presentan una cobertura de profundidad de cobertura por encima del 20% ( $>0,2$ ) de la profundidad promedio; y el porcentaje de posiciones que presentan una profundidad de cobertura por encima de la profundidad promedio ( $>1$ ).

Tabla 7. Datos de los ensamblados de genomas completos obtenidos para las matrices analizadas provenientes de aves con fenotipo enfermo.

Matriz	Especie	Largo del genoma	Prof. Promedio	Desvío estándar	> 0,2 (%)	> 1 (%)
361501/Bursa	CAV	2.318	68.643,98	25.566,33	93,62	67,96
	AvGyV2	2.383	9.819,59	9.550,83	91,27	23,42
	GyV3	2.359	4.437,06	11.419,62	23,44	19,08
	GyV4	2.034	1.875,33	1.664,9	94,74	39,77
361501/Tráquea	CAV	2.319	49.448,99	20.206,75	93,66	62,35
	AvGyV2	2.376	4.176,48	7.603,03	89,17	7,39
	GyV3	2.338	2.390,79	8.239	21,2	11,36
	GyV4	2.034	353,61	2.115,09	82,74	5,01
	IBV	27.634	1.876,36	11.481,45	19,18	5,28
181601/Bursa	CAV	2.302	2.248,67	918,96	92,58	63,69
	AvGyV2	2.368	170,24	259,45	89,38	7,55

### 5.3 Aplicación de abordaje metagenómico a muestras de aves con fenotipo sano

#### 5.3.1 Secuenciación de alto rendimiento

Se realizó la secuenciación masiva a partir de las muestras 182001 y 182002 de fenotipo sano, utilizando las matrices de tráquea y bursa conjuntamente (*pool* de tejidos denominado "TB"). Los datos crudos, así como los obtenidos luego de los distintos pasos de filtrado se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8 Datos crudos obtenidos en la secuenciación, y datos obtenidos luego de los procesos de trimming y filtrado con genoma del hospedero.**

Muestra	Reads totales	Reads luego de control de calidad	Reads luego de filtrado con genoma del hospedero (%)
182001/TB - RNA	3.568.660	3.512.851	109.843 (3,1)
182001/TB - DNA	3.854.799	3.841.319	1.475.579 (38,4)
182002/TB - RNA	4.303.515	4.232.588	75.436 (1,7)
182002/TB - DNA	2.634.932	2.623.231	207.778 (7,9)

### 5.3.2 Identificación de reads pertenecientes a genomas virales

El análisis con el programa ViromeScan de la muestra 182001/TB identificó 14.785 reads correspondientes a genomas virales en la muestra de DNA, y 7.748 en la muestra de RNA. Estos fueron clasificados dentro de las familias *Adenoviridae*, *Anelloviridae*, *Herpesviridae*, *Parvoviridae* y *Picornaviridae* (Figura 12A). Mediante el ensamblaje *de novo* se lograron obtener un total de 284 contigs en la muestra de DNA y 46 en la muestra de RNA. Estos contigs fueron clasificados dentro de las familias *Adenoviridae* (3 contigs, promedio del logaritmo del *e-value* -303,81), *Anelloviridae* (1 contig, logaritmo del *e-value* -257,55), *Caliciviridae* (1 contig, logaritmo del *e-value* -121,82), *Genomoviridae* (1 contigs, logaritmo del *e-value* promedio -79,43) y *Picornaviridae* (14 contigs, logaritmo del *e-value* promedio -140,22).

Para la muestra 182002/TB, el programa ViromeScan detectó la presencia de 579 reads virales en el DNA y 8.626 en el RNA, los cuales fueron identificaron como pertenecientes a las familias *Birnaviridae*, *Herpesviridae* y *Picornaviridae* (Figura 12b). Por su parte, mediante el ensamblaje *de novo* se obtuvieron un total de 63 contigs para DNA y 16 para RNA. Seis de ellos se clasificaron dentro de la familia *Picornaviridae* con un promedio del logaritmo del *e-value* de -236,85, mientras uno de ellos dentro de la familia *Genomoviridae* (logaritmo del *e-value* de -79,73).

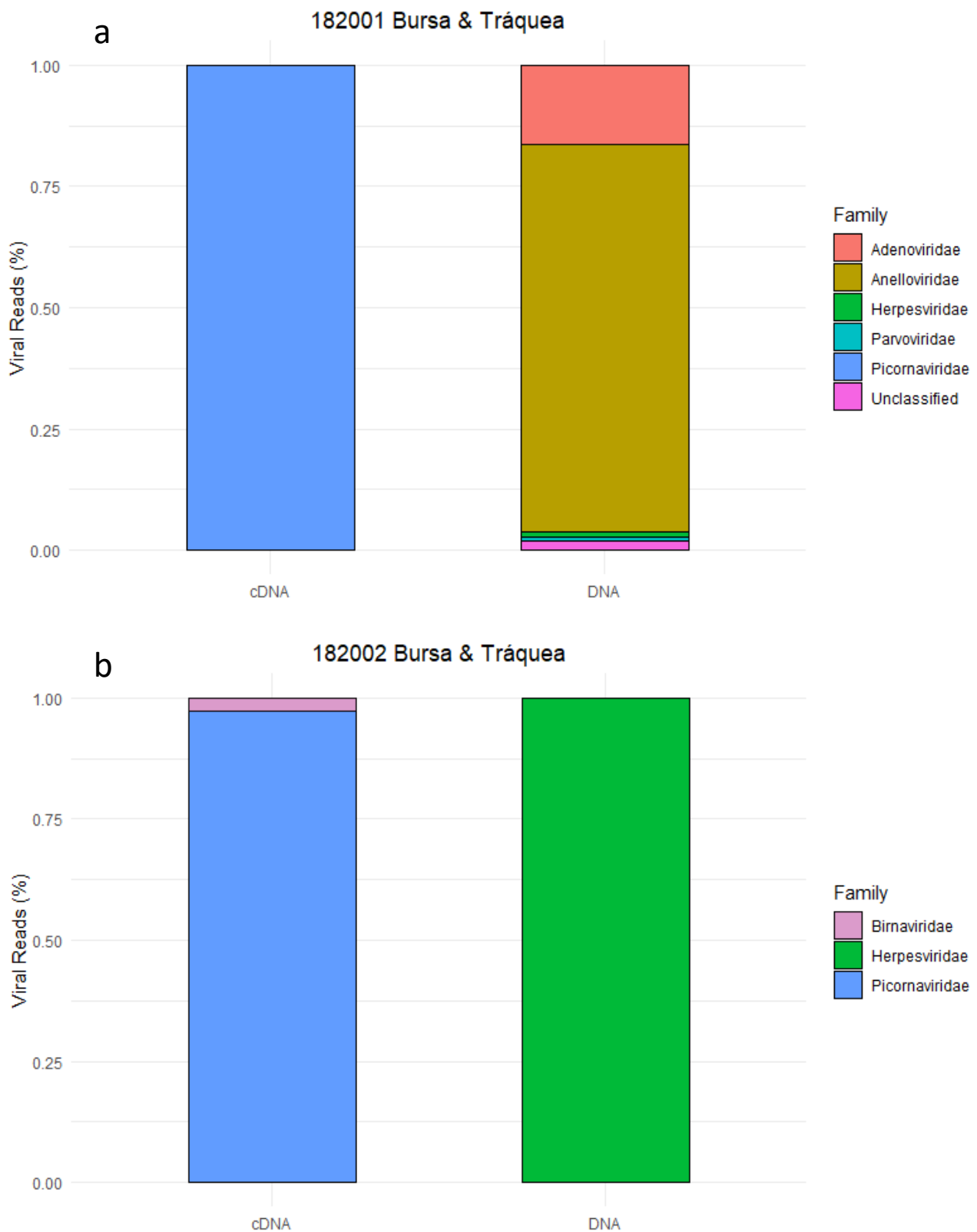


Figura 12. Distribución según familia de los reads correspondientes a genomas virales obtenidos con el programa ViromeScan para las muestras 182001 (a) y 182002 (b), ambas de bursa y tráquea. A la izquierda se muestran los reads correspondientes a la muestra de RNA (cDNA), mientras que a la derecha los pertenecientes a la muestra de DNA.

### 5.3.3 Clasificación a nivel de especie (ensamblados con genomas de referencia)

Las especies virales identificadas en la muestra 182001 fueron: AvGyV2 (*Anelloviridae*), Fowl Aviadenovirus A (*Adenoviridae*), Parvovirus de Pollo (Galliform Parvoviridae o GaPV) (*Parvoviridae*), Virus HCBI8.215 (*Genomoviridae*), Picornavirus de Pollo 1 (Chicken Picornavirus 1 o ChPV1) y Sicinivirus 1 (SiV-A1) (*Picornaviridae*). Se realizaron los ensamblajes utilizando los genomas de referencia correspondientes a las mencionadas especies (Figura 13a, Anexo I). Se pudo obtener el genoma completo de AvGyV2, con un largo de 2.383 nt y una cobertura de profundidad promedio de 779,31 (desvío estándar de 302,66). El porcentaje de *reads* por encima la profundidad promedio fue de 58,37%, mientras que el porcentaje por encima del 20% de la profundidad promedio fue de 93,62%.

Por su parte, en la muestra 182002 se pudo identificar la presencia de cuatro especies virales: ChPV1 (*Picornaviridae*), IBDV (*Birnaviridae*), Meleagrid herpesvirus (*Herpesviridae*) y SiV-A1 (*Picornaviridae*). El número de *reads* mapeados y la cobertura obtenida en los ensamblados utilizando genomas de referencia para estas cuatro especies se muestran en la figura 13b y en el Anexo I.

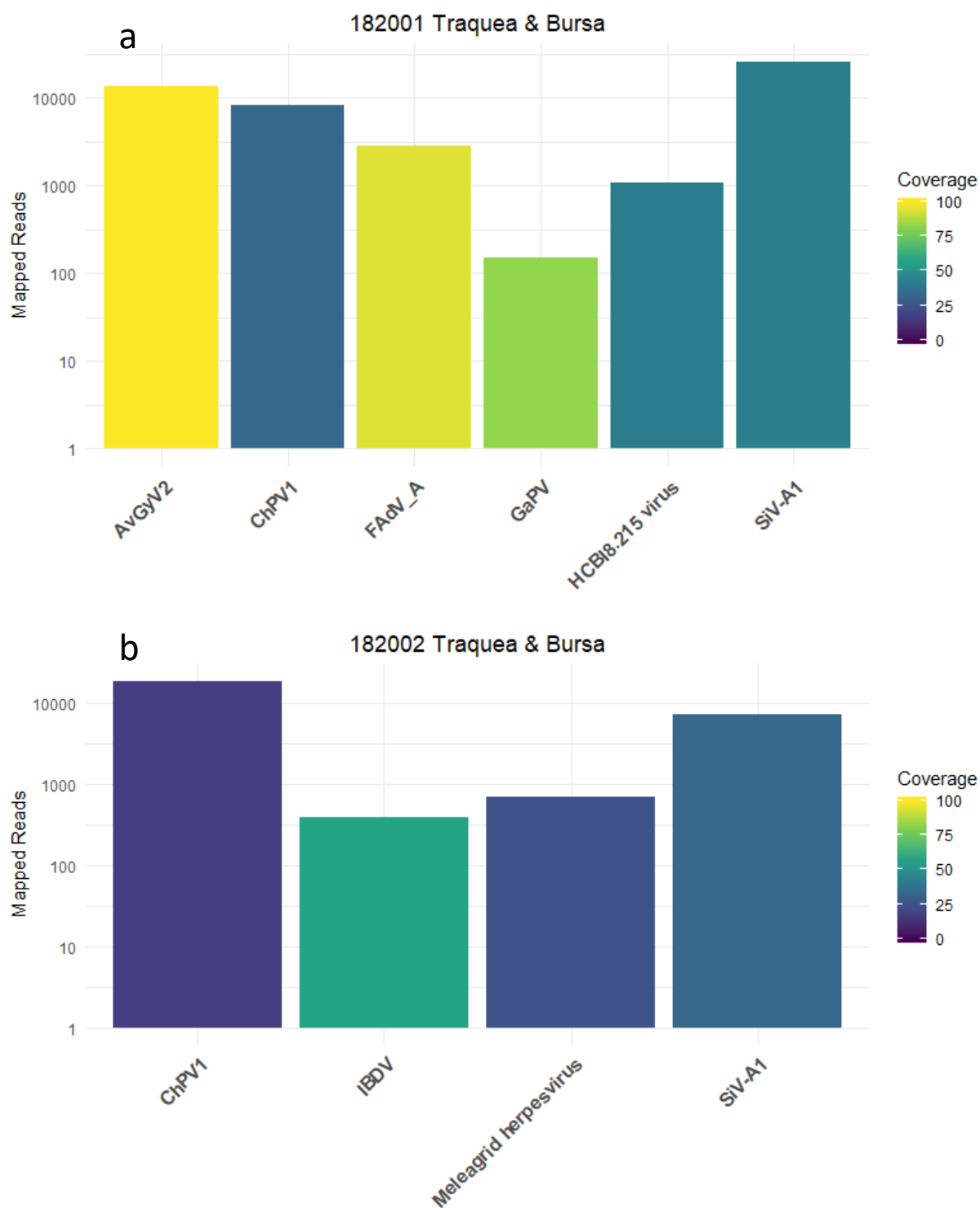


Figura 13. Resultado de los ensamblados con genomas de referencia utilizando el programa BWA para los virus detectados en las muestras 182001 (a) y 182002 (b), ambas de tráquea y bursa. Para cada una de las especies virales, se indica el número de reads mapeados (en escala logarítmica). El color de las barras indica el porcentaje del genoma cubierto por reads en el ensamblado.

## 5.4 Comparación de las comunidades virales

El análisis de agrupamiento jerárquico permitió establecer una relación entre las distintas matrices analizadas en base al perfil de las comunidades virales identificadas en las mismas. El diagrama en forma de árbol generado por este análisis muestra dos principales grupos: uno de ellos formado por las matrices provenientes de aves con sintomatología clínica, y otro compuesto por las muestras de aves con fenotipo sano (Figura 14). A su vez, dentro del grupo de muestras de aves enfermas, los viromas obtenidos a partir de la misma matriz (bursa) se encuentran más estrechamente relacionados entre sí que con la muestra de tráquea analizada.

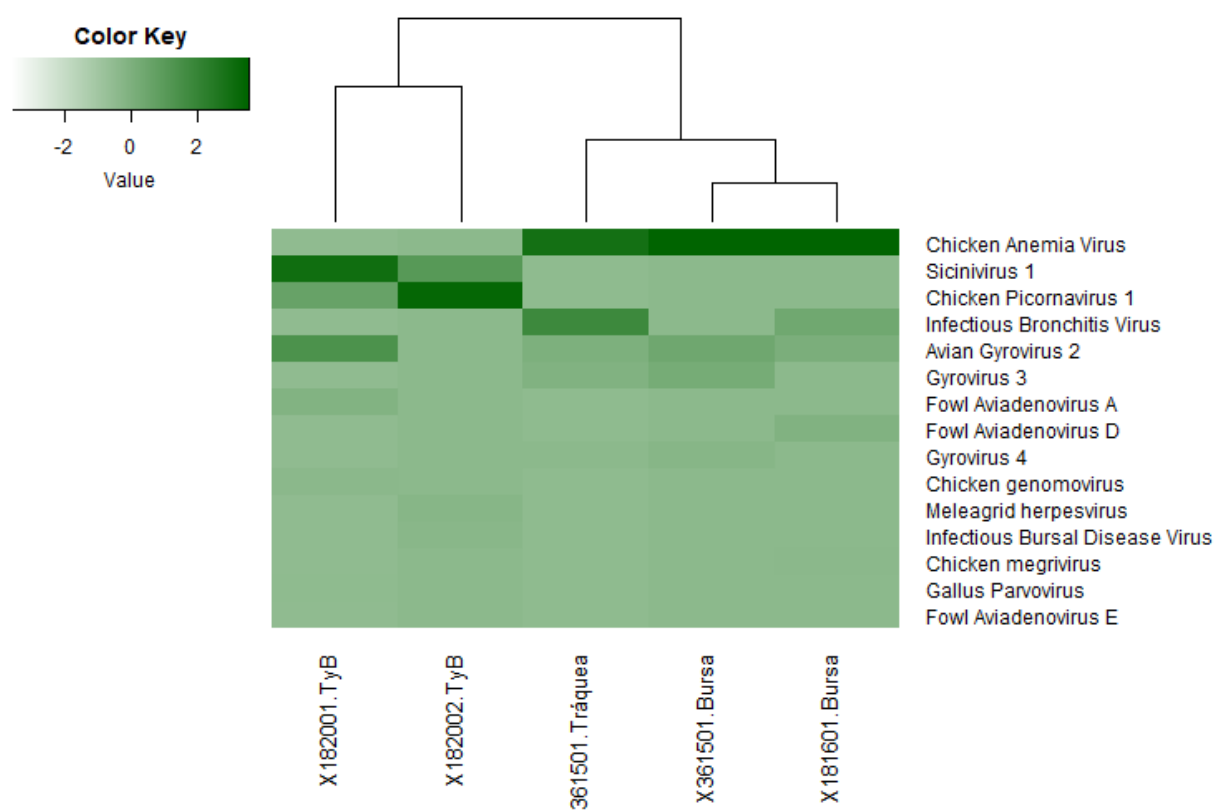


Figura 14. Agrupamiento jerárquico basado en la composición de los viromas caracterizados en las distintas matrices analizadas. Los colores en el mapa de calor hacen referencia a la cantidad de reads identificados para cada una de las especies virales, desde claro (menos reads) a oscuro (más reads).

Por otra parte, para poder analizar de mejor manera la distribución de las especies virales detectadas en las distintas muestras analizadas se realizaron diagramas de Venn, distinguiendo entre aves de fenotipo enfermo y sanas (Figura 15). El mismo

muestra tres especies en común entre todas las muestras de fenotipo enfermo (CAV, AvGyV2 e IBV), y dos especies en común entre las dos matrices de la misma muestra (GyV3 y GyV4). Para las muestras de aves sin sintomatología, según los datos obtenidos por el programa ViromeScan las mismas comparten dos especies, ambas pertenecientes a la familia *Picornaviridae* (Chicken Picornavirus 1 y Sicinivirus 1).

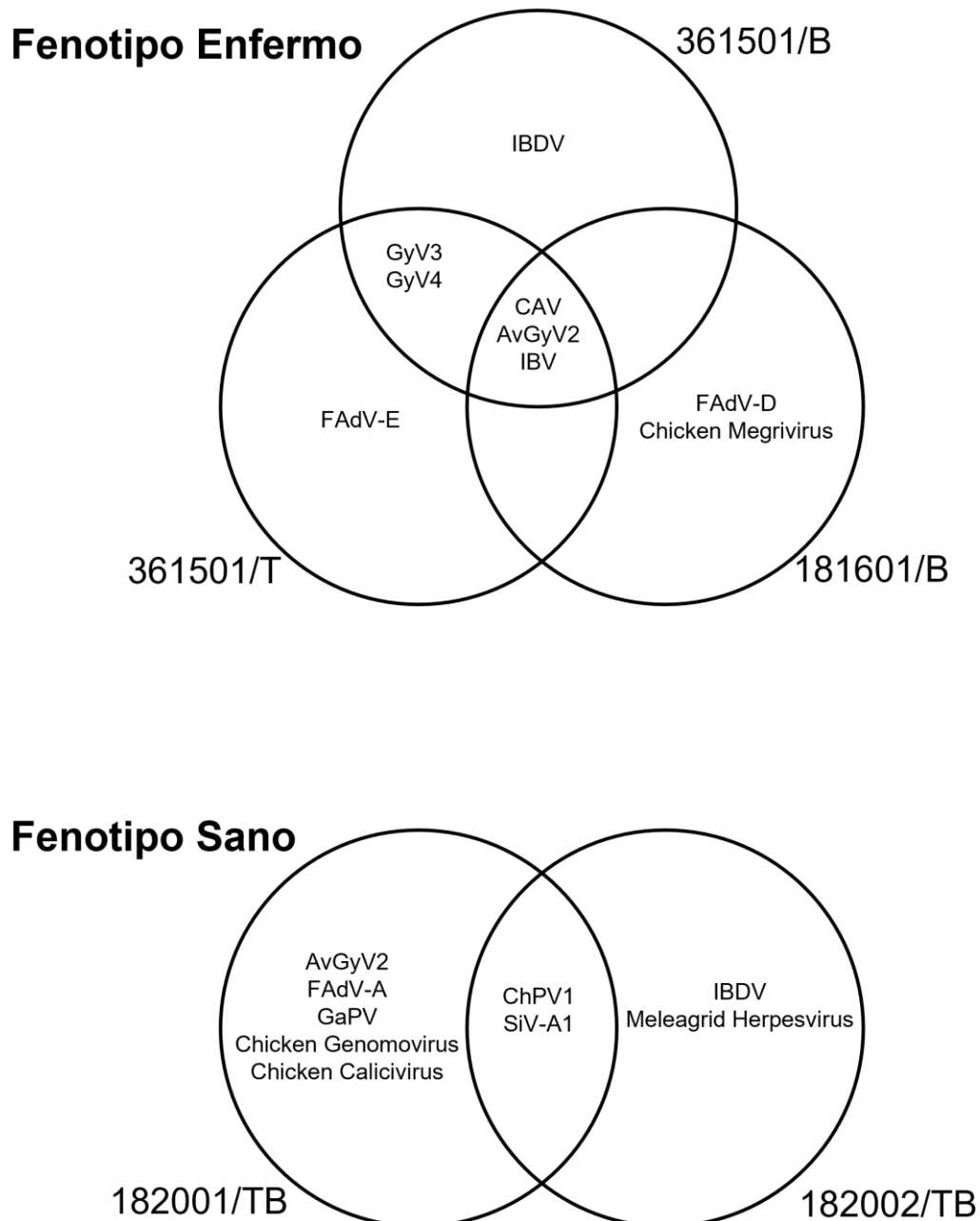


Figura 15. Diagrama de Venn indicando la distribución de las especies virales identificadas en las distintas matrices analizadas.

## 5.5 Caracterización de las familias virales

A partir de los ensamblados realizados utilizando genomas de referencia, fue posible obtener secuencias consenso de los genomas completos y/o regiones parciales de algunas de las especies virales detectadas en las distintas muestras analizadas en este trabajo. Las secuencias obtenidas fueron utilizadas para analizar la variabilidad genética presente entre las mismas, o en comparación con secuencias obtenidas de la base de datos *GenBank*. Los resultados de dichos análisis se presentan a continuación, clasificados por familia viral.

### 5.5.1 *Adenoviridae*

En las muestras analizadas, fueron identificadas tres especies pertenecientes al género *Aviadenovirus*. Las especies Fowl *Aviadenovirus* D y Fowl *Aviadenovirus* E fueron detectados en las muestras de fenotipo enfermo 181601/Bursa y 361501/Tráquea respectivamente, mientras que la especie Fowl *Aviadenovirus* A fue identificada en la muestra de fenotipo sano 182001/TB. Mediante los ensamblajes con el uso de genomas de referencia, fue posible obtener *reads* que mapean a lo largo de distintas regiones del genoma de estas especies (Figura 16, Anexo I).

Para la realización de los análisis filogenéticos, se tomaron secuencias consenso correspondientes a una región de 600 nt perteneciente al gen Hexón, el cual es ampliamente utilizado para este tipo de análisis. Esta secuencia no pudo ser obtenida para el genoma de FAdV-E detectado en la muestra 361501/Tráquea, debido a que no se obtuvo una cantidad de *reads* suficiente sobre esa región del genoma para poder obtener una secuencia consenso (Figura 16). Por lo tanto, el análisis filogenético fue realizado con las secuencias obtenidas para FAdV-A y FAdV-D (muestras 182001/TB y 361501/Tráquea respectivamente), junto con secuencias obtenidas de la base de datos de *GenBank* representativas de las cinco especies reportadas hasta el momento (FAdV A-E) (Figura 17).



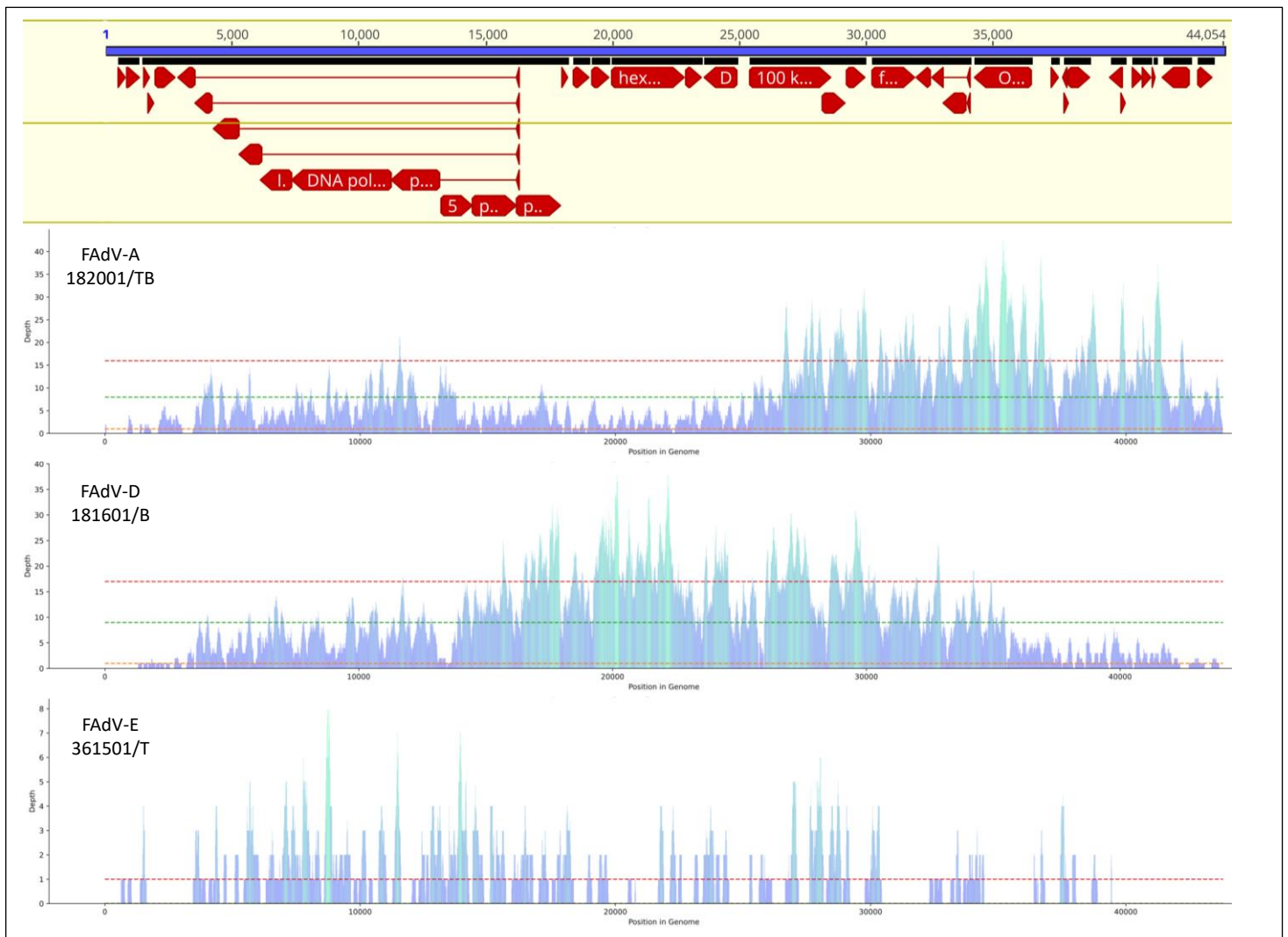


Figura 16. Estructura del genoma de Aviadenvirus (arriba), y gráficos de cobertura para las tres especies identificadas en el presente trabajo. Se indica la profundidad de cobertura a lo largo del genoma.

