TESIS DE DOCTORADO
PEDECIBA BIOLOGÍA

Virus inmunosupresores aviares: caracterización genómica y patogénica del virus de Gumboro y su relación con el virus de la anemia infecciosa aviar y el virus de Marek

Mag. Claudia Techera

Tutora: Dra. Ana Marandino

Co-Tutor: Dr. Ruben Pérez

Sección Genética Evolutiva

Facultad de Ciencias, UdelaR

Índice

Resumen……1
1. Introducción……4
1.1. Virus inmunosupresores en aves de corral……4
1.2. Virus de Gumboro: clasificación taxonómica……5
1.3. Genoma viral y proteínas codificadas……6
1.4. Ciclo replicativo de IBDV……...8
1.5. Mecanismos de variabilidad en IBDV……10
1.6. Clasificación de IBDV……10
1.7. Enfermedad de Gumboro……13
1.8. Interacción entre IBDV, CAV y MDV……..17
1.9. Técnicas de secuenciación masiva…...……19
2. Hipótesis de trabajo……..22
3. Objetivos……22
4. Capítulos……23
4.1. Capítulo 1……24
4.2. Capítulo 2……50
4.3. Capítulo 3……60
4.4. Capítulo 4……84
4.5. Capítulo 5……115
5. Aportes……..……144
6. Perspectivas……..145
7. Bibliografía……146
8. Anexos……...181

Resumen

La inmunosupresión de las aves es un problema grave en la avicultura mundial. Esta causado por diversos factores, entre los que se incluyen las condiciones ambientales inadecuadas, toxinas en el alimento, estrés por vacunación o sobrepoblación, y la presencia de patógenos. Los patógenos más relevantes son aquellos que inciden directamente sobre los órganos linfoides de las aves, afectando la productividad, la susceptibilidad a otras infecciones y la eficacia de las vacunas. Entre ellos se destacan, por sus efectos adversos y alta prevalencia global, el virus de Gumboro (IBDV), el virus de la anemia infecciosa aviar (CAV) y el virus de Marek (MDV).

Esta Tesis se centra en el análisis genómico y patogénico de IBDV y su relación con CAV y MDV, virus con los cuales coinfecta frecuentemente. El objetivo principal es contribuir al control de estos virus inmunosupresores en la industria avícola regional. Para cumplir con estos objetivos se desarrollaron metodologías de caracterización genética y fenotípicas que se aplicaron en virus circulante en Uruguay y Argentina.

En el capítulo 1, se analizó la patogenicidad de la cepa *Distinct* (principal cepa de IBDV circulante en Uruguay hasta el inicio de la tesis) en aves SPF de dos semanas, utilizando una cepa Clásica como control. La cepa *Distinct* mostró características distintivas: se registró una aparición temprana de signos clínicos, una atrofia bursal más marcada y una mayor carga viral en los tejidos linfoides analizados, aunque no hubo mortalidad. Estos hallazgos sugieren que las cepas *Distinct* tienen un potencial de virulencia significativo. Se discute el efecto de estas cepas en la salud avícola regional y su relevancia para el desarrollo de estrategias de control y prevención de la enfermedad.

En el capítulo 2, se identificaron casos positivos de IBDV, CAV y MDV en muestras de campo uruguayas, y se realizó una caracterización primaria de las cepas de IBDV mediante secuenciación y análisis de la región hipervariable de VP2. Como resultado, se detectó el genoma de IBDV en el 90% de las muestras analizadas, y se identificaron cepas pertenecientes a tres genogrupos circulantes: A1 (cepas clásicas), A4 (cepas *Distinct*) y A8 (cepas clásicas atenuadas). Además, se observó coinfección con CAV o MDV en el 44% de las muestras positivas para IBDV.

En el capítulo 3, se aplicaron metodologías de secuenciación masiva con abordaje virómico para obtener las secuencias genómicas completas de IBDV y detectar

coinfecciones con otros virus aviares. Se aplicaron protocolos de enriquecimiento viral a cinco cepas uruguayas de IBDV, pertenecientes a los genogrupos A4 y A1, obteniendo buenos resultados en cuatro de las muestras, aunque con limitaciones en aquellas con baja carga viral. Utilizando nuevos esquemas de clasificación que consideran ambos segmentos genómicos de IBDV, dos cepas fueron asignadas al genotipo A4B1 (cepas *Distinct*) y una al genotipo A1B1 (cepas clásicas), mientras que la cuarta cepa fue identificada como reordenante. Además, se detectó coinfección de IBDV con otros virus en tres de las muestras analizadas.

En el capítulo 4, se desarrolló una metodología de enriquecimiento basada en Multiplex-PCR acoplada a secuenciación masiva para obtener los genomas completos de IBDV. Se diseñaron cebadores quiméricos con la secuencia adaptadora de Illumina en el extremo 5′, que amplifican regiones de 200 a 300 pb y permiten la reconstrucción del genoma completo de IBDV. Para estandarizar esta metodología, se utilizaron cepas de diferentes genotipos y cargas virales. Esta técnica reduce costos y tiempo de secuenciación, además de ser eficiente para obtener secuencias genómicas completas en cepas de diversos genotipos y muestras con bajas cargas virales. Se aplicó con éxito en muestras de campo uruguayas y argentinas, lo que permitió la caracterización genómica de todas las cepas y de un nuevo genotipo de IBDV (A2dB1b) que ha ingresado a la región. Además, esta metodología detectó variantes intrahospedero, revelando coinfecciones entre diferentes cepas de IBDV en muestras de campo.

En el capítulo 5, se desarrollaron metodologías de enriquecimiento, basadas en Multiplex-PCR, acoplada a secuenciación masiva para la secuenciación de regiones genómicas de CAV y MDV, virus con genoma de ADN que coinfectan con IBDV en un alto porcentaje de aves productivas uruguayas. Se diseñaron cebadores quiméricos para obtener el genoma completo de CAV y se utilizaron cebadores previamente diseñados para MDV, que permiten secuenciar genes implicados en oncogenicidad y patogenicidad viral. Las metodologías se estandarizaron con cepas vacunales y se aplicaron exitosamente a muestras de campo de Uruguay y Argentina, permitiendo su caracterización genética. Esta información es crucial, ya que la presencia conjunta de estos virus podría afectar significativamente la patogenicidad y el control del IBDV.

Los resultados de esta tesis han permitido comprender la diversidad y la patogenicidad de las cepas de IBDV que circulan en Uruguay y Argentina. También han brindado un marco metodológico sólido para la caracterización de otros virus aviares que coinfectan

a las aves. Esta investigación tiene el potencial de colaborar en el establecimiento de futuras estrategias de control y prevención, fortaleciendo así la salud avícola en la región y reduciendo las pérdidas económicas asociadas con estas infecciones virales.

1. Introducción

1.1. Virus inmunosupresores en aves de corral

Los productos derivados de la cría de aves de corral son una de las fuentes de proteínas de mejor conversión alimenticia en el sector pecuario, gracias a sus cortos ciclos productivos y bajo costo en comparación con otros animales de granja. Esta ventaja ha impulsado un notable dinamismo en la avicultura, generando una demanda constante asociada al aumento del consumo mundial. En los últimos años, la carne de ave se ha consolidado como la más producida a nivel global, superando a la carne de cerdo (Statista, 2024), y las proyecciones indican que esta tendencia se mantendrá (OECD-FAO 2021). Este desarrollo no solo beneficia el consumo interno, sino que también potencia las exportaciones, convirtiendo a la producción avícola en una importante fuente de empleo y un componente esencial de la canasta básica familiar, debido a su accesibilidad y alto valor nutritivo.

La sanidad avícola es un aspecto crítico que afecta significativamente la productividad del sector. Las enfermedades infecciosas aumentan los costos de producción y, en casos extremos, llevan al sacrificio sanitario de aves o a restricciones en el comercio internacional. La epizootia de Influenza Aviar Altamente Patógena (HPAI) es uno de los mejores ejemplos de cómo los compromisos sanitarios pueden tener repercusiones económicas y de salud pública (Wu y Perrings, 2018; Absalón et al., 2019; Adlhoch et al., 2021). Además de las enfermedades de alto impacto en un marco de salud global (One Health), muchas dolencias que afectan el sistema inmunológico de las aves constituyen problemas persistentes en la avicultura mundial (Balamurugan y Kataria, 2006, Dey et al., 2019; Najimudeen et al., 2020).

La inmunosupresión, provocada por factores como condiciones ambientales inadecuadas, toxinas en la alimentación, estrés por manejo inadecuado y patógenos, es una de las principales preocupaciones en el sector avícola. Los patógenos inmunosupresores, que atacan directamente los órganos linfoides, no solo comprometen la productividad, sino que también aumentan la susceptibilidad a otras infecciones y reducen la eficacia de las vacunas (Balamurugan y Kataria, 2006). Entre los virus más relevantes se encuentran el virus de Gumboro, el virus de la anemia infecciosa aviar y el virus de Marek. Estas enfermedades tienen una distribución mundial y requieren un control permanente, con la elaboración de planes específicos adaptados a las cepas y variantes locales.

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), la falta de conocimiento sobre las cepas circulantes puede resultar en graves pérdidas económicas para los países afectados, ya que dificulta el desarrollo de estrategias de control efectivas. Este contexto resalta la importancia de investigar y abordar los desafíos que presentan estos virus en la avicultura comercial.

Por esta razón, esta tesis se enfoca en el análisis de IBDV, así como en su relación con otros virus inmunosupresores, como CAV y MDV, con los cuales coinfecta con frecuencia a las aves de producción.

1.2. Virus de Gumboro: clasificación taxonómica

El virus de Gumboro, también conocido como *Avibirnavirus gumboroense,* pertenece a la familia *Birnaviridae* (ICTV, 2021). El término *Birna* resalta la característica más importante de estos virus: *Bi*, indica el carácter bisegmentado de su genoma y la estructura de doble hebra, y *rna,* hace referencia al tipo de ácido nucleico que poseen (Nick et al., 1976). La familia *Birnaviridae* está compuesta por virus desnudos con cápside de simetría icosaédrica, número de triangulación T=13, de unos 70 nm de diámetro (Böttcher et al., 1997; Coulibaly et al., 2005) (Figura 1).

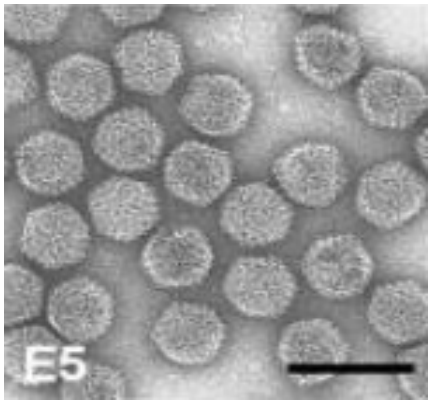


Figura 1- Micrografía electrónica de partículas virales purificadas de IBDV. La barra corresponde a 100 nm. Tomada de Luque et al. (2009).

Dentro de la familia existen siete géneros: *Aquabirnavirus, Avibirnavirus, Blosnavirus, Dronavirus, Entomobirnavirus, Ronavirus* y *Telnavirus* (ICTV, 2021). IBDV infecta aves y es la única especie que integra el género *Avibirnavirus.* El resto de los géneros incluyen virus que infectan diversas especies acuáticas e insectos.

1.3. Genoma viral y proteínas codificadas

El genoma del virus de Gumboro está compuesto por dos segmentos de ARN de doble hebra, conocidos como segmentos A y B (Figura 2). El segmento A tiene aproximadamente 3.3 kb y contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF) parcialmente solapados, denominados ORF-A1 y ORF-A2 (Kibenge et al., 1990). El ORF-A1 codifica la proteína VP5 y varía entre 438 y 450 nucleótidos (nt) según la cepa viral (Mundt et al., 1995). El ORF-A2, con una longitud de 3039 nt, codifica una poliproteína que se procesa mediante clivaje para producir las proteínas VP2, VP3, VP4 y cuatro pequeños péptidos (Sánchez y Rodríguez, 1999; Lejal et al., 2000; Da Costa et al., 2002). En ambos extremos del segmento A se encuentran regiones no codificantes, conocidas como 5' UTR y 3' UTR, con longitudes de 96 y 95 nt, respectivamente.

El segmento B del genoma tiene aproximadamente 2.9 kb y contiene un único ORF de 2640 nt que codifica la proteína VP1. Las regiones 5' UTR y 3' UTR de este segmento miden 111 y 82 nt, respectivamente (Mundt y Muller, 1995).

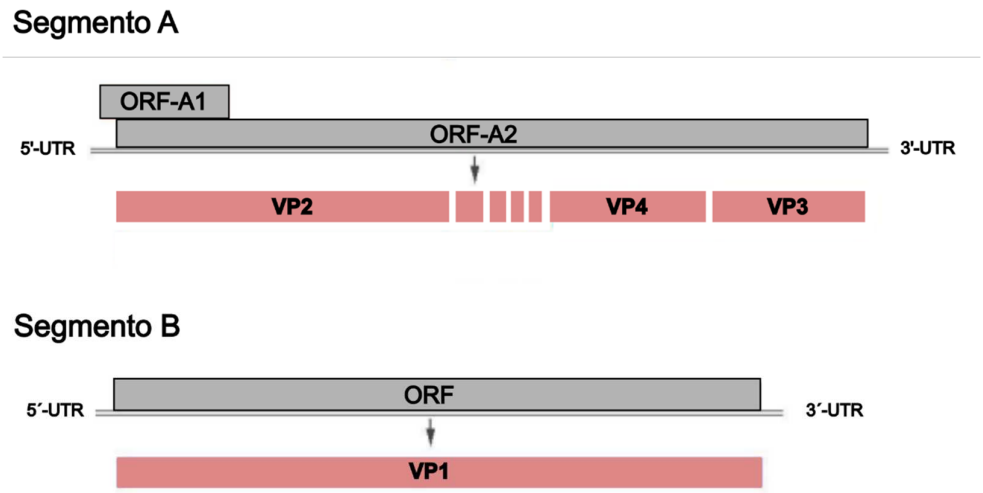


Figura 2- Esquema representativo de los dos segmentos genómicos A y B de IBDV. Se indican los marcos abiertos de lectura de cada segmento y sus productos proteicos.

La proteína VP1 es la ARN polimerasa ARN-dependiente encargada de transcribir y replicar el genoma viral (von Einem et al., 2004). VP1 también actúa como una proteína cebadora, incorporando residuos de guanina por un proceso de auto guanilización que hibridan con residuos de citosina localizados en los extremos 3´ de ambos segmentos genómicos (Pan et al., 2009). Esta dualidad de funciones, como polimerasa y como proteína cebadora, es una característica distintiva de las polimerasas de los birnavirus (Kibenge y Dhama, 1997). VP1 tiene tres regiones principales: la región N- terminal (1-167 aa) con función cebadora, la región central (168-658 aa) que posee los dominios

responsables de la actividad polimerasa, y la región C-terminal (659-878 aa) que funciona evitando errores en el proceso de cebado al inicio de la polimerización (*back-priming*) (Pan et al., 2007).

La poliproteína codificada por el ORF-A2 del segmento A es un polipéptido precursor de orden pVP2-VP4-VP3. La poliproteína se autoescinde co-traduccionalmente para formar las proteínas virales pVP2, VP3 y VP4 (Jagadish et al., 1988). El proceso de autoproteólisis comienza con la acción de la proteasa viral VP4, la cual corta a la altura de su amino y carboxilo terminal, liberando así a las proteínas pVP2 y VP3 (Lejal et al., 2000). La proteína pVP2 genera, por un proceso de maduración, la principal proteína de la cápside VP2 y cuatro péptidos pequeños pep46, pep11, pep7a, pep7b (Da Costa et al., 2002) que también forman parte de la cápside madura. Estos péptidos pequeños están involucrados en el mecanismo de entrada del virus a la célula, a través de la desestabilización de la membrana celular (Chevalier et al., 2005; Galloux et al., 2007).

VP2 es una proteína que se organiza en tres dominios: B (*base*), S (*shell*) y P (*projection*) (Garriga et al., 2006) (Figura 3A). Los dominios B y S son muy conservados, mientras que el dominio P es el más variable, ya que contiene la región hipervariable que se extiende desde la posición aminoacídica 206 a la 350 (Bayliss et al., 1990). En esta región hipervariable de VP2 se encuentran cuatro bucles que se proyectan hacia el exterior, denominados P_{BC}, P_{DE}, P_{FG} y P_{HI}, para conformar la región más expuesta de la partícula viral (Letzel et al., 2007) (Figura 3A y B). Los residuos de estos bucles intervienen en el tropismo celular, en la virulencia y en la antigenicidad (Brandt et al., 2001; Jackwood et al., 2008; Qi et al., 2009, 2013; Noor et al., 2014).

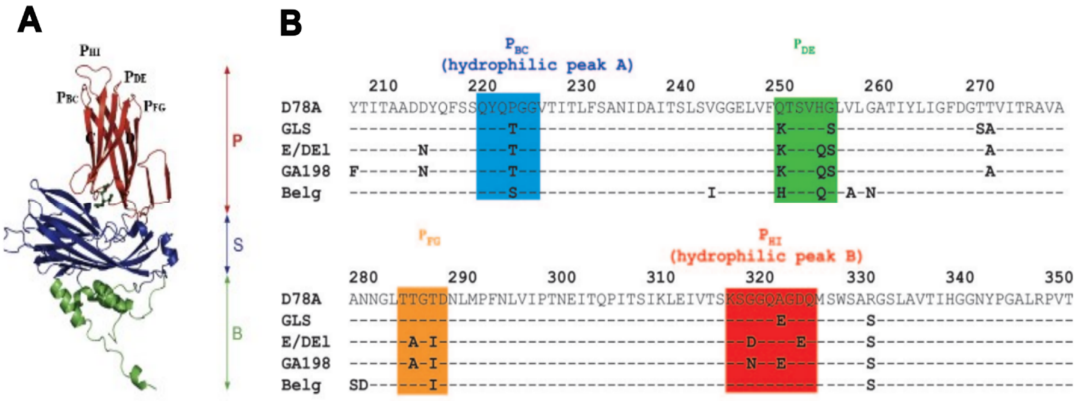


Figura 3- Representación esquemática de la proteína VP2. (A) Monómero de VP2. Los dominios P, S y B se muestran en diferente color. Se indica la posición de cada uno de los bucles P_{BC}, P_{DE}, P_{FG} y P_{HI}. (B) Secuencia aminoacídica de la región hipervariable de VP2. Se indican los bucles del dominio P de VP2 en diferentes colores; P_{BC} azul, P_{DE} verde, P_{FG} anaranjado y P_{HI} rojo. Modificada de Letzel et al. (2007) y Delgui et al. (2009).

VP3 es una proteína multifunción implicada en la replicación viral, morfogénesis, inhibición de la apoptosis celular y escape a la respuesta inmune del huésped. VP3 recluta a VP1 y al genoma viral, ensamblando el complejo rinonucleoproteíco en donde ocurre la replicación de IBDV (Luque et al., 2009). Además, VP3 interacciona con la polimerasa viral VP1 y funciona como regulador de la actividad transcripcional (Lombardo et al., 1999). La interacción del extremo C-terminal de VP3 con el extremo C-terminal de pVP2 es importante para la correcta formación de la cápside viral, por lo cual se ha descrito a VP3 como una proteína scaffold durante la morfogénesis (Maraver et al., 2003; Oña et al., 2004; Saugar et al., 2005; Mata et al., 2018). VP3 además previene la muerte celular programada inducida por la expresión de VP2 (Busnadiego et al., 2012) e inhibe la respuesta inmune del hospedero protegiendo al ARN doble hebra viral contra los sensores celulares (Ye et al., 2014).

La proteína VP4 es una serín-proteasa viral encargada del procesamiento co-traduccional de la poliproteína (Lejal et al., 2000). Además, participa en la inhibición de la respuesta inmune del hospedero mediante su interacción con la proteína GILZ (*glucocorticoid-induced leucine zipper*) lo que inhibe la expresión del interferón tipo I (He et al., 2018).

La proteína VP5 (no estructural) es una proteína transmembrana de clase II que participa en la regulación de la apoptosis celular. En etapas tempranas de la infección VP5 inhibe la apoptosis celular, lo que favorece la producción de más progenie (Liu y Vakharia, 2006; Wei et al., 2011) y en etapas tardía de la infección actúa promoviéndola, para favorecer la diseminación del virus (Li et al., 2012).

1.4. Ciclo replicativo de IBDV

1.4.1. Ingreso a la célula

IBDV entra en la célula a través de la interacción de la proteína de la cápside VP2 con receptores celulares como cHSP90, α4β1 integrina y sIgM (Lin et al., 2007; Delgui et al., 2009; Luo et al., 2010). La entrada se produce por macropinocitosis (Giménez et al., 2015), seguido de la formación de endosomas. La disminución de calcio en los endosomas provoca cambios en la cápside viral, liberando pep46 (pequeño péptido de cápside) que forma poros en la membrana endosomal (Galloux et al., 2007). Las proteínas VP2 restantes son degradadas, mientras que los complejos ribonucleoproteicos (RNP) se asocian a nuevos endosomas mediante VP3 (Giménez et

al., 2018). Los RNP se transportan a la región perinuclear, estableciendo contacto físico con el complejo de Golgi, donde ocurre la replicación viral (Delgui et al., 2013) (Figura 4)

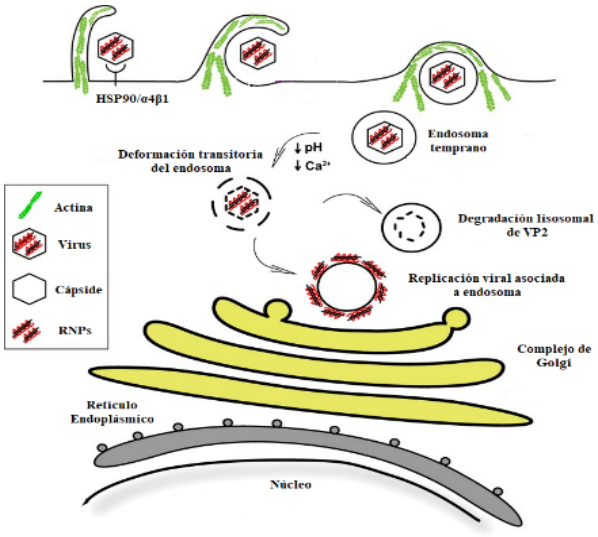


Figura 4- Modelo esquemático para el ingreso de IBDV y el establecimiento del nicho de replicación asociado a endosoma. Modificado de Giménez et al. (2018).

1.4.2. Replicación y transcripción

La proteína VP1 cataliza la replicación del genoma y la síntesis de ARNm viral (Spies et al., 1987). Existen dos formas de VP1 en el virión: libre y unida al ARN doble hebra (Kibenge y Dhama, 1997; Villanueva et al., 2005). Después de la entrada del virus, VP1 y VP3 se liberan al citoplasma, donde VP1 experimenta modificaciones postraduccionales (fosforilación, ubiquitinación, sumoilación y auto-guanilación) necesarias para la transcripción y replicación viral (Pan et al., 2009; Wu et al., 2019; Hu et al., 2023). La proteína VP1 libre sufre un doble proceso de auto guanilización que le permite actuar como proteína cebadora, uniéndose a las citosinas conservadas en los extremos 3' de las hebras molde. La generación del ARN viral ocurre de manera semiconservativa utilizando la hebra negativa de cada segmento genómico como molde (Spies et al., 1987; Pan et al., 2007).

1.4.3. Traducción de proteínas virales, ensamblaje y liberación.

Los ARNm virales, que carecen de CAP y cola poli(A), utilizan un mecanismo alternativo para la traducción. Se ha planteado que las proteínas VP1 y VP3 virales son necesarias y suficientes para compensar la deficiencia de CAP en 5´ y reemplazar el papel del factor eIF4E en el reclutamiento de la maquinaria traduccional del huésped. Es probable que VP1 y/o VP3 interactúen con uno o más componentes de los factores de iniciación de la traducción celular, facilitando así la entrada del ribosoma a las secuencias (Ye et al.,

2018). La interacción entre el intermediario guanilado de VP1 y el extremo carboxi-terminal del factor de inicio de la traducción (eIF4AII) recluta la subunidad ribosomal menor 40S al extremo 5´ del ARNm viral y comienza la traducción (Tacken et al., 2004). El ensamblaje de la cápside se inicia con el procesamiento de la poliproteína por la proteasa VP4. Según las interacciones con VP3 o con la proteasa celular PurSA, se forman hexámeros o pentámeros de pVP2, dando lugar a una procápside que contiene el genoma viral, con VP1 unido en sus extremos 5' e interactuando también con VP3. Finalmente, la pVP2 se autocliva, liberando VP3 y formando la partícula viral madura, mientras que VP5 induce la apoptosis, lo que facilita la liberación de las partículas virales (Li et al., 2012).

1.5. Mecanismos de variabilidad en IBDV

El genoma de IBDV evoluciona por mutación, recombinación y reordenamientos que llevan al surgimiento y establecimiento de virus que pueden variar antigénica y patogénicamente.

El genoma de ARN de IBDV está sometido a altas tasas de mutación de entre 10^{-5} y 10^{-6} mutaciones/sitio/generación (Peck y Lauring, 2018). Esto se refleja en tasas de sustitución que rondan las 10^{-4} sustituciones/sitio/año (Silva et al., 2013; Alfonso-Morales et al., 2015).

La recombinación homóloga es otro de los mecanismos que desempeña un papel importante en la generación de variabilidad en IBDV. Ocurren eventos de recombinación en ambos segmentos de IBDV entre cepas de campo (Jackwood, 2012), y entre cepas de campo y vacunales (Hon et al., 2008; He et al., 2009; Wu et al., 2020; Feng et al., 2022).

Por poseer un genoma bisegmentado, otro de los mecanismos responsable de variabilidad es el reordenamiento. Se han descrito reordenamientos entre cepas de campo (Jackwood et al., 2016; Wang et al., 2022), entre cepas de campo y vacunales (Wei et al., 2006; Chen et al., 2012; Abed et al., 2018; Pikula et al., 2018; Wang et al., 2023), y entre distintos serotipos (Jackwood et al., 2011).

1.6. Clasificación de IBDV

La prueba de seroneutralización identifica dos serotipos de IBDV (McFerran et al., 1980). El serotipo 2 es común en pavos (Jackwood et al., 1982; Chin et al., 1984) y, aunque infecta tanto pavos como pollos, se considera no patogénico, ya que causa

seroconversión sin signos clínicos ni daño significativo en la bursa de Fabricio (Perelman y Heller, 1983; Jackwood et al., 1984; Ismail et al., 1988).

Por otro lado, el serotipo 1 es patogénico en pollos y se divide en cuatro fenotipos: clásicas (cIBDV), variantes (vaIBDV), hipervirulentas (vvIBDV) y clásicas atenuadas (caIBDV). Las cepas hipervirulentas (vvIBDV) son las más problemáticas, con mortalidades del 25% en pollos de engorde y del 60% en aves de postura, además de causar lesiones graves en la bursa de Fabricio (van den Berg et al., 1991; Nunoya et al., 1992). Las cepas cIBDV presentan patogenicidad moderada, con mortalidades que no superan el 10% (Cosgrove, 1962; Parkhurst, 1964). En contraste, las cepas caIBDV, principalmente vacunales, no causan mortalidad, aunque pueden provocar daño variable en la bursa y distintos grados de inmunodepresión (Giambrone y Clay, 1986; Mazariegos et al., 1990). Las cepas vaIBDV, aunque inmunodeprimen, no muestran signos clínicos ni mortalidad directa y tienen variaciones antigénicas distintivas (Ismail y Saif, 1988).

Ante la aparición de nuevas cepas con características moleculares distintas, Michel y Jackwood (2017) propusieron un sistema de clasificación para IBDV basado en la región hipervariable de VP2. Este enfoque permite identificar marcadores asociados con la patogenicidad, la antigenicidad y la capacidad de crecimiento en cultivos celulares (Vakharia et al., 1994; Brandt et al., 2001; Letzel et al., 2007). Las cepas se agrupan en siete linajes o genogrupos: cIBDV, vaIBDV y vvIBDV corresponden a G1, G2 y G3, respectivamente, mientras que los genogrupos G4 a G7 incluyen las cepas *Distinct* (G4), descritas por nuestro grupo (Hernández et al., 2015; Tomás et al., 2019, 2020), cepas recombinantes propuestas en México (G5), cepas divergentes, principalmente de Italia (G6), y cepas australianas (G7).

Además de analizar la región hipervariable de VP2 (segmento genómico A), la OMSA aconseja la caracterización genética de ambos segmentos del genoma de IBDV, ya que las variaciones genéticas en ambos segmentos del genoma influyen en la patogenicidad de la cepa (Nouën et al., 2006, 2012; Escaffre et al., 2013; Gao et al., 2018). Además, se ha informado cada vez más sobre la circulación de cepas reordenantes entre diferentes tipos de IBDV (Pikula et al., 2018; Hussain et al., 2019; Pikuła et al., 2020). En base a esto, se han establecido reglas para el genotipado de IBDV basadas en la secuencia parcial de ambos segmentos (Islam et al., 2021; Wang et al., 2021). Wang et al. (2021) propuso un esquema de clasificación con ocho genogrupos (A1-A8) para el Segmento A y cuatro genogrupos (B1-B4) para el Segmento B para las

cepas que pertenecen al serotipo 1 (Figura 5). El genogrupo A2 se dividió además en cuatro linajes A2a, A2b, A2c y A2d. Los tres primeros corresponden principalmente a cepas norteamericanas, mientras que A2d contiene variantes recientes descritas en China (Fan et al., 2019). Los genogrupos A1-A7 son equivalentes a G1-G7, y el genogrupo A8 representa cepas atenuadas de IBDV. El genogrupo B1 asocia cepas clásicas, variantes, *Distinct* y atenuadas. El genogrupo B2 incluye cepas muy virulentas, mientras que el genogrupo B3 contiene cepas similares a HLJ0504 que comparten el Segmento B de un ancestro único. El genogrupo B4 comprende cepas emergentes de linajes transicionales de Polonia y Finlandia. Las cepas clásicas, variantes, hipervirulentas y atenuadas de IBDV que no experimentan recombinación o reordenamiento se asignan a los genotipos A1B1, A2B1, A3B2 y A8B1, respectivamente.

Aunque los nuevos esquemas de clasificación de IBDV, como los propuestos por Wang et al. (2021), permiten una clasificación detallada en genotipos, el acceso a secuencias completas de ambos segmentos genómicos sigue siendo esencial para una caracterización más precisa del virus. La secuenciación completa del genoma proporciona una visión más integral de la diversidad genética y los fenómenos de recombinación, lo cual es crucial para entender la variabilidad y patogenicidad del IBDV (Michel y Jackwood, 2017). En este contexto, varios estudios recientes han demostrado la utilidad de las secuencias genómicas completas para mejorar la clasificación del IBDV y para una mejor comprensión de su evolución y epidemiología (Feng et al., 2022; Pikula et al., 2023; Junnu y Pohuang, 2023).

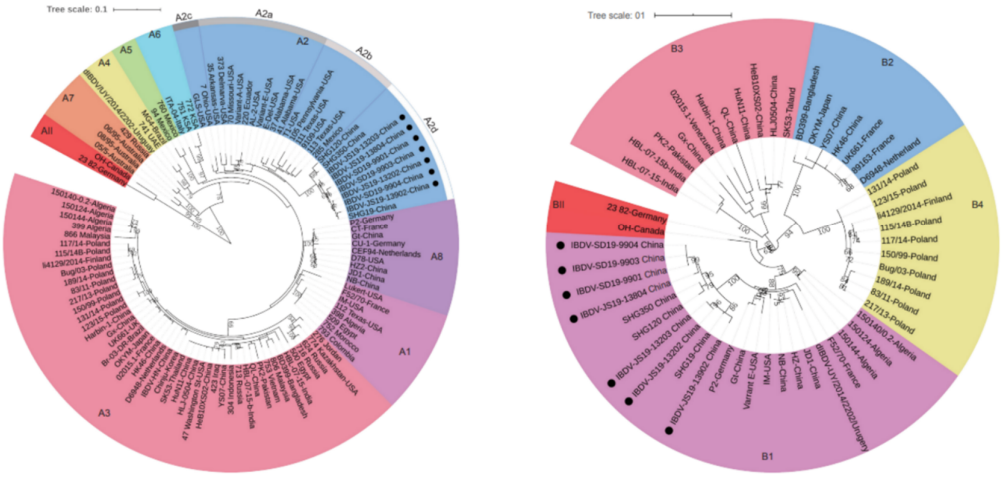


Figura 5- Árboles filogenéticos basados en las secuencias nucleotídicas de la región hipervariable de VP2 del Segmento A (izquierda) y en la secuencia del marcador B de VP1 del Segmento B (derecha) de IBDV. Los árboles muestran la formación de ocho genogrupos (A1-A8) en el Segmento A y cuatro genogrupos (B1-B4) en el Segmento B para las cepas del serotipo 1 de IBDV. Tomadas de Wang et al. (2021).

1.7. Enfermedad de Gumboro

1.7.1. Patogenia

IBDV causa la Enfermedad de Gumboro, enfermedad descrita por Albert Cosgrove en 1957 en una granja de la comunidad de Gumboro, Delaware, Estados Unidos (Cosgrove, 1962). En la actualidad se encuentra distribuida mundialmente y se considera una de las afecciones más problemáticas de la avicultura industrial (McIlroy, et al., 1989; Zachar et al., 2016).

La enfermedad provoca inmunodepresión e inmunosupresión en aves parrilleras, reproductoras y ponedoras, principalmente entre las 2 y 6 semanas de edad (Eterradossi y Saif, 2008). La transmisión del virus ocurre de forma horizontal a través de las heces de las aves infectadas y puede persistir hasta 122 días en el ambiente (Benton et al., 1967; Zhao et al., 2013). El ingreso del virus puede ocurrir por vía oral o por inhalación (Zhao et al., 2013). En el intestino ocurre la primera replicación en macrófagos del duodeno, yeyuno y ciego (Müller et al., 1979). A través del torrente sanguíneo principal el virus alcanza otros órganos entre ellos la bursa de Fabricio, en cuyos folículos se encuentran las principales células blanco, los linfocitos B inmaduros. A las 13hs posinfección la mayoría de los folículos son positivos para la presencia del virus, y a las 16hs posinfección ocurre una nueva viremia masiva asociada a una segunda replicación en otros órganos linfoides, tales como timo, bazo, tonsilas cecales y glándula de Harder. La replicación de IBDV en los linfocitos B inmaduros provoca una depleción linfocitaria, que es la principal causa de inmunodepresión de las aves infectadas. Las aves inmunodeprimidas son más susceptibles a la infección con otros patógenos virales y bacterianos encontrados en las granjas (Rosenberger y Cloud, 1989; Nader et al., 2013) y tienen una respuesta inmune reducida a la aplicación de vacunas, lo que aumenta aún más la problemática (Giambrone, 1979).

1.7.2. Signos clínicos y lesiones

El período de incubación de la enfermedad es corto, y los primeros signos clínicos se observan entre 2 y 3 días después de la exposición al virus. La presencia y gravedad de los signos clínicos y las lesiones dependen de varios factores, incluyendo la edad de las aves, su estado inmunológico, su línea genética y la virulencia de la cepa viral involucrada (Fadly y Nazerian, 1983; Chettle et al., 1985; Bumstead et al., 1993). Se reconocen dos formas de la enfermedad: clínica y subclínica.

La forma clínica ocurre principalmente en pollos de entre 3 y 6 semanas de edad, cuando la bursa de Fabricio alcanza su máxima maduración y el mayor número de linfocitos B inmaduros (Ismail et al., 1987). Los signos clínicos más comunes incluyen diarrea, erizamiento de las plumas, disminución en el consumo de alimento y agua, y letargia variable con falta de reacción a estímulos externos (Cosgrove, 1962). Las infecciones por cepas clásicas de IBDV provocan un aumento en el tamaño y peso de la bursa de Fabricio entre los días 2 y 6 posinfección, debido a edema e hiperemia, seguido de atrofia a partir del día 7 (Cheville, 1967). En contraste, las cepas variantes de IBDV no inducen inflamación, lo que resulta en una atrofia más rápida (Sharma et al., 1989; Snyder, 1990). El bazo puede estar ligeramente agrandado y presentar pequeños focos grises dispersos. Las lesiones microscópicas incluyen necrosis linfoide en la bursa, bazo, timo, glándula de Harder y tonsilas cecales (Glisson et al., 2008). La enfermedad generalmente alcanza el 100% de morbilidad, y las tasas de mortalidad varían según la virulencia de la cepa. La forma subclínica afecta principalmente a aves menores de tres semanas. Estas aves no presentan signos clínicos evidentes, pero sufren atrofia de la bursa y una notable inmunodepresión. A partir de las 6 semanas de edad, la susceptibilidad a la infección disminuye, reduciendo la aparición de síntomas clínicos debido a la atrofia natural del órgano, que pierde funcionalidad al alcanzar la madurez sexual alrededor de las semanas 18-20 (Ciriaco et al., 2003).

El sistema inmunológico también cumple un rol crucial, especialmente en relación con los anticuerpos maternos. Las aves jóvenes con altos niveles de anticuerpos maternos tienen menor susceptibilidad a la enfermedad, siempre y cuando haya una alta correspondencia entre estos anticuerpos neutralizantes y la cepa viral presente (Ide et al., 1978).

La línea genética del ave hospedadora influye en la aparición y severidad de los signos clínicos. Un estudio con aves SPF reveló que las aves de postura (White Leghorn) son más susceptibles a una cepa hipervirulenta que los pollos de engorde (Plymouth Rock) (Silva et al., 2016). Resultados similares se encontraron con una cepa clásica, donde las aves de postura mostraron mayor susceptibilidad (Nielsen et al., 1998). Esta variabilidad se debe a diferencias en la respuesta inmune innata, especialmente en células T y la expresión de citoquinas (Tippenhauer et al., 2013).

Finalmente, el tipo de cepa responsable de la infección tiene un impacto significativo en la manifestación de los signos clínicos, como se detalla en la sección 1.6 para las cepas hipervirulentas, clásicas, clásicas atenuadas y variantes del IBDV. Además, nuestro

grupo ha informado que las cepas *Distinct* que infectan aves de 6 semanas no producen signos clínicos evidentes, pero sí causan una severa atrofia de la bursa y una fuerte inmunodepresión (Tomás et al., 2019). Asimismo, está circulando a nivel mundial una nueva variante (nvIBDV) reportada en China que no causa signos clínicos severos, pero provoca daños irreversibles en los órganos inmunitarios de los pollos, incluyendo lesiones en la bursa, hinchazón y atrofia del bazo, e inmunosupresión a largo plazo (Fan et al., 2019, 2020; Xu et al., 2020).

1.7.3. Control de la enfermedad

La primera línea de defensa contra la enfermedad de Gumboro es la bioseguridad. Sin embargo, el virus presenta una gran resistencia a agentes físicos y químicos, persistiendo en los ambientes de crianza incluso después de la limpieza y desinfección (Eterradossi y Saif, 2013). Por ello, la segunda línea de defensa consiste en la vacunación, que protege a los pollitos contra la infección. Las vacunas utilizadas para el control del IBDV incluyen las vivas atenuadas, las inactivadas, las basadas en inmunocomplejos y las vectorizadas (recombinantes).

Las vacunas vivas atenuadas contra IBDV se utilizan extensamente en el control de la enfermedad en aves jóvenes. Estas vacunas, desarrolladas mediante la atenuación de cepas de campo por pasajes en embriones de pollo SPF o cultivos celulares (Müller et al., 2012), replican en la bursa de Fabricio, imitando la infección y promoviendo respuestas inmunitarias protectoras tanto humoral como celular. No requieren adyuvantes, lo que evita reacciones inflamatorias locales, y se administran a menudo por vías masivas, como en el agua de bebida o por aspersión. Sin embargo, la presencia de anticuerpos maternos puede neutralizar el virus vacunal, por lo que es crucial determinar el momento óptimo para la vacunación. La efectividad de estas vacunas depende de tres factores: el tiempo de vacunación, los niveles de anticuerpos maternos anti-IBDV y la virulencia del virus vacunal. Las vacunas se clasifican en suaves, intermedias e intermedias plus (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2023). Las vacunas suaves, que se emplean principalmente en aves reproductoras de aproximadamente 8 semanas de edad antes de administrar vacunas inactivadas (Skeeles et al., 1979), tienen una efectividad limitada frente a anticuerpos maternos y no provocan daño significativo en la bursa. En contraste, las vacunas intermedias e intermedias plus, aplicadas en pollos parrilleros y aves de postura, así como en reproductoras jóvenes en riesgo, pueden causar lesiones moderadas a graves en la bursa y distintos grados de inmunodepresión. Estas últimas suelen administrarse en dos dosis: una entre los 10 y 14 días de edad y

otra 7-10 días después. La monitorización de la caída de anticuerpos maternos es esencial para asegurar el mejor momento para la vacunación (Eterradossi y Saif, 2013). Una desventaja de las vacunas vivas atenuadas es la posible reversión de la virulencia y, en consecuencia, un posible efecto deletéreo en la salud y producción de los lotes (Müller et al., 2012)

Las vacunas inactivadas son seguras porque no replican en las aves, pero generan una respuesta inmune más débil que las vacunas vivas, ya que el virus inactivado no simula la infección natural, limitando la activación del sistema inmunológico y requiriendo múltiples dosis para lograr una inmunidad efectiva (Müller et al., 2012). Generalmente, se administran a las aves reproductoras antes de que alcancen la edad reproductiva, especialmente si recibieron vacunas vivas atenuadas al inicio de su vida. Esto estimula la producción de altos niveles de anticuerpos neutralizantes en las reproductoras, que se transfieren pasivamente a la descendencia a través de la yema de huevo, protegiendo a los pollos durante las primeras semanas de vida (Eterradossi y Saif, 2013).

Las vacunas basadas en inmunocomplejos antígeno-anticuerpo se desarrollan mezclando anticuerpos anti-IBDV con cepas de virus vacunal, específicamente cepas intermedias plus. Estas vacunas pueden administrarse tanto en embriones de 18 días como en pollitos de 1 día de edad, y no interfieren con los anticuerpos maternos (Haddad et al., 1997; Giambrone et al., 2001; Iván et al., 2005). La mezcla de anticuerpos policlonales y el virus forma un complejo que es suficiente para retrasar la replicación del virus vacunal sin aumentar la inmunidad materna (Jeurissen et al., 1998). Aunque estas vacunas superan la inmunidad materna, las cepas intermedias plus pueden causar lesiones en la bursa y potencialmente inducir inmunodepresión.

Otro tipo de vacunas desarrolladas son las vacunas vectorizadas recombinantes que utilizan vectores virales como el herpesvirus del pavo, virus de Newcastle, fowlpox, canarypox y adenovirus aviar para expresar la proteína VP2 del IBDV (Heine y Boyle, 1993; Darteil et al., 1995; Tsukamoto et al., 1999; Huang et al., 2004). Estas vacunas pueden administrarse *in ovo* en embriones de 18 días o a pollitos de 1 día de edad, sin interferir con los anticuerpos maternos (Bublot et al., 2007). Son efectivas para inducir una respuesta inmune protectora contra IBDV y no producen lesiones significativas en la bursa, evitando la inmunodepresión asociada con las vacunas vivas atenuadas (Müller et al., 2012; Prandini et al., 2016). Si bien son vacunas que ofrecen una solución innovadora para la inmunización contra IBDV también presentan desafíos en cuanto a

costos y administración.

A pesar de los avances en el desarrollo y efectividad de las vacunas contra IBDV, aún existen desafíos en su control. Estos problemas pueden surgir debido a errores en la aplicación y manejo de las vacunas, así como a la aparición de nuevas variantes del virus. Por ello, es esencial conocer las cepas de campo presentes en los sistemas productivos para diseñar estrategias de control más precisas y efectivas.

