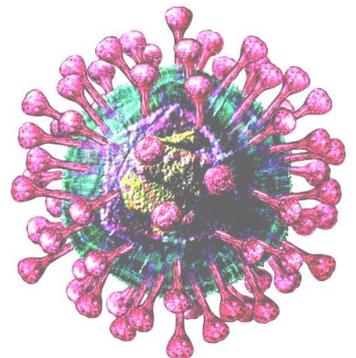
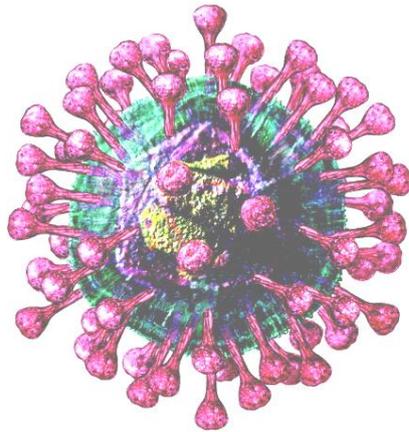
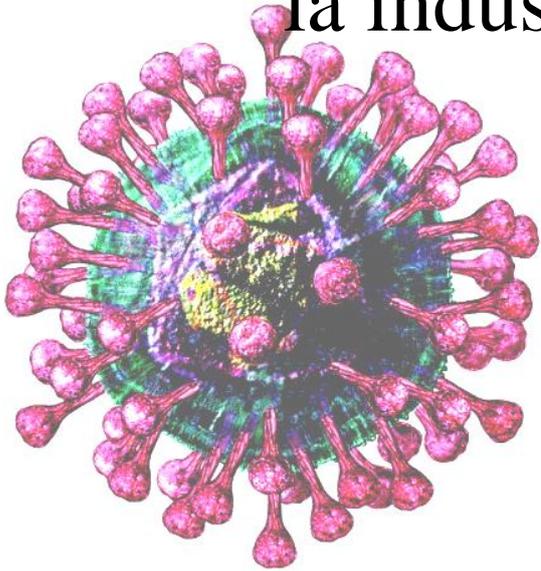


Diagnóstico y caracterización genética del virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar en la industria avícola regional



Lic. Ana Marandino

Tesis de Maestría PEDECIBA Biología

Subárea Genética

Orientador: Dr. Ruben Pérez

Co-orientador: Dr. Ariel Pereda

Uruguay, 2013

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	4
1. Introducción	
1.1. Avicultura: industria sensible a los problemas sanitarios	6
1.2. Virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar: clasificación taxonómica	7
1.3. Composición viral de IBV	8
1.4. Ciclo replicativo de IBV	9
1.5. Caracterización funcional y genética de IBV	16
1.6. Mecanismos de variabilidad de IBV	17
1.7. Bronquitis Infecciosa Aviar	18
1.8. Herramientas de control de la Bronquitis Infecciosa Aviar	21
1.9. Antecedentes del estudio de IBV en Uruguay y la región	21
2. Objetivos	22
3. Hipótesis de Trabajo	22
4. Materiales y Métodos	
4.1. Muestras	23
4.2. Extracción del genoma viral	23
4.3. Retrotranscripción	23
4.4. Estandarización del ensayo de PCR en tiempo real	24
4.5. Diagnóstico de muestras de campo por PCR en tiempo real	26
4.6. Ensayo de cuantificación absoluta	27
4.7. Amplificación de la región codificante de S1	31
4.8. Amplificación del gen N	32
4.9. Visualización de los productos de PCR	33
4.10. Purificación de los amplicones	33
4.11. Secuenciación	33
4.12. Análisis bioinformáticos	33
5. Resultados	

5.1. Estandarización del ensayo de PCR en tiempo real	38
5.2. Aplicación del ensayo de PCR en tiempo real en muestras de campo	39
5.3. Ensayo de cuantificación absoluta	41
5.4. Caracterización genética de las cepas de IBV sudamericanas basada en la región codificante de S1	43
5.5. Caracterización genética de las cepas de IBV sudamericanas basada en la secuencia codificante del gen N	54
5.6. Análisis de coalescencia	58
6. Discusión	
6.1. Ensayo de diagnóstico y cuantificación de IBV basado en PCR en tiempo real	62
6.2. Caracterización genética de las cepas de IBV circulantes en la industria avícola sudamericana	64
7. Conclusiones	77
8. Perspectivas	78
9. Bibliografía	79
10. Anexos	
10.1. Anexo 1: Protocolos	88
10.2. Anexo 2: Secuencias	97
10.3. Anexo 3: Filogenias basadas en secuencias parciales de S1	105

Abreviaturas

A/SII: Asia/Sudamérica II

ADN: Acido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ARN: Acido ribonucleico

Ct: ciclo umbral

CV: coeficiente de variación

E: eficiencia

E: Pequeña Proteína de Membrana

FAM: 6-carboxifluoresceína

g: gramos

HPD: intervalo de confianza

HVR: región hipervariable

IB: Bronquitis Infecciosa

IBV: virus de la Bronquitis Infecciosa

IRES: internal ribosomal entry site

L: secuencia líder

LOQ: límite de cuantificación

LT: largo del transcripto

M: Glicoproteína Integral de Membrana

MCMC: cadenas de Markov Monte Carlo

MEGA: Molecular Evolutionary Genetic Analysis

N: Proteína de Nucleocápside

NA: número de Avogadro

ng: nanogramos

nsp: proteína no estructural

°C: grados centígrados

OIE: Organización Internacional de Epizootias

ORF: marco abierto de lectura

PAST: Paleontological Statistics

pb: pares de bases

PDD: distribución de densidad de probabilidad

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

R²: coeficiente de determinación

RT: Retrotranscripción

RTC: complejo de replicación/transcripción

S: Glicoproteína de Superficie

SI: Sudamérica I

SPF: libre de patógenos específicos

TAMRA: tetrametilrodamina

tMRCA: edad del ancestro común más reciente

TRS: secuencia reguladora de la transcripción

UTR: región no traducida

VIC: 2'-cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceina

μg: microgramo

μL: microlitro

Resumen

El virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV) es responsable de una de las patologías más problemáticas de la avicultura industrial mundial. Para controlar adecuadamente la enfermedad se necesita un conocimiento genético detallado de las cepas y variantes locales que permita desarrollar métodos de diagnóstico y tipificación específicos, así como diseñar planes de vacunación efectivos para mantener la sanidad aviar. IBV (familia Coronaviridae) es un virus envuelto y con un genoma de ARN simple hebra, de polaridad positiva y 27,6 kb de longitud. Desde su descripción en los años 30, se han identificado decenas de variantes genéticas o genotipos de IBV circulando en el mundo. La caracterización genética se realiza principalmente mediante el análisis de la secuencia codificante de la porción S1 de la Glicoproteína de Superficie del virus, donde residen los principales sitios antigénicos. Más recientemente, también se ha comenzado a analizar el gen que codifica para la Nucleoproteína (N) porque cumple cierto rol en la inmunidad protectora. En Sudamérica (Argentina, Brasil y Colombia) se han caracterizado genéticamente cepas de IBV utilizando secuencias parciales de S1, pero hasta la fecha no existen publicaciones que analicen secuencias completas de S1 o N. El objetivo de esta tesis fue diagnosticar y caracterizar genéticamente cepas de campo de IBV que circulan en la industria avícola regional. Durante la investigación se estandarizó e implementó una metodología de diagnóstico molecular de IBV basada en PCR en tiempo real. A partir de esta metodología se estandarizó un ensayo de cuantificación absoluta de la carga viral, que demostró un excelente desempeño analítico de la metodología de diagnóstico. Para la caracterización genética se amplificó y secuenció la región completa de S1 y el gen N de 25 cepas uruguayas y argentinas de IBV. Los estudios filogenéticos realizados con la secuencia de S1, permitieron identificar dos genotipos circulantes en la región, los cuales denominamos Sudamérica I (SI) y Asia Sudamérica II (A/SII). El genotipo SI agrupa cepas sudamericanas que circulan en Argentina, Brasil y Uruguay, mientras que el genotipo A/SII está constituido por cepas argentinas y uruguayas, y variantes asiáticas de un grupo genético descrito en China y denominado CK/CH/LDL/97I. El análisis de secuencias parciales de S1 confirmó que en Brasil circula únicamente el genotipo SI, mientras que en Colombia y Chile se detectaron cepas del genotipo A/SII. La recombinación habría tenido un rol relevante en la evolución de

las cepas sudamericanas. Utilizando aproximaciones bioinformáticas, se detectó un evento de recombinación intra-génico en una cepa argentina, con un sitio de recombinación en el interior del gen S. Además, las variantes sudamericanas del genotipo A/SII serían el resultado de un evento de recombinación entre una variante asiática del tipo CK/CH/LDL/97I y una variante del genotipo SI. Los análisis de coalescencia sugieren que el genotipo SI emergió en Sudamérica alrededor de 1968, mientras que el genotipo A/SII se habría originado en Asia alrededor de 1985. La circulación del genotipo A/SII en Sudamérica sería consecuencia de un evento de invasión intercontinental, revelando una sorprendente capacidad de dispersión de este genotipo. Los análisis de coalescencia indicaron también que los genotipos sudamericanos tienen tasas de sustitución elevadas, del orden de 10^{-3} sustituciones/sitio/año. Los análisis genéticos comparativos entre las cepas de campo analizadas y las cepas vacunales sugieren un bajo nivel de protección cruzada entre los genotipos sudamericanos y la cepa Massachusetts, única cepa vacunal autorizada en Uruguay y en la mayoría de los países de América del Sur. Nuestro hallazgo sugieren que las cepas sudamericanas de IBV presentan una notoria variabilidad genética que refleja una dinámica compleja de este virus en la región; los dos genotipos (SI y A/SII) tienen diferente historia evolutiva y se han expandido geográficamente en forma diferencial. Además, la divergencia que presentan estos genotipos con respecto a la cepa vacunal, sustentan la necesidad de evaluar la utilización de otras vacunas comerciales disponibles en el mercado para inmunizar a las granjas avícolas sudamericanas contra IBV.

1. Introducción

1.1. Avicultura: industria sensible a los problemas sanitarios

La avicultura industrial tiene como principal objetivo la cría de aves para la producción de carne y huevos a gran escala. Esta industria viene experimentando a través de los años un crecimiento sostenido a nivel mundial. En la primera década del 2000, la producción de carne de ave tuvo un crecimiento muy superior al resto de las carnes (FAO, 2010). En este período, su producción se incrementó un 37,19 %, mientras que la carne de cerdo y la vacuna lo hicieron un 17,67 % y un 10,83 %, respectivamente. El liderazgo de crecimiento alcanzado por la industria avícola se debe, en gran medida, al poderoso impulso productivo de esta cadena de valor (Desouzart, 2009). El desarrollo y la transferencia de tecnologías de producción, faena y elaboración, han mejorado la inocuidad y eficiencia de los productos avícolas, satisfaciendo las exigencias de la demanda y estimulando el ensamblaje de grandes unidades productivas.

El desarrollo de la industria avícola se evidencia en algunos países sudamericanos como Brasil y Argentina, observándose tasas de crecimiento que promedian el 7.4 % anual. De acuerdo a los especialistas, este incremento responde a la intervención de países asiáticos en la demanda de productos, a la intensificación e incorporación de tecnología, a su integración vertical eficiente, al mejoramiento continuo de los sistemas de vigilancia sanitaria y, quizás más importante, al estatus sanitario que ostentan varios países sudamericanos para ingresar a mercados exigentes (Desouzart, 2009; Aho, 2011). La industria también se está desarrollando en Uruguay, constatándose en el 2012 un incremento del volumen de producción del 5 % respecto al año anterior (Errea, 2012).

La sanidad de los lotes y de las granjas es uno de los principales factores que inciden en la competitividad de la industria avícola. La cría intensiva a la que son sometidas las aves en la actualidad favorece la emergencia de patógenos difíciles de controlar e incrementa notoriamente la incidencia de los problemas sanitarios. En la 63^{ra} Sesión General de la OIE la enfermedad de Bronquitis Infecciosa (IB), causada por el virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV), fue declarada como una de las afecciones más problemáticas de la avicultura industrial, debido a que tiene distribución mundial y requiere de un control permanente. Para

controlar adecuadamente a IBV se necesita un conocimiento genético detallado de las cepas y variantes locales que permita desarrollar métodos de diagnóstico y tipificación específicos, así como diseñar planes de vacunación efectivos para mantener la sanidad de las aves.

1.2. Virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar: clasificación taxonómica

IBV pertenece a la familia *Coronaviridae* del orden *Nidovirales*. Las cuatro familias que forman este orden, *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Toroviridae* y *Roniviridae*, comparten la disposición de los marcos abiertos de lectura dentro de sus genomas y la presencia en las células infectadas de múltiples ARNm subgenómicos anidados y truncados en el extremo 5'.

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) divide a los coronavirus en cuatro géneros, Alfacoronavirus, Betacoronavirus, Gamacoronavirus (dentro del cual se encuentra IBV) y Deltacoronavirus. Esta clasificación se basa en análisis filogenéticos y en cálculos de distancias evolutivas de siete dominios altamente conservados de los genes virales (Figura 1) (de Groot et al., 2012; Lauber & Gorbalenya, 2012).



Figura 1. Árbol filogenético basado en el gen viral más conservado (gen 1). Se incluyen 21 virus que representan la diversidad de especies de los coronavirus. Alfacoronavirus 1 (Alpha-CoV1), Coronavirus Humano 229E (HCoV-229E), Coronavirus Humano NL63 (HCoV-NL63), Coronavirus del Murciélago Miniopterus 1 (BtCoV-1AB), Coronavirus del Murciélago Miniopterus HKU8 (BtCoV-HKU8), Virus de la Diarrea Epidémica Porcina (PED), Coronavirus del Murciélago Rhinolophus HKU2 (BtCoV-HKU2), Coronavirus del Murciélago Scotophilus 512 (BtCoV-512), Betacoronavirus 1 (Beta-cov1), Coronavirus Humano HKU1 (HCoV-HKU1), Virus de la Hepatitis del Ratón (MHV), Coronavirus del Murciélago

Typonycteris HKU4 (BtCoV-HKU4), Coronavirus del Murciélago Pipistrellus HKU5 (BtCoV-HKU5), Coronavirus del Murciélago Rousettus HKU9 (BtCoV-HKU9), Coronavirus Asociado al Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV), Coronavirus Asociado al Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo Humano (HCoV-EMC/2012), Virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), Coronavirus de la Ballena Beluga SW1 (BtCoV-SW1), Coronavirus del Bulbul HKU11 (ACoV-HKU11), Coronavirus del Zorzal HKU12 (ACoV-HKU12), y Coronavirus del Munia HKU13 (ACoVHKU13). Tomado de van Boheemen et al. (2012).

1.3. Composición Viral de IBV

1.3.1. Genoma viral

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

Al igual que el resto de los Coronavirus, IBV posee un set de genes esenciales, que codifican para las proteínas estructurales y las proteínas asociadas a la replicación y transcripción viral, que se encuentran en un orden invariable en todos los miembros de la familia *Coronaviridae* (Lai et al., 1997). IBV contiene además un grupo de genes accesorios, que difieren entre los diferentes coronavirus, que codifican para pequeñas proteínas no estructurales de función desconocida (3a, 3b, 5a y 5b) (Weiss et al., 2005) (Figura 2).

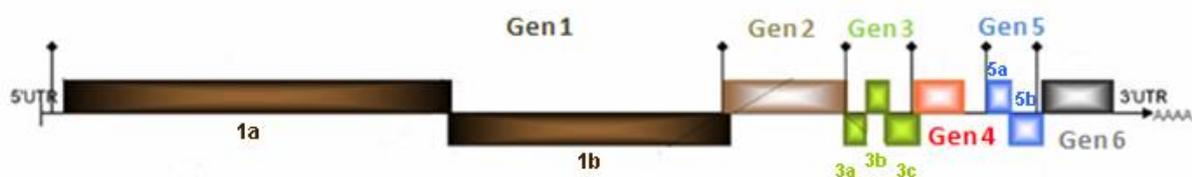


Figura 2. Representación esquemática del genoma de IBV. Este genoma tiene seis genes, tres de los cuales poseen más de un marco abierto de lectura. El gen 1 codifica para proteínas asociadas a la transcripción y replicación de los genes virales. El gen 2 codifica para la Glicoproteína de Superficie. El gen 3 codifica para proteínas no estructurales (ORFs 3a y 3b) y para la Pequeña Proteína de Membrana (ORF 3c). El gen 4 codifica para la Glicoproteína Integral de Membrana. El gen 5 codifica para proteínas no estructurales. El gen 6 codifica para la Proteína de Nucleocápside. Tomada y modificada de Ammayappan et al. (2008).

1.3.2. Envoltura viral

IBV es un virus pleomórfico (80-120 nm) que se halla rodeado por una bicapa lipídica con proyecciones superficiales denominadas espículas (Berry et al., 1964). Esta envoltura viral tiene apariencia de corona cuando se observa el virus al microscopio electrónico (Figura 3A), de donde deriva el nombre de la familia.

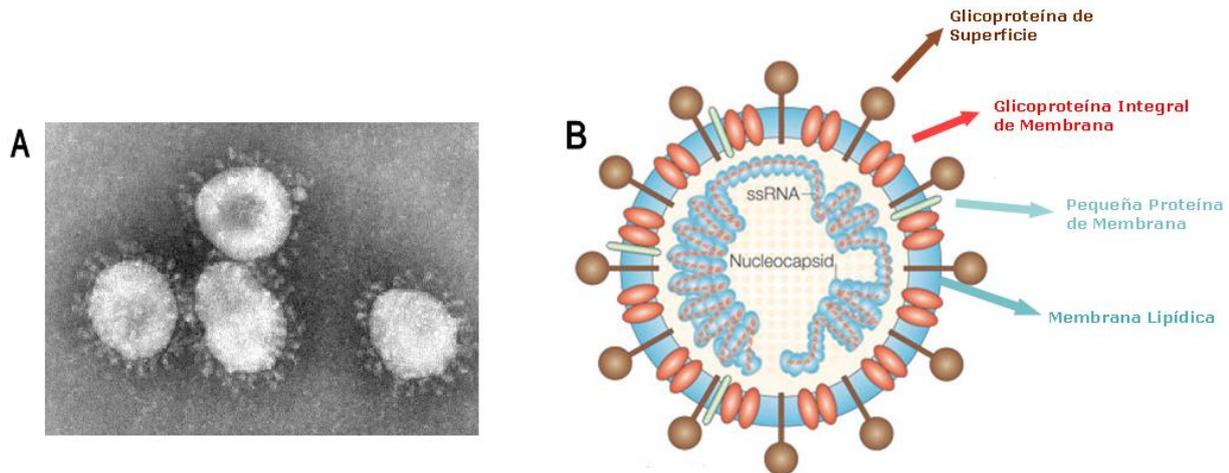


Figura 3. A. Fotografía de microscopía electrónica de IBV. B. Representación esquemática de la partícula viral. Se indican los elementos estructurales de relevancia. Imagen tomada y modificada de www.nature.com.

1.3.3. Proteínas estructurales

IBV posee cuatro proteínas estructurales: Glicoproteína de Superficie, Glicoproteína Integral de Membrana, Proteína Pequeña de Membrana y Proteína de Nucleocápside (Figura 3B).

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

La proteína S es codificada en forma de un precursor proteico (S_0), que es clivado post-traduccionalmente en S1 y S2 durante el primer paso de la infección (Vennema et al., 1990). Este clivaje es esencial para que ocurra la fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal.

Los modelos estructurales indican que tres moléculas de S forman las espículas. Los dominios S1 constituyen los bulbos de la espícula, mientras que los dominios S2 forman un tallo espiralado mediante la interacción de las regiones HR (*heptad repeat*). Las regiones HR son repetidos de siete aminoácidos, ampliamente distribuidas en las proteínas de fusión virales, que median la interacción entre proteínas (Figura 4).

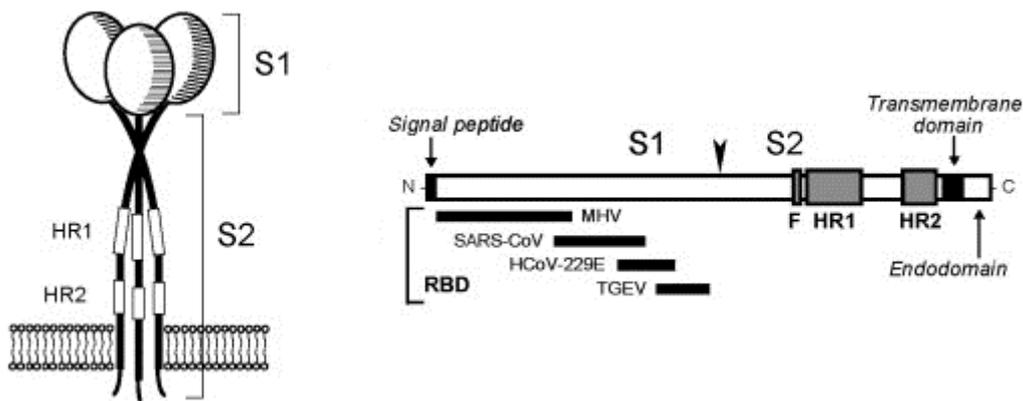


Figura 4. Izquierda: modelo del homotrímero de la proteína S. Derecha: mapa lineal de la proteína S en donde se muestra la porción amino terminal S1 y carboxilo terminal S2. La punta de flecha indica el sitio de clivaje S1-S2. En S1 se indica el péptido señal (*signal peptide*) y los dominios de unión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

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

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

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

constituido por un core o núcleo central, con una estructura tridimensional de hoja β plegada (Figura 5).

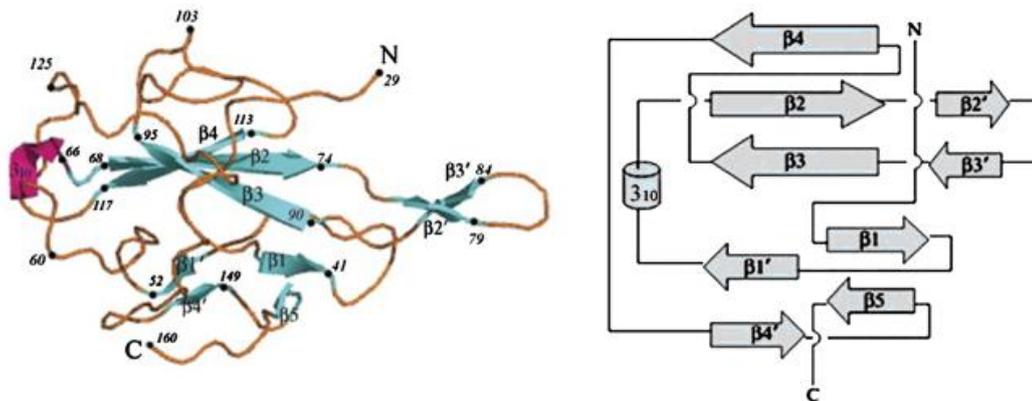


Figura 5. Esquema del plegado tridimensional de la Nucleoproteína de IBV. Los números indican los residuos aminoacídicos. Se muestran los elementos de estructura secundaria y los extremos N y C-terminales. Tomado de Fan et al. (2005).

1.4. Ciclo replicativo de IBV

1.4.1. Ingreso a la célula

El primer paso en el ciclo de replicación de IBV es la unión de los viriones a la membrana plasmática de la célula diana. En IBV no se conoce el dominio de S que se une al receptor celular, pero existen fuertes evidencias de que reside en la subunidad S1, como ocurre en otros coronavirus (Figura 4). El receptor celular es el ácido N-acetilneuramínico $\alpha 2,3$ (ácido siálico) que se encuentra en la mayoría de los tipos celulares (Winter et al., 2006; Winter et al., 2008). La afinidad de IBV por este ácido explica la naturaleza pantrópica de IBV en el pollo, aunque no sería el único determinante de la susceptibilidad. Como el ácido siálico está presente en células que no son infectadas por IBV, y en diversos tipos celulares de especies de animales no susceptibles, se plantea que, al igual que otros coronavirus, IBV requiere para ingresar a las células un segundo receptor u otro factor del huésped aún no identificado (Cavanagh et al., 2007; Wickramasinghe et al., 2011).

Luego de la adsorción del virión, éste ingresa a la célula en un paso que implica la fusión de membranas. A diferencia de la mayoría de los coronavirus, IBV exhibe una fusión de membrana a pH ácido, sugiriendo que ésta ocurre en el interior de endosomas ácidos (Chu et al., 2006). La fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal se lleva a cabo por

la acción del péptido de fusión, un dominio hidrofóbico de 20 aminoácidos de S2 que se ancla a la membrana endosomal (Bosch et al., 2003). La exposición del péptido de fusión ocurre como consecuencia del clivaje, realizado por la proteasa celular Furina, del precursor S_0 en S1 y S2.

1.4.2. Traducción y clivajes post-traduccionales del ORF 1

El ARN viral liberado en el citoplasma se emplea como ARNm para traducir las proteínas que constituyen el complejo de replicación/transcripción (RTC). Este complejo multiproteico está codificado por el gen 1, el cual contiene dos grandes marcos abiertos de lectura (ORF 1a y ORF 1b) que se hayan superpuestos en un único nucleótido. La poliproteína pp1a se traduce a partir del ORF 1a, mientras que pp1ab se traduce a partir de los ORF 1a y 1b por un mecanismo de desplazamiento -1 del marco ribosomal (Brierley et al., 1992; Eleouet et al., 1995) (Figura 6). La frecuencia con que ocurre el desplazamiento del marco ribosomal provoca un exceso de 3 a 5 veces de pp1a sobre pp1ab.

Los polipéptidos pp1a y pp1ab son clivados post-traduccionamente por dos proteasas codificadas por el virus, PLP2 y M^{pro} , en 15 proteínas maduras no estructurales (nsp), las cuales intervienen directa o indirectamente en la replicación y transcripción de los genes virales (Gorbalenya et al., 1989; Lu et al., 1996; Tibbles et al., 1996) (Figura 6).

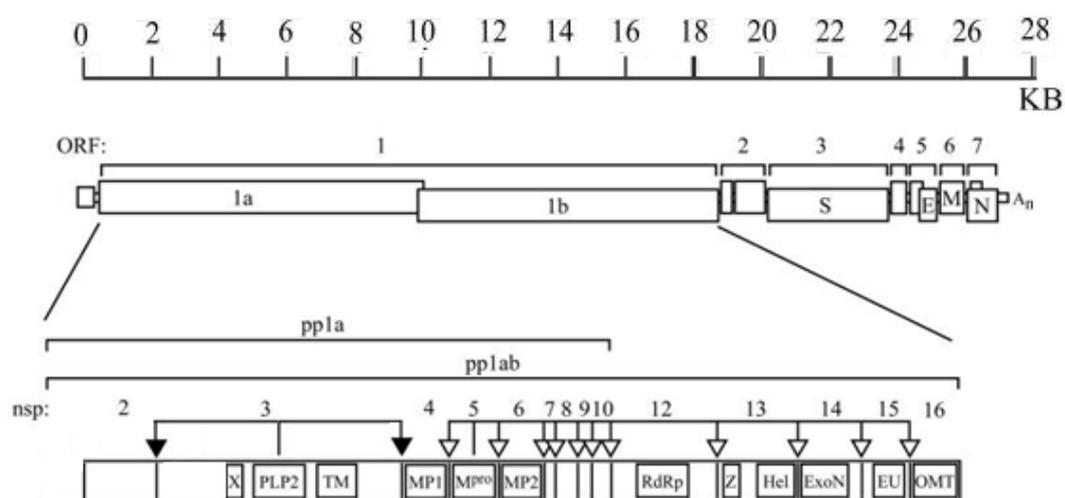


Figura 6. Representación esquemática de la traducción y de los clivajes post-traduccionales del ORF 1. El ORF 1 constituye las dos terceras partes del genoma de IBV, y codifica para los polipéptidos pp1a y pp1ab. Estos polipéptidos son procesados por dos proteasas virales, PLP2 y M^{pro} , en 15 proteínas maduras no

estructurales (nsp). PLP2 es responsable del clivaje entre nsp2-nsp3 y nsp3-nsp4 (triángulos negros). M^{pro} es la encargada de procesar las restantes proteínas (triángulos blancos). X: ADP ribosa monofosfatasa, TM, MP1, y MP2: dominios hidrofóbicos transmembrana, RdRp: ARN Polimerasa ARN dependiente, Hel: helicasa, ExoN: exo-nucleasa, EU: endo-ribonucleasa y OMT: ARN 2'-O-metiltransferasa. Tomado de Fang et al. (2008).

1.4.3. Replicación y transcripción

El complejo de replicación/transcripción (RTC) sintetiza nuevos ARNs genómicos virales, así como ARNm subgenómicos a partir de los cuales se traducen el resto de las proteínas virales. Los procesos de replicación y transcripción requieren de distintos tipos de secuencias reguladoras distribuidas en el genoma de IBV (Figura 7).

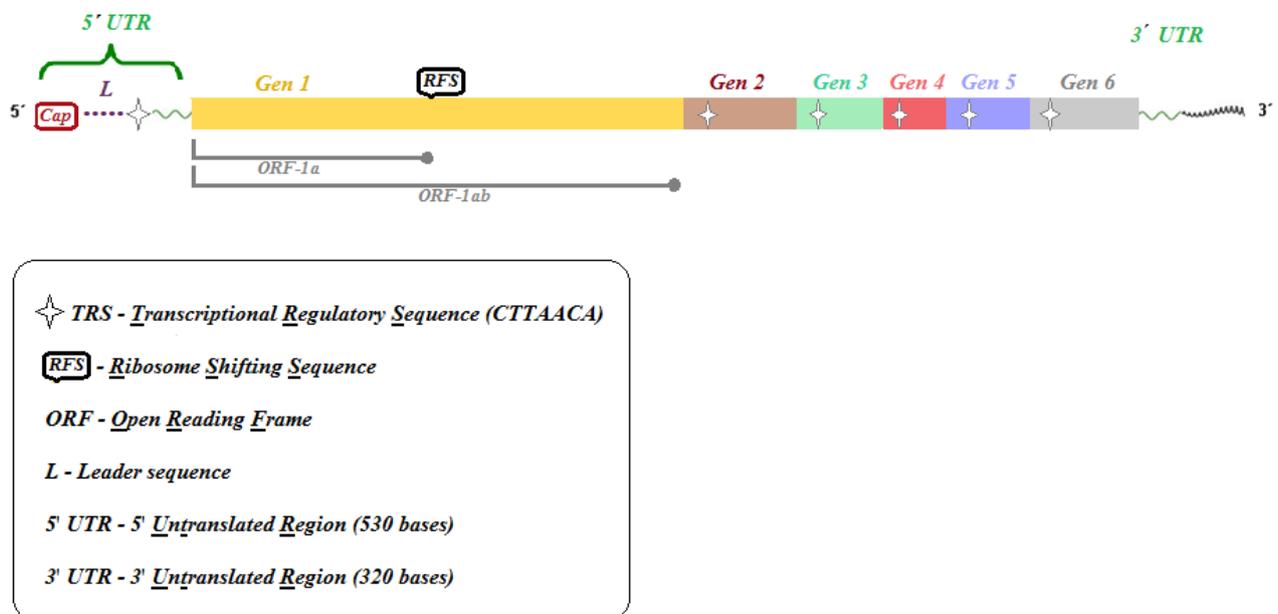


Figura 7. Secuencias reguladoras de la replicación y transcripción de los genes virales. TRS: secuencias reguladoras de la transcripción de 7 nucleótidos (CTTAACA) que se encuentran inmediatamente corriente arriba del codón de inicio de la traducción de cada gen. RFS: secuencia de cambio del marco ribosomal. ORF: marco abierto de lectura. L: Secuencia líder que se encuentra en el extremo 5' del primer TRS (TRS-L). 5' UTR: región no traducida de aproximadamente 530 nucleótidos en el extremo 5' del genoma que incluye la secuencia líder y el primer TRS. 3'UTR: región no traducida de aproximadamente 320 nucleótidos en el extremo 3' del genoma.