La filogenia muestra las cinco especies de Aviadenvirus claramente diferenciadas en distintos clados con altos valores de soporte estadístico. Las cepas pertenecientes a las muestras 182001 y 181601 se agrupan en los clados correspondientes a FAdV-A y FAdV-D, respectivamente. Para ésta última, la secuencia obtenida se encuentra agrupada dentro del subclado correspondiente al denominado Genotipo D3, particularmente junto con cuatro cepas provenientes de Brasil (Figura 17).

La región del gen Hexón analizada fue utilizada para el cálculo de la divergencia genética inter e intra-especies (Tabla 9).

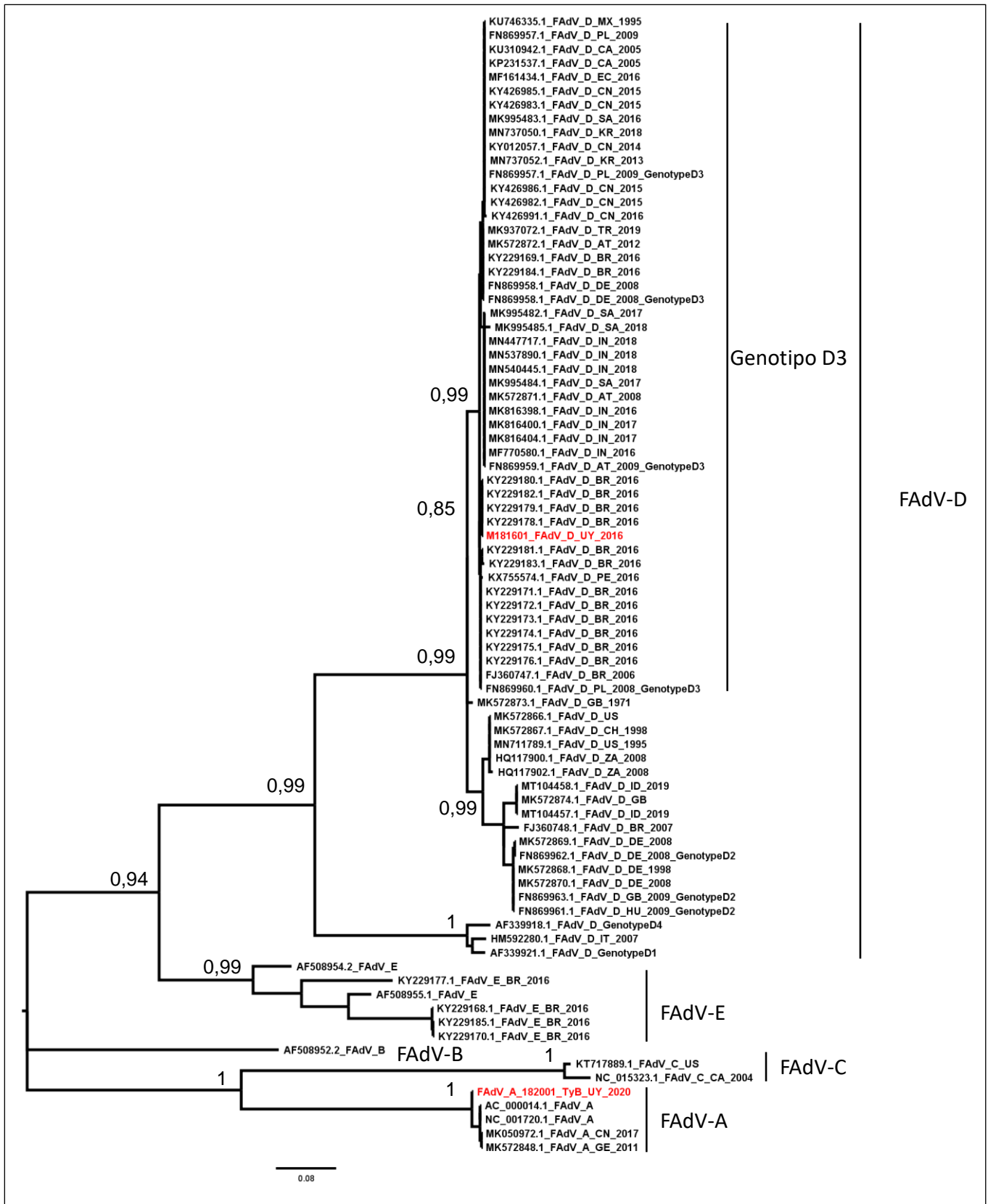


Figura 17. Filogenia de máxima verosimilitud basada en una región de 600 nt del gen Hexón de Fowl aviadenovirus. En total se utilizaron 82 secuencias, y el modelo de sustitución que más se ajustó a los datos fue TN93+G+I. En rojo se indican las muestras obtenidas en este trabajo.

*Tabla 9. Divergencia genética promedio a nivel nucleotídico inter e intra – especie para las distintas cepas de Fowl Aviadenovirus analizadas en este trabajo.*

	Inter – especie (%)					Intra – Especie (%)
	FAdV-A	FAdV-B	FAdV-C	FAdV-D	FAdV-E	
FAdV-A	-					0,4
FAdV-B	35	-				-
FAdV-C	31	35	-			4,1
FAdV-D	37	32	38	-		4,2
FAdV-E	35	32	36	30	-	12,4

### 5.5.2 Anelloviridae

Se obtuvo la secuencia consenso del genoma completo de cuatro especies de virus pertenecientes al género Gyrovirus: CAV, AvGyV2, GyV3 y GyV4 (Tabla 7). Estas cuatro especies fueron identificadas en las dos matrices analizadas provenientes de la muestra de fenotipo enfermo 361501 (bursa y tráquea). A su vez, dos de estas especies (CAV y AvGyV2) fueron identificadas en la segunda muestra de fenotipo enfermo, 181601 (Tabla 7). Por su parte la especie AvGyV2 fue detectada en una de las muestras de fenotipo sano (182001/TB).

Estos genomas fueron anotados, identificando los distintos ORFs previamente descritos para cada uno de los genomas. Para los casos de CAV, AvGyV2 y GyV3, esto consiste en la presencia de 3 ORFs solapantes correspondientes a los genes VP1, VP2 y VP3; mientras que para GyV4 el genoma presenta únicamente dos ORFs, denominados VP1 y VP2. Además de estas regiones codificantes, fue posible realizar la anotación de las distintas regiones reguladoras que presentan dichos genomas (Figura 18).

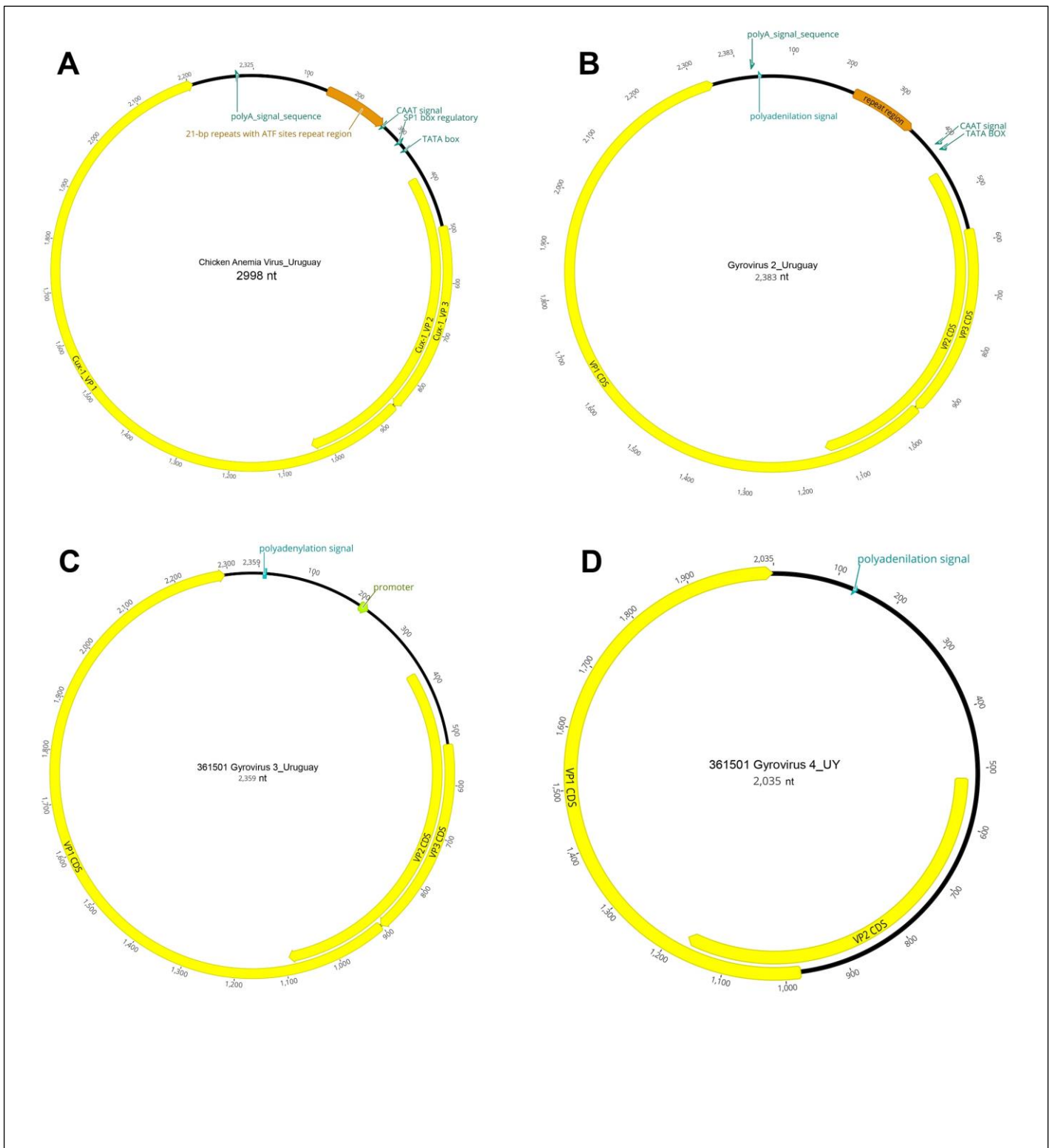


Figura 18. Estructura de los Genomas completos anotados de las especies pertenecientes al género Gyrovirus obtenidos en este trabajo. Las flechas amarillas representan los distintos ORFs, mientras que las flechas naranjas representan regiones repetidas y las restantes regiones reguladoras (promotores, caja TATA, señales de poliadenilación).

## CAV

Los dos genomas completos de CAV obtenidos para la muestra 361501 (a partir de ambas matrices, bursa y tráquea) presentan una distancia genética nucleotídica (*p-distance*) de 0,002. En cuanto a la región codificante del genoma (1823 nt, la cual comprende los tres ORFs), estas dos secuencias poseen una distancia genética de 0,001. Se compararon estas secuencias con la obtenida mediante secuenciación Sanger en el marco de la tesis de maestría de Techera 2019, correspondiente a la región codificante del genoma de CAV obtenida a partir de bursa de 361501. Se encontró que ambas secuencias provenientes de bursa (Techera 2019 y la obtenida en este trabajo) son 100% idénticas.

Por su parte, en comparación con el genoma de CAV obtenido para la muestra 181601, las regiones codificantes de los genomas de 361501 presentan una distancia genética de 0,036 y 0,037 (con tráquea y bursa, respectivamente).

Se realizó un análisis filogenético utilizando las regiones codificantes de los genomas obtenidos en este trabajo, secuencias obtenidas previamente por nuestro laboratorio, y secuencias obtenidas de la base de datos *GenBank*. La filogenia muestra las cepas de CAV agrupadas en cuatro clados claramente diferenciados, con altos valores de soporte estadístico (Figura 19). Estos clados coinciden con los identificados previamente por Techera et al. 2021, denominados del I al IV. Las secuencias de 361501 se encuentran en el llamado Clado III junto con cepas de Asia y vacunales, mientras que la secuencia de 181601 se localiza en el denominado clado II, agrupada con otras cepas uruguayas.

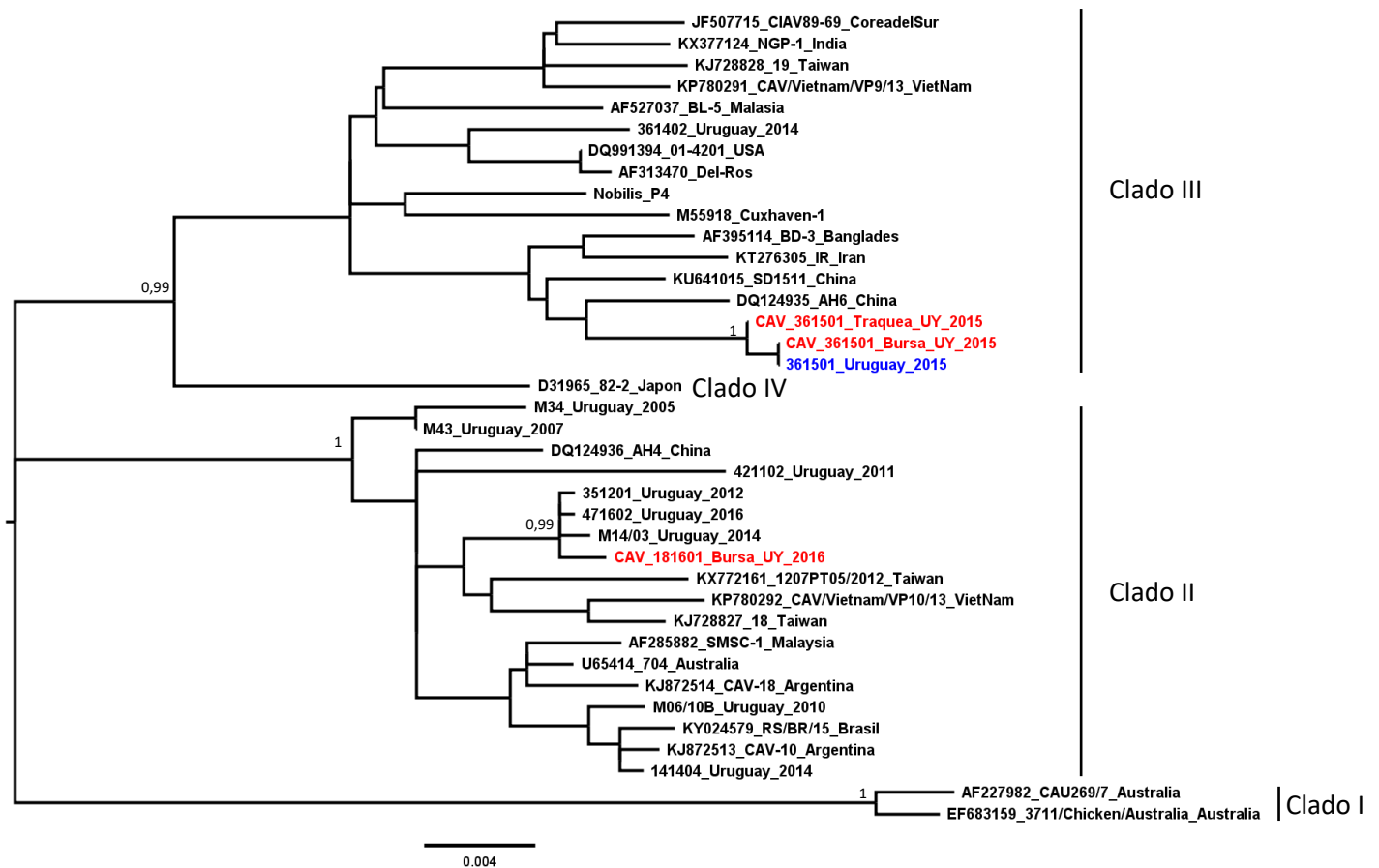


Figura 19. Filogenia de máxima verosimilitud basada en 37 secuencias de la región codificante (1823 nt) del genoma de CAV. El modelo de sustitución que más se ajustó a los datos fue GTR+G+I. En rojo se indican las muestras obtenidas en este trabajo y en azul la secuencia obtenida previamente por Techera (2019) para 361501 de bursa.

## Gyrovirus Aviar 2

Los genomas completos obtenidos para AvGyV2 en las matrices de tráquea y bursa de la muestra 361501 presentan un 100% de identidad nucleotídica. Al compararse con el genoma obtenido para la muestra 181601/Bursa de fenotipo enfermo se observó una distancia genética (*p-distance*) de 0,001 a nivel nucleotídico, mientras que con la muestra de fenotipo sano 182001/TB mantiene una distancia genética de 0,018.

En lo que respecta a la región codificante del genoma de AvGyV2, los genomas obtenidos a partir de las muestras de fenotipo enfermo 361501 y 181601/Bursa presentan una única diferencia, a nivel de la posición 916 correspondiente a la región codificante de la proteína VP3 (cambio de Lysina por Arginina).

En comparación con el genoma obtenido a partir de la muestra de fenotipo sano 182001/TB, las regiones codificantes presentan un total de 33 polimorfismos de nucleótido único (SNPs): 21 en el ORF de VP1 y 12 en el ORF de VP2 (6 de los cuales se encuentran a su vez en la región perteneciente al ORF de VP3, producto de estar solapados). Esto se ve reflejado a nivel proteico en una diferencia de 18 aminoácidos (6 en VP1, 6 en VP2 y 6 en VP3) (Tabla 10).

*Tabla 10. Diferencias a nivel aminoacídico entre los genomas de AvGyV2 obtenidos a partir de muestras de aves fenotipo enfermo y sano.*

<b>Proteína</b>	<b>Posición en el ORF</b>	<b>Muestras fenotipo enfermo</b>	<b>Muestra fenotipo sano 182001</b>
VP1	154	Ser	Ala
	270	Ala	Ser
	310	Gln	Glu
	383	Gln	Pro
	401	Met	Val
	416	Ile	Leu
VP2	14	Thr	Asp
	22	Ser	Leu
	23	Ala	Pro
	25	Ser	Arg
	26	Arg	Gln
	30	Pro	Leu
VP3	54	Tyr	Ser
	65	Ala	Val
	69	Asp	Ala
	71	Gly	Glu
	79	Ala	Val
	81	Ser	Leu

### **Gyrovirus 3**

Al comparar las secuencias consenso de los genomas completos de GyV3 obtenidos para bursa y tráquea de la muestra 361501 se observó un 98.8% de identidad nucleotídica. A nivel del ORF de la proteína VP1, estos genomas presentan 13 SNPs, todos ellos cambios sinónimos.

Para el caso de la proteína VP2 se identificaron nueve sustituciones nucleotídicas, involucradas en el cambio de cinco aminoácidos. A su vez, tres de estos nueve SNPs

detectados en el ORF de la proteína VP2 se encuentran al mismo tiempo dentro del ORF que codifica para la proteína VP3 (contenido dentro del ORF de VP2, y en distinto marco de lectura). A nivel aminoacídico, estos SNPs resultan en el cambio de dos residuos de la proteína VP3 (Tabla 11).

*Tabla 11. Diferencias a nivel aminoacídico entre los genomas de GyV3 obtenidos a partir de tráquea y bursa para la muestra de fenotipo enfermo 361501*

Proteína	Posición en el ORF	Muestra de bursa	Muestra de tráquea
VP2	41	Lys	Thr
	86	Gln	Asp
	132	Ser	Phe
	194	Gly	Glu
	234	Ile	Thr
VP3	36	Lys	Ile
	82	Pro	Ser

#### Gyrovirus 4

Los genomas completos de GyV4 obtenidos en las matrices de bursa y tráquea de la muestra 361501 presentan una identidad nucleotídica de 99.9%. La secuencia nucleotídica del gen VP2 es idéntica para ambos genomas, mientras que para VP1 presentan una única diferencia. La misma produce un cambio de aminoácido en la posición 137 de la proteína, en la cual la muestra de bursa presenta una Valina (codón GTT) mientras que la muestra de tráquea presenta una Isoleucina (codón ATT).

#### Análisis filogenéticos

Para llevar a cabo las inferencias filogenéticas, se tomaron las secuencias correspondientes a los genes VP1 de todas las especies pertenecientes al género Gyrovirus obtenidas en este trabajo, y secuencias representativas de cada una de las cuatro especies obtenidas del *GenBank*. La filogenia permitió diferenciar estas especies claramente agrupadas en clados separados, con altos valores de soporte estadístico. Para el caso de CAV, pudieron observarse los dos clados previamente descritos en el análisis de la región codificante del genoma, con la misma disposición de las secuencias obtenidas en este trabajo. Las cepas de AvGyV2 de Uruguay agrupan en un sub-clado junto con secuencias provenientes de Brasil y de China, al igual que las cepas obtenidas para GyV4. Por su parte las secuencias de GyV3 agrupan con cepas provenientes de China, Brasil y Chile (Figura 20).



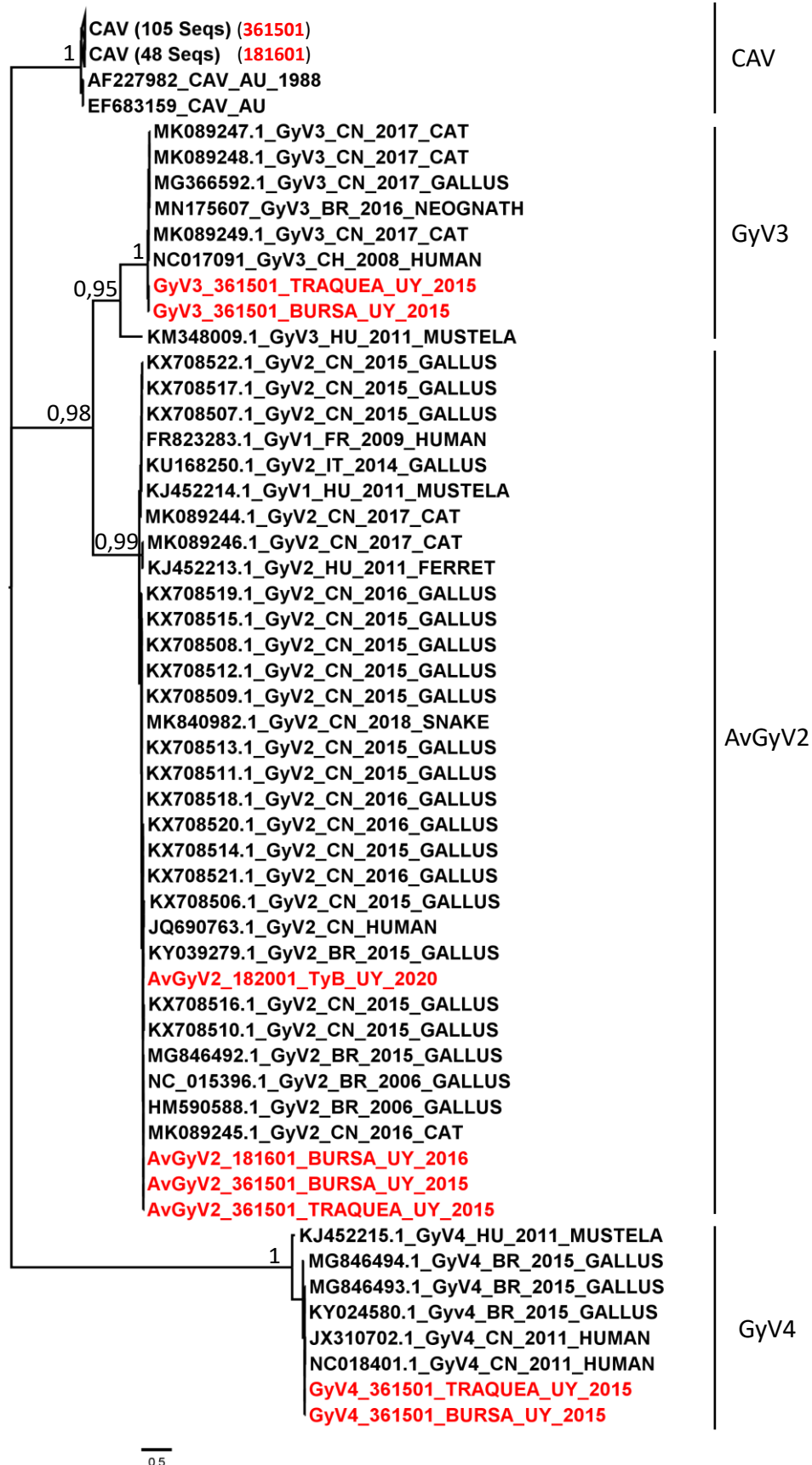


Figura 20. Filogenia de máxima verosimilitud basada en 206 secuencias correspondientes al gen VP1 del genoma de Gyrovirus. El modelo de sustitución que más se ajustó a los datos fue GTR+G+I. En rojo se indican las muestras obtenidas en este trabajo.

Las secuencias del gen VP1 de las distintas especies del género Gyrovirus analizadas en este trabajo fueron empleadas para el cálculo de la divergencia genética promedio a nivel nucleotídico inter e intra-especies (Tabla 13).

*Tabla 12. Divergencia nucleotídica inter e intra -especie basada en la secuencia del gen VP1 de las especies del Género Gyrovirus analizadas en este trabajo.*

Divergencia nucleotídica	Inter – especies (%)				Intra – especies (%)
	CAV	AvGyV2	GyV3	GyV4	
CAV	-				3,1
AvGyV2	42,2	-			2,9
GyV3	43,1	34,1	-		6,8
GyV4	51,2	52,5	55,3	-	4,5

### 5.5.3 Birnaviridae

El virus de la enfermedad infecciosa de la bursa fue detectado en una matriz proveniente de aves de fenotipo enfermo (361501/Bursa) y otra de aves con fenotipo sano (182002/TB).

Para el caso de la muestra de fenotipo enfermo no fue posible obtener una secuencia consenso para realizar una caracterización genética debido a la baja cantidad de *reads* que mapearon en el genoma (36 *reads* en el segmento A y 22 en el segmento B) (Tabla 5).

Por su parte para la muestra de fenotipo sano 182002/TB fue posible obtener la secuencia correspondiente a la región hipervariable del gen VP2 (ubicado en el segmento A del genoma), la cual es ampliamente utilizada para la caracterización de cepas de IBDV. Una región de 381 nucleótidos de esta región fue empleada para la construcción de una filogenia junto con secuencias obtenidas de la base de datos *GenBank*. Dicho análisis agrupa las secuencias de IBDV según los distintos genogrupos establecidos actualmente (Figura 21). La secuencia obtenida para la muestra 182002/TB se agrupa dentro del clado correspondiente a las cepas pertenecientes al Genogrupo 1, particularmente formando un sub-clado con otra secuencia de Uruguay y una de USA. Estas últimas dos secuencias son 100% idénticas entre sí y presentan 2 SNPs con respecto a la secuencia descrita para 182002/TB. Uno de ellos corresponde a un cambio no sinónimo (TAC por AAC,

Tirosina por Asparagina) en el aminoácido correspondiente a la posición 220 de la proteína VP2.