1.8. Interacción entre IBDV, CAV y MDV: Impacto en la Patogenicidad y Estrategias de Control

Conocer la interacción entre el virus de Gumboro y otros virus que causan inmunosupresión en aves, como el virus de la anemia infecciosa aviar y el virus de Marek, es fundamental para la salud aviar y las estrategias de control.

El virus de la anemia infecciosa aviar (*Gyrovirus chickenanemia)* pertenece al género *Gyrovirus* de la familia *Anelloviridae* (ICTV, 2023). Posee un genoma de ADN simple hebra circular de polaridad negativa de 2,3 kb de longitud que codifica para tres proteínas, VP1, VP2 y VP3 (Figura 6A) (Schat y van Santen, 2020). CAV replica en los hemocitoblastos de la médula ósea y en los linfoblastos o linfocitos inmaduros en el timo, lo que genera anemia e inmunodepresión (Adair et al., 2000; Miller y Schat, 2004). Todas las cepas aisladas de CAV se agrupan en una única variante antigénica o serotipo (McNulty, 1991; Noteborn y Koch, 1995). Se han descrito cuatro genotipos o clados cuando se realizan los análisis con las secuencias de genomas completos (Elthair et al., 2011; Tesis de Maestría Techera, 2018). Las estrategias de control más efectivas contra este virus incluyen medidas de bioseguridad, buenas prácticas de manejo y vacunación (Fatoba y Adeleke, 2019). En Uruguay, se vacuna únicamente a las reproductoras, las cuales transmiten anticuerpos a los pollitos, utilizando productos como Nobilis P4. En la región, se emplea la vacuna Del-Ros.

El virus de Marek (*Mardivirus gallidalpha2*), pertenece al género *Mardivirus* dentro de la subfamilia *Alphaherpesvirinae* de la familia *Orthoherpesviridae.* (ICTV, 2023). Posee un genoma de ADN de doble hebra lineal de aproximadamente 180 kpb de longitud compuesto por numerosos genes (Figura 6B) (Nair et al., 2020). Infecta principalmente linfocitos T y se caracteriza por la formación de tumores linfoides generalizados, inmunosupresión y parálisis (Nair et al., 2020).

El potencial patogénico del virus de Marek varía entre una baja y una alta virulencia. En

las últimas décadas, se han identificado cuatro patotipos de MDV: suave (m), virulento (v), muy virulento (vv) y muy virulento plus (vv+) (Nair et al., 2020). Se utiliza la secuenciación y el análisis de genes, tales como la interleucina 8 viral (vIL-8), la oncoproteína Meq, la fosfoproteína pp38 y la glicoproteína L (gL), para diferenciar entre cepas de baja (m), media (v) y alta virulencia (vv y vv+), y comprender su efecto patogénico (Add-Ellatieff et al., 2018; Prathibha et al., 2018; Ozan et al., 2021; Kannaki et al., 2022). Los primeros tres genes tienen implicaciones significativas en la oncogenicidad y patogenicidad de MDV (Tian et al., 2011), mientras que la gL es crucial para la infección por MDV (Rajcani y Vojvodova, 1998).

Controlar la enfermedad es complicado debido a la latencia del virus y su persistencia en el ambiente avícola. La vacunación y la mejora de la bioseguridad son esenciales para el manejo de la Enfermedad de Marek (Nair et al., 2020). En Uruguay, se utilizan vacunas comerciales contra MDV, que contiene la cepa CVI988 (Rispens).

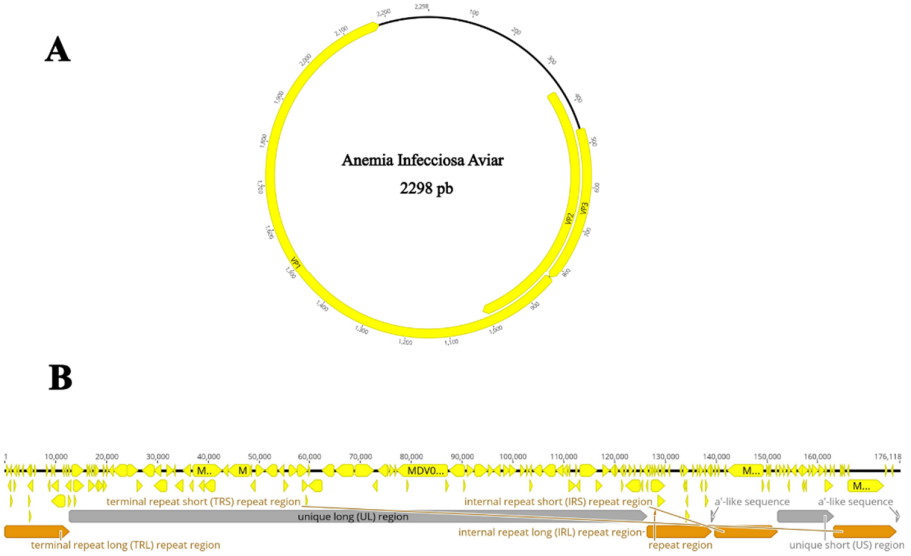


Figura 6- A) Representación esquemática del genoma de CAV. Está formado por tres marcos abiertos de lectura parcialmente solapados, codificantes de la proteína de la cápside VP1, la proteína no estructural VP2 y la proteína Apoptina VP3. B) Esquema representativo de la estructura genómica de MDV. En amarillo se detallan los genes.

Coinfecciones entre estos virus se han detectado en aves de producción uruguayas (Techera et al., 2019; Tesis Maestría Perbolianachis, 2021). Coinfecciones experimentales entre IBDV y CAV respaldan un efecto acumulativo de ambos virus y un mayor impacto en los parámetros productivos (Toro et al., 2009). La infección con CAV

combinada con el uso de una vacuna intermedia plus IBDV en parvadas comerciales de pollos de engorde puede llevar a una disminución en el aumento de peso (Chacón et al., 2010) y dermatitis gangrenosa (Gimeno y Schat, 2018). Un control adecuado de IBDV es crucial para obtener las respuestas inmunes necesarias para controlar la anemia infecciosa, ya que se vacuna a las reproductoras que transmiten anticuerpos a los pollitos. Estas vacunas no se pueden usar en aves jóvenes, por lo que no hay vacunas disponibles para prevenir la infección por CAV una vez que los anticuerpos maternos disminuyen. La mejor estrategia es asegurar una respuesta inmune óptima para el desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra CAV, evitando el uso de vacunas para controlar IBDV que comprometan la respuesta humoral de las aves, como ocurre con las cepas vacunales intermedias plus, que pueden afectar negativamente la inmunidad de las aves (Gimeno y Schat, 2018). En este sentido, las cepas vacunales intermedias plus utilizadas en el control de IBDV ocasionan lesiones moderadas a graves en la bursa de Fabricio que favorecen la entrada para otros virus como CAV y/o MDV, promoviendo distintos grados de inmunodepresión (Mazariegos et al., 1990; Tsukamoto et al., 1995; Kumar et al., 2000; Rautenschlein et al., 2005). También se han reportado cepas de MDV que escapan a la protección vacunal, a menudo debido a cepas virulentas emergentes o a una respuesta inmunológica comprometida por IBDV y/o CAV (Kannaki et al., 2022; Cheng et al., 2024). El control a largo plazo de MDV no es posible si los pollos están coinfectados con CAV, ya que este virus compromete las funciones de los linfocitos citotóxicos necesarios para controlar MDV (Gimeno y Schat, 2018).

Lo anteriormente expuesto revela que conocer las cepas de IBDV en circulación es esencial, pero no suficiente, para una gestión eficaz. La selección de vacunas contra IBDV debe considerar no solo la cepa específica de IBDV, sino también la posible influencia de otros virus inmunosupresores como CAV y MDV, los cuales pueden afectar la patogenicidad y el control de IBDV. Por lo tanto, es crucial comprender en detalle las cepas de virus coinfectantes para optimizar las estrategias de vacunación y manejo en el campo.

1.9. Técnicas de secuenciación masiva

El desarrollo de metodologías de secuenciación masiva de nueva generación (*next generation sequencing*, NGS) ha revolucionado la forma de obtener secuencias nucleotídicas para caracterizar diferentes organismos (Barzon et al., 2011; Capobianchi et al., 2013; Quiñones-Mateu et al., 2014). Estas tecnologías de secuenciación permiten

el procesamiento masivo y en paralelo de las muestras, lo que reduce notablemente los costos y el tiempo para obtener la secuencia genómica, en comparación con la secuenciación automática de Sanger (Metzker, 2010).

La utilización de estas nuevas tecnologías ha revolucionado los estudios en virología ya que brindan un análisis más profundo de la diversidad en poblaciones virales. Esto se debe a un aumento significativo en la cobertura y profundidad de secuencias que permiten estudiar eventos de coinfección, recombinación, reordenamientos y diversidad de cuasiespecies (Pérez et al., 2014; Isakov et al., 2015).

La metagenómica, que consiste en la secuenciación del contenido total de ácidos nucleicos en una muestra (generalmente ADNc o ADN), es una herramienta eficaz para obtener secuencias genómicas completas de virus (Gire et al., 2014; Carroll et al., 2015). Una de sus principales ventajas es la capacidad de secuenciar genomas virales sin necesidad de conocer previamente la secuencia del virus, lo cual es particularmente beneficioso para estudiar virus altamente mutables o poco caracterizados. Esta técnica es especialmente valiosa para identificar virus desconocidos y responder rápidamente a brotes epidémicos. Sin embargo, la metagenómica presenta desafíos significativos en términos de costo y sensibilidad. La secuenciación directa de muestras clínicas puede enfrentar dificultades debido a que la cobertura del genoma puede ser baja o incluso inexistente cuando se intenta secuenciar virus presentes en baja abundancia en muestras con altos niveles de ácido nucleico del huésped (Quick et al., 2017).

El enriquecimiento es frecuentemente necesario para realizar la secuenciación completa del genoma en muestras clínicas. Este proceso puede realizarse de manera directa mediante aislamiento en cultivo, el uso de sondas de oligonucleótidos o enriquecimiento por PCR, o de manera indirecta a través de la depuración de ácidos nucleicos del huésped. Entre estos métodos, el enriquecimiento por PCR es uno de los más utilizados debido a su simplicidad, bajo costo y rapidez en comparación con otras técnicas (Quick et al., 2017). Este procedimiento generalmente implica la generación de amplicones superpuestos que abarcan todo el genoma antes de la secuenciación masiva (NGS). Esta técnica se utiliza ampliamente para la secuenciación de los genomas de SARS-CoV-2 y Zika (Quick et al., 2017; Lambisia et al., 2022). El enriquecimiento por PCR del genoma viral debe continuarse con la generación de librerías Illumina. Estas librerías requieren un procedimiento de tagmentación que genera fragmentos de aproximadamente 300 pb. Posteriormente se agregan adaptadores que son utilizados

durante la secuenciación en el equipo (Quick et al., 2017; Jauk, 2019). La tagmentación y el agregado de adaptadores emplea Kits específicos de costo muy elevado, además de gastos de transporte desde el exterior. Una alternativa para reducir gastos es diseñar cebadores que cubran todo el genoma y amplifiquen fragmentos superpuestos de aproximadamente 300 pb en dos reacciones de multiplexado (se utilizan dos reacciones para evitar amplificar diferencialmente las regiones superpuestas). Estos cebadores se sintetizan con los adaptadores Illumina en sus extremos, por lo que no es necesario realizar el procedimiento de las librerías, requiriéndose solo el uso del indexado de las secuencias para secuenciarlas en forma conjunta en el equipo. La utilización de cebadores con adaptadores es muy aplicada en estudios de metagenómica en bacterias (Bjerre et al., 2019; Amos et al., 2020) y en estudios de genes relacionados con cáncer. Si bien este procedimiento implica un mayor esfuerzo en el diseño de los cebadores y un mayor costo de estos por el agregado de los adaptadores, permite un gran ahorro posterior en la compra de kits. Por esta razón, la puesta a punto de metodologías de este tipo constituye una innovación que puede realizarse en el procedimiento de secuenciación masiva.

2. Hipótesis de trabajo

En Uruguay y la región, las cepas de virus inmunosupresores, como IBDV, CAV y MDV, infectan aves de corral y coexisten frecuentemente. Conocer la patogenicidad de las cepas de IBDV circulantes, junto con el desarrollo de metodologías de secuenciación masiva para la caracterización genómica rápida y económica de IBDV y otros virus inmunosupresores coinfectantes, proporcionará información crucial para mejorar el control de estos patógenos en la industria avícola regional y mitigar los efectos de la inmunosupresión en la salud aviar.

3. Objetivos

Objetivo General: Contribuir al control de los virus inmunosupresores en la industria avícola regional (Uruguay y Argentina) mediante la caracterización patogénica de las cepas circulantes del linaje *Distinct* de IBDV y el desarrollo de metodologías de secuenciación masiva para obtener los genomas completos de IBDV y otros virus coinfectantes, como CAV y MDV, con el fin de analizar sus interacciones y proponer mejoras en las estrategias de control.

Objetivos Específicos:

- Evaluar la patogenicidad de las cepas de IBDV del linaje *Distinct* en aves jóvenes.
- Identificar casos positivos de IBDV, CAV y MDV en muestras de campo uruguayas y realizar una caracterización primaria de las cepas de IBDV.
- Aplicar metodologías de secuenciación masiva con abordaje virómico para obtener las secuencias de genomas completos de cepas de IBDV y detectar eventos de coinfección con otros patógenos virales aviares.
- Desarrollar metodologías para la obtención de genomas completos de IBDV utilizando técnicas de enriquecimiento basadas en amplificación con cebadores quiméricos y NGS.
- Desarrollar metodologías para obtener regiones genómicas de virus aviares inmunosupresores coinfectantes que puedan afectar la patogenicidad y el control de IBDV, utilizando técnicas de enriquecimiento con amplificación mediante cebadores quiméricos y NGS.

4. Capítulos

La presente tesis está organizada en capítulos asociados con los cinco objetivos específicos. En cada capítulo se describe la metodología realizada, los resultados obtenidos y se discuten los principales hallazgos.

● **Capítulo 1**. Determinación de la patogenicidad de las cepas del linaje *Distinct* de IBDV en aves jóvenes.

● **Capítulo 2**. Identificación de IBDV, CAV y MDV en muestras uruguayas de aves con signos clínicos sugerentes de inmunosupresión. Caracterización genética de las cepas de IBDV mediante secuenciación y análisis de la región hipervariable de VP2.

● **Capítulo 3**. Aplicación de metodologías de secuenciación masiva con abordaje virómico para obtener los genomas completos de cepas de IBDV. Detección de eventos de coinfección con otros patógenos virales aviares.

● **Capítulo 4**. Desarrollo y estandarización de una metodología basada en Multiplex PCR-NGS con cebadores quiméricos para obtener los genomas completos de cepas de IBDV.

● **Capítulo 5**. Desarrollo y estandarización de metodologías basada en Multiplex PCR-NGS con cebadores quiméricos para obtener regiones genómicas de cepas de CAV y MDV.

4.1. Capítulo 1

Estudio de la patogenicidad de las cepas del linaje *Distinct* de IBDV

4.1.1. Metodología

4.1.1.1 Cepas virales utilizadas

La cepa *Distinct* 1/chicken/ARG/P33/15 fue obtenida en Argentina, a partir de aves que participaron en una prueba de eficacia de la vacuna TRANSMUNE (inmunocomplejos antígeno-anticuerpo) durante 2015. Esta cepa se aisló de bursas de Fabricio de pollos de engorde de 30 días de edad que no habían recibido vacunación.

La cepa utilizada como control de infección fue la cepa Clásica 1210. Es una cepa de posible origen vacunal, derivada de la cepa Winterfield 2512, que se aisló de una muestra de campo argentina en 2012.

4.1.1.2 Aislamiento y titulación viral

Las bursas de Fabricio se homogenizaron en un mortero con arena estéril y PBS que contenía penicilina (10,000 UI/ml), estreptomicina (5,000 µg/ml), sulfato de gentamicina (1,000 µg/ml), sulfato de kanamicina (700 µg/ml) y anfotericina B (10 µg/ml). Posteriormente, las muestras se centrifugaron para eliminar los restos celulares y la arena. El sobrenadante fue colectado y se realizaron pasajes en huevos embrionados libres de patógenos específicos (SPF) de 7 días de edad (Instituto Rosenbusch, Buenos Aires, Argentina), inoculando 0,5 mL en el saco vitelino hasta observar las lesiones características de IBDV.

Las titulaciones de los aislamientos *Distinct* y Clásica se hicieron en huevos embrionados SPF de 7 días de edad. Se realizaron diluciones seriadas en base 10 y se inocularon 0,5 mL de cada dilución en el saco vitelino de 5 huevos embrionados. A los 7 días posinoculación fueron sacrificados los embriones vivos (incubación a 4° por dos horas) y se procedió a la apertura del huevo y visualización de lesiones de todos los embriones. Se calculó la dosis infectiva de embrión de pollo 50% ($CEID_{50}$), definida como la dilución del virus que produce lesiones en un 50% de los embriones infectados. En general, el 50% del efecto buscado no corresponde exactamente a una de las diluciones de trabajo, por lo que es necesario hacer una interpolación matemática para definirla, y en este trabajo utilizamos el método de Reed and Muench (Reed and Muench, 1938). Este

método se basa en que el número de unidades de prueba afectadas varía proporcionalmente al log_{10} de la dilución, y que en la zona cercana al 50% el efecto varía linealmente con la dosis.

4.1.1.3 Animales e instalaciones

Se adquirieron huevos embrionados White Leghorn SPF en el Instituto Rosenbusch (Buenos Aires, Argentina). Tras la eclosión, los pollos fueron criados y mantenidos en aisladores esterilizados para pollos, en condiciones de presión negativa (Allentown CH8ISOL), con acceso libre a alimento y agua (*ad libitum*) durante toda la duración de los experimentos. A lo largo del ensayo, se les proporcionó alimento balanceado de iniciación. Las instalaciones utilizadas para la cría y experimentación con aves se encuentran en el Instituto de Virología del INTA Castelar, Buenos Aires.

4.1.1.4 Ensayo de patogenicidad

Se utilizaron 108 aves SPF de 14 días de edad, identificadas mediante anillos plásticos de diferentes colores en las patas y distribuidas al azar en tres grupos de 36 aves cada uno. A un grupo infectado se le inoculó por vía oral con 10^2 $CEID_{50}$ de la cepa *Distinct,* mientras que al otro grupo infectado se le inoculó con 10^2 $CEID_{50}$ de la cepa Clásica. El grupo control recibió diluyente PBS por la misma vía. Durante el ensayo de patogenicidad, se registraron los signos clínicos y la mortalidad de cada grupo.

En los días 1, 2, 4, 7, 14 y 21 posinfección, se seleccionaron 6 aves de cada grupo, a las cuales se les midió el peso corporal y se les tomó muestra de sangre por vía intracardíaca. Posteriormente, las aves fueron sacrificadas por dislocación cervical, de acuerdo con las disposiciones recomendadas y autorizadas por el Comité de Ética del INTA. A cada ave sacrificada se le registró el peso de la bursa de Fabricio y del bazo.

El índice bursa-peso corporal (BBWI) se calculó con la fórmula:

BBWI = [BBW del ave afectada / BBW del Control negativo]

Siendo BBW = [peso de la bursa (g)/peso corporal (g)]*1000.

Valores menores a 0,7 son considerados de atrofia bursal (Lucio y Hitchner,1979).

La relación bazo-peso corporal (SBW) se calculó con la fórmula:

SBW = [peso del bazo (g)/peso corporal (g)]*1000.

4.1.1.5 Análisis histopatológicos

Las muestras de bursa de Fabricio fueron procesadas para su análisis histopatológico, el cual fue realizado por la Dra. Silvina Pintos, profesora de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. Los preparados se analizaron utilizando la escala de daño propuesta por la Dra. Pintos, y se les asignó un valor de acuerdo con dicha escala. La lesión analizada fue la depleción linfoide, y el sistema de puntuación empleado fue el siguiente: 1 = No hay depleción, 2 = Depleción leve, 3 = Depleción moderada, 4 = Depleción severa.

4.1.1.6 Cuantificación de la carga viral

De cada ave sacrificada se colectó tejido de bursa de Fabricio, bazo y tonsilas cecales. La extracción de ácidos nucleicos de las muestras biológicas se realizó con el *kit Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep (Zymo Research)* a partir de 50 mg de tejidos homogeneizados en 800 µl de *DNA/RNA Shield™* (provisto por el *kit*), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN/ARN extraído se eluyó en 50 µL de agua libre de ADNasa/ARNasa.

La transcripción reversa se realizó con el *kit RevertAidTM Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific*), hexanucleótidos al azar y 11 µL de ADN/ARN extraído.

Finalmente se realizó una PCR cuantitativa diseñada por nuestro grupo de investigación (Techera et al., 2019). Esta cuantificación de tipo absoluta brinda los resultados expresados en número de copias virales/reacción de PCR.

4.1.1.7 Determinación del nivel de anticuerpos

Los títulos de anticuerpos anti-IBDV se determinaron en muestras de suero de cada ave utilizando el kit comercial *IDEXX IBDV Ab Test* (IDEXX Laboratory) y determinando el valor S/P (S/P= Absorbancia media de la muestra / Absorbancia media del control positivo). Los valores de S/P mayores a 0.2 indican la presencia de anticuerpos, clasificando así los sueros como positivos.

4.1.1.8 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete XLSTAT del programa Excel. La prueba de Kruskall-Wallis seguida de la prueba post hoc Dunn se empleó en la comparación de más de dos grupos. La prueba de Mann-Whitney se utilizó para

comparar dos grupos de datos. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

4.1.1.9 Análisis de variabilidad intrahospedero por secuenciación profunda

4.1.1.9.1 Amplificación de VP2

Las muestras de bursas de Fabricio de los grupos infectados colectadas en los días 2, 4, 7 y 14 posinfección se utilizaron para realizar un estudio de variabilidad intrahospedero. La extracción de ácidos nucleicos de las muestras biológicas y la transcripción reversa se realizó como se especifica en la sección 4.1.1.6.

Para cada muestra se amplificó la región codificante de la proteína VP2, la cual se utilizó como molde para la secuenciación masiva. Dicha región se obtuvo por PCR en dos fragmentos solapantes: uno de 1192 pb de la región 5' de VP2 y otro de 1262 pb de la región 3', utilizando los cebadores y condiciones descritas por Tomás et al. (2020). Las PCR fueron realizadas con la enzima *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (*Thermo Fisher Scientific*).

4.1.1.9.2 Visualización, purificación y cuantificación de los productos de PCR

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

Los amplicones de cada muestra se combinaron y purificaron usando una relación 1:1.8 de esferas magnéticas *AMPure XP (Beckman Coulter)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el ADN en el fluorómetro Qubit con el *kit Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) (Thermo Fisher Scientific).*

4.1.1.9.3 Preparación de librerías y secuenciación

Las librerías se generaron por tagmentación del ADN doble hebra y adición de las secuencias adaptadoras en los extremos de los fragmentos con el *kit* comercial *Nextera XT DNA Sample Preparation* (*Illumina*) a partir de 1 ng de los productos purificados de PCR. Las librerías indexadas se purificaron con *AMPure XP (Beckman Coulter)* y se cuantificaron en Qubit con el *kit Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) (Thermo Fisher Scientific).*

Se evaluó la calidad y la longitud de cada librería con el *kit Standard Sensitivity NGS Fragment Analysis* utilizando el *Fragment Analyzer 5200 (Agilent).* La secuenciación se

realizó en la plataforma genómica *Illumina MiniSeq (Illumina)* de la Universidad de la República con el cartucho *MiniSeq™ Mid Output Reagent Cartridge (300-cycles, paired-end reads).*

4.1.1.9.4 Ensamblaje de las secuencias obtenidas

El análisis de las lecturas crudas (*raw reads*) obtenidas por cada muestra biológica en la plataforma Illumina se realizó en el Geneious Prime 2019.2.1 (https://www.geneious.com). Los *reads* fueron filtrados con la herramienta *BBDuk* para remover adaptadores, las lecturas de baja calidad (valores de calidad <30) y los que constaban de tamaños menores a 60 pb de longitud. Las lecturas resultantes se ensamblaron sobre secuencias obtenidas por Sanger para la cepa cepa *Distinct* 1/chicken/ARG/P33/15 (MN313610) y para la cepa Clásica 1210 (No publicada) usando *Minimap2.* Las secuencias se inspeccionaron visualmente y se modificaron manualmente.

4.1.1.9.5 Detección de variantes intrahospedero.

El estudio de las variantes nucleotídicas intrahospedero fue realizado con el software Geneious Prime 2019.2.1 (https://www.geneious.com) configurando frecuencias de variantes mínimas de 0,10 y una cobertura mínima de 100.

4.1.2. Resultados

4.1.2.1 Aislamientos

El tercer pasaje de los aislamientos de las cepas *Distinct* y Clásica produjeron lesiones en los embriones. En el caso de la cepa *Distinct* los embriones se observaron edematosos, más pequeños y sin plumas (Figura 7A). Los hígados estaban en su mayoría rodeados de bilis (Figura 7B). Para la cepa Clásica los embriones se observaron hemorrágicos, más pequeños y sin plumas (Figura 7A). El hígado más necrótico.

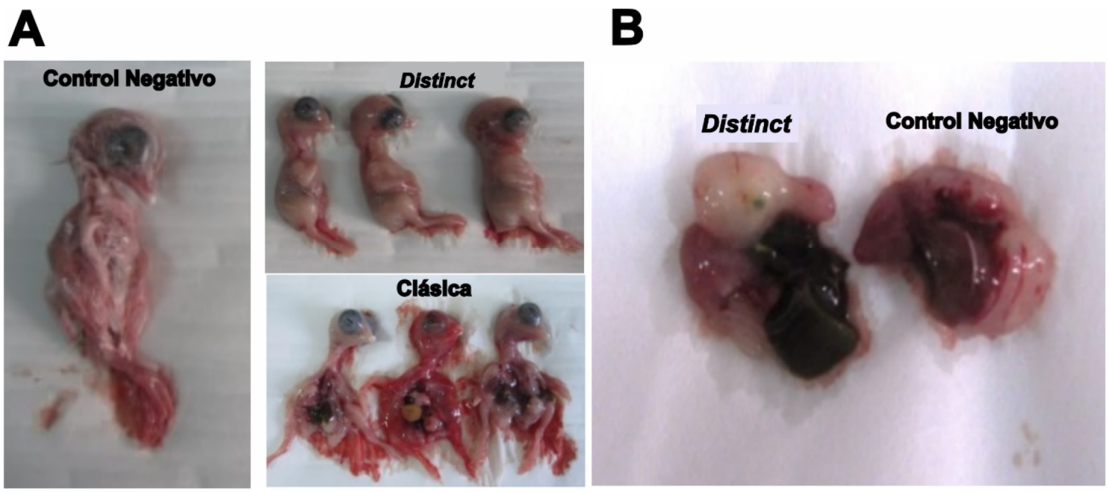


Figura 7- A) Lesiones producidas por las cepas *Distinct* y Clásica en embriones SPF. B) Hígado de ave infectada con la cepa *Distinct* e hígado de ave sin infectar (control negativo).

4.1.2.2 Titulación

La cepa *Distinct* y la cepa Clásica presentaron un título de $10^{3,8}$ $CEID_{50}$/mL y $10^{3,46}$ $CEID_{50}$/mL respectivamente (Tablas 1 y 2).

Tabla 1- Cálculo del título viral ($CEID_{50}$/mL) de la cepa *Distinct* en huevos embrionados SPF por el método de Reed and Muench.

		N° de embriones		Valor acumulado				
Log_{10} (Dilución)	Unidades de pruebas totales	Afectados	No afectados	Afectados[a]	No afectados[b]	Relación[c]	%	
-2	5	5	0	9	0	9/9	100	$10^{3,8}$ $CEID_{50}$/mL
-3	4	3	1	4	1	4/5	80	
-4	4	1	3	1	4	1/5	20	
-5	5	0	5	0	9	0/9	0	

[a]Sumatoria del número (N°) de embriones Afectados desde la mayor dilución a la menor. [b]Sumatoria de N° embriones No afectados desde la menor dilución a la mayor. [c]Relación de Valor acumulado Afectados: Total de Valor acumulado (Afectados+ No Afectados).

Tabla 2- Cálculo del título viral ($CEID_{50}$/mL) de la cepa Clásica en huevos embrionados SPF por el método de Reed and Muench.

		N° de embriones		Valor acumulado				
Log_{10} (Dilución)	Unidades de pruebas totales	Afectados	No afectados	Afectados[a]	No afectados[b]	Relación[c]	%	
-1	5	5	0	12	0	12/12	100	$10^{3,46}$ $CEID_{50}$/mL
-2	5	3	2	7	2	7/9	77,7	
-3	4	3	1	4	3	4/7	57,1	
-4	5	1	4	1	7	1/8	12,5	

[a]Sumatoria del número (N°) de embriones afectados desde la mayor dilución a la menor. [b]Sumatoria del número de embriones no-afectados desde la menor dilución a la mayor. [c]Relación del valor acumulado afectados: total de valor acumulado (afectados+ no Afectados).

4.1.2.3 Mortalidad y signos clínicos

Durante el ensayo de patogenicidad, no se registró mortalidad en ninguno de los tres grupos evaluados. Los signos clínicos comenzaron a manifestarse el segundo día posinfección en el grupo inoculado con la cepa *Distinct*, y al tercer día posinfección en el grupo inoculado con la cepa Clásica. Los signos observados en ambos grupos fueron muy similares e incluyeron depresión, postramiento y erizamiento de las plumas. Las aves mostraron un comportamiento más sedentario e inactivo de lo habitual, tendiendo a acurrucarse y cerrar los ojos (Figura 8). Estos signos clínicos persistieron aproximadamente tres días, tras los cuales las aves se recuperaron completamente.

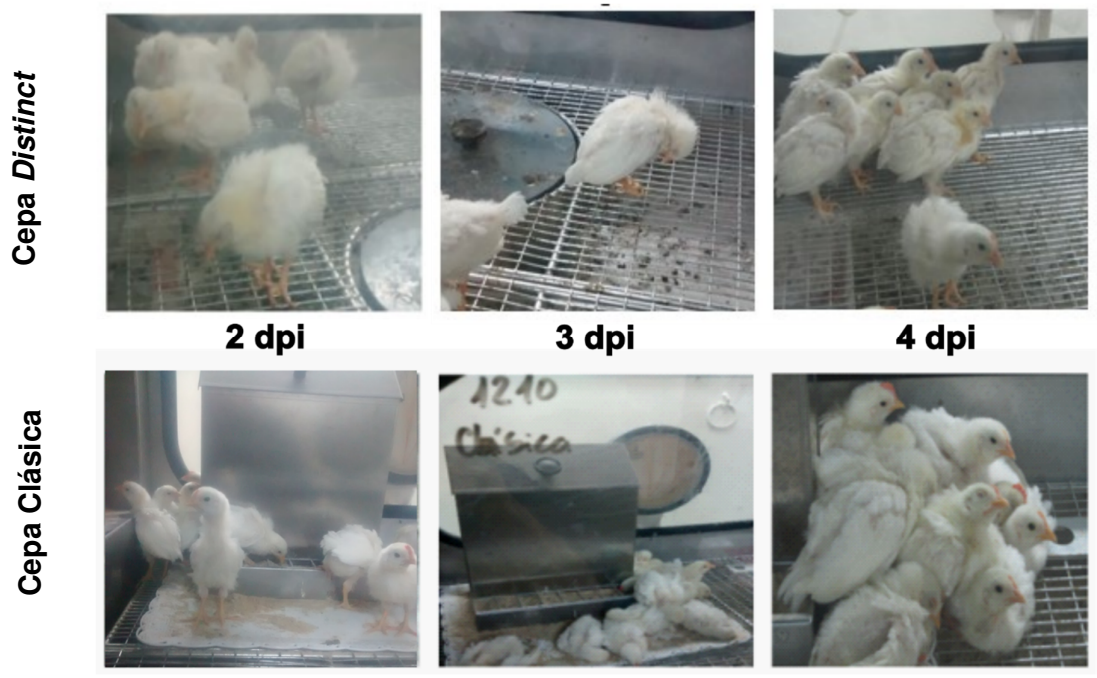


Figura 8- Signos clínicos observados en los días 2, 3 y 4 posinfección en las aves infectadas con la cepa *Distinct* (arriba) y en aves infectadas con la cepa Clásica (abajo).

4.1.2.4 Pesos y lesiones de órganos linfoides

Se registró el peso corporal, de la bursa de Fabricio y del bazo de cada ave del ensayo de patogenicidad (Tabla 3). La evolución del aspecto y tamaño de ambos órganos linfoides posinfección para los tres grupos puede observarse en la Figura 9.

Tabla 3- Peso corporal, peso de bursa de Fabricio y peso de bazo expresados en gramos (g) para cada ave de los tres grupos en los días 1, 2, 4, 7, 14 y 21 posinfección. Grupo control (C-), grupo infectado con la cepa 1210 (Clásica) y grupo infectado con la cepa 1/chicken/ARG/P33/15 (*Distinct*).

		Peso ave	Peso bursa	Peso bazo			Peso ave	Peso bursa	Peso bazo
1 dpi	C-	121,2	0,4	0,1	7dpi	C-	152,2	0,6	0,3
		121	0,6	0,2			165,1	0,8	0,3
		199,9	0,4	0,2			168,8	1,1	0,2
		119	0,5	0,1			177,1	0,9	0,2
		74,4	0,1	0,1			192,2	0,8	0,2
		138	0,5	0,3			183	1,1	0,2
	Clásica	123,2	0,5	0,1		Clásica	175,8	0,2	0,6
		97,8	0,2	0,1			204,7	0,3	0,6
		119,1	0,5	0,1			195,9	0,3	0,4
		122,5	0,5	0,1			144,9	0,2	0,4
		116,7	0,6	0,2			169,2	0,2	0,4
		111,5	0,3	0,1			157,4	0,3	0,3
	Distinct	107,3	0,5	0,1		*Distinct*	157,4	0,1	0,4
		116,7	0,6	0,1			172,9	0,3	0,4
		136,7	0,4	0,1			165,7	0,2	0,5
		98,4	0,3	0,1			192,5	0,2	0,4
		109,7	0,6	0,2			154,3	0,2	0,5
		119,2	0,4	0,1			159,4	0,2	0,4
2 dpi	C-	142,5	0,8	0,2	14 dpi	C-	342,7	2,7	0,8
		129,5	0,6	0,1			261,3	1,5	0,4
		158,5	0,9	0,1			243	1,4	0,6
		138,1	0,7	0,2			326,8	1,9	0,5
		108,3	0,4	0,1			330	1,8	0,5
		118,4	0,5	0,1			323	2,8	0,7
	Clásica	106,7	0,2	0,2		Clásica	223,3	0,4	0,5
		132	0,4	0,2			287,1	0,4	0,4
		118,8	0,4	0,2			222	0,5	0,3
		130,9	0,5	0,3			257,4	0,5	0,5
		135,8	0,8	0,3			278,3	0,3	0,7
		104,3	0,3	0,2			204,8	0,2	0,3
	Distinct	112,2	0,4	0,2		*Distinct*	250,6	0,2	0,4
		101,4	0,3	0,2			274,2	0,2	0,6
		124,1	0,3	0,2			238,6	0,2	0,6
		121,7	0,4	0,2			254,3	0,2	0,5
		128,5	0,3	0,3			257,7	0,1	0,3
		110,2	0,3	0,2			281,9	0,3	0,5
4 dpi	C-	113,4	0,4	0,1	21 dpi	C-	284,1	1,2	0,6
		139,1	0,6	0,1			356,7	1,5	0,5
		117,4	0,2	0,1			312,3	1,6	0,7
		146,5	0,7	0,2			408,6	2,8	0,8
		171,8	0,8	0,2			435,2	2,6	0,9
		134	0,5	0,2			463,4	2,7	1,1
	Clásica	142,2	0,6	0,5		Clásica	344,3	0,8	0,7
		152,9	0,6	0,4			336,8	1,1	0,7
		130	0,4	0,3			369,8	0,6	0,8
		156,1	0,3	0,4			382,7	0,9	0,7
		114,4	0,3	0,3			367,1	0,6	0,8
		143,6	0,3	0,4			352,3	0,7	0,6
	Distinct	137,8	0,4	0,4		*Distinct*	291,1	0,4	0,6
		162,5	0,3	0,5			326,7	0,6	0,6
		123,5	0,3	0,3			266,3	0,4	0,4
		152,8	0,3	0,5			373,2	0,5	0,7
		125,9	0,2	0,3			397,9	0,5	0,6
		144,5	0,2	0,3			396	0,9	0,8

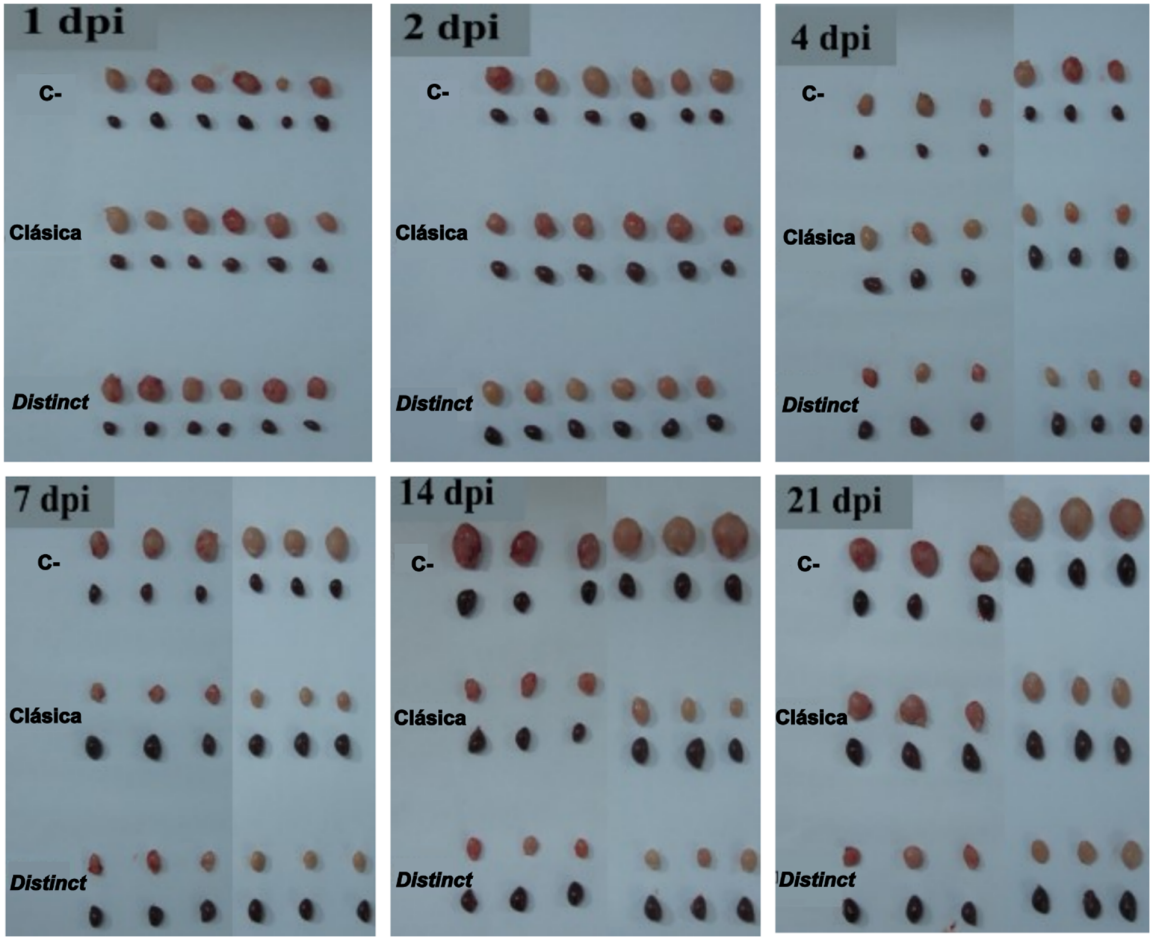


Figura 9- Registro fotográfico de aspecto y tamaño de la bursa de Fabricio y bazo para cada ave sacrificada de los tres grupos en los días 1, 2, 4, 7, 14 y 21 posinfección. Grupo control (C-), grupo infectado con la cepa 1210 (Clásica) y grupo infectado con la cepa 1/chicken/ARG/P33/15 (*Distinct*).

A partir del segundo día posinfección, la mediana del peso de la bursa de Fabricio en el grupo infectado con la cepa *Distinct* fue significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación con el grupo control (Tabla 3; Figuras 9 y 10). Se observó una diferencia significativa en la mediana del peso de la bursa de Fabricio entre el grupo control (C-) y el grupo infectado con la cepa Clásica en los días 7, 14 y 21 posinfección ($p < 0.05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos infectados (Clásica y *Distinct*) en ninguno de los días posinfección evaluados durante el ensayo de patogenicidad (Figura 10).

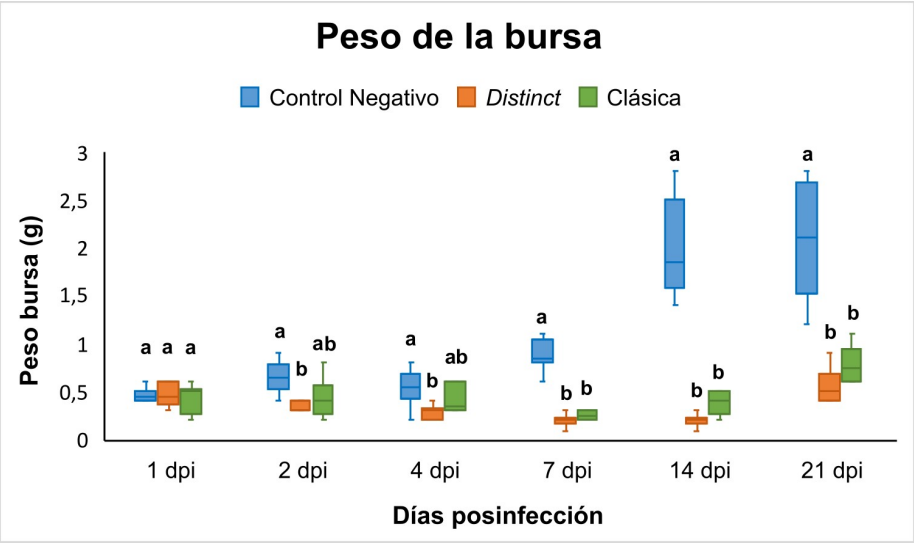


Figura 10- Peso de la bursa de Fabricio en gramos (g) de los tres grupos para los días 1, 2, 4 ,7 ,14 y 21 posinfección. Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos se indican con diferentes letras minúsculas.

En los días 2, 4 y 7 posinfección el peso del bazo en los grupos infectados fue mayor con respecto al grupo control (Tabla 3; Figuras 9 y 11). Siendo estadísticamente significativa la diferencia entre la mediana del peso del bazo del grupo control (C-) y los grupos infectados ($p < 0.05$). En ninguno de los días posinfección evaluados en el ensayo de patogenicidad se encontraron diferencias significativas entre los grupos infectados (Clásica y *Distinct*) (Figura 11).