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

genómico de polaridad negativa), y cinco ARN subgenómicos de polaridad negativa. Los ARN subgenómicos son truncados en el extremo 3' al inicio de los diferentes genes y están provistos con una secuencia complementaria a la secuencia líder (secuencia anti-líder) (Figura 8). La secuencia anti-líder se adquiere por un mecanismo de transcripción discontinua: el RTC comienza la síntesis de un ARN subgenómico de polaridad negativa a partir de su extremo 5', al llegar a un TRS lo reconoce, lo copia y se trasloca al 5' UTR del genoma viral para copiar la secuencia líder.

Para sintetizar los ARNm subgenómicos y nuevos genomas virales, el RTC utiliza los ARNs subgenómicos de polaridad negativa y el ARN genómico de polaridad negativa como moldes (Figura 8).

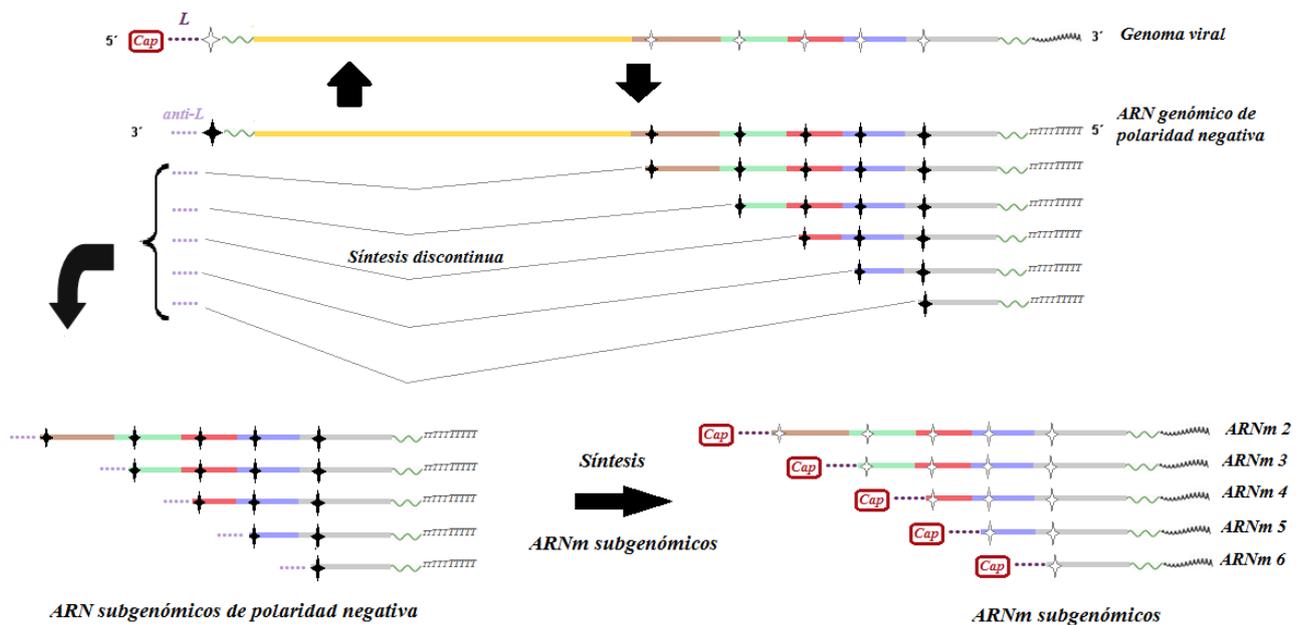


Figura 8: Replicación y transcripción del genoma de IBV. Se esquematiza la síntesis de nuevos genomas virales (replicación) y la síntesis de los cinco ARNm subgenómicos por un mecanismo de transcripción discontinua.

1.4.4. Traducción de proteínas virales, ensamblaje y liberación

Las proteínas virales son traducidas por ribosomas asociados al retículo endoplasmático. Aquellos genes que poseen un único ORF se traducen de manera CAP dependiente, al igual que el primer ORF de los genes que poseen más de un marco abierto de lectura (Tahara et al., 1994). Algunos ORFs internos, como el que codifica para la proteína E,

se traducen en forma CAP independiente mediante IRES (*internal ribosomal entry site*) (Liu et al., 1992; Thiel et al., 1994). El mecanismo de traducción del segundo ORF del gen 5 aún se desconoce.

El ensamblaje de la partícula viral comienza cuando la proteína N se asocia al ARN genómico viral y este complejo ribonucleoproteico se transporta hacia la membrana del retículo endoplasmático, lugar donde se encuentran ancladas las proteínas virales S, E y M. La envoltura viral es adquirida por brotamiento de las partículas en el retículo endoplasmático. Los viriones maduros se transportan en grandes vesículas que se fusionan a la membrana celular para ser liberados de las células (Salanueva et al., 1999) (Figura 9).

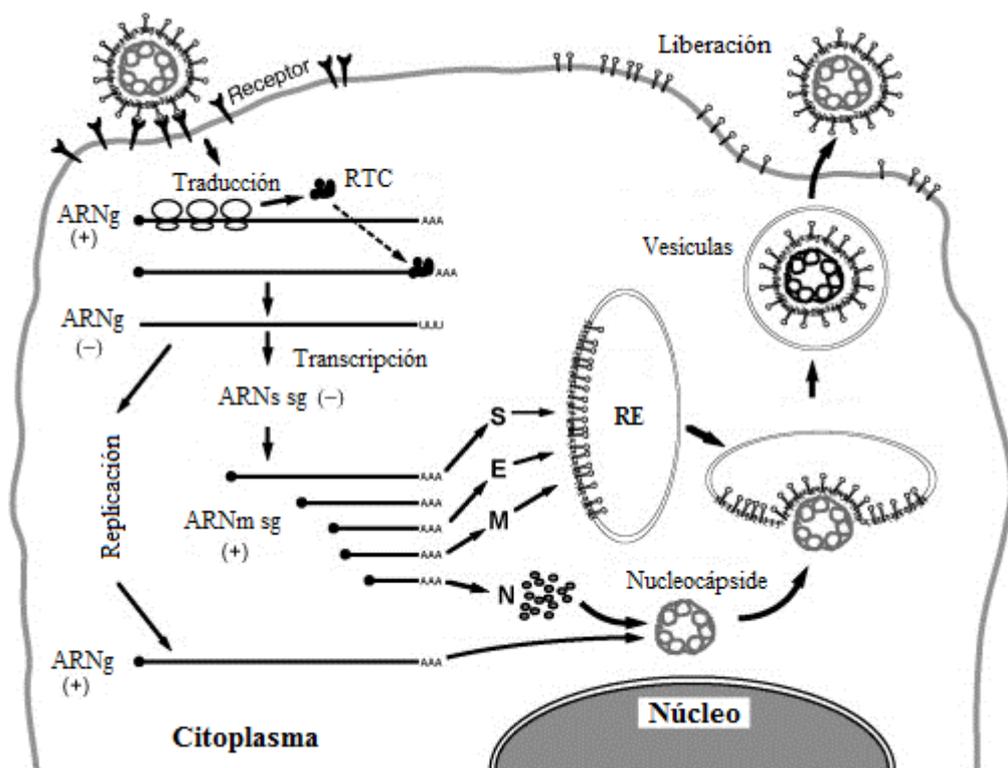


Figura 9: Ciclo replicativo de IBV. Se esquematiza el ingreso del virus a la célula, la traducción de las proteínas que forman el complejo de replicación/transcripción (RTC), la replicación o síntesis de nuevos ARN genómicos virales (ARNg), la transcripción o síntesis de los cinco ARNm subgenómicos (ARNm sg), la traducción de las proteínas estructurales (S, E, M y N), el ensamblaje y brotamiento de las partículas virales en el retículo endoplasmático (RE) y las liberación de los viriones en vesículas. Tomado y modificado de Masters et al. (2006).

1.5. Caracterización funcional y genética de IBV

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

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

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

La clasificación en genotipos se basa en el análisis total o parcial del genoma. La metodología más directa e informativa es la secuenciación, pero también se emplean metodología de caracterización indirectas del genoma basadas en las técnicas de RFLP y PCR en tiempo real (De Wit, 2000). La caracterización genética más utilizada se realiza mediante el análisis de la secuencia codificante de S1, la región más variable del genoma por

codificar para los principales sitios antigénicos del virión. En base a estos análisis se han descritos decenas de genotipos circulando en la industria avícola mundial. En la sección 4.12.5 se muestra un exhaustivo análisis de los principales genotipos descritos que en el mundo. Más recientemente, también se ha comenzado a analizar el gen que codifica para la proteína N porque cumple cierto rol en la inmunidad protectora.

1.6. Mecanismos de variabilidad en IBV

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

Los coronavirus poseen una tasa de mutación del orden de 10^{-6} a 10^{-7} mutaciones por nucleótido copiado por ciclo de replicación (Eckerle et al., 2007; Eckerle et al., 2010), por lo que incorpora 1 nucleótido en forma errónea cada un millón a diez millones de nucleótidos copiados durante un ciclo replicativo. Esta tasa de mutación es una de las más bajas dentro de los virus ARN, y resulta fundamental para mantener la integridad de los genomas sorprendentemente largos de los coronavirus (Figura 10). Esta baja tasa de mutación no está únicamente determinada por la fidelidad de copia de la ARN polimerasa ARN dependiente, sino que la acción de la proteína no estructural 14 (nsp14), también denominada ExoN, aumenta la fidelidad de copia durante la replicación y transcripción (Eckerle et al., 2007). Aunque no se conoce el mecanismo por el cual nsp14 incrementa la fidelidad de copia, se sugiere que podría actuar en forma análoga a la subunidad correctora de pruebas de la polimerasa celular.

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

Tasa de mutación (mutaciones/nucleótidos copiado/ciclo de replicación)

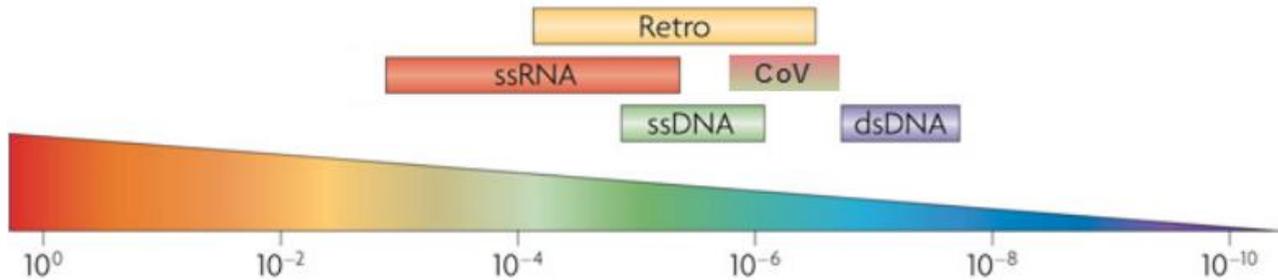


Figura 10. Tasas de mutación de Retrovirus (Retro), virus ARN simple hebra (ssRNA), virus ADN simple hebra (ssDNA), virus ADN doble hebra (dsDNA) y coronavirus (CoV). Tomado y modificado de Duffy et al. (2008).

1.7. Bronquitis Infecciosa Aviar

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

La transmisión de IBV puede producirse de forma vertical, de las reproductoras a su descendencia, o de forma horizontal, entre las aves de un mismo lote por vía aerógena. La transmisión horizontal entre aves de un mismo lote es rápida, ya que pollos libres del virus puesto en contacto con otros infectados producen los síntomas típicos de la infección dos días más tarde (Cavanagh et al., 1997).

IBV infecta inicialmente las células epiteliales de las vías respiratorias superiores, posteriormente se propaga hacia las células de tráquea y pulmones donde continúa replicándose hasta el octavo día post-infección. Tras este período, el virus pasa por vía sanguínea y por difusión, desde los sacos aéreos a otras superficies epiteliales, incluyendo el riñón, ovarios, oviducto, testículos, bolsa de Fabricius, tonsilas cecales y muchas partes del tracto digestivo (esófago, proventrículo, duodeno, yeyuno, recto y cloaca), donde se

multiplica lesionando los tejidos infectados (Crinion et al., 1970; Kinde et al., 1991; Wang et al., 1996; Di Fabio et al., 2000).

La sintomatología de la enfermedad es variable y depende de factores tales como la cepa de virus infectante, y la edad y estado inmunitario de las aves. En general se manifiesta con síntomas respiratorios; tos, estornudos, exudados nasales y oculares, estridor y disnea (Shalk et al., 1931). Este cuadro puede agravarse por infecciones bacterianas secundarias que generan un considerable aumento en la mortalidad media del lote (Goryo et al., 1994; Naqi et al., 2001).

En gallinas ponedoras se produce también un descenso en la producción de huevos de hasta un 50%, y un incremento en el número de huevos con alteraciones externas características como cáscara rugosa, huevos asimétricos y deformes, deficiencias en la calcificación y fragilidad excesiva. También, se aprecian alteraciones en la calidad interna del huevo, tales como albúmina acuosa y yema con deficiencias en la pigmentación (Crinion et al., 1970; Gelb et al., 1991). En el caso de gallinas reproductoras, además de la sintomatología respiratoria, se produce un notable descenso de la fertilidad y muerte embrionaria (Gelb et al., 1991; Cavanagh et al., 1997).

Desde los años 60 se reportan casos de IBV que afectan gravemente el sistema renal y aumentan la mortalidad media del lote (cepas nefropatógenas). Las infecciones renales se caracterizan por un aumento de volumen y palidez de los riñones, y la presencia de túbulos y uréteres con cristales de ácido úrico, especialmente en aves jóvenes (Winterfield et al., 1962). Dada la gravedad, estas variantes son consideradas casos notificables a los centros de investigación y vigilancia sanitaria de referencia para esta enfermedad, como el Poultry Diagnostic and Research Center (PDRC) y la Organización Internacional de Epizootias (OIE).

1.8. Herramientas de control de la Bronquitis Infecciosa Aviar

1.8.1. Diagnóstico

El diagnóstico clínico de la IB no es sencillo debido a que otras patologías aviares pueden presentar síntomas similares. Para lograr un diagnóstico certero de la enfermedad es

conveniente utilizar métodos de diagnóstico complementarios. Se ha realizado el diagnóstico por aislamiento e identificación del virus con pruebas serológicas tradicionales, como la neutralización viral, pero es muy laborioso y poco seguro por la alta tasa de cambios antigénicos que posee IBV (Andreasen et al., 1991).

Desde hace algunos años se vienen empleando técnicas de genética molecular para el diagnóstico rápido de la IB, que consisten en la amplificación por PCR de regiones genómicas del virus (Zwaagstra et al., 1992). En el año 2006 se desarrolló la primer metodología de diagnóstico de IBV basado en PCR en tiempo real, la cual consiste en la amplificación de un fragmento del 5'UTR del genoma viral, región sumamente conservada por su importancia en la regulación de la transcripción viral (Callison et al., 2006). Esta metodología se caracteriza por su rapidez, alta sensibilidad y especificidad, lo que cobra una gran importancia en este modelo viral debido al bajo título que presenta IBV durante una infección.

1.8.2. Vacunas

En la década de 1950 se comenzaron a utilizar las primeras vacunas a partir de cepas de campo atenuadas; 20 años después se desarrollaron vacunas inactivadas. Las actuales vacunas vivas brindan buena protección contra variantes de campo perteneciente al mismo protectotipo, pero los títulos protectivos comienzan a declinar alrededor de las nueve semanas después de la vacunación. En pollos de engorde, cuyos ciclos productivos generalmente no exceden los 60 días, la vacunación con vacunas vivas se efectúa a temprana edad para inducir suficiente protección para cubrir el período total de crianza. En ponedoras y reproductoras se utilizan varias dosis de vacunas vivas en las primeras etapas de vida, y se refuerza con la aplicación de vacunas inactivadas en etapas previas a la producción. Con esto se pretende proteger al ave en todo su ciclo productivo y, en las reproductoras, transmitir además inmunidad pasiva a la progenie (Cavanagh et al., 2003).

En Uruguay, al igual que en la mayoría de los países sudamericanos, las vacunas atenuadas e inactivadas del serotipo Massachusetts son las únicas oficialmente autorizadas. Pero a pesar de la vacunación sistemática con esta cepa, es muy común que surjan brotes de la enfermedad en lotes de aves correctamente inmunizados. Estos brotes pueden ocurrir por

diferencias antigénicas entre los aislados de campo y los serotipos vacunales, particularmente debido a que los serotipos vacunales presentan bajo nivel de protección cruzada (Cavanagh, 2003).

Desde hace algunos años se emplean técnicas de genética molecular para seleccionar el plan de vacunación adecuado a las características antigénicas de los virus de campo locales. Una herramienta cualitativa muy poderosa para implementar planes de vacunación más efectivos es seleccionar la vacuna con el mayor índice de homología genética respecto al tipo de virus circulante en el campo, comparando aquellas regiones que poseen los sitios antigénicos inmunoprotectores. En IBV, los sitios antigénicos inmunoprotectores se han mapeado en las proteínas S1 (Kant et al., 1992; Moore et al., 1997; Ignjatovic et al., 2005) y N (Boots et al., 1991; Boots et al., 1992; Seah et al., 2000).

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

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

En Argentina, Brasil y Colombia la caracterización genética de cepas sudamericanas de IBV se realizó mediante el análisis de diferentes regiones parciales de S1. Estos análisis mostraron la circulación de tres linajes en Argentina (Rimondi et al., 2009), un único grupo genético en Brasil (Chacón et al., 2011; Felipe et al., 2010; Villarreal et al., 2007) y cuatro linajes en Colombia (Alvarado et al., 2005). Hasta la fecha no existen publicaciones basadas en secuencias completas de S1 y N de variantes sudamericanas.

En Uruguay, en el marco de mi tesina de grado se estandarizó e implementó por primera vez un ensayo de diagnóstico molecular basado en la amplificación por PCR en tiempo final de una región de 437 pb del gen que codifica para la proteína N. A través de esta metodología confirmamos la circulación de IBV en una granja avícola uruguaya. El análisis de esta secuencia mostró que el virus era una variante de IBV altamente divergente a la cepa del serotipo Massachusetts.

2. Objetivos

Objetivo General: Diagnosticar y caracterizar genéticamente cepas de campo de IBV que circulan en la industria avícola regional.

Objetivos Específicos:

- Estandarizar una metodología de diagnóstico molecular basada en la tecnología de PCR en tiempo real.
- Aplicar la metodología de diagnóstico en muestras de campo uruguayas pertenecientes a animales con sintomatología presuntiva de una infección por IBV.
- Poner a punto un ensayo de cuantificación absoluta de la carga viral.
- Caracterizar genéticamente cepas de IBV circulantes en la industria avícola uruguaya y argentina mediante la secuenciación de la región codificante de S1 y del gen N.
- Comparar las secuencias obtenidas con las de variantes de IBV que circulan en la región y el mundo, y con las diferentes cepas vacunales disponibles en el mercado mundial.
- Estimar la edad del ancestro común más reciente y la tasa de sustitución nucleotídica de las variantes que circulan en la región.

3. Hipótesis de Trabajo

En la región circulan variantes de IBV con características genéticas particulares que son muy divergentes de las cepas vacunales empleadas para su control. La comparación genética de estas variantes con cepas regionales y mundiales permitirá una mejor comprensión de la epidemiología y evolución de este importante patógeno aviar.

4. Materiales y métodos

4.1. Muestras

Para estandarizar los ensayos de diagnóstico y caracterización molecular, y para contar con un control positivo para el diagnóstico de cepas de campo, se utilizó una muestra positiva (UY/09/CA/01) y una muestra negativa (UY/09/CA/02) diagnosticadas durante mi tesina de grado, y una cepa vacunal de IBV, incluida en la vacuna a virus vivo del laboratorio MC Asociados – Fort Dodge Uruguay. La cepa vacunal era del tipo Massachusetts, único tipo autorizado en Uruguay para su inclusión en vacunas.

Se analizaron 25 muestras uruguayas de pollos con síntomas presuntivos de infección por IBV. Las muestras fueron remitidas entre los años 2009 y 2012 (1 en el 2009, 2 en el 2010, 12 en el 2011 y 10 en el 2012), y corresponden a tráqueas, pulmones, tonsilas cecales y bursas. La colecta del material biológico fue realizada por veterinarios especialistas en avicultura que colaboran con nuestro grupo de trabajo. Los tejidos se almacenaron a -80° C hasta su procesamiento. También se analizaron 13 muestras argentinas en el marco de una pasantía en el Laboratorio de Virología de Aves y Porcinos del INTA-Castelar, Argentina. Estas muestras fueron tomadas entre los años 2009 y 2011, y diagnosticadas como positivas para IBV por el grupo de trabajo de este laboratorio.

4.2. Extracción del genoma viral

Se utilizaron dos protocolos de extracción de ARN viral dependiendo del órgano analizado. En el caso de tráqueas y liofilizado vacunal se utilizó el kit "QIAmp Viral RNA Mini Kit" (anexo 1.a), mientras que para tonsilas cecales, pulmón y bursas se utilizó el kit "Quick-RNA™ MiniPrep" (Zymo Research) (anexo 1.b).

4.3. Retrotranscripción

Las reacciones de retrotranscripción (RT) se realizaron con el kit "RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase" (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo 1.c). Para las reacciones de RT se utilizaron 10 µl de ARN extraído y hexámeros al azar.

4.4. Estandarización del ensayo de PCR en tiempo real

Se estandarizó la detección del genoma de IBV mediante una metodología basada en PCR en tiempo real utilizando la cepa vacunal Massachusetts y las muestras UY/09/CA/01 y UY/09/CA/02. En esta metodología se utilizó un juego de cebadores (IBV-F391 y IBV-R533) y una sonda de hidrólisis (IBV 5' UTR) diseñados previamente, que amplifican una región de 142 pb del 5'UTR del genoma de IBV (Callison et al., 2006) (Tabla 1). Dicha sonda presenta el fluoróforo 2'-cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína (VIC) en el extremo 5', y la molécula bloqueadora (*quencher*) tetrametilrodamina (TAMRA) en el extremo 3'.

Para la estandarización del ensayo se probaron diferentes concentraciones de sonda y cebadores (0,05 μM – 0,15 μM , 0,1 μM – 0,3 μM y 0,2 μM – 0,6 μM), manteniendo siempre la relación recomendada de concentración sonda:cebadores (1:3). Las condiciones de ciclado se detallan en la Tabla 2 (Protocolo 1).

Se desarrolló y estandarizó un ensayo de control interno para validar la extracción de ARN y la PCR en tiempo real. Para ello se diseñó una sonda y un juego de cebadores capaces de amplificar una región de 152 pb del exón 3 del gen que codifica para la beta actina aviar. Esta sonda presenta la molécula de 6-carboxifluoresceína (FAM) como fluoróforo, y un doble *quencher* de moléculas no fluorescentes (ZEN y 3IABkFQ) (Tabla 1). Para esta metodología también se optimizó la reacción con diferentes concentraciones de sonda y cebadores (0,1 μM – 0,3 μM , 0,05 μM – 0,15 μM y 0,2 μM – 0,6 μM). Las condiciones de ciclado se detallan en la Tabla 2 (Protocolo 1).

Todos los experimentos basados en PCR en tiempo real se realizaron en el equipo ABI 7500 (Applied Biosystems) de la Sección Genética Evolutiva, que emplea el software ABI 7500 versión 3.0.

Tabla 1. Cebadores y sondas utilizadas en las reacciones de PCR en tiempo real y final.

Cebadores y sondas	Secuencia 5' → 3'	Polaridad	Posición en el genoma ^a
5' UTR			
IBV-F65	AACGGACTTAAATACCTACAGCT	+	65-87
IBV-F391*	GCTTTTGAGCCTAGCGTT	+	391-409
IBV-R533*	GCCATGTTG TCA CTG TCT ATT G	-	511-533
IBV 5' UTR*	VIC-CACCACCAGACCTGTCACCTC-TAMRA	+	444-465
gen S			
IBV-S1	ACTGAACAAAAGACAGACTT	+	20313-20332
IBV-S2	CCATCTGAAAAATTRCCAGT	-	21076-21095
IBV-S5	TTTGTYAATGGTACTGYACA	+	21001-21020
IBV-S4	CATAACTAACATAAGGGCAA	-	22008-22027
gen N			
IBV-N2**	GTCTTGTCGCCGCGTGTA	+	25846-25862
IBV-N1**	ACCCTTACCAGCAACCC	-	26267-26283
IBV-N3	GATGGTATAGTGTGGGTTGCTG	+	26254-26275
IBV-N4	TCCCTGGCGATAGACATGTA	-	27205-27224
β-actina aviar			
β-act Fw	GAGAAATTGTGCGTGACATCA	+	3003-3023
β-act Rv	CCTGAACCTCTCATTGCCA	-	3136-3154
β-act Pb	FAM-TGCTCGAAA-ZEN-TCCAGTGCGACGTAG-3IABkFQ	-	3037-3060

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

*Cebador descritos por Zwaagstra et al. (2002). **Cebadores descritos por Callison et al. (2006).

Tabla 2. Protocolos de ciclados de PCR. Protocolo 1: PCR en tiempo real. Protocolo 2: amplificación del fragmento F65-R570. Protocolo 3: Amplificación de la región codificante de S1. Protocolo 4: Amplificación del gen N (amplicón N2-N1). Protocolo 5: Amplificación del gen N (amplicón N3-N4).

	Proceso	Temperatura	Tiempo	
Protocolo 1	Lectura pre-PCR	50° C	5 min	40 ciclos
	Desnaturalización inicial	95° C	10 min	
	Desnaturalización	95° C	15 seg	
	Hibridación-Extensión	60° C	1 min	
	Lectura pos-PCR	70° C	5 min	
Protocolo 2	Desnaturalización inicial	95° C	5 min	35 ciclos
	Desnaturalización	95° C	30 seg	
	Hibridación	57° C	30 seg	
	Extensión	72° C	50 seg	
	Extensión final	72° C	5 min	
Protocolo 3	Desnaturalización inicial	95° C	5 min	35 ciclos
	Desnaturalización	95° C	30 seg	
	Hibridación	53° C	30 seg	
	Extensión	72° C	1 min	
	Extensión final	72° C	5 min	
Protocolo 4	Desnaturalización inicial	95° C	5 min	30 ciclos
	Desnaturalización	95° C	30 seg	
	Hibridación	55° C	30 seg	
	Extensión	72° C	30 seg	
	Extensión final	72° C	5 min	
Protocolo 5	Desnaturalización inicial	95° C	5 min	40 ciclos
	Desnaturalización	95° C	30 seg	
	Hibridación	55° C	30 seg	
	Extensión	72° C	1 min	
	Extensión final	72° C	5 min	

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

La metodología de PCR en tiempo real estandarizada se aplicó en 25 muestras uruguayas y 13 argentinas provenientes de animales con sintomatología clínica asociada a Bronquitis Infecciosa. Para cada muestra se realizaron dos reacciones, una para la detección del genoma de IBV y otra para la detección del gen de la β -actina aviar (control interno).

4.6. Ensayo de cuantificación absoluta

El ensayo de cuantificación absoluta se basa en la generación de una curva estándar a partir de diluciones seriadas de ARN viral cuyo número de copias genómicas es conocido. Esta curva estándar representa la relación lineal entre el logaritmo del número de copias ARN viral y el Ct (primer ciclo de la PCR donde se registra fluorescencia significativa) de cada dilución. Para generar la curva se obtuvo una gran cantidad de ARN viral de concentración y de tamaño conocido, mediante un ensayo de transcripción *in vitro*. En la figura 11 se esquematiza la metodología realizada para la generación de la curva estándar.

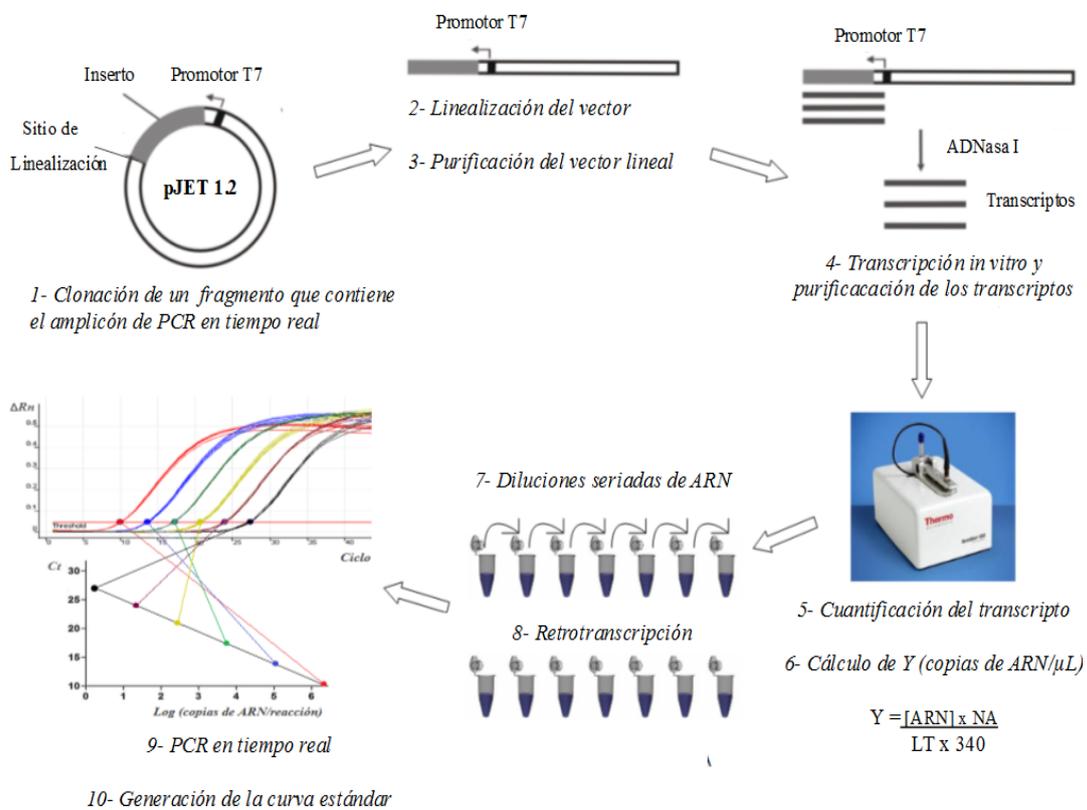


Figura 11: Metodología empleada para la generación de la curva estándar. Para realizar la curva estándar (relación lineal entre el Log_{10} del número de copias de ARN viral y el Ct) se clonó un fragmento que contiene el amplicón de PCR en tiempo real, se linealizó y purificó el plásmido, se transcribió *in vitro* el fragmento clonado y se calculó el número de copias de ARN/ μ L (Y) obtenido en el protocolo de transcripción. A partir del transcripto se realizaron diluciones seriadas que se sometieron a una reacción de retrotranscripción seguida de una PCR en tiempo real. Con los Ct resultantes y el Y calculado se generó la curva estándar.