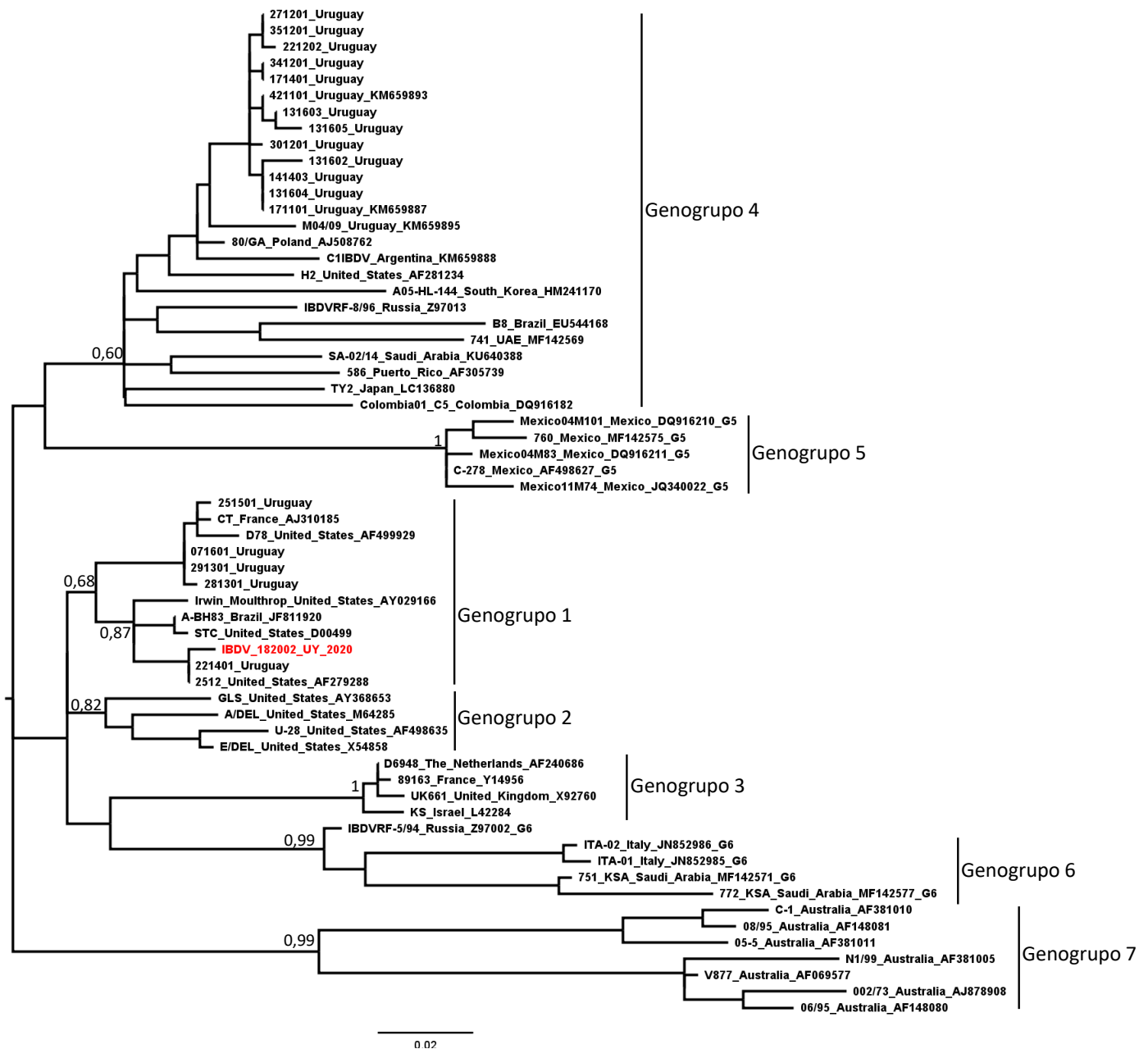


Figura 21. Filogenia de máxima verosimilitud basada en una región de 381 nucleótidos pertenecientes a la región hipervariable del gen VP2 de 70 secuencias de IBDV. El modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustó al conjunto de datos fue GTR+G+I. En rojo se muestra la secuencia de 182002 obtenida en este trabajo

Si bien para la realización del análisis filogenético no se emplearon secuencias pertenecientes a vacunas, existe conocimiento acerca de que las cepas utilizadas en las mismas corresponden al Genogrupo 1 (Michel and Jackwood 2017). La comparación de la secuencia de la región hipervariable obtenida para la muestra

182002/TB con cepas vacunales obtenidas de la base de datos *GenBank* permitió detectar que la misma es idéntica a la cepa utilizada en dos vacunas: Bursaplex y Cevac-IBD-L (números de acceso AJ586967 y EU544157, respectivamente).

#### 5.5.4 *Caliciviridae*

El *contig* obtenido por ensamblaje *de novo* para la familia *Caliciviridae*, presente en los datos de la muestra de fenotipo sano 182001/TB, presentó un largo de 2398 nt y fue posible identificarlo como perteneciente a la especie Chicken Calicivirus.

De esta secuencia se tomó una región de 830 nucleótidos correspondiente a un fragmento de la poliproteína del genoma de esta especie (particularmente a la RNA polimerasa dependiente de RNA) para la realización de análisis filogenéticos, junto con secuencias obtenidas de *GenBank*. El análisis permitió diferenciar las cepas de Chicken Calicivirus en cuatro clados que pueden clasificarse siguiendo un patrón geográfico, con cuatro países: Alemania, USA, Corea del Sur y Brasil. La secuencia obtenida para 182001/TB se ubica como externa al clado formado por dos secuencias de USA (Figura 22).

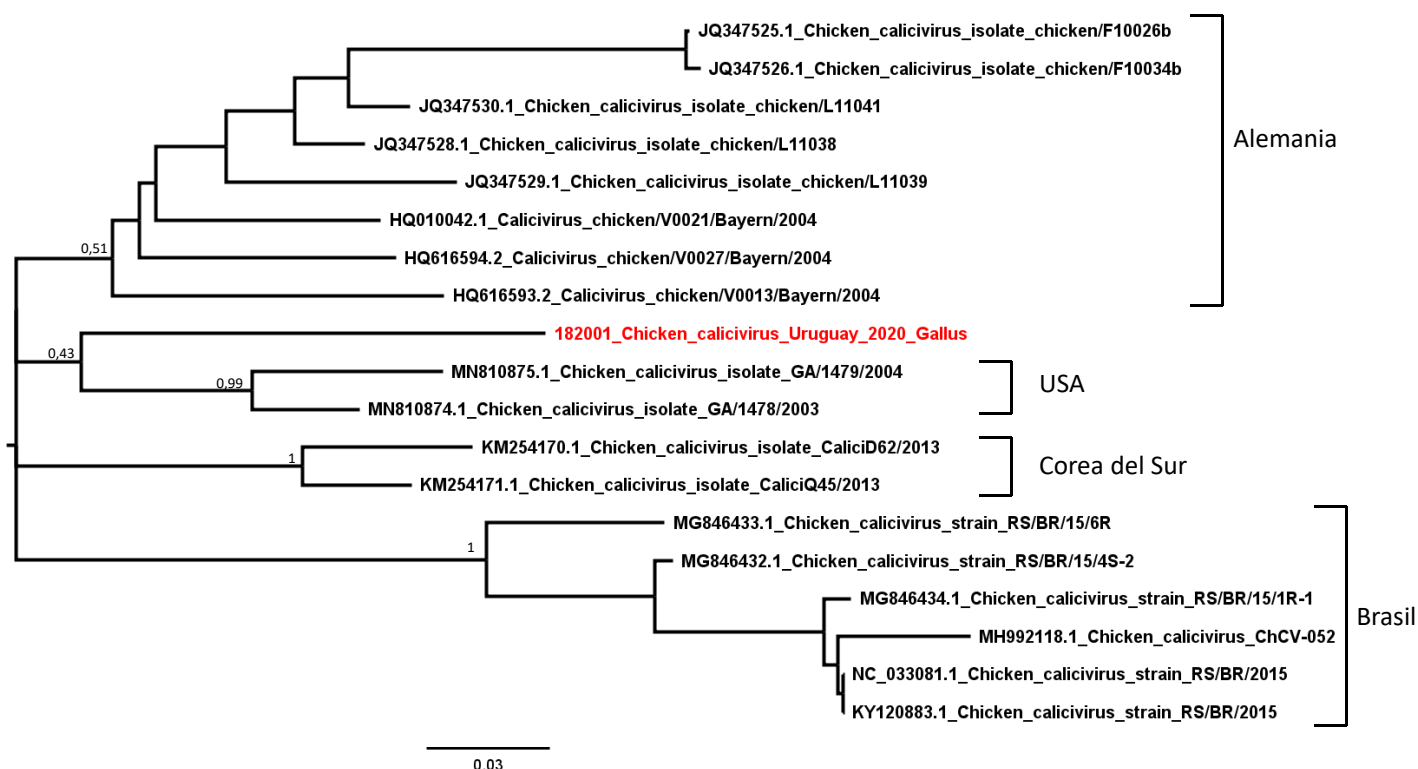


Figura 22. Filogenia de máxima verosimilitud basada en una región parcial (830 nt) de la poliproteína de 19 cepas de Chicken Calicivirus. El modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustó a los datos fue GTR+G. En rojo se muestra la secuencia obtenida para la muestra de fenotipo sano 182001.

### 5.5.5 Coronaviridae

El genoma de IBV fue detectado en todas las matrices analizadas provenientes de aves con fenotipo enfermo. Para la muestra 361501 se pudo obtener un 88,8% del genoma en la matriz de bursa y el genoma completo en la matriz de tráquea, mientras que para la muestra 181601/Bursa los *reads* abarcaron un 94,0% del genoma (Figura 23).



Figura 23. Genomas de IBV ensamblados en el presente trabajo. a) esquema de la estructura del genoma completo anotado donde se señalan los distintos ORFs identificados. b) Gráficos de cobertura (en escala logarítmica) de los tres ensamblados realizados para las matrices donde IBV fue detectado.

Para analizar la variabilidad genética de las distintas cepas, se utilizó la secuencia nucleotídica codificante de la región S1 de la Glicoproteína de Superficie del genoma de IBV. Además, para el análisis de la muestra 361501 se contó con la secuencia de S1 de IBV obtenida previamente en el marco de la tesis doctoral de Marandino 2017, la cual fue obtenida mediante un abordaje de purificación, distinto al planteado en este trabajo (Marandino et al. 2017). Mientras que las secuencias obtenidas en este trabajo a partir de ambas matrices de la muestra 361501 (tráquea y bursa) son idénticas a nivel nucleotídico en esta región del genoma de IBV, las mismas presentan una diferencia de dos nucleótidos con la obtenida por Marandino. Estos SNPs corresponden ambos a cambios de aminoácido, en las posiciones 94 (Ala en Marandino et al. 2017 y Val en tráquea y bursa) y 382 (Asn en Marandino 2017 y Tyr en tráquea y bursa) de esta proteína.

La región S1 fue utilizada para analizar las relaciones filogenéticas entre las secuencias obtenidas en este trabajo, la secuencia previamente obtenida para 361501, y un total de 52 secuencias provenientes de la región y el mundo, representativas de las distintas variantes de IBV identificadas (Figura 24). La filogenia agrupa las secuencias obtenidas en este trabajo y la obtenida por Marandino 2017 en un mismo clado y junto con otras secuencias uruguayas, con un alto soporte estadístico.

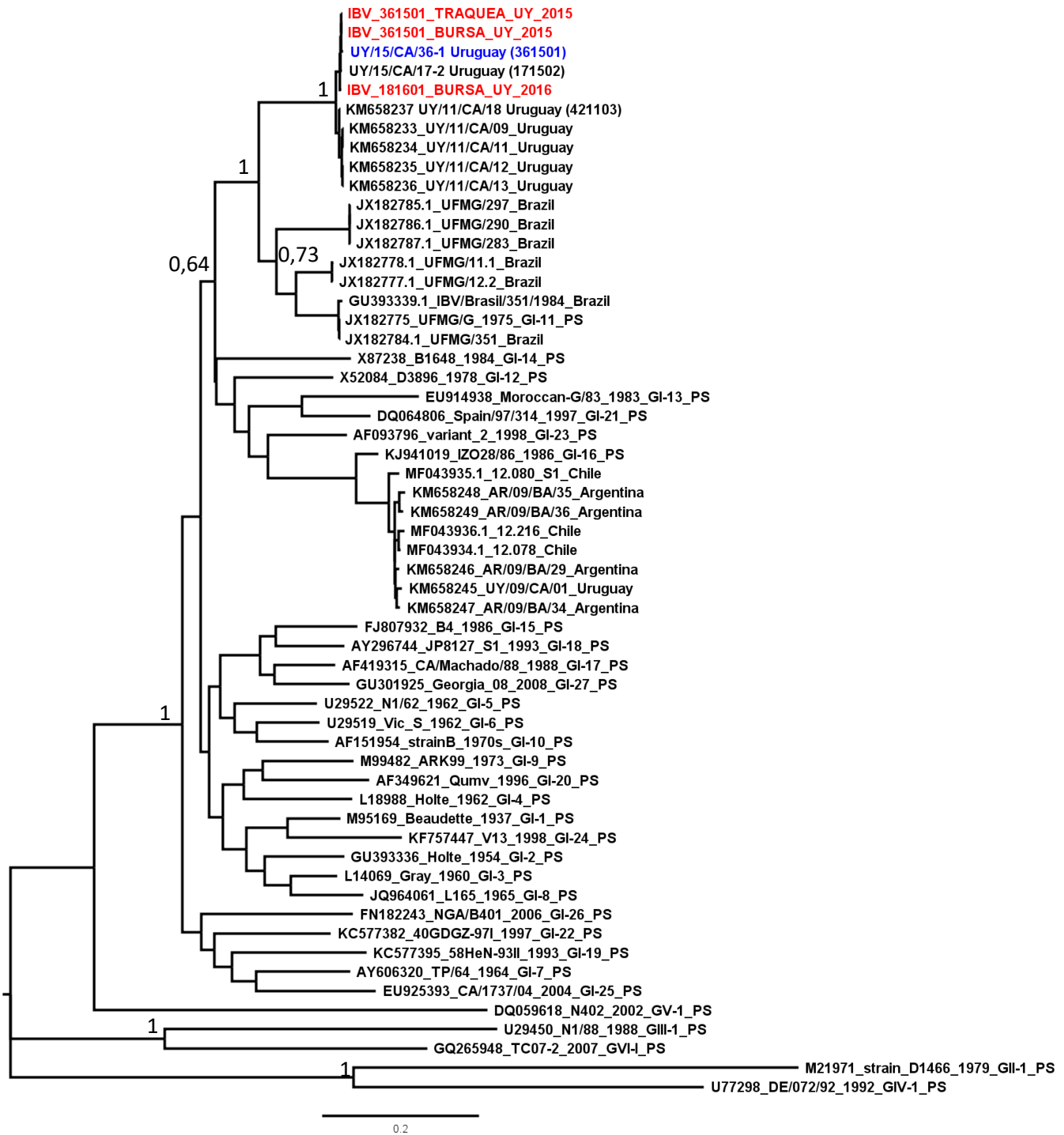


Figura 24. Filogenia de máxima verosimilitud basada en la secuencia nucleotídica codificante de la región S1 del genoma de IBV. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó al conjunto de datos fue el GTR+G+I. En rojo se señalan las secuencias obtenidas en este trabajo, mientras que en azul la secuencia de 361501 obtenida por Marandino 2017.

### 5.5.6 *Genomoviridae*

Mediante el análisis de los *contigs* obtenidos en el ensamblaje *de novo*, fue posible obtener los genomas completos de dos especies pertenecientes a la familia *Genomoviridae*, para las muestras de fenotipo sano 182001 y 182002 (2196 nt y 2180 nt respectivamente). Los genomas fueron anotados pudiendo identificar los genes de las dos proteínas que componen el genoma: la proteína de la cápside (CP) y la proteína asociada a la replicación (Rep).

Para la caracterización genética se utilizó la secuencia aminoacídica del gen de la proteína de la cápside, compuesto por 310 aminoácidos. En base a este gen, las secuencias uruguayas presentaron un 78% de identidad aminoacídica. La realización de análisis filogenéticos se llevó a cabo con secuencias obtenidas de la base de datos *GenBank*. En dicho análisis, las cepas de Chicken Genomovirus se agrupan en dos principales clados, con alto soporte estadístico (Figura 25). Las cepas uruguayas agrupan en uno de ellos, particularmente en un sub clado junto con otras secuencias provenientes de Estados Unidos.



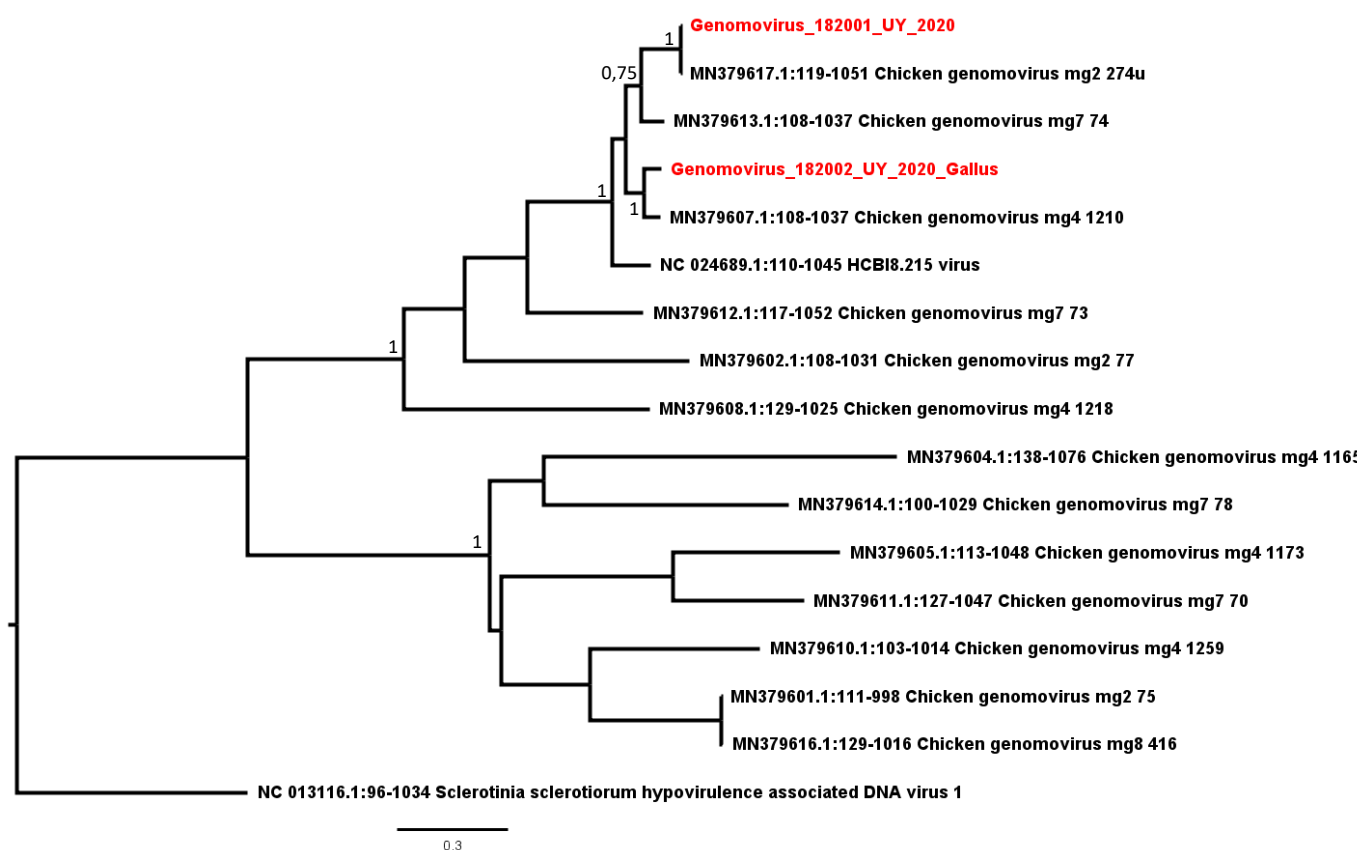


Figura 25. Filogenia de máxima verosimilitud basada en la secuencia aminoacídica del gen de la proteína de la cápside de Chicken Genomovirus. El modelo de sustitución que mejor se ajustó a los datos analizados fue LG+G+I. En rojo se indican las secuencias obtenidas en el presente trabajo. Los números corresponden a los valores de Bootstrap.

### 5.5.7 Parvoviridae

El genoma de parvovirus de pollo fue detectado en la muestra de fenotipo sano 182001/TB. Tras el ensamblado con genoma de referencia fue posible obtener la secuencia consenso correspondiente a 3633 nt de los 4615 que conforman la región codificante del genoma de este virus (Figura 26). La misma fue empleada para la realización de un análisis filogenético, junto con secuencias obtenidas de la base de datos *GenBank* (Figura 27). La filogenia agrupa la secuencia uruguaya obtenida en este trabajo en un clado junto con cuatro secuencias provenientes de Brasil. El porcentaje de identidad nucleotídica de la secuencia uruguaya con las restantes del clado va desde 96% (Isolate RS/BR/15/4R) hasta 96,9% (con la cepa Isolate IPV).

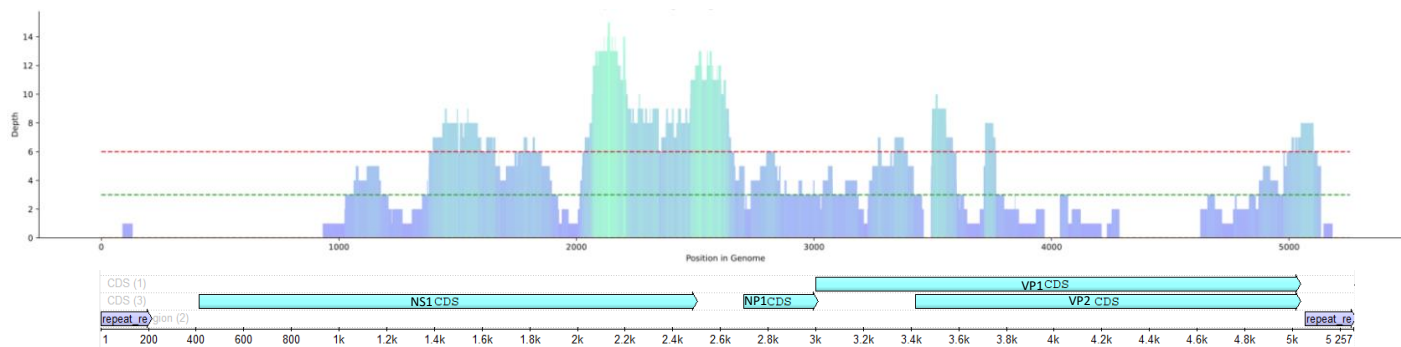


Figura 26. Arriba: gráfico de cobertura del ensamblado realizado con el genoma de Chicken Parvovirus como referencia para la muestra 182001/TB. Abajo: estructura del genoma utilizado como referencia, señalando los distintos ORFs (flechas celestes) y las regiones repetidas (flechas grises).

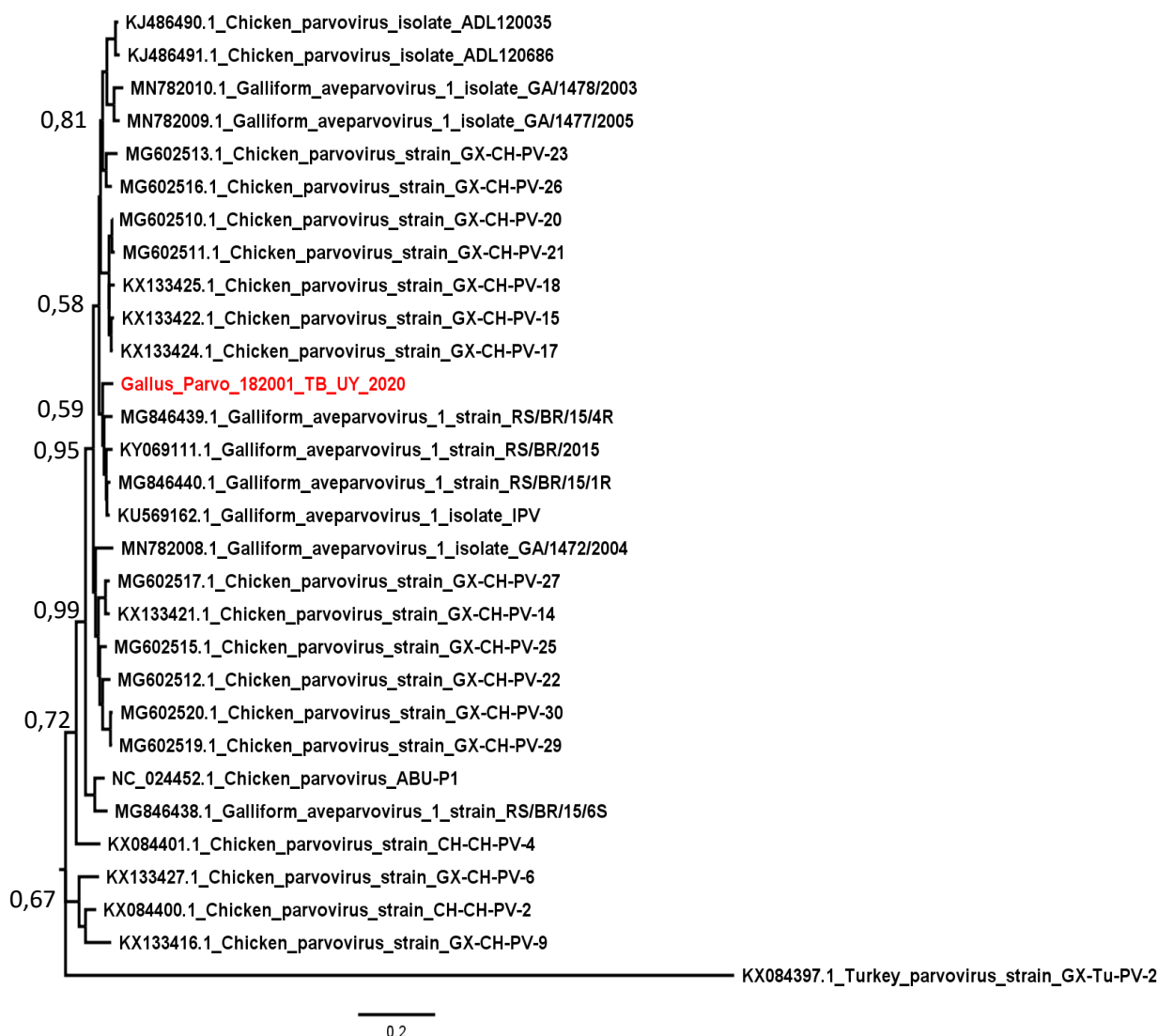
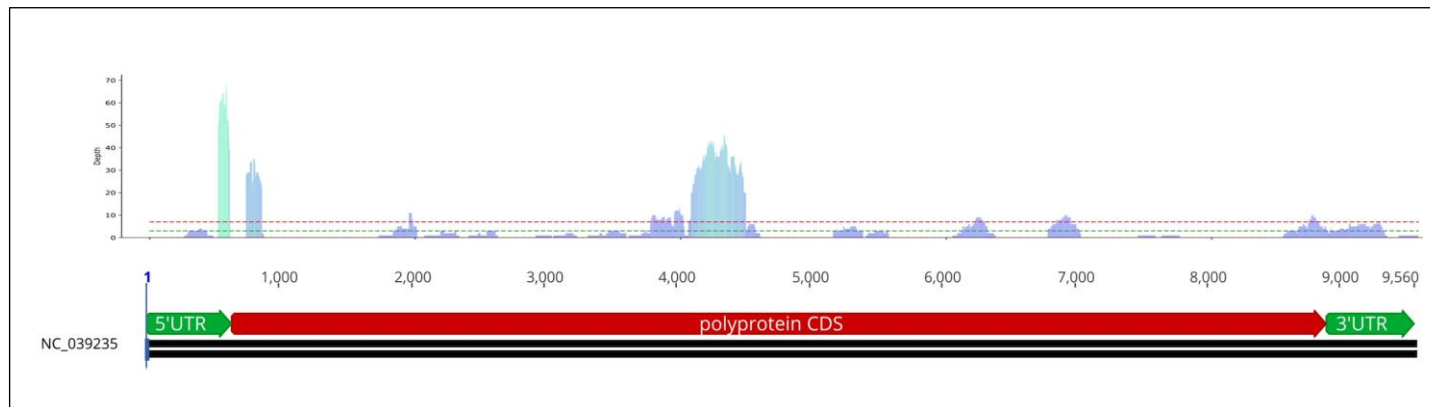


Figura 27. Filogenia de máxima verosimilitud basada en 3633 nucleótidos de la región codificante del genoma de Parvovirus de Pollo. El modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustó a los datos fue GTR+G+I. En rojo se muestra la secuencia obtenida en este trabajo.