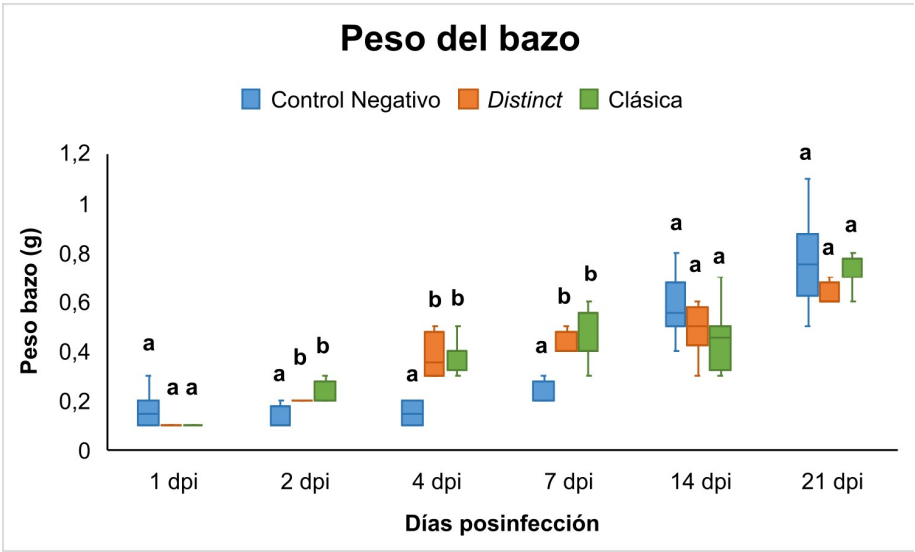


Figura 11- Peso del bazo en gramos (g) de los tres grupos para los días 1, 2, 4 ,7 ,14 y 21 posinfección. Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos se indican con diferentes letras minúsculas.

4.1.2.5 Índice bursa-peso corporal (BBWI) y relación bazo-peso corporal (SBW)

Los valores de BBWI y SBW de cada ave para cada grupo en los días 1, 2, 4, 7,14 y 21 posinfección, se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4- Valores de índice bursa-peso corporal (BBWI) y relación bazo-peso corporal (SBW) para cada ave de cada grupo en los días 1, 2, 4, 7, 14 y 21 posinfección. Grupo control (C-), grupo infectado con la cepa 1210 (Clásica) y grupo infectado con la cepa 1/chicken/ARG/P33/15 (*Distinct*).

	BBWI		**SBW**		
	Distinct	**Clásica**	**C-**	***Distinct***	**Clásica**
1 dpi	1,44	1,25	0,83	0,93	0,81
	1,59	0,63	1,65	0,86	1,02
	0,90	1,30	1,00	0,73	0,84
	0,94	1,26	0,84	1,02	0,82
	1,69	1,59	1,34	1,82	1,71
	1,04	0,83	2,17	0,84	0,90
2 dpi	0,74	0,39	1,40	1,78	1,87
	0,61	0,63	0,77	1,97	1,52
	0,50	0,70	0,63	1,61	1,68
	0,68	0,79	1,45	1,64	2,29
	0,48	1,22	0,92	2,33	2,21
	0,56	0,60	0,84	1,81	1,92
4 dpi	0,77	1,11	0,88	2,90	3,52
	0,49	1,04	0,72	3,08	2,62
	0,64	0,81	0,85	2,43	2,31
	0,52	0,51	1,37	3,27	2,56
	0,42	0,69	1,16	2,38	2,62
	0,37	0,55	1,49	2,08	2,79
7 dpi	0,12	0,22	1,97	2,54	3,41
	0,34	0,29	1,82	2,31	2,93
	0,24	0,30	1,18	3,02	2,04
	0,20	0,27	1,13	2,08	2,76
	0,25	0,23	1,04	3,24	2,36
	0,25	0,37	1,09	2,51	1,91
14 dpi	0,12	0,27	2,33	1,60	2,24
	0,11	0,21	1,53	2,19	1,39
	0,13	0,34	2,47	2,51	1,35
	0,12	0,30	1,53	1,97	1,94
	0,06	0,16	1,52	1,16	2,52
	0,16	0,15	2,17	1,77	1,46
21 dpi	0,26	0,43	2,11	2,06	2,03
	0,34	0,61	1,40	1,84	2,08
	0,28	0,30	2,24	1,50	2,16
	0,25	0,44	1,96	1,88	1,83
	0,23	0,30	2,07	1,51	2,18
	0,42	0,37	2,37	2,02	1,70

Las aves de los grupos infectados mostraron atrofia de la bursa de Fabricio a partir del día 7 posinfección, evidenciada por un índice bursa-peso corporal (BBWI) inferior a 0,7 en todas las aves de cada grupo (Tabla 4). Se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los grupos en el día 14 posinfección, donde el BBWI del grupo infectado con la cepa *Distinct* fue menor que el del grupo infectado con la cepa Clásica (Figura 12). Aunque en los días 2 y 4 posinfección el grupo infectado con la cepa *Distinct* presentó una mediana de BBWI inferior a 0,7, se registró un ave en cada uno de esos días con valores superiores a 0,7 (Tabla 4).

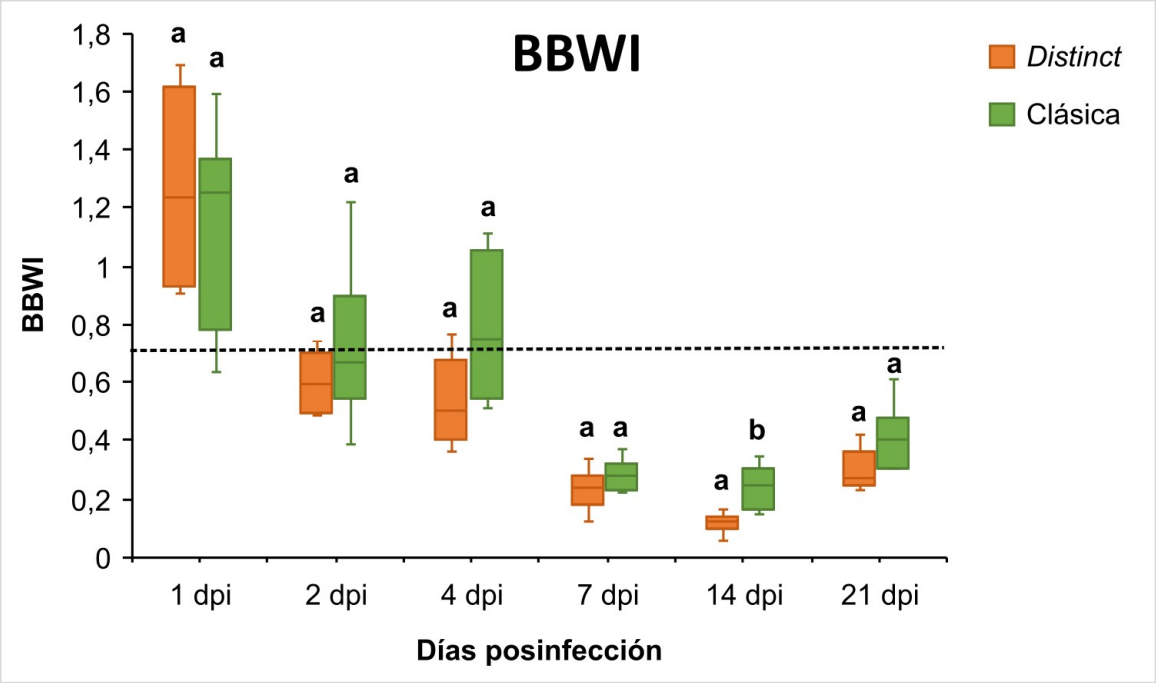


Figura 12- Índice bursa-peso corporal (BBWI) de los tres grupos para los días 1, 2, 4, 7, 14 y 21 posinfección. Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos se indican con diferentes letras minúsculas. La línea punteada representa el valor umbral para atrofia de la bursa de Fabricio.

En los días 2, 4 y 7 posinfección la relación bazo-peso corporal (SBW) de los grupos infectados fue significativamente mayor ($p < 0.05$) con respecto al grupo control (Tabla 4; Figura 13) Los grupos *Distinct* y Clásica no presentaron diferencias significativas en ninguno de los días evaluados en el ensayo de patogenicidad (Figura 13).

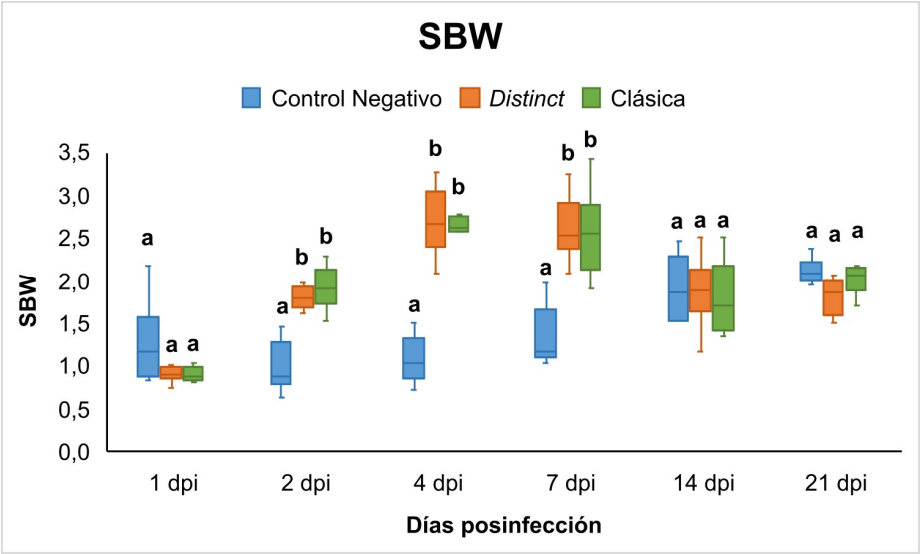


Figura 13- Relación bazo-peso corporal (SBW) de los tres grupos para los días 1, 2, 4, 7 ,14 y 21 posinfección. Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos se indican con diferentes letras minúsculas.

4.1.2.6 Histopatología

Se analizaron los valores de mediana del puntaje de depleción linfoide en bursa de Fabricio para cada grupo a distintos días posinfección (Tabla 5).

Tabla 5- Valor de mediana del puntaje de depleción linfoide en bursa de Fabricio para cada grupo en los días 1, 2, 4, 7, 14 y 21 posinfección.

	Puntaje de depleción linfoide en bursa de Fabricio		
	C-	***Distinct***	**Clásica**
1 dpi	1.00	1.00	1.00
2 dpi	1.00	3.83	2.50
4 dpi	1.00	3.67	3.83
7 dpi	1.00	3.34	3.83
14 dpi	1.00	2.50	2.67
21 dpi	1.00	2.50	2.67

Los grupos infectados mostraron depleción linfoide a partir del día 2 posinfección (Tabla 5). El mayor puntaje de depleción linfoide en las bursas de las aves infectadas con la cepa *Distinct* se registró el día 2 posinfección, siendo significativamente mayor ($p < 0.05$) que el observado en las aves infectadas con la cepa Clásica (Figura 14A). En el resto de los días analizados, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos infectados. El puntaje más alto de depleción linfoide en las bursas de las aves infectadas con la cepa Clásica se observó el día 4 posinfección (Tabla 5; Figura 14A). La depleción

linfoide observada en los días 7, 14 y 21 posinfección para los grupos infectados se presenta en la Figura 14B, donde se compara con el grupo control, que no mostró depleción linfoide en ninguno de los días evaluados.

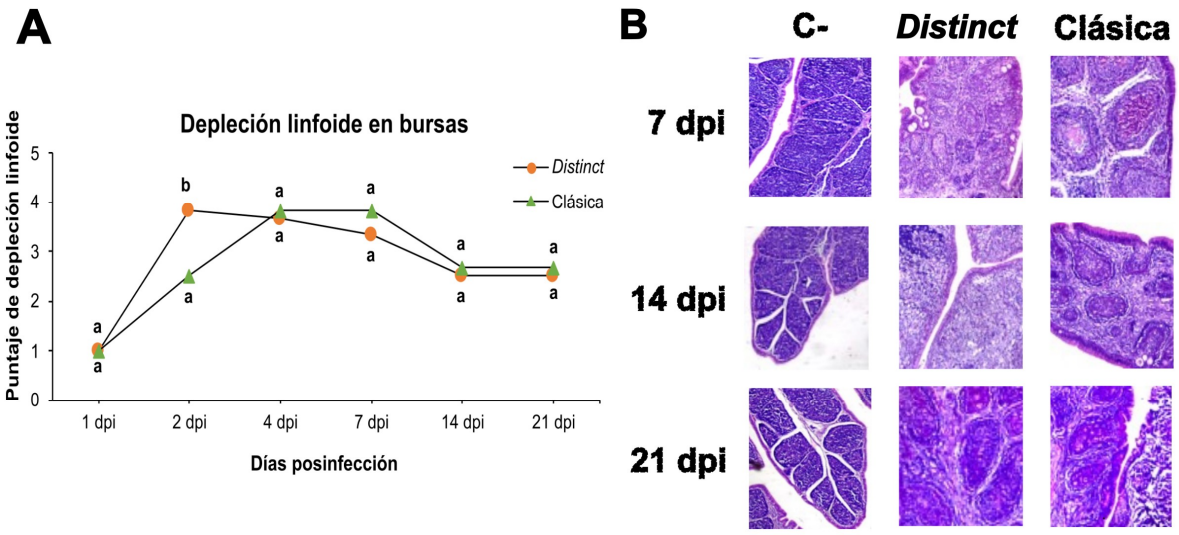


Figura 14- A) Mediana del puntaje de depleción linfoide para los dos grupos infectados (Clásica y *Distinct*) en los días 1, 2, 4, 7, 14 y 21 posinfección. Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos se indican con diferentes letras minúsculas. B) Imágenes de depleción linfoide en la bursa de las aves infectadas con la cepa Clásica y la cepa *Distinct*, así como del grupo control negativo, en los días 7, 14 y 21 posinfección.

4.1.2.7 Carga viral de IBDV en diferentes órganos linfoides.

Se cuantificó la carga viral de IBDV por RT-qPCR en la bursa de Fabricio, bazo y tonsilas cecales de cada ave sacrificada. Los grupos infectados por cepas *Distinct* y Clásicas presentaron la mayor carga viral, expresada en log $_{10}$ (copias de ARN/reacción), a los 2 días posinfección en todos los tejidos analizados, seguido de una disminución en los valores hasta los 21 días posinfección (Figura 15). No se detectó carga viral de IBDV en el grupo control en ninguno de los días posinfección evaluados. La bursa de Fabricio se identificó como el órgano linfoide con la carga viral más alta en todos los días posinfección analizados, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos infectados en los días 1 y 14. En esos días, la mediana de la carga viral de IBDV fue mayor en las aves infectadas con la cepa *Distinct* (Figura 15A). En el bazo, también se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos infectados en los días 1 y 7, siendo la mediana de la carga viral de IBDV más alta en el grupo de la cepa *Distinct* (Figura 15B). En las tonsilas cecales, la mediana de la carga viral de IBDV

fue mayor en el grupo infectado con la cepa *Distinct* en los días 2 y 7, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (Figura 15C).

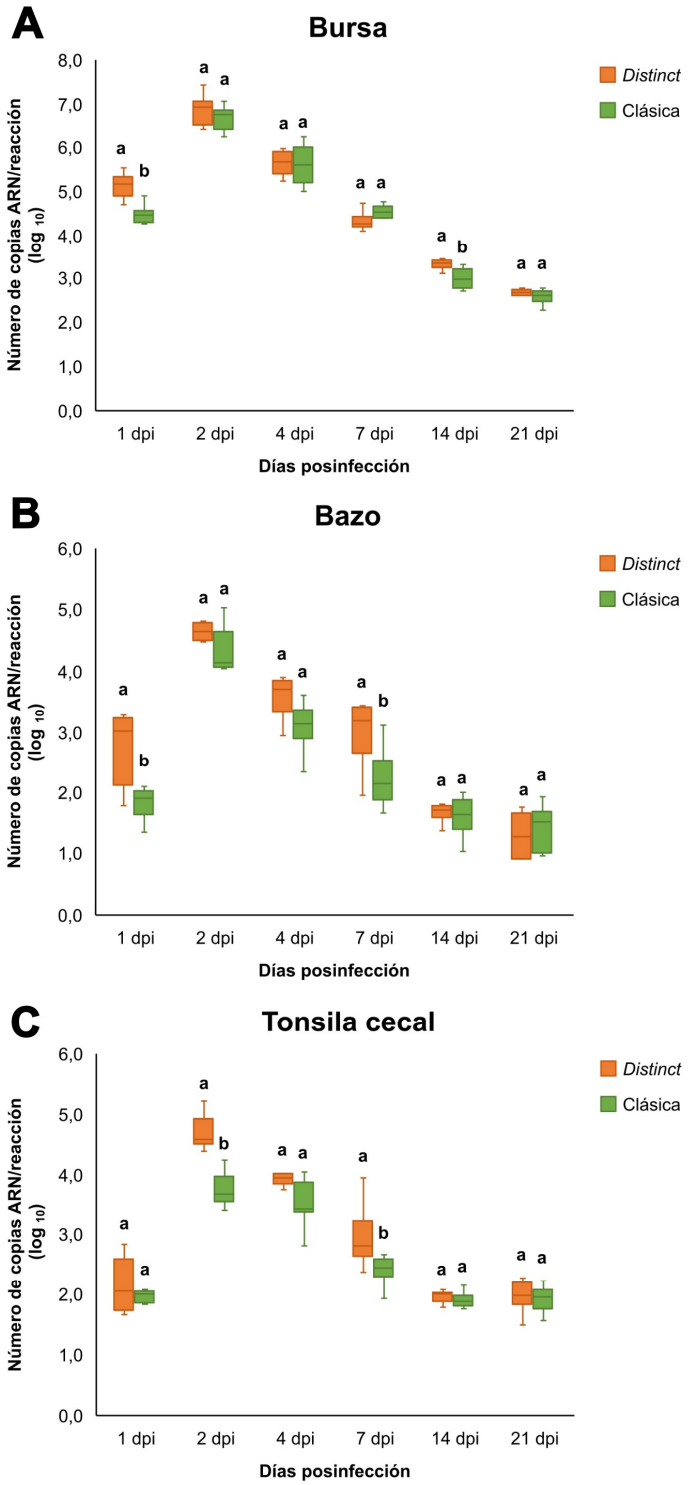


Figura 15- Carga viral de IBDV para los dos grupos infectados (Clásica y *Distinct*) en los días 1, 2, 4, 7, 14 y 21 posinfección. A) Bursa. B) Bazo. C) Tonsilas cecales. Los valores graficados corresponden a la mediana del log $_{10}$ (copias de ARN/reacción) obtenida de 6 aves para cada grupo. Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos se indican con diferentes letras minúsculas.

4.1.2.8 Dinámica de anticuerpos específicos anti-IBDV por ELISA

Los valores de S/P obtenidos en el ensayo de ELISA para cada ave de cada grupo en los días 1, 2, 4, 7, 14 y 21 posinfección, se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6- Valor de S/P obtenidos por el ensayo de ELISA para cada ave de cada grupo en los días 1, 2, 4, 7, 14 y 21 posinfección. Grupo control (C-), grupo infectado con la cepa 1/chicken/ARG/P33/15 (*Distinct*) y grupo infectado con la cepa 1210 (Clásica).

	S/P IDEXX		
	C-	***Distinct***	**Clásica**
1 dpi	0	0,00285714	0,02142857
	0	0,00142857	0,00857143
	0	0,00428571	0,00142857
	0	0,00142857	0,00285714
	0	0,00428571	0,01428571
	0	0,00571429	0,00142857
2 dpi	0	0,00714286	0,00142857
	0	0,00571429	0,00428571
	0	0,00285714	0,00857143
	0	0	0,00428571
	0	0,00857143	0,00285714
	0	0	0,00428571
4 dpi	0	0,01571429	0,03
	0	0,01285714	0,04142857
	0	0,02	0,00285714
	0	0,03	0,06
	0	0,03428571	0,04714286
	0	0,02714286	0,04714286
7 dpi	0	0,16428571	0,17
	0	0,26285714	0,26571429
	0	0,5	0,10571429
	0	0,36142857	0,48
	0	0,48571429	0,28142857
	0	0,29142857	0,54
14 dpi	0	0,33571429	0,21857143
	0	0,46285714	0,27857143
	0	0,90142857	0,22857143
	0	0,36571429	0,53857143
	0	0,24142857	0,61
	0	0,63857143	0,62
21 dpi	0	0,29714286	0,27428571
	0	0,49142857	1,00857143
	0	0,51714286	0,28714286
	0	0,39857143	1,15857143
	0	1,32285714	0,98
	0	0,58	0,51714286

Se detectaron anticuerpo anti-IBDV en aves infectadas con ambas cepas a partir del día 7 posinfección, con valores de S/P superiores a 0,2 (Figura 16). Sin embargo, fue solo a partir del día 14 posinfección que el 100% de las aves de ambos grupos resultaron seropositivas. En contraste, en el grupo control negativo no se detectaron anticuerpos anti-IBDV en ningún momento durante el seguimiento.

Se observaron diferencias significativas entre la mediana de S/P del grupo control (C-) y los grupos infectados (Clásica y *Distinct*) en los días 4, 7, 14 y 21 posinfección ($p < 0,05$) (Figura 16). No obstante, no se registraron diferencias significativas entre los grupos infectados en ninguno de los días evaluados.

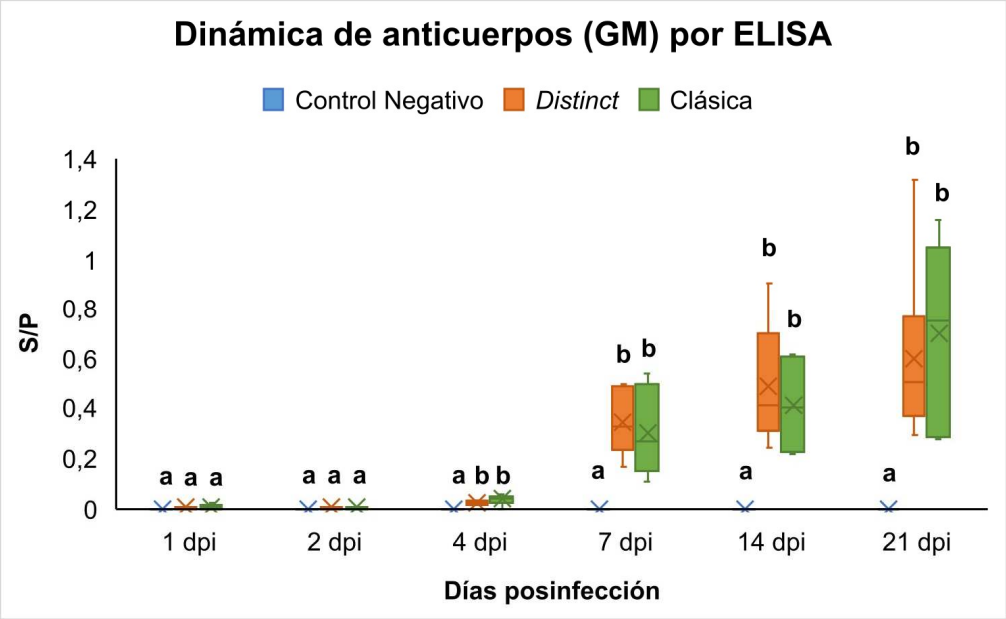


Figura 16- Valor S/P obtenidos por ELISA de los tres grupos para los días 1, 2, 4, 7 ,14 y 21 posinfección. Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos se indican con diferentes letras minúsculas. La línea punteada representa el valor de S/P de corte entre negativo y positivo.

4.1.2.9 Variantes intrahospedero

Se detectó variación genética intrahospedero en la secuencia codificante de VP2 (gen vp2) en las muestras analizadas. En ciertas posiciones, la frecuencia de las variantes fue superior al 10%. Las variaciones consistieron en cambios de un solo nucleótido que ocasionalmente alteran las secuencias de aminoácidos. No se detectaron variantes en los inóculos de cada cepa. En las Tablas 7 y 8 se especifican las variantes intrahospedero observadas para la cepa *Distinct* y la cepa Clásica en los días 2, 4, 7 y 14 posinfección. Se analizaron los seis animales de cada grupo (A-F), en los días 2, 4 y 7 posinfección. En el día 14 posinfección sólo se pudo amplificar VP2 completo en tres

animales infectados con la cepa *Distinct* (A, D y F) y en dos animales (B y C) infectados con la cepa Clásica.

Tabla 7- Variantes nucleotídicas detectadas en las muestras de bursas del grupo infectado con la cepa *Distinct* colectadas en los días 2, 4, 7 y 14 posinfección. Se denota la cobertura, la frecuencia, la posición en la secuencia codificante (CDS) de cada variante, así como si generan cambios en el codón y secuencia aminoacídica codificante.

Distinct		**Cambio**	**Cobertura**	**Frecuencia de variante**	**Posición CDS [a]**	**Número codón CDS**	**Cambio en el codón**	**Cambio aa**
2 dpi	**A**	C -> T	4985	82.1%	660	220	TAC -> TAT	No
	B	C -> T	2674	99.7%	660	220	TAC -> TAT	No
	C	C -> T	82431	100.0%	660	220	TAC -> TAT	No
	D	C -> T	97842	77.6%	660	220	TAC -> TAT	No
		T -> C	77615	10.1%	711	237	ATT -> ATC	No
	E	C -> T	5818	99.9%	660	220	TAC -> TAT	No
	F	C -> T	4039	92.5%	660	220	TAC -> TAT	No
4 dpi	**A**	C -> T	4147	97.0%	660	220	TAC -> TAT	No
	B	C -> T	3594	98.8%	660	220	TAC -> TAT	No
	C	C -> T	4189	100.0%	660	220	TAC -> TAT	No
	D	C -> T	3128	100.0%	660	220	TAC -> TAT	No
	E	C -> T	3508	98.7%	660	220	TAC -> TAT	No
	F	C -> T	2121	86.9%	660	220	TAC -> TAT	No
7 dpi	**A**	C -> T	4167	96.8%	660	220	TAC -> TAT	No
	B	C -> T	4167	97.7%	660	220	TAC -> TAT	No
	C	C -> T	3210	99.9%	660	220	TAC -> TAT	No
	D	C -> T	83274	94.5%	660	220	TAC -> TAT	No
	E	C -> T	1939	13.5%	110	37	ACT -> ATT	T -> I
		T -> C	1821	12.6%	176	59	TTT -> TCT	F -> S
		C -> T	1851	99.9%	660	220	TAC -> TAT	No
	F	C -> T	56530	50.8%	660	220	TAC -> TAT	No
14 dpi	**A**	C -> T	396	100.0%	660	220	TAC -> TAT	No
		C -> T	363	100.0%	713	238	ACA -> ATA	T -> I
		C -> T	520	10.0%	1073	358	GCA -> GTA	A -> V
	D	G -> T	17064	99.9%	172	58	GTC -> TTC	V -> F
		C -> T	23487	99.9%	660	220	TAC -> TAT	No
	F	C -> T	853	64.0%	660	220	TAC -> TAT	No
		C -> A	796	65.7%	756	252	GTC -> GTA	No

[a]Posición de IBDV gen vp2 perteneciente al segmento A según la cepa *Distinct* 1/chicken/ARG/P33/15 (MN313610).

Tabla 8- Variantes nucleotídicas detectadas en las muestras de bursas del grupo infectado con la cepa Clásica colectadas en los días 2, 4, 7 y 14 posinfección. Se indica la cobertura, la frecuencia, la posición en CDS de cada variante, así como si generan cambios en el codón y secuencia aminoacídica codificante.

Clásica		Cambio	Cobertura	Frecuencia de variante	Posición CDS [b]	Número codón CDS	Cambio en el codón	Cambio aa
2 dpi	A	C -> T	33773	11.1%	1083	361	TCC -> TCT	No
	B	C -> T	3821	19.1%	1083	361	TCC -> TCT	No
	C	C -> T	3821	18.1%	1083	361	TCC -> TCT	No
	D	G -> A	10358	12.5%	984	328	TCG -> TCA	No
		C -> T	9696	22.5%	1083	361	TCC -> TCT	No
	E	C -> T	2526	19.9%	1083	361	TCC -> TCT	No
	F	G -> A	32073	11.0%	984	328	TCG -> TCA	No
4 dpi	A	G -> A	3927	13.6%	984	328	TCG -> TCA	No
		C -> T	2452	41.2%	1083	361	TCC -> TCT	No
		T -> C	1783	23.2%	1299	433	AAT -> AAC	No
	B	G -> A	3073	15.4%	984	328	TCG -> TCA	No
		C -> T	1935	44.2%	1083	361	TCC -> TCT	No
	C	G -> A	4503	11.3%	984	328	TCG -> TCA	No
		C -> T	2575	43.1%	1083	361	TCC -> TCT	No
	D	G -> A	4383	12.2%	984	328	TCG -> TCA	No
		C -> T	2613	42.1%	1083	361	TCC -> TCT	No
	E	C -> T	817	41.4%	1083	361	TCC -> TCT	No
		G -> A	1333	10.4%	984	328	TCG -> TCA	No
	F	G -> A	3038	16.2%	984	328	TCG -> TCA	No
		C -> T	2278	34.0%	1083	361	TCC -> TCT	No
7 dpi	A	G -> A	4110	14.6%	984	328	TCG -> TCA	No
		C -> T	5542	14.8%	1083	361	TCC -> TCT	No
	B	C -> T	4891	30.4%	1083	361	TCC -> TCT	No
	C	G -> A	1390	16.0%	984	328	TCG -> TCA	No
		C -> T	1460	26.4%	1083	361	TCC -> TCT	No
	D	C -> T	34528	10.4%	1083	361	TCC -> TCT	No
	E	C -> T	15229	22.1%	1083	361	TCC -> TCT	No
	F	G -> A	2702	12.0%	984	328	TCG -> TCA	No
		C -> T	2557	23.6%	1083	361	TCC -> TCT	No
14 dpi	B	C -> T	489	42.1%	983	328	TCG -> TTG	S -> L
		C -> T	554	23.1%	1083	361	TCC -> TCT	No
		G -> A	485	13.0%	984	328	TCG -> TCA	No
	C	A -> G	86173	30.6%	550	184	ATT -> GTT	I -> V
		C -> T	24618	15.3%	1083	361	TCC -> TCT	No

[b]Posición de IBDV gen vp2 perteneciente al segmento A según la cepa Clásica 1210 (No publicada).

El análisis de las muestras infectadas con la cepa *Distinct* mostró que una de las variantes se detecta en todos los animales analizados en los días 2, 4, 7 y 14 posinfección. Dicha variante alcanza altas frecuencias (50,8 -100%) en la posición nucleotídica 660 (codón 220), y no genera cambio aminoacídico (Tabla 7).

En las muestras infectadas con la cepa Clásica se detecta una variante que está presente en todas las aves analizadas en los días 2, 4, 7 y 14 posinfección (excepción ave F del día 2 dpi). La variante se encuentra en la posición nucleotídica 1083 (codón 361) y no produce cambio aminoacídico. La frecuencia más baja de esta variante es de 10,4% y alcanza su valor máximo en el día 4 posinfección (34-44,2%) (Tabla 8).

4.1.3 Discusión

Las cepas *Distinct* fueron descritas como un nuevo linaje de IBDV en 2015 (Hernández et al., 2015) pero circulan en varios continentes desde hace más de 50 años (Shcherbakova et al., 1998; Kwon et al., 2000; Ikuta et al., 2001; Jackwood et al., 2001; Domanska et al., 2004; Jackwood y Sommer-Wagner, 2007; Ojkic et al., 2007; Jeon et al., 2009; Hernández et al., 2015; Vera et al., 2015; Michel y Jackwood, 2017; Yamazaki et al., 2017; Tomás et al 2019, 2020). Diversos análisis han demostrado que las cepas *Distinct* constituyen un grupo viral con características genéticas y antigénicas que las distinguen de las cepas tradicionales de IBDV (Domanska et al., 2004; Hernández et al., 2015; Tomás et al., 2019, 2020). Además, se ha reportado que las aves infectadas con cepas *Distinct* que circulan en Asia, Europa y Sudamérica presentan infecciones subclínicas (sin signos clínicos) y una notable atrofia de la bursa de Fabricio (Minta et al., 1985; Jeon et al., 2009; Yamazaki et al., 2017; Tomás et al., 2019). Estos estudios evaluaron la patogenicidad de las cepas *Distinct* en aves de entre 4 y 6 semanas de edad.

En este capítulo, optamos por evaluar la patogenicidad de una cepa *Distinct* argentina mediante infecciones controladas en aves de dos semanas de edad. Ya que se ha demostrado la presencia de estas cepas en aves muy jóvenes (Vera et al., 2015), y los estudios de patogenicidad de IBDV suelen llevarse a cabo en aves SPF de 2 a 3 semanas de edad (Saif y Fletcher, 2020). Además, seleccionamos la cepa Clásica (1210) como control de infección en nuestro ensayo, ya que representa otro genotipo de IBDV que circula en nuestro país y en la región (Hernández et al., 2015; Vera et al., 2015). Esto nos permite evaluar diferencias en la patogenicidad entre las cepas de ambos genotipos bajo las mismas condiciones experimentales. La dosis del inóculo utilizada fue de 10^2 $CEID_{50}$, adecuada para inducir efectivamente los signos clínicos y lesiones representativas de la enfermedad en aves de 2 semanas de edad. Es importante destacar que dosis más altas pueden generar resultados exagerados e irreales (Saif y Fletcher, 2020). Para simular una infección real por IBDV, se eligió la ruta de inoculación oral.

Durante el aislamiento de la cepa *Distinct* y la cepa Clásica, observamos que ambas afectan el crecimiento de los embriones, tal como se menciona en el estudio de Barrios et al. (2006). Sin embargo, se detectaron diferencias significativas en las lesiones provocadas. Las lesiones asociadas con la cepa Clásica 1210, que incluyen hemorragias cutáneas y necrosis hepática, son características de las cepas tradicionales de IBDV

inoculadas en la membrana corioalantoidea (Hitchner, 1970). En contraste, las lesiones inducidas por la cepa *Distinct* se caracterizan por edemas en los embriones y hígados rodeados de bilis similares a las observadas tras la inoculación de cepas variantes de IBDV en la misma membrana (Glisson et al., 2008).

Al analizar la patogenicidad de la cepa *Distinct* argentina en aves SPF de dos semanas de edad, no se registró mortalidad; sin embargo, se observaron signos clínicos en las aves infectadas a partir del 2 día posinfección (dpi). Esto contrasta con estudios anteriores que evaluaron la patogenicidad de estas cepas en aves de mayor edad (Minta et al., 1985; Jeon et al., 2009; Yamazaki et al., 2017; Tomás et al., 2019). Esta discrepancia podría atribuirse a diferencias en las condiciones experimentales, como la edad de las aves, la dosis viral y la vía de inoculación, variables que, según la OMSA, son fundamentales para comparar los resultados de los ensayos de patogenicidad.

Es relevante destacar que, aunque los signos clínicos observados en ambos grupos infectados fueron similares, se manifestaron antes en las aves infectadas con la cepa *Distinct* (Figura 8). Esta anticipación podría explicarse, en parte, por la mayor carga viral detectada en la bursa de Fabricio y el bazo a 1 dpi, así como en las tonsilas cecales a 2 dpi, en las aves infectadas con la cepa *Distinct*, en comparación con las aves infectadas con la cepa Clásica (Figura 15 A, B y C). En este contexto, Becht et al. (1980) propusieron que el desarrollo de los signos clínicos de IBDV se relaciona con la velocidad de replicación del virus en los linfocitos bursales. Así, la mayor carga viral observada en la bursa de Fabricio a 1 dpi en aves infectadas con la cepa *Distinct* podría correlacionarse con una manifestación clínica más temprana. Tanimura et al. (1995) concluyeron que la virulencia de las cepas de campo de IBDV se asocia con la producción de lesiones en órganos linfoides distintos a la bursa de Fabricio, así como con la distribución del antígeno en esos tejidos. De manera concordante, Tsukamoto et al. (1995) observaron altos títulos virales en la bursa de Fabricio entre 1 y 3 días después de la inoculación de la cepa de alta patogenicidad Ehime/91, además de un número elevado de células positivas al antígeno por inmunohistoquímica en otros órganos linfoides, como el bazo. En contraste, con la cepa de baja patogenicidad J1, solo se detectó de manera significativa el antígeno viral en la bursa. Estos hallazgos sugieren que las diferencias en la replicación viral en diversos tejidos linfoides están estrechamente relacionadas con la patogenicidad de las cepas de IBDV, lo que resalta la importancia de investigar no solo

la bursa de Fabricio, sino también otros órganos linfoides en el estudio de esta enfermedad.

Las infecciones por cepas Clásicas de IBDV provocan un aumento en el tamaño y peso de la bursa de Fabricio entre los días 2 y 6 posinfección, debido a edema e hiperemia, seguido de atrofia a partir del día 7 (Cheville, 1967). En contraste, las cepas variantes de IBDV no inducen inflamación, resultando en una atrofia más rápida (Sharma et al., 1989; Snyder, 1990). En nuestro estudio, tanto la cepa *Distinct* como la cepa Clásica mostraron un comportamiento similar al de las cepas variantes, sin incremento en el tamaño y peso de la bursa. El peso de la bursa de las aves infectadas con la cepa *Distinct* fue significativamente menor que el del grupo control desde el día 2 posinfección (Figuras 9 y 10), y no se observaron diferencias significativas entre los grupos infectados en los días evaluados. Esto sugiere que las aves infectadas con la cepa Clásica tampoco mostraron aumento en el tamaño y peso de la bursa, lo cual coincide con un reporte previo que indica que una cepa con características antigénicas clásicas presenta un comportamiento patológico similar al de las cepas variantes (Banda et al., 1999).

El análisis del índice bursa-peso corporal (BBWI) mostró que las cepas *Distinct* y Clásica indujeron atrofia de la bursa de Fabricio a partir del 7 día posinfección, evidenciada por un índice bursa-peso corporal (BBWI) inferior a 0,7 en todas las aves de cada grupo (Tabla 4; Figura 12). Las cepas Clásicas de IBDV que infectan aves SPF de dos semanas generan atrofia de la bursa entre los días 5 y 8 posinfección, lo que respalda nuestros hallazgos (Sharma et al., 1989; Hassan et al., 1996). Ambas cepas mostraron un impacto similar en el índice bursa-peso corporal (BBWI) durante la mayoría de los días analizados; sin embargo, en el día 14 posinfección, la atrofia de la bursa fue significativamente mayor en el grupo infectado con la cepa *Distinct* en comparación con el grupo infectado con la cepa Clásica (Figura 12). Este resultado sugiere que la cepa *Distinct* podría tener un efecto más severo en la atrofia bursal en comparación con la cepa Clásica en etapas posteriores de la infección, lo que podría correlacionarse con la carga viral detectada en la bursa en el día 14 posinfección, que fue superior en las aves infectadas con la cepa *Distinct* (Figura 15A).

Aunque el grupo infectado con la cepa *Distinct* mostró una mediana de BBWI inferior a 0,7 en los días 2 y 4 posinfección, se registró un ave en cada uno de esos días con valores superiores a 0,7. Esto sugiere que, a pesar de la tendencia general hacia la atrofia de la bursa, algunas aves presentaron variabilidad en su respuesta al proceso

infeccioso. Los valores de BBWI inferiores a 0,7 en 5 de las 6 aves infectadas con la cepa *Distinct* podrían indicar un comportamiento similar al de cepas variantes, las cuales han evidenciado atrofia de la bursa entre los días 3 y 4 posinfección en aves SPF de dos semanas de edad (Sharma et al., 1989; Hassan et al., 1996).

Para validar esta hipótesis, sería necesario realizar nuevos experimentos con un mayor número de aves y evaluar si efectivamente se produce atrofia bursal en los días 2 y 4 posinfección tras la inoculación con la cepa *Distinct.* Aunque no se observaron diferencias significativas con la cepa Clásica en esos días, la tendencia sugiere un inicio más temprano de la atrofia bursal, lo que justificaría un estudio adicional. Además, los puntajes de histopatología de la bursa respaldan la agresividad de la cepa *Distinct* en este órgano, mostrando que el pico de depleción linfoide ocurrió más tempranamente en comparación con la cepa Clásica. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la depleción linfoide entre ambos grupos en los días posteriores (Figura 14A y B).

En el caso del bazo, la influencia de ambas cepas fue similar, sin diferencias significativas en el peso ni en la relación SWB en ninguno de los días analizados. Ambas cepas provocaron esplenomegalia entre los días 2 y 7 posinfección (Figuras 11 y 13). Estudios previos han reportado que diferentes cepas de IBDV inducen esplenomegalia a partir de las 36 horas posinfección, alcanzando un pico en la relación SWB a los 6 días, seguido de una disminución (Lupini et al., 2020; Li et al., 2023).

En este estudio, evaluamos y comparamos la distribución, carga y persistencia de la cepa *Distinct* en relación con la cepa Clásica en varios tejidos linfoides, incluyendo la bursa de Fabricio, el bazo y las tonsilas cecales, ya que, como discutimos anteriormente, estas variables están estrechamente relacionadas con la patogenicidad de las cepas de IBDV. Ambas cepas fueron detectadas en los tres tejidos desde el día 1 posinfección hasta el final del ensayo, a los 21 días posinfección. La bursa presentó la mayor carga viral, y en los tres tejidos, esta fue más alta a los 2 días posinfección. Estos hallazgos son consistentes con estudios anteriores que reportan una mayor carga viral en la bursa en comparación con otros órganos linfoides analizados (Abdul et al., 2013; Jayasundara et al., 2017; Aliyu et al., 2022) y con el informe de Jayasundara et al. (2017), en el que se analizó una cepa variante de IBDV en aves infectadas a las dos semanas de vida, detectando ARN de IBDV en los tres tejidos linfoides desde el día 3 hasta el día 28 posinfección. Aunque no se evaluaron los días 1 y 2, se encontró que la mayor carga

viral se presentaba a los 3 dpi, y a partir de ese momento, se observó un decrecimiento en la carga viral.

Es importante señalar que se registraron cargas virales más altas de la cepa *Distinct* en la bursa de Fabricio a los días 1 y 14 posinfección, en el bazo a los días 1 y 7, y en las tonsilas cecales a los días 2 y 7 (Figura 15A, B y C). Estos resultados sugieren que la cepa *Distinct* podría tener una mayor eficiencia de replicación en comparación con la cepa Clásica, o que la respuesta antiviral del hospedador es menos efectiva frente a la cepa *Distinct*. En este sentido, se ha reportado que un retraso en la respuesta antiviral en aves puede explicar la atrofia bursal más temprana observada en aves infectadas con la cepa ITA (Genotipo G6), así como la mayor carga viral detectada en los órganos linfoides en comparación con la cepa clásica G1a (Silveira et al., 2019). Esto puede ser un punto importante para explorar en futuras investigaciones con la cepa *Distinct*, ya que la eficacia de la respuesta inmune puede influir en la patogenicidad y la dinámica de la infección.

En relación con la respuesta de anticuerpos a la infección, los resultados mostraron que no existen diferencias significativas en la respuesta humoral entre los grupos infectados. Se detectó una respuesta de anticuerpos a partir del día 7 en 5 de las 6 aves infectadas con la cepa *Distinct* y en 4 de las 6 aves infectadas con la cepa Clásica. Asimismo, el 100% de las aves de ambos grupos se volvieron seropositivas a partir del día 14 posinfección, manteniendo esta seropositividad hasta el final del experimento.

Este hallazgo es consistente con el patrón observado tras la vacunación con vacunas vivas atenuadas de IBDV, las cuales se aplicaron a las dos semanas de vida del ave, que inducen títulos significativos a los 7 días posinfección, con incrementos hasta los 28 días posinfección en pollos SPF (Jakka et al., 2014). Además, se alinea con los resultados obtenidos en estudios en los que se infectaron aves de dos semanas con cepas clásicas y variantes, donde se detectaron anticuerpos anti-IBDV entre los días 5 y 7 posinfección, con incrementos hasta los días 25 y 28 posinfección (Sharma et al., 1989; Jayasundara et al., 2017).