4.6.1. Amplificación del fragmento F65-R533

Se amplificó un fragmento de 469 pb que contiene la secuencia empleada en el ensayo de diagnóstico de PCR en tiempo real. Esta reacción de PCR se realizó con el juego de cebadores F65 y R533 (Tabla 1). Se utilizó un termociclador con gradiente de temperatura “CG1/96” (Corbett Research) y las condiciones detalladas en las tablas 2 (Protocolo 2) y 3. El amplicón se purificó con el kit “Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (General Electric) (anexo 1.d).

Tabla 3. Concentraciones de los reactivos de las reacciones de PCR en tiempo final

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

4.6.2. Clonación

El amplicón F65-R533 fue clonado con el kit “GeneJet PCR Product Cloning kit” (Fermentas) utilizando células competentes de *E. Coli* XL-1 Blue (anexo 1.e).

El producto de PCR clonado contiene una región de poli-A en el extremo 3', por tanto antes de ser clonado fue tratado con una enzima de *blunting* que genera extremos romos. El vector plasmídico utilizado, denominado pJET 1.2, posee un promotor para la ARN Polimerasa T7 que permite transcribir el inserto clonado.

4.6.3. Extracción de ADN plasmídico

Para corroborar la presencia del fragmento de interés en las colonias transformadas se realizó un rastreo por PCR con los cebadores F65 y R533, utilizando las condiciones ya descritas. En los clones positivos se confirmó la correcta dirección del inserto realizando PCR con el cebador directo del vector y el cebador reverso del amplicón y viceversa

(pJET_F-R533 y F65-pJET_R). La extracción del ADN plasmídico de los clones positivos y con la dirección correcta del inserto se efectuó con el kit “PureLink Quick Plasmid MiniPrep Kit” (Invitrogen).

4.6.4. Linealización y purificación del vector

Para evitar la generación de transcritos heterólogos, debido a la alta procesividad de la ARN Polimerasa, el plásmido fue linealizado con la enzima de restricción NcoI que posee un sitio de reconocimiento en el plásmido (anexo 1.g). El plásmido lineal fue purificado con el método de fenol:cloroformo (anexo 1.h).

4.6.5. Transcripción *in vitro*

La transcripción *in vitro* se realizó con el kit “TrascriptAid T7 High Yield Transcription Kit” (Fermentas) (anexo 1.i). Los transcritos fueron tratados con ADNasa I y purificados con el método de fenol:cloroformo (anexo 1.j).

4.6.6. Cálculo de Y (Número de copias de ARN/μL)

El número de copias de ARN/μL (Y) se calculó mediante la siguiente ecuación:

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

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

La concentración del transcrita fue determinada con un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

4.6.7. RT-PCR en tiempo real

A partir del transcrita de ARN se realizaron nueve diluciones seriadas en base 10 en un rango de 20×10^8 a 20 copias de ARN/μL.

Cada dilución se sometió a una reacción de RT de volumen final de 20 μL. Para la reacción de RT se utilizaron 10 μl de ARN que se obtuvo al mezclar 1 μL de cada dilución

con 9 μL de ARN proveniente de una muestra negativa para IBV (ARN contaminante). Este paso simula una situación real donde el ARN viral se encuentra en baja proporción en relación al ARN celular (principalmente ARN ribosomal). Por último, cada RT se sometió a una reacción de PCR en tiempo real (Figura 12).

Cada ensayo, que incluye la realización de las diluciones seriadas y las reacciones de RT y PCR en tiempo real, se realizó por triplicado bajo las mismas condiciones. También fue realizada por triplicado cada reacción de PCR en tiempo real a partir de un mismo ADNc.

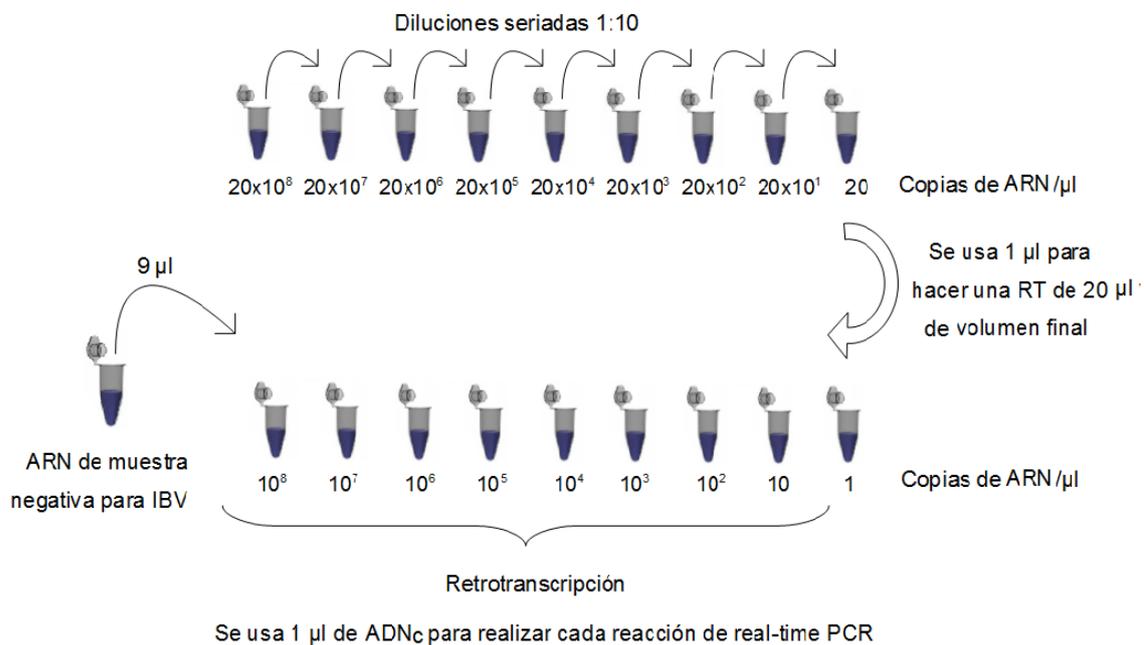


Figura 12: Esquema representativo de las diluciones de ARN utilizadas para generar la curva estándar. A partir del transcripto de ARN se realizaron nueve diluciones seriadas en base 10. Para cada reacción de RT se utilizaron 10 μL de ARN (1 μL de dilución más 9 μL de ARN contaminante).

4.6.8. Curva Estándar

La mejor recta que describe la relación entre el Log_{10} (N° de copias de ARN) y el Ct se obtuvo por el método de los mínimos cuadrados implementado por el programa PAST (PAleontological STatistics) versión 1.94b (http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).

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

La eficiencia se calculó usando la fórmula $E = (10^{(-1/k)}) - 1$, donde k es la pendiente de la curva estándar. Un valor de E=1 corresponde a una eficiencia de amplificación del 100%, lo que indica que la PCR es capaz de duplicar el ADN molde de un ciclo a otro. El coeficiente de determinación (R^2) se calculó con el programa PAST versión 1.94b. Este coeficiente puede tomar valores de 0 a 1, siendo 1 cuando todos los valores estimados caen sobre la recta de regresión.

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

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

Los coeficientes de variación se calcularon mediante la fórmula: $C.V. = (S_{n-1}/X) \times 100$, donde X es la media de los Ct y S_{n-1} la desviación estándar.

4.7. Amplificación de la región codificante de S1

La región codificante de la porción S1 de la Glicoproteína de Superficie se amplificó por PCR en dos fragmentos solapantes (Figura 13). Un fragmento de 783 pb de la región 5' de S1 y un fragmento de 1027 pb de la región 3', se obtuvo con los cebadores IBV-S1 e IBV-S2 y los cebadores IBV-S5 e IBV-S4, respectivamente (Tabla 1).

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

4.8. Amplificación del gen N

La secuencia completa del gen N se amplificó por PCR en dos fragmentos solapantes (Figura 13). Un fragmento de 437 pb de la región 5' del gen se obtuvo con los cebadores IBV-N2 e IBV-N1, y un fragmento de 971 pb de la región 3' se obtuvo con los cebadores IBV-N3 e IBV-N4 (Tabla 1).

Las concentraciones de los reactivos utilizadas en las reacciones de PCR se detallan en la tabla 3 y las condiciones de ciclado se detallan en la tabla 2 (Protocolos 4 y 5). Las reacciones se realizaron en un termociclador con gradiente de temperatura "CG1/96" (Corbett Research).

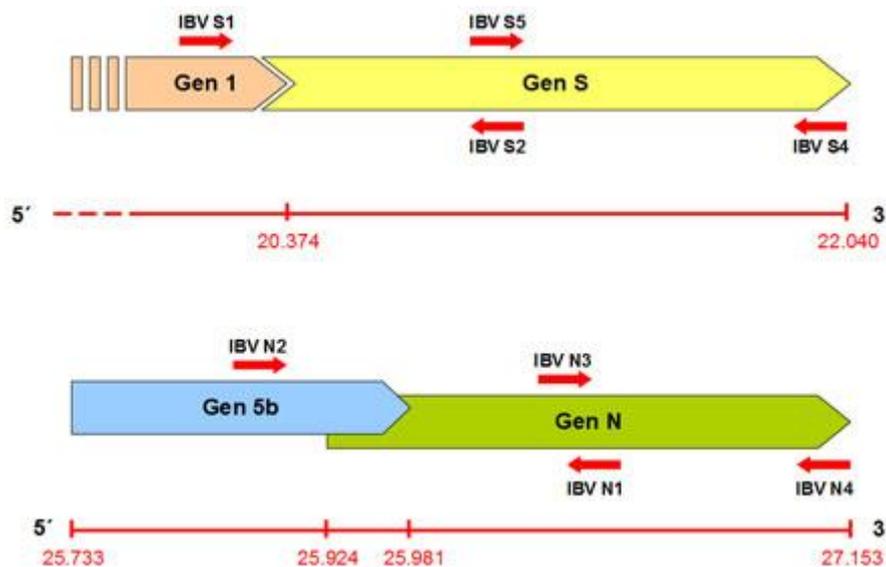


Figura 13: Representación gráfica de las dos regiones del genoma de IBV amplificadas por PCR en tiempo final. Con flechas horizontales se indica la posición de los cebadores. En el margen superior se esquematizan los genes 1 y S. En el margen inferior se esquematizan los genes 5b y N. Sobre la línea se señalan las posiciones nucleotídicas en el genoma de IBV.

4.9. Visualización de los productos de PCR

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Como buffer de electroforesis se utilizó TAE 1X y la electroforesis se realizó a 90

volts. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y visualizados bajo luz UV.

4.10. Purificación de los amplicones

Las purificaciones de los amplicones se realizaron con el kit “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (General Electric), siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo 1.d).

4.11. Secuenciación

Los amplicones purificados fueron secuenciados en ambas direcciones de forma automática en el equipo ABI3130 (Applied Biosystems) de la Unidad de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo.

4.12. Análisis bioinformáticos

4.12.1. Diseño de cebadores y sondas

Usando regiones genómicas de las diferentes variantes de IBV que se encuentran disponibles en la base de datos del GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) se realizaron alineamientos con el algoritmo *MUSCLE* (Edgar, 2004) del programa MEGA versión 5. Con los alineamientos se diseñaron cebadores específicos para la amplificación de la región codificante de S1 (1629 pb), del gen N (1227 pb) y del 5' UTR. Los cebadores se analizaron con la herramienta *Oligoanalyzer* de IDT (*Integrated DNA Technologies*), y fueron adquiridos en esta empresa (<http://www.idtdna.com>).

Los cebadores y la sonda utilizados para el control interno fueron diseñados sobre la base de la secuencia del gen de la β-actina de *Gallus gallus* (Número de acceso X00182) utilizando las mismas herramientas bioinformáticas.

4.12.2. Edición y alineamiento de secuencias nucleotídicas

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

4.12.3. Determinación de secuencias recombinantes

Para determinar la presencia de recombinantes en el conjunto de secuencias obtenidas en este trabajo se utilizó los paquetes informáticos *SplitsTree4* y RDP4 (*Recombination Detection Program*).

El programa *SplitsTree4* compara los alineamientos de secuencias mediante la construcción de redes filogenéticas. La diferencia de las redes filogenéticas con los tradicionales árboles filogenéticos es que estos últimos asumen únicamente evolución vertical de los linajes, ya que los linajes actuales solo reciben información de linajes parentales ancestrales. Por el contrario, las redes filogenéticas permiten visualizar eventos evolutivos, como la transferencia horizontal de genes o la recombinación, que implican la herencia de información a partir de linajes contemporáneos. Estos eventos se representan uniendo con líneas las ramas de un árbol filogenético clásico. Para darle soporte estadístico a los resultados se calculó la probabilidad (en forma de un *p-value*) de existencia de secuencias recombinantes en el conjunto de datos analizado (*Phi test*). Para obtener más información sobre el recombinante, por ejemplo identificar el punto de recombinación, se utilizó el programa RDP4. Este programa integra seis algoritmos (RDP, Bootscann, MaxChi, Chimaera, GeneConv y Sis-scan) que detectan las secuencias recombinantes, las hipotéticas secuencias parentales y los sitios de recombinación. Los algoritmos se basan en dos tipos de metodologías: i- métodos filogenéticos (RDP y Bootscann) que comparan árboles filogenéticos construidos a partir de distintas partes de la secuencia, detectando los eventos de recombinación por diferencias en las topologías de estos árboles, y ii- métodos de sustitución nucleotídica (MaxChi, Chimaera, GeneConv y Sis-scan) que determinan en las secuencias nucleotídicas un agrupamiento de sustituciones que se ajuste a una distribución estadística esperada.

Para el análisis se utilizó un tamaño de ventana de 100 pb y una significancia estadística de $p \leq 0,001$. Los datos de las secuencias utilizadas tanto en el *SplitsTree* como en el RDP4 se encuentran en el anexo 2.a.

4.12.4. Análisis filogenéticos

Se realizaron análisis filogenéticos basados en la secuencias codificante de la región S1 y el del gen N. En este análisis se incluyeron secuencias de cepas que circulan en la industria avícola mundial (ver sección 4.12.5).

Se determinó el modelo de sustitución en cada alineamiento mediante el paquete *jModelTest* (Posada, 2008). Estos datos fueron utilizados para inferir árboles filogenéticos con el método de máxima verosimilitud, implementado en el servidor <http://www.phylogeny.fr/>. Para obtener el valor de significancia de las ramas de los árboles se realizaron análisis de bootstrap con 1000 réplicas. Las filogenias obtenidas se visualizaron con el programa *Treeview* versión 1.6.6.

4.12.5. Selección de cepas para los análisis filogenéticos

Para la selección de las cepas que se incluyeron en los análisis filogenéticos se realizó un exhaustivo análisis bibliográfico de las cepas de campo y vacunales que circulan mundialmente. Se incluyó la cepa Massachusetts porque circuló globalmente hasta la década de 1970s o 1980s, y actualmente es la única vacuna autorizada en muchos países del mundo. También se incluyeron 5 cepas europeas: las cepas D1466, D207 y D3896, descritas en 1971, contra las cuales se desarrollaron vacunas que se usan hasta la actualidad; la cepa 4/91, también denominada serotipo 793/B, una variante que causó importantes problemas económicos en los países europeos en la década de 1990s y llevó al desarrollo de vacunas vivas atenuadas con esta cepa semilla; y la cepa Italy 02, una nueva variante contra la cual aún no se ha desarrollado vacunas. Entre las cepas estadounidenses se seleccionó la cepa Arkansas, la variante más importante desde el punto de vista económico, y las variantes Massachusetts, Connecticut, Delaware y Georgia 98, contra las que también se han desarrollado vacunas por su gran relevancia. Otras variantes estadounidenses que fueron incluidas en el análisis son JMK, Jilin, Cal 99, Gray y Holte, variantes importantes contra las cuales no se suministran vacunas. Con respecto a variantes asiáticas se incluyeron cepas representantes de los grupos genéticos que co-circulan en Asia en los últimos 15 años (Han et al., 2011): QX, LX4, BJ, CK/CH/LHLJ/95I, CK/CH/LSC/99I y CK/CH/LDL/97I. También se incluyeron las cuatro cepas australianas de mayor relevancia, T Australian, N2/75, N1/62,

V5/90 y VicS, que han evolucionado de forma independiente del resto del mundo debido a su aislamiento geográfico.

4.12.6. Análisis de similitud nucleotídica y aminoacídica

Los cálculos de similitud nucleotídica y aminoacídica se realizaron con el programa MEGA 5.0, utilizando el modelo de sustitución *p-distance*.

4.12.7. Identificación de sitios de glicosilación

La identificación de sitios potenciales de glicosilación en las secuencias aminoacídicas de la porción S1 de la Glicoproteína de Superficie se realizó con el programa MEGA 5.0. Estos sitios presentan la secuencia N-X-S/T, donde N corresponde a arginina, X a cualquier aminoácido excepto prolina, S a serina y T a triptófano.

4.12.8. Análisis de coalescencia

Para realizar el análisis de coalescencia se utilizan secuencias datadas y obtenidas en distintos puntos en el tiempo (datos heterocrónicos) (anexo 2.d).

Se estimó la edad del ancestro común más reciente (tMRCA) y la tasa de sustitución (sustituciones/sitio/año) de las variantes virales circulantes en la región, utilizando las secuencias nucleotídicas de S1. Las estimaciones de estos parámetros evolutivos fueron calculadas con el paquete BEAUTi/BEAST (Drummond et al., 2007). Previamente se utilizó el programa BEAUTi para, a partir de un alineamiento de secuencias en formato NEXUS, generar un archivo en formato XML que sirve de *input* al BEAST.

El paquete BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees*) analiza secuencias de ADN utilizando aproximaciones bayesianas a través de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC). Para calcular el tMRCA el programa BEAST genera un grupo de árboles filogenéticos a partir de un alineamiento de secuencias de edad conocida, y para cada uno de ellos estima la edad de la raíz. Para nuestros datos se analizaron un total de 100.000 árboles, ya que el largo de la cadena de Markov utilizado fue de 100.000.000 pasos y se tomaron muestras cada 1000. Para asegurarse que la MCMC había llegado a la convergencia

se corroboró que todos los parámetros tuvieran valores de ESS (*Effective Sample Size*) mayores a 200.

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

Con el programa TRACER se analizaron de forma gráfica los archivos generados por el BEAST.

5. Resultados

5.1. Estandarización del ensayo de PCR en tiempo real

Se estandarizó un ensayo de diagnóstico de IBV basado en PCR en tiempo real que implica dos reacciones paralelas, una para la detección del genoma de IBV y otra para la detección del gen de la β actina aviar (control interno).

Para estandarizar este ensayo se utilizó una muestra positiva (UY/09/CA/01) y una muestra negativa (UY/09/CA/02). También se empleó la cepa vacunal Massachusetts, que posteriormente se utilizó como control positivo en los ensayos de diagnóstico de muestras de campo. Las condiciones estandarizadas para ambas reacciones se muestran en la tabla 4.

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

Reactivos	Cf
SuperHot Master Mix (Bioron)	1X
IBV-F391/ β -act Fw	0.3 μ M
IBV-R533/ β -act Rv	0.3 μ M
IBV 5' UTR/ β -act Pb	0.1 μ M

En el ensayo de diagnóstico de la muestra positiva hay un incremento de fluorescencia en la muestra y en el control positivo (cepa vacunal) de la reacción de detección del genoma de IBV (Figura 14 A). Se observa también un incremento de fluorescencia en la reacción de detección del gen de la β actina aviar (Figura 14 B). En ninguna de las reacciones se observa incremento de fluorescencia correspondiente a los blancos de PCR, lo que descarta contaminación en la reacción de PCR (Figuras A y B).

En el ensayo de diagnóstico de la muestra negativa no se observa incremento de la fluorescencia en la reacción de detección del genoma de IBV, pero si existe un incremento de fluorescencia en el control positivo (Figura 14 C), y en la detección de β actina (Figura 14 D).

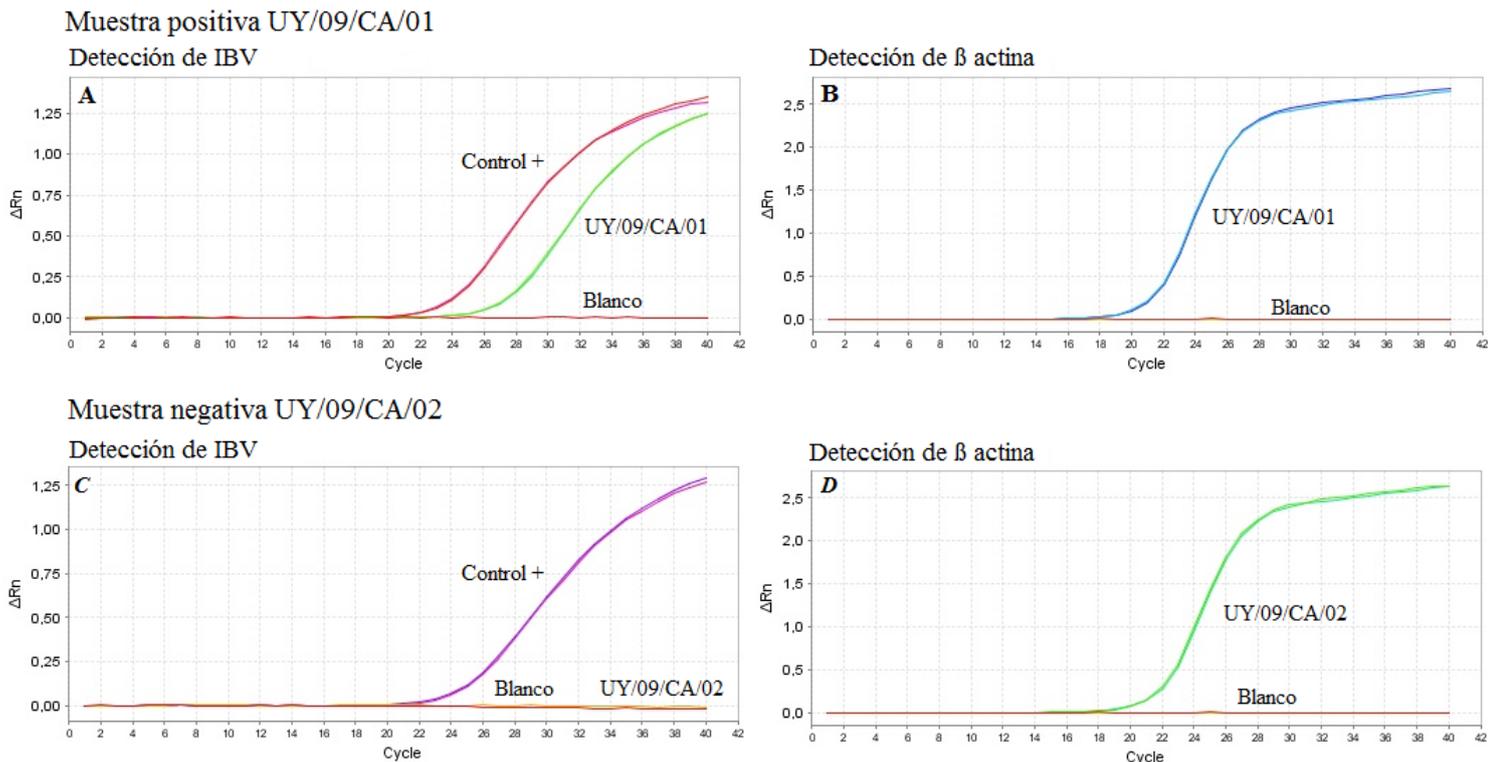


Figura 14. Ensayo de diagnóstico de IBV por PCR en tiempo real de una muestra positiva (UY/09/CA/01) y una muestra negativa (UY/09/CA/02). Para cada ensayo se muestran las curvas de amplificación de detección del genoma de IBV (A y C) y de detección del gen de la β actina aviar (control interno) (B y D).

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

La metodología de PCR en tiempo real estandarizada detectó el genoma viral en 15 de las 25 muestras uruguayas provenientes de animales con sintomatología clínica asociada a Bronquitis Infecciosa Aviar (Tabla 5). También fueron analizadas con esta metodología las muestras argentinas, previamente diagnosticadas como positivas por PCR a tiempo final, corroborando que el genoma de IBV estaba presente en todas ellas (Tabla 5).

Tabla 5. Muestras positivas para IBV por PCR en tiempo real. Se detalla el nombre de la muestra, el año en que fue colectada, el órgano analizado y la edad del animal.

Muestra^a	Año de colecta	Órgano analizado	Edad (días)
UY/09/CA/01	2009	Tráquea	38
UY/10/CA/03	2010	Tráquea	39
UY/11/CA/09	2011	Tráquea	33
UY/11/CA/11	2011	Tráquea	38
UY/11/CA/12	2011	Tráquea y pulmón	49
UY/11/CA/13	2011	Tráquea, tonsilas cecales y bursa	35
UY/11/CA/16	2011	Tráquea	38
UY/11/CA/18	2011	Tráquea y bursa	46
UY/11/CA/19	2011	Tráquea y bursa	38
UY/12/CA/27	2012	Tráquea	40
UY/12/CA/30	2012	Tráquea	33
UY/12/CA/33	2012	Tráquea	41
UY/12/CA/36	2012	Tráquea y bursa	39
UY/12/CA/39	2012	Tráquea y bursa	39
UY/12/CA/40	2012	Tráquea y bursa	47
AR/09/BA/29	2009	ND	ND
AR/09/BA/34	2009	ND	ND
AR/09/BA/35	2009	ND	ND
AR/09/BA/36	2009	ND	ND
AR/09/BA/37	2009	ND	ND
AR/09/BA/38	2009	ND	ND
AR/09/BA/39	2009	ND	ND
AR/10/BA/30	2010	ND	ND
AR/11/BA/27	2011	ND	ND
AR/11/BA/28	2011	ND	ND
AR/11/BA/31	2011	ND	ND
AR/11/ER/32	2011	ND	ND
AR/11/ER/33	2011	ND	ND

^aEl nombre de la muestra hace referencia al país de origen (UY: Uruguay, AR: Argentina), el año de colecta de la muestra y el departamento o provincia de origen (CA: Canelones, BA: Buenos Aires, ER: Entre Ríos).

ND: no disponible

5.3. Ensayo de cuantificación absoluta

5.3.1. Obtención del transcripto

A partir del ADNc de la cepa vacunal Massachusetts se amplificó y purificó un fragmento de 469 pb del 5`UTR de IBV. El amplicón fue clonado en el vector plasmídico pJET 1.2/blunt. Se realizó una minipreparación de una colonia positiva y posteriormente el plásmido se linealizó y purificó. A partir del plásmido lineal purificado se realizó una reacción de transcripción *in vitro*. La concentración del transcripto, expresada como la media \pm desvío estándar, fue de: 12993 ng/ μ L \pm 1,58 ng/ μ L. Teniendo en cuenta esta concentración y aplicando la fórmula presentada en la sección 4.6.6. de *Materiales y Métodos* se calculó el número de copias de ARN por μ L que se obtuvo de la transcripción *in vitro*:

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

$$\text{LT} \times 340$$

$$Y = \frac{12993 \times 10^{-9} \text{ g}/\mu\text{L} \times 6,022 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}}{(469+87) \text{ nucleótidos} \times 340 \text{ g/mol.nucleótidos}}$$

$$(469+87) \text{ nucleótidos} \times 340 \text{ g/mol.nucleótidos}$$

$$Y = 4,1 \times 10^{13} \text{ copias de ARN}/\mu\text{L}$$

5.3.2. Curva Estándar

La curva estándar mostró un rango dinámico lineal de 1×10^2 - 1×10^8 copias de ARN por reacción (Figura 15), en este rango el protocolo se comporta realmente de forma cuantitativa.

Los valores de eficiencia (E: 94%) y coeficiente de determinación (R^2 : 0,999) de la curva estándar fueron muy satisfactorios; los valores aceptables de estas variables son de E mayor a 0,98 y R^2 entre 90-110%. Los valores mínimos de los CVs intra- e inter-ensayo (Tabla 6) indicaron que la reproducibilidad del ensayo es alta.

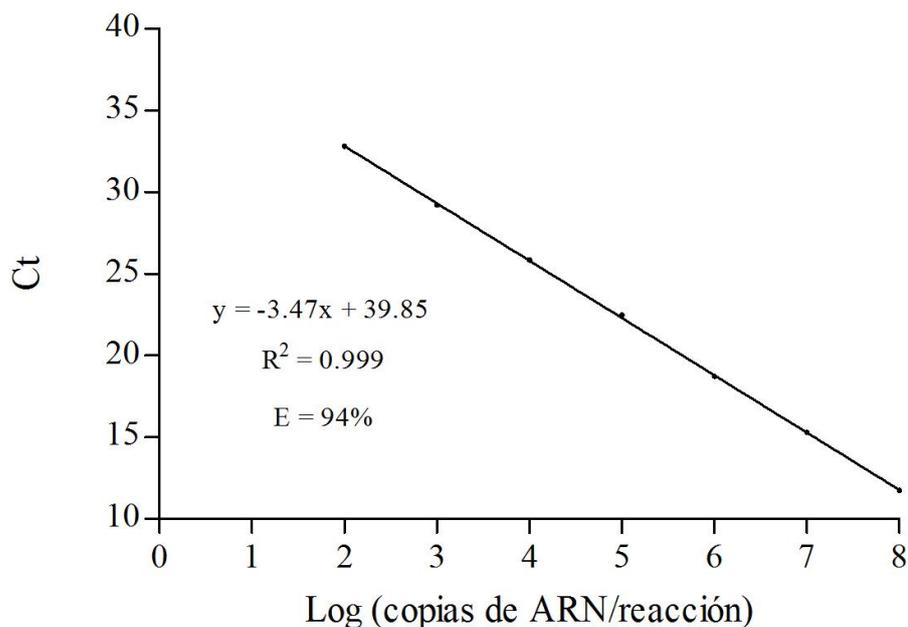


Figura 15. Curva estándar del ensayo de diagnóstico de IBV por PCR en tiempo real. Cada punto representa la media del Ct de nueve medidas (tres ensayos independientes con tres replicas cada uno) para su correspondiente valor de Log (copias de ARN/reacción). Se indican los valores de la eficiencia de la reacción (E) y el coeficiente de determinación (R^2) de la curva de regresión lineal.

Tabla 6. Variabilidad intra- e inter-ensayo

Copias de ARN/reacción	Variaciones intra-ensayo		Variaciones inter-ensayo	
	Media de Ct	CV	Media de Ct	CV
1×10^2	32.57 - 33.07	0.92-1.13	32.82	1.06
1×10^3	28.78 - 29.44	0.61-0.99	29.21	0.85
1×10^4	25.85 - 25.89	0.23-0.30	25.87	0.28
1×10^5	22.45 - 22.52	0.24-0.51	22.49	0.43
1×10^6	18.76 - 18.79	0.36-0.43	18.73	0.27
1×10^7	15.32 - 15.38	0.34-0.45	15.32	0.39
1×10^8	11.73 - 11.78	0.28-0.57	11.75	0.47

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

5.4. Caracterización genética de las cepas de IBV sudamericanas basada en la región codificante de S1

5.4.1. Amplificación y secuenciación

En todas las muestras uruguayas y argentinas, diagnosticadas como positivas para IBV por PCR en tiempo real (Tabla 4), se realizaron las reacciones de PCR para amplificar la secuencia codificante de S1. En 12 de las 15 muestras uruguayas y en todas las muestras argentinas se amplificó la región codificante de S1 en dos fragmentos solapados, S1-S2 de 783 pb (Figura 16) y S5-S4 de 1027 pb (Figura 17). Los amplicones obtenidos se secuenciaron directamente y las secuencias se editaron y ensamblaron para obtener la totalidad de la región codificante de S1.