### 5.5.8 Picornaviridae

En la muestra 181601/Bursa de fenotipo enfermo fue detectado el genoma de la especie viral Chicken Megrivirus. El ensamblado realizado con un genoma de referencia permitió identificar *reads* que alinean en diversas regiones a lo largo del mismo (Figura 28). Para la caracterización genética de la cepa detectada, se pudo tomar una secuencia consenso de 540 nt correspondiente a una región de la poliproteína del genoma de este picornavirus. Más específicamente, esta secuencia pertenece a la región P2 de la poliproteína, la cual codifica para proteínas no estructurales. Dicha secuencia fue utilizada para realizar un análisis filogenético, junto con otras cepas de Chicken Megrivirus, y especies cercanamente relacionadas como el virus de la hepatitis del pavo (también perteneciente al género Megrivirus) y los denominados Chicken Picornavirus 4 y 5. El resultado del análisis ubicó a la cepa uruguaya como basal en un clado conformado por cepas de Chicken Megrivirus provenientes de Hungría, Irán y Brasil con alto soporte estadístico (Figura 29).



**Figura 28.** Arriba: gráfico de cobertura del ensamblado realizado con el genoma de Chicken Megrivirus como referencia para la muestra 181601/B. Abajo: estructura del genoma utilizado como referencia. En rojo se señala la región codificante para la poliproteína, y en verde las regiones no codificantes 5' y 3'.

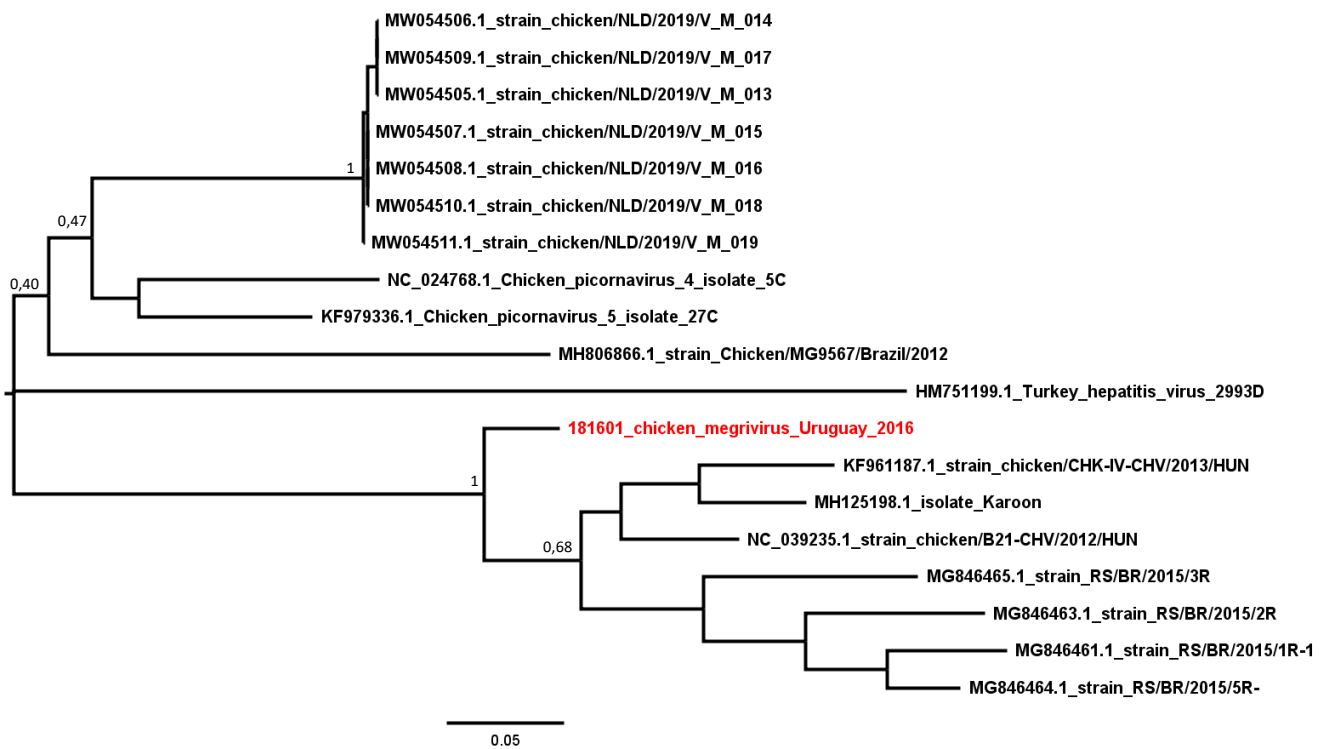


Figura 29. Filogenia de máxima verosimilitud basada en una región de 540 nt de la poliproteína de picornavirus. El modelo que mejor se ajustó a los datos fue HKY+G. En rojo se muestra la secuencia de chicken megrivirus obtenida en este trabajo para la muestra 181601.

## 6 Discusión

El análisis de las comunidades de microorganismos (virus y bacterias) presentes en una muestra determinada es un tema de estudio que ha cobrado gran relevancia durante las últimas décadas. El conocimiento acerca de su gran abundancia, las interacciones entre ellos y con su entorno, y su repercusión a niveles de mayor escala (ciclos biogeoquímicos, redes metabólicas, complejidad de enfermedades) han despertado el interés de grupos de investigación de todo el mundo en caracterizar detalladamente las comunidades que estos microorganismos conforman.

Particularmente, los patógenos virales resultan de gran importancia tanto para la salud humana como animal, estando ambas estrechamente vinculadas debido al potencial zoonótico de los virus. A su vez, estos microorganismos son responsables de grandes pérdidas económicas en el ámbito de la producción animal, donde la implementación de la cría intensiva promueve indefectiblemente la aparición y diseminación de enfermedades infecciosas. Basada en la práctica de este tipo de crianza, la cual permite generar altísimos niveles de producción ocupando mínimos espacios físicos, la industria avícola ha experimentado un crecimiento constante a nivel mundial en los últimos años (USDA 2021). El estudio de los patógenos virales que circulan en las aves de corral resulta de vital importancia para obtener niveles adecuados de producción.

El desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva y de distintos flujos de trabajo para el análisis bioinformático de los datos obtenidos, han permitido que el área de la metagenómica se encuentre en constante crecimiento desde sus comienzos a principios del siglo XXI. La implementación de este tipo de análisis ha significado un gran avance para la comprensión de las comunidades de microorganismos, debido a su potencial para poder obtener información acerca del material genético presente en prácticamente cualquier tipo de muestra, sea ambiental o asociada a macroorganismos.

El procesamiento de muestras para la realización de abordajes metagenómicos, y en particular para el análisis de los viomas, requiere de la implementación de métodos de enriquecimiento de partículas virales, cuya complejidad y eficiencia está

estrictamente relacionada con el tipo de muestra analizada. Diversos trabajos han comparado y evaluado distintos métodos de enriquecimiento de partículas virales, resaltando la necesidad de métodos validados y estandarizados para la aplicación de este tipo de abordajes (Vega-Thurber et al. 2009; Hall et al. 2014; Lewandowska et al. 2017).

Si bien las aves de corral han sido objeto de estudio para la implementación de análisis metagenómicos a partir de distintas matrices, son pocos los trabajos realizados hasta la fecha, y particularmente existe muy poca información acerca de las comunidades virales presentes en muestras de tejido de estos animales (De la Torre et al. 2018; Devaney et al. 2016; Sajani et al. 2018).

### **Evaluación y optimización de un protocolo de enriquecimiento de partículas virales**

En el presente trabajo se implementó un protocolo de enriquecimiento de partículas virales y se realizó el seguimiento de los distintos pasos del mismo mediante técnicas moleculares (qPCR) en una muestra correspondiente a bursa de Fabricius (órgano linfóide primario de las aves) proveniente de un galpón de aves con sintomatología respiratoria e inmunodepresión. La matriz seleccionada para este proceso resulta ideal para la evaluación y puesta a punto del protocolo, debido a haber sido previamente caracterizada como co-infectante para tres virus con distintas características tanto morfológicas (envueltos y no envueltos), como con respecto a la composición y longitud de su genoma, como son CAV (ssDNA, 2,3 kb), IBV (ssRNA, 27 kb) e IBDV (dsRNA bi-segmentado, 3,1 y 2,7 kb).

El protocolo implementado consiste en cuatro principales pasos: homogeneizado en buffer, filtrado con filtros de 0,45  $\mu\text{m}$ , digestión con nucleasas y remoción del RNA ribosomal (este último aplicado para las muestras de RNA). Para el seguimiento de este protocolo, se calcularon los valores de enriquecimiento ( $r$ ) que establecen una relación entre los distintos genomas virales y el genoma del hospedero. Este último mediante la detección de dos genes (18S ribosomal y  $\beta$ -actina) de expresión constitutiva, y que son idóneos desde que presentan características distintas en cuanto al número de copias en el genoma (múltiples copias para 18S y copia única para  $\beta$ -actina). Por esta razón la elección de los mismos es de gran importancia para

las comparaciones realizadas con los distintos genomas virales, y posterior puesta a punto del protocolo implementado.

La comparación de los valores  $r$  obtenidos para los pasos de homogeneizado y filtrado permitió verificar la eficiencia del protocolo, observándose una disminución de la relación genoma del hospedero/genoma viral para todos los casos analizados (figuras 7, 8 y 9). Estos resultados cercioran la utilidad de este tipo de filtros en protocolos de enriquecimiento de partículas virales, los cuales han sido previamente utilizados en protocolos similares aplicados a muestras de tejido de pollos (Day et al. 2015; Kim et al. 2015; Devaney et al. 2016). Algunos de estos trabajos utilizan estos filtros en combinación con otros de distinto tamaño de poro, como  $0,8 \mu\text{m}$  y  $0,22 \mu\text{m}$ . Si bien estos últimos han demostrado ser eficientes a la hora de disminuir la presencia de material genético proveniente del hospedero y de otros microorganismos como bacterias, estudios realizados en muestras de materia fecal humana han logrado demostrar que el uso de filtros de  $0,22 \mu\text{m}$  disminuye a la mitad la cantidad de DNA viral obtenido en comparación con el uso de filtros de  $0,45 \mu\text{m}$ , posiblemente debido a la presencia de virus de tamaño superior al de los poros (Lewandowska et al. 2017).

El siguiente paso del protocolo, la digestión con nucleasas, tuvo un efecto distinto en los valores de enriquecimiento para las comparaciones con los genes 18S y  $\beta$ -actina. Mientras que para la relación con el gen 18S se vio una disminución del valor (indicando que aumentó la presencia de los genomas virales), para la comparación con el gen de  $\beta$ -actina se observó un incremento o bien ningún cambio (indicando que la presencia de los genomas virales disminuyó/no se alteró en relación con este gen). Uno de los motivos posibles de esta discordancia entre uno u otro gen del hospedero, puede ser debido a que todos los ensayos de qPCR fueron realizados a partir de cDNA. Por este motivo los resultados observados son producto de la amplificación tanto de los genes analizados como sus correspondientes transcritos. En este sentido es coherente observar un efecto más notorio en las comparaciones con el gen 18S, debido a la abundancia de rRNA presente en las células del hospedero. A su vez las diferencias que los virus presentan en cuanto a sus ciclos de replicación pueden llevar a diferencias en los niveles de expresión de algunos genes. Estos factores, en conjunto con la acción de las distintas nucleasas podrían estar generando las variaciones observadas en los valores de enriquecimiento.

Finalmente, el paso de remoción del rRNA permitió obtener la mayor disminución del valor *r* en todas las comparaciones realizadas, llevando este parámetro a valores cercanos o menores a 1 (figuras 8 y 9). Esto confirma la gran abundancia de rRNA presente en las muestras analizadas. Si bien el kit implementado está validado para eliminar el rRNA perteneciente a humanos, ratas y ratones, los resultados obtenidos muestran que las sondas utilizadas por el mismo resultan también eficientes para la remoción del rRNA proveniente del genoma de pollo. Sin embargo, la baja concentración de cDNA doble hebra obtenido posteriormente (no detectable mediante fluorómetro Qubit) hizo que no pudiera ser utilizado para la preparación de bibliotecas con el kit seleccionado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos anteriores, donde se ha tenido que aumentar la cantidad de RNA de partida (*input*) con respecto a la recomendada por los fabricantes de determinados kits de este tipo, con el fin de obtener cantidades detectables de material genético (Manso, Bibby, and Mbisa 2017). En el presente trabajo, incluso luego de la implementación de un paso de amplificación de los ácidos nucleicos, tampoco se obtuvieron cantidades detectables de material genético, teniendo que descartar este paso del protocolo de enriquecimiento, a pesar de su eficiencia.

No se puede descartar que, además de la baja cantidad de material de partida, el mismo no presente una buena calidad. El kit de amplificación por MDA empleado en este trabajo especifica que las amplificaciones presentan mayor eficiencia si se parte de fragmentos de longitud mayor a 1kb. Por el contrario, la implementación del kit de amplificación por MDA a partir del material genético obtenido luego del paso de digestión con nucleasas (sin remoción del rRNA) permitió obtener la cantidad de DNA/cDNA suficiente para la construcción de bibliotecas y posterior secuenciación.

Tras el seguimiento por qPCR de los distintos pasos del protocolo de enriquecimiento de partículas virales, la secuenciación masiva del material genético presente en la matriz analizada permitió evaluar la presencia del hospedero y de los tres virus previamente identificados en la misma.

Los datos de secuenciación obtenidos mostraron una significativa diferencia en cuanto a la cantidad de *reads* obtenidos correspondientes al genoma del hospedero en las matrices de DNA y RNA (54,9% y 98,4% de las lecturas consideradas de buena calidad, respectivamente) (Tabla 4). Esta diferencia puede estar reflejando la abundancia de transcritos de RNA mensajero (mRNA) y de rRNA correspondientes



al hospedero, siendo más predominante en matrices de RNA que de DNA. Cantidades de *reads* pertenecientes al genoma del hospedero superiores al 90% en muestras biológicas son habitualmente reportadas (Yang et al. 2011).

Finalmente, la efectividad del protocolo implementado pudo comprobarse mediante la realización de ensamblados utilizando genomas de referencia para la detección de los virus previamente identificados en esta matriz (CAV, IBV e IBDV). La obtención de *reads* pertenecientes a los genomas de estos virus (Tabla 5) confirma la capacidad del protocolo de ser utilizado para la realización de abordajes metagenómicos en muestras de tejido de aves de corral. El mismo demostró ser eficiente para la detección de especies virales con genomas de distinta composición y longitud.

La puesta a punto de este tipo de metodologías en nuestro laboratorio constituye una herramienta de gran importancia no solamente para el estudio de patógenos aviarios, dado su potencial para ser implementado en diferentes modelos de estudio como otros animales e incluso muestras de humanos.

### **Análisis de las comunidades virales**

Una vez puesto a punto el protocolo de enriquecimiento de partículas virales, el mismo fue aplicado a otras muestras provenientes de aves con fenotipo enfermo (sintomatología respiratoria e inmunodepresión) y sanas. Los análisis bioinformáticos realizados a partir de los datos de secuenciación obtenidos permitieron la caracterización de los viomas presentes en las distintas matrices analizadas y su comparación.

En las muestras de fenotipo enfermo, se identificaron un total de nueve especies virales pertenecientes a cinco familias (*Adenoviridae*, *Anelloviridae*, *Birnaviridae*, *Coronaviridae* y *Picornaviridae*). Tres de estas especies fueron identificadas en todas las matrices de aves con sintomatología (CAV, AvGyV2 e IBV). Este resultado indica la presencia de estos virus en aves con fenotipo enfermo en nuestro país, en concordancia con los múltiples reportes de virus como CAV e IBV realizados por parte de nuestro grupo de investigación (Marandino et al. 2016, 2017; Techera et al. 2021).

Al comparar los viomas de las dos matrices (bursa y tráquea) provenientes de la misma muestra de fenotipo enfermo (361501), además de las tres especies previamente mencionadas las mismas también comparten la presencia de otras dos especies de la familia Anelloviridae: Gyrovirus 3 y Gyrovirus 4. En cuanto a las diferencias que presentan los viomas caracterizados en estas dos matrices, IBDV fue detectado únicamente en bursa mientras que FAdV-E fue identificado sólo en tráquea. Estas diferencias pueden deberse al tropismo de los distintos virus. De esta forma, las diferencias observadas en la composición de las comunidades virales presentes en los distintos tejidos son una muestra de la gran complejidad de los viomas, cuyo estudio puede resultar acotado si se analiza un único tejido. Esto debe ser tenido en cuenta a la hora de caracterizar las comunidades virales que circulan en un determinado organismo.

También pudieron observarse diferencias en los viomas de las dos bursas de aves con fenotipo enfermo analizadas, identificándose en una de ellas IBDV (361501) mientras que en la otra (181601) se detectaron FAdV-D y Chicken Megrivirus. Estas diferencias, en conjunto con las tres especies detectadas en común (CAV, AvGyV2 e IBV) muestran la gran diversidad viral presente en la bursa de Fabricius. Si bien este órgano no es considerado diana de muchos de estos patógenos virales, los resultados indican que el mismo puede ser empleado para la detección de una amplia variedad de especies. Esto concuerda con estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio, donde se han reportado casos de co-infección de virus como CAV e IBV en este órgano (Techera et al. 2019). De esta forma, la bursa de Fabricius constituye una matriz sumamente interesante para el análisis de las comunidades virales, teniendo en cuenta además su rol en la respuesta inmune y el hecho de ser un órgano exclusivo de las aves.

Por su parte, el análisis de los viomas caracterizados en muestras de aves sin sintomatología permitió detectar un total de nueve especies virales pertenecientes a siete familias (*Adenoviridae*, *Anelloviridae*, *Birnaviridae*, *Caliciviridae*, *Genomoviridae*, *Herpesviridae* y *Picornaviridae*). Esto muestra una diversidad viral igual o mayor a la identificada en muestras de fenotipo enfermo, resaltando la importancia del monitoreo de especies virales en aves de corral independientemente del fenotipo observado. En ambas muestras se detectó la presencia de especies virales pertenecientes a la familia *Picornaviridae*. Si bien el

análisis con el programa ViromeScan identificó a nivel de especie Sicinivirus 1 y Chicken Picornavirus 1, los ensamblados realizados con genomas de referencia mostraron que la gran mayoría de los *reads* mapean fuera de las regiones codificantes del genoma de estos virus, como son el 5'UTR (el cual contiene una estructura de IRES) y el 3'UTR. A su vez, el análisis realizado mediante ensamblaje *de novo*, el cual realiza un BLASTX de los *contigs* obtenidos contra una base de datos de proteínas virales, permitió la clasificación de los mismos a nivel de familia, pero no de especie. Estos resultados permiten reportar la presencia de especies virales pertenecientes a la familia *Picornaviridae* en aves de fenotipo sano, siendo necesarios análisis adicionales para lograr una caracterización más detallada de las mismas.

En suma, se observó que las muestras de fenotipo enfermo y sano presentan comunidades virales de composición diferenciada, como pudo verse en el análisis de agrupamiento jerárquico (Figura 14). Este resultado es importante para poder determinar y diferenciar los perfiles que presentan los viomas caracterizados en aves enfermas y sanas, y constituyen un aporte fundamental para comprender el rol patogénico de los virus en estos animales. Si bien el concepto clásico de infección viral está habitualmente relacionado con la condición de enfermedad, el significativo aumento de la información relacionada con las comunidades virales producto de la implementación de abordajes metagenómicos ha producido un cambio en la perspectiva acerca del rol de los virus en animales sanos. Esto deja abiertas muchas preguntas relacionadas con la potencial intervención de estos microorganismos en el estado de salud (Shah et al. 2016).

Recientemente, ha cobrado relevancia el concepto de cursar una enfermedad de manera asintomática, específicamente en el marco de la actual pandemia del virus SARS-CoV-2. La capacidad de ciertos virus de propagarse en una población sin presentar una sintomatología determinada en algunos hospederos es una muestra de la importancia de realizar este tipo de estudios, con el fin de mantener un relevamiento de los virus circulantes.

## Consideraciones generales

Es importante discutir algunos aspectos generales acerca de los resultados de secuenciación obtenidos en las distintas matrices analizadas:

- Como se vio en los resultados obtenidos mediante el programa ViromeScan, se identificaron *reads* pertenecientes a la familia *Anelloviridae* tanto en las muestras de DNA como RNA, pese a ser una familia compuesta por virus con genoma de DNA (Figura 10). Esto concuerda con lo propuesto anteriormente acerca de la presencia de transcriptos en la matriz de RNA, en este caso productos de expresión de los genomas virales.
- No todas las especies virales fueron detectadas por un único análisis bioinformático. Para casos como el de Calicivirus, el programa ViromeScan no identificó la presencia de este genoma en los datos de secuenciación, posiblemente debido a que la base de datos que utiliza el programa no cuente con genomas de esta especie con suficiente identidad nucleotídica para poder alinear con los *reads* obtenidos. Sin embargo, la realización del ensamblaje *de novo* y posterior uso de la herramienta BLASTX contra una base de datos de proteínas virales permitió detectar *contigs* pertenecientes al genoma de dicho virus. Esto remarca la importancia del uso de diferentes herramientas para el análisis de los datos de metagenómica obtenidos. Las distintas bases de datos empleadas en los flujos de trabajo y la gran divergencia que presentan los genomas virales dentro de una misma especie pueden derivar en resultados que no reflejen la complejidad total de las comunidades virales en estudio.
- Es importante mencionar, respecto a la distribución de los *reads* obtenidos, que los resultados de este tipo de abordajes no tienen significado cuantitativo. Es decir que no existe relación con la carga viral presente en la muestra analizada. En este sentido, la abundancia de *reads* correspondientes a genomas pequeños circulares como los aquí detectados (pertenecientes al género Gyrovirus) ya ha sido identificada previamente como producto de un sesgo hacia este tipo de genomas en la amplificación del material genético cuando se utilizan kits de MDA (Parras-Moltó et al. 2018).

## Caracterización genética de las especies virales identificadas

Los genomas completos y/o las secuencias parciales consenso obtenidas en este trabajo fueron utilizadas para analizar la variabilidad genética de las distintas especies virales identificadas, en relación con las ya disponibles en bases de datos. A continuación, se discuten los resultados obtenidos, clasificados por familia viral.

### *Adenoviridae*

La familia *Adenoviridae* está compuesta por virus no envueltos que presentan un genoma lineal de DNA doble hebra que varía entre 26 y 45 kb de longitud, el cual codifica para alrededor de 40 proteínas. Dentro de esta familia, el género *Aviadenovirus* comprende las especies denominadas Fowl adenovirus, las cuales se clasifican en cinco especies (FAdV-A a la E) basado en patrones de digestión mediante enzimas de restricción (Zsak and Kisary 1984), y 12 serotipos mediante ensayos de neutralización cruzada (Hess 2000).

Además, las distintas especies de Fowl aviadenovirus pueden distinguirse claramente mediante análisis filogenéticos utilizando la secuencia del gen Hexón, el cual codifica para la proteína mayor de la cápside. A su vez mediante este tipo de análisis se han definido cuatro genotipos para la especie FAdV-D (desde D1 a D4) (Marek et al. 2010). Las cepas descritas en este trabajo corresponden a las especies A (muestra sana), D y E (muestras de fenotipo enfermo). Se trata del primer reporte de estas especies virales en nuestro país, mientras que para FAdV A es, además, el primer reporte en la región.

Si bien la especie más estudiada de este género corresponde a FAdV D, es poco el conocimiento acerca de las cepas circulantes en Sudamérica, donde se han reportado secuencias provenientes de Chile, Brasil, Ecuador y Perú (De la Torre et al. 2018; Mazaheri et al. 1998; Toro et al. 1999; Rodríguez et al. 2014; Pereira et al. 2014). El análisis filogenético realizado basado en la secuencia parcial del gen Hexón permitió clasificar la cepa de FAdV D obtenida en este trabajo como perteneciente al genotipo D3, agrupando con cepas provenientes de Brasil pertenecientes a dicho genotipo.

A nivel de la divergencia genética que presentan estas especies, la clara diferenciación observada en la filogenia se ve reflejada en los porcentajes de

identidad nucleotídica entre las especies, que superan el 30% en todos los casos (Tabla 9). Sin embargo, a nivel intra-especie estos valores son significativamente menores, con valores de 0,4% y 4,2% para FAdV-A y FAdV-D respectivamente, especies identificadas en este trabajo.

Diversas enfermedades han sido asociadas a las especies pertenecientes a este género, entre ellas la hepatitis de cuerpos de inclusión (IBH), el síndrome de hepatitis-hidropericardio (HHS) y la erosión de la molleja (GE), las cuales son usualmente causadas por especies específicas (Kaján et al. 2019). Mientras que las especies de FAdV-D y FAdV-E están comúnmente asociadas a IBH (Schachner et al. 2018; Zadavec et al. 2013), las especies de FAdV-A están asociadas a la erosión de la molleja (Domanska-Blicharz et al. 2011; Grafl et al. 2018; Lim et al. 2011).