El análisis de las variantes intrahospedero del gen VP2 de IBDV en todas las aves infectadas con las cepas *Distinct* y Clásica reveló una baja variabilidad (Tablas 7 y 8). Este hallazgo es significativo, dado que en patógenos con alta tasa de mutación como IBDV se esperaría una mayor diversidad de variantes. Sin embargo, se identificó una

variante en todas las aves infectadas con la cepa *Distinct* y otra en todas las aves infectadas con la cepa Clásica, que requieren estudios adicionales. Aunque estas variantes no generan cambios aminoacídicos, su persistencia sugiere que podrían estar asociadas con características fenotípicas específicas de la enfermedad.

En resumen, este estudio profundizó en la patogenicidad de la cepa *Distinct* de IBDV en aves jóvenes, revelando características distintivas en comparación con la cepa Clásica. A pesar de no registrarse mortalidad, la aparición más temprana de signos clínicos, la atrofia bursal más marcada y la mayor carga viral observada en los tejidos linfoides de las aves infectadas con la cepa *Distinct* indican un potencial de virulencia significativo. Estos hallazgos subrayan la necesidad de un seguimiento constante de las cepas *Distinct* en la avicultura, con el fin de mejorar las estrategias de control y prevención de la enfermedad.

4.2. Capítulo 2

Diagnóstico de virus inmunosupresores y caracterización primaria de cepas de IBDV

4.2.1. Metodología

4.2.1.1. Muestras

Se analizaron 20 muestras de pollos uruguayos que presentaban signos clínicos sugerentes de inmunosupresión, las cuales fueron colectadas entre 2019 y 2023 de granjas avícolas localizadas en el departamento de Canelones. Este departamento alberga una gran parte de la producción avícola del país, concentrando una proporción significativa de las granjas y plantas de faena de Uruguay. Para el diagnóstico de IBDV, se utilizó la bursa de Fabricio. También se procesaron muestras para la detección de otros virus inmunosupresores, como CAV y MDV. Para el diagnóstico de CAV, se emplearon la bursa de Fabricio, el timo y las tonsilas cecales, mientras que para el diagnóstico de MDV se analizaron el bazo y el folículo piloso. El procesamiento del material biológico fue realizado por veterinarios especialistas en avicultura que colaboran con nuestro grupo de trabajo. Las muestras se enviaron al laboratorio con la documentación correspondiente y se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento.

4.2.1.2. Extracción de ácidos nucleicos y transcripción reversa

La extracción de ácidos nucleicos y la transcripción reversa se realizaron según lo detallado en la sección 4.1.1.6 del capítulo anterior.

4.2.1.3. Diagnóstico de IBDV

El diagnóstico de IBDV fue realizado a partir de ADNc con una metodología de qPCR diseñada por nuestro laboratorio (Techera et al., 2019) (Tabla 9). En todos los casos se utilizó como control interno un ensayo previamente diseñado en el laboratorio que amplifica una región de la beta actina aviar (Tesis de Maestría Ana Marandino) (Tabla 9).

Además, a cada muestra se le realizó el diagnóstico por qPCR de CAV y MDV (Tabla 9).

Tabla 9- Cebadores y sondas utilizadas en las reacciones de PCR en tiempo real para la detección de IBDV, CAV y MDV y para el gen de la beta actina aviar.

Virus	Gen diana	Cebadores y sonda	Secuencia 5'→3'	Referencia
IBDV	VP5-VP2	F143	CMAGATCAAACCCAACAGATTGT	Techera et al. (2019)
		R253	CTCTGACCTGAGAGTGTGCTTCTC	
		S175	FAM-ACGGAGCCT-ZEN-TCTGATGCCAACAACC-IBFQ	
CAV	VP2-VP3	CAV-F630	ACGCTAAGATCTGCAACTG	Techera et al. (2019)
		CAV-R756	TTACCCTGTACTCGGAGG	
		CAV-Pb	HEX-CAAGCCTCC-ZEN- CTCGAAGAAGC-3IABkFQ	
MDV	pp38	MDV_qF_pp38	CGCATACCGACTTTCGTCAA	Baigent et al. (2016)
		MDV_qR_pp38	GAGCTAACCGGAGAGGGAGA	
		MDV_Pb_pp38	FAM-GCTACCGCCTGAGCC-BHQ1	
	β actina aviar	β-act Fw	GAGAAATTGTGCGTGACATCA	Tesis Maestría Ana Marandino (2013)
		β-act Rv	CCTGAACCTCTCATTGCCA	
		β-act Pb	FAM-TGCTCGAAA-ZEN-TCCAGTGCGACGTAG-3IABkFQ	

4.2.1.4. Caracterización genética de IBDV

Todas las muestras positivas para IBDV fueron sometidas a una caracterización genética parcial mediante la amplificación por RT-PCR, secuenciación y análisis de 492 pb correspondientes a la región hipervariable de VP2. Esta región se extiende desde la posición nucleotídica 736 hasta la posición 1227 del Segmento A (AY029166). La amplificación fue realizada con la enzima *Immolase DNA polymerase del ImmoMix™* (Meridian Bioscience) y los cebadores P3 y P4 previamente publicados (Liu et al., 1998). Las concentraciones de los reactivos utilizados en la reacción de PCR y las condiciones de ciclado se detallan en las Tablas 10 y 11, respectivamente.

Tabla 10- Concentraciones de los reactivos de la reacción de PCR en tiempo final para el amplicón P3-P4.

Reactivos	Co	Cf	Vo/tubo (µL)
H2O			5.9
ImmoMix™	2×	1×	7.5
Cebador P3	10 µM	0.2 µM	0.3
Cebador P4	10 µM	0.2 µM	0.3
ADNc			1

Tabla 11- Protocolo de ciclado de la reacción de PCR en tiempo final para el amplicón P3-P4.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	1
Desnaturalización	95°C	30 segundos	35
Hibridación	56°C	30 segundos	
Extensión	72°C	40 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

4.2.1.5. Visualización y purificación de los productos de PCR

La visualización y purificación de los productos de PCR se realizó según lo detallado en la sección 4.1.1.9.2 del capítulo anterior.

4.2.1.6. Secuenciación

Las purificaciones se secuenciaron en ambas direcciones de forma automática en MACROGEN (https://dna.macrogen.com).

4.2.1.7. Edición y alineamiento de secuencias nucleotídicas

Las secuencias obtenidas se ensamblaron y editaron con el programa *SeqMan* del paquete *Lasergene 7.0 (DNASTAR).* Los alineamientos se realizaron con el algoritmo *MUSCLE* del programa MEGA versión 7 e incluyeron las secuencias obtenidas en este trabajo, secuencias de referencia del serotipo 2 y de todos los genogrupos descritos hasta la fecha (Michel y Jackwood, 2017; Wang et al.,2021; Legnardi et al., 2022) disponibles en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.2.1.8. Determinación de secuencias recombinantes

Para determinar la presencia de recombinantes en el conjunto de secuencias obtenidas en este trabajo se utilizó el programa RDP4 (*Recombination Detection Program*). Este programa integra siete algoritmos (RDP, Bootscann, MaxChi, Chimaera, GeneConv, Sis-scan y 3seq) que detectan las secuencias recombinantes, las hipotéticas secuencias parentales y los sitios de recombinación. Los algoritmos se basan en dos tipos de metodologías: i- métodos filogenéticos (RDP y Bootscan) que comparan árboles filogenéticos 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, Sis-scan y 3seq) que determinan en las secuencias nucleotídicas un agrupamiento de sustituciones que se ajuste a una distribución estadística esperada.

Para el análisis se utilizaron los parámetros por defecto y se asumió un evento de recombinación si es detectado por al menos cuatro métodos.

4.2.1.9. Análisis filogenético

Se determinó el modelo de sustitución del alineamiento mediante el paquete *jModelTest* (Posada, 2008). Este dato se empleó para inferir árboles filogenéticos con el método de máxima verosimilitud implementado en el servidor http://www.phylogeny.fr/. Para obtener el nivel de significancia de las ramas de los árboles filogenéticos se aplicó el método de aLRT (*approximate likelihood ratio test*). Las filogenias se visualizaron usaron la herramienta online iTOL v4 (Letunic y Bork, 2016).

4.2.2. Resultados

4.2.2.1. Diagnóstico de muestras de campo

La metodología de diagnóstico de qPCR detectó el genoma viral de IBDV en 18 de las 20 muestras uruguayas provenientes de animales con signos clínicos sugerentes de inmunosupresión (Tabla 12). En todas las muestras negativas se amplificó el control interno y fueron positivas para CAV.

El 44% de las muestras positivas para IBDV también fueron positivas para CAV o MDV (Tabla 12).

4.2.2.2. Caracterización genética de las muestras positivas para IBDV

En todas las muestras uruguayas, diagnosticadas como positivas para IBDV por qPCR (Tabla 12) se amplificó el fragmento esperado de 492 pb correspondientes a la región hipervariable de VP2. El amplicón de cada muestra fue purificado y secuenciado bidireccionalmente.

Tabla 12- Muestras uruguayas positivas para IBDV por PCR en tiempo real. Se detalla el nombre de la muestra, el año en que fue la colecta, tipo de ave, la edad del animal y la presencia de CAV y MDV.

Muestra	Año de colecta	Tipo de ave	Edad	CAV/MDV
031901	2019	Parrilleros	21 días	CAV
451901	2019	Parrilleros	25-28 días	-
471901	2019	Parrilleros	21 días	-
471902	2019	Parrilleros	28 días	-
352001	2020	Parrilleros	ND	CAV
222201	2022	Parrilleros	ND	CAV
222202	2022	Parrilleros	ND	-
442201	2022	Parrilleros	ND	-
442202	2022	Parrilleros	ND	-
462204	2022	Parrilleros	ND	-
032301	2023	Ponedoras	17 días	MDV
042301	2023	Ponedoras	24 días	MDV
232302	2023	Parrilleros	ND	-
232303	2023	Parrilleros	ND	CAV
232304	2023	Parrilleros	ND	-
262301	2023	Parrilleros	ND	CAV
262302	2023	Parrilleros	ND	-
262303	2023	Parrilleros	ND	CAV

ND: no disponible.

Previo a la realización de los análisis filogenéticos se implementó una búsqueda de secuencias recombinantes con el programa RDP4. En el análisis se incluyeron todas las

secuencias obtenidas en este trabajo, secuencias de referencia para los nueve genogrupos (A1-A9) descritos hasta la fecha en base a la región hipervariable de VP2 (Michel y Jackwood, 2017; Wang et al., 2021; Legnardi et al., 2022) y secuencias del serotipo 2 (Anexo 1a). En ninguna de las cepas analizadas se encontró evidencia de recombinación mediante estos análisis, por lo que fueron utilizadas para análisis filogenéticos.

El análisis filogenético realizado con la región hipervariable de VP2 evidenció que las secuencias del serotipo 1 se agrupan en los nueve genogrupos descritos anteriormente (A1-A9), mientras que las cepas del serotipo 2 (AII) ocuparon una posición basal (Figura 17)

Las cepas uruguayas agruparon en tres de los nueve genogrupos: A1(cepas clásicas), A4 (cepas *Distinct*) y A8 (cepas clásicas atenuadas) (Figura 17).

Las cepas uruguayas 031901, 451901, 471901 y 471902 se encuentran dentro del genogrupo A4, presentando una alta identidad nucleotídica (99.2% -100%) con cepas *Distinct* sudamericanas identificadas entre 2010 y 2016 (Figura 17).

Las cepas uruguayas 032301 y 042301 forman parte de las cepas clásicas atenuadas (A8) y presentan un porcentaje de identidad del 100% con la cepa vacunal D78.

Las restantes cepas uruguayas secuenciadas en este trabajo se agrupan con cepas clásicas del genogrupo A1, y tienen un porcentaje de identidad del 100% con la cepa vacunal Winterfield-2512.

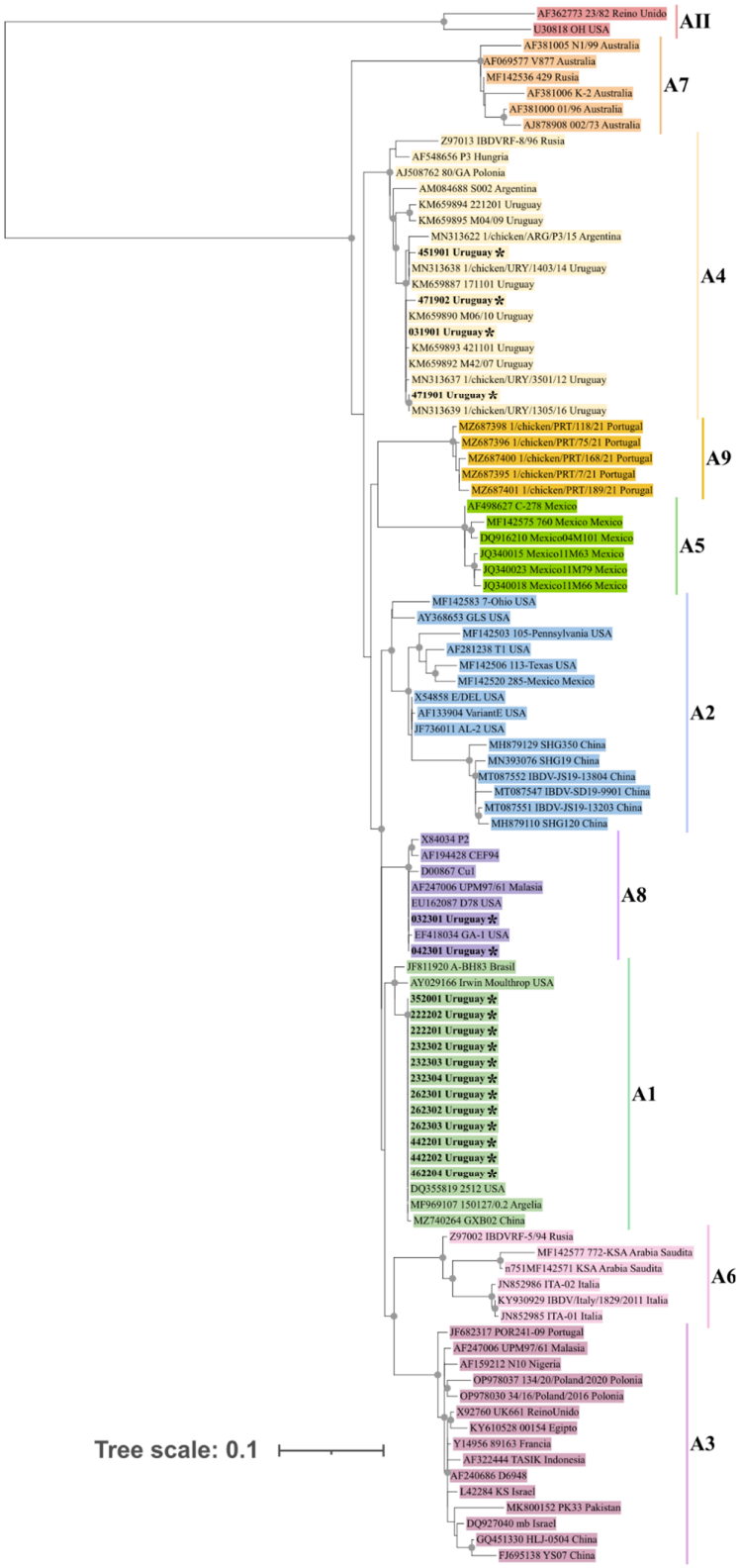


Figura 17- Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en un fragmento de 492 pb de la región hipervariable de VP2. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el GTR+I+G. Las secuencias del serotipo 2 (AII) y los genogrupos del serotipo 1 se indican con nombres (A1-A9) y colores. Los nodos con valores de soporte de aLRT superiores a 0,7 están marcados con círculos grises. Las secuencias obtenidas en este trabajo se indican en negrita y con un asterisco.

4.2.3. Discusión

Durante la primera parte de este estudio se trabajó en la identificación de casos positivos de IBDV por RT-qPCR para su posterior caracterización por secuenciación. El diagnóstico clínico de IBDV es desafiante dadas las diferentes presentaciones que van desde manifestaciones no aparentes o sutiles hasta graves con altas tasas de mortalidad, y la frecuente ocurrencia de coinfecciones con otros patógenos que dificultan los signos característicos de la enfermedad (Eregae et al., 2014). Por lo que la utilización de una metodología diagnóstica basada en qPCR, caracterizada por su alta sensibilidad y especificidad, es un instrumento extremadamente valioso para la industria avícola ya que permite un diagnóstico definitivo y rápido de la enfermedad. Por esta razón, fue utilizada una metodología de qPCR diseñada y estandarizada por nuestro laboratorio (Techera et al., 2019) para el diagnóstico específico de IBDV en muestras de animales con signos clínicos sugerentes de inmunosupresión.

La aplicación de esta metodología reveló que el genoma de IBDV estaba presente en el 90% de las muestras analizadas. Las dos muestras negativas para IBDV, fueron positivas para CAV. Este virus como vimos en la introducción también afecta el sistema inmunológico de las aves (Adair et al., 2000; Miller y Schat, 2004), lo que explicaría los signos clínicos de inmunosupresión observados en las muestras negativas para IBDV.

Un alto porcentaje (44%) de las muestras positivas para IBDV presentaron coinfección con otro agente viral inmunosupresor (CAV o MDV). Este tipo de coinfecciones ya han sido previamente reportados en muestras de campo (Techera et al., 2019; Li et al., 2020; Luan et al., 2022; Cheng et al., 2024) Las infecciones inmunosupresoras, como las producidas por estos virus, causan una depleción de linfocitos en los pollos, lo que resulta en un aumento de la susceptibilidad a diversos patógenos virales y bacterianos. Además, las infecciones por estos virus afectan la protección generada por la vacunación. Si un ave es vacunada contra un patógeno y está previamente infectado con un agente inmunosupresor, se verá disminuida la respuesta inmune generada por la vacunación contra ese patógeno. Esto explica que los virus inmunosupresores como IBDV, CAV y MDV se encuentran con frecuencia como coinfecciones en la industria avícola (Zeng et al., 2015).

En ninguna de las cepas uruguayas secuenciadas en este trabajo se encontró evidencia de recombinación en la región hipervariable de VP2. La recombinación homóloga es uno de los mecanismos relevantes en la generación de variabilidad en IBDV. Se han

reportado eventos de recombinación en ambos segmentos de IBDV entre cepas de campo (Jackwood, 2012) y entre cepas de campo y vacunales (Hon et al., 2008; He et al., 2009; Wu et al., 2020; Feng et al., 2022). El punto de recombinación (*breakpoint*) puede ocurrir en la región hipervariable de VP2 (Jackwood, 2012) o en otras regiones genómicas de IBDV (He et al., 2009; Wu et al., 2020). En base a nuestros análisis sólo podemos afirmar que las cepas uruguayas de IBDV secuenciadas en este trabajo no presentan un *breakpoint* en la región hipervariable de VP2. No podemos descartar la posibilidad de que ocurra recombinación en estas cepas en otras regiones genómicas de IBDV.

Las cepas uruguayas agrupadas en el genogrupo A4 se asociaron con cepas *Distinct* previamente reportadas en Uruguay y Argentina (Tomás et al., 2020). Presentan en la región hipervariable de VP2 los marcadores aminoacídicos T272, P289, I290 y F296 característicos del genogrupo *Distinct* (A4) (Vera et al., 2015; Tomás et al., 2020).

Las restantes cepas uruguayas se agruparon con cepas clásicas (A1) y con cepas clásicas atenuadas (A8) siendo idénticas a las cepas vacunales Winterfield-2512 y D78 respectivamente. La detección de cepas con posible origen vacunal era previsible, ya que en Uruguay se utilizan vacunas que incluyen estas cepas para el control de la enfermedad. (MGAP, https://www.gub.uy). Existen diferentes vacunas autorizadas en nuestro país para el control de IBDV. Una de ellas es Nobilis Gumboro D78 (MSD Animal Health), vacuna a virus vivo atenuado que contiene la cepa D78. Dicha vacuna se utiliza en pollos parrilleros y aves de postura. Generalmente se aplica en dos dosis, una cuando el ave tiene entre 10-14 días y otra entre 7-10 días más tarde. Las muestras uruguayas 032301 y 042301 en donde se detectaron cepas clásicas que son idénticas a la cepa vacunal D78 corresponden a aves de postura de 17-24 días de edad sin registro de vacunación (Tabla 12). Es posible que estos pollos hayan sido vacunados con Nobilis Gumboro D78 o que esta cepa vacunal este circulando en el campo (revertante) y haya infectado a las aves. Otras vacunas muy utilizadas en nuestro país se basan en inmunocomplejos antígeno-anticuerpo que consisten en una mezcla de anticuerpos anti-IBDV y un virus vacunal. Las autorizadas en nuestro país son Poulvac Bursaplex (Zoetis) y CEVAC TRANSMUNE IBD (Ceva Nasmek Corporation S.A.) que contienen la cepa Winterfield-2512. Estas vacunas se aplican en embriones de 18 días y pollitos de 1 día de edad. Es posible que las cepas clásicas detectadas en las muestras uruguayas colectadas en 2020, 2022 y en algunas del 2023 tengan un origen vacunal.

Algo a destacar en base a nuestros resultados es que desde 2020 no se reportan casos de cepas *Distinct,* que han circulado en nuestro país con alta frecuencia desde 2007 (Hernández et al., 2015; Tomás et al., 2019). Para explicar estos resultados, se pueden considerar las siguientes hipótesis: i) El número de muestras y granjas analizadas desde 2020 hasta la fecha es insuficiente para reflejar la realidad de las cepas circulantes de IBDV en Uruguay, y/o ii) Los planes de vacunación aplicados para controlar IBDV en las granjas analizadas son eficaces contra las cepas *Distinct*. La primera hipótesis parece la más probable, ya que, debido a la pandemia de COVID-19 (2020-2022), el número de muestras remitidas al laboratorio para el diagnóstico de IBDV disminuyó considerablemente. Para confirmar la segunda hipótesis, sería necesario realizar ensayos de protección vacunal contra la cepa *Distinct* utilizando las vacunas empleadas en nuestro país.

Aunque la caracterización genética de IBDV basada en la región hipervariable de VP2 proporciona un conocimiento rápido de las cepas circulantes en nuestro país, esta metodología presenta limitaciones. Para una clasificación más exhaustiva de las cepas uruguayas de IBDV detectadas en este estudio, es necesario secuenciar las regiones completas o casi completas de ambos segmentos del genoma de IBDV (Michel y Jackwood, 2017). Esta aproximación permitirá identificar si las cepas uruguayas son recombinantes, detectando posibles puntos de recombinación fuera de la región hipervariable de VP2, y si presentan reordenamientos, dado que el genoma de IBDV es bisegmentado. Por lo tanto, los capítulos 3 y 4 de esta tesis se centran en la aplicación y el desarrollo de metodologías basadas en secuenciación masiva para la obtención y caracterización de los genomas completos de IBDV.

4.3. Capítulo 3

Aplicación de metodologías de secuenciación masiva con abordaje virómico: Obtención de genomas completos de cepas de IBDV y detección de coinfecciones con patógenos virales aviares

4.3.1. Metodología

4.3.1.1 Muestras

Para este capítulo utilizamos las muestras de tejido de bursa de Fabricio de las cinco aves diagnosticadas como positivas para IBDV en 2019 y 2020 (Tabla 12 Capítulo 2). Se seleccionaron muestras pertenecientes a diferentes genogrupos (A1-A4) y con diferentes cargas virales. Los Ct de las cinco muestras seleccionadas durante el diagnóstico de IBDV (Techera et al., 2019) se especifican a continuación: 031901 Ct= 31,51; 451901 Ct=19,20; 471901 Ct= 15,63; 471902 Ct=18,28 y 352001 Ct= 23,72.

4.3.1.2 Protocolo de enriquecimiento de partículas virales

Con el objetivo de maximizar la presencia de los genomas virales en las muestras analizadas, se emplearon protocolos de enriquecimiento de partículas virales que fueron puestos a punto y evaluados por nuestro laboratorio durante la Tesis de Maestría de Eddie Fuques (2021).

Uno de ellos se aplicó en las cinco muestras seleccionadas por separado y consistió en homogenizar tejido de bursa de Fabricio (≈10 mg) en 700 µL de buffer fosfato salino (1× PBS), seguido de una centrifugación a 2500 rpm por 3 minutos a 4°C. Para reducir la cantidad de bacterias y degradar la mayor cantidad posible de material genético libre del hospedero, el sobrenadante de cada muestra fue filtrado (0,45 µm) y digerido con nucleasas como se especifica en la Tesis de Maestría de Eddie Fuques 2021. Para evitar degradar el ARN doble hebra del genoma de IBDV que pueda estar libre, no se agregó la enzima ShortCut Rnase III.

El segundo protocolo consistió en enriquecer las partículas virales por colchón de sacarosa al 30% y se aplicó sólo en la muestra que presentaba baja carga viral (031901). Se generaron dos homogenizados con tejido de bursa de Fabricio (≈30 mg) en 3 mL de buffer fosfato salino (1× PBS). Cada homogenizado se colocó en un colchón de sacarosa

al 30% y se ultra centrifugó a 100000g a 4°C durante dos horas y media. El pellet obtenido se resuspendió en 200 µL de PBS y todo el volumen fue utilizado para realizar la digestión con nucleasas como se describe en el protocolo anterior.

4.3.1.3 Extracción de ácidos nucleicos

Las extracciones de ADN y ARN, de cada muestra, se hicieron por separado utilizando los kits *Quick-RNA™ Miniprep (Zymo Research)* y *Quick-gDNA™ Miniprep (Zymo Research)* respectivamente. Para cada extracción se utilizaron 200 µL del producto de digestión. En la extracción de ARN se realizó el paso de digestión con DNase I y la elución final se hizo en 50 µL de agua libre de ADNasa/ARNasa.

4.3.1.4 Síntesis de ADNc doble hebra y amplificación por MDA

El ARN obtenido se empleó para la generación de ADNc doble hebra (ds-cDNA, por sus siglas en inglés), necesario para la construcción de librerías, mediante el uso del kit *Maxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific)* con *hexámeros al azar* y 12 µL de ARN extraído.

Como el ADNc doble hebra y el ADN de cada muestra eran insuficientes para realizar las librerías fueron sometidos a un paso de Amplificación por Desplazamiento Múltiple (MDA) con el fin de aumentar la cantidad total de material genético presente. Para ello se utilizó el kit *REPLI-g Mini Kit (Qiagen)* partiendo de 5µL de ADN/ADNc doble hebra. Los ácidos nucleicos se purificaron con *AMPure XP (Beckman Coulter)* y se cuantificaron en Qubit con el *kit Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) (Thermo Fisher Scientific).*

4.3.1.5 Preparación de librerías y secuenciación

Las librerías se generaron utilizando el *kit* comercial *Nextera XT DNA Sample Preparation* (*Illumina*) a partir de 1 ng de ADN. Las librerías indexadas se purificaron, cuantificaron, evaluaron y secuenciaron como se especifica en la sección 4.1.1.9.3 del capítulo 1.

4.3.1.6 Análisis bioinformáticos

4.3.1.6.1 Control de calidad y filtrado de los *reads*

El control de calidad de los *reads* obtenidos para cada muestra se realizó con el programa fastqc / PRINSEQ v0.20.4 (Schmieder y Edwards, 2011). Los *reads* de baja calidad fueron filtrados utilizando el programa Trim Galore (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) con sus opciones por

defecto. Por último, se filtraron los *reads* pertenecientes al genoma del hospedero, utilizando un genoma de referencia de *Gallus gallus* (número de acceso: GCF_000002315.6) y los paquetes BWA (Li y Durbin, 2009) y SAMtools (Li et al., 2009).

4.3.1.6.2 Detección y clasificación de los *reads* virales

Los archivos fastq obtenidos luego de los procesos de filtrados fueron utilizados para la detección de *reads* pertenecientes a genomas virales. Se realizó un ensamblaje *de novo* con el programa SPAdes v3.12.0 (Bankevich et al., 2012) utilizando valores de k-mers de 33, 55 y 71. Fueron seleccionados aquellos *contigs* con un bitscore mayor a 200 y un porcentaje de identidad mayor al 50%. Los *contigs* resultantes fueron clasificados utilizando la herramienta DIAMOND (Buchfink et al., 2015) y una base de datos de proteínas virales no redundante obtenida de RefSeq (https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/release/).

4.3.1.6.3 Ensamblaje y anotación de los genomas

Una vez identificadas las especies virales presentes en las muestras se procedió a realizar ensamblajes con genomas de referencias utilizando la herramienta *Minimap2* del programa Geneious Prime 2019.2.1 (https://www.geneious.com). Los genomas se descargaron de la base de datos del NCBI con los siguientes números de acceso: AY029166 y AY029165 (IBDV, Segmento A y B respectivamente), MT671980.1 (CAV), NC_015396.1 (GyVg1), NC_017091.1 (GyH1), NC_018401.1 (GyV4), NC_014955.1 (VPH), NC_024765 (ChPV1) y NC_023861 (SiV-A1). Sólo se tuvieron en cuenta las especies virales que mapearon un mínimo de 50 *reads* con los genomas de referencia.

Las secuencias se inspeccionaron visualmente y se modificaron manualmente. La secuencia consenso de cada cepa se guardó para volver a realizar el ensamblado de las lecturas sobre ella. Este paso se repitió hasta obtener una secuencia consenso final, la cual fue anotada utilizando secuencias de referencia.

4.3.1.6.4 Caracterización genómica de las cepas de IBDV

4.3.1.6.4.1 Análisis de secuencias consenso

Se realizaron análisis filogenéticos con las secuencias consenso codificantes del segmento A (3070 nt) y del segmento B (2634 nt) de IBDV. Las secuencias obtenidas en este trabajo se compararon con secuencias de referencias obtenidas de la base de datos del NCBI (Anexos 1b y c). Los alineamientos, la detección de recombinantes, la

búsqueda de los mejores modelos de sustitución y las filogenias fueron realizadas según se detalla en el capítulo 2.
La secuencia de aminoácidos correspondiente a VP5, poliproteína y VP1 de las cepas uruguayas secuenciadas en este capítulo se compararon con otras cepas de referencia utilizando secuencias codificantes parciales y completas.

4.3.1.6.4.2 Detección de variantes intrahospedero

Las secuencias consenso finales anotadas se ensamblaron nuevamente con los *reads* limpios para detectar las variantes nucleotídicas intrahospedero. Esto se realizó como se detalla en la sección 4.1.1.9.5 del capítulo 1.

4.3.1.6.5 Caracterización de otras especies virales

Se realizó una caracterización génica de las especies virales que coinfectan las muestras con IBDV. Las secuencias obtenidas para cada especie viral se compararon con secuencias de referencias obtenidas de la base de datos del NCBI. Los alineamientos, la detección de recombinantes, la búsqueda de los mejores modelos de sustitución y las filogenias fueron realizadas según se detalla en el capítulo 2.

4.3.2 Resultados

4.3.2.1 Obtención de genomas de IBDV

Mediante el protocolo de enriquecimiento de partículas virales, que involucra filtrado, digestión con nucleasas y secuenciación utilizando tecnología Illumina, se obtuvo la secuencia genómica consenso de cuatro de las cinco muestras analizadas (451901, 471901, 471902 y 352001). A pesar de implementar también el protocolo de enriquecimiento por colchón de sacarosa al 30% en la muestra 031901, no se obtuvo la secuencia genómica de esta cepa. En la Tabla 13, se presentan los resultados de los ensamblajes realizados con las secuencias de referencia del segmento A (AY029166) y del segmento B (AY029165) de IBDV para cada muestra analizada.

Tabla 13- Resultado de los ensamblajes realizados con las secuencias de referencia del segmento A (AY029166) y del segmento B (AY029165) de IBDV para cada muestra.

Muestra	**Número de *reads* filtrados mapeados con genoma de referencia**		**Amplitud de cobertura de Genoma completo (%) [a]**		**Amplitud de cobertura de Genoma codificante (%) [a]**		**Cobertura media [b]**	
	Segmento A (AY029166)	**Segmento B (AY029165)**	**Segmento A (3260 nt)**	**Segmento B (2826 nt)**	**Segmento A (3070 nt)**	**Segmento B (2637 nt)**	**Segmento A**	**Segmento B**
031901 (Filtrado)	50	0	21,20	0	19,31	0	-	-
031901 (Colchón)	28	30	13,1	32,9	13,87	35,1	-	-
451901	4058	4278	98,9	98,9	100	100	129	170
471901	124008	204039	100	100	100	100	4248	8276
471902	3868	7066	98,5	99,2	100	100	147	279
352001	11177	9600	99,2	99,6	100	100	382	372

[a]Amplitud de cobertura: porcentaje del genoma que fue cubierta por las lecturas de secuenciación.

[b]Cobertura media: Número promedio de veces que se lee cada posición.

4.3.2.2 Determinación de secuencias recombinantes y análisis filogenéticos

Antes de realizar los análisis filogenéticos, se realizó una búsqueda de secuencias recombinantes. Ninguna de las cepas uruguayas secuenciadas en este capítulo mostró evidencia de recombinación, lo que permitió su inclusión en los análisis filogenéticos. La secuencia codificante completa del Segmento A se analizó junto con las secuencias de referencia de los genogrupos A1, A2, A3, A4, A7 y A8 del serotipo 1, así como con secuencias del serotipo 2. No se dispone de secuencias genómicas completas de cepas de los genogrupos A5, A6 y A9. La filogenia reveló que las cepas del serotipo 1 se agruparon en seis clados bien definidos, mientras que las cepas del serotipo 2 (AII) ocuparon una posición basal. (Figura 18). Las secuencias de los genogrupos del serotipo

1 (B1-B4) y del serotipo 2 fueron analizadas para el Segmento B. La filogenia reveló que las cepas del serotipo 1 formaron cuatro clados con buenos soportes (Figura 18).

Las cepas uruguayas 451901 y 471901 están estrechamente relacionadas con cepas *Distinct*. Exhiben un alto porcentaje de identidad nucleotídica con cepas uruguayas *Distinct* identificadas entre 2014 y 2016 (99,38 - 99,44% para el Segmento A, y 99,39-99,47% para el Segmento B). El nuevo esquema de genotipificación clasificó estas cepas en el genotipo A4B1. La cepa uruguaya 352001 agrupa con cepas clásicas y se asignó al genotipo A1B1. Presentó una mayor identidad (99,97% y 99,96% para el Segmento A y B, respectivamente) con la cepa clásica vacunal 150127/0.2 (MF969107- MF969108).

En relación con la cepa uruguaya 471902, al comparar ambos segmentos se evidencia un alto porcentaje de identidad nucleotídica: 99,25% en el Segmento A con la cepa uruguaya *Distinct* 421101 (MN313612), colectada en 2011, y 99,92% en el Segmento B con la cepa clásica vacunal 150127/0.2. El análisis filogenético confirma los diferentes orígenes de ambos segmentos de la cepa 471902 (Figura 18). Por consiguiente, esta cepa se clasifica como una cepa reordenante con genotipo A4B1; el Segmento A presenta una mayor identidad con cepas *Distinct*, mientras que el Segmento B exhibe una mayor identidad con cepas clásicas.

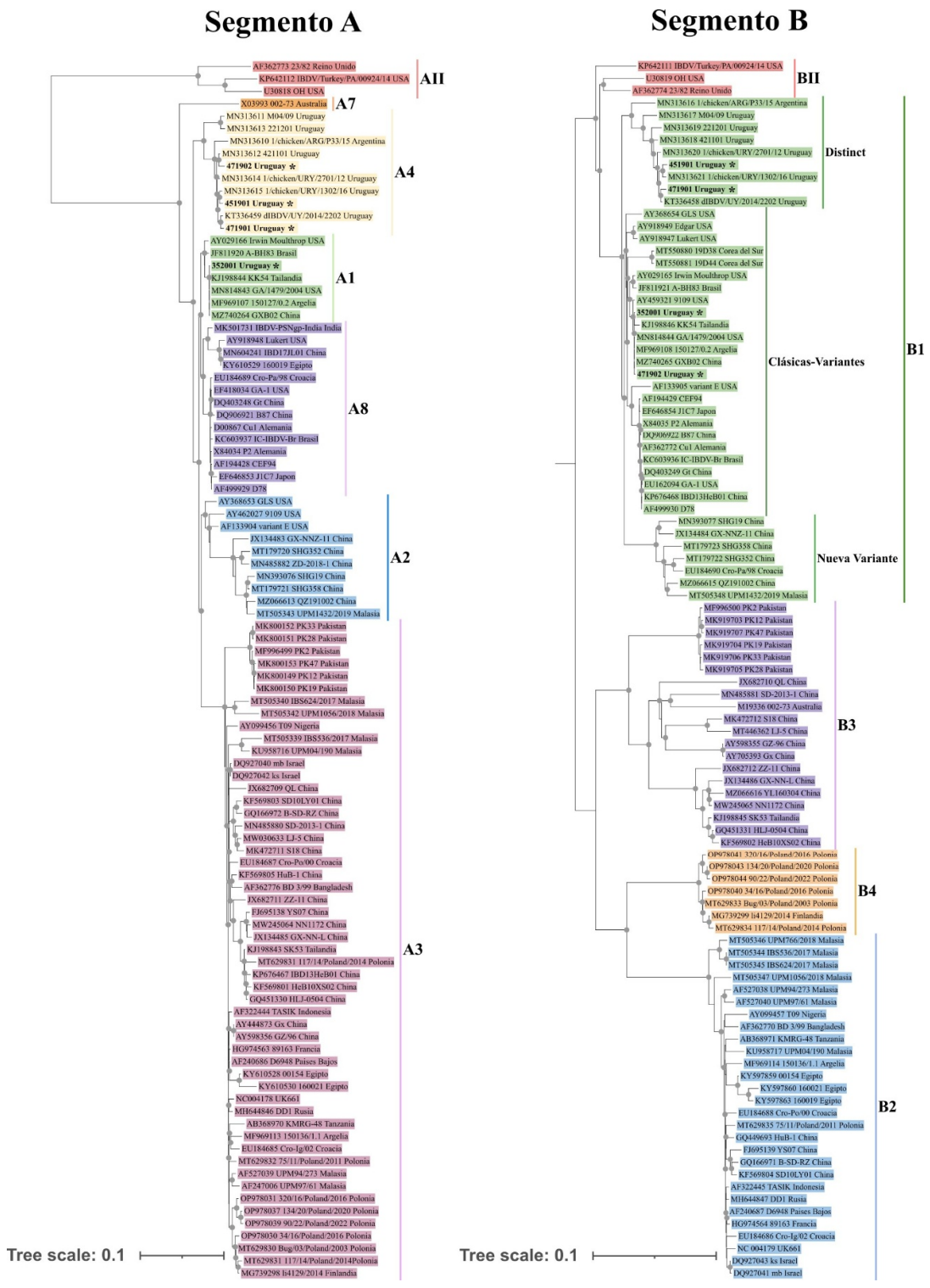


Figura 18- Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en un fragmento de 3070 nt del segmento A del genoma de IBDV (izquierda) y un fragmento de 2634 nt correspondiente al segmento B del genoma de IBDV (derecha). El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el GTR+I+G. Las secuencias del serotipo 2 (AII) y los genogrupos del serotipo 1 se indican con nombres y colores. Los nodos con valores de soporte de aLRT superiores a 0,7 están marcados con círculos grises. Las secuencias obtenidas en este trabajo se indican en negrita y con un asterisco.

4.3.2.3 Análisis de secuencia de aminoácidos de VP5, poliproteína y VP1

La secuencia de aminoácidos del segmento A en las cepas uruguayas 451901, 471901 y 471902 presenta un perfil característico de cepas *Distinct*, con los marcadores VP2 (V124, S222, T272, P289, I290, F296), VP3 (S777, I922), VP4 (W680, I711) y VP5 (R135), los cuales Tomas et al. (2020) han descrito como distintivos para esta variante (Tabla 14). Por el contrario, la secuencia de aminoácidos deducida del segmento A de la cepa uruguaya 352001 mostró un perfil típico de cepas clásicas (P222) (Tabla 14).

La secuencia de aminoácidos del segmento B de las cepas uruguayas 451901 y 471901 también reveló un perfil característico de cepas *Distinct*, al presentar los marcadores VP1 (D56, S57, P243) y compartir la firma aminoacídica SEG en las posiciones 145-147 con la de cepas *Distinct* argentinas y uruguayas descritas previamente (Tabla 14) (Tomas et al., 2020). En contraste, las cepas 471902 y 352001 muestran la firma aminoacídica NED en estas mismas posiciones de VP1, una característica asociada con cepas clásicas y variantes de IBDV (Tabla 14).

La cepa uruguaya 451901 presentó tres cambios aminoacídicos en el Segmento A en comparación con la cepa *Distinct* 1/chicken/URY/1302/16, para la cual ya se ha establecido un perfil patogénico y antigénico en estudios previos (Tabla 14) (Tomás et al., 2019). Además, se detectaron cuatro cambios aminoacídicos en VP1 (Tabla 14), siendo el cambio M411 el único no reportado en otras cepas de IBDV.

La cepa 471901 exhibió cuatro cambios aminoacídicos en el Segmento A en comparación con la cepa *Distinct* 1/chicken/URY/1302/16. Adicionalmente, se identificaron cuatro cambios aminoacídicos en VP1 (Tabla 14). Los cambios exclusivos observados en esta cepa, que no se han reportado en otras cepas, son VP5 (K102) y VP3 (V980).

En contraste, la cepa uruguaya 352001 no mostró cambios aminoacídicos en comparación con la cepa clásica vacunal 150127-0.2 (Tabla 14).

Finalmente, la cepa 471902 presentó diez cambios aminoacídicos en el Segmento A en comparación con la cepa *Distinct* 1/chicken/URY/1302/16 (Tabla 14). Los cambios en VP4 (D584) y VP3 (H806) son únicos y no se han observado en otras cepas. Además, se identificó un único cambio en VP1 (G742) en comparación con la cepa clásica vacunal 150127-0.2; sin embargo, este cambio no es exclusivo, ya que ha sido reportado en otras cepas de IBDV.

Tabla 14- Diferencias aminoacídicas entre las cepas uruguayas secuencias en este capítulo, la cepa *Distinct* 1/chicken/URY/1302/16 y la cepa clásica vacunal 150127.0-2 en los Segmentos A y B de IBDV.

| | | **Segmento A** | | |

4.3.2.4 Variantes intrahospedero

Se observaron variantes intrahospedero en los Segmentos A y B de las muestras analizadas. En ciertas posiciones, la frecuencia de las variantes fue mayor al 10%. Las variaciones consistieron en cambios de un solo nucleótido que ocasionalmente alteran la secuencia de aminoácidos. En las Tablas 15 y 16 se especifican las variantes intrahospedero observadas en el Segmento A y B de las muestras analizadas en este capítulo.

Tabla 15- Variantes nucleotídicas detectadas en el Segmento A de todas las muestras analizadas en este capítulo. Se denota la cobertura, la frecuencia, el CDS, la posición en CDS de cada variante, el número de codón en el CDS, así como si generan cambios en el codón y secuencia aminoacídica codificante.