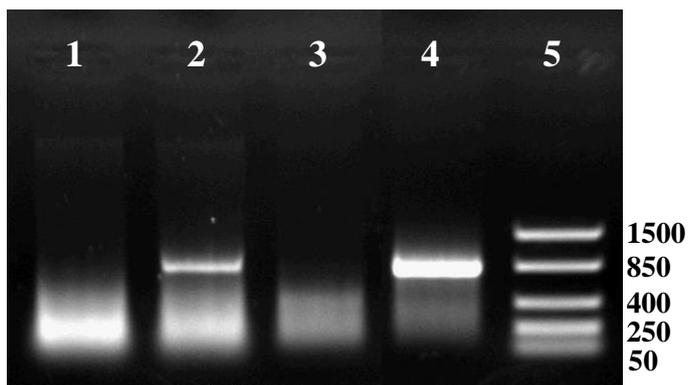


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa del amplicón S1-S2 correspondientes a un blanco de PCR, dos muestras de campo y un control positivo. Carril 1: Blanco de PCR. Carril 2: UY/11/CA/09. Carril 3: UY/11/CA/16. Carril 4: Control Positivo (cepa vacunal Massachusetts). Carril 5: Marcador de peso molecular (se indican los tamaños en pares de bases).

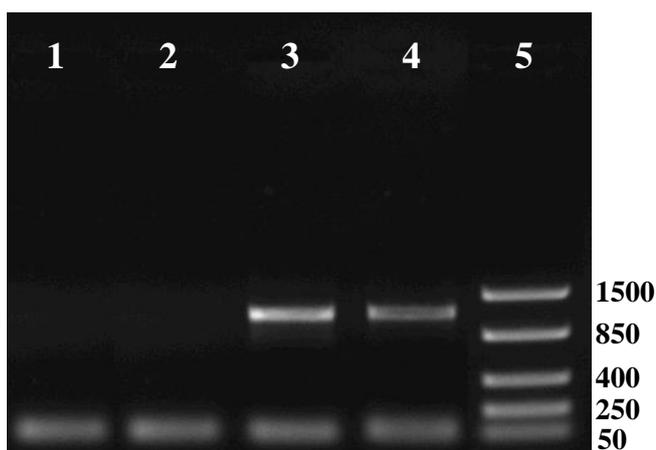


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa del amplicón S5-S4 correspondientes a un blanco de PCR, dos muestras de campo y un control positivo. Carril 1: Blanco de PCR. Carril 2: UY/11/CA/16. Carril 3 UY/11/CA/09: Carril 4: Control Positivo (cepa vacunal Massachusetts). Carril 5: Marcador de peso molecular (se indican los tamaños en pares de bases).

5.4.2. Determinación de secuencias recombinantes

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

En este análisis se incluyeron las 25 secuencias uruguayas y argentinas obtenidas en este estudio, la secuencia de la cepa vacunal Massachusetts y 22 secuencias brasileras disponibles en la base de datos del GenBank (Anexo 2.a). Estas últimas representan las únicas secuencias completas de S1 sudamericanas disponibles en la base de datos (no se encuentran asociadas a ninguna publicación).

En la red filogenética obtenida con el programa *SplitsTree4* se definen claramente tres agrupaciones o clados de aislados sudamericanos (Figura 18). Uno de estos clados está formado por nueve cepas brasileras que se agrupan claramente con la cepa vacunal Massachusetts (clado Massachusetts). Los otros dos clados sudamericanos están formados por cepas brasileras, uruguayas y argentinas (clado I), y cepas uruguayas y argentinas (clado II).

Según el resultado del *Phi test* se encontró evidencia estadísticamente significativa de recombinación en el set de datos analizado ($p = 0,0$). La cepa argentina AR/11/ER/32 es una posible secuencia recombinante, encontrándose unida con líneas transversales al clado Massachusetts y al el clado II (clados parentales hipotéticos).

0.01

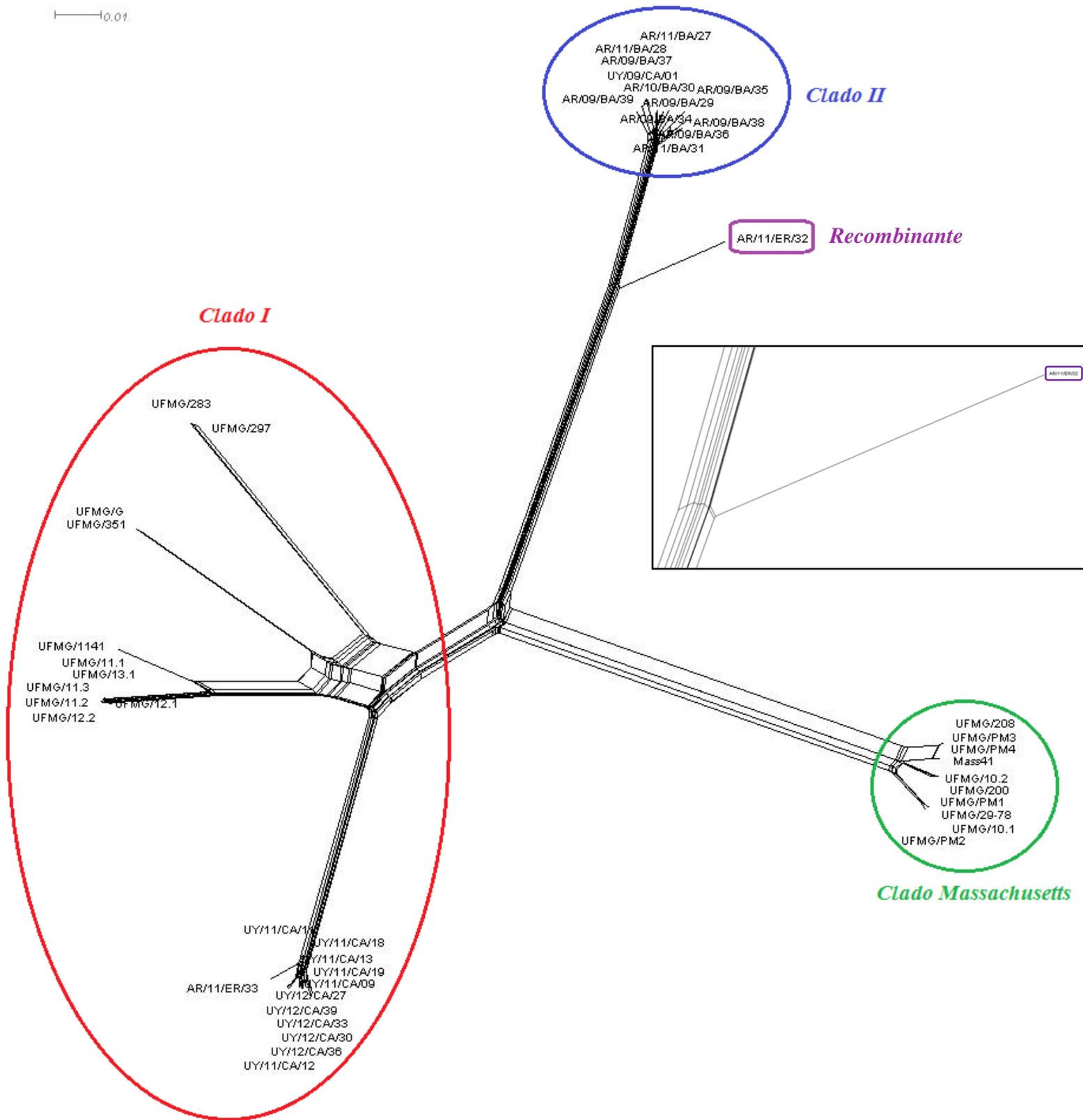


Figura 18. Red filogenética basada en la secuencia nucleotídica completa de S1 de las variantes de IBV sudamericanas y la cepa vacunal Massachusetts. Se definen tres clados sudamericanos: clado Massachusetts (en verde), clado I (en rojo) y clado II (en azul). En violeta se señala la cepa recombinante. Con un recuadro se muestra una ampliación para visualizar mejor las líneas que unen la cepa recombinante con los clados parentales.

Cinco de los seis algoritmos integrados en el paquete RDP4 identificaron que la secuencia nucleotídica de S1 de la cepa argentina AR/11/ER/32 es una secuencia recombinante (Tabla 7), con un sitio de recombinación en la posición nucleotídica 1449 del gen S. Los cinco algoritmos muestran como posible parental mayor (parental que aporta la mayor longitud de secuencia) a la cepa argentina AR/10/BA/30. El parental menor varía con los diferentes algoritmos utilizados, dos algoritmos identifican a la cepa UFMG/PM1 del clado Massachusetts como posible parental menor (igual a lo observado en la red filogenética), mientras que los otros dos algoritmos identifican a las cepas UY/12/CA/33 y UFMG/G del clado I.

Tabla 7. Resultado del paquete RDP4. Se muestra la secuencia recombinante y las secuencias parentales (mayor y menor) identificadas por cada algoritmo.

Algoritmo	Recombinante	Parental mayor	Parental menor
RDP	AR/11/ER/32	AR/10/BA/30	UY/12/CA/33
BootScan	AR/11/ER/32	AR/10/BA/30	UFMG/PM1
GENECONV	AR/11/ER/32	AR/10/BA/30	UFMG/PM1
Chimaera	AR/11/ER/32	AR/10/BA/30	Desconocido
MaxChi	-	-	-
Sis-scan	AR/11/ER/32	AR/10/BA/30	UFMG/G

Para el evento de recombinación descrito se analizaron dos factores que influyen en el cambio de molde de la ARN Polimerasa durante la recombinación por *copy choice*: el grado de identidad de la secuencia nucleotídica local entre los genomas parentales y la presencia de secuencias específicas de ARN que actúan como *hotspots* o puntos calientes de recombinación. Los porcentajes de similitud nucleotídica, en los 100 pb alrededor de sitio de recombinación, entre la secuencia parental mayor AR/10/BA/30 y las posibles secuencias parentales menores UFMG/G, UY/12/CA/33 y UFMG/PM1 son de 90,6 %, 85,8 % y 83,4 % respectivamente. Mientras que las similitudes nucleotídicas de estas secuencias basada en todo el largo de la secuencia codificante de S1 son de 79,9%, 79,3% y 77,2%, respectivamente.

En los coronavirus se ha planteado que la presencia de la secuencia reguladoras de la transcripción (TRS) en el interior de los genes actuaría como *hotspots* de recombinación. La

secuencia TRS de IBV (CTTAACA) no se encontró en las inmediaciones del sitio de recombinación de la secuencia recombinante ni de las posibles secuencias parentales.

5.4.3. Análisis filogenéticos

5.4.3.1. Secuencia completa de S1

Se realizó un análisis filogenético con 68 secuencias nucleotídicas de S1 (que van desde el codón de inicio ATG hasta el sitio de clivaje S1-S2) que incluyó las 12 secuencias uruguayas y las 12 argentinas obtenidas en este estudio (no se incluyó la secuencia recombinante AR/11/ER/32). También se incorporaron las 11 secuencias brasileras no-Massachusetts que se muestran en la red filogenética y 32 secuencias de cepas que circulan en la industria avícola mundial (sección 4.12.5. de *Materiales y métodos*).

Las cepas sudamericanas están incluidas en dos grupos genéticos o genotipos, que denominamos en este estudio genotipo Sudamérica I (SI) y genotipo Asia/Sudamérica II (A/SII) (Figura 19). El genotipo SI es exclusivamente sudamericano y presenta un apoyo estadístico del 100%. Este genotipo está integrado por una cepa argentina, la mayoría de las cepas uruguayas y todas las brasileras. El genotipo A/SII está constituido por la mayoría de las cepas argentinas, una cepa uruguaya, y variantes chinas y taiwanesas del tipo genético CK/CH/LDL/97I. Este genotipo tiene un apoyo estadístico del 100% y se asocia con las cepas europeas D207, D3896, Italy02 y 4/91.

Tanto el genotipo SI como el A/SII se separan claramente de la cepa vacunal Massachusetts, única cepa vacunal comercial autorizada en Uruguay, Argentina y Brasil.

También se realizó un análisis filogenético basado en las secuencias aminoacídicas de S1 utilizando las mismas cepas que en el análisis anterior. La filogenia obtenida presentó la misma topología que la obtenida con las secuencias nucleotídicas (datos no mostrados).

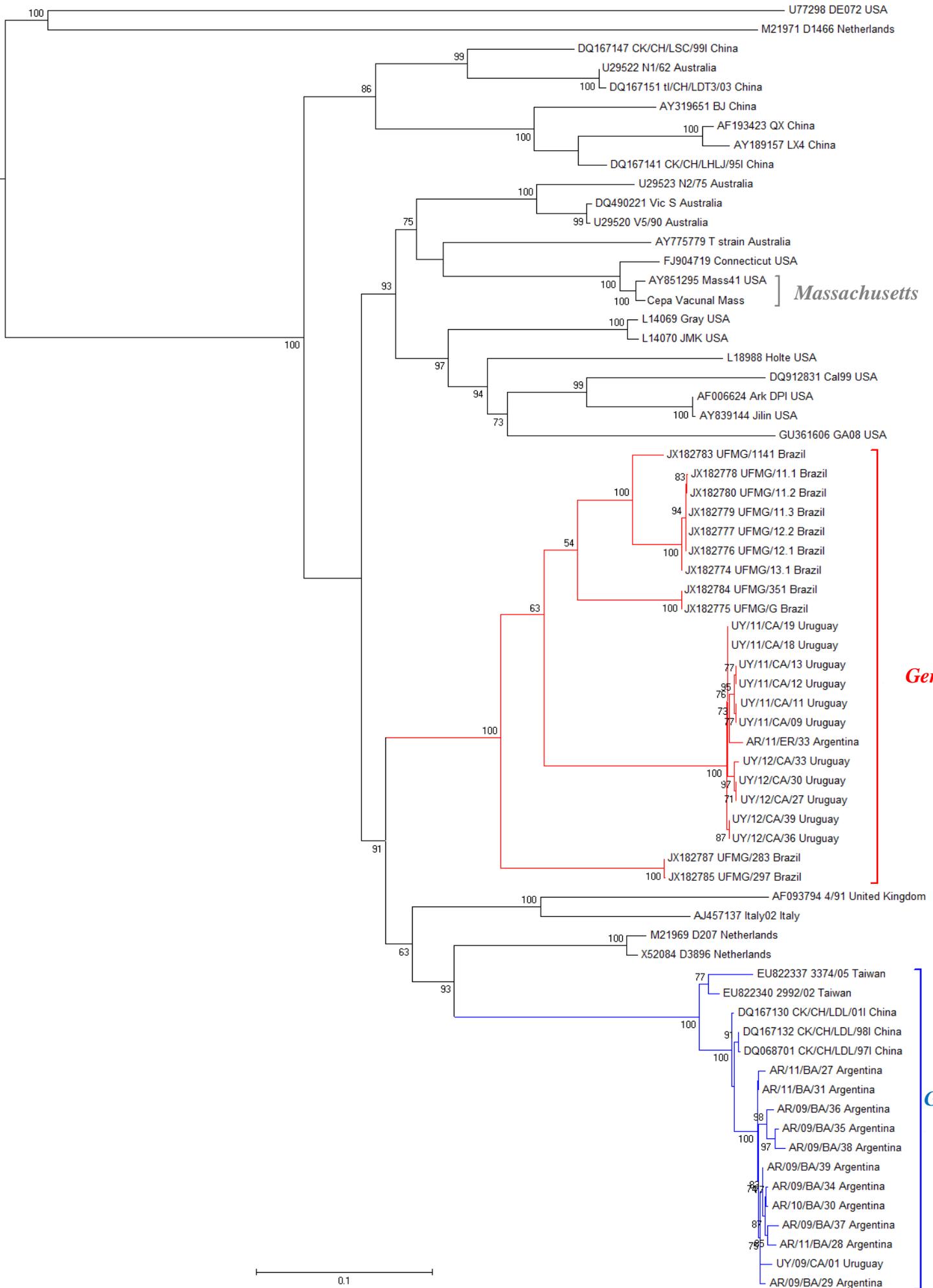


Figura 19. Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en la secuencia nucleotídica codificante de la región S1 de la Glicoproteína de Superficie. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó al conjunto de datos fue el GTR+I+G. Se marcan con llaves los dos genotipos sudamericanos y la cepa vacunal Massachusetts. Para cada secuencia se indica el número de acceso de GenBank, el nombre de la cepa y el país de origen.

5.4.3.2. Secuencias parciales de S1

Los diferentes grupos de investigación de la región han realizado análisis genéticos con amplicones de tamaño variable y de regiones diferentes de S1, lo que genera dificultades a la hora de realizar análisis comparativos (Tabla 8). Es por ello que no se pudo incluir todas las secuencias sudamericanas en un mismo análisis, por lo que se realizaron cinco filogenias diferentes basadas en las siguientes regiones nucleotídicas de S1: 1-528, 229-528, 1-310, 134-722 y 740-1089 (Anexo 3). En estos análisis se utilizaron las mismas secuencias usadas en la sección 5.4.3.1., además de 91 secuencias brasileras, 19 secuencias argentinas, 17 secuencias colombianas y 9 secuencias chilenas (Anexo 2.b).

A partir de los análisis filogenéticos se infirieron los genotipos circulantes en los diferentes países sudamericanos (Tabla 8). En las 5 filogenias se visualizan las agrupaciones de secuencias que forman los genotipos sudamericanos descritos en base a la secuencia completa de S1, sin embargo hay diferencias en las relaciones de estos genotipos con las cepas de referencia y los valores de apoyo estadístico de los clados son bajos. Todas las cepas de campo brasileras corresponderían a cepas del genotipo SI (70 cepas). Las cepas argentinas se agrupan en los genotipos SI (3 cepas) y A/SII (6 cepas), y en un tercer genotipo diferente a los descritos en base a la secuencia completa de S1 (denominado “Cluster B” por Rimondi et al., 2009) que está cercanamente emparentado con el genotipo SI. Las cepas de campo colombianas se agrupan en cuatro genotipos no vacunales, el genotipo A/SII (3 cepas), dos genotipos emparentados cercanamente con el genotipo A/SII, y otro no relacionado; estos tres últimos genotipos habían sido denominados originalmente A, B y D (Alvarado et al., 2005). Todas las cepas chilenas se agrupan en el genotipo A/SII (9 cepas).

Tabla 8. Genotipos sudamericanos inferidos mediante los análisis filogenéticos de secuencias parciales de S1. Se detalla las publicaciones en donde fueron reportadas las secuencias sudamericanas, los años de aislamiento, la región de S1 analizada y el número de secuencias pertenecientes a cada genotipo. Entre comillas se muestra el nombre del grupo genético según la publicación.

	Publicación	Años	Amplicón analizado^a	Nº de secuencias/Genotipo
Brasil	Montassier et al., 2006	1988-2000	1-528	5 Sudamérica I (SI) 8 Massachusetts 1 Connecticut 1 Arkansas
	Villarreal et al., 2007	2002-2006	1-571	12 Sudamérica I (SI)
	Felippe et al., 2010	2003-2009	229-556	12 Sudamérica I “Cluster D207” 11 Massachusetts 1 Connecticut
	Chacón et al., 2011	2003-2009	1-536	41 Sudamérica I (SI) “Genotipo BR I”
Argentina	Rimondi et al., 2009	2001-2008	134-722	3 Sudamérica I (SI) “Cluster C” 6 Asia/Sudamérica II (A/SII) “Cluster A” 6 “Cluster B” 2 Massachusetts 2 Connecticut
Colombia	Alvarado et al., 2005	2003	1-310	3 Asia/Sudamérica II (A/SII) “Genotipo C” 3 “Genotipo A” 4 “Genotipo B” 2 “Genotipo D” 4 Massachusetts 1 Connecticut
Chile	Sin publicar	2008-2009	740-1089	9 Asia/Sudamérica II (A/SII)

^aPosición nucleotídica en el gen S de la cepa M41 de IBV (AY851295)

5.4.4. Variabilidad nucleotídica y aminoacídica en S1 de los genotipos SI y A/SII: comparación con la cepa Massachusetts

El análisis nucleotídico y aminoacídico del genotipo SI incluyó las 12 secuencias uruguayas y argentinas obtenidas en este estudio, y las 11 secuencias brasileras disponibles en la base de datos del GenBank, todas incluidas en la filogenia de la figura 19. Para el genotipo A/SII se analizaron 25 secuencias, las 12 secuencias uruguayas y argentinas y 13

secuencias asiáticas del tipo CK/CH/LDL/97I, estas últimas aisladas entre los años 1997-2011 y disponibles en la base de datos del GenBank (Anexo 2.c).

5.4.4.1. Similitud nucleotídica y aminoacídica intra- e inter-genotipo

Los genotipos SI y A/SII difieren en la similitud nucleotídica y aminoacídica a nivel intra-genotipo, siendo el genotipo A/SII el que presenta mayor homología en sus secuencias. Se observa una baja similitud nucleotídica y aminoacídica cuando se comparan los genotipos sudamericanos entre sí y con la cepa vacunal Massachusetts (Tabla 9).

Tabla 9. Similitud nucleotídica y aminoacídica de S1 a nivel intra- e inter-genotipo.

Genotipo	Similitud nucleotídica (%)		Similitud aminoacídica (%)	
	1	2	1	2
1-Sudamérica I	86.9 a 100		83.9 a 100	
2-Asia/Sudamérica II	79.3 a 83.9	97.9 a 99.9	71.6 a 78.1	95.1 a 100
3-Massachusetts	78.6 a 80.3	77.2 a 78.9	75.6 a 78.8	73.4 a 74.6

5.4.4.2. Marcadores nucleotídicos y aminoacídicos

El análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de S1 de las cepas pertenecientes a los genotipos SI y A/SII reveló la existencia de marcadores nucleotídicos y aminoacídicos únicos de cada genotipo (Figura 21). En el genotipo SI se observa la inserción ACTGGTCCT en la posición 429, que codifica para los aminoácidos TGP (T es treonina, G es glicina y P es prolina). Esta inserción determina que la secuencia nucleotídica codificante de S1 sea de 1632 nucleótidos (544 aminoácidos), mientras que las cepas que forman el genotipo A/SII tiene una secuencia nucleotídica de 1623 nucleótidos (541 aminoácidos). También se realizó este análisis comparativo con las secuencias parciales de S1 disponibles en la base de datos del GenBank. En 70 secuencias brasileras y 3 secuencias argentinas se confirmó la presencia de esta inserción, y se detectó una nueva variante con una mutación no sinónima AATGGTCCT, que codifica para los aminoácidos NGP (N es asparagina).

En el genotipo A/SII se observó que el sitio de clivaje S1-S2 presenta una secuencia característica. En la gran mayoría de las cepas de IBV que circulan en el mundo, inclusive el genotipo SI y la cepa vacunal Massachusetts, el sitio de clivaje es RXRR (R es arginina y X

cualquier aminoácido). En cambio, en todas las secuencias del genotipo A/SII este sitio es RTGR (T es treonina y G es glicina) (Figura 20).

La secuencia recombinante AR/11/ER/32 carece de la inserción al igual que las secuencias del genotipo A/SII, pero no posee el sitio de clivaje característico de este genotipo. El sitio de clivaje es RSRR, al igual que en las variantes del genotipo SI y la cepa vacunal Massachusetts (Figura 20).

5.4.4.3. Sitios potenciales de glicosilación

Se identificaron los sitios potenciales de glicosilación de la secuencia aminoacídica de S1 presentes en los genotipos SI y A/SII, y en la cepa vacunal Massachusetts. En el genotipo SI hay un total de 19 sitios, mientras que en el genotipo A/SII y en la cepa Massachusetts se encontraron 17 sitios potenciales de glicosilación. Los genotipos sudamericanos difieren en 3 sitios, mientras que estos genotipos difieren con la cepa vacunal en 4 sitios potenciales de glicosilación (Figura 21).

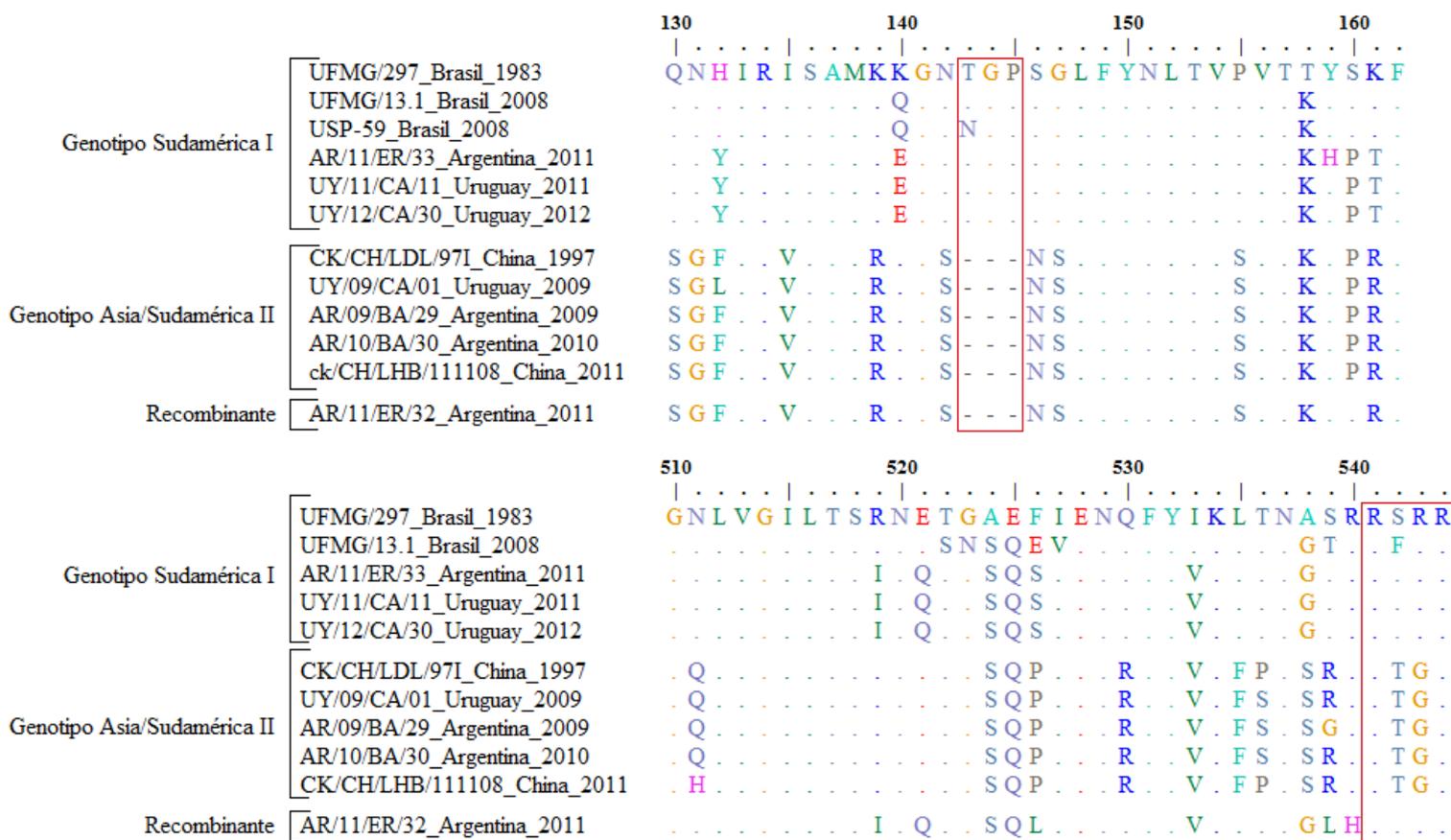


Figura 20. Alineamiento aminoacídico de secuencias representantes del genotipo Sudamérica I y Asia/Sudamérica II, y la secuencia recombinante AR/11/ER/32. Se indica con un recuadro la inserción de tres aminoácidos en el genotipo SI y el sitio de clivaje S1-S2.

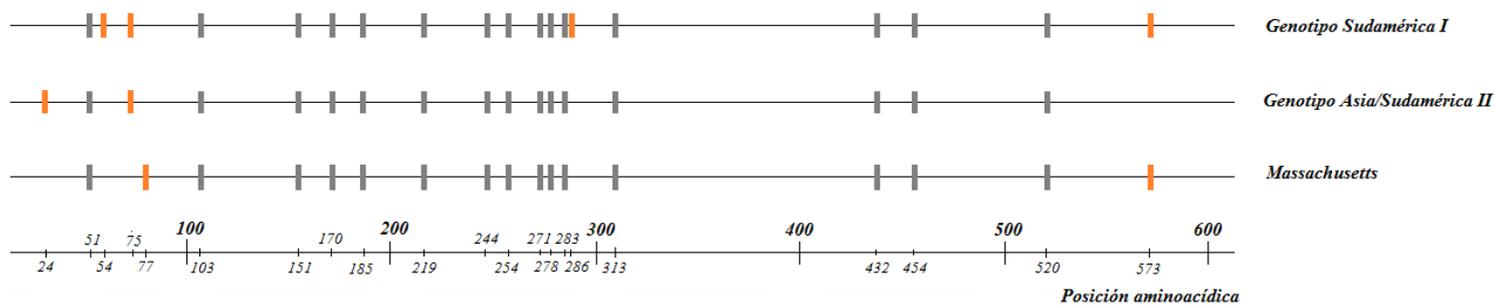


Figura 21. Representación esquemática de los sitios potenciales de glicosilación de la secuencia aminoacídica de S1 de los genotipos Sudamérica I, Asia/Sudamérica II y Massachusetts (cepa vacunal). En color gris se indican los sitios que están presentes tanto en los dos genotipos sudamericanos como en la cepa Massachusetts, en color naranja se indican los sitios que no son compartidos por todas las variantes. En la parte inferior de la imagen se indican las posiciones aminoacídicas de cada sitio.

5.5. Caracterización genética de las cepas de IBV sudamericanas basada en la secuencia codificante del gen N.

5.5.1. Amplificación y secuenciación

En 12 de las 15 muestras uruguayas y en todas las muestras argentinas, diagnosticadas como positivas para IBV por PCR en tiempo real (tabla 5), se amplificó la secuencia codificante del gen N en dos amplicones solapados, N1-N2 de 437 pb (Figura 22), y N3-N4 de 971 (Figura 23). Las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas para obtener el gen N completo.

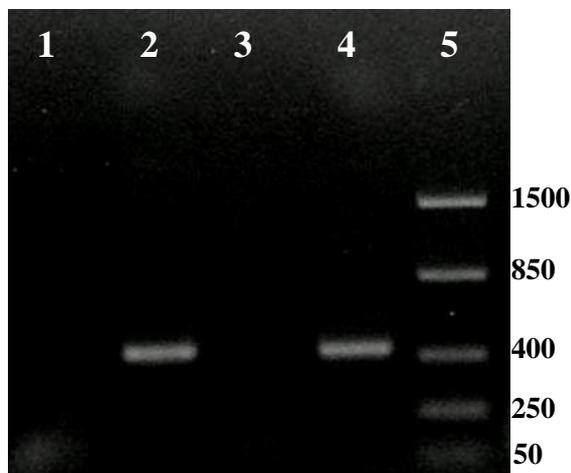


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa del amplicón N1-N2 correspondientes a un blanco de PCR, dos muestras de campo y un control positivo. Carril 1: Blanco de PCR. Carril 2: UY/11/CA/09. Carril 3: UY/11/CA/16. Carril 4: Control Positivo (cepa vacunal Massachusetts). Carril 5: Marcador de peso molecular (se indican los tamaños en pares de bases).