Los virus de este género son causantes de grandes pérdidas económicas, especialmente en pollos broilers (Kaján et al. 2019). La identificación y caracterización de especies de Fowl aviadenovirus en la industria avícola uruguaya provee nueva información acerca de los virus circulantes y destaca la necesidad de la implementación de estrategias de control, como las vacunas recientemente desarrolladas en contra de IBH (De Luca et al. 2020; Popowich et al. 2018).

### *Anelloviridae*

Esta familia está compuesta por virus pequeños, sin envoltura y con un genoma de ssDNA circular de polaridad negativa de alrededor de 2,3 kb de longitud (Schat 2009). De los 14 géneros que componen esta familia (Shulman and Davidson 2017), las especies identificadas en las muestras analizadas en este trabajo corresponden al género Gyrovirus. La especie más representativa de este género es CAV, aislada por primera vez en 1979 (Yuasa, Taniguchi, and Yoshida 1979), e identificada como la única de su género hasta 2011. Desde entonces, especies relacionadas comenzaron a reportarse y a asignarse dentro del género Gyrovirus, como AvGyV2, GyV3 y GyV4 (Chu et al. 2012; Cibulski et al. 2021; Rijsewijk et al. 2011; Rosario et al. 2017; Tung G. Phan et al. 2012). Si bien CAV ha sido reportado exclusivamente en aves, el resto de las especies de este género han sido detectadas además en otros vertebrados como humanos, ratones y perros, entre otros (Fang et al. 2017; Fehér et al. 2014).

Dado que CAV es objeto de estudio por parte de nuestro grupo de investigación desde el año 2014, se ha reportado una alta prevalencia de este virus en nuestro país (Techera et al. 2019). Sin embargo, no existen reportes previos de cepas de AvGyV2, GyV3 o GyV4 en Uruguay. Más aún, en la región únicamente se han reportado estas especies en Brasil (Abolnik and Wandrag 2014; A Duarte et al. 2019), y Chile para el caso de GyV3 (Tung G. Phan et al. 2012). En este trabajo fue posible identificar las cuatro especies en la muestra de fenotipo enfermo 361501 (en sus dos matrices, tráquea y bursa), dos en la muestra con sintomatología 181601 (CAV y AvGyV2), y una en la muestra de fenotipo sano 182001 (AvGyV2).

CAV es un importante patógeno inmunodepresor con distribución a nivel mundial que ocasiona grandes pérdidas económicas en la industria avícola (Schat 2009). Las cepas de CAV caracterizadas en este trabajo fueron identificadas únicamente en aves con sintomatología, reafirmando la relación de este patógeno con el fenotipo enfermo, ya sea provocado por el propio virus, por otros patógenos que co-infectan el hospedero, o muy posiblemente por una combinación de ambas.

Desde el punto de vista de la variabilidad genética, si bien los genomas obtenidos para las distintas matrices de la muestra 361501 presentan una baja divergencia nucleotídica (indicando una baja variabilidad intra-hospedero), las cepas de las muestras 361501 y 181601 comparadas entre sí resultan filogenéticamente distantes. Las mismas se ubican en distintos clados de las filogenias realizadas tanto para la región codificante del genoma de CAV al igual que con el gen VP1. La variabilidad observada coincide con lo descrito por Eltahir et al. (2011) donde se clasifican las cepas circulantes de CAV a nivel mundial en cuatro clados bien diferenciados. A su vez, con respecto a la clasificación de las secuencias obtenidas en este trabajo, los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Techera et al. (2021), donde las cepas uruguayas circulantes agrupan en dos de estos clados. Esta divergencia observada en las cepas circulantes en nuestro país es explicada debido al distinto origen de los clados, determinado mediante análisis filogeográficos (Techera et al. 2021).

Avian Gyrovirus 2 fue descrito por primera vez a partir de aves de fenotipo enfermo en 2011 en Brasil (Rijsewijk et al. 2011). Sin embargo, trabajos posteriores sugieren que este virus se encuentra ampliamente distribuido y que está presente tanto en aves enfermas como sanas (Devaney et al. 2016; Shulman and Davidson 2017). Esto

concuera con los resultados obtenidos en este trabajo, donde AvGyV2 fue identificado en muestras de aves con y sin sintomatología. Hasta la fecha existen reportes asociados a aves de corral en Países Bajos, Sudáfrica, China, Italia, USA y Brasil (Abolnik and Wandrag 2014; dos Santos et al. 2012; Rijsewijk et al. 2011; Ye et al. 2015; W. Zhang et al. 2014). Las cepas de AvGyV2 uruguayas se encuentran estrechamente relacionadas con las reportadas en Brasil y China (Figura 20), lo cual puede estar sugiriendo que estas cepas comparten un origen evolutivo común. Alternativamente, otro escenario posible es que las cepas de AvGyV2 circulantes sean producto de la contaminación de vacunas aplicadas a aves de corral, junto con cepas de CAV, como se ha reportado previamente (Varela et al. 2014).

Si bien no ha sido asociado a una patología en particular, AvGyV2 ha sido reportado en aves con signos neurológicos severos, así como en heces de humanos, particularmente de niños con diarrea (Abolnik and Wandrag 2014; dos Santos et al. 2012; Tung G. Phan et al. 2012). El análisis de las secuencias aminoacídicas a partir de los genomas anotados de AvGyV2 permitió identificar un total de 18 diferencias a nivel de los tres ORFs del genoma entre las matrices de muestras con fenotipo sano y enfermo. Esta información puede ser utilizada para la identificación de marcadores que indiquen factores como la patogenicidad. Para ello es importante continuar con el relevamiento de este virus (del cual se disponen pocas secuencias) en la región y el mundo, siendo fundamental la meta data asociada a las cepas que se reporten (como la sintomatología que presentan las aves al momento de aislar cada cepa).

GyV3 fue reportado por primera vez en Chile en 2012, a partir de materia fecal de niños con diarrea (Tung G. Phan et al. 2012). Desde entonces ha sido reportado además en vertebrados como gatos, hurones y aves (Fehér et al. 2014; G. Li et al. 2018; Niu et al. 2019). Si bien en la actualidad existen pocos reportes de este virus, en la región se han descrito cepas circulantes en Chile (Tung G. Phan et al. 2012), Brasil (A Duarte et al. 2019), y por primera vez en Uruguay en el presente trabajo.

Los dos genomas completos de las cepas de GyV3 de Uruguay obtenidos presentan un total de 7 diferencias a nivel aminoacídico, 5 a nivel de la proteína VP2 y 2 a nivel de la proteína VP3. Esto resulta interesante debido a que se trata de distintas matrices provenientes de una misma muestra. La divergencia observada indica una variabilidad intra-hospedero de los genomas de GyV3. La misma puede deberse a un



eventual caso de co-infección con distintas cepas, o a variantes de una misma cepa que se diferencian en el transcurso de la infección del virus a través los distintos tejidos (denominado compartimentalización), proceso que ha sido estudiado en otros virus como el virus de la Hepatitis C (Gismondi et al. 2013; Ramachandran et al. 2011).

La existencia de reportes previos en Chile y en Brasil de GyV3 sugiere una circulación del virus en la región y resalta la importancia de realizar estudios acerca de la prevalencia del mismo. Este tipo de estudios son de relevancia no sólo para la industria avícola sino para la salud humana y animal, teniendo en cuenta el aparente amplio rango de hospedero que este virus parece tener, según los reportes existentes hasta el momento. Si bien el rol patogénico de GyV3 aún permanece poco claro, en aves ha sido asociado a proventriculitis (G. Li et al. 2018). Las lesiones en los proventrículos son causantes de grandes pérdidas económicas en la industria avícola y constituyen una de las lesiones asociadas con el síndrome de malabsorción (Dormitorio, Giambrone, and Hoerr 2007). Estudios adicionales son necesarios para lograr comprender mejor tanto la prevalencia de este virus en el país y en la región, como su implicancia en la patogenicidad y el impacto en la industria avícola.

Por su parte, GyV4 fue descrito por primera vez en 2012 a partir de muestras de materia fecal de pacientes con diarrea, y a partir de muestras de carne de pollo para consumo humano (Chu et al. 2012). Son muy pocos los reportes de cepas de esta especie reportados hasta el momento, sin embargo en la región se han identificado cepas circulantes en Brasil aisladas a partir de aves tanto sanas como enfermas (síndrome de malabsorción) (Lima et al. 2019). Los genomas de las cepas uruguayas obtenidos fueron anotados identificando la presencia de dos ORFs, correspondientes a las proteínas VP1 y VP2, acorde con la estructura previamente reportada para los genomas de esta especie (Chu et al. 2012). De todas las especies del género Gyrovirus analizadas en este trabajo, GyV4 es la única cuyo genoma carece de un ORF que codifique para una proteína apoptótica (VP3). Esta proteína es importante ya que induce apoptosis en las células T de pollos (Schat 2009), y le otorga a las especies que la presentan un potencial rol patogénico. Ante la ausencia de esta proteína, el rol patogénico de GyV4 se encuentra en discusión.

Los diversos reportes de especies de Gyrovirus en Brasil y la cercanía geográfica con Uruguay sugieren que este país puede estar actuando como un centro de dispersión

de distintas cepas de Gyrovirus hacia nuestro país. Estudios adicionales son necesarios para poder comprender mejor la epidemiología de estos virus. En suma, los resultados obtenidos en este trabajo constituyen un aporte a una mejor comprensión de la complejidad de las co-infecciones de gyrovirus en aves enfermas y sanas. Además, realzan la importancia del relevamiento de estas especies en aves de corral debido al impacto que puedan tener estos patógenos en la industria avícola, así como el potencial zoonótico de algunas de estas especies.

### *Birnaviridae*

Esta familia está compuesta por virus desnudos pequeños, que presentan un genoma compuesto por dos segmentos de RNA doble hebra (Nick, Cursiefen, and Becht 1976). Dentro de esta familia, IBDV es el único virus clasificado dentro del género *Avibirnavirus* (Delmas et al. 2019).

Actualmente, las cepas de IBDV se clasifican en siete linajes bien diferenciados genéticamente denominados genogrupos (G), desde G1 a G7 (Michel and Jackwood 2017). La cepa caracterizada genéticamente en este trabajo, identificada en la muestra de fenotipo sano 182002, agrupa con secuencias pertenecientes al genogrupo 1 (Figura 21), particularmente con otra secuencia de Uruguay previamente caracterizada como “clásica virulenta” (según el anterior criterio de clasificación) (Tomás et al. 2017). A su vez, las cepas clásicas virulentas están relacionadas con aquellas empleadas en el uso de vacunas contra IBDV (Michel and Jackwood 2017).

En este sentido, la comparación de la secuencia empleada para el análisis filogenético con secuencias de cepas vacunales, permitió identificar una cepa vacunal idéntica a nivel nucleotídico con la obtenida en este trabajo. Estos resultados sugieren que la cepa detectada es producto de las vacunas implementadas, dado que se trata de una muestra de aves sin sintomatología. Además, una de las vacunas empleadas en Uruguay para la protección contra IBDV (Vaccitek), consiste en una vacuna recombinante que utiliza herpesvirus de pavo como vector. El uso de este herpesvirus brinda además protección cruzada contra el virus de la enfermedad de Marek (<https://www.thepoultrysite.com/articles/hvt-immunity-interest-of-using-such-virus-as-vector>). La identificación en la muestra 182002 de *reads* virales pertenecientes al genoma del herpesvirus de pavo

(meleagrid herpesvirus) (Figura 13B), sustenta lo anteriormente expuesto y justifica además la presencia del genoma de este herpesvirus en la muestra.

### *Caliciviridae*

La familia *Caliciviridae* está compuesta por virus no envueltos de pequeño tamaño, con un genoma de RNA simple hebra y polaridad positiva, cuyo tamaño varía entre 6,4 y 8,4 kb (Green et al. 2000). Actualmente hay cinco géneros establecidos en esta familia: *Lagovirus*, *Nebovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus*, y *Vesivirus* (Clarke 2012). Las especies de esta familia infectan un amplio rango de vertebrados que incluye humanos, vacas, peces y aves, entre otros (Barlough et al. 1987; Desselberger 2019; Karst 2010; Mikalsen et al. 2014; Wolf, Reetz, and Otto 2011).

Las especies de esta familia que infectan aves se han reportado recientemente (Bodewes 2018; Wolf, Reetz, and Otto 2011), y han sido propuestas como pertenecientes a dos nuevos géneros denominados *Bavovirus* y *Nacovirus*, correspondientes a dos clados monofiléticos bien diferenciados mediante análisis filogenéticos (Canuti et al. 2019; Bodewes 2018; Kim et al. 2020). Mientras que las especies del género *Bavovirus* reportadas hasta el momento se han detectado únicamente en pollos, el género *Nacovirus* presenta una diversidad de hospederos que abarca además de pollos otras aves como pavos y patos (Canuti et al. 2019; de Souza et al. 2019).

La cepa de calicivirus aviar identificada en este trabajo en la muestra 182001 de fenotipo sano pertenece al género propuesto como *Bavovirus*. Si bien existen sólo unos pocos reportes de las cepas de este género circulantes en el mundo, en la región se han identificado cepas de origen brasilero, mediante abordajes metagenómicos (de Souza et al. 2019; Lima et al. 2019). Sin embargo, la cepa reportada en este trabajo no parece tener una relación evolutiva cercana con las cepas del país fronterizo, según el análisis filogenético realizado (Figura 22). Dado que las relaciones filogenéticas de las distintas cepas de *Bavovirus* parecen seguir un patrón geográfico, este resultado destaca la importancia de desarrollar métodos de diagnóstico que permitan el relevamiento y la posterior caracterización genética de las especies de *Calicivirus* aviar circulantes en nuestro país, cuyo primer reporte es el expuesto en el presente trabajo.

En cuanto a las patologías asociadas, las enfermedades relacionadas a los Calicivirus en humanos están principalmente asociadas al género *Norovirus*, siendo una de las principales causas de gastroenteritis en el mundo (Karst 2010). Además, los Calicivirus han sido asociados a enfermedades de gran relevancia en veterinaria, como son las enfermedades respiratorias en gatos causadas por el calicivirus felino, y la fiebre hemorrágica en conejos (Abrantes et al. 2012; Meli et al. 2018). Para el caso de pollos, se han registrado reportes de Calicivirus en aves con síndrome de malabsorción (Kim et al. 2020; Lima et al. 2019). Sin embargo, no se ha establecido relación directa de los Calicivirus con estas patologías. Estudios adicionales son requeridos para poder elucidar el rol patogénico de los calicivirus en aves, debido a la relevancia de estos virus en la salud de la gran mayoría de los hospederos que infectan.

### *Coronaviridae*

La familia *Coronaviridae* comprende un diverso número de especies virales capaces de infectar aves y mamíferos, divididas en cuatro géneros: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. De estos cuatro, IBV pertenece al género *Gamacoronavirus* (de Groot 2012), y presenta un genoma de RNA simple hebra con polaridad positiva de 27,6 kb de longitud. En los extremos del mismo, se ubican regiones no traducidas que poseen importantes funciones en la regulación de la replicación y transcripción del genoma viral (Lai and Cavanagh 1997).

Al igual que el resto de los virus de esta familia, el genoma de IBV posee un conjunto de genes de orden invariable, que codifican para las cuatro proteínas estructurales y las proteínas asociadas a la replicación y transcripción (Lai and Cavanagh 1997). Para la caracterización genética, la región más utilizada del genoma corresponde a la secuencia codificante de S1, debido a que constituye la región más variable del genoma, codificante para los principales sitios antigénicos del virión. En base a el análisis de esta región, se han identificado seis genotipos principales (GI-GVI) (Valastro et al. 2016).

El análisis filogenético realizado mostró que las cepas descritas en este trabajo, provenientes de aves con fenotipo enfermo, agrupan junto con otras cepas de Uruguay anteriormente identificadas como pertenecientes al genotipo I, linaje 11

(GI-11) (Marandino et al. 2015). Dentro de estas secuencias se encuentra la previamente obtenida por parte de nuestro grupo para la muestra 361501, la cual presenta una baja divergencia genética con las secuencias obtenidas en este trabajo para la misma muestra. Las diferencias observadas en las secuencias consenso pueden deberse a artefactos de la secuenciación, o a los distintos métodos empleados para el ensamblado y la obtención de los genomas. No puede descartarse además la presencia de variantes, las cuales son comunes en virus con genomas de RNA. El sesgo introducido con el uso de algunos protocolos como el de MDA, podría estar aumentando la representación de determinadas variantes, las cuales podrían verse reflejadas en las secuencias consenso obtenidas. Estudios adicionales son necesarios para identificar la presencia de variantes en los ensamblados realizados en este trabajo.

Es importante destacar además que el abordaje implementado en el presente trabajo permitió obtener más de un 85% del genoma de este virus en todas las matrices donde fue detectado, el cual presenta un tamaño considerable en comparación con el resto de los genomas virales (27 Kb). Esto remarca la eficiencia del protocolo para el análisis de los viomas.

En suma, los resultados obtenidos significan un aporte al constante relevamiento de cepas de IBV en la industria avícola llevado a cabo por nuestro grupo desde el año 2014, siendo uno de los principales patógenos respiratorios de esta industria ocasionando grandes pérdidas económicas.

### *Genomoviridae*

En el año 2016, la familia *Genomoviridae* fue descrita por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), como una familia de virus con genoma de DNA simple hebra circular (de entre 2 y 2,4 Kb) que infectan eucariotas (Krupovic et al. 2016). Un único género (*Gemycirculavirus*) y una única especie fueron definidos como pertenecientes a la misma. Dicha especie, denominada “virus de DNA asociado a hipovirulencia de *Sclerotinia sclerotiorum* 1” (SsHADV-1, por sus siglas en inglés) representa el primer (y hasta la fecha el único) virus con genoma de DNA simple hebra capaz de infectar especies de hongos (D. Jiang et al. 2013).

Durante los últimos años, un gran número de especies virales relacionadas con este virus han sido reportadas (denominadas en muchos trabajos como “SsHADV-1 like”)

asociadas a un diverso número de hospederos como plantas y animales, e incluso muestras ambientales (Krupovic et al. 2016; Sikorski et al. 2013). Si bien el hospedero natural de estas especies aún es desconocido, estos trabajos sugieren que se trata de una familia viral muy diversa con una amplia distribución (Krupovic et al. 2016).

El genoma de estos virus codifica para dos proteínas: la proteína de la cápside (CP) y la proteína de iniciación de la replicación (Rep) (Krupovic et al. 2016). La secuencia de estos genes presenta una gran variabilidad genética entre las distintas especies reportadas, lo cual llevó a proponer un total de hasta ocho géneros dentro de esta familia (Varsani and Krupovic 2017).

En aves de corral, se han reportado especies de genomovirus asociadas a muestras de materia fecal de pollos (Sikorski et al. 2013). Además, en la base de datos del NCBI se encuentran secuencias tomadas de hisopados de tráquea en aves provenientes de USA, aunque las mismas no se encuentran asociadas a ninguna publicación científica.

En el presente trabajo se lograron obtener, mediante ensamblaje *de novo*, los genomas completos de dos cepas de genomovirus, provenientes de aves con fenotipo sano. Estos genomas presentan una alta divergencia con respecto a las secuencias disponibles reportadas hasta la fecha. Los resultados contribuyen al conocimiento acerca de esta familia recientemente descrita, y de la cual aún queda mucho por saber, desde el rango de hospedero hasta su implicancia en enfermedades.

### *Parvoviridae*

La familia *Parvoviridae* está constituida por virus no envueltos y de tamaño pequeño (25 nm). Se subdivide en dos sub familias denominadas *Densovirinae* y *Parvovirinae* que infectan invertebrados y vertebrados, respectivamente (Cotmore et al. 2014). Actualmente, la sub familia *Parvovirinae* está dividida en ocho géneros: *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Protoparvovirus*, y *Tetraparvovirus* (Miranda and Thompson 2016).

Dentro del género *Aveparvovirus*, se encuentra la especie Galliform aveparvovirus, capaz de infectar pollos y pavos (Cotmore et al. 2014). Además, se han reportados especies de parvovirus en muestras de aves salvajes, relacionadas genéticamente con cepas de Galliform aveparvovirus, sugiriendo que las especies del género *Aveparvovirus* presentan una circulación no sólo en animales de cría sino también en aves salvajes (Tung Gia Phan et al. 2013; De Souza et al. 2018).

El genoma de estos virus está compuesto por una única molécula de DNA simple hebra de entre 4 y 6 kb de longitud, variando entre las especies de pollo y pavo, debido a la presencia de motivos repetidos (Day and Zsak 2010). Las región codificante de los genomas de parvovirus de pollo reportados tienen una longitud de entre 4594 y 4615 (De Souza et al. 2018). La misma presenta dos ORFs que codifican para proteínas no estructurales (hacia el extremo 5') y para las proteínas de la cápside (hacia el extremo 3') (Kapgate et al. 2018).

El rol patogénico de los parvovirus en pollos permanece aún poco claro, habiéndose reportado previamente tanto en aves con síndrome de malabsorción como en aves sanas mediante abordajes metagenómicos (De Souza et al. 2018; Lima et al. 2019; Kim et al. 2020).

Si bien los reportes de las distintas cepas de Galliform aveparvovirus parecen indicar una circulación a nivel mundial de este virus, en la región existen únicamente reportes en Brasil (De Souza et al. 2018; Lima et al. 2019). La cepa descrita en este trabajo, identificada en la muestra 182001 de fenotipo sano, constituye el primer reporte de *Gallus aveparvovirus* en Uruguay. Dicha cepa agrupa con otras provenientes de Brasil en el análisis filogenético llevado a cabo basado en la región codificante del genoma (Figura 26). Esto sugiere que estas cepas comparten un origen evolutivo común, e indica la circulación de este virus en la región. A pesar de no estar claro su rol patogénico, un mayor conocimiento acerca de la prevalencia de este virus en nuestro país y en la región resulta de gran importancia para poder comprender la implicancia de estos patógenos en la salud de las aves de cría intensiva.

#### *Picornaviridae*

Esta familia está compuesta por virus pequeños no envueltos, con un genoma de RNA simple hebra de polaridad positiva que varía entre 6 y 10 kb. El mismo codifica

para una única poliproteína, flanqueada por dos regiones no codificantes. Hasta la fecha, se han reportado por lo menos 47 géneros dentro de esta familia, de los cuales 12 infectan aves (Zell 2018). Sin embargo, hasta el año 2014 el virus de la encefalomiелitis aviar era la única especie de esta familia reportada que infectara pollos. En ese año, Boros y colaboradores lograron secuenciar el genoma completo del virus de la hepatitis del pavo (THV) y de otros dos picornavirus de pollos (A. Boros et al. 2014). Debido a diferencias observadas a nivel de ORFs y de secuencias repetidas en regiones UTR, sugieren la designación de una nueva especie, la cual denominaron chicken megrivirus. De esta forma, el género Megrivirus, que hasta el momento estaba compuesto únicamente por THV, pasó a estar compuesto además por una especie capaz de infectar pollos. También en este año, Lau y colaboradores proponen la existencia de cepas aisladas de pollos relacionadas filogenéticamente con THV, las cuales denominaron Chicken picornavirus 4 y 5 (Lau et al. 2014).

En Sudamérica, el género Megrivirus ha sido reportado en Brasil (Castro et al. 2018; Gerber et al. 2019) sugiriendo una circulación a nivel local de este virus, descrito por primera vez en Uruguay en el presente trabajo en la muestra de fenotipo enfermo 181601. El análisis filogenético realizado en base a la secuencia parcial del gen de la poliproteína ubica a la cepa uruguaya como basal en un clado conformado por secuencias de Brasil, Hungría e Irán. Secuencias también provenientes de Brasil, pero más recientemente reportadas, agrupan en otro clado junto con las denominadas Chicken picornavirus 4 y 5 (Figura 29). Estos resultados muestran la gran variabilidad de las cepas circulantes de este género, las cuales deben ser analizadas más en detalle, dado que existe múltiple evidencia de recombinación entre especies de este género, incluso entre aquellas que infectan distinto hospedero (Lau et al. 2014).

Especies pertenecientes a este género han sido detectadas en proventrículos de pollos mediante análisis metagenómicos en aves con proventriculitis (Kim et al. 2015). Sin embargo, el rol patogénico exacto de estos virus permanece sin aclarar.

Los resultados obtenidos sugieren la prevalencia de diversas especies de la familia *Picornaviridae* en aves de corral de fenotipo enfermo y sano. Estudios adicionales son necesarios para poder caracterizar de mejor manera la totalidad de especies circulantes, ya que, si bien se pudo identificar la presencia de chicken megrivirus en una muestra proveniente de aves con fenotipo enfermo, también pudieron



detectarse *reads* pertenecientes a genomas de picornavirus en muestras de aves de fenotipo sano.

### **Consideraciones finales**

Recientemente, estudios realizados proponen que la identificación de determinadas familias virales circulantes en los animales criados en establecimientos con fines de producción, pueden ser empleados para determinar una “huella digital viral” que describa el perfil de los virus presentes en cada uno de estos animales (vacas, cerdos, aves de corral). De esta manera, establecer perfiles relativamente estables de familias virales podría ayudar a realizar el seguimiento del flujo de los distintos virus entre los animales, el ser humano, y el ambiente (Kwok et al. 2020). Dentro de las familias más comúnmente reportadas en aves de corral se encuentran *Picornaviridae*, *Parvoviridae*, *Astroviridae* y *Anelloviridae*. Sin embargo, debido a que el número de abordajes metagenómicos (los cuales permiten caracterizar de forma más completa los viomas) realizados en pollos aún es relativamente bajo, es necesario un mayor número de análisis de este tipo para poder definir mejor el perfil de familias virales que circulan en estos animales. El presente trabajo constituye un significativo aporte a la comprensión de la diversidad viral presente en aves de corral de fenotipo enfermo y sano de Uruguay. Además, puede ser utilizado como punto de partida para el estudio de diversas especies virales circulantes en la industria avícola de nuestro país, cuya presencia había sido ignorada hasta el momento.

Por su parte la puesta a punto de un protocolo de enriquecimiento de partículas virales a partir de muestras de tejido y el análisis del viroma trascienden la implementación en muestras de aves de corral. En base a los resultados obtenidos en este trabajo, nuestro grupo de investigación se encuentra realizando este tipo de abordajes en un diverso rango de muestras, provenientes de otros animales e incluso de humanos. En este último caso el análisis del viroma resulta fundamental para detectar casos de co-infección, particularmente en el marco de la actual pandemia de SARS-CoV-2, constituyendo un aporte importante para la comprensión de la sinergia de este virus con otros respiratorios.

## 7 Conclusiones

- Se logró la puesta a punto en nuestro laboratorio de un protocolo de enriquecimiento de partículas virales que permite la correcta caracterización del viroma a partir de muestras de tejido de aves de corral.
- Se caracterizó el viroma presente en distintas matrices provenientes de aves con sintomatología respiratoria e inmunodeprimidos, y con fenotipo sano, generando el primer perfil virómico en la industria uruguaya.
- Se observó una gran diversidad de especies virales circulantes tanto en aves enfermas como sanas.
- Se reportaron por primera vez en Uruguay las especies Avian Gyrovirus 2, Gyrovirus 3, Gyrovirus 4, Fowl Aviadenovirus A, Fowl Aviadenovirus D, Fowl Aviadenovirus E, Chicken Calicivirus, Chicken Genomovirus, Chicken Parvovirus y Chicken Megrivirus.
- Se obtuvieron los genomas completos de las especies Avian Gyrovirus 2, Gyrovirus 3 y Gyrovirus 4.
- Se obtuvo más del 75% de los genomas de Bronquitis Infecciosa Aviar, Fowl Aviadenovirus A, Fowl Aviadenovirus D y Gallus Parvovirus.