Cepa	Cambio	Cobertura	Frecuencia de variante	CDS	Posición CDS	Número codón CDS	Número codón poliproteína	Cambio en el codón	Cambio aa
451901	G -> T	173	44.5%	VP3	575	192	914	CGG -> CTG	R -> L
	C -> T	114	40.4%	VP3	644	215	937	CCA -> CTA	P -> L
	C -> T	189	31.2%	VP3	448	150	872	CCA -> TCA	P -> S
	G -> C	210	25.2%	VP3	491	164	886	GGC -> GCC	G -> A
	G -> A	191	24.1%	VP3	479	160	882	GGG -> GAG	G -> E
	A -> C	264	16.7%	VP4	532	178	630	ATA -> CTA	I -> L
	A -> T	372	13.7%	VP4	613	205	657	ATA -> TTA	I -> L
	C -> T	329	14%	VP4	659	220	672	GCC -> GTC	A -> V
471902	C -> T	102	13.7%	VP3	486	162	884	AGC -> AGT	
352001	C -> T	745	46.8%	VP5	374	125	-	CCC -> CTC	P -> L
	C -> T	745	46.8%	VP2	340	114	114	CCT -> TCT	P -> S
	T -> A	724	42.7%	VP5	372	124	-	ACT -> ACA	
	T -> A	724	42.7%	VP2	338	113	113	CTC -> CAC	L -> H
	T -> G	541	39.2%	VP5	410	137	-	CTC -> CGC	L -> R
	T -> G	541	39.2%	VP2	376	126	126	TCC -> GCC	S -> A
	T -> C	199	27.1%	VP4	540	180	632	GAT -> GAC	
	G -> T	558	15.9%	VP2	828	276	276	GTG -> GTT	
	C -> T	294	13.6%	VP3	401	134	856	ACA -> ATA	T -> I
	A -> T	303	10.9%	VP3	418	140	862	ATG -> TTG	M -> L

Tabla 16- Variantes nucleotídicas detectadas en el Segmento B de todas las muestras analizadas en este capítulo. Se denota la cobertura, la frecuencia, el CDS, la posición en CDS de cada variante, el número de codón en el CDS, así como si generan cambios en el codón y secuencia aminoacídica codificante.

Cepa	Cambio	Cobertura	Frecuencia de variante	CDS	Posición CDS	Número codón CDS	Cambio en el codón	Cambio aa
451901	C -> T	207	44%	VP1	1962	654	GCC -> GCT	
	G -> T	855	23.7%	VP1	1521	507	ATG -> ATT	M -> I
	G -> T	739	21.7%	VP1	1459	487	GCA -> TCA	A -> S
471901	A -> G	3347	12.5%	VP1	2121	707	CCA -> CCG	
471902	A -> T	167	26.3%	VP1	395	132	AAG -> ATG	K -> M
	A -> G	268	14.9%	VP1	286	96	ACT -> GCT	T -> A
	C -> T	277	14.4%	VP1	239	80	CCA -> CTA	P -> L
	T -> G	125	11.2%	VP1	2416	806	TCG -> GCG	S -> A
352001	TT -> CC	219	10.5%	VP1	1670	557	GTT -> GCC	V -> A
	C -> T	223	36.3%	VP1	64	22	CCT -> TCT	P -> S
	G -> T	302	27.5%	VP1	2185	729	GCC -> TCC	A -> S
	G -> T	304	18.8%	VP1	114	38	GTG -> GTT	

4.3.2.5 Detección y clasificación de los *reads* virales

Con los *reads* obtenidos luego de los procesos de filtrado se realizó un ensamblaje *de novo* y posterior mapeo de *contigs* contra una base de datos de proteínas virales, para la identificación de genomas virales en las distintas muestras analizadas. De esta forma se identificaron otros virus en las muestras analizadas en este capítulo.

En la muestra 031901 además de IBDV, se identificó el virus de la anemia infecciosa aviar (*Gyrovirus chickenanemia*, CAV). Se realizaron los ensamblajes utilizando los genomas de referencia correspondientes a estos virus y el número de *reads* mapeados para cada virus se especifica en la Figura 19A. Se obtuvo un 99,3% de amplitud de cobertura del genoma de CAV.

En la muestra 451901, además de IBDV, se identificaron Picornavirus de Pollo 1 (Chicken Picornavirus 1 o ChPV1) y Sicinivirus A1 (SiV-A1) ambos de la familia *Picornaviridae.* El número de *reads* mapeados con los genomas de referencia para cada especie viral detectada en la muestra se especifica en la Figura 19B. Se obtuvo 10,5% de amplitud de cobertura del genoma de Picornavirus de Pollo 1 y 17,8% de amplitud de cobertura del genoma de Sicinivirus A1.

En la muestra 352001 se detectó además de IBDV, cuatro especies pertenecientes a la familia *Anelloviridae*, género *Gyrovirus*: el virus de la anemia infecciosa aviar (*Gyrovirus*

chickenanemia, CAV), *Gyrovirus galga1* (GyVg1), *Gyrovirus homsa1* (GyH1), *Gyrovirus homsa3* (GyV4). Además, se detectó un virus similar al del papiloma Humano (VPH) que pertenece a la familia *Papillomaviridae*. El número de *reads* mapeados con los genomas de referencia de cada especie viral detectada se especifica en la Figura 19C. Para los virus CAV, GyVg1, GyV4 y VPH se obtuvo un 100% de amplitud de cobertura del genoma. Para el virus GyH1 se obtuvo un 22% del genoma.

En las muestras 471901 y 471902 no se detectó coinfección de IBDV con otras especies virales.

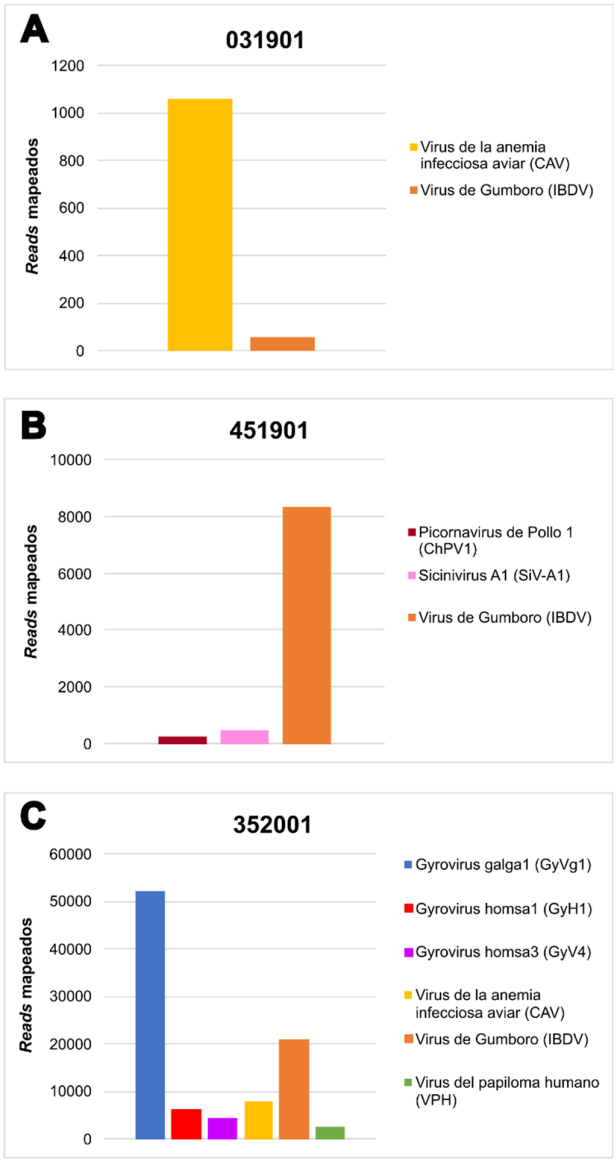


Figura 19- Número de *reads* mapeados sobre genomas de referencia para los virus detectados en las muestras 031901(A), 451901 (B) y 352001 (C).

4.3.2.6 Caracterización de las especies virales que coinfectan las muestras con IBDV.

Para los virus Picornavirus de Pollo 1 y Sicinivirus A1 detectados en la muestra 451901 y *Gyrovirus homsa1* (GyH1) detectado en la muestra 352001 se obtuvieron regiones pequeñas del genoma, por lo que no pudimos realizar su caracterización.

Por otra parte, se obtuvo la secuencia consenso del genoma completo de tres especies de virus pertenecientes al género *Gyrovirus*: CAV, GyVg1y GyV4. Los genomas de CAV se obtuvieron de las muestras 031901 y 352001, mientras que los genomas de GyVg1 y GyV4 se obtuvieron de la muestra 352001.

Los dos genomas completos de CAV obtenidos para la muestra 031901 y 352001 poseen una distancia genética nucleotídica (*p distance*) de 0,0128. En cuanto a la región codificante del genoma (1823 nt que contiene los tres ORFs), estas dos secuencias poseen una distancia genética de 0,0127.

Se realizó un análisis filogenético utilizando las secuencias codificantes de los genomas de CAV obtenidos en este capítulo, de secuencias obtenidas durante mi tesis de Maestría (Techera, 2018), y de secuencias obtenidas de la base de datos del NCBI (Anexo 1d). La filogenia muestra la formación de cuatro clados claramente diferenciados, con altos valores de soporte estadístico (Figura 20). Estos clados coinciden con los identificados en mi Tesis de Maestría (Techera, 2018) que fueron denominados del I al IV. El clado I, integrado únicamente por cepas de origen australiano; el clado II, constituido por cepas de campo que circulan en diferentes partes del mundo; el clado III formado por cepas asiáticas, europeas, africanas, estadounidenses, uruguayas y todas las vacunales desarrolladas hasta la fecha y el clado IV formado únicamente por una cepa de origen japonés. Las cepas uruguayas 031901 y 352001 agruparon en el clado II. La cepa 031901 presentó mayor identidad nucleotídica con cepas uruguayas que fueron secuenciadas durante mi tesis de Maestría (Techera, 2018) y con cepas asiáticas. La cepa 352001 presentó mayor identidad con cepas brasileras, argentinas y uruguayas que fueron previamente secuenciadas en nuestro laboratorio.

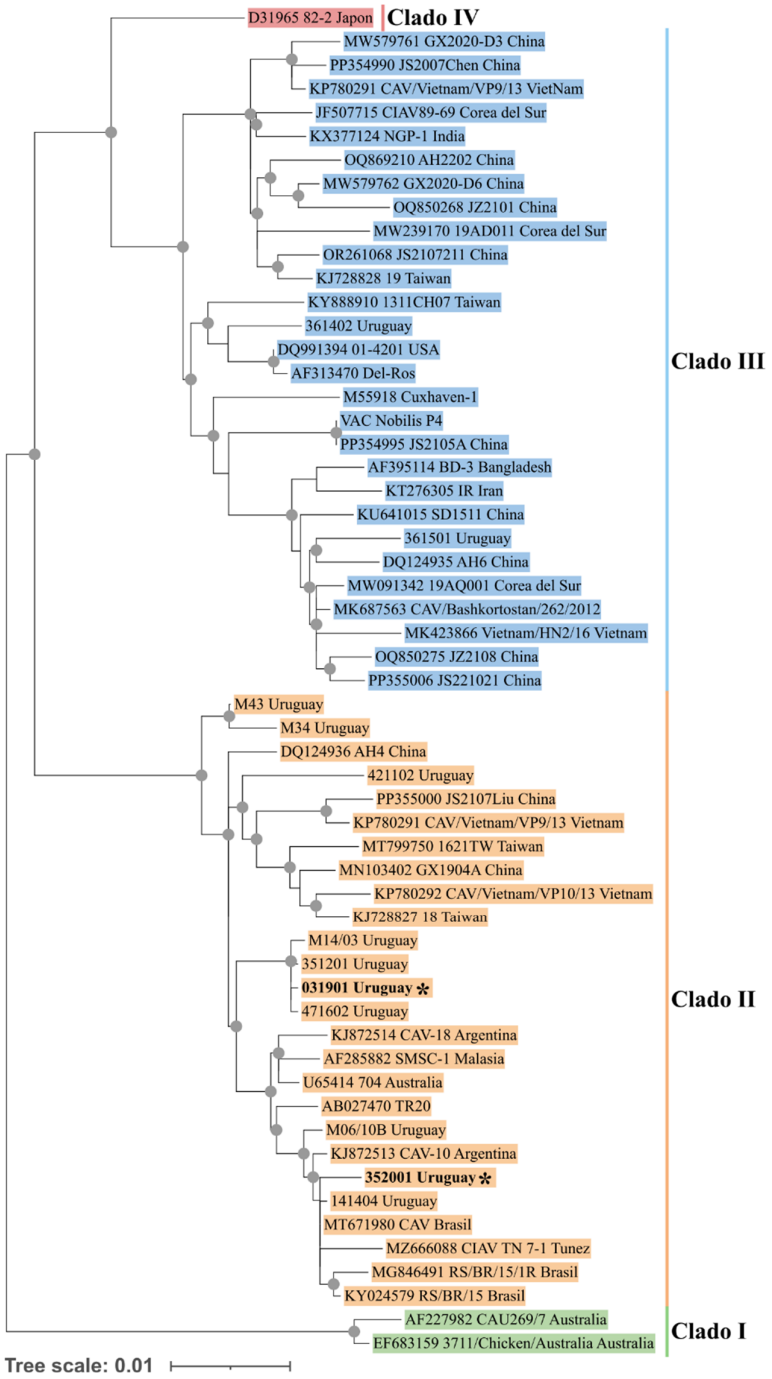


Figura 20- Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en secuencias de genomas completos codificantes de cepas representantes de los diferentes clados de CAV, secuencias uruguayas obtenidas durante mi Tesis de Maestría y las secuencias uruguayas obtenidas en este capítulo. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el GTR+I+G. Las secuencias de los diferentes clados se indican con nombres y colores. Los nodos con valores de soporte de aLRT superiores a 0,7 están marcados con círculos grises. Las secuencias obtenidas en este capítulo se indican en negrita y con un asterisco.

Con el fin de caracterizar genéticamente las especies virales del género *Gyrovirus* obtenidas en este capítulo, se realizó un análisis filogenético utilizando la secuencia completa del gen VP1, que codifica para la proteína de la cápside. Este análisis incorporó tanto las secuencias obtenidas en este trabajo como las secuencias representativas de las especies CAV, GyVg1 y GyV4 disponibles en la base de datos del NCBI (Anexo 1e). En el caso de CAV, las secuencias obtenidas en este estudio se dispusieron de la misma manera que en el análisis basado en la región codificante completa del genoma. Además, se observó que las secuencias uruguayas 352001 de GyVg1 y GyV4 se agruparon en subclados junto con secuencias provenientes de Brasil (Figura 21).

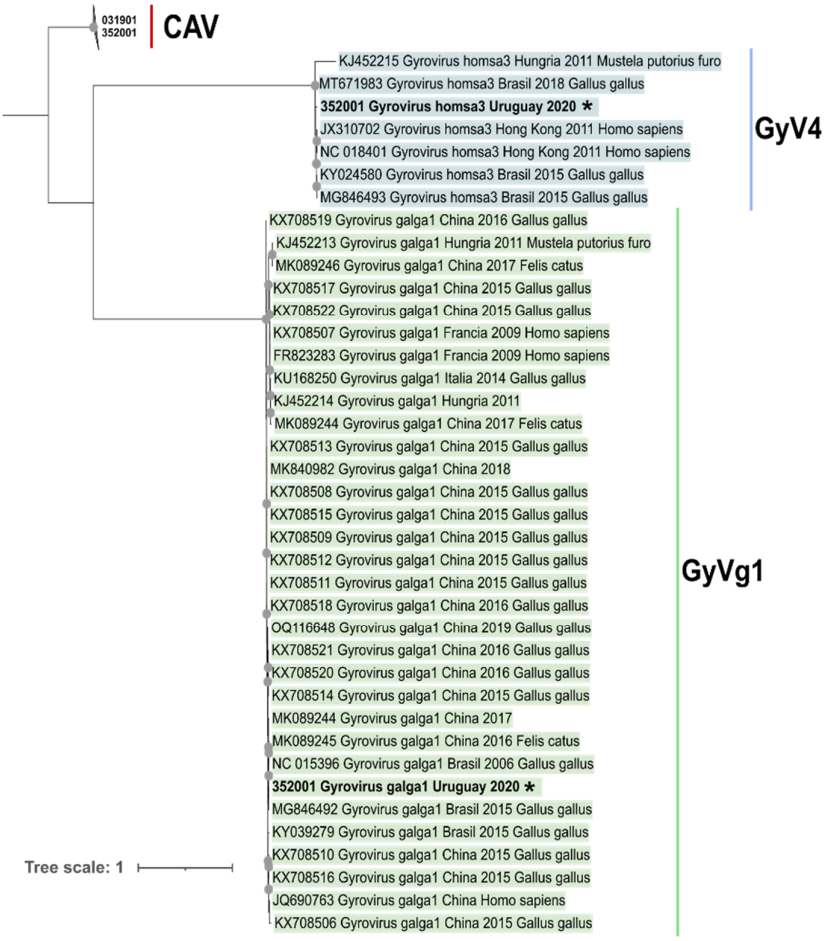


Figura 21- Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en secuencias completas del gen VP1 de especies pertenecientes al género Gyrovirus, incluyendo CAV, GyVg1 y GyV4, así como las secuencias uruguayas obtenidas en este capítulo. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el GTR+I+G. Las secuencias de las diferentes especies se indican con nombres y colores. Los nodos con valores de soporte de aLRT superiores a 0,7 están marcados con círculos grises. Las secuencias obtenidas en este capítulo se indican en negrita y con un asterisco.

Finalmente, se empleó un análisis BLAST utilizando la secuencia genómica consenso de VPH obtenida de la muestra 352001. Se observó que la cepa exhibía un nivel de similitud nucleotídica del 99,69% con la cepa (FA10) del tipo HPV210, la cual pertenece a la especie Gamma-12 del género *Gammapapilomavirus.*

4.3.3 Discusión

El acceso a las secuencias completas de ambos segmentos genómicos de IBDV es esencial para mejorar su clasificación (Michel y Jackwood, 2017) y comprender su evolución. Las técnicas de secuenciación masiva (NGS) se emplean, cada vez más frecuentemente, para obtener genomas en diversos organismos (Barzon et al., 2011; Capobianchi et al., 2013; Quiñones-Mateu et al., 2014). La NGS reduce significativamente los costos por base y el tiempo necesario para obtener genomas en comparación con la secuenciación tradicional (Metzker, 2010). También permite un análisis más detallado de las poblaciones virales al detectar eventos de coinfección, recombinación, reordenamientos y diversidad de cuasispecies (Pérez et al., 2014; Isakov et al., 2015; Yang et al., 2021).

En este capítulo, aplicamos un enfoque de metagenómica viral con NGS (Illumina), lo que permitió obtener secuencias genómicas completas o casi completas confiables (con una cobertura media de más de 100×) de cuatro de las cinco muestras analizadas (Tabla 13). Antes de secuenciar estas muestras, se aplicaron protocolos de enriquecimiento de partículas virales (desarrollados en la Tesis de Maestría de Fuques, 2021) para maximizar la presencia de los genomas virales en las muestras analizadas. A pesar de los esfuerzos, no se obtuvo la secuencia genómica completa de IBDV para la muestra 031901, que presentaba una baja carga viral con un valor de Ct = 31.51, equivalente a 10^3 copias/µL. La secuenciación metagenómica directa a partir de muestras clínicas plantea desafíos en términos de sensibilidad: la cobertura del genoma puede ser baja o inexistente cuando se secuencian virus con baja carga viral. Esto se ha observado en la obtención de genomas para virus como el Zika y el SARS-CoV-2 (Quick et al., 2017; Charre et al., 2020).

Las secuencias genómicas consenso de ambos segmentos de IBDV de las cuatro cepas secuenciadas permitieron su completa caracterización genómica. Ninguna de las cepas uruguayas mostró evidencia de recombinación entre ellas o con cepas vacunales, a pesar de ser un mecanismo utilizado por IBDV para generar variabilidad. Los análisis filogenéticos de los genomas completos evidenciaron los mismos genogrupos para los segmentos A y B realizados con secuencias parciales y genomas completos (Wang et al., 2021; Pikula et al., 2023). Según el nuevo sistema de clasificación, las cepas

uruguayas secuenciadas en este capítulo correspondieron a los genotipos A1B1 (clásicas) y A4B1 (*Distinct*).

Las cepas uruguayas 451901 y 471901, agrupadas en el genotipo A4B1, presentaron una mayor asociación en ambos segmentos de IBDV con cepas *Distinct* identificadas en Uruguay y Argentina (Tomás et al., 2020). Estas cepas tienen los marcadores aminoacídicos característicos del genogrupo *Distinct*, así como la firma SEG en la posición 145-147 de VP1 (Tabla 14), una característica distintiva de las cepas *Distinct* circulantes en ambos países (Vera et al., 2015; Tomás et al., 2020). La cepa 352001, clasificada como perteneciente al genotipo A1B1 o cepa clásica, exhibió una asociación nucleotídica cercana con la cepa 150127/0.2, con la cual es idéntica a nivel aminoacídico. La cepa 150127/0.2 es muy similar a la vacuna CEVAC-IBDL que contiene la cepa Winterfield 2512. La cepa 150127/0.2. tiene un perfil patogénico consistente con una cepa de vacuna intermedia plus (baja morbilidad, sin mortalidad y atrofia bursal evidente) (Abed et al., 2018). Por lo que la cepa 352001 podría corresponder a una cepa vacunal, lo cual no es inesperado ya que como se discutió en el capítulo 2, se aplican ampliamente en Uruguay para controlar la enfermedad.

En el caso de la cepa uruguaya 471902 los análisis filogenéticos evidenciaron que los segmentos tienen diferente origen (Figura 18). Para descartar la posibilidad de coinfección en dicha muestra se analizó la presencia de variantes nucleotídicas intrahospedero en los marcadores aminoacídicos de las cepas *Distinct* y clásicas. Las variantes nucleotídicas en la muestra 471902 no se detectaron en esas posiciones (Tablas 15 y 16). Por lo que en este trabajo se identificó y secuenció por primera vez en Uruguay una cepa de IBDV reordenante de origen natural, que lleva el segmento A de una cepa *Distinct* y el segmento B de una cepa clásica de posible origen vacunal (A4B1).

El reordenamiento es un mecanismo de variación genética que ha sido aprovechado con éxito por IBDV y está asociado con la cocirculación de dos o más genotipos diferentes en la misma región, permitiendo la coinfección simultanea del mismo huésped. Esto puede resultar en la formación de partículas virales que transporten un reordenamiento de los segmentos del genoma. Existen reportes de reordenantes entre cepas de campo y cepas vacunales (Wei et al., 2006; Chen et al., 2012; Abed et al., 2018; Pikula et al., 2018; Wang et al., 2023). En Uruguay circulan las cepas de campo *Distinct* desde 2007 (Hernández et al., 2015; Tomas et al., 2020) y se aplican en las granjas avícolas vacunas

vivas que contienen cepas clásicas (Winterifield-2512), creando un entorno propicio para el surgimiento de cepas reordenantes como la detectada en la muestra 471902.

El descubrimiento de esta cepa indica que las cepas de IBDV presentes en Uruguay evolucionan por mutaciones y procesos de reordenamiento. Estos procesos conducen al surgimiento y establecimiento de poblaciones virales genéticamente heterogéneas, con la capacidad de variar tanto en términos antigénicos como patogénicos. El fenotipo antigénico de las cepas de IBDV es determinado por la secuencia de la región hipervariable de la proteína VP2 (Bayliss et al., 1990; Eterradossi et al., 1997), específicamente por aminoácidos localizados en cuatro tramos que se denominan picos hidrofílicos. Estos picos se encuentran en las posiciones aminoacídicas 210 a 225 (P_{BC}), 249 a 252 (P_{DE}), 281 a 292 (P_{FG}) y 313 a 324 (P_{HI}) (van den Berg et al., 1996; Letzel et al., 2007).

En este contexto, se espera que la cepa reordenante 471902 exhiba un perfil antigénico similar o igual al descrito para las cepas *Distinct* (Domanska et al., 2004; Tomas et al., 2019), ya que contiene los aminoácidos S222 y D254 en VP2 que son responsables del perfil antigénico característico de estas cepas. Sin embargo, se destaca un cambio aminoacídico S317N en VP2 (Tabla 14), respecto a las cepas *Distinct* analizadas previamente en términos antigénicos, el cual requiere una evaluación detallada. Aunque la sustitución de serina por asparagina en el pico hidrofílico P_{HI} de VP2 no introduce mayores alteraciones hidrofílicas, su ubicación es relevante, dado que como se mencionó previamente, esta región es crucial para la antigenicidad de IBDV.

A nivel patogénico, se ha documentado que ambos segmentos de IBDV contribuyen a la patogenicidad de sus cepas (Boot et al., 2005; Escaffre et al., 2013). Estos segmentos codifican para diferentes proteínas virales que interactúan y desempeñan roles clave en la replicación viral, la virulencia y la interacción con el sistema inmunitario del hospedador. Por lo tanto, alteraciones en cualquiera de estos segmentos pueden afectar la patogenicidad de las cepas de IBDV. Este fenómeno ha sido observado en los análisis de patogenicidad de las cepas reordenantes de IBDV. La patogenicidad de la cepa reordenante puede ser menor (Nouën et al., 2006; Wei et al., 2011, 2006, Lu et al., 2015; Wang et al., 2022), igual (Abed et al., 2018; Pikula et al., 2018) o mayor (Li et al., 2015) con respecto a la cepa parental más patogénica.

En este contexto, es necesario evaluar la patogenicidad de la cepa reordenante 471902, ya que la nueva combinación de segmentos podría tener implicaciones en la patogenicidad de la cepa resultante. Detectar cepas reordenantes de IBDV que contienen un segmento con origen vacunal alerta sobre el riesgo asociado al uso de vacunas vivas atenuadas. Esto podría tener implicaciones en la evolución del virus y potencialmente conducir a la emergencia de variantes virales con características imprevistas, incluida la posible reversión a la virulencia de cepas con segmentos de origen vacunal.

Este fenómeno de reversión se refiere a la capacidad del virus vacunal atenuado de incrementar su virulencia original, y ha sido documentado tanto en cepas de campo, como en ensayos de pollos controlados infectados con cepas vacunales de IBDV (Muskett et al., 1985; Yamaguchi et al., 2000; Jackwood et al., 2008; Adamu et al., 2013). Por lo tanto, este descubrimiento resalta la importancia de monitorear de cerca la efectividad y seguridad de las vacunas vivas atenuadas, así como de implementar medidas de control adecuadas para mitigar cualquier riesgo potencial asociado con su uso.

La metodología aplicada en este capítulo también permitió caracterizar el viroma presente en las cinco muestras de bursa de Fabricio. Los análisis evidenciaron una diversidad viral significativa. En dos de las muestras (471901 y 471902) se identificó exclusivamente la presencia de cepas de campo de IBDV, si bien son cepas del mismo virus presentan diversidad en su composición genómica (*Distinct*-471901 y Reordenante-471902). En dos de las cinco muestras (031901 y 352001), se observó una coinfección de IBDV con especies virales pertenecientes al género *Gyrovirus* (CAV, GyVg1, GyH1 y GyV4) de la familia *Anelloviridae.* Por último, en la muestra restante (451901) se detectó coinfección de una cepa de campo de IBDV (*Distinct*) con especies virales de la familia *Picornaviridae*.

Es importante destacar que coinfecciones de IBDV con las especies virales identificadas en este capítulo ya han sido reportadas en muestras de bursas de aves uruguayas (Tesis Maestría Fuques 2021; Techera et al., 2019). La familia *Anelloviridae* está compuesta por virus pequeños, sin envoltura, con genomas de ADN simpe hebra circular de polaridad negativa, que poseen una longitud que oscila entre 1.6 y 3.9 kb. De los 30 géneros que componen esta familia (Varsani et al., 2023), las especies identificadas en

este capítulo corresponden al género *Gyrovirus*. La especie más representativa de este género es CAV que es un patógeno muy extendido que causa inmunodepresión en los pollos.

CAV induce apoptosis de los hemocitoblastos lo que resulta en anemia, hemorragias y una mayor susceptibilidad a las infecciones secundarias. También causa la apoptosis de los timocitos y de los linfocitos T en división, afectando las funciones de los linfocitos T cooperadores (con las siglas en ingles Th), que son esenciales para la producción de anticuerpos y también afecta las funciones de linfocitos T citotóxicos (con las siglas en ingles CTL), lo que genera respuestas subóptimas a las vacunas. Los análisis filogenéticos, realizados utilizando las regiones codificantes de los genomas de CAV, revelaron que las dos cepas uruguayas detectadas y secuenciadas en este capítulo (039101 y 352001) son cepas de campo que se agrupan en el clado II. Este clado ha estado circulando en nuestro país desde el año 2005 (Techera et al., 2021), y se han documentado coinfecciones entre cepas del clado II de CAV y cepas de IBDV en Uruguay (Techera et al., 2019).

En la muestra 031901, se identificó una coinfección de estos dos virus; sin embargo, no logramos caracterizar la cepa de IBDV. En la muestra 352001 se ha detectado una coinfección entre una cepa clásica con posible origen vacunal de IBDV y una cepa de campo de CAV. No se cuenta con registro de vacunación para esta ave en particular. Sin embargo, los análisis realizados indican que la cepa 352001 de IBDV, como se discutió previamente, se clasifica como una cepa vacunal, ya que muestra una identidad aminoacídica del 100% con la cepa vacunal 150127/0.2, la cual posee un perfil patogénico consistente con una cepa vacunal intermedia-plus. En Uruguay, se utiliza la vacuna Poulvac Bursaplex (Zoetis), que contiene una cepa viva Winterfield 2512 intermedia-plus de IBDV.

Es relevante destacar que las vacunas intermedias-plus de IBDV requieren replicarse en la bursa para generar una respuesta inmune efectiva, lo cual puede provocar daño en este órgano (Rautenschlein et al., 2005; Gimeno y Schat, 2018). Este hecho concuerda con las observaciones realizadas por los veterinarios, quienes notaron lesiones significativas en las bursas durante el muestreo. Este daño en la bursa podría comprometer la respuesta humoral contra CAV y, potencialmente, facilitar la entrada de este virus en el ave. Por lo tanto, se evidencia que el tipo de vacuna utilizado para

controlar IBDV también puede influir en el control de CAV (Gimeno y Schat, 2018).

En la muestra 352001 también se detectó la presencia de GyVg1, GyH1 y GyV4 que son nuevos miembros del género *Gyrovirus* y presentan similitud con CAV. Aún se desconoce la patogenicidad de estas tres especies virales en pollos. GyVg1 se detectó por primera vez en sueros de pollos que presentaban signos clínicos como apatía y pérdida de peso en 2011 en Brasil (Rijsewijk et al., 2011). Si bien GyVg1 se ha detectado en aves con signos neurológicos severos (Abolnik y Wandrag, 2014) no se ha realizado una infección experimental en pollos con este virus para determinar con certeza su patogenicidad. La presencia de GyVg1 también se ha descrito en sangre, heces y piel de humanos (Sauvage et al., 2011; Maggi et al., 2012; Phan et al., 2015), en heces de hurones (Fehér et al., 2014), en heces de animales domésticos (Niu et al., 2019; Liu et al., 2022) y en vacunas comerciales para aves (Varela et al., 2014).

GyH1 fue descrito por primera vez en Chile en 2012 a partir de muestra fecal de niños con diarrea (Phan et al., 2012). Posteriormente se reportó en pollos de engorde con proventriculitis viral transmisible (TVP) en China (Li et al., 2018), en aves silvestres aparentemente saludables en Brasil (Duarte et al., 2019) y en gatos con diarrea en China (Niu et al., 2019). Estudios previos han demostrado que GyH1 puede infectar de forma independiente a los pollos, causando inmunodepresión, anemia aplásica y TVP (Li et al., 2018). Las lesiones en los proventrículos causan grandes pérdidas económicas en la industria avícola y constituyen una de las lesiones asociadas con el síndrome de malabsorción (Dormitorio et al., 2007).

Por su parte GyV4 fue descrito por primera vez en 2012 a partir de muestras de materia fecal de pacientes con diarrea, y a partir de muestras de carne de pollo para consumo humano (Chu et al., 2012). En Brasil se han descrito cepas de GyV4 aisladas a partir de aves sanas y enfermas (síndrome de malabsorción) (Lima et al., 2019). De todas las especies del género *Gyrovirus*, GyV4 es la única cuyo genoma carece de un ORF que codifica para una proteína apoptótica (VP3). Esta proteína es importante ya que induce apoptosis en las células T de pollo (Schat, 2009), otorgándole a las especies que lo presentan un potencial rol patogénico. Ante la ausencia de esta proteína, el rol patogénico de GyV4 se encuentra en discusión.

En Uruguay el primer reporte de circulación de estos virus fue en 2021 (Tesis Maestría Fuques), donde se identificó la presencia de GyVg1, GyH1 y GyV4 en muestras de ave

con fenotipo enfermo y GyVg1 en muestras de ave con fenotipo sano. Los análisis filogenéticos basados en el gen VP1 revelaron una estrecha relación entre las cepas uruguayas de GyVg1 y GyV4 secuenciadas en este estudio y las encontradas en Brasil (Figura 21). Esta relación también se observó con las primeras cepas de estos virus reportadas en nuestro país (Tesis Maestría Fuques 2021). La presencia de diversas especies de *Gyrovirus* en Brasil, junto con su proximidad geográfica a Uruguay, sugiere que Brasil podría estar desempeñando un papel como fuente de diferentes cepas de *Gyrovirus* que se dispersan hacia nuestro país.

En la muestra 352001 también se identificó la presencia del virus del papiloma humano (VPH). La cepa detectada y secuenciada en este capítulo mostró un porcentaje de similitud nucleotídica de 99,69% (según BLAST) con la cepa (FA10) del tipo HPV210, perteneciente a la especie Gamma-12 del género *Gammapapilomavirus* (Gamma-PV). Esta cepa fue aislada de la piel sana de una zona expuesta al sol. El género Gamma-PV se destaca por ser el clado más diverso y extenso dentro de la familia *Papillomaviridae*, compuesta por virus de ADN de doble hebra no envueltos. Los virus del género Gamma-PV están asociados comúnmente con infecciones cutáneas en humanos y se han encontrado en diversas condiciones de la piel, desde verrugas hasta lesiones benignas y malignas (Bolatti et al., 2018).

La prevalencia de verrugas virales causadas por el virus del papiloma humano (VPH) es mayor en personas que trabajan con pollos, especialmente en industrias avícolas como las plantas de procesamiento y empaquetado de aves (Taylor,1980; Stehr-Green et al., 1993). Esto se debe a la naturaleza del trabajo, que puede implicar el manejo directo de aves y productos avícolas, así como a las condiciones ambientales en las que se realiza el trabajo, que favorecen la transmisión del virus. La presencia de Gamma-PV en la muestra 352001 podría explicarse por la presencia de verrugas o lesiones cutáneas causadas por estos virus en las manos u otras partes del cuerpo de la persona que manipuló la muestra.

En la muestra 451901, se detectó una coinfección con una cepa de campo *Distinct* de IBDV y dos especies virales de la familia *Picornaviridae*. Esta familia está compuesta por virus pequeños no envueltos, con un genoma de ARN de simple hebra de polaridad positiva que varía entre 6 y 10 kb. Actualmente consta de 158 especies agrupadas en 68 géneros (www.picornaviridae.com), con un número creciente de nuevos picornavirus

actualmente no asignados. Los picornavirus han sido identificados en diversas especies de vertebrados, incluyendo aves.

Los picornavirus aviares han sido detectados frecuentemente en muestras cloacales y heces recogidas tanto de pollos sanos como afectados (Farkas et al., 2012; Bullman et al., 2014; Lau et al., 2014; Zhou et al., 2015; Boros et al., 2016; Lima et al., 2017, 2019). Dos picornavirus aviares, Picornavirus de pollo 1 (no clasificado) y Sicinivirus A1 (Género *Sicinivirus*), se detectaron en la muestra 451901. El potencial patogénico de estas especies no se ha determinado completamente.

Aunque Sicinivirus A1 ha sido detectado en muestras de aves afectadas con el síndrome de raquitismo y retraso del crecimiento (RSS) (Devaney et al., 2016), una enfermedad entérica que causa importantes pérdidas económicas a los productores avícolas en todo el mundo debido a ratios de conversión alimenticia elevados, disminución del peso corporal durante el crecimiento y sacrificio excesivo, no se ha establecido si es la causa directa de la enfermedad. Se requiere más investigación para comprender completamente el impacto que estos virus pueden tener en la salud de las aves.

En resumen, en este capítulo hemos empleado un enfoque de metagenómica viral con NGS (Illumina), que permite obtener secuencias genómicas completas o casi completas de IBDV. Además, posibilitó la identificación eventos de coinfección en las muestras analizadas y evidenció la capacidad de detectar virus desconocidos. Esto ha enriquecido nuestro entendimiento de brotes de campo y proporciona información crucial para el diseño de estrategias de control.

Es importante destacar que, si bien los métodos virómicos son valiosos para obtener genomas completos de virus, presentan ciertas limitaciones. Una baja carga viral puede resultar en la falta de generación de genomas completos. Además, esta metodología puede ser costosa, ya que requiere una gran cobertura por muestra.

Por esta razón, en el capítulo 4 de esta tesis, hemos desarrollado y estandarizado una metodología innovadora que no solo permite obtener genomas completos de IBDV en un amplio rango de carga viral, sino que también reduce significativamente los costos asociados con la secuenciación.

4.4. Capítulo 4

Desarrollo de una metodología de Multiplex-PCR NGS para la secuenciación de genomas completos de IBDV

4.4.1 Metodología

4.4.1.1 Estandarización de la metodología

4.4.1.1.1 Muestras

En este capítulo se utilizaron muestras de bursa de Fabricio positivas para IBDV provenientes de Argentina (n=5), Estados Unidos (n=3) y Uruguay (n=6), colectadas entre 2010 y 2022 (Tabla 17). La genotipificación de las cepas se realizó mediante la amplificación y secuenciación de fragmentos de 492 y 594 pb, correspondientes a la región hipervariable del gen VP2 y al gen VP1, respectivamente. Para la región hipervariable del gen VP2 se siguieron los protocolos detallados en el capítulo 2, mientras que para el fragmento del gen VP1 se aplicaron los métodos descritos por Hernández et al. (2006).

Tabla 17- Cepas de IBDV secuenciadas en la puesta a punto de este capítulo.

Nombre de la cepa	País de origen	Año de colecta	Genotipo	Genogrupo	Ct
031901	Uruguay	2019	A4B1	*Distinct* (G4)	31,51
451901	Uruguay	2019	A4B1	*Distinct* (G4)	19,2
471901	Uruguay	2019	A4B1	*Distinct* (G4)	15,63
397_11	Argentina	2022	A4B1	*Distinct* (G4)	23,47
352001	Uruguay	2020	A1B1	Clásica (G1)	23,72
222201	Uruguay	2022	A1B1	Clásica (G1)	24,74
222202	Uruguay	2022	A1B1	Clásica (G1)	19,66
1210	Argentina	2012	A1B1	Clásica (G1)	26,96
397_12	Argentina	2022	A1B1	Clásica (G1)	28,23
A333D	Argentina	2021	A3B2	Hipervirulenta (G3)	20
A350A	Argentina	2021	A3B2	Hipervirulenta (G3)	20,99
2566B	Estados Unidos	2010	A2B1	Variante (G2)	22,54
2567C	Estados Unidos	2010	A2B1	Variante (G2)	24,61
2567D	Estados Unidos	2010	A2B1	Variante (G2)	25,83

4.4.1.1.2 Extracción de ácidos nucleicos, transcripción reversa y diagnóstico de IBDV

La extracción de ácidos nucleicos y la transcripción reversa fue realizada como se detalla en la sección 4.1.1.6 del capítulo 1. La presencia de IBDV se confirmó mediante qPCR, y el ciclo umbral (Ct) se determinó para cada muestra siguiendo a Techera et al. (2019). Los valores de Ct se interpolaron a la curva estándar previamente obtenida para estimar el número de copias virales.

4.4.1.1.3 Análisis de secuencias y diseño de cebadores

Se realizó un análisis de las secuencias de genomas completos y parciales disponibles en la base de datos del NCBI. Se generaron alineamientos utilizando el algoritmo *MUSCLE* (Kumar et al., 2016) del programa MEGA versión 7. Estos alineamientos se utilizaron para el diseño de cebadores.

Con el objetivo de desarrollar una nueva metodología de enriquecimiento mediante multiplex PCR acoplada a secuenciación masiva (multiplex PCR-NGS), independiente de la preparación de librerías de secuenciación, se diseñaron cebadores quiméricos. Estos cebadores incluyen en su extremo 5', la secuencia del adaptador de Illumina (Figura 22A). Están diseñados para amplificar regiones de entre 200 y 300 pb y, entre distintos juegos, presentan zonas de solapamiento que permiten la reconstrucción de secuencias de genomas completos de IBDV (Figura 22B; Anexo 2a). Para minimizar la generación de productos de amplificación no específicos, los cebadores quiméricos se diseñaron con temperaturas de hibridación superiores a 60 °C. Además, se realizó una búsqueda BLAST para garantizar la especificidad de las secuencias de los cebadores y verificar la ausencia de homología no específica con otras regiones del genoma de IBDV o del pollo.

4.4.1.1.4 *Pools* de cebadores

Se generaron dos *pools* de cebadores (*pool 1* y *pool 2*) (Figura 22B), para evitar la generación de amplicones de pequeño tamaño en las reacciones de multiplex-PCR. Para preparar los *pools,* se diluyeron 10 µL de cada cebador de un stock de 100 µM, hasta una concentración final de 2 µM o 0.2 µM para cada uno.

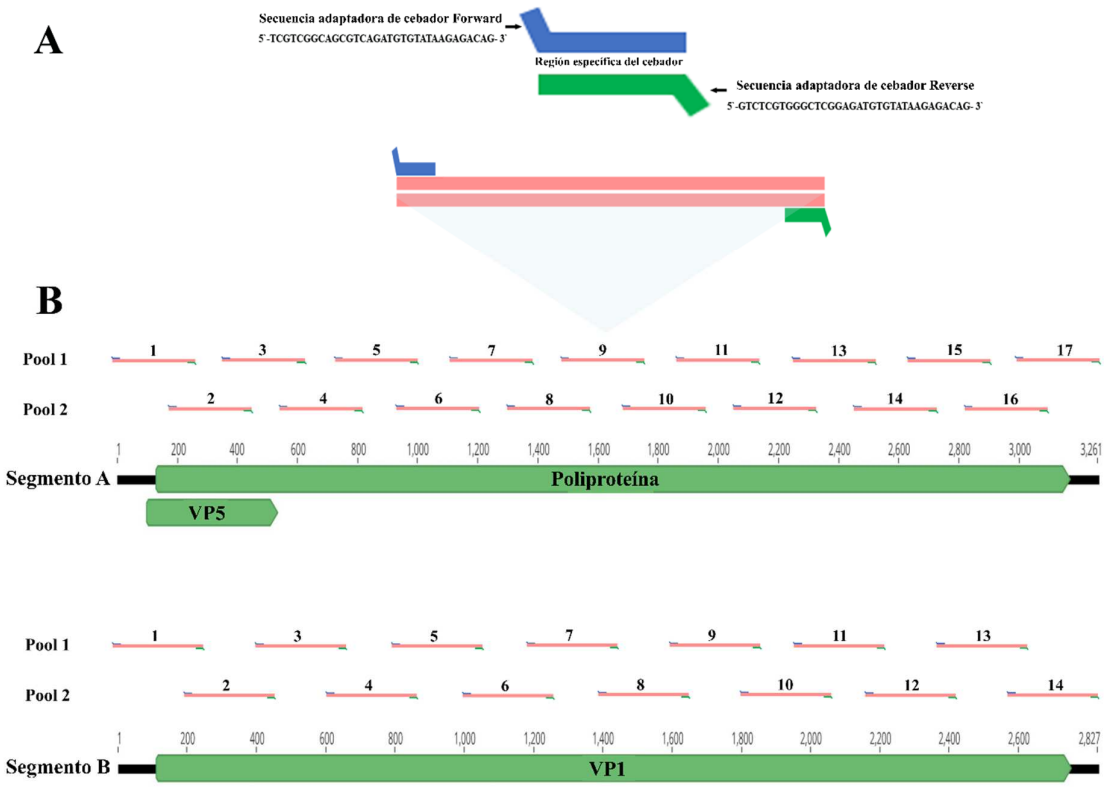


Figura 22- A) Representación de cebadores quiméricos para la secuenciación independiente de kits comerciales de preparación de librerías Illumina. B) Esquema que muestra los productos de amplicones esperados para cada *pool* en el contexto genómico de IBDV.