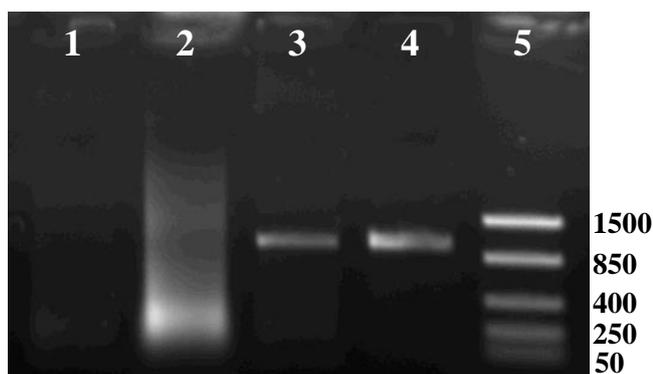


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa del amplicón N3-N4 correspondientes a un blanco de PCR, dos muestras de campo y un control positivo. Carril 1: Blanco de PCR. Carril 2: UY/11/CA/16. Carril 3: UY/11/CA/09. Carril 4: Control Positivo (cepa vacunal Massachusetts). Carril 5: Marcador de peso molecular (se indican los tamaños en pares de bases).

5.5.2. Determinación de secuencias recombinantes

Las 25 secuencias uruguayas y argentinas del gen N, y la de la cepa vacunal Massachusetts se analizaron con los programas *SplitsTree4* y RDP4 para detectar eventos de recombinación. En la red filogenética no se visualizan eventos claros de recombinación y

ninguno de los seis algoritmos integrados en el paquete estadístico RDP4 identificó secuencias recombinantes (datos no mostrados).

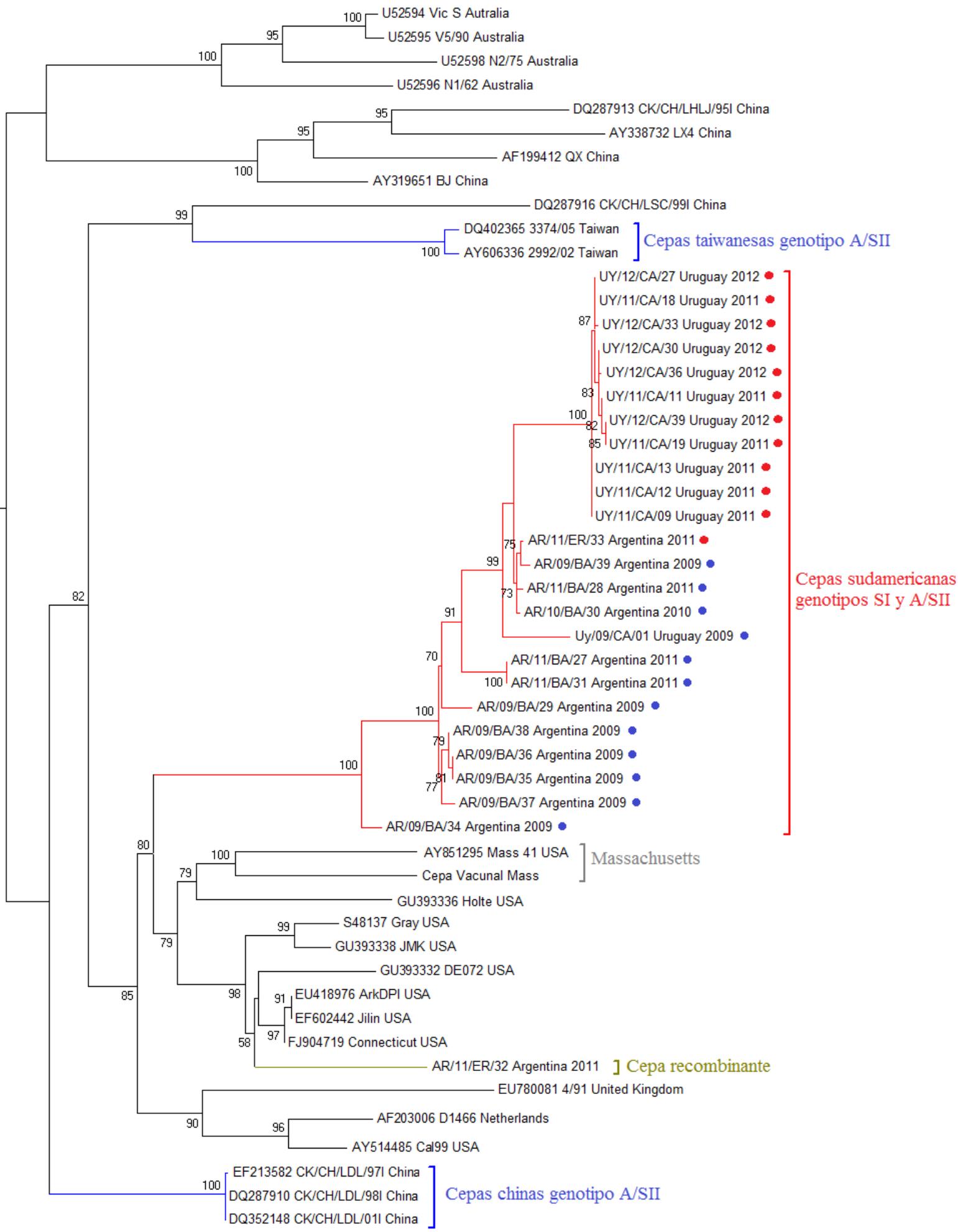
5.5.3. Análisis filogenéticos

Se realizó un análisis filogenético con 51 secuencias nucleotídicas del gen N, incluyendo las 25 secuencias obtenidas en este estudio y 26 secuencias de cepas de referencias que circulan en la industria avícola mundial (los datos de las secuencias se indican en la filogenia de la Figura 24). Todas las cepas utilizadas en la filogenia basada en la secuencia de S1 fueron incluidas en este análisis, a excepción de las cepas brasileras, la cepa americana GA, las cepas europeas Italy02, D207 y D3896, la cepa australiana T strain y la cepa asiáticas t1/CH/LDT3/03, ya que hasta la fecha no existen reportes en la base de datos del GenBank de secuencias completas del gen N de estas variantes.

Las cepas sudamericanas de los dos genotipos descritos sobre la base de S1 se hallan estrechamente relacionadas, con un apoyo estadístico del 100% (Figura 24).

En este análisis se puede observar como la secuencia recombinante AR/11/ER/32 se asocia con las secuencias americanas Arkansas, Jilin, Connecticut y DE072.

Las cepas sudamericanas del genotipo A/SII se separan claramente de los aislamientos chinos de este mismo genotipo. Existe una incongruencia filogenética con respecto a las cepas sudamericanas del genotipo A/SII entre los análisis basados en las secuencias codificantes de S1 y N, ya que estas variantes tienen distintos patrones de agrupación cuando se los analiza a través de una filogenia basada en la secuencia codificante de S1 (Figura 19) y una basada en la secuencia del gen N (Figura 24). Las cepas sudamericanas del genotipo A/SII se asocian con cepas asiáticas del tipo CK/CH/LDL/97I en el análisis filogenéticos de S1, mientras que empleando secuencias de N se asocian con las cepas del genotipo SI.



0.01

Figura 24. Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en la secuencia nucleotídica del gen N. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el GTR+I+G. Se señalan las cepas sudamericanas de los genotipos SI (círculo rojo) y A/SII (círculo azul) definidos en base a S1. Se marcan con llaves la cepa vacunal Massachusetts, la cepa recombinante, las cepas taiwanesas y chinas del genotipo A/SII y las cepas sudamericanas.

Al igual de lo que se observa en la filogenia basada en la secuencia codificante de S1, las cepas sudamericanas se separan claramente de la cepa vacunal Massachusetts.

También se realizó un análisis filogenético basado en las secuencias aminoacídicas de N utilizando las mismas cepas que en el análisis anterior. La filogenia obtenida presentó la misma topología que la obtenida con las secuencias nucleotídicas (datos no mostrados).

5.5.4. Variabilidad nucleotídica y aminoacídica en N de los genotipos SI y A/SII: comparación con la cepa Massachusetts

Se determinó el porcentaje de similitud nucleotídica y aminoacídica de N entre las cepas sudamericanas, y entre estas y la cepa recombinante AR/11/ER/32, la cepa vacunal Massachusetts y tres aislamientos chinos del tipo CK/CH/LDL/97I (Tabla 10). Las cepas sudamericanas tienen una alta similitud nucleotídica y aminoacídica en N, con valores superiores a 95 %. Cuando se comparan, tanto la cepa vacunal Massachusetts con las cepas sudamericanas como las cepas sudamericanas con los aislados del tipo CH/CH/LDL/97I, se observa una baja similitud nucleotídica y aminoacídica.

Tabla 10. Similitud nucleotídica y aminoacídica del gen N entre las cepas sudamericanas, y entre estas y la cepa recombinante AR/11/ER/32, la cepa vacunal Massachusetts y tres aislamientos del tipo CK/CH/LDL/97I.

Cepa/s	Similitud nucleotídica (%)			Similitud aminoacídica (%)		
	1	2	3	1	2	3
1-Sudamericanos	95.9 a 100			95.3 a 100		
2-AR/11/ER/32	91.4 a 92.4			91.6 a 93.3		
3-Massachusetts	89.6 a 90.6	91.3		90.9 a 92.6	92.7	
4-tipo CK/CH/LDL/97I	89.6 a 92.7	90.2 a 91.8	90.6 a 91.3	91.1 a 94.6	91.4 a 92	92 a 92.7

5.6. Análisis de coalescencia

A través de análisis de coalescencias se estimó la tasa de sustitución (sustituciones/sitio/año) y la edad del ancestro común más reciente (tMRCA) de los genotipos SI y A/SII. Para el genotipo SI se utilizaron un total de 82 secuencias de 528 pb datadas entre los años 1975 y 2012 (70 secuencias brasileras, 1 secuencia argentina y 11 uruguayas). Este análisis fue realizado con secuencias parciales de S1 con el fin de contar con un mayor número de secuencias y mayor cantidad de años representados (Anexo 2.c).

Para el genotipo A/SII se realizaron dos análisis de coalescencia con dos grupos de secuencias diferentes. El primero estaba formado por la totalidad de las secuencias completas codificantes de S1 existentes de este genotipo, que incluye 25 secuencias datadas entre los años 1997 y 2011 (Anexo 2.c). El segundo estaba formado por 83 secuencias datadas entre 1979 y 2011, las 25 secuencias del primer grupo y 58 secuencias de las cepas europeas D207, D3896, Italy02 y 4/91 (con las cuales el genotipo A/SII mantiene estrecha relación filogenética) (Anexo 2.d). El objetivo de incorporar al análisis secuencias de un clado hermano es calibrar mejor el cálculo de la tasa de mutación y la edad de los ancestros de los diferentes linajes.

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

El tMRCA calculado para el genotipo SI es de 44 años, lo que indica que el ancestro de este genotipo se habría originado en 1968. El intervalo de confianza está entre los 38-54 años, por lo que el origen estaría entre los años 1958 y 1974 con un 95% de confianza (Tabla 11).

El tMRCA calculado para el genotipo A/SII con el primer grupo de secuencias es de 27 años, por lo que el ancestro de este genotipo se habría originado en 1985. El intervalo de confianza se encuentra entre los 19-40 años, sugiriendo que el origen fue entre los años 1972 y 1993 con un 95% de confianza. Con el segundo grupo de secuencia el tMRCA no varía, pero el rango del intervalo de confianza disminuye, sugiriendo que el origen fue entre los años 1975 y 1992 (Tabla 11). El árbol filogenético muestra que las cepas asiáticas del

genotipo A/SII tienen un origen más antiguo que las cepas sudamericanas de este genotipo (Figura 25). La edad del ancestro de las cepas sudamericanas del genotipo A/SII es de solamente 10 años, con un intervalo de confianza de 5-14 años.

El ancestro común del genotipo SI es 17 años más antiguo que el genotipo A/SII, si consideramos las medias geométricas de los tMRCA. Como se puede visualizar en la figura 26 los intervalos de confianza del 95% no se solapan, por lo que se puede asegurar que el genotipo SI tiene un origen más antiguo que el genotipo A/SII.

Tabla 11. Edad del ancestro común más reciente (tMRCA) de cada genotipo con su correspondiente intervalo de confianza (HPD 95%) y tasa de sustitución (sustituciones/sitio/año) de cada genotipo con su correspondiente intervalo de confianza.

Genotipo	tMRCA	HPD 95%	Tasa de sustitución	HPD 95%
Sudamérica I	44	38 – 54	$6,3 \times 10^{-3}$	$4,8 \times 10^{-3} - 8,9 \times 10^{-3}$
Asia/Sudamérica II Set 1	27	19 – 40	$1,2 \times 10^{-3}$	$6,9 \times 10^{-4} - 1,8 \times 10^{-3}$
Asia/Sudamérica II Set 2	27	20 – 37		

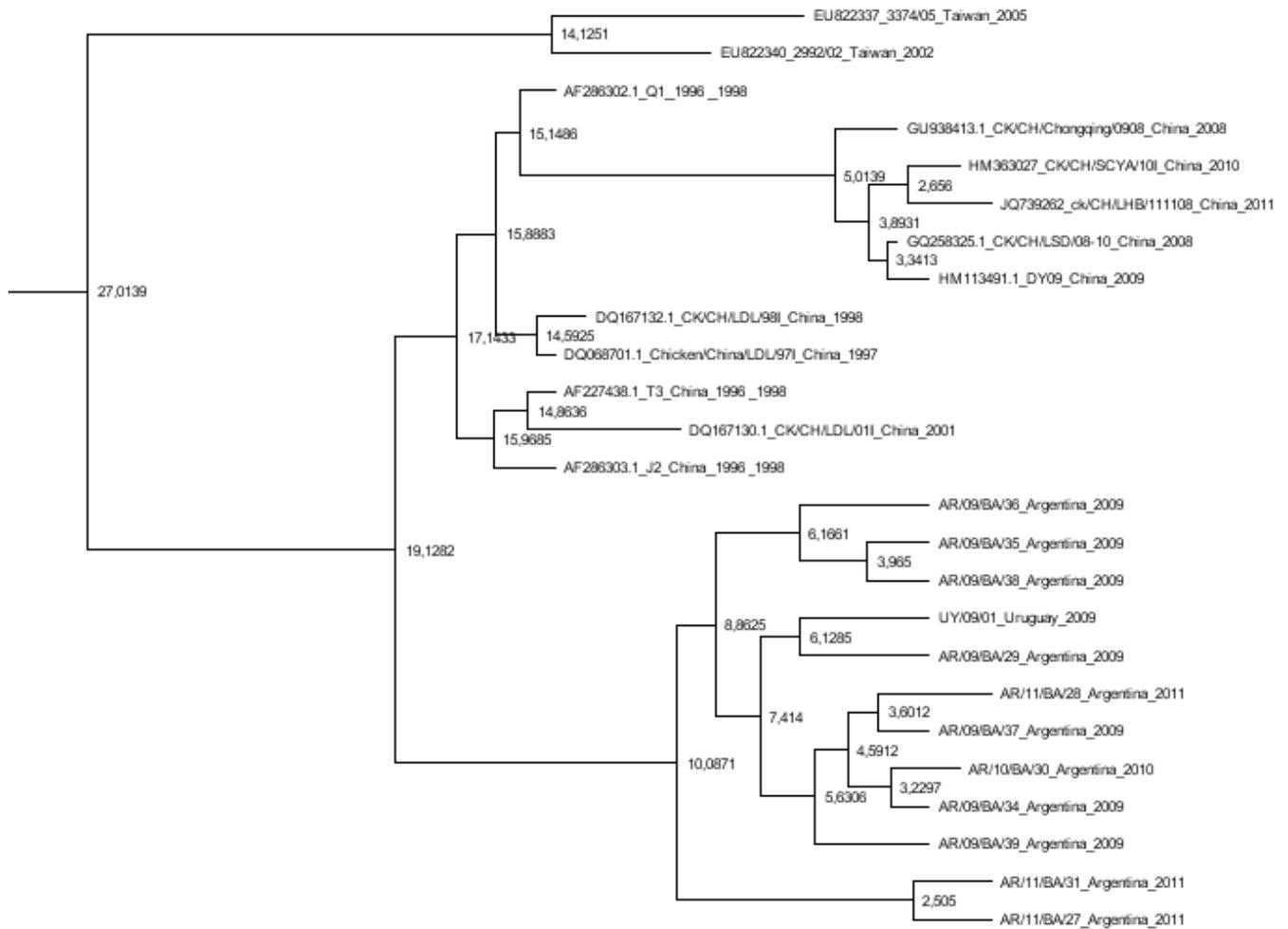


Figura 25. Reconstrucción filogenética datada basada en la secuencia nucleotídica completa codificante de S1 de las cepas del genotipo A/SII. Se indica, en los nodos, la edad en años del ancestro común más reciente de cada linaje.

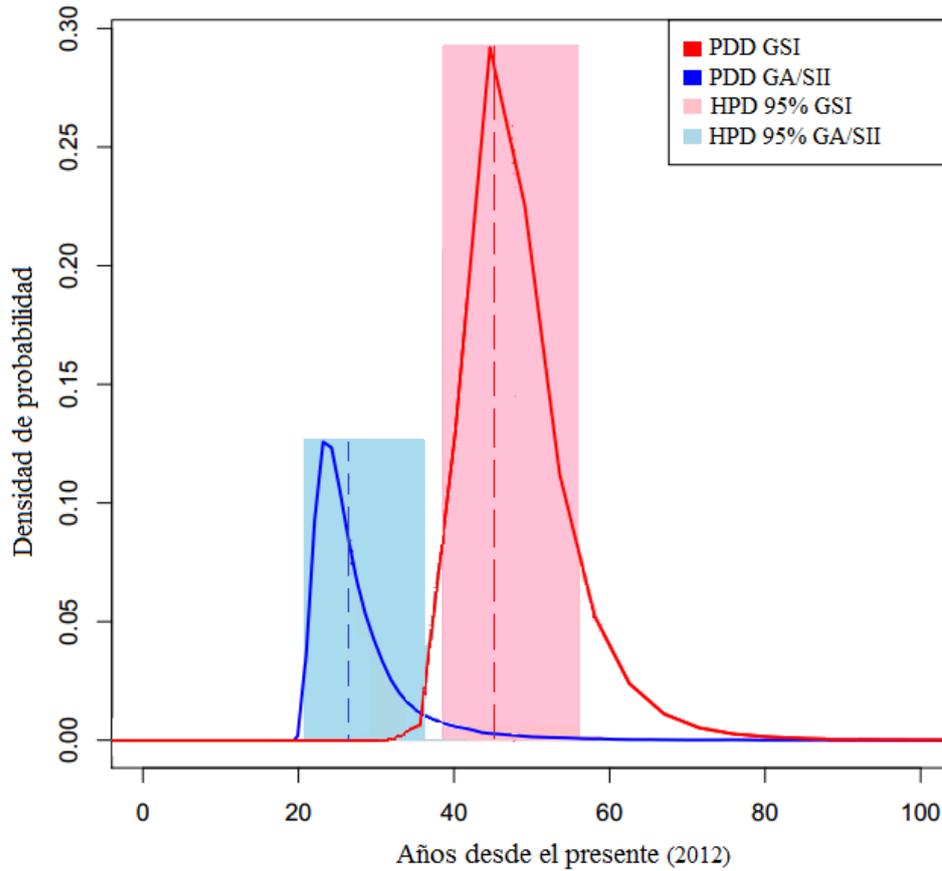


Figura 26. Distribución de densidad de probabilidades de la edad del ancestro común más reciente (tMRCA) de cada genotipo. Los valores del genotipo A/SII corresponden al segundo grupo de secuencias. GSI: genotipo Sudamérica I. GA/SII: genotipo Asia/Sudamérica II. PDD: distribución de densidad de probabilidad. HPD 95%: intervalo de confianza del 95%. Con una línea discontinua se indica la media geométrica del tMRCA de cada genotipo.

6. Discusión

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

El diagnóstico clínico de la Bronquitis Infecciosa suele ser muy dificultoso porque la sintomatología no es específica. Los signos clínicos respiratorios asociados a esta patología, tales como tos, estornudos, exudados nasales y oculares, estridor y disnea, están presentes también en la enfermedad de Newcastle, la Laringotraqueitis Infecciosa y en las infecciones por Pneumovirus (Shalk et al., 1931). En las infecciones renales de IBV, caracterizadas por un aumento de volumen y palidez de los riñones y la presencia de túbulos y uréteres con cristales de ácido úrico, se observa un cuadro clínico similar al provocado por intoxicación con sal y por la enfermedad de Gumboro (Winterfield et al., 1962). Por estas razones, es importante la implementación de métodos de diagnóstico alternativos que complementen la clínica.

En el presente trabajo se implementó, por primera vez en Uruguay, una metodología de diagnóstico molecular de IBV basada en PCR en tiempo real. Se utilizó un juego de cebadores y una sonda de hidrólisis que amplifican una región de 142 pb del 5'UTR del genoma de IBV (Callison et al., 2006). Debido a la importancia funcional del 5'UTR en la replicación y transcripción del genoma viral, es una región sumamente conservada entre las diferentes variantes de IBV, lo que la convierte en un blanco ideal para ensayos de diagnóstico.

Esta metodología de diagnóstico también implicó el diseño y estandarización de un ensayo de control interno basado en la amplificación de una región de 152 pb del exón 3 del gen que codifica para la beta actina aviar. La utilización de un control interno evita los falsos negativos debidos a una extracción de ARN de mala calidad, o a la presencia de inhibidores de la reacción de PCR. No hemos encontrado antecedentes de controles internos del genoma aviar que sean específicos para PCR en tiempo real, por lo que consideramos que nuestro diseño es un aporte metodológico relevante. Este control interno puede aplicarse a cualquier técnica de diagnóstico genético en aves que utilice PCR en tiempo real, en nuestro laboratorio la hemos empleado exitosamente en el diagnóstico de Gumboro y Metapneumovirus Aviar.

En 10 de las 25 muestras uruguayas analizadas, todas extraídas de animales con signos clínicos presuntivos de una infección por IBV, no se detectó el genoma viral, pero se amplificó correctamente el control interno. Es posible que los síntomas clínicos de las aves estén asociados a otra afección respiratoria con signos clínicos similares. Otra posibilidad es que las muestras presuntamente negativas tengan una carga viral muy baja en el momento de la toma de la muestra. La carga viral de una muestra depende de varios factores, entre ellos la edad del ave, la cepa de virus infectante y el órgano infectado. La cepa Massachusetts se detectó mejor por RT-PCR en las primeras etapas de la infección (hasta 14 días), mientras que la cepa de Arkansas lo hizo en las etapas tardías de la infección (21 y 28 días) (Alvarado et al., 2006). Mediante hibridación in situ del gen N de IBV se observó que en la tráquea existe un mayor título viral en etapas tempranas de la infección (7, 14 y 21 días), mientras que en las tonsilas cecales el título fue mayor en las etapas tardías de la infección (21, 28 y 35 días). De acuerdo a estos resultados, una alternativa para incrementar la sensibilidad de la detección de IBV es el análisis de los diferentes tejidos que el virus infecta (tráquea, tonsilas cecales, ovarios, riñones, bolsa de Fabricio). Desafortunadamente, para las muestras negativas se dispuso únicamente de muestras traqueales. Otra alternativa para mejorar la sensibilidad de detección de IBV es una etapa de enriquecimiento viral en huevos embrionados. Esta técnica consiste en el inóculo de un homogeneizado del tejido a estudiar en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de 9 a 11 días de edad (Gelb y Jackwood, 2008).

A partir de la metodología de diagnóstico de IBV por PCR en tiempo real se estandarizó un ensayo de cuantificación absoluta. Este ensayo determinó el desempeño analítico de la metodología en nuestro laboratorio, y permitirá realizar una cuantificación absoluta y precisa de la carga viral de IBV en futuros estudios.

La curva estándar obtenida tuvo una eficiencia (E) de 94%, un coeficiente de determinación (R^2) de 0,999 y un límite de cuantificación (LOQ) inferior de 100 copias. Estos resultados están dentro de los valores considerados como muy satisfactorios, por lo tanto los datos y conclusiones que se pueden obtener a partir de esta curva estándar son totalmente válidos. Además los bajos valores de los CVs intra- e inter-ensayo avalan la reproducibilidad que tiene este ensayo (Tabla 7).

La curva estándar realizada en la publicación de este ensayo tuvo una eficiencia de 91%, un coeficiente de determinación de 0,997, y un LOQ inferior de 100 copias (Callison et al., 2006). La diferencia observada en los valores de eficiencia y coeficiente de determinación pueden atribuirse a la manipulación por diferentes operadores y a diferencias en los protocolos (Tabla 12).

Tabla 12. Diferencias en los protocolos de cuantificación absoluta por PCR en tiempo real entre la metodología publicada (Callison et al., 2006) y la realizada en esta tesis.

	Callison et al., 2006	En esta tesis
Kit de Retrotranscripción	Qiagen	RevertAid M-MuLV (Fermentas)
Fluoróforo-Quencher	FAM-BHQ	VIC-TAMRA
Master Mix	Quantitect Probe Mix (Qiagen)	SuperHot Master Mix (Bioron)
Concentración final cebadores	0.5 μ M	0.3 μ M
Termociclador	SmartCycler	ABI-7500

6.2. Caracterización genética de las cepas de IBV circulantes en la industria avícola sudamericana

6.2.1. Genotipos circulantes en Sudamérica

El análisis de la secuencia codificante de S1 ha permitido identificar decenas de variantes genéticas o genotipos de IBV circulando en el mundo. Argentina, Brasil y Colombia son los únicos países sudamericanos en los cuales se caracterizaron genéticamente cepas de IBV utilizando diferentes secuencias parciales de S1 (Alvarado et al., 2005; Villarreal et al., 2007; Rimondi et al., 2009; Felipe et al., 2010; Chacón et al., 2011). Lamentablemente, la secuenciación de distintas regiones de S1 por los diferentes grupos de investigación sudamericanos no ha permitido la realización de análisis comparativos entre los distintos países.

Las 25 secuencias completas de S1 de variantes uruguayas y argentinas obtenidas en esta tesis se analizaron con 22 secuencias brasileras depositadas en el GenBank (no asociadas a ninguna publicación). En base a estas secuencias se identificaron dos genotipos circulantes en la región, denominados Sudamérica I (SI) y Asia/Sudamérica II (A/SII) haciendo referencia a los continentes en donde fueron detectados. El genotipo SI agrupa cepas

sudamericanas que circulan en Argentina, Brasil y Uruguay. El genotipo A/SII está constituido por cepas argentinas y uruguayas, y variantes asiáticas de un grupo genético descrito en China y denominado CK/CH/LDL/97I (Han et al., 2011). Las variantes asiáticas de este genotipo se describieron por primera vez en 1996 (Yu et al., 2001), y habían sido aisladas sistemáticamente de muestras de tejido proventricular colectadas entre los años 1996 y 2001. Estas variantes estaban asociadas a una patología denominada proventriculitis transmisible, enfermedad que causa un incremento del grosor y una mayor fragilidad del estómago glandular de los pollos (proventrículo). La infección de pollos SPF con aislados de este genotipo causó sintomatología respiratoria y las lesiones proventriculares visualizadas en el campo (Yu et al., 2001), pero no se han publicado estudios adicionales que confirmen esta sintomatología clínica. En el año 2002 se aisló en pollos de engorde de una granja de Taiwán una variante de la cepa CK/CH/LDL/97I, denominada 2992/02, que presentaba problemas nefríticos (Huang et al., 2004). Más recientemente se describieron aislados chinos de este genotipo que generaban sólo síntomas respiratorios (Liu et al., 2009). Las variantes sudamericanas del genotipo A/SII se aislaron de tráqueas de animales con sintomatología respiratoria, sin proventriculitis ni problemas nefríticos en condiciones de campo. Existen otros ejemplos de cepas del mismo genotipo que se asocian con múltiples condiciones clínicas. Un ejemplo muy claro es la cepa QX, que en China se asoció con casos de proventriculitis, mientras que en Europa estuvo asociada a casos de nefritis y de falsas ponedoras (Worthington et al., 2008). Este tipo de diferencias clínicas observadas en el campo dependen de factores tales como la edad, los estados fisiológicos de los pollos en el momento de la infección, y complicaciones debidas a patógenos secundarios (Boshkov et al., 2006).

El análisis comparativo con las secuencias parciales de S1 disponibles en la base de datos mostró que en Colombia y Chile circulan cepas del genotipo A/SII, y confirmó que en Brasil circulan únicamente cepas de campo del genotipo SI (Anexo 3). Resulta sorprendente que el genotipo A/SII no haya sido detectado en Brasil, teniendo en cuenta que la diseminación del virus se produce con relativa facilidad entre regiones cercanas, ya sea a través del aire, por los propios portadores naturales, o por el comercio y transporte de aves y sus productos. Además, la principal zona de producción avícola en Brasil se encuentra en la región sur del país, muy cercana geográficamente a Uruguay y Argentina; países con los que

Brasil mantienen importantes relaciones comerciales a través del mercado común del sur (MERCOSUR).

Existe una notoria diferencia en el porcentaje de cepas caracterizadas de cada genotipo entre los diferentes países sudamericano. Uruguay se asemeja más a Brasil, ya que la gran mayoría de las cepas de IBV uruguayas pertenecen al genotipo SI. Por otro lado, las cepas caracterizadas en Argentina, Chile y Colombia pertenecen mayoritariamente al genotipo A/SII. Aunque en algunos casos el número de muestras analizadas es limitado, los datos podrían estar indicando diferentes frecuencias de circulación de los genotipo SI y A/SII en los países sudamericanos.

6.2.2. Marcadores nucleotídicos y aminoacídicos de los genotipos sudamericanos

Los genotipos SI y A/SII presentan diferencias nucleotídicas y aminoacídicas relevantes (Figura 20). En todas las cepas del genotipo SI se observa una inserción de tres aminoácidos (T/NGP) en la posición 143 de la proteína S, dentro de la segunda región hipervariable (HVR-2). Inserciones de tres aminoácidos en esta posición, diferentes a los del genotipo SI, se observan en otras cepas virales como en los serotipos americanos California 99, Arkansas, Jilín, y GA98, y en las cepas australianas Vic S y V5/90. Las inserciones y deleciones en S1, en particular en las tres HVRs, son descritas frecuentemente y tienen un rol importante en la generación de diversidad genética en IBV (Liu et al., 2009; Abro et al., 2011).

Un marcador diferencial del genotipo A/SII es el sitio de clivaje S1-S2, presente en el precursor S₀, que es procesado por la proteasa celular Furina. El clivaje provoca un cambio conformacional que expone el péptido de fusión y permite su anclaje a la membrana endosomal, desencadenando la fusión de la misma con la envoltura viral (Bosch et al., 2003). La Furina es una serina proteasa celular calcio dependiente que circula entre la red del trans-Golgi, la membrana plasmática y endosomas (Bosschart et al., 1994; Molloy et al., 1994). Esta proteasa procesa una amplia variedad de proteínas precursoras, clivándolas en el extremo carboxilo terminal de una arginina. El motivo de reconocimiento más frecuente en proteínas virales de fusión es RXR(K)R (R es arginina, X cualquier aminoácido y K es lisina que puede o no estar presente) (Basak et al., 2001; Keelapang et al., 2004), mientras que

R(S/F)RR es el motivo más frecuente en las Glicoproteínas de Superficie de las diferentes variantes de IBV (Cavanagh et al., 1986; Li et al., 2000). Esta última secuencia está presente en variantes de campo y vacunas de todo el mundo, incluyendo la cepa vacunal Massachusetts, y en esta tesis fue encontrada en las cepas del genotipo SI. En cambio, el sitio de clivaje de todas las secuencias del genotipo A/SII es RTGR, como ya había sido descrito en secuencias chinas del tipo CK/CH/LDL/97I (Yu et al., 2001). En IBV, la secuencia del sitio de clivaje no se ha correlacionado con la capacidad de procesamiento, el tropismo o la virulencia, como en los ortomixovirus y paramixovirus (Subbiah et al., 2011). Tampoco se ha demostrado que la secuencia del sitio de clivaje esté implicado en la patogenicidad, ya que variantes atenuadas y patógenas del mismo virus poseen secuencias idénticas (Jackwood et al., 2001).