## 8 Perspectivas

- Continuar con la caracterización del viroma en muestras de aves de corral de la industria avícola uruguaya.
- Desarrollar herramientas de diagnóstico y caracterización de los patógenos identificados por primera vez en nuestro país, con el fin obtener un mejor panorama acerca de la prevalencia de estos virus en nuestro país.
- Obtener la secuencia de los genomas completos de todas las especies virales identificadas en este trabajo, para ampliar la caracterización génica.

## 9 Bibliografia

- A Duarte, Matheus, João M. F Silva, Clara R Brito, Danilo S Teixeira, Fernando L Melo, Bergmann M Ribeiro, Tatsuya Nagata, and Fabrício S Campos. 2019. "Faecal Virome Analysis of Wild Animals from Brazil." *Viruses* 11 (9). <https://doi.org/10.3390/v11090803>.
- Abolnik, Celia, and Daniel B. R. Wandrag. 2014. "Avian Gyrovirus 2 and Avirulent Newcastle Disease Virus Coinfection in a Chicken Flock with Neurologic Symptoms and High Mortalities." *Avian Diseases* 58 (1): 90–94. <https://doi.org/10.1637/10657-090313-reg.1>.
- Abrantes, Joana, Wessel van der Loo, Jacques Le Pendu, and Pedro J Esteves. 2012. "Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) and Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV): A Review." *Veterinary Research* 43 (1): 12. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-12>.
- Adair, B. M. 2000. "Immunopathogenesis of Chicken Anemia Virus Infection." *Developmental and Comparative Immunology* 24 (2–3): 247–55. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00076-2](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00076-2).
- Allander, Tobias, Suzanne U. Emerson, Ronald E. Engle, Robert H. Purcell, and Jens Bukh. 2001. "A Virus Discovery Method Incorporating DNase Treatment and Its Application to the Identification of Two Bovine Parvovirus Species." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (20): 11609–14. <https://doi.org/10.1073/pnas.211424698>.
- Amarasinghe, Shanika L., Shian Su, Xueyi Dong, Luke Zappia, Matthew E. Ritchie, and Quentin Gouil. 2020. "Opportunities and Challenges in Long-Read Sequencing Data Analysis." *Genome Biology* 21 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-1935-5>.
- Bankevich, Anton, Sergey Nurk, Dmitry Antipov, Alexey A. Gurevich, Mikhail Dvorkin, Alexander S. Kulikov, Valery M. Lesin, et al. 2012. "SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing." *Journal of Computational Biology* 19 (5): 455–77. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- Barlough, J E, E S Berry, A W Smith, and D E Skilling. 1987. "Prevalence and Distribution of Serum Neutralizing Antibodies to Tillamook (Bovine) Calicivirus in Selected Populations of Marine Mammals." *Journal of Wildlife Diseases* 23 (1): 45–51. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-23.1.45>.
- Belák, Sándor, Oskar E. Karlsson, Anne Lie Blomström, Mikael Berg, and Fredrik Granberg. 2013. "New Viruses in Veterinary Medicine, Detected by Metagenomic Approaches." *Veterinary Microbiology* 165 (1–2): 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.022>.
- Blomström, Anne Lie. 2011. "Viral Metagenomics as an Emerging and Powerful Tool in Veterinary Medicine." *Veterinary Quarterly* 31 (3): 107–14. <https://doi.org/10.1080/01652176.2011.604971>.
- Bodewes, R. 2018. "Novel Viruses in Birds: Flying through the Roof or Is a Cage

- Needed?" *Veterinary Journal* 233 (2010): 55–62.  
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.12.023>.
- Bolger, Anthony M., Marc Lohse, and Bjoern Usadel. 2014. "Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data." *Bioinformatics* 30 (15): 2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Bordenstein, Seth R., and Kevin R. Theis. 2015. "Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes." *PLoS Biology* 13 (8): 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002226>.
- Boros, A., P. Pankovics, N. J. Knowles, C. Nemes, E. Delwart, and G. Reuter. 2014. "Comparative Complete Genome Analysis of Chicken and Turkey Megariviruses (Family Picornaviridae): Long 3' Untranslated Regions with a Potential Second Open Reading Frame and Evidence for Possible Recombination." *Journal of Virology* 88 (11): 6434–43. <https://doi.org/10.1128/jvi.03807-13>.
- Boros, Ákos, Péter Pankovics, Ádám Adonyi, Hajnalka Fenyvesi, J. Michael Day, Tung Gia Phan, Eric Delwart, and Gábor Reuter. 2016. "A Diarrheic Chicken Simultaneously Co-Infected with Multiple Picornaviruses: Complete Genome Analysis of Avian Picornaviruses Representing up to Six Genera." *Virology* 489: 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.12.002>.
- Breitbart, Mya, Peter Salamon, Bjarne Andresen, Joseph M. Mahaffy, Anca M. Segall, David Mead, Farooq Azam, and Forest Rohwer. 2002. "Genomic Analysis of Uncultured Marine Viral Communities." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (22): 14250–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.202488399>.
- Buchfink, Benjamin, Chao Xie, and Daniel H. Huson. 2014. "Fast and Sensitive Protein Alignment Using DIAMOND." *Nature Methods* 12 (1): 59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>.
- Callison, Scott A., Deborah A. Hilt, Tye O. Boynton, Brenda F. Sample, Robert Robison, David E. Swayne, and Mark W. Jackwood. 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>.
- Canuti, Marta, Ashley N.K. Kroyer, Davor Ojkic, Hugh G. Whitney, Gregory J. Robertson, and Andrew S. Lang. 2019. "Discovery and Characterization of Novel Rna Viruses in Aquatic North American Wild Birds." *Viruses* 11 (9): 1–14. <https://doi.org/10.3390/v11090768>.
- Castro, Ceyla Maria Oeiras, Elaine Hellen Nunes Chagas, Delana Andreza Melo Bezerra, Aline Farias Ribeiro, Sandro Patroca da Silva, Ana Cecília Ribeiro Cruz, Edivaldo Costa Sousa Júnior, René Ribeiro Silva, and Joana D.Arc Pereira Mascarenhas. 2018. "A Proposed New Strain of Avian Picornavirus in Broiler Chicken from Brazil." *Genome Announcements* 6 (12): 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00012-18>.
- Chu, Daniel K.W., Leo L.M. Poon, Susan S.S. Chiu, Kwok H. Chan, Erica M. Ng, Irma Bauer, Tim K. Cheung, et al. 2012. "Characterization of a Novel Gyrovirus in Human Stool and Chicken Meat." *Journal of Clinical Virology* 55 (3): 209–13. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.07.001>.

- Cibulski, Samuel, Diane Alves de Lima, Helton Fernandes dos Santos, Thais Fumaco Teixeira, Caroline Tochetto, Fabiana Quoos Mayer, and Paulo Michel Roehe. 2021. "A Plate of Viruses: Viral Metagenomics of Supermarket Chicken, Pork and Beef from Brazil." *Virology* 552 (June 2020): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.09.005>.
- Clarke, I N. 2012. "Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses." In *Elsevier*, 977–86. <https://doi.org/10.1201/9781315149929-16>.
- Cotmore, Susan F, Mavis Agbandje-McKenna, John A Chiorini, Dmitry V Mukha, David J Pintel, Jianming Qiu, Maria Soderlund-Venermo, et al. 2014. "The Family Parvoviridae." *Archives of Virology* 159 (5): 1239–47. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1914-1>.
- Daly, Gordon M., Nick Bexfield, Judith Heaney, Sam Stubbs, Antonia P. Mayer, Anne Palser, Paul Kellam, et al. 2011. "A Viral Discovery Methodology for Clinical Biopsy Samples Utilising Massively Parallel next Generation Sequencing." *PLoS ONE* 6 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028879>.
- Darriba, Diego, Guillermo L Taboada, Ramón Doallo, and David Posada. 2015. "JModelTest 2: More Models, New Heuristics and High-Performance Computing Europe PMC Funders Group." *Nature Methods* 9 (8): 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>.
- Dávila-Ramos, Sonia, Hugo G. Castelán-Sánchez, Liliana Martínez-ávila, María Del Rayo Sánchez-Carbente, Raúl Peralta, Armando Hernández-Mendoza, Alan D.W. Dobson, Ramón A. Gonzalez, Nina Pastor, and Ramón Alberto Batista-García. 2019. "A Review on Viral Metagenomics in Extreme Environments." *Frontiers in Microbiology* 10 (OCT): 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02403>.
- Day, J. Michael, Brian B. Oakley, Bruce S. Seal, and Laszlo Zsak. 2015. "Comparative Analysis of the Intestinal Bacterial and RNA Viral Communities from Sentinel Birds Placed on Selected Broiler Chicken Farms." *PLoS ONE* 10 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117210>.
- Day, J. Michael, and Laszlo Zsak. 2010. "Determination and Analysis of the Full-Length Chicken Parvovirus Genome." *Virology* 399 (1): 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.12.027>.
- De la Torre, David, Luis F.N. Nuñez, Silvana H. Santander Parra, Claudete S. Astolfi-Ferreira, and Antonio J. Piantino Ferreira. 2018. "Molecular Characterization of Fowl Adenovirus Group I in Commercial Broiler Chickens in Brazil." *VirusDisease* 29 (1): 83–88. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0430-z>.
- De Luca, Carlotta, Anna Schachner, Taniya Mitra, Sarah Heidl, Dieter Liebhart, and Michael Hess. 2020. "Fowl Adenovirus (FAdV) Fiber-Based Vaccine against Inclusion Body Hepatitis (IBH) Provides Type-Specific Protection Guided by Humoral Immunity and Regulation of B and T Cell Response." *Veterinary Research* 51 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00869-8>.
- Delmas, Bernard, Houssam Attoui, Souvik Ghosh, Yashpal S. Malik, Egbert Mundt, and Vikram N. Vakharia. 2019. "ICTV Virus Taxonomy Profile: Birnaviridae." *Journal of General Virology* 100 (1): 5–6. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001185>.

- Delwart, Eric L. 2007. *Viral Metagenomics. Reviews in Medical Virology*. Vol. 17. <https://doi.org/10.1002/rmv.532>.
- Denesvre, Caroline, Marine Dumarest, Sylvie Rémy, David Gourichon, and Marc Eloit. 2015. "Chicken Skin Virome Analyzed by High-Throughput Sequencing Shows a Composition Highly Different from Human Skin." *Virus Genes* 51 (2): 209–16. <https://doi.org/10.1007/s11262-015-1231-8>.
- Desselberger, Ulrich. 2019. "Caliciviridae Other than Noroviruses." *Viruses* 11 (3). <https://doi.org/10.3390/v11030286>.
- Devaney, Ryan, James Trudgett, Alan Trudgett, Caroline Meharg, and Victoria Smyth. 2016. "A Metagenomic Comparison of Endemic Viruses from Broiler Chickens with Runting-Stunting Syndrome and from Normal Birds." *Avian Pathology* 45 (6): 616–29. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1193123>.
- Djikeng, Appolinaire, Rebecca Halpin, Ryan Kuzmickas, Jay DePasse, Jeremy Feldblyum, Naomi Sengamalay, Claudio Afonso, et al. 2008. "Viral Genome Sequencing by Random Priming Methods." *BMC Genomics* 9: 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-5>.
- Domanska-Blicharz, K., G. Tomczyk, K. Smietanka, W. Kozaczynski, and Z. Minta. 2011. "Molecular Characterization of Fowl Adenoviruses Isolated from Chickens with Gizzard Erosions<sup>1</sup>." *Poultry Science* 90 (5): 983–89. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01214>.
- Dormitorio, T. V., J. J. Giambrone, and F. J. Hoerr. 2007. "Transmissible Proventriculitis in Broilers." *Avian Pathology* 36 (2): 87–91. <https://doi.org/10.1080/03079450601142588>.
- Elnifro, E. M., A. M. Ashshi, R. J. Cooper, and P. E. Klapper. 2000. "Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology." *Clinical Microbiology Reviews* 13 (4): 559–70. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.559-570.2000>.
- Eltahir, Yassir M., Kun Qian, Wenjie Jin, Pingping Wang, and Aijian Qin. 2011. "Molecular Epidemiology of Chicken Anemia Virus in Commercial Farms in China." *Virology Journal* 8 (November 2010): 1–8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-145>.
- Fang, Lichun, Yang Li, Yixin Wang, Jiayuan Fu, Shuai Cui, Xiaohan Li, Shuang Chang, and Peng Zhao. 2017. "Genetic Analysis of Two Chicken Infectious Anemia Virus Variants-Related Gyrovirus in Stray Mice and Dogs: The First Report in China, 2015." *BioMed Research International* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6707868>.
- Fehér, Enikő, Péter Pazár, Eszter Kovács, Szilvia L. Farkas, György Lengyel, Ferenc Jakab, Vito Martella, and Krisztián Bányai. 2014. "Molecular Detection and Characterization of Human Gyroviruses Identified in the Ferret Fecal Virome." *Archives of Virology* 159 (12): 3401–6. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2203-3>.
- Fierer, Noah, Mya Breitbart, James Nulton, Peter Salamon, Catherine Lozupone, Ryan Jones, Michael Robeson, et al. 2007. "Metagenomic and Small-Subunit RRNA Analyses Reveal the Genetic Diversity of Bacteria, Archaea, Fungi, and Viruses in Soil." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (21): 7059–66.

- <https://doi.org/10.1128/AEM.00358-07>.
- Gerber, Priscilla F., Huigang Shen, Ying Zheng, Ganwu Li, Zélia I. P. Lobato, and Tanja Opriessnig. 2019. "Genomic Sequence of a Megrivirus Strain Identified in Laying Hens in Brazil." *Microbiology Resource Announcements* 8 (4): 24–26. <https://doi.org/10.1128/mra.01438-18>.
- Gismondi, María Inés, Juan María Díaz Carrasco, Pamela Valva, Pablo Daniel Becker, Carlos Alberto Guzmán, Rodolfo Héctor Campos, and María Victoria Preciado. 2013. "Dynamic Changes in Viral Population Structure and Compartmentalization during Chronic Hepatitis C Virus Infection in Children." *Virology* 447 (1–2): 187–96. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.09.002>.
- Grafl, Beatrice, Cristina Garcia-Rueda, Peter Cargill, Alisdair Wood, Alex Schock, Dieter Liebhart, Anna Schachner, and Michael Hess. 2018. "Fowl Aviadenvirus Serotype 1 Confirmed as the Aetiological Agent of Gizzard Erosions in Replacement Pullets and Layer Flocks in Great Britain by Laboratory and in Vivo Studies." *Avian Pathology* 47 (1): 63–72. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1367364>.
- Green, K Y, T Ando, M S Balayan, T Berke, I N Clarke, M K Estes, D O Matson, et al. 2000. "Taxonomy of the Caliciviruses." *The Journal of Infectious Diseases* 181 Suppl (May): S322-30. <https://doi.org/10.1086/315591>.
- Grgacic, Elizabeth V.L., and David A. Anderson. 2006. "Virus-like Particles: Passport to Immune Recognition." *Methods* 40 (1): 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.018>.
- Groot, RJ de. 2012. "Family Coronaviridae." In *Virus Taxonomy, 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 806–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00068-9>.
- Hall, Richard J., Jing Wang, Angela K. Todd, Ange B. Bissielo, Seiha Yen, Hugo Strydom, Nicole E. Moore, et al. 2014. "Evaluation of Rapid and Simple Techniques for the Enrichment of Viruses Prior to Metagenomic Virus Discovery." *Journal of Virological Methods* 195: 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.035>.
- Hamza, Ibrahim Ahmed, Lars Jurzik, Klaus Überla, and Michael Wilhelm. 2011. "Methods to Detect Infectious Human Enteric Viruses in Environmental Water Samples." *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214 (6): 424–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.07.014>.
- Hernández, Martín, Alejandro Banda, Diego Hernández, Francisco Panzera, and Ruben Pérez. 2006. "Detection of Very Virulent Strains of Infectious Bursal Disease Virus (VvIBDV) in Commercial Broilers from, Uruguay." *Avian Diseases* 50 (4): 624–31. <https://doi.org/10.1637/7530-032306R1.1>.
- Hernández, Martín, Gonzalo Tomás, Diego Hernández, Pedro Villegas, Alejandro Banda, Leticia Maya, Yanina Panzera, and Ruben Pérez. 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): 368–74. <https://doi.org/10.1637/9672-013111-Reg.1>.
- Hernández, Martín, Gonzalo Tomás, Ana Marandino, Gregorio Iraola, Leticia Maya,

- Nora Mattion, Diego Hernández, et al. 2015. "Genetic Characterization of South American Infectious Bursal Disease Virus Reveals the Existence of a Distinct Worldwide-Spread Genetic Lineage." *Avian Pathology* 44 (3): 212–21. <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1025696>.
- Hernández, Martín, Pedro Villegas, Diego Hernández, Alejandro Banda, Leticia Maya, Valeria Romero, Gonzalo Tomás, and Ruben Pérez. 2010. "Sequence Variability and Evolution of the Terminal Overlapping VP5 Gene of the Infectious Bursal Disease Virus." *Virus Genes* 41 (1): 59–66. <https://doi.org/10.1007/s11262-010-0485-4>.
- Hess, M. 2000. "Detection and Differentiation of Avian Adenoviruses: A Review." *Avian Pathology* 29 (3): 195–206. <https://doi.org/10.1080/03079450050045440>.
- Jeon, Sol A., Jong Lyul Park, Jong Hwan Kim, Jeong Hwan Kim, Yong Sung Kim, Jin Cheon Kim, and Seon Young Kim. 2019. "Comparison of the MGISEQ-2000 and Illumina Hiseq 4000 Sequencing Platforms for RNA Sequencing." *Genomics and Informatics* 17 (3). <https://doi.org/10.5808/GI.2019.17.3.e32>.
- Jiang, Daohong, Yanping Fu, Li Guoqing, and Said A Ghabrial. 2013. "Viruses of the Plant Pathogenic Fungus *Sclerotinia Sclerotiorum*." *Advances in Virus Research* 86: 215–48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394315-6.00008-8>.
- Jiang, X, M Wang, D Y Graham, and M K Estes. 1992. "Expression, Self-Assembly, and Antigenicity of the Norwalk Virus Capsid Protein." *Journal of Virology* 66 (11): 6527–32. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.11.6527-6532.1992>.
- Jones, Bryony A., Delia Grace, Richard Kock, Silvia Alonso, Jonathan Rushton, Mohammed Y. Said, Declan McKeever, et al. 2013. "Zoonosis Emergence Linked to Agricultural Intensification and Environmental Change." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (21): 8399–8404. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208059110>.
- Jones, Kate E., Nikkita G. Patel, Marc A. Levy, Adam Storeygard, Deborah Balk, John L. Gittleman, and Peter Daszak. 2008. "Global Trends in Emerging Infectious Diseases." *Nature* 451 (7181): 990–93. <https://doi.org/10.1038/nature06536>.
- Kaján, Győző L., Ilaria Affranio, Andrea Tóthné Bistyák, Sándor Kecskeméti, and Mária Benkő. 2019. "An Emerging New Fowl Adenovirus Genotype." *Heliyon* 5 (5): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01732>.
- Kapgate, Sunil S., K. Kumanan, K. Vijayarani, and Sukhadeo B. Barbuddhe. 2018. "Avian Parvovirus: Classification, Phylogeny, Pathogenesis and Diagnosis." *Avian Pathology* 47 (6): 536–45. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1517938>.
- Karst, Stephanie M. 2010. *Pathogenesis of Noroviruses, Emerging RNA Viruses*. Vol. 2. <https://doi.org/10.3390/v2030748>.
- Kehoe, Monica A., Brenda A. Coutts, Bevan J. Buirchell, and Roger A.C. Jones. 2014. "Plant Virology and next Generation Sequencing: Experiences with a Potyvirus." *PLoS ONE* 9 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104580>.



- Kim, Hye Ryoung, Yong Kuk Kwon, Il Jang, and You Chan Bae. 2020. "Viral Metagenomic Analysis of Chickens with Runting-Stunting Syndrome in the Republic of Korea." *Virology Journal* 17 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01307-z>.
- Kim, Hye Ryoung, Se Joung Yoon, Hee Soo Lee, and Yong Kuk Kwon. 2015. "Identification of a Picornavirus from Chickens with Transmissible Viral Proventriculitis Using Metagenomic Analysis." *Archives of Virology* 160 (3): 701–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2325-7>.
- Kleiner, Manuel, Lora V. Hooper, and Breck A. Duerkop. 2015. "Evaluation of Methods to Purify Virus-like Particles for Metagenomic Sequencing of Intestinal Viromes." *BMC Genomics* 16 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-014-1207-4>.
- Koopmans, Marion, Berry Wilbrink, Marina Conyn, Gerard Natrop, Hans Van Der Nat, Harry Vennema, Adam Meijer, et al. 2004. "Transmission of H7N7 Avian Influenza A Virus to Human Beings during a Large Outbreak in Commercial Poultry Farms in the Netherlands." *Lancet* 363 (9409): 587–93. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15589-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15589-X).
- Kristensson, K. 1999. "The Discovery of the Poliovirus." *Brain Research Bulletin* 50 (5–6): 461. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(99\)00134-3](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00134-3).
- Krupovic, Mart, Said A. Ghabrial, Daohong Jiang, and Arvind Varsani. 2016. "Genomoviridae: A New Family of Widespread Single-Stranded DNA Viruses." *Archives of Virology* 161 (9): 2633–43. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2943-3>.
- Kumar, Sudhir, Glen Stecher, and Koichiro Tamura. 2016. "MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7 . 0 for Bigger Datasets Brief Communication." *Molecular Biology and Evolution*, no. July. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Kuo, Author G, Q Choo, H J Alter, G L Gitnick, A G Redeker, R H Purcell, J L Dienstag, et al. 1989. "An Assay for Circulating Antibodies to a Major Etiologic Virus of Human Non-A , Non-B Hepatitis." *Science* 244 (4902): 362–64.
- Kwok, Kirsty T.T., David F. Nieuwenhuijse, My V.T. Phan, and Marion P.G. Koopmans. 2020. "Virus Metagenomics in Farm Animals: A Systematic Review." *Viruses* 12 (1): 1–22. <https://doi.org/10.3390/v12010107>.
- Lai, M M, and D Cavanagh. 1997. "The Molecular Biology of Coronaviruses." *Advances in Virus Research* 48: 1–100. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60286-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60286-9).
- Lane, David J, Bernadette Pace, Gary J Olsen, David A Stahl, Mitchell L Sogint, and Norman R Pace. 1985. "Rapid Determination of 16S Ribosomal RNA Sequences for Phylogenetic Analyses (Reverse Transcriptase/Dideoxynucleotide)." *Evolution* 82 (October): 6955–59.
- Langmead, Ben, Cole Trapnell, Mihai Pop, and Steven L. Salzberg. 2009. "Ultrafast and Memory-Efficient Alignment of Short DNA Sequences to the Human Genome." *Genome Biology* 10 (3). <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>.

- Lau, Susanna K.P., Patrick C.Y. Woo, Cyril C.Y. Yip, Kenneth S.M. Li, Rachel Y.Y. Fan, Ru Bai, Yi Huang, Kwok Hung Chan, and Kwok Yung Yuen. 2014. "Chickens Host Diverse Picornaviruses Originated from Potential Interspecies Transmission with Recombination." *Journal of General Virology* 95 (PART 9): 1929–44. <https://doi.org/10.1099/vir.0.066597-0>.
- Leland, Diane S., and Christine C. Ginocchio. 2007. "Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology." *Clinical Microbiology Reviews* 20 (1): 49–78. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-06>.
- Lewandowska, Dagmara W., Osvaldo Zagordi, Fabienne Desirée Geissberger, Verena Kufner, Stefan Schmutz, Jürg Böni, Karin J. Metzner, Alexandra Trkola, and Michael Huber. 2017. "Optimization and Validation of Sample Preparation for Metagenomic Sequencing of Viruses in Clinical Samples." *Microbiome* 5 (1): 94. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0317-z>.
- Li, Gen, Shiyu Yuan, Menglian He, Manda Zhao, Xiaojing Hao, Minxun Song, Lingjuan Zhang, et al. 2018. "Emergence of Gyrovirus 3 in Commercial Broiler Chickens with Transmissible Viral Proventriculitis." *Transboundary and Emerging Diseases* 65 (5): 1170–74. <https://doi.org/10.1111/tbed.12927>.
- Li, Heng, and Richard Durbin. 2009. "Fast and Accurate Short Read Alignment with Burrows-Wheeler Transform." *Bioinformatics* 25 (14): 1754–60. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.
- Li, Heng, Bob Handsaker, Alec Wysoker, Tim Fennell, Jue Ruan, Nils Homer, Gabor Marth, Goncalo Abecasis, and Richard Durbin. 2009. "The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools." *Bioinformatics* 25 (16): 2078–79. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
- Lim, Tae Hyun, Hyun Jeong Lee, Dong Hun Lee, Yu Na Lee, Jae Keun Park, Ha Na Youn, Myung Seob Kim, et al. 2011. "Identification and Virulence Characterization of Fowl Adenoviruses in Korea." *Avian Diseases* 55 (4): 554–60. <https://doi.org/10.1637/9730-032011-Reg.1>.
- Lima, Diane A., Samuel P. Cibulski, Caroline Tochetto, Ana Paula M. Varela, Fabrine Finkler, Thais F. Teixeira, Márcia R. Loiko, et al. 2019. "The Intestinal Virome of Malabsorption Syndrome-Affected and Unaffected Broilers through Shotgun Metagenomics." *Virus Research* 261 (August 2018): 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.12.005>.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. 2000. *Molecular Cell Biology 5th Ed. W.H. Freeman*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/%5Cnhttp://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=K3JbjG1jiUMC&pgis=1>.
- Manso, Carmen F., David F. Bibby, and Jean L. Mbisa. 2017. "Efficient and Unbiased Metagenomic Recovery of RNA Virus Genomes from Human Plasma Samples." *Scientific Reports* 7 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02239-5>.
- Marandino, Ana. 2018. "Caracterización Genética y Antigénica de Las Cepas Del Virus de La Bronquitis Infecciosa Aviar Circulantes En La Industria Avícola Regional."
- Marandino, Ana, Ariel Pereda, Gonzalo Tomás, Martín Hernández, Gregorio Iraola,

- María Isabel Craig, Diego Hernaández, et al. 2015. "Phylogenetic Analysis of Avian Infectious Bronchitis Virus in South America." *Journal of General Virology* 96: 1340–46. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000077>.
- Marandino, Ana, Gonzalo Tomás, Martín Hernández, Yanina Panzera, María Isabel Craig, Ariel Vagnozzi, Federico Vera, et al. 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>.
- Marandino, Ana, Gonzalo Tomás, Yanina Panzera, Gonzalo Greif, Adriana Parodi-Talice, Martín Hernández, Claudia Techera, Diego Hernández, and Ruben Pérez. 2017. "Whole-Genome Characterization of Uruguayan Strains of Avian Infectious Bronchitis Virus Reveals Extensive Recombination between the Two Major South American Lineages." *Infection, Genetics and Evolution* 54 (January): 245–50. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.07.009>.
- Marek, Ana, Ayse Günes, Evelyn Schulz, and Michael Hess. 2010. "Classification of Fowl Adenoviruses by Use of Phylogenetic Analysis and High-Resolution Melting-Curve Analysis of the Hexon L1 Gene Region." *Journal of Virological Methods* 170 (1–2): 147–54. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.09.019>.
- Martin, Marcel. 2014. "Cutadapt Removes Adapter Sequences From High-Throughput Sequencing Reads." *EMBnet.Journal* 17 (1).
- Mazaheri, A., C. Prusas, M. Voß, and M. Hess. 1998. "Some Strains of Serotype 4 Fowl Adenoviruses Cause Inclusion Body Hepatitis and Hydropericardium Syndrome in Chickens." *Avian Pathology* 27 (3): 269–76. <https://doi.org/10.1080/03079459808419335>.
- Meli, Marina L, Alice Berger, Barbara Willi, Andrea M Spiri, Barbara Riond, and Regina Hofmann-Lehmann. 2018. "Molecular Detection of Feline Calicivirus in Clinical Samples: A Study Comparing Its Detection by RT-QPCR Directly from Swabs and after Virus Isolation." *Journal of Virological Methods* 251: 54–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.10.001>.
- Michel, Linda O., and Daral J. Jackwood. 2017. "Classification of Infectious Bursal Disease Virus into Genogroups." *Archives of Virology* 162 (12): 3661–70. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3500-4>.
- Mikalsen, Aase B, Pål Nilsen, Marianne Frøystad-Saugen, Karine Lindmo, Trygve M Eliassen, Marit Rode, and Øystein Evensen. 2014. "Characterization of a Novel Calicivirus Causing Systemic Infection in Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.): Proposal for a New Genus of Caliciviridae." *PLOS ONE* 9 (9): 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107132>.
- Miller, Ruth R., Vincent Montoya, Jennifer L. Gardy, David M. Patrick, and Patrick Tang. 2013. "Metagenomics for Pathogen Detection in Public Health." *Genome Medicine* 5 (9): 1. <https://doi.org/10.1186/gm485>.
- Milne, Iain, Gordon Stephen, Micha Bayer, Peter J.A. Cock, Leighton Pritchard, Linda Cardle, Paul D. Shawand, and David Marshall. 2013. "Using Tablet for Visual Exploration of Second-Generation Sequencing Data." *Briefings in Bioinformatics* 14 (2): 193–202. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs012>.