4.4.1.1.5 Estandarización de multiplex PCR.

Cada multiplex PCR (*pool 1* y *pool 2*) se estandarizó con la enzima *Immolase DNA polymerase del ImmoMix*™ (Meridian Bioscience).

Se evaluó la amplificación óptima utilizando temperaturas de hibridación de 58, 60 y 62 °C, con concentraciones finales de cebadores de 0.3 µM y 0.02 µM para cada uno. Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 25 µL, que incluyó 2.5 µL de ADNc molde, 12.5 µL de 2× ImmoMix (Meridian Bioscience), y 3.75 µL (2 µM) o 2.5 µL (0.2 µM) de cada *pool* de cebadores, junto con agua libre de nucleasas. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, e hibridación y extensión simultáneas a 58/60/62 °C durante 5 minutos, sin un paso de extensión final. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 0.8%. Posteriormente, los

amplicones se combinaron y purificaron en una relación 1:1.8 con esferas magnéticas *AMPure XP (Beckman Coulter)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, la cuantificación se realizó con un fluorómetro Qubit utilizando el kit *Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) (Thermo Fisher Scientific).*

4.4.1.1.6 Multiplex PCR-NGS

El material de entrada para la preparación de librerías no necesitó tagmentación, ya que los amplicones contienen los adaptadores de Illumina y tienen una longitud aproximada de 300 pb. El indexado se realizó en un volumen de reacción de 25 µL que contenía 5 µL de Buffer de Reacción Q5 5×, 1 µL de dNTPs (10 mM), 0.25 µL de ADN Polimerasa de Alta Fidelidad Q5 (2000 U/ml) (New England Biolabs), 10 µL de *Index Nextera™ DNA CD Indexes* (Illumina) y 8.75 µL de ADN molde (100 ng en total). Las condiciones de ciclado fueron: 68 °C durante 3 minutos, 98 °C durante 3 minutos, seguidos de 5 ciclos de 98 °C durante 45 segundos, 62 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 2 minutos, y un paso final de 68 °C durante 1 minuto.

Los amplicones indexados se purificaron, cuantificaron, evaluaron y secuenciaron como se especifica en la sección 4.1.1.9.3 del capítulo 1.

4.4.1.1.7 Ensamblaje y anotación de los genomas

El ensamblaje y la anotación de las secuencias se realizó utilizando el programa Geneious Prime 2021.2.2 (https://www.geneious.com). Las lecturas crudas de Illumina se filtraron utilizando *BBDuk* para eliminar adaptadores, cebadores, lecturas de baja calidad (valores de calidad <30) y lecturas de menos de 60 pares de bases de longitud. Las lecturas limpias se mapearon a las secuencias de referencia AY029166 (segmento A) y AY029165 (segmento B) utilizando *Minimap2.* Se obtuvo el consenso mayoritario para cada genoma y las anotaciones se transfirieron de cepas de referencia. Los genomas anotados se ensamblaron nuevamente con lecturas limpias y se utilizaron para la detección de variantes intrahospedero. Se utilizó el BLAST para buscar similitud de secuencias en las bases de datos.

4.4.1.1.8 Análisis de secuencias consenso

Se realizaron análisis filogenéticos con las secuencias consenso codificantes del segmento A (3070 nt) y del segmento B (2634 nt) de IBDV. Las cepas se compararon

con secuencias de referencia de los genogrupos A1, A2, A3, A4, A7, A8 del segmento A y B1, B2, B3 y B4 del segmento B, así como secuencias del serotipo 2 obtenidas de la base de datos del NCBI (Anexos 1f y g). Los alineamientos, la detección de recombinantes, la búsqueda de los mejores modelos de sustitución y la construcción de filogenias se realizaron según se detalla en el capítulo 2.

4.4.1.1.9 Detección de variantes intrahospedero

El estudio de las variantes nucleotídicas intrahospedero fue realizado con el software Geneious Prime 2021.2.2 (https://www.geneious.com) configurando frecuencias de variantes mínimas de 0,10 y una cobertura mínima de 100.

4.4.1.2 Aplicación de la múltiplex PCR-NGS a cepas de campo

4.4.1.2.1 Muestras

Una vez estandarizada la metodología de multiplex PCR-NGS, se aplicó a las muestras restantes de Uruguay que fueron diagnosticadas como positivas para IBDV (n=12), así como a 18 muestras argentinas también positivas para IBDV colectadas entre 2020 y 2022. Las muestras de bursa de Fabricio argentinas procedían de granjas situadas en las regiones centrales de cría de pollos de este país, las cuales tenían antecedentes de condiciones inmunosupresoras. Dichas muestras se obtuvieron principalmente de granjas que utilizaban la vacuna viva atenuada MB, derivada de la cepa hipervirulenta ks (Kiryat Shmona), en el marco de un proyecto en curso. También se incluyeron muestras de granjas que seguían otros programas de vacunación, como parte de las actividades de diagnóstico de rutina.

El diagnóstico de estas muestras se realizó en el Instituto de Virología del INTA Castelar, Buenos Aires, mediante la amplificación de un fragmento de 492 pb de la región hipervariable de VP2, utilizando los cebadores y condiciones descritos por Hernández et al. 2006. Las muestras se secuenciaron mediante Sanger y se sometieron a una búsqueda BLAST para su identificación preliminar. Las 18 muestras mostraron una baja identidad nucleotídica con virus previamente descritos en Argentina y fueron seleccionadas para obtener los genomas completos (Tabla 18).

Tabla 18- Muestras de campo argentinas a las que se le aplicó la metodología de multiplex PCR-NGS.

Muestra	Ubicación	Fecha de colecta	Tipo de ave	Edad	Vacunas
A327J	Entre Ríos	Agosto 2020	Parrilleros	28 días	VA-hipervirulenta
A329B	Entre Ríos	Octubre 2020	Parrilleros	27 días	VA-hipervirulenta
A335I	Entre Ríos	Febrero 2021	Parrilleros	28 días	VA-hipervirulenta
A363E	Entre Ríos	Agosto 2021	Parrilleros	26 días	VA-hipervirulenta
A397-1	Entre Ríos	Abril 2022	Parrilleros	28 días	CI-clásica
A397-2	Entre Ríos	Abril 2022	Parrilleros	22 días	CI-clásica
A397-5	Entre Ríos	Abril 2022	Parrilleros	27 días	CI-clásica
A397-6	Entre Ríos	Abril 2022	Parrilleros	29 días	CI-clásica
A397-7	Entre Ríos	Abril 2022	Parrilleros	29 días	CI-clásica
A397-9	Entre Ríos	Abril 2022	Parrilleros	36 días	CI-clásica
A397-18	Entre Ríos	Mayo 2022	Parrilleros	21 días	CI-clásica
A397-21	Buenos Aires	Mayo 2022	Parrilleros	28 días	CI-clásica
A397-22	Buenos Aires	Mayo 2022	Parrilleros	24 días	CI-clásica
A397-23	Buenos Aires	Mayo 2022	Parrilleros	27 días	CI-clásica
A397-27	Buenos Aires	Junio 2022	Parrilleros	32 días	CI-clásica
A397-29	Buenos Aires	Junio 2022	Parrilleros	15 días	CI-clásica
A397-30	Buenos Aires	Junio 2022	Parrilleros	32 días	CI-clásica
A397-32	Buenos Aires	Junio 2022	Parrilleros	35 días	CI -clásica

VA: vacuna viva atenuada CI: vacuna basada en inmunocomplejos antígeno-anticuerpo

4.4.1.2.2 Análisis de las secuencias consenso.

Se realizaron análisis filogenéticos con las secuencias genómicas obtenidas, como se especifica en la sección 4.4.1.1.8 de este capítulo. En estos análisis se incluyó el genogrupo B5 (cepas nigerianas) propuesto por Islam et al. (2021) y la división del genogrupo A2 en A2a, A2b, A2c y A2d, propuesta por Wang et al. (2021) (Anexos 1h e i). Los tres primeros corresponden principalmente a cepas variantes de América del Norte, mientras que A2d está compuesto por variantes nuevas descritas por primera vez en China (Fan et al., 2019).

La secuencia de aminoácidos correspondiente a VP5, poliproteína y VP1 de las cepas uruguayas 031901 y las colectadas entre 2022 y 2023, así como de cepas argentinas secuenciadas en esta sección, se compararon con otras cepas de referencia utilizando secuencias codificantes parciales y completas.

4.4.2 Resultados

4.4.2.1 Estandarización de la metodología

4.4.2.1.1 Diseño de cebadores quiméricos para el enriquecimiento por PCR

Se diseñaron 47 cebadores para obtener el Segmento A de IBDV y 37 cebadores para el Segmento B. Algunos de estos cebadores incluían bases degeneradas para abarcar todo el espectro de variantes de IBDV (Anexo 2a). Una búsqueda de BLAST nucleotídica de cada cebador mostró similitud únicamente con las regiones genómicas esperadas de IBDV.

4.4.2.1.2 Estandarización de ensayos de múltiplex-PCR

Los cebadores para las multiplex-PCR se dividieron en dos *pools* (*pool* 1 y 2) para evitar la amplificación de regiones superpuestas (Figura 22B; Anexo 2a). Para estandarizar las reacciones de multiplex-PCR, utilizamos cepas de IBDV con diferentes valores de Ct (desde 31.51 hasta 15.63), que corresponden aproximadamente a un rango de 10^3 a 10^8 copias de genoma/µL (Tabla 17). Los mejores resultados se obtuvieron utilizando un volumen final de 25 µL, que contenía 2.5 µL de ADNc de molde, 7.5 µL de agua libre de nucleasas, 12.5 µL de 2× ImmoMix (Meridian Bioscience) y 2.5 µL de cada *pool* de cebadores (0.2 µM cada uno). Una temperatura de hibridación de 62 °C proporcionó una amplificación óptima. La concentración de los productos de PCR purificados osciló entre 50 y 150 ng/µL. Los amplicones se diluyeron y se utilizaron 8.75 µL (100 ng en total) para su indexación.

4.4.2.1.3 Multiplex PCR-NGS

La concentración de los amplicones indexados estaba entre 25 y 75 ng/µL. Se observó una distribución no gaussiana con tamaños discretos entre 300 y 500 pb en todos los casos.

La secuenciación Illumina produjo alrededor de 5×10^5 lecturas para cada una de las catorce muestras, las cuales se ensamblaron para obtener las secuencias genómicas consenso. Estas secuencias presentaron una amplitud de cobertura, que variaba entre el 98.6% y el 99.9% para el Segmento A y entre el 98.4% y el 99.5% para el Segmento B. La cobertura media de ambos segmentos de cada cepa se detalla en la Tabla 19. Las

secuencias consenso fueron completamente idénticas a las obtenidas para hvVP2 y VP1 mediante secuenciación tradicional o Sanger, y estas últimas se emplearon para la clasificación de las cepas.

Tabla 19- Cobertura media de los segmentos A y B de IBDV.

	Cobertura media	
	Segmento A	**Segmento B**
031901	4402	5678
451901	4139	12832
471901	3847	13504
397-11	10118	12806
352001	5733	3506
222201	6423	4844
222202	3660	2484
1210	6080	5333
397-12	12182	11380
A333D	6836	5087
A350A	3428	2878
2566B	8252	6656
2567C	5640	5199
2567D	4709	4131

4.4.2.1.4 Determinación de secuencias recombinantes y análisis filogenéticos

Antes de realizar el análisis filogenético, se examinaron los conjuntos de datos en busca de posibles cepas recombinantes. Ninguna de las cepas uruguayas secuenciadas en este capítulo mostró evidencia de recombinación, por lo que fueron utilizadas posteriormente para los alineamientos y análisis filogenéticos.

La secuencia codificante completa de los Segmentos A y B se analizaron junto con secuencias de referencia de los serotipos y de los genogrupos que se especifican en la sección 4.3.2.2 del capítulo 3. La filogenia del Segmento A mostró que las cepas del serotipo 1 se agruparon en seis clados bien respaldados, mientras que las cepas del serotipo 2 (AII) ocuparon una posición basal. Por otro lado, la filogenia del Segmento B reveló que las cepas del serotipo 1 formaron cuatro clados con buen soporte (Figura 23). Las topologías de ambas filogenias fueron idénticas a la observada en el capítulo 3.

Las secuencias de las cepas uruguayas 451901 y 471901, obtenidas en este capítulo, fueron idénticas a las obtenidas mediante abordaje virómico utilizado en el capítulo 3, lo

que las clasificó dentro del genotipo A4B1. De manera similar, la cepa 352001 se identificó como del genotipo A1B1, siendo también idéntica a la obtenida mediante el mismo abordaje.

La cepa uruguaya 031901 y la cepa argentina 397-11 estaban estrechamente relacionadas con cepas *Distinct* (Figura 23). El nuevo esquema de genotipificación clasificó estas cepas en el genotipo A4B1. Las cepas compartían una alta similitud, que iba desde el 97.3% al 99.4% para el Segmento A y del 97.8% al 99.5% para el Segmento B, con las cepas *Distinct* sudamericanas identificadas entre 2011 y 2016.

Las cepas uruguayas y argentinas 222201, 222202, 1210 y 397-12 se agruparon con cepas clásicas, siendo asignadas al genotipo A1B1 (Figura 23). Exhibieron una mayor identidad (99.9–100% para el Segmento A y el Segmento B) con la cepa vacunal clásica 150127/0.2 (MF969107- MF969108).

Las cepas argentinas A333D y A350A agruparon en los clados hipervirulentos y fueron asignadas al genotipo A3B2 (Figura 23). Compartieron un alto porcentaje de similitud, 99.9% para el Segmento A y 99.9–100% para el Segmento B, con la cepa vacunal hipervirulenta mb (DQ927040- DQ927041).

Por último, las cepas americanas 2566B, 2567C y 2567D se agruparon con cepas variantes y fueron asignadas al genotipo A2B1 (Figura 23). Compartieron una mayor identidad (97.5%) con la cepa variante E para el Segmento A y estuvieron más cercanas a las cepas coreanas (19D38–19D44) y americanas (9109) (97.8–99.6%) para el Segmento B.

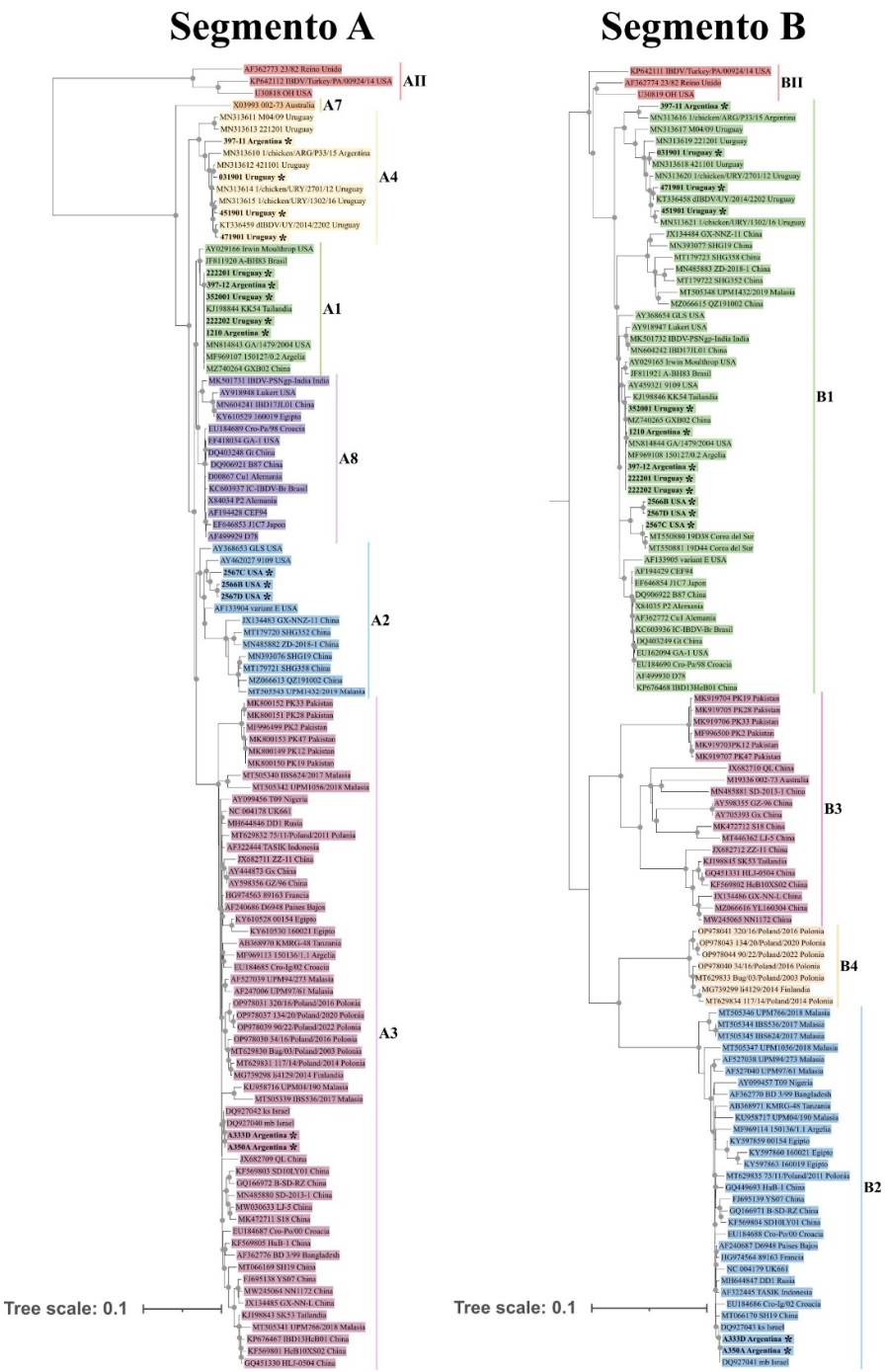


Figura 23- Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en un fragmento de 3070 nt del segmento A del genoma de IBDV (izquierda) y un fragmento de 2634 nt correspondiente al segmento B del genoma de IBDV (derecha). El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el GTR+I+G. Las secuencias del serotipo 2 (AII) y los genogrupos del serotipo 1 se indican con nombres y colores. Los nodos con valores de soporte de aLRT superiores a 0,7 están marcados con círculos grises. Las secuencias obtenidas en este trabajo se indican en negrita y con un asterisco.

4.4.2.1.5 Variantes intrahospedero

Se observaron variantes intrahospedero en los Segmentos A y B de las muestras analizadas. En ciertas posiciones, la frecuencia de las variantes fue mayor al 10%. Las variaciones consistieron en cambios de un solo nucleótido y/o variaciones de dos nucleótidos ligados que ocasionalmente alteran la secuencia de aminoácidos. En las Tablas 20 y 21 se especifican las variantes intrahospedero observadas en el Segmento A y B de las muestras analizadas en este capítulo. En la muestra 397-11, se detectaron haplotipos, y las posiciones nucleotídicas correspondientes a estos haplotipos se indican en color gris.

Tabla 20- Variantes nucleotídicas detectadas en el Segmento A de todas las muestras analizadas en este capítulo. Se indica la cobertura, la frecuencia, el CDS, la posición en CDS de cada variante, el número de codón en el CDS, así como si generan cambios en el codón y secuencia aminoacídica codificante.

Cepa	Cambio	Cobertura	Frecuencia de variante	CDS	Posición CDS	Número codón CDS	Número codón poliproteína	Cambio en el codón	Cambio aa
031901	T -> C	16306	12.8%	VP4	282	94	546	CAT -> CAC	
	T -> C	8251	12.4%	VP4	324	108	560	CCT -> CCC	
	C -> T	1135	35.9%	VP2	962	321	321	GCT -> GTT	A -> V
451901	T -> C	13653	14.8%	VP3	123	41	763	CCT -> CCC	
	C -> T	13598	32.6%	VP3	138	46	768	GCC -> GCT	
471901	T -> A	1198	10.6%	VP4	50	17	469	CTG -> CAG	L -> Q
397-11	G -> A	143	23.1%	VP2	672	224	224	GGG -> GGA	
	G -> A	144	21.5%	VP2	675	225	225	GTG -> GTA	
	G -> A	16868	12.1%	VP2	1215	405	405	AGG -> AGA	
	G -> A	16623	48.3%	VP4	267	89	541	GTG -> GTA	
	C -> A	17365	48.8%	VP4	318	106	558	CTC -> CTA	
	G -> A	11141	14.5%	VP3	134	45	767	GGC -> GAC	G -> D
	A -> C	134	26.1%	VP2	661	221	221	AAA -> CAA	K -> Q
	A -> C	16231	36.1%	VP2	783	261	261	ATA -> ATC	
	T -> C	279	10.0%	VP4	666	222	674	ACT -> ACC	
	T -> C	100	18.0%	VP3	225	75	797	ATT -> ATC	
	T -> C	100	12.0%	VP3	227	76	798	GTG -> GCG	V -> A
	T -> G	205	11.2%	VP5	343	115	-	TCG -> GCG	S -> A
	T -> G	205	11.2%	VP2	309	103	103	AGT -> AGG	S -> R
	T -> G	141	24.8%	VP2	664	222	222	TCA -> GCA	S -> A
	A -> G	16065	45.4%	VP2	768	256	256	GTA -> GTG	
	A -> G	16356	36.2%	VP2	822	274	274	AGA -> AGG	
	A -> G	100	16.0%	VP3	223	75	797	ATT -> GTT	I -> V
	A -> T	122	30.3%	VP2	627	209	209	ACA -> ACT	

	C -> T	4841	46.0%	VP4	49	17	469	CTA -> TTA	
	C -> T	8271	20.6%	VP3	486	162	884	AGC -> AGT	
222201	C -> A	533	36.2%	VP2	1044	348	348	CCC -> CCA	
	T -> C	4467	48.3%	VP2	1260	420	420	ACT -> ACC	
	T -> G	7987	11.5%	VP4	329	110	562	GTC -> GGC	V -> G
	C -> T	165	18.2%	VP3	230	77	799	ACT -> ATT	T -> I
222202	T -> C	185	10.3%	VP3	227	76	798	GTG -> GCG	V -> A
	T -> G	3140	12.2%	VP4	329	110	562	GTC -> GGC	V -> G
	A -> G	185	15.7%	VP3	215	72	794	GAG -> GGG	E -> G
	A -> G	184	16.8%	VP3	229	77	799	ACT -> GCT	T -> A
1210	T -> C	170	16.5%	VP3	227	76	798	GTG -> GCG	V -> A
	T -> C	156	21.8%	VP3	231	77	799	ACT -> ACC	
397_12	T -> C	34225	41.6%	VP4	298	100	552	TTA -> CTA	
	A -> G	1591	11.3%	VP4	99	33	485	GCA -> GCG	
	A -> G	5006	39.1%	VP3	696	232	954	GGA -> GGG	
	C -> T	149	18.8%	VP3	230	77	799	ACT -> ATT	T -> I
	C -> T	9085	40.7%	VP3	312	104	826	AGC -> AGT	
A333D	T -> C	4694	22.0%	VP4	804	268	720	TTT -> TTC	
	T -> C	316	10.8%	VP3	227	76	798	GTG -> GCG	V -> A
	A -> G	319	11.0%	VP3	229	77	799	ACT -> GCT	T -> A
A350A	T -> C	2886	26.3%	VP2	1204	402	402	TTG -> CTG	
	T -> C	170	12.9%	VP3	225	75	797	ATT -> ATC	
	T -> C	169	13.0%	VP3	227	76	798	GTG -> GCG	V -> A
	T -> C	168	16.7%	VP3	231	77	799	ACT -> ACC	
	A -> G	173	11.0%	VP3	215	72	794	GAG -> GGG	E -> G
	G -> T	164	10.4%	VP4	76	26	478	GAC -> TAC	D -> Y
2566B	G -> A	1190	16.8%	VP3	81	27	749	CAG -> CAA	
	T -> A	371	14.6%	VP3	588	196	918	GAT -> GAA	D -> E
	G -> A	299	43.1%	VP3	675	225	947	AAG -> AAA	
	T -> C	7247	25.9%	VP4	540	180	632	GAT -> GAC	
	T -> C	963	19.8%	VP4	774	258	710	GAT -> GAC	
	T -> C	1130	18.9%	VP3	60	20	742	CTT -> CTC	
	T -> G	448	26.1%	VP2	309	103	103	AGT -> AGG	S -> R
	T -> G	448	26.1%	VP5	343	115	-	TCG -> GCG	S -> A
	A -> G	964	19.0%	VP4	777	259	711	GTA -> GTG	
	A -> G	1180	18.5%	VP3	72	24	746	GCA -> GCG	
	C -> T	6893	10.4%	VP3	527	176	898	CCG -> CTG	P -> L
2567C	A -> G	22565	33.9%	VP5	10	4	-	AGA -> GGA	R -> G
	T -> G	206	24.8%	VP5	343	115	-	TCG -> GCG	S -> A
	T -> G	206	24.8%	VP2	309	103	103	AGT -> AGG	S -> R
	C -> T	4192	13.4%	VP3	527	176	898	CCG -> CTG	P -> L
2567D	T -> A	121	14.0%	VP3	588	196	918	GAT -> GAA	D -> E
	T -> C	304	11.2%	VP3	60	20	742	CTT -> CTC	
	T -> G	208	32.2%	VP2	309	103	103	AGT -> AGG	S -> R
	T -> G	208	32.2%	VP5	343	115	-	TCG -> GCG	S -> A

	C -> T	2678	10.9%	VP3	527	176	898	CCG -> CTG	P -> L
	C -> T	125	14.4%	VP3	598	200	922	CTA -> TTA	

Tabla 21- Variantes nucleotídicas detectadas en el Segmento B de todas las muestras analizadas en este capítulo. Se indica la cobertura, la frecuencia, el CDS, la posición en CDS de cada variante, el número de codón en el CDS, así como si generan cambios en el codón y secuencia aminoacídica codificante.

Cepa	Cambio	Cobertura	Frecuencia de variante	CDS	Posición CDS	Número codón CDS	Cambio en el codón	Cambio aa
031901	A -> C	38176	11.3%	VP1	1427	476	CAA -> CCA	Q -> P
451901	A -> C	30531	21.5%	VP1	1427	476	CAA -> CCA	Q -> P
397-11	G -> A	2868	35.0%	VP1	2190	730	GGG -> GGA	
	T -> C	12013	40.1%	VP1	1095	365	AAT -> AAC	
	T -> C	22898	40.2%	VP1	1125	375	TTT -> TTC	
	T -> C	9572	39.9%	VP1	1302	434	TAT -> TAC	
	A -> C	18015	31.3%	VP1	1427	476	CAA -> CCA	Q -> P
	T -> C	8792	42.9%	VP1	1584	528	TTT -> TTC	
	T -> C	2821	36.3%	VP1	2166	722	ACT -> ACC	
	T -> C	1548	20.4%	VP1	2229	743	CGT -> CGC	
	T -> C	37601	46.9%	VP1	2574	858	CCT -> CCC	
	T -> C	37361	46.7%	VP1	2576	859	ATA -> ACA	I -> T
	T -> G	2304	28.0%	VP1	306	102	GGT -> GGG	
	T -> G	22967	40.1%	VP1	1131	377	CCT -> CCG	
	A -> G	6533	17.7%	VP1	1769	590	AAG -> AGG	K -> R
	A -> G	6417	48.7%	VP1	1812	604	GAA -> GAG	
	C -> T	15321	35.3%	VP1	996	332	ACC -> ACT	
352001	C -> T	176	14.2%	VP1	816	272	GGC -> GGT	
222201	A -> C	13866	10.7%	VP1	1427	476	CAA -> CCA	Q -> P
	C -> T	322	11.2%	VP1	816	272	GGC -> GGT	
222202	A -> G	637	36.7%	VP1	2363	788	AAG -> AGG	K -> R
1210	A -> C	10655	24.2%	VP1	1427	476	CAA -> CCA	Q -> P
397_12	A -> C	14280	36.9%	VP1	1427	476	CAA -> CCA	Q -> P
	TT -> CC	14918 -> 14963	46.1% ->46.3%	VP1	2243	748	GTT -> GCC	V -> A
	C -> T	514	15.2%	VP1	816	272	GGC -> GGT	
	C -> T	59257	38.6%	VP1	2576	859	ACA -> ATA	T -> I
A333D	T -> C	4896	15.8%	VP1	1882	628	TTG -> CTG	
A350A	A -> G	5266	27.4%	VP1	2575	859	ACA -> GCA	T -> A
2566B	T -> C	2213	24.8%	VP1	483	161	GAT -> GAC	
2567D	A -> G	2168	23.0%	VP1	2340	780	CTA -> CTG	

4.4.2.2 Caracterización genómica de las cepas de campo

4.4.2.2.1 Análisis filogenéticos

No se encontró evidencia de recombinación en ninguna de las cepas uruguayas y argentinas secuenciadas en esta sección. La única cepa clasificada como reordenante fue la 471902. Las secuencias del Segmento A y B de esta cepa, obtenidas a través de la metodología de multiplex PCR-NGS, fueron idénticas a las obtenidas por el abordaje virómico.

Los análisis filogenéticos permitieron identificar los siete genogrupos previamente descritos para el Segmento A (A1, A2, A3, A4, A6, A7 y A8) y los cinco para el Segmento B (B1-B5) (Figura 24).

Las cepas uruguayas 032301 y 042301 se agruparon con cepas clásicas atenuadas y se asignaron al genotipo A8B1 (Figura 24), mostrando una mayor identidad con cepas vacunales y de campo que se han identificado como posibles revertantes de la cepa vacunal D78 (GA-1, H-30).

El resto de las cepas uruguayas se agruparon con cepas clásicas y se asignaron al genotipo A1B1 (Figura 24), presentando una mayor identidad con la cepa vacunal clásica 150127/0.2.

En cuanto a las 18 cepas argentinas, se agruparon en clados monofiléticos dentro de los genogrupos A2d y B1b (Figura 24), mostrando una estrecha relación con la cepa china SHG19.

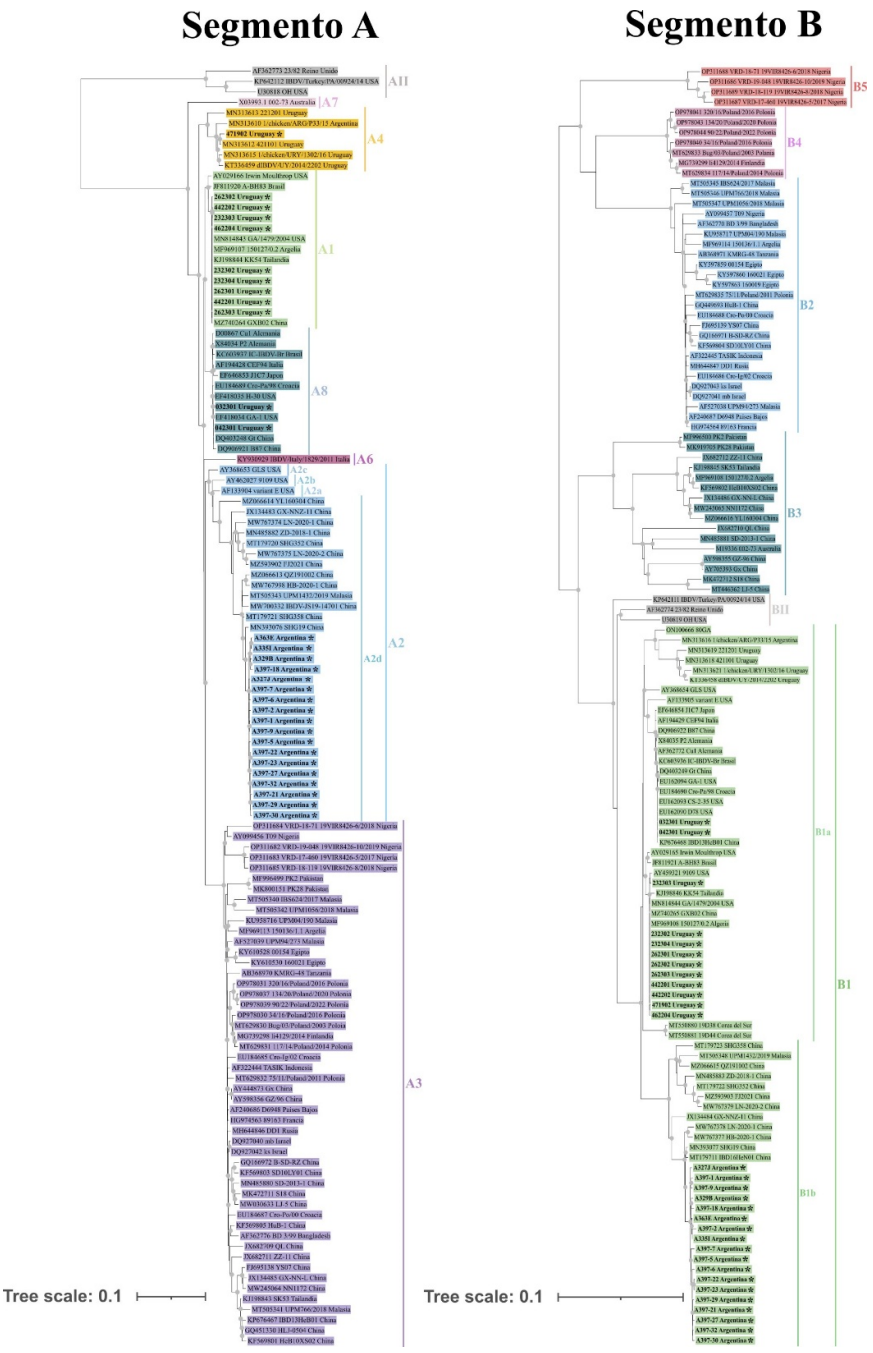


Figura 24- Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en un fragmento de 3070 nt del segmento A del genoma de IBDV (izquierda) y un fragmento de 2634 nt correspondiente al segmento B del genoma de IBDV (derecha). El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el GTR+I+G. Las secuencias del serotipo 2 (AII) y los genogrupos del serotipo 1 se indican con nombres y colores. Los nodos con valores de soporte de aLRT superiores a 0,7 están marcados con círculos grises. Las secuencias obtenidas en este trabajo se indican en negrita y con un asterisco.

4.4.2.2.2 Análisis de secuencia de aminoácidos de VP5, poliproteína y VP1

Los análisis aminoacídicos de las cepas 451901, 471901, 471902 y 352001 son los mismos que los de la sección 4.3.2.3 del capítulo 3 ya que las secuencias obtenidas por multiplex-PCR-NGS para estas cepas y las obtenidas por viroma son idénticas.

La cepa uruguaya 031901 mostró los marcadores aminoacídicos distintivos de las cepas *Distinct*, previamente descrito para cepas uruguayas y argentinas (Tomás et al., 2020) en las proteínas VP2, VP3, VP4 y VP1. En contraste, esta cepa no presentó el marcador aminoacídico típico de estas cepas en VP5 en la posición R135; en su lugar, mostró una C (Tabla 22). Este cambio no ha sido observado en otras cepas de IBDV publicadas.

Las cepas uruguayas 032301 y 042301 exhiben el marcador de cepas clásicas P222, así como los marcadores asociados a cepas atenuadas en VP2 (H253, N279, T284 y R330) (Tabla 22). En el segmento A, la cepa 032301 muestra dos cambios aminoacídicos en comparación con la cepa vacunal D78, mientras que la cepa 042301 presenta solo un cambio respecto a la misma cepa vacunal. En el segmento B, ambas cepas son idénticas a nivel aminoacídico con la cepa D78 (Tabla 22).

El resto de las cepas uruguayas fueron idénticas a la cepa vacunal clásica 150127.0-2 a nivel aminoacídico, excepto por las cepas 462204, 232303 y 262303, que presentaron cambios específicos (Tabla 22).

Se compararon las secuencias de aminoácidos de VP5, poliproteína y VP1 de los 18 virus argentinos con las restantes secuencias genómicas completas de IBDV.

Tanto la poliproteína como VP1 exhibieron longitudes típicas de 1012 y 879 aminoácidos, respectivamente. En el segmento A, se observó una sustitución nucleotídica A50T (según la numeración de la secuencia AY029166), que introduce un codón de inicio adicional (AUG) en el marco de lectura abierto de VP5 en la posición 49, junto con los codones típicamente presentes en las posiciones 85 y 97. Este nuevo codón podría funcionar como un inicio alternativo de traducción, lo que daría lugar a un VP5 de 161 aminoácidos, en contraste con los 149 y 145 aminoácidos observados en otras cepas de IBDV. Al comparar con otras secuencias completas del segmento A de IBDV, se ha identificado que la sustitución A50T también está presente en la mayoría de las cepas chinas A2d.

Tabla 22- Diferencias aminoacídicas entre las cepas uruguayas secuenciadas en este capítulo, la cepa *Distinct* 1/chicken/URY/1302/16 (A4B1), la cepa clásica vacunal 150127.0-2 (A1B1), la cepa vacunal atenuada D78 y la cepa de campo GA-1 (revertante de D78) (A8B1) en los Segmentos A y B de IBDV.

| | | Segmento A | | |

En la región hipervariable de VP2, se identificó que 252I era el único marcador común en todas las cepas A2d, mientras que 249K se confirmó como un marcador característico de A2 (Figura 25). Al analizar las secuencias codificantes completas, siete residuos de aminoácidos emergieron como marcadores fuertes de A2dB1b, todos presentes en los virus argentinos (Figura 25; Tablas 23 y 24). Estos incluyen 3R, 40P, 88R y 143E en VP5, 252I en VP2, 951L en VP3 y 240E en VP1. Curiosamente, el residuo 72D en VP1 fue exclusivo de los virus argentinos, reemplazando al 72E, que es típico de otros genotipos, incluido B1b.

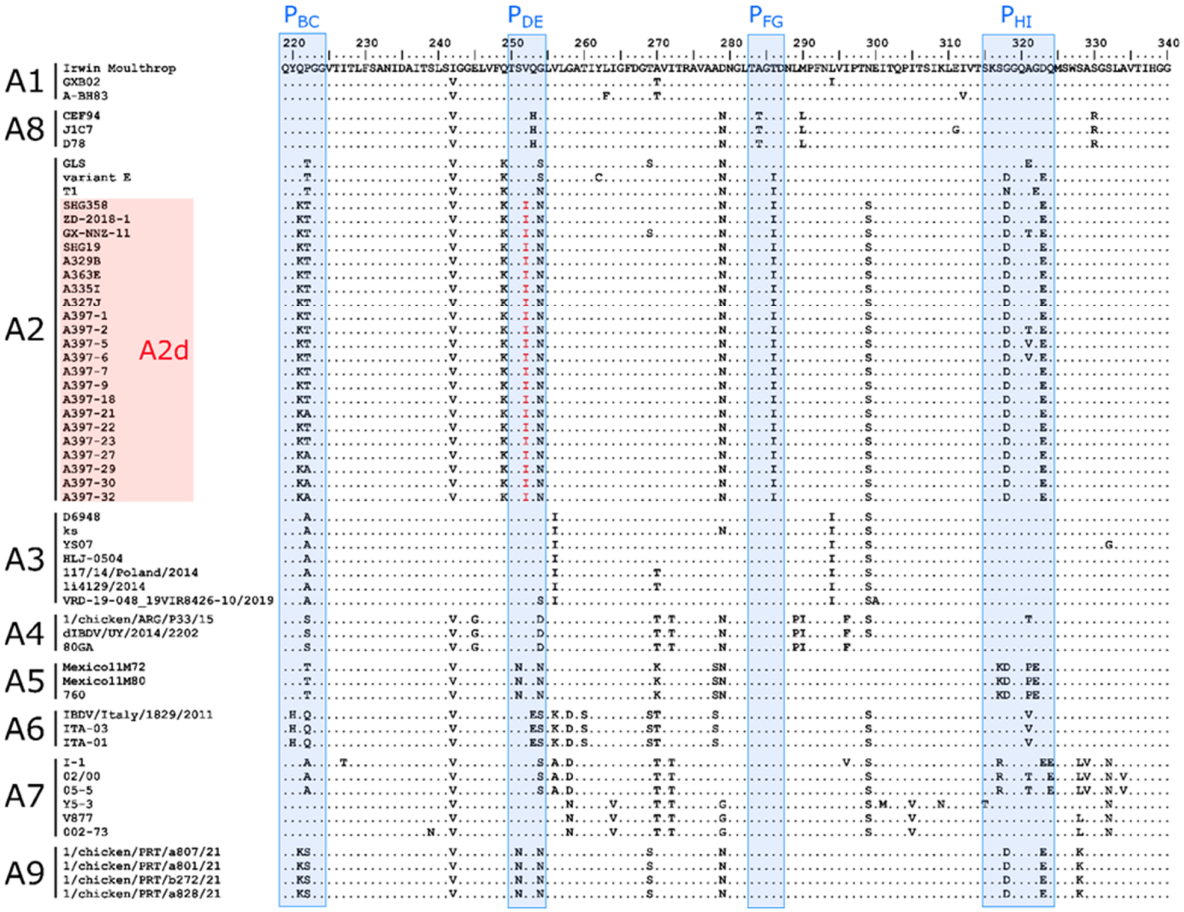


Figura 25- Aminoácidos presentes en la región hvVP2 de cepas representativas de los diferentes genogrupos. En rojo se indican las cepas A2dB1b. Los picos hidrofílicos se delimitaron en azul. El marcador aminoacídico de las cepas A2dB1b se coloreó en rojo.

Tabla 23- Alineamiento de aminoácidos de VP5, VP2, VP4 y VP3, mostrando las posiciones variables tanto en las cepas argentinas como en las representativas de cada genotipo.

		Segmento A																													
		VP5												VP2						VP4			VP3								
Cepa	Genotipo	3	40	74	85	88	95	100	105	112	113	120	143	73	79	187	213	451	491	541	547	686	767	951	981	1005					
Irwin Moulthrop	A1	S	S	I	T	Q	S	C	G	A	S	E	K	T	N	I	D	I	T	V	N	V	S	I	P	T					
GXB02	A1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
A-BH83	A1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
J1C7	A8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.					
CEF94	A8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.					
D78	A8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.					
variant E	A2a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	N	.	.	I	.	I	.	.	.	.					
GLS	A2c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	I	.	I	.	.	.	.					
SHG358	A2d	R	P	L	.	R	.	G	R	.	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	.	A					
ZD-2018-1	A2d	R	P	L	.	R	P	G	.	.	.	K	E	.	.	.	N	.	.	I	.	I	.	L	.	A					
GX-NNZ-11	A2d	R	P	F	.	R	.	G	.	.	.	K	E	.	.	.	.	.	.	I	.	I	.	L	.	A					
SHG19	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	V	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	.	A					
A329B	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	I	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	T	A					
A363E	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	.	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	T	A					
A335I	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	V	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	T	A					
A327J	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	V	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	.	A					
A397-1	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	V	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	.	A					
A397-2	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	V	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	.	A					
A397-5	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	V	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	.	A					
A397-6	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	V	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	N	L	.	A					
A397-7	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	V	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	.	A					
A397-9	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	V	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	.	A					
A397-18	A2d	R	P	L	S	R	P	G	R	V	G	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	T	A					
A397-21	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	V	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	.	A					
A397-22	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	V	.	K	E	I	S	V	N	L	S	I	D	I	.	L	.	A					
A397-23	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	V	.	K	E	I	S	V	N	L	S	I	D	I	.	L	.	A					
A397-27	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	V	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	.	A					
A397-29	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	V	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	.	A					
A397-30	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	V	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	.	A					
A397-32	A2d	R	P	L	.	R	P	G	R	V	.	K	E	I	S	V	N	L	.	I	.	I	.	L	.	A					
D6948	A3	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	I	.	.	.	.	.	A					
ks	A3	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	I	.	.	.	.	.	A					
YS07	A3	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	I	.	.	.	.	.	A					
HLJ-0504	A3	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	I	.	.	.	.	.	A					
117/14/Poland/2014	A3	.	.	F	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	S	.	.	L	.	I	.	.	.	.	.	A					
li4129/2014	A3	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	L	.	I	.	.	.	.	.	A					
VRD-19-048 19VIR8426-10/2019	A3	.	.	L	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	L	.	I	.	.	.	.	.	A					
1/chicken/ARG/P33/15	A4	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	I	.	D	.	G	.	.	.					
dIBDV/UY/2014/2202	A4	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	D	.	G	.	.	.					
1/chicken/URY/1302/16	A4	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	D	.	G	.	.	.					
IBDV/Italy/1829/2011	A6	ND	ND	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
002-73	A7	.	.	.	D	.	P	G	S	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					

Tabla 24- Alineamiento de aminoácidos de VP1, mostrando las posiciones variables tanto en las cepas argentinas como en las representativas de cada genotipo.

| | | Segmento B | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

4.4.2.2.3 Variantes intrahospedero

Se detectaron variantes intrahospedero en los Segmentos A y B de las muestras uruguayas analizadas es esta sección, correspondientes a las muestras diagnosticadas como positivas para IBDV que no fueron usadas para poner a punto la metodología de multiplex-PCR-NGS. En ciertas posiciones, la frecuencia de las variantes fue mayor al 10%. Las variaciones consistieron en cambios de un solo nucleótido y/o variaciones de dos nucleótidos ligados que ocasionalmente alteran la secuencia de aminoácidos. En las Tablas 25 y 26 se especifican las variantes intrahospedero de los Segmentos A y B de las muestras uruguayas analizadas en esta sección. En la muestra 232303, se detectaron haplotipos, y las posiciones nucleotídicas correspondientes a estos haplotipos se indican en color gris.