6.2.3. Recombinación en los genotipos sudamericanos

Los eventos de recombinación inter- o intra-génico se describen frecuentemente en cepas de campo de IBV (Kottier et al., 1995; Lee y Jackwood, 2000; Dolz et al., 2008). Esta alta frecuencia es consecuencia de varios factores: i) la presencia de una maquinaria de replicación capaz de disociarse y reasociarse al molde de ARN durante la síntesis discontinua de ARNm subgenómicos, ii) el gran tamaño del genoma de IBV, y iii) la alta disponibilidad de moléculas de ARNceptoras de recombinación (ARN de longitud completa y ARN subgenómicos) (Figura 8). La co-circulación de más de un genotipo en una región y el amplio uso de vacunas a virus vivo puede también contribuir a un aumento de la frecuencia de recombinación entre cepas heterólogas (Kusters et al., 1990; Wang et al., 1993; Jia et al., 1995; Lee y Jackwood, 2000; Bochkov et al., 2007). Por esta razón, es importante analizar diferentes regiones del genoma y aplicar diversas herramientas bioinformáticas para la detección de secuencias recombinantes (Martin et al., 2011).

Mediante estudios bioinformáticos se identificó que la secuencia nucleotídica de S1 de la cepa argentina AR/11/ER/32 es una secuencia recombinante, con un sitio de recombinación en la posición 1449. El parental que aporta la mayor parte de la secuencia al recombinante es una cepa del genotipo A/SII. El parental menor difiere de acuerdo a los programas y algoritmos utilizados, y podría corresponder a una cepa del serotipo Massachusetts o a una del genotipo SI. La dificultad de identificar el parental menor puede

deberse a que solo se dispone de 174 pb del extremo 3' del sitio de recombinación. El análisis basado en el gen N no confirma ninguno de los posibles parentales menores identificado en base a S1 (Figura 24).

En esta tesis también se describe un posible evento de recombinación en las variantes sudamericanas del genotipo A/SII. Estas variantes se asocian con cepas asiáticas del tipo CK/CH/LDL/97I en el análisis filogenético de S1, pero se agrupan con las cepas del genotipo SI cuando se analiza secuencias de N (Figuras 19 y 24). Las variantes sudamericanas del genotipo A/SII podrían haber surgido como resultado de un evento de recombinación entre una variante asiática del tipo CK/CH/LDL/97I y una variante del genotipo SI (Figura 27). Para confirmar esta hipótesis e identificar la ubicación del sitio de recombinación, y para analizar mejor el recombinante AR/11/ER/32, sería necesario secuenciar los aproximadamente 5500 pb que separan S1 y N, incluyendo S2 (gen 2), 3a-3b-E (gen 3), M (gen 4) y 5a-5b (gen 5).

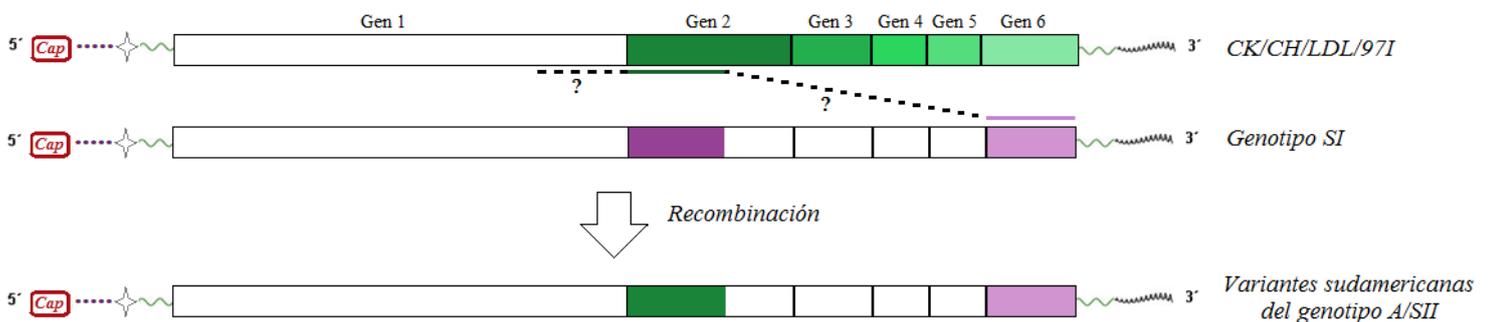


Figura 27. Esquema representativo del evento de recombinación. Se muestran los genomas virales de una variante asiática del tipo CK/CH/LDL97I (parental I), de una variante del genotipo SI (parental II), y de una variante sudamericana del genotipo A/SII (recombinante). Con color se indican las regiones genómicas secuenciadas y en blanco las que restan por secuenciar.

También se han descrito eventos de recombinación entre S1 y N en las cepas taiwanesas 2992/02 y 3374/05 del genotipo A/SII (Chen et al., 2009). Estas cepas se asocian con cepas asiáticas del tipo CK/CH/LDL/97I y con cepas argentinas y uruguayas, integrando el genotipo A/SII, en base a la secuencia de S1. En base a la secuencia de N se agrupan con la cepa CK/CH/LSC/99I, cepa de referencia de uno de los nueve genotipos asiáticos de alta prevalencia en Taiwán que no está relacionado evolutivamente con el genotipo A/SII. La

secuenciación de todo el genoma de estas cepas demostró que se trataban de variantes virales recombinantes (Chen et al., 2009).

6.2.4. Origen de los genotipos sudamericanos

Los estudios de coalescencia nos permitieron establecer la edad de los ancestros más recientes del genotipo SI y A/SII.

El genotipo SI se habría originado en Sudamérica alrededor de 1968 (Figura 26). Previo a la aparición de este genotipo circulaban en Sudamérica cepas del serotipo Massachusetts (Hipólito, 1957, Hidalgo et al., 1976). Como las vacunas comerciales de este serotipo se introdujeron en Sudamérica recién a principio de la década de 1980s, las cepas de campo del serotipo Massachusetts co-circularon con cepas del genotipo SI en los años previos a la vacunación. Es probable que los planes de control con vacunas del tipo Massachusetts colaboraron con un control eficaz de las variantes de campo de este serotipo, pero no tan eficazmente con el control de las variantes del genotipo SI que son muy divergentes (ver sección 6.2.6). Podemos especular que la fuerte presión inmunológica contra las variantes Massachusetts habría proporcionado un ambiente con mayor ventaja adaptativa o “fitness” para el genotipo SI, contribuyendo a su dispersión en Argentina, Brasil y Uruguay. Este comportamiento epidemiológico fue descrito en otras cepas de IBV, como por ejemplo la variante 4/91. Esta variante fue predominante en España en la década de 1990, pero fue rápidamente desplazada por la cepa Italy 02 cuando se comenzaron a utilizar vacunas comerciales contra 4/91 (Dolz et al., 2006).

El genotipo A/SII se habría originado en Asia alrededor de 1985 (Figura 25 y 26), invadiendo Sudamérica 17 años después (Figura 26). Esta expansión intercontinental resulta llamativa, ya que un comportamiento epidemiológico característico de las cepas emergentes de IBV es que suelen poseer poca capacidad de expansión a nuevos territorios. Si bien se ha descrito la presencia y la propagación de algunas cepas de IBV entre regiones geográficas cercanas (Ignjatovic y Sapats, 2000; Meulemans et al., 2001; Ignjatovic et al., 2006), la dispersión de cepas a grandes distancias, por ejemplo entre diferentes continentes, es un evento poco frecuente. Cerca de 20 serotipos emergentes en América del Norte nunca se extendieron a otros continentes. Del mismo modo, la mayoría de los serotipos europeos,

australianos y asiáticos nunca se han aislados en otros continentes (de Wit et al., 2011). Una excepción relevante a esta regla la constituye la cepa de Massachusetts, con distribución mundial, y más recientemente, las cepas QX y 4/91 aisladas en el continente asiático, africano y europeo (Gough et al., 1992; Meulemans et al., 2001; Bochkov et al., 2006; Mase et al., 2008; Worthington et al., 2008). No obstante, los factores que determinan la capacidad de dispersión de nuevas cepas emergentes no son conocidos. Por lo tanto, se hace necesario un continuo relevamiento y caracterización molecular de las poblaciones de IBV para identificar variaciones genéticas que podrían contribuir a la capacidad de dispersión de las cepas.

¿Qué factores externos pudieron contribuir en la propagación de cepas del genotipo A/SII de Asia a Sudamérica? El principal factor a considerar es el comercio de productos avícolas y la importación de pollitos de un día entre Asia y Sudamérica. Si bien existe exportación desde Sudamérica a países asiáticos de líneas parentales y reproductoras, y de pollos y sus derivados de cortes y procesados, no hay un registro oficial de importación de estos productos desde Asia. La invasión pudo tener una ruta indirecta, a través de regiones con las que si tenemos comercio de importación, por ejemplo países europeos. Sin embargo, no se han descrito en las bases de datos secuencias europeas, ni de otros continentes, del genotipo A/SII. Otro factor a tener en cuenta es el papel de las aves silvestres migratorias en la dispersión de variantes de IBV. La cepa QX se extendió desde China a Europa en aproximadamente 7 años, tiempo similar al requerido para la propagación del virus de la influenza aviar altamente patógeno H5N1 a través de aves acuáticas migratorias (Brown et al., 2006), por lo que se especula que QX pudo tener una ruta similar. Recientemente se identificaron coronavirus en especies de aves silvestres, incluidas pavos reales (Liu et al., 2005; Sun et al., 2007), cercetas (Liu et al., 2005) y palomas (Qian et al., 2006), que presentan gran similitud con IBV en la secuencia nucleotídica de S1. Es posible que algunas especies de aves silvestres pueden ser portadoras de IBV, pero no hay evidencia de que las cepas de IBV pueden infectar a las aves silvestres migratorias y transmitirse a largas distancias como lo hace el virus de influenza.

El origen de las variantes sudamericanas del genotipo A/SII podría estar asociado a un evento de recombinación importante. En esta tesis proponemos que ocurrió recombinación

entre la cepa invasora y una variante del genotipo SI. Esta cepa recombinante se habría convertido en el ancestro de las variantes argentinas y uruguayas aquí caracterizadas (Figura 27). Como no se han analizado secuencias del gen N de las variantes chilenas y colombianas, no sabemos si éstas derivan de la cepa invasora o del ancestro recombinante.

6.2.5. Tasas de sustitución nucleotídicas en los genotipos sudamericanos

Los genotipos sudamericanos tienen tasas de sustitución elevadas, del orden de 10^{-3} sustituciones/sitio/año (Tabla 11). A pesar de la baja tasa de mutación que presentan los coronavirus (del orden de 10^{-6} a 10^{-7} nucleótidos copiados por ciclo de replicación), es evidente que un alto porcentaje de las mutaciones son fijadas, contribuyendo a las elevadas tasas de sustitución observadas. Una posible explicación de la elevada fijación de sustituciones es la influencia de presiones selectivas positivas, asociadas a la adaptación de estos virus a las nuevas condiciones ambientales de la avicultura industrial. Las tasas de fijación altas también pueden estar relacionadas a la existencia de una protección limitada brindada por la vacunación. Una vacunación eficaz provee una inmunidad sólida al ave, lo cual limita la replicación del virus y, por consiguiente, disminuye la generación de variantes genéticas. Por otro lado, una vacunación inadecuada podría resultar en un incremento de la población viral, con la consecuente aparición de un mayor número de variantes de IBV (Toro et al., 2012). Se ha descrito que la tasa de sustitución de la región hipervariable de S1 del serotipo 4/91 fue de 3×10^{-3} sustituciones por sitio por año durante la década de 1990, cuando no existía un plan de vacunación específico contra este serotipo (Cavanagh et al., 1998). Por el contrario, la tasa de sustitución de los serotipos Massachusetts y Connecticut, calculada en un período en el cual vacunas vivas atenuadas homólogas se usaban rutinariamente para controlar la enfermedad, osciló en un rango de 10^{-4} a 10^{-6} sustituciones por sitio por año (McKinley et al., 2011).

6.2.6. Vacunas y variabilidad de cepas de campo sudamericanas

La enfermedad de Bronquitis Infecciosa es una de las afecciones más problemáticas relacionada a la avicultura industrial, por lo que el diseño eficaz de los planes de vacunación contra IBV es fundamental para fomentar el desarrollo de esta industria.

Al igual que en muchos países del mundo, las vacunas atenuadas e inactivadas de tipo Massachusetts son las únicas autorizadas oficialmente en los países sudamericanos cuyas secuencias fueron analizadas en esta tesis (Argentina, Brasil, Uruguay, Chile y Colombia). A pesar de la vacunación sistemática, es muy común que surjan brotes de la enfermedad en lotes de aves de la región correctamente inmunizados. Estos brotes pueden ocurrir porque los aislados de campo y los serotipos vacunales difieren antigénicamente, principalmente considerando que los serotipos vacunales presentan bajo nivel de protección cruzada (Cavanagh y Naqui, 1997). Por lo tanto, identificar las variantes de campo de IBV que causan la enfermedad es un paso fundamental para implementar planes de control adecuados.

El análisis de protectotipos en pollos SPF proporciona una información directa y precisa acerca de la eficacia de una vacuna, pero es un método laborioso, costoso y que requiere un alto nivel de instalaciones. También se han empleado análisis de las regiones genómicas virales (genotipificación), y pruebas de virus neutralización (serotipificación) para estudiar el grado de protección cruzada observada entre las cepas de campo y vacunales.

Para la genotipificación es importante analizar regiones genómicas virales involucradas en la inmunidad protectora. Tanto la respuesta inmune humoral como la celular poseen un rol fundamental en la inmunidad protectora. Los principales sitios antigénicos que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes se encuentran en la proteína S1 (Kant et al., 1992; Moore et al., 1997; Ignjatovic et al., 2005), mientras que los principales sitios antigénicos inmunoprotectores que activan la respuesta T citotóxica se encuentran en la proteína N (Ignjatovic et al., 1994; Seo et al., 1997; Collisson et al., 2000).

Los análisis filogenético basados en la secuencia completa de S1 y del gen N muestran que los dos genotipos descritos en esta tesis se separan claramente de la cepa vacunal Massachusetts (Figura 19 y 24). Esta divergencia a nivel filogenético está sustentada por la baja similitud nucleotídica y aminoacídica de la cepa vacunal con los genotipos sudamericanos. Esta similitud es menor que 80 % en el caso de S1 (Tabla 9), y menor que 90 % en el caso de N (Tabla 10). Además, los genotipos sudamericanos y la cepa vacunal difieren en los sitios potenciales de glicosilación (Figura 21), los cuales están involucrados en la antigenicidad de las proteínas (Vigerust et al., 2007).

conferida por 4 cepas vacunales comerciales (Mass, JASS, Jilin y J9) al desafío de un aislado del tipo CK/CH/LDL/97I (Liu et al., 2009). Los resultados indicaron que ninguna de estas vacunas confiere protección contra la cepa desafío. Aunque estos resultados indicarían que el genotipo A/SII no está siendo protegido con la cepa Massachusetts, se debe tener en cuenta que la cepa desafío difiere en el gen N de las variantes sudamericanas del genotipo A/SII, por lo que los resultados no son estrictamente extrapolables.

En el análisis filogenético basado en la secuencia de S1, las variantes del genotipo A/SII se asocian con las cepas D207, D3896, Italy02 y 4/91. Estas cuatro cepas virales generaron importantes pérdidas económicas en granjas avícolas europeas en diferentes momentos de la historia, y en la actualidad se utilizan las cepas vacunales D207, D3896 y 4/91 para inmunizar las granjas europeas. Hasta la fecha no se ha evaluado la protección cruzada existente entre estas cepas vacunales y los genotipos sudamericanos, por lo que una perspectiva inmediata sería implementar ensayos de virus neutralización utilizando las variantes sudamericanas y anti-sueros derivados de estas cepas vacunales.

En resumen, los presentes análisis genéticos basados en S1 y N, y los ensayos de virus neutralización previos, indican un bajo nivel de protección cruzada entre los genotipos sudamericanos y la cepa vacunal Massachusetts. Por lo tanto, se debería evaluar la utilización de otras vacunas comerciales disponibles en el mercado para inmunizar a las granjas avícolas sudamericanas contra IBV. También se debería considerar la posibilidad de atenuar cepas de los genotipos SI y A/SII para el desarrollo de nuevas vacunas.

6.2.7. Otros genotipos sudamericanos

En los análisis basados en secuencias parciales de S1 se observó la circulación en Sudamérica de 4 posibles genotipos adicionales, diferentes a los descritos en base a la secuencia completa de S1: un genotipo argentino, emparentado cercanamente con el genotipo SI y denominado Cluster B por Rimondi et al. (2009), y tres genotipos colombianos, denominados genotipos A, B y D por Alvarado et al. (2005), los dos primeros emparentados cercanamente con el genotipo A/SII (Figura 29). Este estudio comparativo preliminar de los genotipos sudamericanos se pudo realizar porque contábamos con secuencias completas de S1 que pudieron ser comparadas con las distintas secuencias parciales que habían sido

obtenidas por estos grupos de investigación. La caracterización genética realizada mediante el análisis de distintas regiones de S1 dificulta los análisis comparativos y es un importante impedimento para el conocimiento global del virus. Como ocurrió en Sudamérica, muchas veces es imposible comparar los resultados obtenidos por diferentes investigadores, porque las secuencias empleadas son distintas y no se superponen. Además, cuando existen superposiciones parciales, la resolución de los análisis filogenético es escasa por la reducción del número de sitios informativos. Por esta razón, las relaciones entre las variantes presentes en diferentes regiones o franjas temporales se pueden distorsionar, generando conclusiones erróneas en cuanto a sus homologías (de Wit et al., 2011). Además, el análisis de una variante de IBV basado en diferentes regiones de S1 puede llevar a la descripción de genotipos diferentes que son, en realidad, resultado de eventos de recombinación (Wang et al., 1993; Jia et al., 1995; Dolz et al., 2008). Estos inconvenientes podrían evitarse amplificando y secuenciando la región completa codificante de S1 como estándar para la caracterización genética de IBV. La aplicación de esta estandarización al relevamiento de IBV en los países sudamericanos nos permitiría avanzar en el conocimiento de la epidemiología molecular de IBV e implementar herramientas de control adecuadas a los virus circulantes. Este esfuerzo se justifica plenamente por la importancia económica que la industria avícola tiene para el desarrollo comercial de la mayor parte del territorio sudamericano.

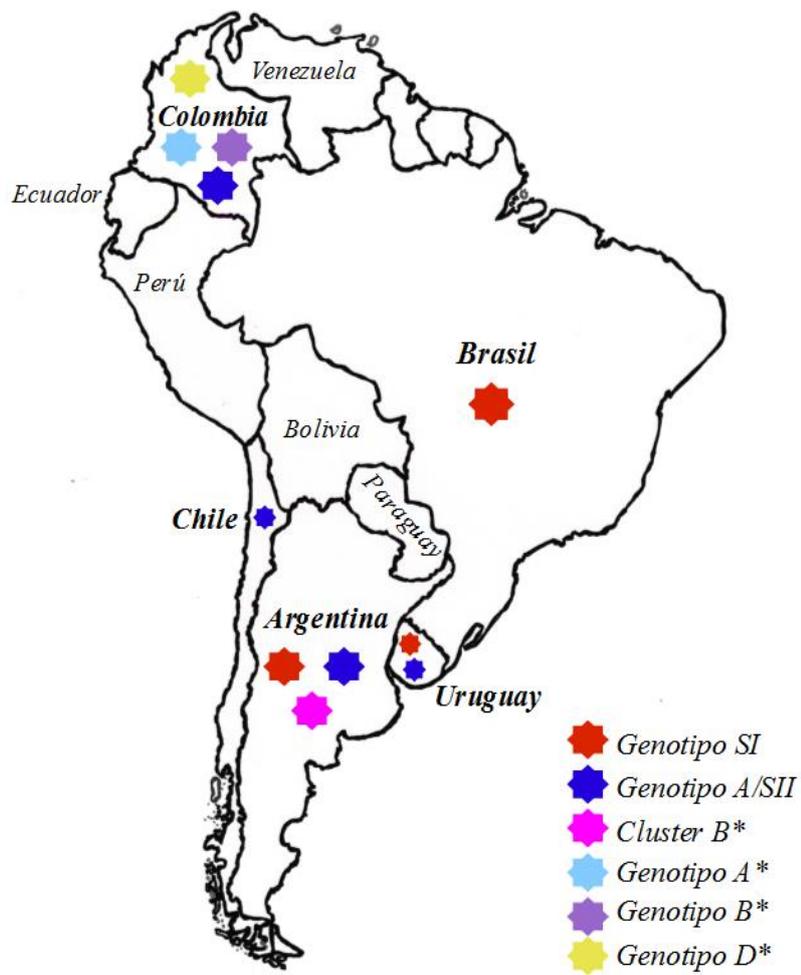


Figura 29. Circulación de IBV en Sudamérica. Se esquematizan los genotipos circulantes en cinco países sudamericanos: Argentina, Uruguay, Chile, Brasil y Colombia. Con un asterisco (*) se indican los genotipos caracterizados únicamente en base a una región parcial de S1.

7. Conclusiones

- La metodología de diagnóstico de IBV fue implementada con éxito y mostró un excelente desempeño analítico.
- Las cepas sudamericanas de IBV presentan una notoria variabilidad genética que refleja una dinámica compleja de este virus en la región; los dos genotipos (SI y A/SII) caracterizados en esta tesis varían en su distribución geográfica, y se originaron a partir de diferentes ancestros en distintos años.
- La recombinación pudo haber tenido un rol relevante en la evolución de las cepas sudamericanas. Las variantes sudamericanas del genotipo A/SII serían el resultado de un evento de recombinación entre variantes asiáticas y sudamericanas (genotipo SI). También se detectó un evento de recombinación intra-génica en una cepa argentina.
- Los análisis genéticos sugieren un nivel de protección cruzada incompleto entre los genotipos sudamericanos y la cepa vacunal Massachusetts (única cepa vacunal autorizada en América del Sur).
- Para avanzar en la epidemiología molecular de IBV en Sudamérica se requiere la estandarización de metodologías de diagnóstico y caracterización que permitan obtener resultados comparables entre los distintos grupos de investigadores. Se sugiere el análisis completo de SI como estándar de análisis para la genotipificación viral.

8. Perspectivas

- Continuar con el diagnóstico y caracterización genética de muestras de campo.
- Desarrollar, estandarizar y validar un ensayo basado en PCR en tiempo real para la diferenciación de los genotipo SI y A/SII, utilizando como blanco los marcadores nucleotídicos y aminoacídicos descritos para cada genotipo.
- Obtener y analizar la secuencia completa de la región 3' del genoma de 9 Kb (genes 2, 3, 4, 5 y 6) de variantes de campo de IBV. El análisis de nuevas regiones del genoma nos permitirá profundizar en el conocimiento de nuestras variantes de campo, así como analizar eventos de recombinación.
- Identificar las presiones selectivas que están actuando sobre los diferentes genes para obtener información sobre la funcionalidad de las proteínas y sus aminoácidos.
- Realizar ensayos de virus neutralización con aislamientos de los genotipos sudamericanos, acoplados a nuestro ensayo de cuantificación absoluta por PCR en tiempo real, como método alternativo de evaluar la capacidad neutralizante de diferentes sueros vacunales. Este enfoque se ha aplicado exitosamente en otros modelos virales (Saito et al., 2003; van Santen et al., 2004).
- Realizar análisis de coalescencia y filogeografía utilizando todas las secuencias de S1 datadas y disponibles en la base de datos del GenBank. Este análisis nos permitirá conocer el lugar y el año de origen de IBV, la dinámica de distribución y las rutas migratorias de las diferentes variantes regionales y mundiales.
- Estudiar la dinámica poblacional de IBV a través de análisis de cuasiespecies en distintos tejidos. Como IBV infecta múltiples órganos, es un modelo interesante para analizar la diversidad genética y establecer la frecuencia de mutación del virus en distintos tejidos y realizar un análisis comparativo (filogeografía intra-hospedero). Este análisis permitirá estudiar el posible rol de las cuasiespecies en el tropismo y patogénesis viral.

9. Bibliografía

- Abdel-Moneim, AS, El-Kady, MF, Ladman, BS, Gelb J. 2006. S1 gene sequence analysis of a nephropathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. *Virology*. 3:78.
- Abro SH, Renström LH, Ullman K, Isaksson M, Zohari S, Jansson DS, Belák S, Baule C. 2011. Emergence of novel strains of avian infectious bronchitis virus in Sweden. *Vet Microbiol.* 155:237-246.
- Aho P. 2011. Lower input prices in 2012. En: *Broiler Economics*. Aviagen Poultry Bulletin 19.
- Alvarado IR, Villegas P, Mossos N, Jackwood MW. 2005. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Colombia during 2003. *Avian Dis.* 49:494-499.
- Alvarado IR, Villegas P, El-Attrache J, Jackwood MW. 2006. Detection of Massachusetts and Arkansas serotypes of infectious bronchitis virus in broilers. *Avian Dis.* 50:292-297.
- Ammayappan A, Upadhyay C, Gelb J Jr, Vakharia VN. 2008. Complete genomic sequence analysis of infectious bronchitis virus Ark DPI strain and its evolution by recombination. *Virology*. 2008. 5:157.
- Andreasen J, Jackwood M, Hilt D. 1991. Polymerase chainreaction amplification of the genome of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 35:216-220.
- Armstrong J, Niemann H, Smeekens S. 1984. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. *Nature.* 308:751-752.
- Basak A, Zhong M, Munzer JS, Chrétien M, Seidah NG. 2001. Implication of the proprotein convertases furin, PC5 and PC7 in the cleavage of surface glycoproteins of Hong Kong, Ebola and respiratory syncytial viruses: a comparative analysis with fluorogenic peptides. *Biochem J.* 353:537-545.
- Berry D, Cruickshank J, Chu H, Wells R. 1964. The structure of infectious bronchitis virus. *Virology.* 23:403-407.
- Bochkov YA, Batchenko GV, Shcherbakova LO, Borisov AV, Drygin VV. 2006. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. *Avian Pathol.* 35:379-393.
- Bochkov YA, Tosi G, Massi P, Drygin VV. 2007. Phylogenetic analysis of partial S1 and N gene sequences of infectious bronchitis virus isolates from Italy revealed genetic diversity and recombination. *Virus Genes.* 351:65-71.
- Boots A, Kusters J, Van Noort J, Zwaagstra K, Rijke E, Van der Zeijst B, Hensen E. 1991. Localization of a T-cell epitope within the nucleocapsid protein of avian coronavirus. *Immunology.* 74:8-13.
- Boots A, Benaissa B, Hesselink W, Rijke E, Schrier C, Hensen E. 1992. Induction of anti-viral immune responses by immunization with recombinant-DNA encoded avian coronavirus nucleocapsid protein. *Vaccine.* 10:119-124.

- Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ. 2003 The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol.* 77:8801-8811.
- Bosshart H, Humphrey J, Deignan E, Davidson J, Drazba J, Yuan L, Oorschot V, Peters PJ, Bonifacino JS. 1994. The cytoplasmic domain mediates localization of furin to the trans-Golgi network en route to the endosomal/lysosomal system. *J Cell Biol.* 126:1157-1172.
- Brierley I, Jenner A, Inglis S. 1992. Mutational analysis of the “slippery sequence” component of a coronavirus ribosomal frameshifting signal. *J Mol Biol.* 227:463-479.
- Brown JD, Stallknecht DE, Beck JR, Suarez DL, Swayne DE. 2006. Susceptibility of North American ducks and gulls to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *Emerg Infect Dis.* 12:1663-1670.
- Callison SA, Hilt DA, Boynton TO, Sample BF, Robison R, Swayne DE, Jackwood MW. 2006. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *J Virol Methods* 138:60-65.
- Cavanagh D, Davis PJ, Pappin DJ, Binns MM, Bournsnel ME, Brown TD. 1986. Coronavirus IBV: partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-Arg at the cleavage site of the spike precursor polypeptide of IBV strains Beaudette and M41. *Virus Res.* 4:133-143.
- Cavanagh D, Elus MM, Cook JK. 1997. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathol.* 26:63-74.
- Cavanagh D, Naqui S, 1997. Infectious Bronchitis. En: *Diseases of Poultry*, Tenth Edition. 511–526.
- Cavanagh, D., K. Mawditt, A. Adzhar, R. E. Gough, J. P. Picault, C. J. Naylor, D. Haydon, K. Shaw, and P. Britton. 1998. Does IBV change slowly despite the capacity of the spike protein to vary greatly? *Adv Exp Med Biol.* 440:729-734.
- Cavanagh D. 2003. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.* 32:567-582.
- Cavanagh D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res.* 38:281-297.
- Chacón J, Nogueira J, Assayag M, Peloso C, Pedroso A, Piantino A. 2011. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Pathol.* 40:153-162.
- Chen HW, Huang YP, Wang CH. 2009. Identification of Taiwan and China-like recombinant avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. *Virus Res.* 140:121-129.
- Chu VC, McElroy LJ, Ferguson AD, Bauman BE, Whittaker GR. 2006. Avian infectious bronchitis virus enters cells via the endocytic pathway. *Adv Exp Med Biol.* 581:309-312.
- Collisson EW, Pei J, Dzielawa J, Seo SH. 2000. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. *Dev Comp Immunol.* 24:187-200.

- Cook JKA, Chesher J, Baxendale W, Greenwood N, Huggins MB, Orbell SJ. 2001. Protection of chickens against renal damage caused by a nephropathogenic infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 30:423-426.
- Crinion P, Ball R, Hofstad M. 1970. Pathogenesis of oviduct lesions in immature chickens following exposure to infectious bronchitis virus at one day old. *Avian Dis.* 14:32-41.
- Cubillos A, Ulloa J, Cubillos V, Cook JK. 1991. Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. *Avian Pathol.* 20:85-99.
- de Groot RJ. 2012. Family Coronaviridae. Virus taxonomy, the 9th report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego, CA. 806–828.
- de Wit JJ. 2000. Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 29:71-93.
- de Wit JJ, Cook JK, van der Heijden HM. 2011. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 40:223-35.
- Desouzart O. 2009. La alta calidad de las carnes de aves y sus efectos en la evolución del mercado. V Intestinal Health Food Safety Seminar – Brasil.
- Di Fabio J, Rossini LI, Orbell SJ, Paul G, Huggins MB, Malo A, Silva BG, Cook JK. 2000. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. *Avian Dis.* 44:582-589.
- Dolz R, Pujols J, Ordonez G, Porta R, Majo N. 2008. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus in Spain over a fourteen year period. *Virology.* 374:50-59.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 29:1969-1973.
- Eckerle LD, Lu X, Sperry SM, Choi L, Denison MR. 2007. High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exoribonuclease mutants. *J Virol.* 22:12135-12144.
- Eckerle LD, Becker MM, Halpin RA, Li K, Venter E, Lu X, Scherbakova S, Graham RL, Baric RS, Stockwell TB, Spiro DJ, Denison MR. 2010. Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLOS Pathog.* 6:e1000896.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797.
- Eleouet J, Rasschaert D, Lambert P. 1995. Complete sequence (20 kilobases) of the polyprotein-encoding gene 1 of transmissible gastroenteritis virus. *Virology.* 206:817-822.
- Errea E. 2011. Carne aviar: situación y perspectivas. Anuario OPYPA 2011. 97-105. ([http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,7,594,O,S,0,MNU;E;66;8;MNU;,"](http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,7,594,O,S,0,MNU;E;66;8;MNU;,)).
- Fan H, Ooi A, Wah Tan Y, Wang S, Fang S, Liu D, Lescar J. 2005. The Nucleocapsid Protein of Coronavirus Infectious Bronchitis Virus: Crystal Structure of Its N-Terminal Domain and Multimerization Properties. *Structure.* 13:1859-1868.