- Miranda, Carla, and Gertrude Thompson. 2016. "Canine Parvovirus: The Worldwide Occurrence of Antigenic Variants." *The Journal of General Virology* 97 (9): 2043–57. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000540>.
- Mokili, John L., Forest Rohwer, and Bas E. Dutilh. 2012. "Metagenomics and Future Perspectives in Virus Discovery." *Current Opinion in Virology* 2 (1): 63–77. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.12.004>.
- Mokili, John L.K., Melissa Rogers, Jean K. Carr, Peter Simmonds, Johnny M. Bopopi, Brian T. Foley, Bette T. Korber, Deborah L. Birx, and Francine E. McCutchan. 2002. "Identification of a Novel Clade of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Democratic Republic of Congo." *AIDS Research and Human Retroviruses* 18 (11): 817–23. <https://doi.org/10.1089/08892220260139567>.
- Nick, H, D Cursiefen, and H Becht. 1976. "Structural and Growth Characteristics of Infectious Bursal Disease Virus." *Journal of Virology* 18 (1): 227–34. <https://doi.org/10.1128/jvi.18.1.227-234.1976>.
- Niu, Jiang Ting, Shu Shuai Yi, Guo Ying Dong, Yan Bing Guo, Yan Li Zhao, Hai Long Huang, Kai Wang, Gui Xue Hu, and Hao Dong. 2019. "Genomic Characterization of Diverse Gyroviruses Identified in the Feces of Domestic Cats." *Scientific Reports* 9 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49955-8>.
- Nooij, Sam, Dennis Schmitz, Harry Vennema, Annelies Kroneman, and Marion P.G. Koopmans. 2018. "Overview of Virus Metagenomic Classification Methods and Their Biological Applications." *Frontiers in Microbiology* 9 (APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00749>.
- Okonechnikov, Konstantin, Olga Golosova, Mikhail Fursov, Alexey Varlamov, Yuri Vaskin, Ivan Efremov, O. G. German Grehov, et al. 2012. "Unipro UGENE: A Unified Bioinformatics Toolkit." *Bioinformatics* 28 (8): 1166–67. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>.
- Pace, Norman R, David A Stahl, David J Lane, and Gary J Olsen. 1986. "The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences." In *Advances in Microbial Ecology*, edited by K C Marshall, 1–55. Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0611-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0611-6_1).
- Panzer, Yanina, Natalia Ramos, Sandra Frabasile, Lucía Calleros, Ana Marandino, Gonzalo Tomás, Claudia Techera, et al. 2021. "A Deletion in SARS-CoV-2 ORF7 Identified in COVID-19 Outbreak in Uruguay." *Transboundary and Emerging Diseases*, no. December 2020: 1–8. <https://doi.org/10.1111/tbed.14002>.
- Panzer, Yanina, Natalia Ramos, Sandra Frabasile, Ana Marandino, Claudia Techera, Eddie Fuques, Viviana Ramas, et al. 2021. "Genome Sequences of SARS-CoV-2 P.1 ( Variant of Concern ) and P.2 (Variant of Interest) Identified in Uruguay." *Microbiology Resource Announcements* 1 (March).
- Parras-Moltó, Marcos, Ana Rodríguez-Galet, Patricia Suárez-Rodríguez, and Alberto López-Bueno. 2018. "Evaluation of Bias Induced by Viral Enrichment and Random Amplification Protocols in Metagenomic Surveys of Saliva DNA Viruses." *Microbiome* 6 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0507-3>.
- Pereira, C. G., S. Y. Marin, B. M. Santos, J. S. Resende, M. Resende, A. M. Gomes, and

- N. R.S. Martins. 2014. "Occurrence of Aviadenovirus in Chickens from the Poultry Industry of Minas Gerais." *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 66 (3): 801–8. <https://doi.org/10.1590/1678-41625899>.
- Pérez, Ruben, Lucía Calleros, Ana Marandino, Nicolás Sarute, Gregorio Iraola, Sofia Grecco, Hervé Blanc, et al. 2014. "Phylogenetic and Genome-Wide Deep-Sequencing Analyses of Canine Parvovirus Reveal Co-Infection with Field Variants and Emergence of a Recent Recombinant Strain." *PLoS ONE* 9 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111779>.
- Petrackova, Anna, Michal Vasinek, Lenka Sedlarikova, Tereza Dyskova, Petra Schneiderova, Tomas Novosad, Tomas Papajik, and Eva Kriegova. 2019. "Standardization of Sequencing Coverage Depth in NGS: Recommendation for Detection of Clonal and Subclonal Mutations in Cancer Diagnostics." *Frontiers in Oncology* 9 (September): 1–6. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00851>.
- Pevzner, Paul A., Haixu Tang, and Glenn Tesler. 2004. "De Novo Repeat Classification and Fragment Assembly." *Genome Research* 14 (9): 1786–96. <https://doi.org/10.1101/gr.2395204>.
- Phan, Tung G., Linlin Li, Miguel G. O’Ryan, Hector Cortes, Nora Mamani, Isidore J.O. Bonkougou, Chunling Wang, Christian M. Leutenegger, and Eric Delwart. 2012. "A Third Gyrovirus Species in Human Faeces." *Journal of General Virology* 93 (6): 1356–61. <https://doi.org/10.1099/vir.0.041731-0>.
- Phan, Tung Gia, NP Vo, Ákos Boros, Péter Pankovics, Gábor Reuter, Olive Li, Chunling Wang, Xutao Deng, Leo L.M. Poon, and Eric L. Delwart. 2013. "The Viruses of Wild Pigeon Droppings Tung." *PloS One* 7 (4): 1–10. <https://doi.org/10.1371/Citation>.
- Popowich, Shelly, Ashish Gupta, Betty Chow-Lockerbie, Lisanework Ayalew, Neil Ambrose, Davor Ojkic, Thushari Gunawardana, et al. 2018. "Broad Spectrum Protection of Broiler Chickens against Inclusion Body Hepatitis by Immunizing Their Broiler Breeder Parents with a Bivalent Live Fowl Adenovirus Vaccine." *Research in Veterinary Science* 118: 262–69. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.03.003>.
- Quail, Michael A, Miriam Smith, Paul Coupland, Thomas D Otto, Simon R Harris, Thomas R Connor, Anna Bertoni, Harold P Swerdlow, and Yong Gu. 2012. "A Tale of Three NGS Sequencing Platforms." *BMC Genomics* 13 (341): 13.
- Ramachandran, S., D. S. Campo, Z. E. Dimitrova, G.-l. Xia, M. A. Purdy, and Y. E. Khudyakov. 2011. "Temporal Variations in the Hepatitis C Virus Intrahost Population during Chronic Infection." *Journal of Virology* 85 (13): 6369–80. <https://doi.org/10.1128/jvi.02204-10>.
- Rampelli, Simone, Matteo Soverini, Silvia Turrone, Sara Quercia, Elena Biagi, Patrizia Brigidi, and Marco Candela. 2016. "ViromeScan: A New Tool for Metagenomic Viral Community Profiling." *BMC Genomics* 17 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2446-3>.
- Reyes, Gregory R., Michael A. Purdy, Jungsuh P. Kim, Ka Cheung Luk, La Vonne M. Young, Kirk E. Fry, and Daniel W. Bradley. 1990. "Isolation of a cDNA from the Virus Responsible for Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis." *Science* 247 (4948): 1335–39. <https://doi.org/10.1126/science.2107574>.

- Rijsewijk, Franciscus A.M., Helton F. dos Santos, Thais F. Teixeira, Samuel P. Cibulski, Ana P.M. Varela, Diogenes Dezen, Ana C. Franco, and Paulo M. Roehe. 2011. "Discovery of a Genome of a Distant Relative of Chicken Anemia Virus Reveals a New Member of the Genus Gyrovirus." *Archives of Virology* 156 (6): 1097–1100. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-0971-6>.
- Rodríguez, Jorge, Ysabel Koga, Arnaldo Alvarado, and Robert Tinoco. 2014. "Molecular Characterization of Peruvian Fowl Adenovirus (FAdV) Isolates." *Advances in Microbiology* 04 (10): 595–603. <https://doi.org/10.4236/aim.2014.410065>.
- Rohwer, Forest, and Rob Edwards. 2002. "The Phage Proteomic Tree: A Genome-Based Taxonomy for Phage." *Journal of Bacteriology* 184 (16): 4529–35. <https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4529-4535.2002>.
- Romancer, Marc Le, Mélusine Gaillard, Claire Geslin, and Daniel Prieur. 2007. "Viruses in Extreme Environments." *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 6 (1–3): 17–31. <https://doi.org/10.1007/s11157-006-0011-2>.
- Romanutti, Carina, Leticia Keller, José La Torre, Yanina Panzera, Eddie Fuques, Ruben Pérez, and Marina Gallo Calderon. 2020. "Virus Isolation and Full-Length Genome Sequencing of a Representative Canine Distemper Virus Wild Type Strain of the South America 2 Clade." *Journal of Virological Methods* 279. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113857>.
- Roossinck, Marilyn J. 2015. "Move Over, Bacteria! Viruses Make Their Mark as Mutualistic Microbial Symbionts." *Journal of Virology* 89 (13): 6532–35. <https://doi.org/10.1128/jvi.02974-14>.
- Rosario, Karyna, Mya Breitbart, Balázs Harrach, Joaquim Segalés, Eric Delwart, Philippe Biagini, and Arvind Varsani. 2017. "Revisiting the Taxonomy of the Family Circoviridae: Establishment of the Genus Cyclovirus and Removal of the Genus Gyrovirus." *Archives of Virology* 162 (5): 1447–63. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3247-y>.
- Rosseel, Toon, Orkun Ozhelvaci, Graham Freimanis, and Steven Van Borm. 2015. "Evaluation of Convenient Pretreatment Protocols for RNA Virus Metagenomics in Serum and Tissue Samples." *Journal of Virological Methods* 222: 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.05.010>.
- Sajnani, Manisha R., D. Sudarsanam, Ramesh J. Pandit, Tejas Oza, Ankit T. Hinsu, Subhash J. Jakhesara, Siddhardha Solosanc, Chaitanya G. Joshi, and Vaibhav D. Bhatt. 2018. "Metagenomic Data of DNA Viruses of Poultry Affected with Respiratory Tract Infection." *Data in Brief* 16: 157–60. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.11.033>.
- Santos, Helton F. dos, Marcus B. Knak, Fernanda L. de Castro, Josiane Slongo, Gisele A. Ritterbusch, Tânia A.P. Klein, Paulo A. Esteves, et al. 2012. "Variants of the Recently Discovered Avian Gyrovirus 2 Are Detected in Southern Brazil and The Netherlands." *Veterinary Microbiology* 155 (2–4): 230–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.021>.
- Schachner, Anna, Miguel Matos, Beatrice Grafl, and Michael Hess. 2018. "Fowl Adenovirus-Induced Diseases and Strategies for Their Control—a Review on the Current Global Situation." *Avian Pathology* 47 (2): 111–26.

- <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1385724>.
- Schat, K A. 2009. "Chicken Anemia Virus Infection," 1190–92.
- Schena, Mark, Dari Shalon, Ronald W. Davis, and Patrick O. Brown. 1995. "Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray." *Science* 270 (5235): 467–70. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.467>.
- Schmieder, Robert, and Robert Edwards. 2011. "Quality Control and Preprocessing of Metagenomic Datasets." *Bioinformatics* 27 (6): 863–64. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>.
- Schoch, Conrad L., Keith A. Seifert, Sabine Huhndorf, Vincent Robert, John L. Spouge, C. André Levesque, Wen Chen, et al. 2012. "Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (16): 6241–46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
- Schoenfeld, Thomas, Melodee Patterson, Paul M. Richardson, K. Eric Wommack, Mark Young, and David Mead. 2008. "Assembly of Viral Metagenomes from Yellowstone Hot Springs." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (13): 4164–74. <https://doi.org/10.1128/AEM.02598-07>.
- Shah, Jigna D., Prerak T. Desai, Ying Zhang, Sarah K. Scharber, Joshua Baller, Zheng S. Xing, and Carol J. Cardona. 2016. "Development of the Intestinal RNA Virus Community of Healthy Broiler Chickens." *PLoS ONE* 11 (2): 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150094>.
- Shean, Ryan C., Negar Makhsous, Graham D. Stoddard, Michelle J. Lin, and Alexander L. Greninger. 2019. "VAPiD: A Lightweight Cross Platform Viral Annotation Pipeline and Identification Tool to Facilitate Virus Genome Submissions to NCBI GenBank." *BMC Bioinformatics*, 1–8. <https://doi.org/10.1101/420463>.
- Shulman, L.M., and I. Davidson. 2017. "Viruses with Circular Single-Stranded DNA Genomes Are Everywhere!" *Annual Review of Virology* 4 (1): 159–80. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041953>.
- Sikorski, Alyssa, Melanie Massaro, Simona Kraberger, Laura M. Young, Darren Smalley, Darren P. Martin, and Arvind Varsani. 2013. "Novel Myco-like DNA Viruses Discovered in the Faecal Matter of Various Animals." *Virus Research* 177 (2): 209–16. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.08.008>.
- Simmonds, Peter, Mike J. Adams, Mária Benk, Mya Breitbart, J. Rodney Brister, Eric B. Carstens, Andrew J. Davison, et al. 2017. "Consensus Statement: Virus Taxonomy in the Age of Metagenomics." *Nature Reviews Microbiology* 15 (3): 161–68. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.177>.
- Simon, Jean Christophe, Julian R. Marchesi, Christophe Mougel, and Marc André Selosse. 2019. "Host-Microbiota Interactions: From Holobiont Theory to Analysis." *Microbiome* 7 (1): 1–5. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0619-4>.
- Sims, L D, J Domenech, C Benigno, S Kahn, A Kamata, J Lubroth, V Martin, and P

- Roeder. 2004. "Origin and Evolution of H5N1 in Asia." *Veterinary Record* 1996.
- Souza, William Marciel De, Tristan Dennis, Marcílio Jorge Fumagalli, Jansen Araujo, Gilberto Sabino-Santos, Felipe Gonçalves Motta Maia, Gustavo Olszanski Acrani, et al. 2018. "Novel Parvoviruses from Wild and Domestic Animals in Brazil Provide New Insights into Parvovirus Distribution and Diversity." *Viruses* 10 (4). <https://doi.org/10.3390/v10040143>.
- Souza, William Marciel de, Marcílio Jorge Fumagalli, Jansen de Araujo, Tatiana Ometto, Sejal Modha, Luciano Matsumiya Thomazelli, Edison Luís Durigon, Pablo Ramiro Murcia, and Luiz Tadeu Moraes Figueiredo. 2019. "Discovery of Novel Astrovirus and Calicivirus Identified in Ruddy Turnstones in Brazil." *Scientific Reports* 9 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42110-3>.
- Techera, Claudia, Ana Marandino, Gonzalo Tomás, Sofía Grecco, Martín Hernández, Diego Hernández, Yanina Panzera, and Ruben Pérez. 2021. "Origin, Spreading and Genetic Variability of Chicken Anemia Virus." *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A*, no. 0: 1–37. <https://doi.org/10.1080/03079457.2021.1919289>.
- Techera, Claudia, Gonzalo Tomás, Yanina Panzera, Alejandro Banda, Paula Perbolianachis, Ruben Pérez, and Ana Marandino. 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>.
- Tomás, Gonzalo, Martín Hernández, Ana Marandino, Yanina Panzera, Leticia Maya, Diego Hernández, Ariel Pereda, et al. 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): 101–7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.06.012>.
- Tomás, Gonzalo, Martín Hernández, Ana Marandino, Claudia Techera, Sofia Grecco, Diego Hernández, Alejandro Banda, Yanina Panzera, and Ruben Pérez. 2017. "Development of an RT-QPCR Assay for the Specific Detection of a Distinct Genetic Lineage of the Infectious Bursal Disease Virus." *Avian Pathology* 46 (2): 150–56. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1228827>.
- Toro, H., C. Prusas, R. Raue, L. Cerda, C. Geisse, C. González, and M. Hess. 1999. "Characterization of Fowl Adenoviruses from Outbreaks of Inclusion Body Hepatitis/Hydropericardium Syndrome in Chile." *Avian Diseases* 43 (2): 262–70. <https://doi.org/10.2307/1592616>.
- Toro, H., V. L. Van Santen, L. Li, S. B. Lockaby, E. Van Santen, and F. J. Hoerr. 2006. "Epidemiological and Experimental Evidence for Immunodeficiency Affecting Avian Infectious Bronchitis." *Avian Pathology* 35 (6): 455–64. <https://doi.org/10.1080/03079450601028811>.
- USDA. 2021. "Livestock and Poultry: World Markets and Trade." *United States Department of Agriculture and Foreign Agricultural Service*, 31. [http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock\\_poultry.PDF](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.PDF).
- Valastro, Viviana, Edward C Holmes, Paul Britton, Alice Fusaro, Mark W Jackwood, Giovanni Cattoli, and Isabella Monne. 2016. "S1 Gene-Based Phylogeny of Infectious Bronchitis Virus: An Attempt to Harmonize Virus Classification." *Infection, Genetics and Evolution*, no. January.



- Varela, Ana Paula Muterle, Helton Fernandes dos Santos, Samuel Paulo Cibulski, Camila Mengue Scheffer, Candice Schmidt, Francisco Esmaille Sales Lima, Alessandra D. Avila Silva, Paulo Augusto Esteves, Ana Cláudia Franco, and Paulo Michel Roehe. 2014. "Chicken Anemia Virus and Avian Gyrovirus 2 as Contaminants in Poultry Vaccines." *Biologicals* 42 (6): 346–50. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2014.08.002>.
- Varsani, Arvind, and Mart Krupovic. 2017. "Sequence-Based Taxonomic Framework for the Classification of Uncultured Single-Stranded DNA Viruses of the Family Genomoviridae." *Virus Evolution* 3 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1093/ve/vew037>.
- Vega-Thurber, Rebecca, Matthew Haynes, Mya Breitbart, Linda Wegley, and Forest Rohwer. 2009. "Laboratory Procedures to Generate Viral Metagenomes." *Nature Protocols* 4 (4): 470–83. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.10>.
- Wang, David, Laurent Coscoy, Maxine Zylberberg, Pedro C Avila, A Homer, Don Ganem, Joseph L Derisi, et al. 2016. "Microarray-Based Detection and Genotyping of Viral Pathogens." *Journal of Virology* 90 (24): 15687–92.
- Wang, David, Anatoly Urisman, Yu Tsueng Liu, Michael Springer, Thomas G. Ksiazek, Dean D. Erdman, Elaine R. Mardis, et al. 2003. "Viral Discovery and Sequence Recovery Using DNA Microarrays." *PLoS Biology* 1 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000002>.
- Wolf, Sandro, Jochen Reetz, and Peter Otto. 2011. "Genetic Characterization of a Novel Calicivirus from a Chicken." *Archives of Virology* 156 (7): 1143–50. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-0964-5>.
- Xiao, Tiantian, and Wenhao Zhou. 2020. "The Third Generation Sequencing: The Advanced Approach to Genetic Diseases." *Translational Pediatrics* 9 (2): 163–73. <https://doi.org/10.21037/TP.2020.03.06>.
- Yang, Jian, Fan Yang, Lili Ren, Zhaohui Xiong, Zhiqiang Wu, Jie Dong, Lilian Sun, et al. 2011. "Unbiased Parallel Detection of Viral Pathogens in Clinical Samples by Use of a Metagenomic Approach." *Journal of Clinical Microbiology* 49 (10): 3463–69. <https://doi.org/10.1128/JCM.00273-11>.
- Ye, Jianqiang, Xiaoyan Tian, Quan Xie, Yu Zhang, Yuanzhao Sheng, Zhenwen Zhang, Chengming Wang, et al. 2015. "Avian Gyrovirus 2 DNA in Fowl from Live Poultry Markets and in Healthy Humans, China." *Emerging Infectious Diseases* 21 (8): 1486–88. <https://doi.org/10.3201/eid2108.150203>.
- Yokouchi, Hiroko, Yayoi Fukuoka, Daikichi Mukoyama, Ronie Calugay, Haruko Takeyama, and Tadashi Matsunaga. 2006. "Whole-Metagenome Amplification of a Microbial Community Associated with Scleractinian Coral by Multiple Displacement Amplification Using  $\Phi$ 29 Polymerase." *Environmental Microbiology* 8 (7): 1155–63. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01005.x>.
- Yuasa, N, T Taniguchi, and I Yoshida. 1979. "Isolation and Some Characteristics of an Agent Inducing Anemia in Chicks." *Avian Diseases* 23 (2): 366–85. <https://doi.org/10.1038/srep39783>.
- Zadravec, M., Brigita Slavec, U. Krapež, G. L. Kaján, J. Račnik, Polona Juntes, Rahela

- Juršič Cizerl, Mária Benkő, and Olga Zorman Rojs. 2013. "Inclusion Body Hepatitis (IBH) Outbreak Associated with Fowl Adenovirus Type 8b in Broilers." *Acta Veterinaria* 63 (1): 101–10.  
<https://doi.org/10.2298/AVB1301101Z>.
- Zell, Roland. 2018. "Picornaviridae—the Ever-Growing Virus Family." *Archives of Virology* 163 (2): 299–317. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3614-8>.
- Zhang, Wen, Linlin Li, Xutao Deng, Beatrix Kapusinszky, and Eric Delwart. 2014. "What Is for Dinner? Viral Metagenomics of US Store Bought Beef, Pork, and Chicken." *Virology* 468 (415): 303–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.08.025>.
- Zhang, Yong Zhen, Mang Shi, and Edward C. Holmes. 2018. "Using Metagenomics to Characterize an Expanding Virosphere." *Cell* 172 (6): 1168–72.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.043>.
- Zsak, Laszlo, and Janos Kisary. 1984. "Grouping of Fowl Adenoviruses Based upon the Restriction Patterns of DNA Generated by BamHI and HindIII." *Intervirology* 22 (2): 110–14. 10.1159/000149541.