Tabla 25- Variantes nucleotídicas detectadas en el Segmento A de todas las muestras uruguayas analizadas en esta sección. Se denota la cobertura, la frecuencia, el CDS, la posición en CDS de cada variante, el número de codón en el CDS, así como si generan cambios en el codón y secuencia aminoacídica codificante.

Cepa	Cambio	Cobertura	Frecuencia de variante	CDS	Posición CDS	Número codón CDS	Número codón poliproteína	Cambio en el codón	Cambio aa
442201	T -> C	333	33.0%	VP3	282	94	816	AAT -> AAC	
442202	A -> G	40216	17.0%	VP2	486	162	162	GAA -> GAG	
462204	A -> T	1113	21.1%	VP3	858	286	1008	GAA -> GAT	E -> D
232302	C -> T	6563	21.7%	VP3	333	111	833	TAC -> TAT	
232303	T -> C	2045	10.3%	VP2	1326	442	442	TTT -> TTC	
	T -> C	1340	10.7%	VP2	1299	433	433	AAT -> AAC	
	G -> A	1345	10.3%	VP2	1272	424	424	GAG -> GAA	
	C -> T	1292	11.0%	VP2	1260	420	420	ACC -> ACT	
	A -> G	610	13.4%	VP2	1056	352	352	GTA -> GTG	
	A -> G	610	13.6%	VP2	1050	350	350	ACA -> ACG	
	T -> A	482	11.4%	VP2	990	330	330	AGT -> AGA	S -> R
	C -> T	1612	24.1%	VP2	969	323	323	GAC -> GAT	
	C -> T	2162	34.6%	VP2	957	319	319	GGC -> GGT	
	T -> C	2107	38.5%	VP2	915	305	305	ATT -> ATC	
	C -> A	2051	37.8%	VP2	894	298	298	ACC -> ACA	
	A -> C	2433	41.9%	VP2	880	294	294	ATT -> CTT	I -> L
	T -> C	1859	44.2%	VP2	864	288	288	AAT -> AAC	
	G -> A	2659	37.6%	VP2	850	284	284	GCC -> ACC	A -> T
	G -> A	1800	40.6%	VP2	835	279	279	GAC -> AAC	D -> N
	T -> A	2062	36.8%	VP2	807	269	269	ACT -> ACA	
	T -> C	2511	31.3%	VP2	789	263	263	CTT -> CTC	
	A -> C	2514	31.1%	VP2	759	253	253	CAA -> CAC	Q -> H

	T -> C	36123	29.3%	VP2	558	186	186	GCT -> GCC	
	C -> T	534	14.4%	VP2	339	113	113	CTC -> CTT	
	C -> T	534	14.4%	VP5	373	125	-	CCC -> TCC	P -> S
	A -> G	967	13.9%	VP2	226	76	76	AGC -> GGC	S -> G
	A -> G	967	13.9%	VP5	260	87	-	GAG -> GGG	E -> G
232304	T -> C	1093	41.9%	VP4	600	200	652	AGT -> AGC	
	A -> G	2086	18.8%	VP4	569	190	642	AAA -> AGA	K -> R
	G -> A	2938	20.7%	VP4	336	112	564	ACG -> ACA	
	T -> C	3614	21.1%	VP4	298	100	552	TTA -> CTA	
	T -> C	3936	21.6%	VP4	276	92	544	GGT -> GGC	
	A -> T	1006	10.8%	VP2	1317	439	439	GCA -> GCT	
	A -> G	11490	42.1%	VP2	480	160	160	GTA -> GTG	
	G -> A	489	13.1%	VP2	165	55	55	GGG -> GGA	
	G -> A	489	13.1%	VP5	199	67	-	GCT -> ACT	A -> T
262301	C -> T	429	47.1%	VP2	1011	337	337	ATC -> ATT	
262302	C -> T	3875	42,7%	VP4	741	247	699	CTC -> CTT	
	T -> C	24695	34,9%	VP2	585	195	195	GCT -> GCC	
262303	A -> G	4705	48,5%	VP3	166	56	778	ATG -> GTG	M -> V
	A -> G	55173	38,0%	VP2	486	162	162	GAA -> GAG	
032301	A -> G	4646	14,7%	VP3	130	44	766	AAG -> GAG	K -> E
042301	G -> T	133	22,6%	VP4	683	228	680	TGT -> TTT	C -> F
	T -> A	1080	24,6%	VP4	9	3	455	GCT -> GCA	

Tabla 26- Variantes nucleotídicas detectadas en el Segmento B de todas las muestras uruguayas analizadas en esta sección. Se denota la cobertura, la frecuencia, el CDS, la posición en CDS de cada variante, el número de codón en el CDS, así como si generan cambios en el codón y secuencia aminoacídica codificante.

Cepa	Cambio	Cobertura	Frecuencia de variante	CDS	Posición CDS	Número codón CDS	Cambio en el codón	Cambio aa
442201	A -> C	5657	47.4%	VP1	1427	476	CAA -> CCA	Q -> P
442202	**T -> C**	5419	27.2%	VP1	2244	748	GTT -> GTC	
	T -> C	603	17.4%	VP1	2019	673	GGT -> GGC	
	A -> C	3771	42.9%	VP1	1427	476	CAA -> CCA	Q -> P
	C -> A	1631	19.3%	VP1	831	277	ATC -> ATA	
462204	A -> C	5966	41.2%	VP1	1427	476	CAA -> CCA	Q -> P
	T -> A	2604	40.5%	VP1	977	326	GTC -> GAC	V -> D
232302	A -> C	15790	23.1%	VP1	1427	476	CAA -> CCA	Q -> P
232303	T -> C	2624	10.0%	VP1	2442	814	TAT -> TAC	
	T -> C	3654	10.2%	VP1	2400	800	GCT -> GCC	
	T -> C	2750	11.1%	VP1	2310	770	TTT -> TTC	
	C -> T	5189	10.2%	VP1	2238	746	GAC -> GAT	
	C -> T	1969	10.4%	VP1	2061	687	TCC -> TCT	

	G -> A	1945	48.4%	VP1	2055	685	GTG -> GTA	
	C -> T	5900	16.0%	VP1	1637	546	CCC -> CTC	P -> L
	C -> T	5921	16.5%	VP1	1608	536	GAC -> GAT	
	C -> T	4890	16.2%	VP1	1584	528	TTC -> TTT	
	T -> G	2581	18.0%	VP1	1545	515	GAT -> GAG	D -> E
	C -> T	5131	18.5%	VP1	1516	506	CTG -> TTG	
	A -> G	5938	17.2%	VP1	1494	498	ACA -> ACG	
	C -> T	7113	15.9%	VP1	1443	481	GGC -> GGT	
	C -> A	6830	47.5%	VP1	1427	476	CCA -> CAA	P -> Q
	T -> C	2069	18.6%	VP1	1173	391	GCT -> GCC	
	G -> A	3087	17.5%	VP1	1140	380	GGG -> GGA	
	C -> T	2106	18.1%	VP1	1083	361	AAC -> AAT	
	C -> T	2494	12.1%	VP1	984	328	AGC -> AGT	
	T -> C	2519	11.3%	VP1	975	325	TAT -> TAC	
	C -> A	2153	10.8%	VP1	831	277	ATC -> ATA	
	G -> A	2129	11.0%	VP1	810	270	ACG -> ACA	
	G -> A	4446	15.9%	VP1	615	205	CTG -> CTA	
	A -> G	5024	18.1%	VP1	582	194	AAA -> AAG	
	G -> A	4714	17.6%	VP1	555	185	GGG -> GGA	
	T -> C	877	24.1%	VP1	483	161	GAT -> GAC	
	T -> C	947	23.3%	VP1	474	158	AAT -> AAC	
	C -> T	961	22.8%	VP1	463	155	CTG -> TTG	
	A -> G	1006	23.0%	VP1	440	147	GAC -> GGC	D -> G
	C -> T	961	24.3%	VP1	309	103	GAC -> GAT	
	C -> T	953	24.6%	VP1	300	100	CCC -> CCT	
	T -> C	1557	15.0%	VP1	285	95	CCT -> CCC	
	C -> A	4614	32.0%	VP1	38	13	ACG -> AAG	T -> K
232304	A -> C	1948	31.9%	VP1	1427	476	CAA -> CCA	Q -> P
262301	A -> C	5061	46.7%	VP1	1427	476	CAA -> CCA	Q -> P
262302	A -> C	1306	49.3%	VP1	1427	476	CAA -> CCA	Q -> P
262303	C -> T	3532	32.8%	VP1	2166	722	ACC -> ACT	
	A -> C	1947	48.3%	VP1	1427	476	CAA -> CCA	Q -> P
	A -> G	536	12.5%	VP1	754	252	ATC -> GTC	I -> V
	T -> C	560	13.6%	VP1	747	249	CTT -> CTC	
	T -> C	566	12.9%	VP1	741	247	GAT -> GAC	
	T -> C	584	15.8%	VP1	735	245	GTT -> GTC	
	TT -> CC	781 -> 788	11.3% -> 11.4%	VP1	727	243	TTT -> CCT	F -> P
032301	A -> C	4935	30.5%	VP1	1427	476	CAA -> CCA	Q -> P
	A -> C	199	24.6%	VP1	153	51	GCA -> GCC	
	A -> T	199	25.1%	VP1	153	51	GCA -> GCT	
042301	G -> A	6739	13.6%	VP1	2630	877	AGC -> AAC	S -> N
	C -> T	4433	13.5%	VP1	2127	709	AAC -> AAT	
	A -> C	8185	26.8%	VP1	1427	476	CAA -> CCA	Q -> P

4.4.3 Discusión

4.4.3.1 Estandarización de la metodología

La evolución de IBDV ha producido cepas con características genéticas, antigénicas y patogénicas diversas. Es crucial realizar la caracterización genómica de estas cepas circulantes y de los nuevos aislamientos de IBDV para comprender su evolución viral y adaptar los esquemas de vacunación de manera óptima a los contextos locales. En este sentido, en este capítulo, hemos desarrollado un método de multiplex-PCR-NGS que simplifica la secuenciación de los genomas de IBDV. El paso de enriquecimiento por PCR garantiza secuenciar de forma directa muestras con bajos títulos virales, lo cual es difícil de lograr utilizando métodos de secuenciación tradicionales. Este enriquecimiento por PCR suele aplicarse en virus recientemente emergidos, como el SARS-CoV-2 y el Zika, o en aquellos con una secuencia consistente que facilita el diseño de cebadores (Worobey et al., 2016; Lambisia et al., 2022; Mackie et al., 2022). Aunque IBDV es relativamente estable para ser un virus de ARN, el diseño de los cebadores requirió un esfuerzo adicional. Para abordar la diversidad de nucleótidos presentes en ciertas posiciones de las cepas de IBDV, incorporamos bases degeneradas en algunos de los cebadores diseñados (Anexo 2a).

Con el fin de reducir los tiempos y costos de secuenciación diseñamos cebadores quiméricos que contienen una región complementaria con el genoma de IBDV y los adaptadores Illumina en el extremo 5' (Figura 22A). Este enfoque simplifica notablemente la preparación de librerías, ya que solo se requiere el indexado de las muestras para realizar la secuenciación. Aunque el uso de cebadores con adaptadores es común en estudios metagenómicos de bacterias (Bjerre et al., 2019; Amos et al., 2020) y SARS-CoV-2 (Gohl et al., 2020), hasta el momento no se ha aplicado en virus aviares. Otras alternativas para el enriquecimiento viral incluyen el uso de huevos embrionados de pollo y la propagación en cultivos celulares, aunque estos métodos pueden ser laboriosos y demandan capacitación especializada (Atkinson et al., 2016; Guerbois et al., 2016; Misencik et al., 2016). Además, la mayoría de los virus de campo no se replican fácilmente en cultivos celulares y pueden requerir varios pasajes para su adaptación. Del mismo modo, las sondas de captura de hibridación son más costosas y los procedimientos llevan más tiempo que la PCR.

Combinar la metodología de enriquecimiento con la secuenciación masiva es sencillo de implementar y proporciona secuencias genómicas de IBDV de manera rápida y confiable. Obtuvimos y caracterizamos exitosamente las secuencias genómicas consenso de ambos segmentos de IBDV para todas las muestras utilizadas en la estandarización de la metodología. La muestra 031901, que no se había obtenido por Viroma, y cuyo diagnóstico por qPCR mostró valores de Ct elevados (10^3copias/ µL), fue secuenciada completamente con parámetros de cobertura adecuados.

La metodología fue estandarizada utilizando muestras previamente genotipadas que circulaban en América del Norte y del Sur, abarcando cepas clásicas, variantes, hipervirulentas y *Distinct* de IBDV (Tabla 17).

El análisis filogenético realizado con genomas completos exhibió un patrón de agrupación consistente con el observado en estudios recientes que emplearon tanto secuencias parciales como genomas completos de IBDV (Wang et al., 2021; Pikuła et al., 2023).

Según el nuevo sistema de clasificación, las cepas se asignaron a los genotipos A1B1 (clásico), A2B1 (variante), A3B2 (hipervirulento) y A4B1 (*Distinct*). Las cepas del genotipo A4B1 están asociadas con cepas *Distinct* previamente reportadas en Argentina y Uruguay (Tomás et al., 2020). Estas cepas presentan los marcadores de aminoácidos característicos del genogrupo *Distinct* y la firma SEG en la posición 145-147 de VP1, típica de las cepas *Distinct* circulantes en ambos países (Vera et al., 2015; Tomás et al., 2020). Se destaca que dentro de este genotipo se encuentra la cepa uruguaya 031901, la cual no se pudo secuenciar por Viroma y es la única que no presenta el marcador aminoacídico característico de las cepas *Distinct* en VP5 en la posición R135; en su lugar, mostró una C (Tabla 22). Esto puede explicarse porque el R135 había sido descrito como un posible marcador de cepas *Distinct,* ya que estaba presente en todas las cepas *Distinct* disponibles hasta el momento, aunque se requerían análisis adicionales para confirmar su validez (Tomás et al., 2020). Con base en la información obtenida en este capítulo, podemos concluir que en la muestra de la bursa de Fabricio 031901 existió una coinfección entre cepas de campo de IBDV (*Distinct*) y CAV (clado II).

Las cepas clasificadas como clásicas o del genotipo A1B1 mostraron una estrecha asociación con la cepa vacunal 150127/0.2, la cual, como describimos en el capítulo 3, guarda una gran similitud con la vacuna CEVAC-IBDL (Abed et al., 2018) que contiene

la cepa Winterfield-2512. Esta cepa está presente en las vacunas utilizadas en Uruguay y Argentina para inmunizar a las aves contra IBDV, lo que sugiere que las cepas agrupadas en este genotipo podrían corresponder a cepas vacunales.

En Argentina, otra vacuna utilizada contra IBDV es la vacuna a virus vivo MB-1, que contiene la cepa atenuada mb derivada de una cepa hipervirulenta ks (Lazarus et al., 2008). Tanto esta cepa vacunal como las cepas argentinas A333D y A350A se clasificaron en el genotipo A3B2. La cepa mb atenuada presentó entre 3 y 5 cambios nucleotídicos en comparación con ambas cepas hipervirulentas argentinas, siendo solo uno de ellos responsable de un cambio de aminoácido en la posición 279 (Asn → Asp) de VP2. El aminoácido 279Asp no está asociado con la atenuación y puede encontrarse tanto en cepas atenuadas como virulentas (Lazarus et al., 2008). Es importante destacar que las granjas en Argentina, donde se colectaron las muestras, fueron vacunadas con la vacuna MB-1. Por lo tanto, las cepas A333D y A350A secuenciadas en este capítulo podrían corresponder a virus vacunales.

Las cepas de América del Norte se agruparon con las cepas variantes en ambos segmentos, formando parte del genotipo A2B1. Este genotipo surgió en la década de 1980 en Estados Unidos (Jackwood et al., 1985) y es actualmente prevalente. Su presencia también se ha reportado en China, Corea del Sur, Sudáfrica, España y varios países de América Latina (Cao et al., 1998; Banda et al., 2003; Jackwood y Sommer-Wagner, 2007; Kim et al., 2010). La secuencia codificante del Segmento A de las tres cepas estadounidenses mostró una mayor identidad nucleotídica con la cepa Variante E, una de las primeras cepas variantes que circulaban en Estados Unidos (Rosenberger et al., 1985). Por otro lado, las secuencias codificantes del Segmento B exhibieron una mayor identidad con las cepas coreanas 19D38 y 19D44, las cuales son cercanas a las variantes estadounidenses (Thai et al., 2021), y con la cepa variante 9109, aislada en los Estados Unidos (Banda et al., 2001). Por lo tanto, estas cepas podrían ser virus de campo que han acumulado cambios y evolucionado a partir de las variantes ancestrales de Estados Unidos.

4.4.3.2. Caracterización genómica de las cepas de campo

La metodología desarrollada en este capítulo se aplicó en muestras de campo uruguayas y argentinas, permitiendo obtener los genomas completos de estas cepas. Como se mencionó en los resultados, ninguna de las cepas analizadas mostró evidencia de

recombinación, y la cepa uruguaya 471902 fue la única reordenante. La secuencia genómica completa de esta cepa, obtenida mediante el método Multiplex-PCR-NGS, valida los resultados del abordaje Virómico (Capítulo 3).

Los análisis filogenéticos revelan distintos genotipos de IBDV. En Uruguay, se identificaron cepas correspondientes a los genotipos A8B1 y A1B1, las cuales se asociaron con las cepas vacunales D78 y 150127/0.2 respectivamente. Las cepas uruguayas 032301 y 042301 mostraron 1 o 2 cambios aminoacídicos respecto a la cepa vacunal D78, sin presentar el cambio N253, que se ha asociado con la reversión a la virulencia de la cepa GA-1 (Jackwood et al., 2008). Por lo tanto, estas cepas uruguayas podrían ser consideradas como cepas vacunales. En cuanto a las cepas uruguayas agrupadas en el genotipo A1B1, la mayoría fueron idénticas a nivel aminoacídico con la cepa vacunal clásica 150127.0-2, a excepción de las cepas 462204, 232303 y 262303 que presentaron entre 1-2 cambios aminoacídicos. Por consiguiente, también es posible que estas cepas sean virus con origen vacunal.

Por otro lado, los análisis filogenéticos de los segmentos completos A y B de los virus argentinos indican que pertenecen al genotipo A2dB1b. Este genotipo, documentado por primera vez en China en la década de 2010 (Fan et al., 2019) y ampliamente extendido en Asia y África (Myint et al., 2021; Thai et al., 2021; Aliyu et al., 2022; Legnardi et al., 2023), ha adquirido una importancia creciente en la epidemiología de IBDV. El alto nivel de homogeneidad genómica de los virus argentinos y su agrupación monofilética en las filogenias (Figura 24) sugieren una introducción única y reciente en Argentina. Además, nuestros hallazgos sugieren que los virus A2dB1b argentinos están más estrechamente relacionados con las cepas chinas que con aquellas que circulan en Japón, Corea del Sur, Malasia y Egipto, lo que sustenta un origen directo desde China. No obstante, el mecanismo exacto de la propagación del virus desde China hasta Argentina aún no está claro. Aunque es probable que el comercio de animales vivos y productos avícolas haya facilitado la dispersión desde China hacia Japón, Malasia y Corea del Sur (Wang et al., 2022), no existen registros de este tipo de comercio desde China hasta Argentina (Base de datos de Comercio de la ONU). Una situación similar se observó en Egipto (Legnardi et al., 2023). Es probable que la alta resistencia IBDV a diversas condiciones fisicoquímicas haya facilitado su propagación a largas distancias a través de medios alternativos que no implican animales vivos ni sus productos derivados (Petek et al., 1973; Alexander y Chettle, 1998; Mandeville et al., 2000). La aparición del genotipo

A2dB1b en Argentina podría representar un cambio epidemiológico significativo y amenazar gravemente a la industria avícola local. Una consecuencia potencial es que estas nuevas cepas desplacen a las del genotipo A4B1 (*Distinct*), que anteriormente representaban más del 80% de las muestras positivas para IBDV en Argentina (Vera et al., 2015). Otra posible consecuencia de la introducción del genotipo A2dB1b en Argentina es la aparición de virus reordenantes. Este mecanismo de variación genética ha sido explotado con éxito por IBDV como lo discutimos en el capítulo 3. En China, la cocirculación de los genotipos A3B3 y A2dB1b facilitó la aparición de virus reordenantes, como el recientemente reportado A2dB3 (Wang et al., 2022). Sin embargo, no detectamos cepas reordenantes en Argentina a pesar de la cocirculación de A2dB1b con A4B1 y varias vacunas clásicas e hipervirulentas. Es posible que, de haber ocurrido tales eventos, estos podrían haber disminuido la aptitud de las cepas y permanecer en frecuencias indetectables en la población avícola. En cualquier caso, es fundamental realizar un análisis continuo de muestras de campo para aumentar la probabilidad de detectar tempranamente tales eventos de reordenamiento.

La propagación del genotipo A2dB1b a varios países y su establecimiento como una cepa de campo circulante, incluso en países con vacunación intensiva, puede atribuirse a características específicas de ciertos aminoácidos (Zhang et al., 2022). En este sentido, las cepas A2dB1b exhiben residuos idénticos a la cepa Variante E de América del Norte en posiciones críticas dentro del bucle P_{HI} en la hvVP2 (318D y 323E) (Figura 25). Estos residuos son cruciales para reducir la protección generada por las vacunas clásicas contra la Variante E (Heine et al., 1991). También son responsables de disminuir la protección de las vacunas hipervirulentas contra las cepas chinas A2dB1b (Fan et al., 2020; Li et al., 2020; Fan et al., 2022). Dado que las vacunas clásicas e hipervirulentas se administran comúnmente en Argentina, y de hecho fueron los tipos de vacunas aplicadas en las granjas donde se colectaron las muestras (Tabla 18), esto podría explicar la circulación A2dB1b en el país. Un estudio reciente demostró que las cepas Variante E y SHG19 (A2dB1b) están estrechamente relacionadas antigénicamente (Broadbent et al., 2023). Esto sugiere que las vacunas derivadas de la Variante E podrían ser candidatas adecuadas para controlar efectivamente el genotipo A2dB1b. Esta información es importante en el contexto de una posible introducción de este genotipo en nuestro país, especialmente considerando que en Uruguay se utilizan vacunas clásicas para controlar la enfermedad.

Identificamos 7 cambios de aminoácidos como marcadores para el genotipo A2dB1b (Figura 25; Tablas 23 y 24). Estos cambios están presentes en VP5 (3R, 40P, 88R y 143E), VP2 (252I), VP3 (951L) y VP1 (240E). Aunque otros marcadores de aminoácidos han sido previamente descritos (por ejemplo, 221K, 299S en hvVP2), nuestro análisis indica también su presencia en otros genogrupos (Figura 25). Es interesante destacar que se ha descrito un sitio adicional de inicio de traducción prematura de VP5 para el genotipo A2dB1b, lo cual también se observa en los virus argentinos secuenciados en este capítulo. Se necesita un análisis más detallado para determinar si estas proteínas VP5 más grandes tienen o no expresión celular. Además, todos los virus A2dB1b argentinos muestran una sustitución en VP1 (E72D) que no ha sido detectada en ninguna secuencia disponible en bases de datos (Tabla 24). Por lo tanto, esta sustitución actúa como un marcador de aminoácidos para los virus A2dB1b circulantes en América del Sur. Las implicaciones biológicas de estos marcadores de aminoácidos siguen siendo desconocidas. Otros residuos de aminoácidos ocurren en algunos virus argentinos analizados (Figura 25; Tablas 23 y 24). Entre ellos, los cambios destacados incluyen T222A, A321T y A321V en la hvVP2 (Figura 25). Estos cambios han sido asociados previamente con variaciones en la antigenicidad y patogenicidad de IBDV (Letzel et al., 2007; Jackwood et al., 2011; Escaffre et al., 2013; Samy et al., 2020). Las sustituciones en estos residuos críticos indicarían que el virus está explorando diferentes paisajes evolutivos, probablemente impulsado por la adaptación al entorno local.

Es probable que el genotipo A2dB1b continúe extendiéndose por toda Argentina, potencialmente alcanzando otros países de América del Sur. Un patrón similar se observó previamente con el genotipo A4B1, donde se documentaron dos eventos independientes de propagación desde Argentina hacia Uruguay (Tomás et al., 2020). Se recomienda la implementación de programas específicos de vigilancia para detectar tempranamente el genotipo A2dB1b en todos los países de la región. Ya se ha desarrollado un sistema de RT-qPCR para detectar las cepas A2dB1b, ofreciendo una alternativa rápida y económica para la vigilancia, especialmente en muestras numerosas (Wang et al., 2023). Es muy probable que estás cepas estén circulando en un futuro próximo en Uruguay y debemos estar preparados para su diagnóstico, análisis y control.

4.4.3.3 Variantes intrahospedero

La metodología desarrollada en este capítulo permite, además de proporcionar las secuencias genómicas consenso de las cepas, la detección de variantes intrahospedero

(Tablas 20, 21, 25 y 26). Al analizar las variantes intrahospedero en la muestra argentina 397_11 (Tablas 20 y 21) y en la muestra uruguaya 232303 (Tablas 25 y 26) obtuvimos información sobre el origen de esta variación. En la muestra argentina 397_11 estas variantes intrahospedero estaban vinculadas en una única lectura y dieron lugar a haplotipos en el gen VP2 y en el gen VP1 (Tablas 20 y 21). Las variantes nucleotídicas en el gen VP1 se encuentran principalmente en una región no informativa del genoma, por lo que no pudimos determinar a qué genogrupo pertenecen estas variantes intrahospedero. El haplotipo de variantes encontrado en el gen VP2 es característico de cepas hipervirulentas. Este haplotipo se encuentra en la región hvVP2, y una de las variantes (664) genera S222A (Tabla 20), un marcador de aminoácidos bien conocido de cepas hipervirulentas. Este haplotipo también está presente en la cepa de vacuna hipervirulenta mb, que se ha utilizado cada vez más desde 2016 para prevenir la enfermedad en Argentina. La posibilidad de coinfección con la cepa de vacuna podría explicar ciertas variantes intrahospedero, que se detectan en la muestra 397_11. Aunque los pollos de esta muestra no tienen registro de vacunación para MB-1, es común el uso de la vacuna en la granja y podría estar presente en el campo. Eventos de coinfección entre diferentes cepas de IBDV en muestras de campo ya han sido reportados (Thai et al., 2021). En situaciones de coinfección, la cepa de vacuna podría replicarse junto con las cepas de campo, lo que resultaría en niveles de detección más bajos en la muestra. La identificación de eventos de coinfección entre cepas de campo y de vacuna es relevante, ya que podrían aumentar la probabilidad de recombinantes y reordenantes (Nouën et al., 2006; He et al., 2009; Jackwood, 2012; Lee et al., 2017; Abed et al., 2018; Pikuła et al., 2018; Wu et al., 2020; Feng et al., 2022; Guzmán et al., 2022).

En la muestra uruguaya 232303, se identificaron variantes intrahospedero, dando lugar a haplotipos en los genes VP5, VP2 y VP1 (Tablas 25 y 26). El haplotipo de variantes encontrado es característico de cepas atenuadas, incluyendo la cepa vacunal D78, utilizada en nuestro país para prevenir la enfermedad. Entre las variantes encontradas, algunas generan cambios aminoácidos en VP5 (E87G y P125S), VP2 (S76G, Q253H, D279N, A284T I294L y S330R) y VP1 (K13T, D147G, D515E y P546L) que están presentes en cepas atenuadas, como la cepa D78 (Tabla 22). La posibilidad de coinfección con la cepa vacunal D78 podría explicar ciertas variantes intrahospedero detectadas en la muestra 232303, que posiblemente corresponde a una cepa vacunal clásica, como discutimos anteriormente. Aunque los pollos de esta muestra no tienen

registro de vacunación, es común en nuestro país aplicar planes de vacunación donde se administra *in ovo* o al día de edad una vacuna basada en inmunocomplejos antígeno-anticuerpo, que contiene una cepa clásica Winterfield 2512, y aproximadamente a las 2-3 semanas de edad, se administra la vacuna D78 como refuerzo. Esta situación podría explicar la coinfección detectada en la muestra 232303. El resto de las variantes intrahospedero detectadas en las muestras podrían surgir debido a la coinfección con cepas del mismo tipo o cuasiespecies que ya se han reportado para el virus de la enfermedad de Gumboro (Jackwood y Sommer, 2002). Aunque es poco frecuente, tampoco podemos descartar errores procedimentales en la transcripción inversa o en la reacción de polimerasa durante la secuenciación de Illumina (Petrackova et al., 2019).

En resumen, hemos desarrollado una metodología basada en Multiplex-PCR acoplada a secuenciación masiva para caracterizar genómicamente el virus de Gumboro. Este método es confiable, rápido y económico en comparación con otros procedimientos de secuenciación de genoma completo, y proporciona una visión integral de las características genéticas y evolutivas del virus, incluyendo la detección de eventos de coinfección en el campo. A lo largo de este capítulo, hemos aplicado con éxito esta metodología para caracterizar cepas argentinas de un genotipo recientemente introducido en la región, lo cual podría tener un impacto significativo en la situación epidemiológica de IBDV en el área. Esperamos que este enfoque metodológico contribuya de manera significativa a la vigilancia de la enfermedad y al manejo de brotes en la industria avícola, ofreciendo una herramienta valiosa para enfrentar los desafíos emergentes en la región.

4.4.4 Publicación de resultados

El desarrollo y la estandarización de la metodología basada en Multiplex-PCR acoplada a secuenciación masiva fue publicada (Anexo 3):

Techera C, Tomás G, Grecco S, Williman J, Hernández M, Olivera V, Banda A, Vagnozzi A, Panzera Y, Marandino A, Pérez R. 2023. “A rapid and affordable amplicon-based method for next-generation genome sequencing of the infectious bursal disease virus”. Journal of Virological Methods. doi: 10.1016/j.jviromet.2023.114807.

La caracterización genómica de las cepas argentinas fue publicada (Anexo 3):

Tomás G, Techera C, Marandino A, Olivera V, Williman J, Panzera Y, Pérez R, Vagnozzi A. 2024. “Genomic characterization of infectious bursal disease virus in Argentina provides evidence of the recent transcontinental spread of Chinese genotype A2dB1b”. Avian Pathology. doi: 10.1080/03079457.2024.2355918.

4.5. Capítulo 5

Desarrollo de metodologías de Multiplex-PCR NGS para secuenciación de regiones genómicas de cepas del virus de la anemia infecciosa aviar y el virus de Marek.

4.5.1 Metodología

4.5.1.1 Estandarización de las metodologías

4.5.1.1.1 Muestras

Para estandarizar las metodologías de multiplex-PCR NGS se utilizaron cepas vacunales que se aplican en nuestro país para prevenir estas enfermedades. Para el virus de la anemia infecciosa aviar, se utilizó la cepa vacunal Nobilis P4, una vacuna atenuada de virus vivo desarrollada a partir de la cepa 26P4. Esta cepa se administra en Uruguay para inmunizar a las reproductoras y su progenie. En el caso del virus de la enfermedad de Marek, se empleó la cepa vacunal CVI988 (Rispens) que se encuentra en todas las vacunas que se aplican en nuestro país.

4.5.1.1.2 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácido nucleico de las cepas vacunales se realizó con el *kit QIAamp® DNA Mini Kit* (Qiagen), siguiendo el protocolo de *DNA Purification from Blood or Body Fluids*. En el caso de CAV se partió de 0.02 g de vacuna liofilizada resuspendida en 200 µl de PBS. Para MDV se usó una mezcla de 100 µl de vacuna y 100 µl de PBS.

4.5.1.1.3 Cebadores utilizados

En este capítulo se desarrollaron metodologías de enriquecimiento basadas en multiplex-PCR acoplada a secuenciación masiva (multiplex-PCR-NGS), para obtener los genomas completos de CAV y las secuencias completas codificantes de los genes Meq, pp38, vIL8 y gL implicados en la oncogenicidad, patogenicidad e infección viral de MDV. Para CAV, se diseñaron nuevos cebadores quiméricos siguiendo el procedimiento descrito para IBDV en la sección 4.4.1.1.3 del capítulo 4. Respecto a MDV, se emplearon cebadores quiméricos previamente diseñados por nuestro grupo en la Tesis de Maestría de Perbolianachis, 2021.

4.5.1.1.4 *Pools* de cebadores

Para CAV se generaron dos *pools* de cebadores (*pool 1* y *pool 2*) y se utilizó un juego de cebadores de forma individual (Figura 26), para evitar la generación de amplicones de pequeño tamaño en las reacciones de multiplex-PCR.

Para preparar los *pools,* se diluyeron 10 µL de cada cebador de un stock de 100 µM, hasta lograr una concentración final de 10 µM o 0.1 µM para cada uno.

Los cebadores CAV_11 FW y CAV_11 RV se llevaron a una concentración de uso de 10 µM a partir de un stock de 100 µM.

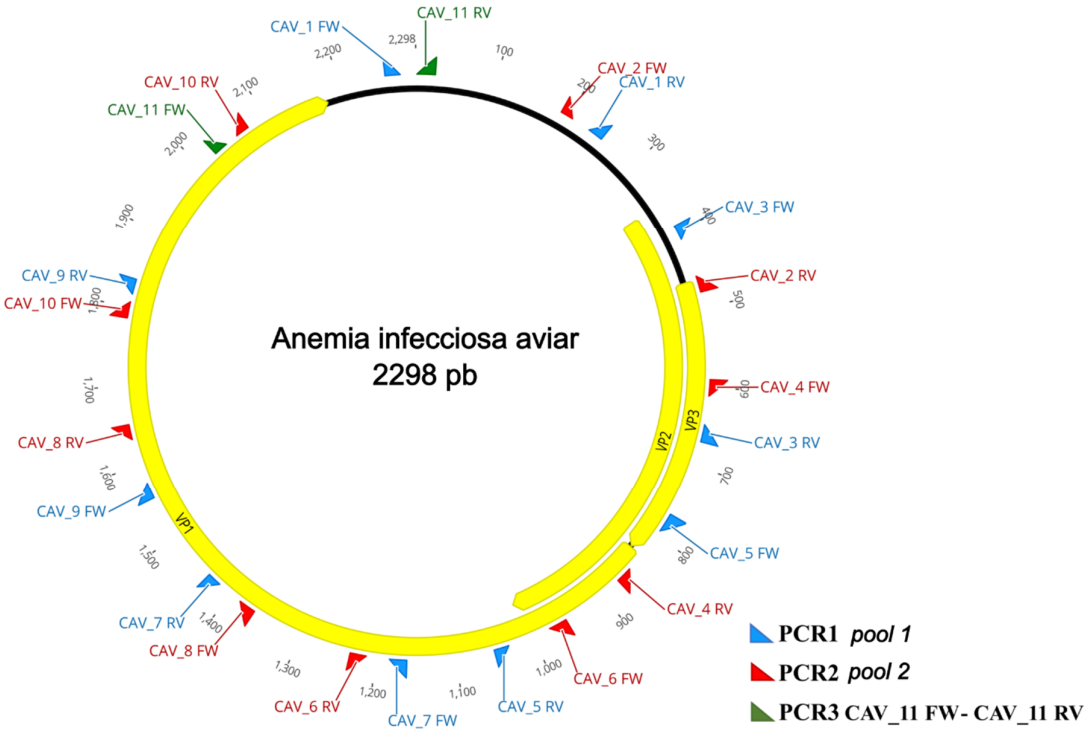


Figura 26- Representación del genoma de CAV y los cebadores quiméricos diseñados para la secuenciación independiente de kits comerciales de preparación de librerías Illumina. Los cebadores del *pool 1* se destacan en azul, los del *pool 2* en rojo, y los utilizados de forma independiente en verde.

Para MDV también se generaron dos *pools* de cebadores (*pool 1* y *pool 2*) (Figura 27). Para generar los *pools* también se diluyeron 10 µL de cada cebador de un stock de 100 µM, pero en este caso se llevó a una concentración final de 5 µM o 0.5 µM para cada uno.

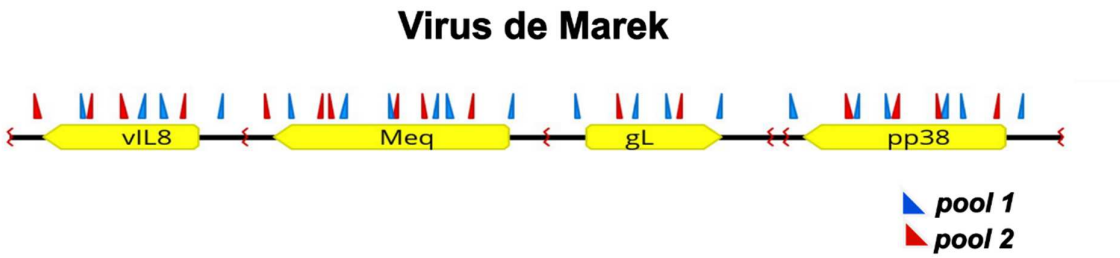


Figura 27- Representación de los genes Meq, pp38, vIL8 y gL de MDV concatenados y los cebadores quiméricos utilizados para la secuenciación independiente de kits comerciales de preparación de librerías Illumina. Los cebadores del *pool 1* se destacan en azul, los del *pool 2* en rojo.

4.5.1.1.5 Estandarización de las PCR para CAV

Cada multiplex PCR (*pool 1* y *pool 2*) y la singleplex PCR3 que utiliza un juego de cebadores (CAV_11 FW y CAV_11 REV) se estandarizaron con la enzima *Immolase DNA polymerase del ImmoMix*™ (Meridian Bioscience).

Para las multiplex PCR 1 y 2 se evaluó la amplificación óptima utilizando temperaturas de hibridación de 58, 60 y 62 °C, con concentraciones finales de cebadores de 0.3 µM y 0.02 µM para cada uno. Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 25 µL, que incluyeron 2.5 µL de ADNc molde, 12.5 µL de 2× ImmoMix (Meridian Bioscience), y 0.75 µL (10 µM) o 5 µL (0.1 µM) de cada *pool* de cebadores, junto con agua libre de nucleasas. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, e hibridación y extensión simultáneas a 58/60/62 °C durante 5 minutos, sin un paso de extensión final.

Para la singleplex PCR3 con el juego de cebadores CAV_11 FW y CAV_11 REV se evaluó la amplificación óptima utilizando temperaturas de hibridación de 58, 60 y 62 °C, con concentraciones finales de cebadores de 0.2 µM. Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 25 µL, que incluyeron 2 µL de ADNc molde, 12.5 µL de 2× ImmoMix (Meridian Bioscience), y 0.5 µL (10µM) de cada cebador, junto con agua libre de nucleasas. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 58/60/62°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 20 segundos, seguido de une extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 0.8%. Posteriormente, los

amplicones de las tres PCR se combinaron, purificaron y cuantificaron como se detalla en la sección 4.4.1.1.5 del capítulo 4.

4.5.1.1.6 Estandarización de multiplex PCR para MDV.

Cada multiplex PCR (*pool 1* y *pool 2*) se estandarizaron con la misma enzima que se utilizó en la sección anterior. Se evaluó la amplificación óptima con temperaturas de hibridación de 56, 58 y 60 °C, con concentraciones finales de cebadores de 0.3 µM y 0.02 µM para cada uno. Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 25 µL, que incluyeron 2.5 µL de ADNc molde, 12.5 µL de 2× ImmoMix (Meridian Bioscience), y 1.5 µL (5 µM) o 1µL (0.5 µM) de cada *pool* de cebadores, junto con agua libre de nucleasas.

El programa de ciclado fue el mismo que el de la sección anterior con la diferencia que las temperaturas de hibridación fueron 56/58/60 °C. Los productos de PCR de las multiplex se visualizaron, combinaron, purificaron y cuantificaron como se describe en la sección 4.4.1.1.5 del capítulo 4.

4.5.1.1.7 Preparación de librerías, secuenciación, ensamblaje y anotación de secuencias.

La preparación de librerías y la secuenciación de los amplicones indexados se hicieron siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.4.1.1.6 del capítulo 4. El ensamblaje y la anotación de las secuencias se hicieron como se describe en la sección 4.4.1.1.7. Se utilizo la secuencia de referencia MT671980.1 para CAV y la secuencia PP032835 de MDV para generar una planilla personalizada con la concatenación de las secuencias codificantes de los genes Meq, pp38, vIL8 y gL.

4.5.1.1.8 Aplicación de las múltiplex PCR-NGS para CAV y MDV a cepas de campo

Después de estandarizar la metodología de multiplex PCR-NGS para CAV, se aplicó a ocho muestras uruguayas que resultaron positivas para CAV entre 2019 y 2023. De estas muestras, seis mostraron coinfección con IBDV (031901, 352001, 222201, 232303, 262302 y 262303), cuyos detalles se encuentran en la Tabla 12 del capítulo 2. Las dos muestras restantes positivas para CAV (151901 y 451902) fueron colectadas en 2019 de aves ponedoras y aves parrilleras de 35 días de edad, respectivamente. El diagnóstico

para CAV de estas muestras se hizo como se detalla en la sección 4.2.1.3 del capítulo 2. La metodología también se aplicó a ocho cepas de campo argentinas, cuyos detalles se encuentran en la Tabla 27. El ADN y los datos de estas muestras fue proporcionado por el Instituto de Virología del INTA Castelar, Buenos Aires.

Tabla 27- Muestras de campo argentinas a las que se le aplicó la metodología de multiplex PCR-NGS de CAV.