- Fang SG, Shen H, Wang J, Tay FP, Liu DX. 2008. Proteolytic processing of polyproteins 1a and 1ab between non-structural proteins 10 and 11/12 of Coronavirus infectious bronchitis virus is dispensable for viral replication in cultured cells. *Virology*. 2008. 379:175-80.
- FAO Statistical Yearbook 2010, B10 - Producción de carne bovina, ovina y caprina; B11 - Producción de carne de cerdo y de pollo. (<http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/ess-yearbook2010/yearbook2010-production/es/>).
- Felippe PA, da Silva LH, Santos MM, Spilki FR, Arns CW. 2010. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Dis*. 54:1191-1196.
- Gelb J, Jackwood M. 2008. Infectious Bronchitis. In DE Swayne (ed.). *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*, 5th ed. American Association of Avian Pathologists (pp. 146-149). Athens, USA.
- Gelb J, Wolff J, Moran C. 1991. Variant Serotypes of Infectious Bronchitis Virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian Dis*. 35: 82-87.
- Gelb J, Weisman Y, Ladman BS, Meir R. 2005. S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). *Avian Pathol*. 34:194-203.
- Godet M, L'Haridon R, Vautherot J, Laude H. 1992. TGEV coronavirus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology*. 188:666-675.
- Godet M, Grosclaude J, Delmas B, Laude H. 1994. Major receptor-binding and neutralization determinants are located within the same domain of the transmissible gastroenteritis virus (coronavirus) spike protein. *J Virol*. 68:8008-8016.
- Gorbalenya A, Donchenko A, Blinov V, Koonin E. 1989. Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold. *FEBS Lett*. 243:103-114.
- Gough RE, Randall CJ, Dagless M, Alexander DJ, Cox WJ, Pearson D. 1992. A "new" strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Vet Rec*. 130:493-494.
- Goryo M, Umemura T, Itakura C. 1984. Concurrence of nephrosis-nephritis due to infectious bronchitis virus and infectious bursal disease in broiler chickens. *Avian Pathol*. 13:191-200.
- Han Z, Sun C, Yan B, Zhang X, Wang Y, Li C, Zhang Q, Ma Y, Shao Y, Liu Q, Kong X, Liu S. 2011. A 15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious bronchitis coronavirus in China. *Infect Genet Evol*. 11:190-200.
- Hesselink WG. 1991. Serotyping avian infectious bronchitis virus: selection of a unified method. In E.F. Kaleta & U. Heffels-Redmann (Eds.). *Proceedings of the 2nd International Symposium on Infectious Bronchitis* (pp. 87-97). Rauischholzhausen, Germany.
- Hidalgo H, Gallardo R, Rosende S. 1976. Isolation of infectious bronchitis virus from broiler chickens in Chile. *Avian Dis*. 20:601-603.

- Hidalgo H, Gallardo R, Toro H. 1986. Antigenic and pathogenic properties of 3 isolates of infectious bronchitis virus recovered from inoculated birds. *Zentralbl Veterinarmed B*. 331:26-35.
- Hipólito O. 1957. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. *Arquivo Escola Veterinária Universidade de Minas Gerais*. 10:131-151.
- Huang YP, Lee HC, Cheng MC, Wang CH. 2004. S1 and N gene analysis of avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. *Avian Dis*. 48:581-589.
- Ignjatovic J & Galli L. 1994. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. *Arch virol*. 138:117-134.
- Ignjatovic J, Sapats S. 2000. Avian infectious bronchitis virus. *Rev Sci Tech*. 19:493-508.
- Ignjatovic J, Sapats S. 2005. Identification of previously unknown antigenic epitopes on the S and N proteins of avian infectious bronchitis virus. *Arch Virol*. 150:1813-1831.
- Ignjatovic J, Gould G, Sapats S. 2006. Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. *Arch Virol*. 151:1567-1585.
- Jackwood MW, Hilt DA, Callison SA, Lee CW, Plaza H, Wade E. 2001. Spike glycoprotein cleavage recognition site analysis of infectious bronchitis virus. *Avian Dis*. 45:366-372.
- Jia W, Karaca K, Parrish CR, Naqi SA. 1995. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Arch Virol*. 140:259-271.
- Kant A, Koch G, van Roozelaar D, Kusters J, Poelwijk F. 1992. Location of antigenic sites defined by neutralising monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolypeptide. *J Gen Virol*. 73:591-596.
- Keelapang P, Sriburi R, Supasa S, Panyadee N, Songjaeng A, Jairungsri A, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Malasit P, Sittisombut N. 2004. Alterations of pr-M cleavage and virus export in pr-M junction chimeric dengue viruses. *J Virol*. 78:2367-2381.
- Kinde H, Daft B, Castro A, Bickford A, Gelb J, Reynolds J. 1991. Viral pathogenesis of a nephrotropic infectious bronchitis virus isolated from commercial pullets. *Avian Dis*. 35:415-421.
- Kottier SA, Cavanagh D, Britton P. 1995. Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology*. 213:569-80.
- Kusters JG, Jager EJ, Niesters HG, van der Zeijst BA. 1990. Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Vaccine*. 8:605-608.
- Ladman BS, Loupos AB, Gelb. 2006. Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. *Avian Pathol*. 35:127-133.
- Lai M, Cavanagh C. 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res*. 48:1-100.
- Lauber C, Gorbalenya AE. 2012. Partitioning the genetic diversity of a virus family: approach and evaluation through a case study of picornaviruses. *J. Virol*. 86:3890-3904.

- Lee CW & Jackwood MW. 2000. Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV. *Arch Virol.* 145:2135-2148.
- Liu D, Inglis S. 1992. Internal entry of ribosomes on a tricistronic mRNA encoded by infectious bronchitis virus. *J Virol.* 66:6143-6154.
- Liu S, Chen J, Chen J, Kong X, Shao Y, Han Z, Feng L, Cai X, Gu S, Liu M. 2005. Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (*Pavo cristatus*) and teal (*Anas*). *J Gen Virol.* 86:719-725.
- Liu S, Zhang X, Wang Y, Li C, Han Z, Shao Y, Li H, Kong X. 2009. Molecular characterization and pathogenicity of infectious bronchitis coronaviruses: complicated evolution and epidemiology in china caused by cocirculation of multiple types of infectious bronchitis coronaviruses. *Intervirology.* 52:223-234.
- Liu S, Zhang X, Wang Y, Li C, Liu Q, Han Z, Zhang Q, Kong X, Tong G. 2009. Evaluation of the protection conferred by commercial vaccines and attenuated heterologous isolates in China against the CK/CH/LDL/97I strain of infectious bronchitis coronavirus. *Vet J.* 179:130-136.
- Lu X, Lu Y, Denison M. 1996. Intracellular and in vitro-translated 27-kDa proteins contain the 3C-like proteinase activity of the coronavirus MHV-A59. *Virology.* 222:375-382.
- Martin DP, Lemey P, Posada D. 2011. Analysing recombination in nucleotide sequences. *Mol Ecol Resour.* 11:943-955.
- Mase M, Inoue T, Yamaguchi S, Imada T. 2008. Existence of avian infectious bronchitis virus with a European-prevalent 4/91 genotype in Japan. *J Vet Med Sci.* 70:1341-1344.
- Masters PS. 2006. The molecular biology of Coronavirus. *Adv Virus Res.* 63:153-292.
- McKinley ET, Jackwood MW, Hilt DA, Kissinger JC, Robertson JS, Lemke C, Paterson AH. 2011. Attenuated live vaccine usage affects accurate measures of virus diversity and mutation rates in avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virus Res.* 158:225-234.
- Meir R, Rosenblut E, Perl S, Kass N, Ayali G, Perk S, Hemsani E. 2004. Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. *Avian Dis.* 48:635-641.
- Meulemans G, Boschmans M, Decaesstecker M, Berg TP, Denis P, Cavanagh D. 2001. Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986 to 1995. *Avian Pathol.* 30:411-421.
- Molloy SS, Thomas L, VanSlyke JK, Stenberg PE, Thomas G. 1994. Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J.* 13:18-33.
- Montassier M, Brentano L, Richtzenhain LJ, Montassier HJ. 2006. Genetic diversity on S1 glycoprotein of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Brazil between 1988-2000. In U. Heffels-Redmann & E.F. Kaleta (Eds.). *Proceedings of the Vth International Symposium on Corona- and Pneumovirus Infections* (pp. 119-131). Rauischholzhausen, Germany.

- Moore K, Jackwood M, Hilt DA, 1997. Identification of amino acids involved in a serotype and neutralisation specific epitope within the S1 subunit of avian infectious bronchitis virus. *Arch Virol.* 142:2249-2256.
- Munner M, Newman J, Halvorsor D, Siva- Nandan V, Com C. 1987. Effect of Avian Infectious Bronchitis Virus (Arkansas strain) on vaccinated laying chickens. *Avian Dis.* 31: 820-828.
- Naqui S, Thompson G, Rauman R, Mohammed H. 2001. The Exacerbating effect of infectious bronchitis virus infection on the infectious bursal disease virus induced suppression of opsonization by *Escherichia coli* antibody in chickens. *Avian Dis.* 45:52-62.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 25:1253-1256.
- Qian DH, Zhu GJ, Wu LZ, Hua GX. 2006. Isolation and characterization of a coronavirus from pigeons with pancreatitis. *Am J Vet Res.* 67:1575-1579.
- Rimondi A, Craig M, Vagnozzi A, Konig G, Delamer M, Pereda A. 2009. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001-2008). *Avian Pathol.* 38:149-153.
- Saito T, Munakata Y, Fu Y, Fujii H, Kodera T, Miyagawa E, Ishii K, Sasaki T. 2003. Evaluation of anti-parvovirus B19 activity in sera by assay using quantitative polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 107:81-87.
- Salanueva I, Carrascosa J, Risco C. 1999. Structural maturation of the transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Virol.* 73:7952-7964.
- Seah J, Yu L, Kwang J. 2000. Localisation of linear B-cell epitopes on infectious bronchitis virus nucleocapsid protein. *Vet Microbiol.* 75:11-16.
- Seo SH, Wang L, Smith R, Collisson EW. 1997. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection. *J Virol.* 71:7889-7894.
- Shalk A & Hawn M. 1931. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J Am Vet Med Assoc.* 78:413.
- Simon-Loriere E, Holmes EC. 2011. Why do RNA viruses recombine? *Nat Rev Microbiol.* 9:617-26.
- Subbiah M, Khattar SK, Collins PL, Samal SK. 2011. Mutations in the fusion protein cleavage site of avian paramyxovirus serotype 2 increase cleavability and syncytium formation but do not increase viral virulence in chickens. *J Virol.* 85:5394-5405.
- Sun L, Zhang GH, Jiang JW, Fu JD, Ren T, Cao WS, Xin CA, Liao M, Liu WJ. 2007. A Massachusetts prototype like coronavirus isolated from wild peafowls is pathogenic to chickens. *Virus Res.*130:121-128.
- Tahara S, Dietlin T, Bergmann C. 1994. Coronavirus translational regulation: Leader affects mRNA efficiency. *Virology.* 202:621-630.
- Thiel V, Siddell S. 1994. Internal ribosome entry in the coding region of murine hepatitis virus mRNA 5. *J Gen Virol.* 75:3041-3046.

- Tibbles K, Brierley I, Cavanagh D, Brown T. 1996. Characterization in vitro of an autocatalytic processing activity associated with the predicted 3C-like proteinase domain of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J Virol.* 70:1923-1930.
- Toro H, Pennington D, Gallardo RA, van Santen VL, van Ginkel FW, Zhang JF, FS Joiner. 2012. Infectious bronchitis virus subpopulations in vaccinated chickens after challenge. *Avian Dis.* 56:501-508.
- van Boheemen S, de Graaf M, Lauber C, Bestebroer TM, Raj VS, Zaki AM, Osterhaus AD, Haagmans BL, Gorbalenya AE, Snijder EJ, Fouchier RA. 2012. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio.* 3:e00473-12.
- van Santen VL, Kaltenboeck B, Joiner KS, Macklin KS, Norton RA. 2004. Real-time quantitative PCR-based serum neutralization test for detection and titration of neutralizing antibodies to chicken anemia virus. *J Virol Methods.* 1152:123-135.
- Vennema H, Heijnen L, Zijderveld A, Horzinek MC, Spaan WJM. 1990. Intracellular transport of recombinant coronavirus spike proteins: Implications for virus assembly. *J Virol.* 64:339-346.
- Vennema H, Godeke G, Rossen. 1996. Nucleocaps envelope protein genes. *EMBO J.* 15:2020-2028.
- Vigerust DJ, Shepherd VL. 2007. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends Microbiol.* 15:211-218
- Villarreal LY, Brandão PE, Chacón JL, Saidenberg AB, Assayag MS, Jones RC, Ferreira AJ. 2007. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. *Avian Dis.* 51:974-978.
- Wang C, Hseih M, Chang P. 1996. Isolation, pathogenicity, and H-120 protection efficacy of Infectious Bronchitis Viruses isolated in Taiwan. *Avian Dis.* 40:620-625.
- Wang L, Junker D, Collisson EW. 1993. Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Virology.* 1922:710-716.
- Weiss S, Navas S. 2005. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Bio Rev.* 69:635-664.
- Wickramasinghe IN, de Vries RP, Gröne A, de Haan CA, Verheije MH. 2011. Binding of avian coronavirus spike proteins to host factors reflects virus tropism and pathogenicity. *J Virol.* 85:8903-8912.
- Williams A, Wang L, Sneed L, Collisson E. 1992. Comparative analysis of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. *Virus Res.* 25:213-222.
- Winter C, Weiß S, Cavanagh D, Neumann U, Herrler G. 2006. Sialic acid is a receptor determinant for infection of cells by avian Infectious bronchitis virus. *J Gen Virol.* 87:1209-1216.
- Winter C, Herrler G, Neumann U. 2008. Infection of the tracheal epithelium by infectious bronchitis virus is sialic acid dependent. *Microbes Infect.* 10:367-373.
- Winterfield R, Hitchner S. 1962. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am J Vet Res.* 23:1273-1279.

- Worthington KJ, Currie RJ, Jones RC. 2008. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathol.* 37:247-57.
- Yu L, Jiang Y, Low S, Wang Z, Nam SJ, Liu W, Kwangac J. 2001. Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis.* 45:416-424.
- Zwaagstra K, van Der Zeijst B, Austers J. 1992. Rapid detection and identification of avian infectious bronchitis virus. *J Clin Microbiol.* 30:79-84.

10. Anexos

10.1. Anexo 1: Protocolos

a) Extracción de ARN con el kit "QIAmp Viral RNA Mini Kit" (Qiagen).

A partir de vacuna:

- Resuspender 0,02 g de vacuna liofilizada en 200 μ L de PBS pH 7.5.
- Utilizar esta suspensión para realizar la extracción de ARN con el kit "QIAmp Viral RNA Mini Kit" (Qiagen).

A partir de tráqueas:

- Armar grupos o *pools* de hasta 5 tráqueas por extracción y macerar en un mortero con el agregado de arena estéril y solución buffer fosfato (PBS) estéril a pH 7.0, generando una suspensión al 20% peso/volumen.
- Centrifugar la suspensión a 3.000 g durante 5 minutos para eliminar restos de tejido y arena.
- Clarificar el sobrenadante con una segunda centrifugación a 3.000 g durante 8 minutos.
- Utilizar este sobrenadante para realizar la extracción de ARN con el kit "QIAmp Viral RNA Mini Kit" (Qiagen).
- Agregar 560 μ l de buffer de lisis y 5.6 μ l de *carrier* de ARN a un tubo de 1.5 ml.
- Adicionar 200 μ l suspensión vacunal o sobrenadante en el caso de tráqueas.
- Mezclar con *vortex* por 15 s.
- Incubar a temperatura ambiente (TA) por 10 minutos. Centrifugar por 15 segundos a 13.000 rpm.

- Adicionar 560 μ l de etanol absoluto y mezclar con *vortex* por 15 segundos.
- Agregar 630 μ l de la solución a una columna “QIAamp Mini column” y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo y descartar el filtrado.
- Repetir el paso anterior.
- Adicionar 500 μ l de buffer de lavado 1 y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo y descartar el filtrado.
- Adicionar 500 μ l de buffer de lavado 2 y centrifugar a 13.000 rpm por 3 minutos. Descartar el filtrado.
- Secar la columna centrifugando a 13.000 rpm por 1 minuto.
- Colocar la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml y adicionar 50 μ l de buffer de elución.
- Incubar a TA por 1 minuto y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
- Almacenar el ARN a -80° C.

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

- Pesar 25 mg de tejido y homogeneizar con 600 μ L del buffer ZR.
- Centrifugar la suspensión a 3.000 g durante 2 minutos para eliminar restos de tejido.
- Transferir el sobrenadante a una columna y centrifugar a 12.000 g por 1 minuto.
- Agregar a la columna 400 μ L de buffer de pre-lavado a la columna y centrifugar a 12.000 g por 1 minuto.

- Agregar a la columna 700 μL de buffer de lavado y centrifugar a 12.000 por 1 minuto.
- Secar la columna centrifugando a 13.000 rpm por 2 minutos.
- Colocar la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml y adicionar 30 μl de H_2O libre de ARNasas.
- Incubar a TA por 1 minuto y centrifugar a 13000 g por 30 segundos.
- Almacenar el ARN a -80°C .

c) Retrotranscripción

- Agregar a un tubo de 0.2 ml, siempre en hielo:
 - 10 μl del ARN extraído.
 - 1 μl de hexámeros al azar.
 - 1 μl de H_2O ultra pura.
- Mezclar y realizar una centrifugación breve.
- Incubar la mezcla 5 minutos a 98°C (desnaturalización) y pasar inmediatamente a hielo. Realizar una centrifugación breve.
- Agregar al tubo:
 - 4 μl de buffer de reacción 5X.
 - 1 μl del inhibidor de ribonucleasas Ribolock (20u/ μl).
 - 2 μl de dNTP (10 mM).
- Mezclar y realizar una centrifugación breve.
- Incubar 5 minutos a 25°C .
- Agregar 1 μl de retrotranscriptasa “RevertAidTM Minus M-MuLV” (200 u/ μl).

- Incubar 10 minutos a 25°C.
- Incubar 1 hora a 42°C.
- Detener la reacción incubando 10 minutos a 70°C.

d) Purificación de producto de PCR

Todos los amplicones se purificaron con el kit “Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (General Electric) según el siguiente protocolo:

- Adicionar 500 µL de buffer de captura a 20-100 µL de producto de PCR. Mezclar por inversión.
- Cargar la mezcla en una columna "GFX MicroSpin column". Centrifugar a 13.000 rpm por 30 segundos. Descartar el filtrado.
- Adicionar 500 µl de buffer de lavado a la columna. Centrifugar a 13.000 rpm por 30 segundos. Descartar el filtrado.
- Secar la columna centrifugando a 13.000 rpm por 30 segundos adicionales.
- Transferir la columna a un tubo de 1.5 ml, agregar 10 -50 µl de buffer de elución e incubar a TA por 1 minuto.
- Recuperar el ADN purificado centrifugando a 13.000 rpm por 1 minuto. Almacenar el ADN a -20 °C.

e) Clonación con células competentes E.coli XL1 Blue

Este ensayo se realiza con el kit “GeneJET™ PCR Cloning Kit” (Fermentas). El protocolo utilizado se detalla a continuación.

Reacción de Blunting:

- Colocar en un tubo de 1,5 mL 10 µL de buffer de reacción 2X.

- Adicionar hasta 7 μL de producto de PCR purificado. Tener en cuenta que la relación inserto:vector recomendada es de 3:1, aunque se aceptan relaciones en un rango de 0,5:1 a 15:1.
- Adicionar 1 μL de la enzima generadora de extremos romos o *Blunting*.
- Adicionar H_2O destilada miliQ hasta alcanzar un volumen final de 18 μL .
- Mezclar con vortex y centrifugar a máxima velocidad.
- Incubar la mezcla a 70° C durante 10 minutos.

Reacción de ligación:

- Adicionar a la mezcla 1 μL del vector “pJET/Blunt” (50 ng/ μL).
- Adicionar 1 μL de ligasa T4 (5U/ μL).
- Mezclar con *vortex* brevemente y centrifugar a máxima velocidad.
- Incubar durante 30 minutos a 22° C.

Transformación de células competentes

- Incubar 5 μL de la mezcla de ligación durante 2 minutos en hielo.
- Adicionar 50 μL de células competentes “XL-1 Blue”.
- Incubar en hielo durante 15 minutos.
- Realizar un choque térmico a 42° C durante 45 segundos.
- Incubar en hielo durante 5 minutos.
- Transferir a 300 μL de medio SOC.
- Incubar en agitador a 37° C durante 90 minutos.
- Plaquear el cultivo en placas de petri con medio LB-agar-ampicilina, previamente incubadas a 37° C durante al menos 2 horas.

- Incubar las placas toda la noche a 37° C.
- Almacenar a -4° C hasta su análisis.

f) Extracción de ADN plasmídico

- Realizar un cultivo en 3 mL de medio líquido LB-ampicilina de la colonia deseada.
- Incubar el mismo a 37° C en agitador toda la noche.
- Transferir 1,5 mL del cultivo a un tubo de 1,5 mL. Centrifugar a 1500 rpm. Descartar el sobrenadante y repetir este paso con el volumen restante.
- Resuspender el pellet en 250 µL de buffer R3.
- Agregar 250 µL de buffer de lisis L7. Mezclar por inversión hasta que el contenido se torne transparente.
- Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Añadir 350 µL de buffer de precipitación N4. Mezclar por inversión.
- Centrifugar a 12.000 g durante 10 minutos y transferir el sobrenadante a una columna.
- Agregar 700 µL de buffer de lavado W9.
- Centrifugar a 12.000 g por 1 minuto.
- Colocar la columna en un nuevo tubo de 1,5 mL.
- Agregar 75 µL de buffer TE.
- Incubar a TA por 1 minuto y centrifugar a 12.000 g por 2 minutos. Almacenar a -20° C.

g) Linealización del plásmido

- Agregar a un tubo eppendorf de 1.5 ml:
 - 4 µl de H₂O ultra pura.
 - 10 µl de buffer NE.
 - 20 µl de plásmido.
 - 0.5 µl de enzima NcoI.
- Mezclar y centrifugar brevemente.
- Incubar 1 hora a 37°C.
- Agregar 0.5 µl de enzima NcoI.
- Incubar 1 hora a 37°C.

h) Purificación del plásmido linealizado

- Mezclar 5 µL de producto linealizado y 50 µL de fenol cloroformo (1:1).
- Centrifugar 1 minuto a 12000 g. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo.
- Realizar dos extracciones con igual volumen de cloroformo.
- Centrifugar 1 minuto a 12000 g. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo.
- Precipitar el ADN agregando 2 volúmenes de etanol absoluto frío y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M . Incubar a -20°C durante 3 horas.
- Centrifugar a 12000 g durante 30 minutos y descartar el sobrenadante.
- Lavar el pellet con 500 µL de etanol 70% y centrifugar a 12000 g durante 2 minutos.

- Resuspender el pellet en 20 μL de H_2O DEPC.

i) Transcripción *in vitro*

La transcripción *in vitro* se realizó con el kit comercial “TranscripAid T7 High Yield Transcription Kit” (Fermenta) siguiendo el siguiente protocolo:

- Mezclar a temperatura ambiente:
 - 4 μL el buffer de reacción
 - 8 μL de dNTPs
 - 6 μL de plásmido linealizado y purificado
 - 2 μL de enzima “TranscriptAid Enzyme”
- Incubar 2 horas a 37°C.
- Agregar 2 μL de ADNasa libre de ARN. Incubar 15 minutos a 37°C.
- Agregar 2 μL de 0,5 M EDTA pH 8. Incubar 10 minutos a 65°C.

j) Purificación de los Transcriptos

- A los 20 μL de reacción de transcripción agregar 115 μL de H_2O DEPC y 15 μL de acetato de sodio 3M.
- Realizar una extracción con igual volumen de fenol cloroformo (1:1).
- Centrifugar 1 minuto a 12000 g. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo.
- Realizar dos extracciones con igual volumen de cloroformo.
- Centrifugar 1 minuto a 12000 g. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo.
- Precipitar el ADN agregando 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Incubar a -20°C durante 3 horas.

- Centrifugar a 12000 g durante 30 minutos y descartar el sobrenadante.
- Lavar el pellet con 500 μL de etanol 70% y centrifugar a 12000 g durante 2 minutos.
- Resuspender el pellet en 20 μL de H_2O DEPC.

10.2. Anexo 2: Secuencias

a) Secuencias nucleotídicas de S1 usadas para el análisis de recombinación

Nº de acceso GenBank	Nombre de la muestra	País de origen	Año de colecta
JX182788	UFMG/208	Brasil	1972
JX182775	UFM/G	Brasil	1975
JX182790	UFMG/29-78	Brasil	1978
JX182789	UFMG/200	Brasil	1981
JX182785	UFM/297	Brasil	1983
JX182787	UFM/283	Brasil	1983
JX182784	UFM/351	Brasil	1984
JX182773	UFMG/PM1	Brasil	1987
JX182772	UFMG/PM2	Brasil	1987
JX182771	UFMG/PM3	Brasil	1989
JX182770	UFMG/PM4	Brasil	1989
JX182781	UFMG/10.1	Brasil	2008
JX182782	UFMG/10.2	Brasil	2008
JX182778	UFM/11.1	Brasil	2008
JX182776	UFM/12.1	Brasil	2008
JX182780	UFM/11.2	Brasil	2008
JX182777	UFM/12.2	Brasil	2008
JX182774	UFM/13.1	Brasil	2008
JX182779	UFM/11.3	Brasil	2008
JX182783	UFM/1141	Brasil	2009
-	UY/09/CA/01	Uruguay	2009
-	AR/09/BA/29	Argentina	2009
-	AR/09/BA/34	Argentina	2009
-	AR/09/BA/35	Argentina	2009
-	AR/09/BA/36	Argentina	2009
-	AR/09/BA/37	Argentina	2009
-	AR/09/BA/38	Argentina	2009
-	AR/09/BA/39	Argentina	2009
-	AR/10/BA/30	Argentina	2010
-	AR/11/BA/27	Argentina	2011
-	AR/11/BA/28	Argentina	2011
-	AR/11/BA/31	Argentina	2011
-	AR/11/ER/33	Argentina	2011
-	UY/11/CA/09	Uruguay	2011
-	UY/11/CA/11	Uruguay	2011
-	UY/11/CA/12	Uruguay	2011
-	UY/11/CA/13	Uruguay	2011
-	UY/11/CA/18	Uruguay	2011
-	UY/11/CA/19	Uruguay	2011
-	UY/12/CA/27	Uruguay	2012
-	UY/12/CA/30	Uruguay	2012
-	UY/12/CA/33	Uruguay	2012
-	UY/12/CA/36	Uruguay	2012
-	UY/12/CA/39	Uruguay	2012

b) Secuencias nucleotídicas parciales de S1 sudamericanas usadas para los análisis filogenéticos

Nº de acceso	Nombre de la muestra	País de origen	Año	Publicación	Clasificación
Q169238	IBV/Brasil/PRB01	Brasil	1988	Montassier et al., 2006	-
Q169239	IBV/Brasil/PR01	Brasil	1988	Montassier et al., 2006	-
Q169240	IBV/Brasil/PR02	Brasil	1988	Montassier et al., 2006	-
Q169242	IBV/Brasil/PR05	Brasil	2000	Montassier et al., 2006	-
Q169243	IBV/Brasil/PR06	Brasil	2000	Montassier et al., 2006	-
GQ169251	IBV/Brasil/SP03	Brasil	1999	Montassier et al., 2006	-
GQ169249	IBV/Brasil/SP01	Brasil	1998	Montassier et al., 2006	-
GQ169247	IBV/Brasil/SC02	Brasil	1999	Montassier et al., 2006	-
GQ169245	IBV/Brasil/PR08	Brasil	2000	Montassier et al., 2006	-
GQ169241	IBV/Brasil/PR03	Brasil	2000	Montassier et al., 2006	-
GQ169252	IBV/Brasil/SP04	Brasil	1999	Montassier et al., 2006	-
GQ169250	IBV/Brasil/SP02	Brasil	1999	Montassier et al., 2006	-
GQ169248	IBV/Brasil/SC03	Brasil	1999	Montassier et al., 2006	-
GQ169246	IBV/Brasil/SC01	Brasil	1999	Montassier et al., 2006	-
GQ169244	IBV/Brasil/PR07	Brasil	1999	Montassier et al., 2006	-
DQ448274	IBV/Brasil/2004/USP07	Brasil	2004	Villarreal et al., 2007	-
DQ448275	IBV/Brasil/2004/USP10	Brasil	2004	Villarreal et al., 2007	-
DQ448273	IBV/Brasil/2004/USP02	Brasil	2004	Villarreal et al., 2007	-
DQ448277	IBV/Brasil/2005/USP03	Brasil	2005	Villarreal et al., 2007	-
DQ492311	IBV/Brasil/2005/USP09	Brasil	2005	Villarreal et al., 2007	-
DQ492309	IBV/Brasil/2005/USP06	Brasil	2005	Villarreal et al., 2007	-
DQ492307	IBV/Brasil/2005/USP04	Brasil	2005	Villarreal et al., 2007	-
DQ355995	IBV/Brasil/2005/USP01	Brasil	2005	Villarreal et al., 2007	-
DQ492312	IBV/Brasil/2005/USP11	Brasil	2005	Villarreal et al., 2007	-
DQ492310	IBV/Brasil/2005/USP08	Brasil	2005	Villarreal et al., 2007	-
DQ492308	IBV/Brasil/2005/USP05	Brasil	2005	Villarreal et al., 2007	-
DQ448276	IBV/Brasil/2005/USP12	Brasil	2005	Villarreal et al., 2007	-
U383070	USP33	Brasil	2003	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383072	USP35	Brasil	2003	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383071	USP34	Brasil	2003	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383073	USP36	Brasil	2003	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383074	USP37	Brasil	2003	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383075	USP38	Brasil	2003	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383076	USP39	Brasil	2003	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383077	USP40	Brasil	2003	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383078	USP41	Brasil	2003	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383079	USP42	Brasil	2003	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383080	USP43	Brasil	2003	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383081	USP44	Brasil	2004	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383082	USP45	Brasil	2004	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383083	USP46	Brasil	2004	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383084	USP47	Brasil	2004	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383085	USP48	Brasil	2004	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383086	USP49	Brasil	2005	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383087	USP50	Brasil	2005	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383088	USP51	Brasil	2005	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”
U383089	USP52	Brasil	2005	Chacón et al., 2011	“Genotipo BR I”