## 10 Anexo I

### Resultados de los ensamblados con genomas de referencia realizados

Muestra	Especie	Reads Mapeados	Cobertura (%)
361501/B-DNA	AvGyV2	236.283	100
	CAV	1.144.432	100
	GyV4	42.710	100
	GyV3	179.603	100
361501/B-RNA	IBV	3.237	88,8
	CAV	17.261	100
	GyV4	86	100
	IBDV	58	8,7
361501/T-DNA	CAV	892.889	100
	AvGyV2	133.312	100
	GyV3	100.348	100
	GyV4	24.121	100
	FAdV-E	300	46,3
361501/T-RNA	IBV	599.818	100
181601/B-DNA	AvGyV2	4.660	100
	CAV	36.961	100
	FAdV-D	2.890	92,7
181601/B-RNA	Chicken Megrivirus	312	45,3
	Chicken Picornavirus 4	188	18,6
	IBV	7.552	93
182001/TB-DNA	AvGyV2	13.494	99,7
	GaPV	149	82,9
	HCBI8.215 Genomovirus	1.069	42,3
	FAdV-A	2.854	94,7
182001/TB-RNA	ChPV1	8.223	23,8
	SiV-A1	25.433	13,3
182002/TB-DNA	Meleagrid Herpesvirus	682	25,6
182002/TB-RNA	IBDV	392	58
	ChPV1	18.375	12,9
	SiV-A1	7.184	15,8

## 11 Anexo II

### Secuencias nucleotídicas de Fowl aviadenovirus

\*Secuencias obtenidas en el presente trabajo

<b>Número de Acceso / Muestra</b>	<b>Especie (Genotipo)</b>	<b>País</b>	<b>Año</b>
M181601*	FAdV-D	UY	2016
KY012057.1	FAdV-D	CN	2014
MN711789.1	FAdV-D	US	1995
MT104457.1	FAdV-D	ID	2019
MT104458.1	FAdV-D	ID	2019
MN447717.1	FAdV-D	IN	2018
MN537890.1	FAdV-D	IN	2018
MN540445.1	FAdV-D	IN	2018
MN737050.1	FAdV-D	KR	2018
MN737052.1	FAdV-D	KR	2013
MK995482.1	FAdV-D	SA	2017
MK995483.1	FAdV-D	SA	2016
MK995484.1	FAdV-D	SA	2017
MK995485.1	FAdV-D	SA	2018
MK937072.1	FAdV-D	TR	2019
MK572866.1	FAdV-D	US	
MK572867.1	FAdV-D	CH	1998
MK572868.1	FAdV-D	DE	1998
MK572869.1	FAdV-D	DE	2008
MK572870.1	FAdV-D	DE	2008
MK572871.1	FAdV-D	AT	2008
MK572872.1	FAdV-D	AT	2012
MK572873.1	FAdV-D	GB	1971
MK572874.1	FAdV-D	GB	
MK816398.1	FAdV-D	IN	2016
MK816400.1	FAdV-D	IN	2017

MK816404.1	FAdV-D	IN	2017
MF770580.1	FAdV-D	IN	2016
KY229169.1	FAdV-D	BR	2016
KY229171.1	FAdV-D	BR	2016
KY229172.1	FAdV-D	BR	2016
KY229173.1	FAdV-D	BR	2016
KY229174.1	FAdV-D	BR	2016
KY229175.1	FAdV-D	BR	2016
KY229176.1	FAdV-D	BR	2016
KY229178.1	FAdV-D	BR	2016
KY229179.1	FAdV-D	BR	2016
KY229180.1	FAdV-D	BR	2016
KY229181.1	FAdV-D	BR	2016
KY229182.1	FAdV-D	BR	2016
KY229183.1	FAdV-D	BR	2016
KY229184.1	FAdV-D	BR	2016
KY426982.1	FAdV-D	CN	2015
KY426983.1	FAdV-D	CN	2015
KY426985.1	FAdV-D	CN	2015
KY426986.1	FAdV-D	CN	2015
KY426991.1	FAdV-D	CN	2016
MF161434.1	FAdV-D	EC	2016
KP231537.1	FAdV-D	CA	2005
KU310942.1	FAdV-D	CA	2005
KU746335.1	FAdV-D	MX	1995
KX755574.1	FAdV-D	PE	2016
FJ360747.1	FAdV-D	BR	2006
FJ360748.1	FAdV-D	BR	2007
HQ117900.1	FAdV-D	ZA	2008
HQ117902.1	FAdV-D	ZA	2008
FN869957.1	FAdV-D	PL	2009
FN869958.1	FAdV-D	DE	2008
FN869963.1	FAdV-D (D2)	GB	2009

HM592280.1	FAdV-D	IT	2007
FN869957.1	FAdV-D (D3)	PL	2009
FN869958.1	FAdV-D (D3)	DE	2008
FN869959.1	FAdV-D (D3)	AT	2009
FN869960.1	FAdV-D (D3)	PL	2008
FN869961.1	FAdV-D (D2)	HU	2009
FN869962.1	FAdV-D (D2)	DE	2008
AF339918.1	FAdV-D (D4)		
AF339921.1	FAdV-D (D1)		
KY229177.1	FAdV-E	BR	2016
KY229185.1	FAdV-E	BR	2016
KY229170.1	FAdV-E	BR	2016
KY229168.1	FAdV-E	BR	2016
AF508955.1	FAdV-E		
AF508954.2	FAdV-E		
AF508952.2	FAdV-B		
KT717889.1	FAdV-C	US	
NC_015323.1	FAdV-C	CA	2004
AC_000014.1	FAdV-A		
MK050972.1	FAdV-A	CN	2017
182001_TyB*	FAdV-A	UY	2020
NC_001720.1	FAdV-A		
MK572848.1	FAdV-A	GE	2011

**Secuencias nucleotídicas de la región codificante de CAV.**

\*Secuencias obtenidas en el presente trabajo

<b>Número de Acceso</b>	<b>Cepa / Muestra</b>	<b>País</b>	<b>Año</b>
	361501_TRAQUEA*	UY	2015
	361501_BURSA*	UY	2015
	181601_BURSA*	UY	2016
DQ124935	AH6	China	
KU641015	SD1511	China	
JF507715	CIAV89-69	CoreadelSur	
AF527037	BL-5	Malasia	
AF395114	BD-3	Banglades	
AF285882	SMSC-1	Malaysia	
DQ124936	AH4	China	
KJ872513	CAV-10	Argentina	
KJ872514	CAV-18	Argentina	
KY024579	RS/BR/15	Brasil	
AF227982	CAU269/7	Australia	
EF683159	3711/Chicken/Australia	Australia	
U65414	704	Australia	
D31965	82-2	Japon	
DQ991394	01-4201	USA	
	Nobilis P4		
	M14/03	UY	2014
	M06/10B	UY	2010
	421102	UY	2011
	351201	UY	2012
	361402	UY	2014
	141404	UY	2014
	471602	UY	2016
	M34	UY	2005
KP780292	CAV/Vietnam/VP10/13	VietNam	

KP780291	CAV/Vietnam/VP9/13	VietNam	
KX377124	NGP-1	India	
KT276305	IR	Iran	
KJ728827	18	Taiwan	
KX772161	1207PT05/2012	Taiwan	
KJ728828	19	Taiwan	
	M43	Uruguay	2007
AF313470	Del-Ros		
M55918	Cuxhaven-1		

### Secuencias nucleotídicas del gen VP1 de las especies de Gyrovirus.

\*Secuencias obtenidas en el presente trabajo

Número de Acceso / Muestra	Especie	País	Año	Hospedero
181601_BURSA*	CAV	UY	2016	GALLUS
361501_TRAQUEA*	CAV	UY	2015	GALLUS
361501_BURSA*	CAV	UY	2015	GALLUS
KJ872513	CAV	AR	2007	GALLUS
KJ872514	CAV	AR	2007	GALLUS
EF683159	CAV	AU		GALLUS
AF227982	CAV	AU	1988	GALLUS
KY024579	CAV	BR	2015	GALLUS
MG846491	CAV	BR	2015	GALLUS
MN175605	CAV	BR	2016	GALLUS
AM407864	CAV	CN	2004	GALLUS
AM407820	CAV	CN	2005	GALLUS
AM407825	CAV	CN	2005	GALLUS
AM407827	CAV	CN	2005	GALLUS
AM407843	CAV	CN	2005	GALLUS



AM407846	CAV	CN	2005	GALLUS
AM407849	CAV	CN	2005	GALLUS
AM407863	CAV	CN	2005	GALLUS
AM407868	CAV	CN	2005	GALLUS
AM407871	CAV	CN	2005	GALLUS
AM407875	CAV	CN	2005	GALLUS
JX964755	CAV	CN	2006	GALLUS
KF224931	CAV	CN	2011	GALLUS
KF224933	CAV	CN	2011	GALLUS
KF224927	CAV	CN	2012	GALLUS
KF224930	CAV	CN	2012	GALLUS
KF224932	CAV	CN	2012	GALLUS
KF224934	CAV	CN	2012	GALLUS
KF224935	CAV	CN	2012	GALLUS
KF224936	CAV	CN	2012	GALLUS
KF224937	CAV	CN	2012	GALLUS
KF224938	CAV	CN	2012	GALLUS
KM496306	CAV	CN	2013	GALLUS
KM496309	CAV	CN	2013	GALLUS
KM496310	CAV	CN	2013	GALLUS
KM496301	CAV	CN	2014	GALLUS
KM496303	CAV	CN	2014	GALLUS
KM496305	CAV	CN	2014	GALLUS
KU641013	CAV	CN	2014	GALLUS
KU645513	CAV	CN	2014	GALLUS
KU645514	CAV	CN	2014	GALLUS
KU645508	CAV	CN	2015	GALLUS
KU645509	CAV	CN	2015	GALLUS
KU645516	CAV	CN	2015	GALLUS
KU645518	CAV	CN	2015	GALLUS
KU645521	CAV	CN	2015	GALLUS
KU645523	CAV	CN	2015	GALLUS
KU845735	CAV	CN	2015	GALLUS

MH801130	CAV	CN	2017	GALLUS
MK484615	CAV	CN	2018	GALLUS
MK484616	CAV	CN	2018	GALLUS
MG827098	CAV	EG	2015	GALLUS
MG827100	CAV	EG	2017	GALLUS
MH001553	CAV	EG	2017	GALLUS
MH001558	CAV	EG	2017	GALLUS
MH001560	CAV	EG	2017	GALLUS
MH001562	CAV	EG	2017	GALLUS
MH001563	CAV	EG	2017	GALLUS
MH001564	CAV	EG	2017	GALLUS
MH001565	CAV	EG	2017	GALLUS
MH001566	CAV	EG	2017	GALLUS
MH001567	CAV	EG	2017	GALLUS
MH001568	CAV	EG	2017	GALLUS
FJ883781	CAV	IN	2006	GALLUS
FJ896818	CAV	IN	2006	GALLUS
FJ883782	CAV	IN	2007	GALLUS
KJ620989	CAV	IN	2008	GALLUS
JF712621	CAV	IN	2009	GALLUS
KP120758	CAV	IN	2009	GALLUS
KP090251	CAV	IN	2010	GALLUS
KP120755	CAV	IN	2010	GALLUS
KP120759	CAV	IN	2010	GALLUS
KP120760	CAV	IN	2010	GALLUS
KP090256	CAV	IN	2011	GALLUS
KX377124	CAV	IN	2012	GALLUS
KX377129	CAV	IN	2015	GALLUS
KX377130	CAV	IN	2015	GALLUS
MG720294	CAV	IN	2017	GALLUS
KM226337	CAV	JP	1976	GALLUS
KJ004669	CAV	JP	1977	GALLUS
KM226338	CAV	JP	1977	GALLUS

KJ004667	CAV	JP	1979	GALLUS
KJ004668	CAV	JP	1980	GALLUS
D31965	CAV	JP	1982	GALLUS
MK624991	CAV	JP	2017	GALLUS
AJ888522	CAV	NE	2002	GALLUS
AJ888528	CAV	NE	2002	GALLUS
AJ888529	CAV	NE	2002	GALLUS
AJ888521	CAV	NE	2004	GALLUS
AJ888524	CAV	NE	2004	GALLUS
AJ888525	CAV	NE	2004	GALLUS
KM458172	CAV	PL	2013	GALLUS
KM458173	CAV	PL	2013	GALLUS
KM458174	CAV	PL	2013	GALLUS
KM458175	CAV	PL	2013	GALLUS
KM458176	CAV	PL	2013	GALLUS
KM458177	CAV	PL	2013	GALLUS
KM458178	CAV	PL	2013	GALLUS
KM458179	CAV	PL	2013	GALLUS
KM458181	CAV	PL	2013	GALLUS
KM458182	CAV	PL	2013	GALLUS
KM458184	CAV	PL	2013	GALLUS
KM458183	CAV	PL	2014	GALLUS
KU095829	CAV	TN	2009	GALLUS
KJ728814	CAV	TW	2012	GALLUS
KJ728815	CAV	TW	2012	GALLUS
KJ728818	CAV	TW	2012	GALLUS
KJ728819	CAV	TW	2012	GALLUS
KJ728820	CAV	TW	2012	GALLUS
KJ728821	CAV	TW	2012	GALLUS
KJ728822	CAV	TW	2012	GALLUS
KJ728823	CAV	TW	2012	GALLUS
KJ728825	CAV	TW	2012	GALLUS
KJ728826	CAV	TW	2012	GALLUS

KJ728827	CAV	TW	2012	GALLUS
KJ728828	CAV	TW	2012	GALLUS
KJ728829	CAV	TW	2012	GALLUS
KJ728830	CAV	TW	2012	GALLUS
MK376315	CAV	TW	2016	GALLUS
MK376316	CAV	TW	2016	GALLUS
MK386570	CAV	TW	2016	GALLUS
UM23	CAV	UY	2005	GALLUS
UM34	CAV	UY	2005	GALLUS
UM43	CAV	UY	2007	GALLUS
UM05/09	CAV	UY	2009	GALLUS
UM06/10B	CAV	UY	2010	GALLUS
U421102	CAV	UY	2011	GALLUS
U421103	CAV	UY	2011	GALLUS
U351201	CAV	UY	2012	GALLUS
U141404	CAV	UY	2014	GALLUS
U171401	CAV	UY	2014	GALLUS
U221401	CAV	UY	2014	GALLUS
U221402	CAV	UY	2014	GALLUS
U361401	CAV	UY	2014	GALLUS
U361402	CAV	UY	2014	GALLUS
UM14/03	CAV	UY	2014	GALLUS
U171502	CAV	UY	2015	GALLUS
U201502	CAV	UY	2015	GALLUS
U211501	CAV	UY	2015	GALLUS
U451502	CAV	UY	2015	GALLUS
U051601	CAV	UY	2016	GALLUS
U071601	CAV	UY	2016	GALLUS
U471602	CAV	UY	2016	GALLUS
U471604	CAV	UY	2016	GALLUS
KP780287	CAV	VN	2013	GALLUS
KP780290	CAV	VN	2013	GALLUS
MH536105	CAV	VN	2017	GALLUS

MK423866	CAV	VN	2018	GALLUS
MK423867	CAV	VN	2018	GALLUS
MK423868	CAV	VN	2018	GALLUS
MK423869	CAV	VN	2018	GALLUS
MK423870	CAV	VN	2018	GALLUS
MK423871	CAV	VN	2018	GALLUS
MK423872	CAV	VN	2018	GALLUS
MK423874	CAV	VN	2018	GALLUS
FR823283.1	GyV1	FR	2009	HUMAN
KJ452214.1	GyV1	HU	2011	MUSTELA
181601_BURSA*	AvGyV2	UY	2016	GALLUS
182001_TyB*	AvGyV2	UY	2020	GALLUS
361501_TRAQUEA*	AvGyV2	UY	2015	GALLUS
361501_BURSA*	AvGyV2	UY	2015	GALLUS
NC_015396.1	AvGyV2	BR	2006	GALLUS
HM590588.1	AvGyV2	BR	2006	GALLUS
KY039279.1	AvGyV2	BR	2015	GALLUS
MG846492.1	AvGyV2	BR	2015	GALLUS
JQ690763.1	AvGyV2	CN		HUMAN
KX708506.1	AvGyV2	CN	2015	GALLUS
KX708507.1	AvGyV2	CN	2015	GALLUS
KX708508.1	AvGyV2	CN	2015	GALLUS
KX708509.1	AvGyV2	CN	2015	GALLUS
KX708510.1	AvGyV2	CN	2015	GALLUS
KX708511.1	AvGyV2	CN	2015	GALLUS
KX708512.1	AvGyV2	CN	2015	GALLUS
KX708513.1	AvGyV2	CN	2015	GALLUS
KX708514.1	AvGyV2	CN	2015	GALLUS
KX708515.1	AvGyV2	CN	2015	GALLUS
KX708516.1	AvGyV2	CN	2015	GALLUS
KX708517.1	AvGyV2	CN	2015	GALLUS
KX708522.1	AvGyV2	CN	2015	GALLUS
MK089245.1	AvGyV2	CN	2016	CAT

KX708518.1	AvGyV2	CN	2016	GALLUS
KX708519.1	AvGyV2	CN	2016	GALLUS
KX708520.1	AvGyV2	CN	2016	GALLUS
KX708521.1	AvGyV2	CN	2016	GALLUS
MK089244.1	AvGyV2	CN	2017	CAT
MK089246.1	AvGyV2	CN	2017	CAT
MK840982.1	AvGyV2	CN	2018	SNAKE
KJ452213.1	AvGyV2	HU	2011	FERRET
KU168250.1	AvGyV2	IT	2014	GALLUS
361501_BURSA*	GyV3	UY	2015	GALLUS
361501_TRAQUEA*	GyV3	UY	2015	GALLUS
MN175607	GyV3	BR	2016	NEOGNATH
NC017091	GyV3	CH	2008	HUMAN
MK089247.1	GyV3	CN	2017	CAT
MK089248.1	GyV3	CN	2017	CAT
MK089249.1	GyV3	CN	2017	CAT
MG366592.1	GyV3	CN	2017	GALLUS
KM348009.1	GyV3	HU	2011	MUSTELA
361501_BURSA*	GyV4	UY	2015	GALLUS
361501_TRAQUEA*	GyV4	UY	2015	GALLUS
MG846493.1	GyV4	BR	2015	GALLUS
MG846494.1	GyV4	BR	2015	GALLUS
JX310702.1	GyV4	CN	2011	HUMAN
NC018401.1	GyV4	CN	2011	HUMAN
KJ452215.1	GyV4	HU	2011	MUSTELA
KY024580.1	Gyv4	BR	2015	GALLUS

**Secuencias nucleotídicas de las especies de IBDV.**

\*Secuencias obtenidas en el presente trabajo

<b>Número de Acceso</b>	<b>Strain</b>	<b>País</b>
	182002/UY/2020*	Uruguay
AY029166	Irwin_Moulthrop	USA
D00499	STC	USA
AF279288	2512	USA
JF811920	A-BH83	Brazil
	221401	Uruguay
AF499929	D78	USA
AJ310185	CT	France
	281301	Uruguay
	291301	Uruguay
	071601	Uruguay
	251501	Uruguay
M64285	A/DEL	USA
X54858	E/DEL	USA
AY368653	GLS	USA
AF498635	U-28	USA
Y14956	89163	France
AF240686	D6948	Netherlands
X92760	UK661	United Kingdom
L42284	KS	Israel
KP878300	CAT278-09	Spain
JX429983	GAEM1941	Netherlands
JX429984	GAEM1942	Netherlands
JX429985	GAEM1943	Netherlands
JX429986	GAEM1944	Netherlands
JX429987	GAEM1945	Netherlands
JX429988	GAEM1946	Netherlands
Z97002	IBDVRF-5/94	Russia

MF142577	772_KSA	Saudi Arabia
MF142571	751_KSA	Saudi Arabia
JN852985	ITA-01	Italy
JN852986	ITA-02	Italy
AF498627	C-278	Mexico
DQ916210	Mexico04M101	Mexico
DQ916211	Mexico04M83	Mexico
JQ340022	Mexico11M74	Mexico
MF142575	760	Mexico
	221202	Uruguay
	271201	Uruguay
	301201	Uruguay
	341201	Uruguay
	351201	Uruguay
	141403	Uruguay
	171401	Uruguay
	131602	Uruguay
	131603	Uruguay
	131604	Uruguay
	131605	Uruguay
	181601	Uruguay
KM659895	M04/09	Uruguay
KM659887	171101	Uruguay
KM659893	421101	Uruguay
AJ508762	80/GA	Poland
KU640388	SA-02/14	Saudi Arabia
LC136880	TY2	Japan
Z97013	IBDVRF-8/96	Russia
AF281234	H2	USA
DQ916182	Colombia01_05	Colombia
KM659888	C1IBDV	Argentina
EU544168	B8	Brazil
HM241170	A05-HL-144	South Korea



AF305739	586	Puerto Rico
MF142569	741	UAE
AF381005	N1/99	Australia
AF069577	V877	Australia
AJ878908	002/73	Australia
AF148080	06/95	Australia
AF381011	05-5	Australia
AF381010	C-1	Australia
AF148081	08/95	Australia

### Secuencias nucleotídicas de las especies de Chicken Calicivirus.

\*Secuencias obtenidas en el presente trabajo

Número de Acceso	Strain / Muestra	País
182001	182001/Chicken_calicivirus/UY/2020*	UY
HQ010042.1	Calicivirus_chicken/V0021/Bayern/2004	GE
KM254170.1	CaliciD62/2013	KR
KM254171.1	CaliciQ45/2013	KR
JQ347528.1	chicken/L11038	GE
JQ347529.1	chicken/L11039	GE
HQ616593.2	chicken/V0013/Bayern/2004	GE
HQ616594.2	chicken/V0027/Bayern/2004	GE
JQ347525.1	chicken/F10026b	GE
JQ347526.1	chicken/F10034b	GE
JQ347530.1	chicken/L11041	GE
MN810875.1	GA/1479/2004	USA
MN810874.1	GA/1478/2003	USA
MH992118.1	ChCV-052	BR
MG846432.1	RS/BR/15/4S-2	BR
MG846433.1	RS/BR/15/6R	BR
NC_033081.1	RS/BR/2015	BR

KY120883.1	RS/BR/2015	BR
MG846434.1	RS/BR/15/1R-1	BR

### Secuencias nucleotídicas de las especies de IBV

\*Secuencias obtenidas en el presente trabajo

Número de Acceso	Strain / Muestra	Año
	181601_BURSA_UY*	2016
	361501_TRAQUEA_UY*	2015
	361501_BURSA_UY*	2015
M95169	Beaudette	1937
GU393336	Holte	1954
L14069	Gray	1960
L18988	Holte	1962
U29522	N1/62	1962
U29519	Vic_s	1962
AY606320	TP/64	1964
JQ964061	L165	1965
M99482	ARK99	1973
AF151954	strainB	1970s
JX182775	UFMG/G	1975
X52084	D3896	1978
EU914938	Moroccan-G/83	1983
X87238	B1648	1984
FJ807932	B4	1986
KJ941019	IZO28/86	1986
AF419315	CA/Machado/88	1988
AY296744	JP8127	1993
KC577395	58HeN-93II	1993
AF349621	Qumv	1996
DQ064806	Spain/97/314	1997

KC577382	40GDGZ-97I	1997
AF093796	Variant_2	1998
KF757447	V13	1998
EU925393	CA/1737/04	2004
FN182243	NGA/B401	2006
GU301925	Georgia_08	2008
M21971	D1466	1979
U29450	N1/88	1988
U77298	DE/072/92	1992
DQ059618	N402	2002
GQ265948	TC07-2	2007
KM658245	UY/09/CA/01	2009
KM658233	UY/11/CA/09	2011
KM658234	UY/11/CA/11	2011
KM658235	UY/11/CA/12	2011
KM658236	UY/11/CA/13	2011
KM658237	UY/11/CA/18	2011
	UY/15/CA/36-1	2015
	UY/15/CA/17-2	2015
KM658246	AR/09/BA/29	2009
KM658247	AR/09/BA/34	2009
KM658248	AR/09/BA/35	2009
KM658249	AR/09/BA/36	2009
GU393339.1	IBV/Brasil/351/1984	
JX182778.1	UFMG/11.1	
JX182787.1	UFMG/283	
JX182785.1	UFMG/297	
JX182786.1	UFMG/290	
JX182777.1	UFMG/12.2	
JX182784.1	UFMG/351	
MF043936.1	12.216	
MF043934.1	12.078	
MF043935.1	12.080	

## Secuencias nucleotídicas de las especies de Genomovirus

\*Secuencias obtenidas en el presente trabajo

Número de Acceso	Strain / Muestra
	182002_genomo_UY_2020*
	182001_genomo_UY_2020*
MN379601.1	111-998 Chicken genomovirus mg2 75
MN379602.1	108-1031 Chicken genomovirus mg2 77
MN379603.1	263-1171 Chicken genomovirus mg4 1107
MN379604.1	138-1076 Chicken genomovirus mg4 1165
MN379605.1	113-1048 Chicken genomovirus mg4 1173
MN379606.1	164-1051 Chicken genomovirus mg4 1196
MN379607.1	108-1037 Chicken genomovirus mg4 1210
MN379608.1	129-1025 Chicken genomovirus mg4 1218
MN379609.1	110-1021 Chicken genomovirus mg4 1247
MN379610.1	103-1014 Chicken genomovirus mg4 1259
MN379611.1	127-1047 Chicken genomovirus mg7 70
MN379612.1	117-1052 Chicken genomovirus mg7 73
MN379613.1	108-1037 Chicken genomovirus mg7 74
MN379614.1	100-1029 Chicken genomovirus mg7 78
MN379615.1	123-1055 Chicken genomovirus mg8 401
MN379616.1	129-1016 Chicken genomovirus mg8 416
MN379617.1	119-1051 Chicken genomovirus mg2 274u
NC_024689.1	110-1045 HCBI8.215
NC_013116.1	96-1034 SsHADV-1
KT862242.1	82-1071 Faeces associated gemycirculavirus17 isolate 27_Fec16497_chicken
KT862241.1	94-1035 Faeces associated gemycirculavirus4 isolate 27_Fec1_chicken
KT862240.1	109-1026 Sewage associated gemycirculavirus3 isolate 27_BS14149_chicken
KT862243.1	191-1114 Faeces associated gemycirculavirus20 isolate 27_Fec79971_chicken

## Secuencias nucleotídicas de las especies de Aveparvovirus

\*Secuencias obtenidas en el presente trabajo

Número de Acceso	Especie	Strain / Muestra
	Chicken Parvovirus	182001_TB_UY_2020*
MG602510.1	Chicken Parvovirus	GX-CH-PV-20
MG602511.1	Chicken Parvovirus	GX-CH-PV-21
MG602512.1	Chicken Parvovirus	GX-CH-PV-22
MG602513.1	Chicken Parvovirus	GX-CH-PV-23
MG602515.1	Chicken Parvovirus	GX-CH-PV-25
MG602516.1	Chicken Parvovirus	GX-CH-PV-26
MG602517.1	Chicken Parvovirus	GX-CH-PV-27
MG602520.1	Chicken Parvovirus	GX-CH-PV-30
MG602519.1	Chicken Parvovirus	GX-CH-PV-29
KX084400.1	Chicken Parvovirus	CH-CH-PV-2
KX084401.1	Chicken Parvovirus	CH-CH-PV-4
KX133416.1	Chicken Parvovirus	GX-CH-PV-9
KX133421.1	Chicken Parvovirus	GX-CH-PV-14
KX133422.1	Chicken Parvovirus	GX-CH-PV-15
KX133424.1	Chicken Parvovirus	GX-CH-PV-17
KX133425.1	Chicken Parvovirus	GX-CH-PV-18
KX133427.1	Chicken Parvovirus	GX-CH-PV-6
KJ486490.1	Chicken Parvovirus	ADL120035
KJ486491.1	Chicken Parvovirus	ADL120686
NC_024452.1	Chicken parvovirus	ABU-P1
MN782010.1	Galliform aveparvovirus 1	GA/1478/2003
MN782009.1	Galliform aveparvovirus 1	GA/1477/2005
MN782008.1	Galliform aveparvovirus 1	GA/1472/2004
MG846440.1	Galliform aveparvovirus 1	RS/BR/15/1R
MG846439.1	Galliform aveparvovirus 1	RS/BR/15/4R
MG846438.1	Galliform aveparvovirus 1	RS/BR/15/6S
KY069111.1	Galliform aveparvovirus 1	RS/BR/2015
KU569162.1	Galliform aveparvovirus 1	IPV

KX084397.1	Turkey parvovirus	GX-Tu-PV-2
------------	-------------------	------------

### Secuencias nucleotídicas de las especies de Megrivirus

\*Secuencias obtenidas en el presente trabajo

Número de Acceso	Strain / Muestra
NC_039235.1	chicken/B21-CHV/2012/HUN
	181601_megrivirus_UY_2016*
MG846461.1	RS/BR/2015/1R-1
MG846463.1	RS/BR/2015/2R
MG846464.1	RS/BR/2015/5R-
MG846465.1	RS/BR/2015/3R
KF961187.1	chicken/CHK-IV-CHV/2013/HUN
MH125198.1	Karoon
HM751199.1	Turkey_hepatitis_virus 2993D
MH806866.1	Chicken/MG9567/Brazil/2012
NC_024768.1	Chicken picornavirus 4 isolate 5C
KF979336.1	Chicken picornavirus 5 isolate 27C
MW054505.1	chicken/NLD/2019/V_M_013
MW054506.1	chicken/NLD/2019/V_M_014
MW054507.1	chicken/NLD/2019/V_M_015
MW054508.1	chicken/NLD/2019/V_M_016
MW054509.1	chicken/NLD/2019/V_M_017
MW054510.1	chicken/NLD/2019/V_M_018
MW054511.1	chicken/NLD/2019/V_M_019