U383090	USP53	Brasil	2005	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383091	USP54	Brasil	2006	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383092	USP55	Brasil	2006	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383093	USP56	Brasil	2007	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383094	USP57	Brasil	2007	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383095	USP58	Brasil	2007	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383096	USP59	Brasil	2008	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383097	USP60	Brasil	2008	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383098	USP61	Brasil	2008	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383099	USP62	Brasil	2008	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383100	USP63	Brasil	2008	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383101	USP64	Brasil	2008	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383102	USP65	Brasil	2008	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383103	USP66	Brasil	2008	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383104	USP67	Brasil	2008	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383105	USP68	Brasil	2009	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383106	USP69	Brasil	2009	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383107	USP70	Brasil	2009	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383108	USP71	Brasil	2009	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383109	USP72	Brasil	2009	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
U383110	USP73	Brasil	2009	Chacón et al., 2011	"Genotipo BR I"
FJ167379	AR/08/ER/22	Argentina	2008	Rimondi et al.,2009	"Cluster A"
FJ167377	AR/06/BA/10	Argentina	2006	Rimondi et al.,2009	"Cluster A"
FJ167388	AR/06/BA/11	Argentina	2006	Rimondi et al.,2009	"Cluster A"
FJ167380	AR/05/RN/07	Argentina	2005	Rimondi et al.,2009	"Cluster A"
FJ167378	AR/08/BA/21	Argentina	2008	Rimondi et al.,2009	"Cluster A"
FJ167373	AR/05/BA/08	Argentina	2005	Rimondi et al.,2009	"Cluster B"
FJ167371	AR/02/BA/05	Argentina	2002	Rimondi et al.,2009	"Cluster B"
FJ167369	AR/08/BA/16	Argentina	2008	Rimondi et al.,2009	"Cluster B"
FJ167374	AR/07/BA/15	Argentina	2007	Rimondi et al.,2009	"Cluster B"
FJ167372	AR/01/BA/03	Argentina	2001	Rimondi et al.,2009	"Cluster B"
FJ167370	AR/07/ER/18	Argentina	2007	Rimondi et al.,2009	"Cluster B"
FJ167375	AR/06/BA/14	Argentina	2006	Rimondi et al.,2009	"Cluster C"
FJ167386	AR/03/BA/06	Argentina	2003	Rimondi et al.,2009	"Cluster C"
FJ167376	AR/06/BA/13	Argentina	2006	Rimondi et al.,2009	"Cluster C"
FJ167387	AR/01/BA/04	Argentina	2001	Rimondi et al.,2009	"Mass"
FJ167383	AR/07/ER/19	Argentina	2007	Rimondi et al.,2009	"Mass"
FJ167382	AR/08/ER/25	Argentina	2008	Rimondi et al.,2009	"Mass"
FJ167387	AR/08/ER/24	Argentina	2008	Rimondi et al.,2009	"Mass"
FJ167385	AR/08/ER/26	Argentina	2008	Rimondi et al.,2009	"Conn"
AY604546	CO1657	Colombia	2003	Alvarado et al., 2005	"Genotipo A/B"
AY604547	CO1692	Colombia	2003	Alvarado et al., 2005	"Genotipo A/B"
AY604557	CO8110T	Colombia	2003	Alvarado et al., 2005	"Genotipo A/B"
AY604556	CO8113T	Colombia	2003	Alvarado et al., 2005	"Genotipo A/B"
AY604554	CO8247	Colombia	2003	Alvarado et al., 2005	"Genotipo A/B"
AY604555	CO8248CT	Colombia	2003	Alvarado et al., 2005	"Genotipo A/B"
AY604552	CO8250	Colombia	2003	Alvarado et al., 2005	"Genotipo A/B"
AY604560	CO8234CT	Colombia	2003	Alvarado et al., 2005	"Genotipo C"
AY604559	CO8234T	Colombia	2003	Alvarado et al., 2005	"Genotipo C"
AY604558	CO8232L	Colombia	2003	Alvarado et al., 2005	"Genotipo C"
AY604551	CO8091L	Colombia	2003	Alvarado et al., 2005	"Genotipo D"
AY604553	CO8089L	Colombia	2003	Alvarado et al., 2005	"Genotipo D"
AY604550	CO8043CT	Colombia	2003	Alvarado et al., 2005	"Mass"

AY604549	CO8043T	Colombia	2003	Alvarado et al., 2005	"Mass"
AY604548	CO1694T	Colombia	2003	Alvarado et al., 2005	"Conn"
AY604561	CO8033CT	Colombia	2003	Alvarado et al., 2005	"Conn"
HM446006	CL/12020/08	Chile	2008	sin publicar	-
HM446007	CL/12021/08	Chile	2008	sin publicar	-
HM446008	CL/12078/09	Chile	2008	sin publicar	-
HM446009	CL/12080/09	Chile	2009	sin publicar	-
HM446010	CL/12101/09	Chile	2009	sin publicar	-
HM446011	CL/12103a/09	Chile	2009	sin publicar	-
HM446012	CL/12103b/09	Chile	2009	sin publicar	-
HM446013	CL/12124/09	Chile	2009	sin publicar	-
HM446014	CL/12139/09	Chile	2009	sin publicar	-
HM561905	IBV/2009/UNICAMP901	Brasil	2009	Felippe et al., 2010	"Mass"
HM561903	IBV/2008/UNICAMP890	Brasil	2008	Felippe et al., 2010	"Mass"
HM561901	IBV/2008/UNICAMP821	Brasil	2008	Felippe et al., 2010	"Mass"
HM561899	IBV/2008/UNICAMP846	Brasil	2008	Felippe et al., 2010	"Cluster D207"
HM561897	IBV/2008/UNICAMP830	Brasil	2008	Felippe et al., 2010	"Cluster D207"
HM561895	IBV/2008/UNICAMP836	Brasil	2008	Felippe et al., 2010	"Mass"
HM561893	IBV/2008/UNICAMP820	Brasil	2008	Felippe et al., 2010	"Mass"
HM561891	IBV/2007/UNICAMP810	Brasil	2007	Felippe et al., 2010	"Cluster D207"
HM561889	IBV/2007/UNICAMP801	Brasil	2007	Felippe et al., 2010	"Cluster D207"
HM561887	IBV/2004/UNICAMP703	Brasil	2004	Felippe et al., 2010	"Cluster D207"
HM561885	IBV/2004/UNICAMP31298	Brasil	2004	Felippe et al., 2010	"Cluster D207"
HM561906	IBV/2009/UNICAMP940T	Brasil	2009	Felippe et al., 2010	"Cluster D207"
HM561904	IBV/2009/UNICAMP897	Brasil	2009	Felippe et al., 2010	"Mass"
HM561902	IBV/2008/UNICAMP882	Brasil	2008	Felippe et al., 2010	"Cluster D207"
HM561900	IBV/2008/UNICAMP861	Brasil	2008	Felippe et al., 2010	"Mass"
HM561898	IBV/2008/UNICAMP818	Brasil	2008	Felippe et al., 2010	"Mass"
HM561896	IBV/2008/UNICAMP816	Brasil	2008	Felippe et al., 2010	"Cluster D207"
HM561894	IBV/2008/UNICAMP832	Brasil	2008	Felippe et al., 2010	"Mass"
HM561892	IBV/2008/UNICAMP857	Brasil	2008	Felippe et al., 2010	"Cluster D207"
HM561890	IBV/2007/UNICAMP805	Brasil	2007	Felippe et al., 2010	"Conn"
HM561888	IBV/2006/UNICAMP788	Brasil	2006	Felippe et al., 2010	"Mass"
HM561886	IBV/2004/UNICAMP706	Brasil	2004	Felippe et al., 2010	"Cluster D207"
HM561884	IBV/2003/UNICAMP31422	Brasil	2003	Felippe et al., 2010	"Cluster D207"

c) Secuencias nucleotídicas de S1 de los genotipos sudamericanos

Genotipo Sudamérica I (SI):

Nº de acceso GenBank	Nombre de la muestra	País de origen	Año de colecta
JX182775	UFM/G	Brasil	1975
JX182785	UFM/297	Brasil	1983
JX182787	UFM/283	Brasil	1983
JX182784	UFM/351	Brasil	1984
Q169238*	IBV/Brasil/PRB01	Brasil	1988
Q169239*	IBV/Brasil/PR01	Brasil	1988
Q169240*	IBV/Brasil/PR02	Brasil	1988
Q169242*	IBV/Brasil/PR05	Brasil	2000
Q169243*	IBV/Brasil/PR06	Brasil	2000
U383070*	USP33	Brasil	2003

U383072*	USP35	Brasil	2003
U383071*	USP34	Brasil	2003
U383073*	USP36	Brasil	2003
U383074*	USP37	Brasil	2003
U383075*	USP38	Brasil	2003
U383076*	USP39	Brasil	2003
U383077*	USP40	Brasil	2003
U383078*	USP41	Brasil	2003
U383079*	USP42	Brasil	2003
U383080*	USP43	Brasil	2003
U383081*	USP44	Brasil	2004
U383082*	USP45	Brasil	2004
U383083*	USP46	Brasil	2004
U383084*	USP47	Brasil	2004
U383085*	USP48	Brasil	2004
DQ448274*	IBV/Brasil/2004/USP07	Brasil	2004
DQ448275*	IBV/Brasil/2004/USP10	Brasil	2004
DQ448273*	IBV/Brasil/2004/USP02	Brasil	2004
DQ448277*	IBV/Brasil/2005/USP03	Brasil	2005
DQ492311*	IBV/Brasil/2005/USP09	Brasil	2005
DQ492309*	IBV/Brasil/2005/USP06	Brasil	2005
DQ492307*	IBV/Brasil/2005/USP04	Brasil	2005
DQ355995*	IBV/Brasil/2005/USP01	Brasil	2005
DQ492312*	IBV/Brasil/2005/USP11	Brasil	2005
DQ492310*	IBV/Brasil/2005/USP08	Brasil	2005
DQ492308*	IBV/Brasil/2005/USP05	Brasil	2005
DQ448276*	IBV/Brasil/2005/USP12	Brasil	2005
U383086*	USP49	Brasil	2005
U383087*	USP50	Brasil	2005
U383088*	USP51	Brasil	2005
U383089*	USP52	Brasil	2005
U383090*	USP53	Brasil	2005
U383091*	USP54	Brasil	2006
U383092*	USP55	Brasil	2006
U383093*	USP56	Brasil	2007
U383094*	USP57	Brasil	2007
U383095*	USP58	Brasil	2007
U383096*	USP59	Brasil	2008
U383097*	USP60	Brasil	2008
U383098*	USP61	Brasil	2008
U383099*	USP62	Brasil	2008
U383100*	USP63	Brasil	2008
U383101*	USP64	Brasil	2008
U383102*	USP65	Brasil	2008
U383103*	USP66	Brasil	2008
U383104*	USP67	Brasil	2008
JX182778	UFM/11.1	Brasil	2008
JX182776	UFM/12.1	Brasil	2008
JX182780	UFM/11.2	Brasil	2008
JX182777	UFM/12.2	Brasil	2008
JX182774	UFM/13.1	Brasil	2008
JX182779	UFM/11.3	Brasil	2008
U383105*	USP68	Brasil	2009

U383106*	USP69	Brasil	2009
U383107*	USP70	Brasil	2009
U383108*	USP71	Brasil	2009
U383109*	USP72	Brasil	2009
U383110*	USP73	Brasil	2009
JX182783	UFM/1141	Brasil	2009
-	AR/11/ER/33	Argentina	2011
-	UY/11/CA/09	Uruguay	2011
-	UY/11/CA/11	Uruguay	2011
-	UY/11/CA/12	Uruguay	2011
-	UY/11/CA/13	Uruguay	2011
-	UY/11/CA/18	Uruguay	2011
-	UY/11/CA/19	Uruguay	2011
-	UY/12/CA/27	Uruguay	2012
-	UY/12/CA/30	Uruguay	2012
-	UY/12/CA/33	Uruguay	2012
-	UY/12/CA/36	Uruguay	2012
-	UY/12/CA/39	Uruguay	2012

*Secuencias parciales de S1.

Genotipo Asia/Sudamérica II (A/SII):

Nº de acceso GenBank	Nombre de la muestra	País de origen	Año de colecta
F286302	Q1	China	1996-1998
F227438	T3	China	1996-1998
DQ068701	CK/CH/LDL/97I	China	1997
F286303	J2	China	1996-1998
DQ167132	CK/CH/LDL/98I	China	1998
DQ167130	CK/CH/LDL/01I	China	2001
EU822340	2992/02	Taiwán	2002
EU822337	3374/05	Taiwán	2005
U938413	CK/CH/Chongqing/0908	China	2008
Q258325	CK/CH/LSD/0810	China	2008
HM113491	DY09	China	2009
-	UY/09/CA/01	Uruguay	2009
-	AR/09/BA/29	Argentina	2009
-	AR/09/BA/34	Argentina	2009
-	AR/09/BA/35	Argentina	2009
-	AR/09/BA/36	Argentina	2009
-	AR/09/BA/37	Argentina	2009
-	AR/09/BA/38	Argentina	2009
-	AR/09/BA/39	Argentina	2009
HM363027	CK/CH/SCYA/10I	China	2010
-	AR/10/BA/30	Argentina	2010
-	AR/11/BA/27	Argentina	2011
-	AR/11/BA/28	Argentina	2011
-	AR/11/BA/31	Argentina	2011
JQ739262	Ck/CH/LHB/111108	China	2011

d) Secuencias nucleotídicas de S1 de los serotipos europeos D207, D3896, Italia02 y 4/91

Nº de acceso GenBank	Nombre de la muestra	País de origen	Año de colecta
M21969	D207	Países Bajos	1979
X15832	D274	Países Bajos	1979
X04723	6/82	Países Bajos	1982
X58067	UK/123/82	UK	1982
X58065	UK/167/84	UK	1984
X58066	UK/142/86	UK	1986
Z83976	UK/2/91	UK	1991
Z83975	UK/7/91	UK	1991
Z83978	UK/5/91	UK	1991
Z83978	UK/5/91	UK	1991
Z83977	UK/3/91	UK	1991
DQ386091	Spain/92/35	España	1992
DQ064801	Spain/92/51	España	1992
DQ386092	Spain/92/185	España	1992
Z83979	UK/7/93	UK	1993
DQ064802	Spain/95/194	España	1995
DQ386093	Spain/95/193	España	1995
DQ386094	Spain/96/330	España	1996
DQ064803	Spain/96/312	España	1996
DQ064806	Spain/97/314	España	1997
DQ064805	Spain/97/307	España	1997
DQ064808	Spain/98/313	España	1998
DQ386096	Spain/98/328	España	1998
DQ386095	Spain/98/315	España	1998
HQ842706	IR/573/98	Irán	1998
HQ842708	IR/525/99	Irán	1999
HQ842707	IR/512/99	Irán	1999
DQ064810	Spain/99/319	España	1999
AJ457137	Italia02	Italia	1999
DQ064813	Spain/00/337	España	2000
DQ064814	Spain/00/33	España	2000
AJQ900129	CK/CH/JS/2011/7	China	2001
DQ386099	Spain/02/26	España	2002
AJ441314	RF/01/02	Rusia	2002
DQ901377	It/497/02	Italia	2002
HQ842711	IR/803/03	Irán	2003
Q844992	Tanin-03	China	2003
AY837465	TA03	China	2003
DQ386105	Spain/04/5438	España	2004
DQ386101	Spain/04/24	España	2004
B363951	JP/Wakayama2/2004	Japón	2004
DQ386100	Spain/04/22	España	2004
DQ386103	Spain/04/221	España	2004
DQ386104	Spain/05/82	España	2005
EU350550	IS/1366	Israel	2005
DQ386102	Spain/05/866	España	2005
FN182276	NGA/295/2006	Nigeria	2006
FJ907239	GX-NN7	China	2006
Q844991	Sichuan06	China	2006

HQ842712	IR/14/07	Irán	2007
HQ842714	IR/19/08	Irán	2008
HQ842715	IR/491/08	Irán	2008
JQ739372	Ck/CH/LSD/110851	China	2011
JQ739319	Ck/CH/LHLJ/111246	China	2011
JQ739409	Ck/CH/LZJ/111113	China	2011
JQ739375	Ck/CH/LSD/110857	China	2011
JQ739353	Ck/CH/LSD/110410	China	2011

10.3. Anexo 3: Filogenias basadas en secuencias parciales de S1

A continuación se muestran cinco árboles filogenéticos basados en cinco regiones diferentes de S1: 1-528, 229-528, 1-310, 134-722 y 740-1089.

Filogenia 1: se incluyeron todas las secuencias usadas en la sección 5.4.3.1 y las secuencias brasileras publicadas en Montassier et al., 2006, Villarreal et al., 2007 y Chacón et al., 2011. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este set de datos fue el GTR+I+G.

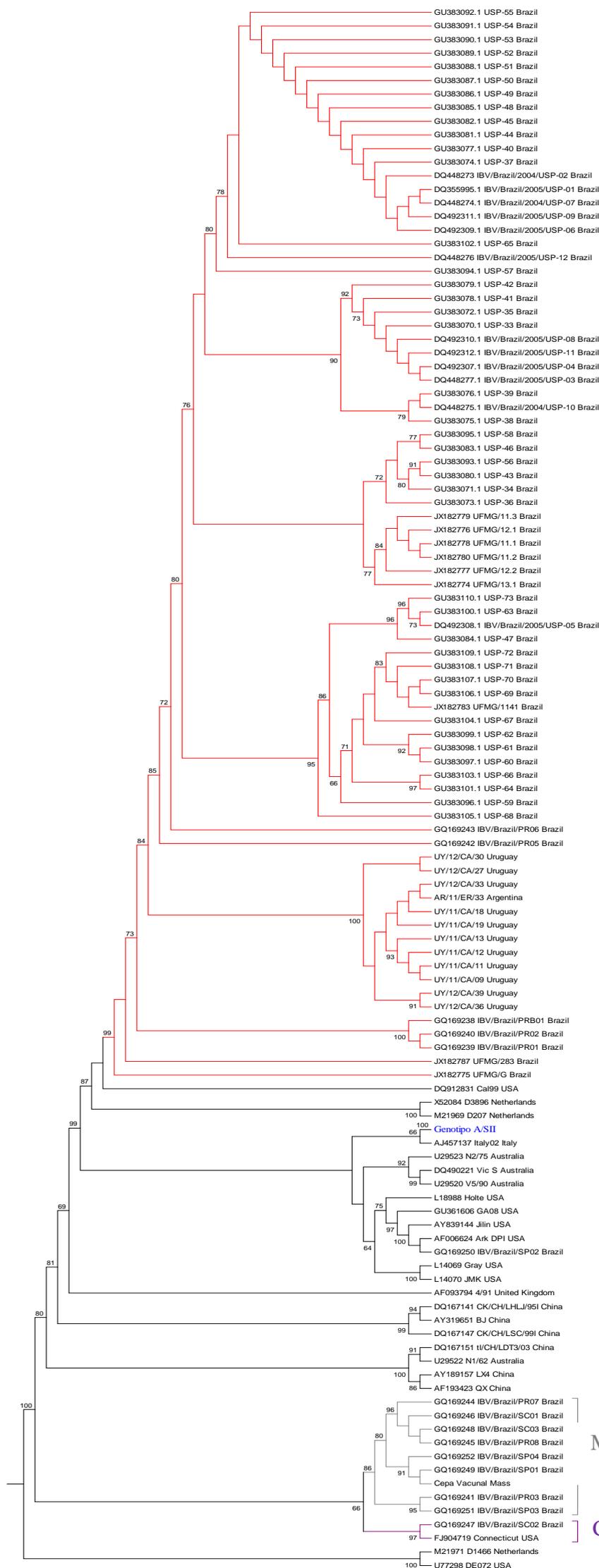
Filogenia 2: se incluyeron todas las secuencias usadas en la filogenia 1 y las secuencias brasileras publicadas en Felipe et al., 2010. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este set de datos fue el GTR+I+G.

Filogenia 3: se incluyeron todas las secuencias usadas en la filogenia 1 y las secuencias colombianas publicadas en Alvarado et al., 2005. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este set de datos fue el HKY+G.

Filogenia 4: se incluyeron todas las secuencias usadas en la sección 5.4.3.1 y las secuencias argentinas publicadas en Rimondi et al., 2009. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este set de datos fue el GTR+I+G.

Filogenia 5: se incluyeron todas las secuencias usadas en la sección 5.4.3.1 y las secuencias chilenas no publicadas. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este set de datos fue el GTR+G.

En los cinco análisis se colapsaron secuencias para facilitar la visualización de las filogenias. Los grupos de secuencias colapsados se indican con triángulos y nombres rojos o azules.

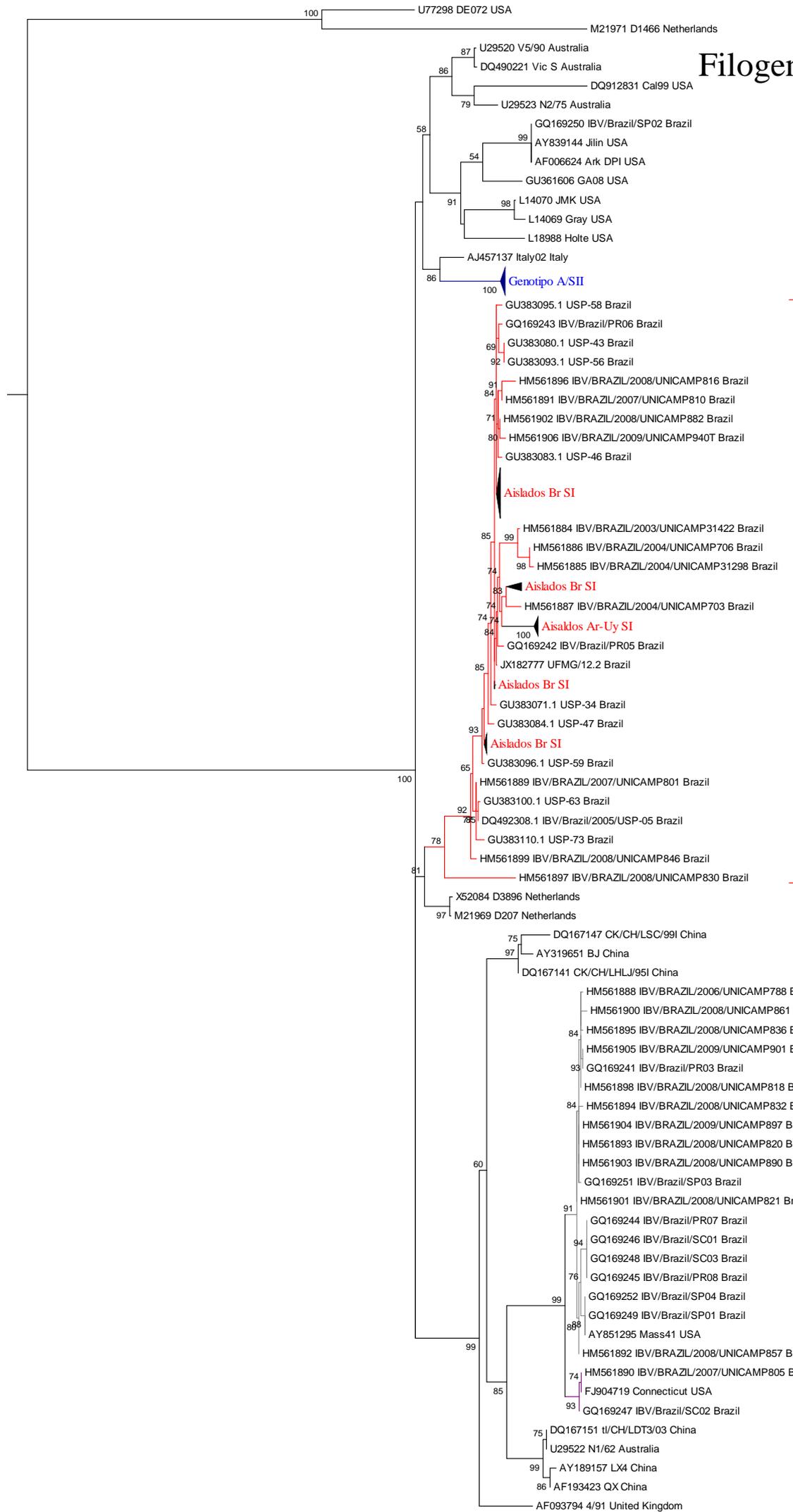


Genotipo SI

Massachusetts

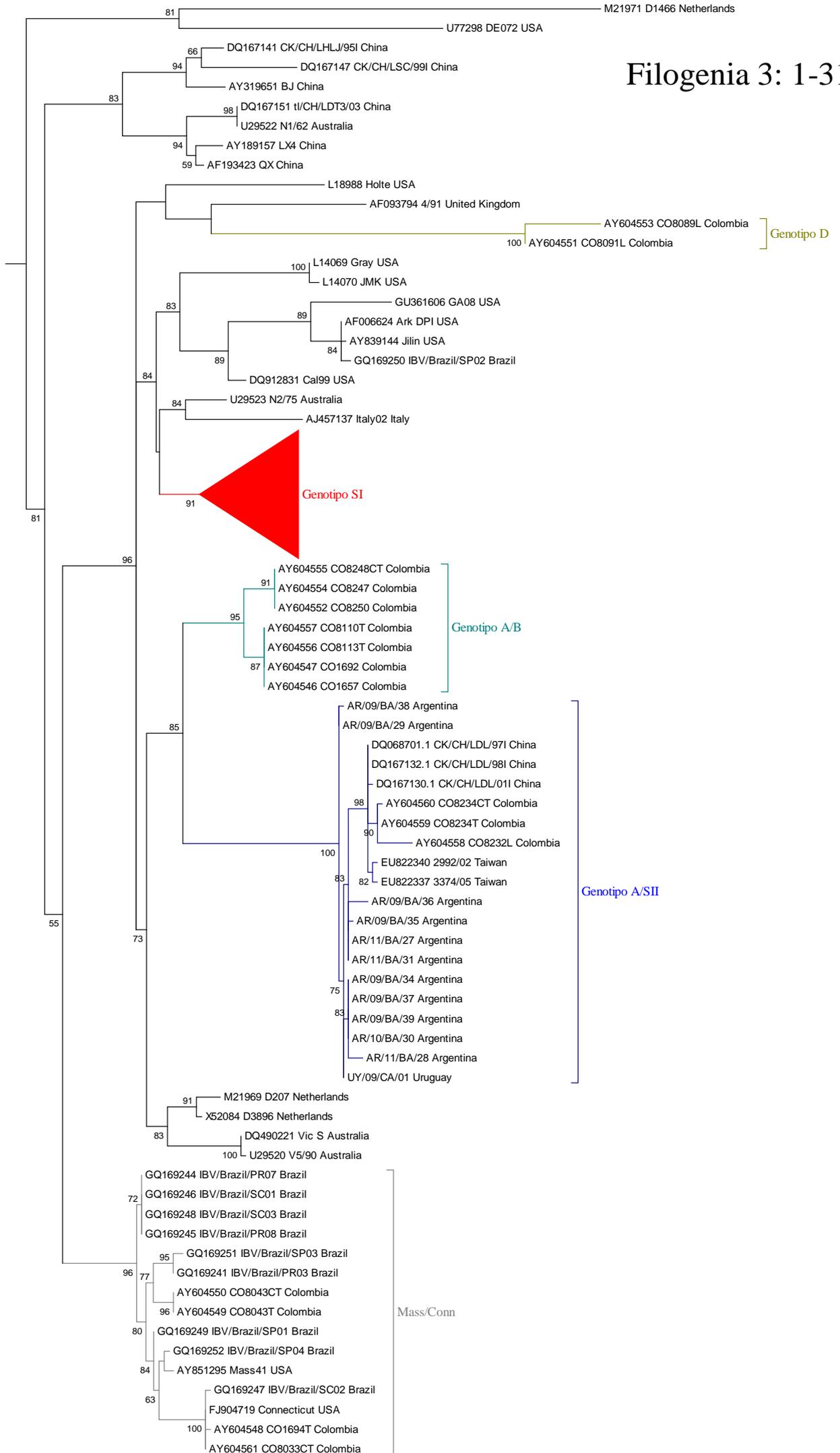
Connecticut

Filogenia 2: 229-528



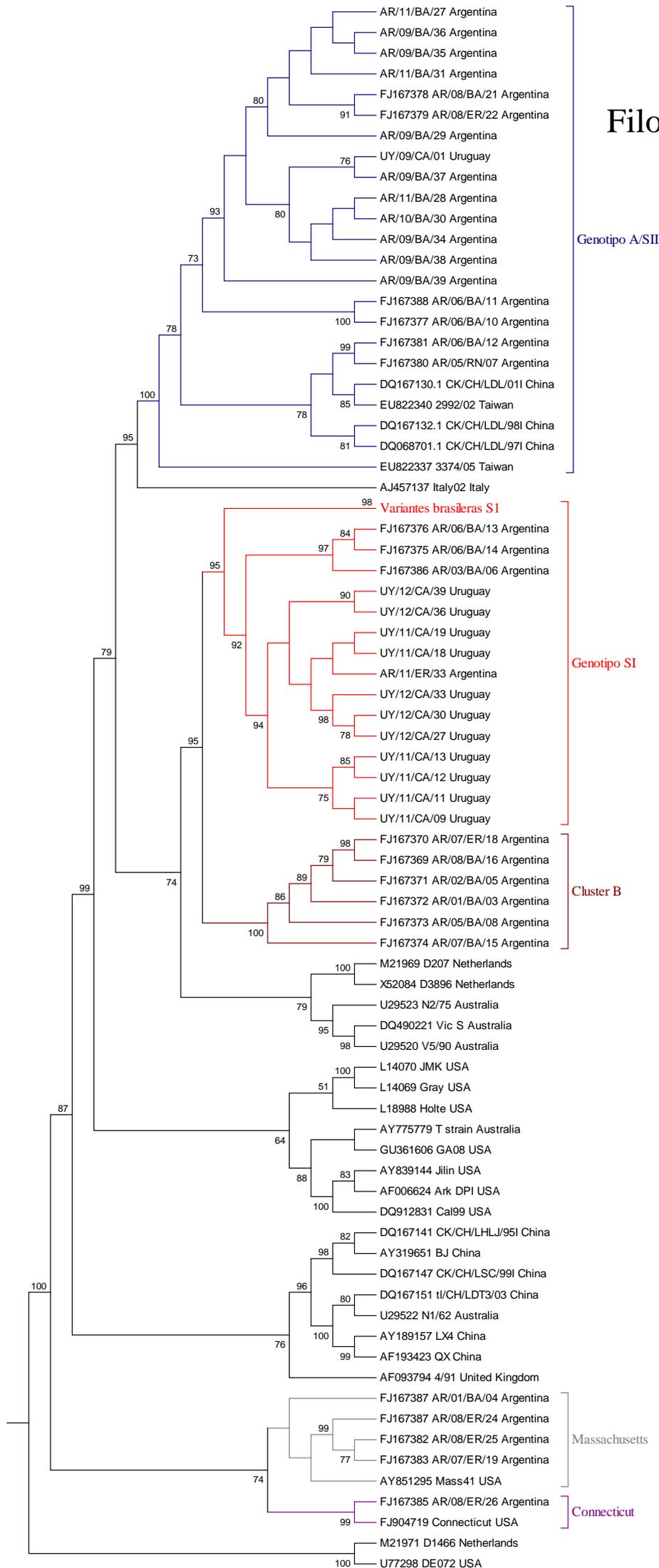
0.2

Filogenia 3: 1-310



0.1

Filogenia 4: 134-722



Filogenia 5: 740-1089