Muestra	Ubicación	Año de colecta
A0081	Buenos Aires	2009
A0083	Buenos Aires	2009
A0087	Buenos Aires	2009
A0090 1	Entre Ríos	2009
A0090 2	Entre Ríos	2009
A0090 3	Entre Ríos	2009
A250	Buenos Aires	2013
A269 1	Mendoza	2014

Después de estandarizar la metodología de multiplex PCR-NGS para MDV, se aplicó a cuatro muestras uruguayas que resultaron positivas para MDV entre 2019 y 2023. El diagnóstico para MDV de estas muestras se hizo como se detalla en la sección 4.2.1.3 del capítulo 2 a partir de folículo de pluma y de bazo. De estas muestras, dos (032301 y 042301) mostraron coinfección con IBDV, cuya información se detalla en la Tabla 12 del capítulo 2. Además, la metodología se empleó en la muestra 261906 colectada de aves ponedoras en 2019, con sospecha de Marek visceral y en la muestra 462203 colectada en 2022 de aves parrilleras de 8 semanas de edad.

4.5.1.1.9 Análisis de secuencias consenso

Se realizaron análisis filogenéticos con las secuencias de genomas completos codificantes de cepas de CAV. Las secuencias consenso de la cepa vacunal y de todas las cepas de campo obtenidas en este capítulo se compararon con secuencias uruguayas obtenidas durante mi Tesis de Maestría y con secuencias de referencias de los diferentes clados de CAV obtenidas de la base de datos del NCBI (Anexo 1d). Los alineamientos, la detección de recombinantes, la búsqueda de los mejores modelos de sustitución y las filogenias fueron realizadas según se detalla en el capítulo 2.

La secuencia de aminoácidos correspondientes a VP1, VP2 y VP3 de CAV de las cepas uruguayas y argentinas obtenidas en este capítulo se compararon entre sí y con las cepas vacunales Nobilis P4 y Del-Ros.
La caracterización genética de MDV se realizó en base a la similitud de homología.

4.5.1.1.10 Detección de variantes intrahospedero

La detección de variantes intrahospedero se realizó como se detalla en la sección 4.4.1.1.9 del capítulo 4.

4.5.1.1.11 Amplificación por PCR de una región del gen Meq de MDV

El genoma de MDV contiene dos copias del gen Meq. Se ha informado que la cepa vacunal CVI988 tiene uno de sus genes Meq con el mismo tamaño que sus homólogos en cepas virulentas de MDV, mientras que la otra copia presenta una inserción en marco de 177 pb en el dominio transactivador carboxi-terminal (Conradie et al., 2019). Para confirmar si las cepas secuenciadas en este estudio eran virulentas o vacunales, se realizó una PCR dirigida a la región del gen Meq donde ocurre la inserción. Se empleó un juego de cebadores quiméricos diseñados específicamente para la multiplex-PCR de MDV, los cuales amplifican la región de interés. La amplificación se realizó utilizando la enzima *Immolase DNA polymerase de ImmoMix™* (Meridian Bioscience) y los cebadores F136509 y R136982 cuyas secuencias se especifican en Anexo 2c. Se esperan amplicones de 364 pb (sin inserción) y 541 pb (con inserción). Las concentraciones de los reactivos utilizados en la reacción de PCR y las condiciones de ciclado se detallan en las Tablas 28 y 29, respectivamente.

Tabla 28- Concentraciones de los reactivos de la reacción de PCR en tiempo final para el amplicón F136509- R136982.

Reactivos	Co	Cf	Vo/tubo (µL)
H2O			5.9
ImmoMix™	2×	1×	7.5
Cebador F136509	10 µM	0.2 µM	0.3
Cebador R136982	10 µM	0.2 µM	0.3
ADNc			1

Tabla 29- Protocolo de ciclado de la reacción de PCR en tiempo final para el amplicón F136509- R136982

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	1
Desnaturalización	95°C	30 segundos	35
Hibridación	64°C	30 segundos	
Extensión	72°C	20 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

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

4.5.2 Resultados

4.5.2.1 Estandarización de la metodología

4.5.2.1.1 Cebadores quiméricos para el enriquecimiento por PCR.

Para CAV se diseñaron 22 cebadores para obtener el genoma completo. Algunos de estos cebadores incluyeron bases degeneradas para abarcar todo el espectro de variantes de CAV (Anexo 2b). Una búsqueda de BLAST nucleotídica de cada cebador mostró similitud únicamente con las regiones genómicas esperadas de CAV.

Para MDV se utilizaron 36 cebadores previamente diseñados por nuestro grupo (Tesis de Maestría de Perbolianachis, 2021) para amplificar las secuencias completas codificantes de los genes Meq (12 cebadores), pp38 (10 cebadores), vIL8 (8 cebadores) y gL(6 cebadores) de MDV (Anexo 2c).

4.5.2.1.2 Estandarización de ensayos de múltiplex-PCR

Para estandarizar las reacciones de singleplex y multiplex-PCR de CAV, utilizamos la cepa vacunal Nobilis P4. Obtuvimos los mejores resultados con un volumen final de 25 µL, que incluye 2.5 µL de ADN molde, 5 µL de agua libre de nucleasas, 12.5 µL de 2× ImmoMix (Meridian Bioscience), y 5 µL de cada *pool* de cebadores (0.1 µM cada uno). La temperatura de hibridación óptima fue de 62 °C, proporcionando una amplificación eficiente tanto en singleplex como en multiplex-PCR.

Para estandarizar las reacciones de multiplex-PCR de MDV, empleamos la cepa vacunal CVI988 y obtuvimos los mejores resultados con un volumen final de 25 µL, que contiene 2.5 µL de ADN molde, 9 µL de agua libre de nucleasas, 12.5 µL de 2× ImmoMix (Meridian Bioscience), y 1 µL de cada *pool* de cebadores (0.5 µM cada uno). La temperatura de hibridación óptima fue de 58 °C.

La concentración del producto de PCR de CAV fue de 190 ng/µL y para MDV fue de 154 ng/µL. Los amplicones se diluyeron y se utilizaron 8,75 µL (100 ng totales) para la indexación.

4.5.2.1.3 Multiplex PCR-NGS

La concentración de los amplicones indexados para CAV fue 15 ng/µL y para MDV fue 47,2 ng/µL. Se observó una distribución no gaussiana con tamaños discretos entre 300

y 500 pb en ambos casos.

La secuenciación Illumina generó aproximadamente $2,5\times10^5$ lecturas para las cepas vacunales Nobilis P4 (CAV) y CVI988 (MDV). Estas lecturas fueron filtradas y ensambladas para obtener la secuencia genómica completa de CAV y las secuencias codificantes completas de los genes vIL8, Meq, gL y pp38 de MDV. Todas estas secuencias mostraron una amplitud de cobertura del 100% (Figura 28A y B). La cobertura media de Nobilis P4 fue de 1500, mientras que para CVI988, la cobertura media fue de 800 para vIL8, 1100 para Meq, 900 para gL y 1000 para pp38.

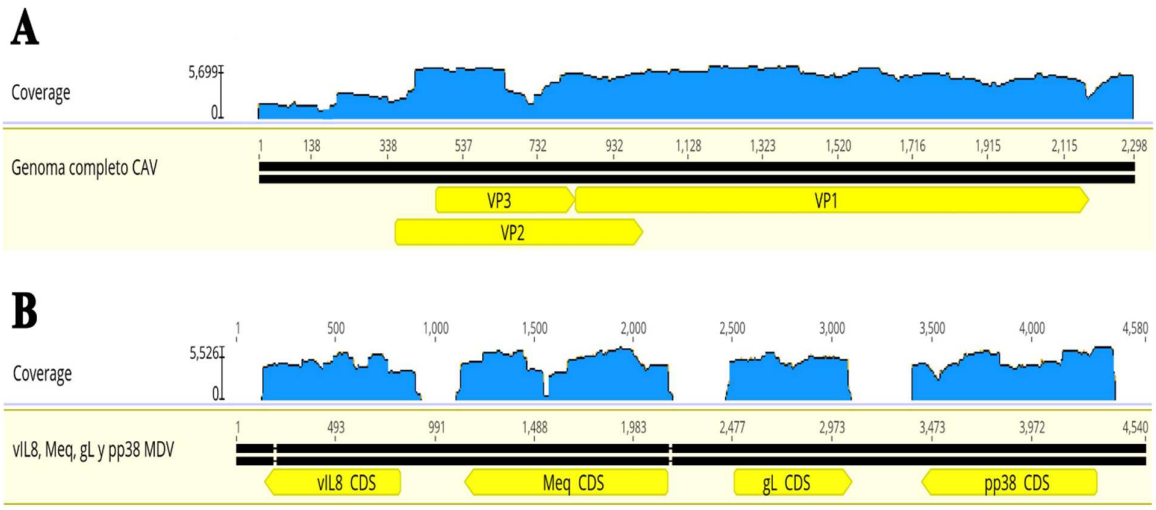


Figura 28- Diagrama de cobertura implementado en el software Geneious Prime de A) Genoma completo de CAV de la cepa vacunal Nobilis P4 y B) Secuencias completas codificantes de los genes vIL8, Meq, gL y pp38 de MDV de la cepa vacunal CVI988.

4.5.2.2 Aplicación de las metodologías multiplex-PCR-NGS a cepas de campo

4.5.2.2.1 Secuenciación de cepas de campo

Para CAV, la secuenciación Illumina generó entre $1x10^4$ y $7x10^5$ lecturas por cada una de las dieciséis muestras de campo, las cuales fueron filtradas y ensambladas para obtener las secuencias genómicas consenso completas. En la Tabla 30 se detallan la amplitud de cobertura del genoma completo y la cobertura media de cada cepa. Se obtuvo la secuencia codificante completa de CAV para todas las cepas, las cuales fueron utilizadas en la caracterización genómica.

Tabla 30- Amplitud de cobertura del genoma completo y cobertura media de cepas de campo de CAV secuenciadas.

	Amplitud de cobertura de genoma completo (%)	Cobertura media
031901	91,1	541
151901	95,3	10564
451902	95,3	4209
352001	92,7	656
222201	95,2	314
232303	95,2	260
262301	95,2	8311
262303	92,7	6039
A0081	91,1	234
A0083	95,4	782
A0087	90,1	100
A0090 1	100	2000
A0090 2	100	1000
A0090 3	95	1100
A250	100	1300
A269 1	100	1300

Para MDV, la secuenciación Illumina produjo entre $1x10^5$ y $7x10^5$ lecturas para cada una de las cuatro muestras de campo. Estas lecturas fueron filtradas y ensambladas para obtener las secuencias completas codificantes de los genes vIL8, Meq, gL y pp38. La amplitud de cobertura fue de 100% para todos los genes secuenciados. En la Tabla 31 se detalla la cobertura media de los genes para cada cepa.

Tabla 31- Cobertura media de los genes vIL8, Meq, gL y pp38 de MDV de cada cepa de campo uruguaya secuenciada.

	Cobertura media			
	vIL8	**Meq**	**gL**	**pp38**
261906	568	650	380	270
462203	800	1000	450	300
032301	3600	5550	3000	600
042301	11755	13728	13240	2000

4.5.2.2.2 Caracterización genómica de cepas de CAV

4.5.2.2.2.1 Análisis filogenéticos

No se encontró evidencia de recombinación en ninguna de las cepas uruguayas y argentinas de CAV secuenciadas en este capítulo. Las secuencias de las cepas 031901 y 352001 obtenidas mediante la metodología de multiplex-PCR-NGS fueron idénticas a las provenientes del abordaje virómico (capítulo 3).

Se realizó un análisis filogenético con las secuencias codificantes completas de los genomas de CAV obtenidas en este capítulo, junto con las empleadas en la sección 4.3.2.6 del capítulo 3. La filogenia presentó la misma topología que la obtenida en esa sección (Figura 29). La cepa vacunal se agrupó en el clado III, un resultado consistente con los hallazgos de mi Tesis de Maestría donde esta cepa fue secuenciada por Sanger. Las cepas de campo uruguayas obtenidas en este capítulo se agruparon en los clados II y III (Figura 29). La cepa 262303 (Clado III) presenta mayor identidad nucleotídica con una cepa asiática, una cepa uruguaya previamente secuenciada en nuestro laboratorio (361402) y la cepa vacunal Del-Ros. La cepa uruguaya 151901 (Clado III) muestra mayor identidad nucleotídica con la cepa uruguaya 361501, secuenciada anteriormente por nuestro grupo, y con cepas asiáticas.

El resto de las cepas uruguayas y argentinas se encuentran en el clado II y se agrupan en dos subgrupos (Figura 29). Un grupo de cepas presentan mayor identidad nucleotídica con cepas uruguayas previamente secuenciadas y asiáticas. Las restantes cepas uruguayas y argentinas muestran mayor identidad nucleotídica con cepas brasileras, argentinas y uruguayas obtenidas anteriormente en nuestro laboratorio.

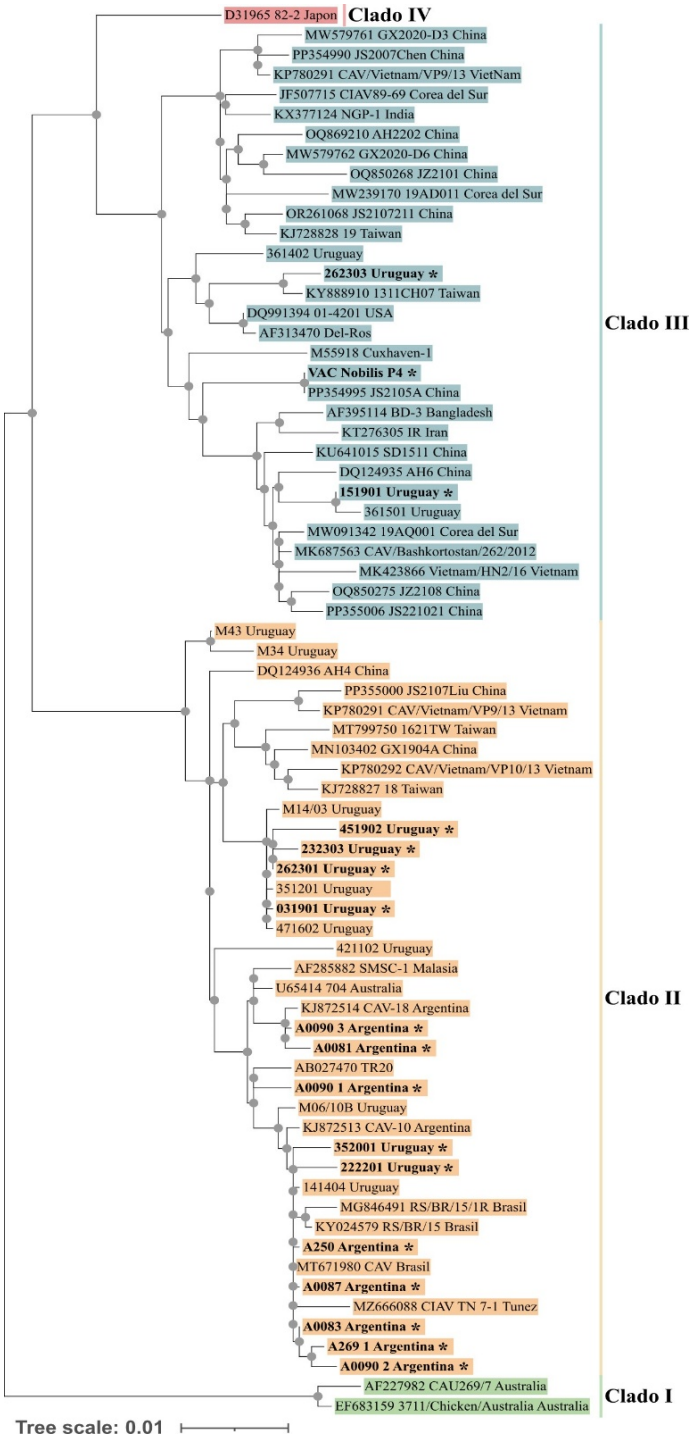


Figura 29- Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en los genomas completos codificantes de cepas representantes de los diferentes clados de CAV, secuencias uruguayas obtenidas durante mi Tesis de Maestría y las secuencias uruguayas obtenidas en este capítulo. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este conjunto de datos fue el GTR+I+G. Las secuencias de los diferentes clados se indican con nombres y colores. Los nodos con valores de soporte de aLRT superiores a 0,7 están marcados con círculos grises. Las secuencias obtenidas en este capítulo se indican en negrita y con un asterisco.

4.5.2.2.2.2 Análisis de secuencias de aminoácidos de VP1, VP2 y VP3 de CAV.

Las diferencias aminoacídicas entre las cepas de campo uruguayas, argentinas y las cepas vacunales Nobilis P4 y Del-Ros (muy utilizada en algunos países de la región) se muestran en la Tabla 32. La cepa uruguaya 262303 es la que posee mayor identidad aminoacídica con las cepas vacunales, presentando solo cuatro cambios con respecto a la cepa vacunal Del-Ros: dos en VP1 y dos en VP2.

Tabla 32- Diferencias aminoacídicas en las proteínas VP1, VP2 y VP3 de CAV entre las cepas de campo uruguayas y argentinas secuenciadas en este capítulo y las cepas vacunales Nobilis-P4 y Del-Ros.

		VP1																				VP2				VP3									
Cepa	**Clado**	22	75	92	97	139	144	149	157	254	283	287	290	294	370	413	447	5	169	177	180	4	23	25	31	51	54	67	73	103
A250_Argentina	II	H	I	G	L	Q	Q	C	V	E	P	T	P	Q	S	A	S	G	D	G	T	L	R	L	R	N	A	S	V	S
A269_Argentina	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A0081_Argentina	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A0083_Argentina	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A0087_Argentina	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A0090 1_Argentina	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A0090 2_Argentina	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A0090 3_Argentina	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.
031901_Uruguay	II	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	A	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.
451902_Uruguay	II	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	A	S	A	.	.	.	.	.	.	A	S	.	.	S	.	.	.	.	.	.
352001_Uruguay	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
222201_Uruguay	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	S	.	.	.	.
232303_Uruguay	II	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	S	.	.	.	.	.	.
262301_Uruguay	II	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	A	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.
151901_Uruguay	III	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	K	.	V	.	.	.
262303_Uruguay	III	Q	V	.	M	K	E	M	.	.	.	S	A	.	G	S	G	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Nobilis P4	III	.	V	D	M	K	E	.	M	G	.	.	A	.	.	.	T	.	G	.	.	P	Q	.	.	.	.	A	N	
Del-Ros	III	.	V	.	M	K	E	.	.	.	.	S	A	.	G	S	G	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

4.5.2.2.2.3 Variantes intrahospedero detectadas en cepas de CAV

Se detectaron variantes intrahopedero en los genomas completos codificantes de CAV de las muestras analizadas. En ciertas posiciones, la frecuencia de las variantes fue mayor al 10%. Las variaciones consistieron en cambios de un solo nucleótido y/o variaciones de dos nucleótidos ligados que ocasionalmente alteran la secuencia de aminoácidos. En la Tabla 33 se especifican las variantes intrahospedero observadas en la vacuna Nobilis P4 y en las muestras analizadas en este capítulo.

Tabla 33- Variantes nucleotídicas detectadas en el genoma completo codificante de CAV en la vacuna Nobilis P4 y en las muestras analizadas en este capítulo. Se denota la cobertura, la frecuencia, el CDS, la posición en CDS de cada variante, el número de codón en el CDS, así como si generan cambios en el codón y secuencia aminoacídica codificante.

Cepa	Cambio	Cobertura	Frecuencia de variante	CDS	Posición CDS	N°codón CDS	Cambio en el codón	Cambio aa
151901	G -> T	24729	15.9%	VP2	53	18	AGC -> ATC	S -> I
451902	A -> C	6989	15.0%	VP3	30	10	CCA -> CCC	
	A -> C	4215	20.1%	VP1	31	11	AGA -> CGA	
	G -> T	10356	14.1%	VP2	53	18	AGC -> ATC	S -> I
	G -> C	2131	12.7%	VP1	66	22	CAG -> CAC	Q -> H
	A -> T	10830	14.3%	VP3	77	26	GAA -> GTA	E -> V
	G -> A	6745	14.8%	VP3	92	31	AGA -> AAA	R -> K
	A -> C	6989	15.0%	VP2	136	46	AGG -> CGG	
	G -> C	8255	16.7%	VP3	158	53	CGC -> CCC	R -> P
	A -> T	10830	14.3%	VP2	183	61	GGA -> GGT	
	G -> A	6745	14.8%	VP2	198	66	CAG -> CAA	
	T -> C	6128	10.7%	VP1	216	72	TTT -> TTC	
	G -> C	8255	16.7%	VP2	264	88	TCG -> TCC	
	C -> A	1443	19.3%	VP3	279	93	TCC -> TCA	
	A -> G	7088	15.1%	VP3	365	122	TAA -> TGA	
	C -> A	1443	19.3%	VP2	385	129	CGA -> AGA	
	A -> G	7088	15.1%	VP2	471	157	GTA -> GTG	
	T -> G	5599	10.2%	VP1	480	160	GCT -> GCG	
	G -> A	2136	20.3%	VP1	486	162	CCG -> CCA	
	A -> C	4215	20.1%	VP2	504	168	GCA -> GCC	
	T -> C	4498	14.7%	VP1	507	169	GCT -> GCC	
	G -> C	2131	12.7%	VP2	539	180	AGC -> ACC	S -> T
	T -> C	5745	12.5%	VP1	543	181	TTT -> TTC	
	C -> T	5608	12.6%	VP1	552	184	CAC -> CAT	
	G -> A	11090	28.0%	VP1	762	254	GAG -> GAA	
	G -> C	10926	21.3%	VP1	795	265	ACG -> ACC	
	A -> C	3379	42.9%	VP1	840	280	CCA -> CCC	
	G -> C	2364	39.1%	VP1	847	283	GCG -> CCG	A -> P
	A -> C	2332	39.0%	VP1	852	284	ATA -> ATC	
	G -> C	4830	39.8%	VP1	860	287	AGT -> ACT	S -> T
	T -> C	4904	40.8%	VP1	864	288	ACT -> ACC	
	A -> G	4008	42.3%	VP1	918	306	TCA -> TCG	
	A -> G	3857	41.9%	VP1	954	318	GCA -> GCG	
	C -> T	8304	26.0%	VP1	975	325	TTC -> TTT	
	AGT -> GGA	4138 -> 4209	22.6% -> 23.0%	VP1	1108	370	AGT -> GGA	S -> G
	G -> A	4259	23.2%	VP1	1113	371	GCG -> GCA	
	C -> T	5223	23.7%	VP1	1137	379	AAC -> AAT	
	A -> G	7626	23.7%	VP1	1173	391	AAA -> AAG	

	A -> G	7010	23.7%	VP1	1218	406	GAA -> GAG	
222201	G -> T	1244	18.1%	VP2	53	18	AGC -> ATC	S -> I
232303	A -> C	321	21.8%	VP1	31	11	AGA -> CGA	
	G -> T	315	10.5%	VP2	53	18	AGC -> ATC	S -> I
	C -> G	218	17.9%	VP1	57	19	CGC -> CGG	
	C -> T	463	14.7%	VP3	74	25	TCG -> TTG	S -> L
	C -> T	463	14.7%	VP2	180	60	GTC -> GTT	
	A -> G	472	10.6%	VP3	365	122	TAA -> TGA	
	A -> G	472	10.6%	VP2	471	157	GTA -> GTG	
	A -> C	321	21.8%	VP2	504	168	GCA -> GCC	
	T -> C	207	13.5%	VP1	507	169	GCT -> GCC	
	C -> G	218	17.9%	VP2	530	177	GCT -> GGT	A -> G
	A -> G	600	11.2%	VP1	558	186	AAA -> AAG	
	A -> G	604	11.1%	VP1	561	187	CAA -> CAG	
	G -> C	567	10.8%	VP1	585	195	CGG -> CGC	
	C -> T	319	13.8%	VP1	708	236	CGC -> CGT	
	G -> A	931	10.1%	VP1	762	254	GAG -> GAA	
	G -> C	935	10.8%	VP1	795	265	ACG -> ACC	
	C -> A	251	10.8%	VP1	840	280	CCC -> CCA	
	C -> G	379	11.3%	VP1	860	287	ACT -> AGT	T -> S
	C -> T	388	11.3%	VP1	864	288	ACC -> ACT	
	G -> A	358	12.0%	VP1	954	318	GCG -> GCA	
	A -> G	495	12.9%	VP1	1158	386	GCA -> GCG	
262301	G -> T	15037	15.9%	VP2	53	18	AGC -> ATC	S -> I
	C -> A	11245	38.2%	VP3	53	18	CCA -> CAA	P -> Q
	C -> A	11245	38.2%	VP2	159	53	GCC -> GCA	
	T -> C	12237	22.8%	VP1	216	72	TTT -> TTC	
	G -> A	3664	21.3%	VP1	489	163	TCG -> TCA	
	T -> C	10917	20.5%	VP1	549	183	AAT -> AAC	
	G -> A	9638	17.3%	VP1	1065	355	ACG -> ACA	
	T -> A	7970	18.6%	VP1	1134	378	ACT -> ACA	
	T -> C	9639	42.1%	VP1	1143	381	TTT -> TTC	
	A -> G	10797	40.0%	VP1	1212	404	CTA -> CTG	
262303	G -> T	11421	17.5%	VP2	53	18	AGC -> ATC	S -> I
	T -> C	7931	28.7%	VP1	543	181	TTT -> TTC	
A0081	T -> A	328	18.3%	VP1	1167	389	ACT -> ACA	
	G -> T	676	14.3%	VP1	786	262	GCG -> GCT	
	C -> G	789	13.7%	VP1	747	249	CGC -> CGG	
	G -> T	422	19.7%	VP2	53	18	AGC -> ATC	
A0083	T -> G	559	16.8%	VP1	1134	378	ACT -> ACG	
	T -> C	852	15.8%	VP1	1068	356	CTT -> CTC	
	G -> A	970	41.9%	VP1	1053	351	CAG -> CAA	
	T -> C	2800	13.9%	VP1	789	263	TAT -> TAC	
	A -> G	2320	15.0%	VP1	558	186	AAA -> AAG	
	T -> G	1311	41.1%	VP1	480	160	GCT -> GCG	

	G -> A	1844	27.7%	VP1	399	133	TTG -> TTA	
	A -> C	1101	12.5%	VP2	504	168	GCA -> GCC	
	A -> C	1101	12.5%	VP1	31	11	AGA -> CGA	
	G -> T	2216	16.2%	VP2	53	18	AGC -> ATC	S -> I
A0087	G -> A	252	14.3%	VP1	798	266	GGG -> GGA	
	C -> T	168	14.3%	VP1	699	233	TAC -> TAT	
	T -> A	229	18.8%	VP1	207	69	ACT -> ACA	
	G -> T	207	17.4%	VP2	53	18	AGC -> ATC	S -> I
A0090 1	G -> T	3804	21.6%	VP2	53	18	AGC -> ATC	S -> I
	A -> C	1406	22.3%	VP1	222	74	GGA -> GGC	
	A -> G	1638	11.8%	VP1	267	89	ACA -> ACG	
	C -> T	1078	10.0%	VP1	289	97	CTC -> TTC	L -> F
	C -> G	2112	18.3%	VP1	339	113	CTC -> CTG	
	G -> A	5049	18.9%	VP1	399	133	TTG -> TTA	
	G -> A	3919	25.4%	VP1	432	144	CAG -> CAA	
	T -> C	3682	24.4%	VP1	435	145	AAT -> AAC	
	C -> T	6041	37.1%	VP1	555	185	CCC -> CCT	
	G -> A	5102	23.3%	VP1	585	195	CGG -> CGA	
	G -> A	5694	16.6%	VP1	798	266	GGG -> GGA	
	A -> T	1200	15.4%	VP1	861	287	ACA -> ACT	
	A -> G	1547	16.8%	VP1	954	318	GCA -> GCG	
	G -> A	1028	16.0%	VP1	1125	375	GAG -> GAA	
	A -> G	2382	30.0%	VP1	1179	393	CAA -> CAG	
	G -> A	2359	14.1%	VP1	1182	394	CAG -> CAA	
A0090 2	G -> A	168	33.9%	VP1	1272	424	CAG -> CAA	
	C -> G	853	48.5%	VP1	868	290	CCG -> GCG	P -> A
	G -> C	816	49.4%	VP1	860	287	AGT -> ACT	S -> T
	G -> A	910	43.1%	VP1	822	274	CAG -> CAA	
	C -> T	1324	34.5%	VP1	603	201	CAC -> CAT	
	G -> A	1275	34.4%	VP1	594	198	GGG -> GGA	
	A -> G	2365	44.1%	VP1	585	195	CGA -> CGG	
	G -> A	1465	21.6%	VP2	471	157	GTG -> GTA	
	G -> A	1465	21.6%	VP3	365	122	TGA -> TAA	
	G -> T	2546	17.2%	VP2	53	18	AGC -> ATC	S -> I
A0090 3	A -> G	166	42.8%	VP2	306	102	AAA -> AAG	
	A -> G	166	42.8%	VP3	200	67	AAC -> AGC	N -> S
	G -> T	2297	18.6%	VP2	53	18	AGC -> ATC	S -> I
A250	A -> G	1293	11.2%	VP1	1167	389	ACA -> ACG	
	G -> A	1111	46.2%	VP1	1053	351	CAG -> CAA	
	G -> A	1193	32.0%	VP1	1038	346	GGG -> GGA	
	G -> C	3985	12.4%	VP1	747	249	CGG -> CGC	
	G -> A	1876	14.0%	VP1	723	241	AAG -> AAA	
	T -> C	2032	32.6%	VP1	603	201	CAT -> CAC	
	G -> A	3779	44.4%	VP1	585	195	CGG -> CGA	
	A -> T	1518	20.6%	VP1	492	164	GCA -> GCT	

	C -> A	2880	14.2%	VP1	477	159	TCC -> TCA	
	T -> C	2435	49.3%	VP1	435	145	AAT -> AAC	
	G -> A	3242	24.4%	VP1	399	133	TTG -> TTA	
	C -> G	1082	18.0%	VP1	339	113	CTC -> CTG	
	C -> A	697	11.0%	VP1	309	103	GCC -> GCA	
	C -> A	553	47.0%	VP1	246	82	CTC -> CTA	
	G -> A	1745	41.4%	VP1	180	60	AGG -> AGA	
	A -> C	1282	42.6%	VP2	597	199	GTA -> GTC	
	A -> C	1282	42.6%	VP1	124	42	AGA -> CGA	
	G -> T	2715	20.8%	VP2	53	18	AGC -> ATC	S -> I
A269 1	A -> G	3464	10.2%	VP1	1224	408	GTA -> GTG	
	A -> G	1967	10.5%	VP1	1173	391	AAA -> AAG	
	C -> T	1214	11.0%	VP1	1137	379	AAC -> AAT	
	A -> G	968	11.0%	VP1	1125	375	GAA -> GAG	
	G -> C	745	24.8%	VP1	1109	370	AGT -> ACT	S -> T
	T -> C	1472	18.1%	VP1	1068	356	CTT -> CTC	
	C -> T	963	17.3%	VP1	930	310	TAC -> TAT	
	G -> C	3939	15.0%	VP1	795	265	ACG -> ACC	
	A -> G	4075	16.4%	VP1	756	252	AAA -> AAG	
	C -> T	1647	15.6%	VP1	603	201	CAC -> CAT	
	T -> C	1639	12.0%	VP1	507	169	GCT -> GCC	
	T -> G	2120	14.5%	VP1	480	160	GCT -> GCG	
	A -> G	1954	20.6%	VP1	399	133	TTA -> TTG	
	C -> G	986	33.1%	VP1	339	113	CTC -> CTG	
	A -> C	548	14.2%	VP1	318	106	TCA -> TCC	
	CTC -> TTG	458 -> 477	14.3% -> 14.8%	VP1	289	97	CTC -> TTG	
	A -> C	432	16.0%	VP1	276	92	GGA -> GGC	
	T -> C	635	13.4%	VP1	264	88	AGT -> AGC	
	A -> G	596	13.3%	VP1	252	84	CTA -> CTG	
	C -> G	377	17.0%	VP1	246	82	CTC -> CTG	
	C -> T	2662	13.4%	VP2	267	89	CGC -> CGT	
	C -> T	2662	13.4%	VP3	161	54	GCT -> GTT	A -> V
	G -> T	3476	12.1%	VP2	53	18	AGC -> ATC	S -> I
	C -> G	104	27.9%	VP2	9	3	GGC -> GGG	
Nobilis P4	G -> A	1212	13.4%	VP1	33	11	CGG -> CGA	
	G -> T	2730	18.9%	VP2	53	18	AGC -> ATC	S -> I
	A -> G	347	31.1%	VP3	308	103	AAC -> AGC	N -> S
	A -> G	347	31.1%	VP2	414	138	AAA -> AAG	
	G -> A	1212	13.4%	VP2	506	169	GGT -> GAT	G -> D

4.5.2.2.3 Caracterización genética de MDV.

4.5.2.2.3.1 Análisis de secuencias

La variabilidad genética de los cuatro genes de MDV entre las cepas secuenciadas fue relativamente baja (Figura 30).

Para el gen pp38, las cepas 462203, 032301, 042301 y la cepa vacunal CVI988 secuenciada en este capítulo mostraron una identidad del 100% con la secuencia disponible en la base de datos del NCBI para la cepa CVI988. La única cepa que presentó una divergencia nucleotídica del 0,23% con respecto a la cepa vacunal fue la 261906. Esta cepa exhibió dos diferencias nucleotídicas (G320A y G526A) (Figura 30A) que generan dos cambios aminoacídicos (R107Q y V176I).

Para el gen gL, las cepas 462203, 032301, 042301 y la cepa vacunal CVI988 secuenciada en este capítulo fueron idénticas a la secuencia disponible en la base de datos de la cepa CVI988. La cepa 261906 fue la única que mostró una divergencia nucleotídica del 0,34% con la cepa vacunal, presentando dos diferencias nucleotídicas (G177A y G538C) (Figura 30B), siendo esta última la única que genera un cambio aminoacídico (A180P).

Para el gen vIL8, la cepa 462203 presentó una identidad del 100% con respecto a la vacuna secuenciada en este trabajo y la secuencia disponible en la base de datos de la cepa CVI988. En contraste, la cepa 261906 presentó una diferencia nucleotídica en la posición 20 con respecto a las demás cepas, resultando en un cambio no sinónimo. Específicamente, la cepa 261906 tiene una alanina en la posición aminoacídica 7, mientras que las otras cepas tienen una valina. Además, las cepas 032301 y 042301 presentan una inserción de adenina en la posición 630 (Figura 30C), lo que provoca un corrimiento del marco de lectura y da lugar a un codón stop prematuro. Como resultado, se produce una proteína con una deleción de 13 aminoácidos en el extremo C-terminal.

Para el gen Meq, las cepas de campo y la vacunal secuenciadas en este capítulo exhiben dos diferencias nucleotídicas con respecto a la cepa CVI988 disponible en la base de datos. Estas variaciones se encuentran en las posiciones 625 y 626, resultando en un cambio de aminoácido en la posición 209. Mientras que la cepa CVI988 publicada tiene una leucina en esta posición, las otras cepas muestran una serina. Hay una tercera

diferencia nucleotídica entre la cepa de CVI988 publicada y la vacuna secuenciada por nosotros. Esta diferencia también está presente en las cepas de campo 261906, 462203 y 042301. Se encuentra en la posición 587 y es no sinónima (Figura 30D). La cepa CVI988 publicada tiene en la posición aminoacídica 196 una serina y el resto de las cepas que presentan esta diferencia tienen una cisteína.

Al comparar cada una de las cepas de campo con la vacuna CVI988 secuenciada en este estudio, observamos lo siguiente: la cepa 042301 es idéntica a la vacuna. La cepa 462203 presenta un único cambio nucleotídico en la posición 546, el cual es sinónimo. En contraste, la cepa 261906 presenta cuatro diferencias nucleotídicas (T211G, G238T, T344C y T977C), que generan los cambios aminoacídicos S71A, D80Y, V115A y I326T. Por último, la cepa 032301 presenta una diferencia nucleotídica en la posición 587 (Figura 30D), siendo no sinónima. En la posición aminoacídica 196, la cepa vacunal tiene una cisteína, mientras que la cepa 032301 y la cepa vacunal de la base de datos muestran una serina.

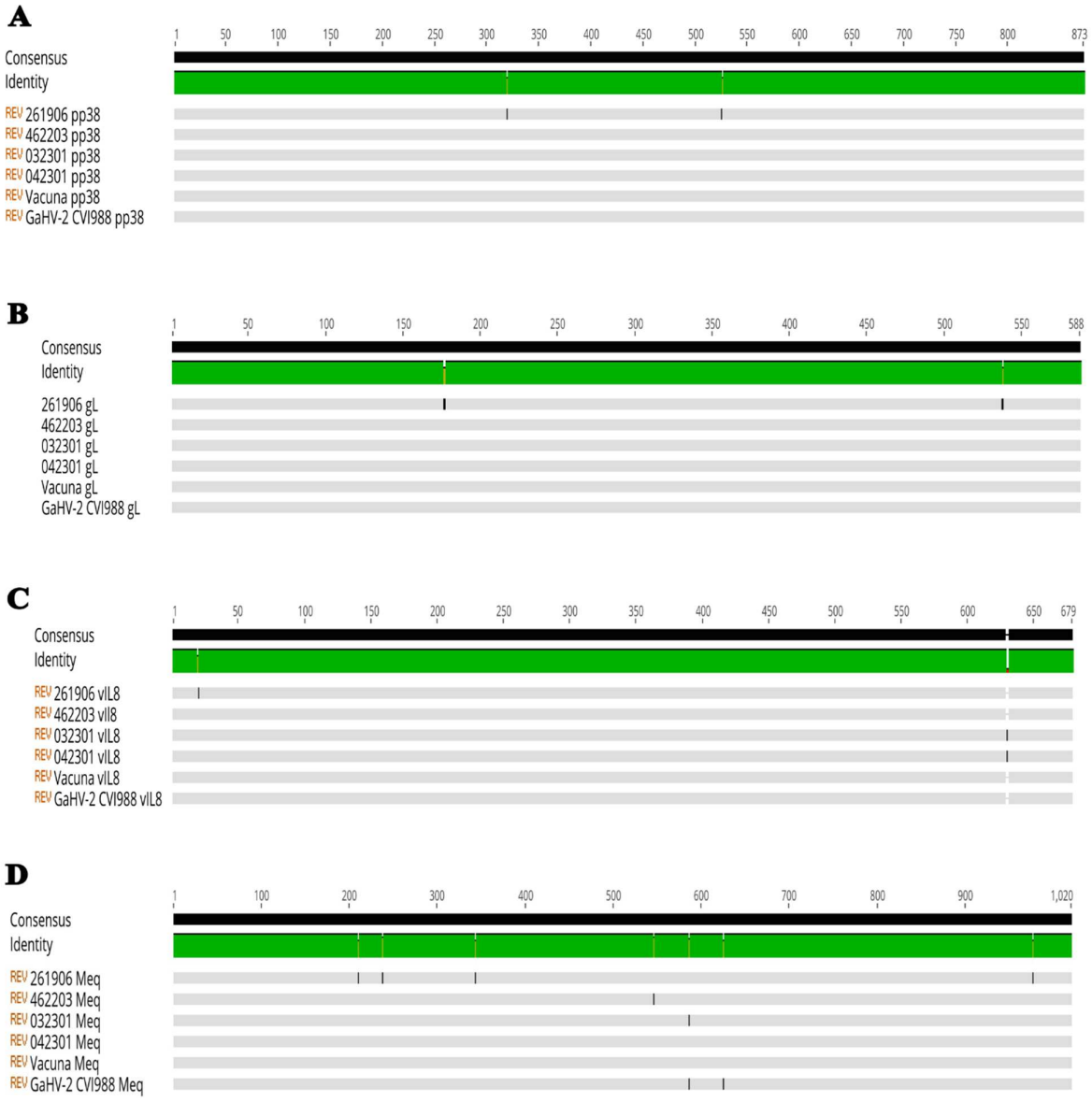


Figura 30- Alineamientos de las secuencias nucleotídicas consensos codificantes completas obtenidas en este capítulo (cepas 261906, 462203, 032301, 042301 y la cepa vacunal CVI988) y la disponible en la base de datos de la cepa vacunal CVI988 de los genes pp38 (A), gL (B), vIL8 (C) y Meq (sin inserción) (D) de MDV.

4.5.2.2.3.2 Variantes intrahospedero detectadas en cepas de MDV

Se detectaron variantes intrahospedero en los genes de MDV de las muestras analizadas. En ciertas posiciones, la frecuencia de las variantes fue mayor al 10%. Las variaciones consistieron en cambios de un solo nucleótido o inserciones o deleciones de

1 nucleótido. En la Tabla 34 se especifican las variantes intrahospedero observadas en la vacuna CVI988 y en las muestras analizadas en este capítulo.

Tabla 34- Variantes nucleotídicas detectadas en los genes de MDV en la vacuna CVI988 y en las muestras analizadas en este capítulo. Se denota la cobertura, la frecuencia, el CDS, la posición en CDS de cada variante, el número de codón en el CDS, así como si generan cambios en el codón y secuencia aminoacídica codificante.

Cepa	Cambio	Cobertura	Frecuencia de variante	CDS	Posición CDS	N°codón CDS	Cambio en el codón	Cambio aa
462203	(A)6 -> (A)7	696	31.8%	vIL8	351	117		
032301	(A)7-> (A)6	793	43.9%	vIL8	351	117		
042301	(A)7-> (A)6	6064	27.4%	vIL8	351	117		
	C -> T	156	19.9%	Meq	661	129	GCG -> ACG	A -> T
	C -> T	159	11.3%	Meq	669	223	GAG -> GAA	
Vac CVI988	(A)6 -> (A)7	304	38.8%	vIL8	351	117		
	C -> T	129	30.2%	Meq	661	129	GCG -> ACG	A -> T
	C -> T	133	25.6%	Meq	669	223	GAG -> GAA	

4.5.2.2.3.3 PCR de la región del gen Meq de MDV

Se obtuvieron los amplicones esperados en las muestras analizadas (Figura 31). En el caso de las cepas de campo 462203, 032301 ,042301 y la cepa vacunal CVI988 se detectaron dos amplicones distintos: uno de 541 pb y otro de 364 pb. Por otro lado, la cepa de campo 261906 mostró un único amplicón de 364 pb.

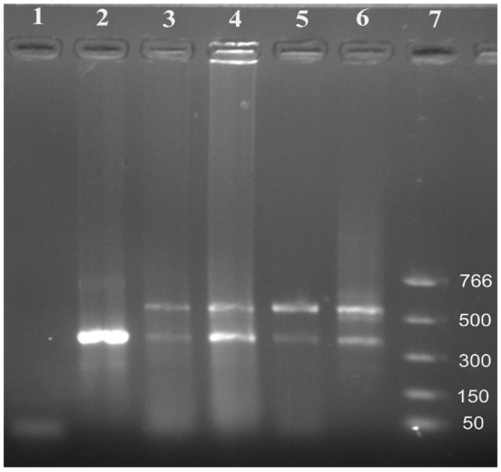


Figura 31- PCR con los cebadores F136509 y R136982 (541-364 pb). Carril 1: Blanco. Carril 2: 261906. Carril 3: 462203. Carril 4: 032301.Carril 5: 042301. Carril 6: Vacuna CVI988. Carril 7: Marcador de peso molecular (se indican los tamaños en pares de bases).

4.5.3 Discusión

Un sistema inmunológico saludable en las aves es esencial para una producción avícola eficiente. Cualquier factor que disminuya las respuestas inmunitarias afectará los parámetros de producción y aumentará los costos asociados. Existen numerosos factores que causan inmunosupresión en los pollos, como condiciones ambientales inadecuadas, presencia de toxinas en el alimento, estrés provocado por vacunación o por sobrepoblación de los galpones, y la presencia de patógenos. En cuanto a este último punto, si bien todos los patógenos afectan el sistema inmune en cierto grado, los más problemáticos son aquellos que atacan directamente los órganos linfoides de las aves (Gimeno y Schat, 2018). Estos patógenos que generan inmunosupresión no solo afectan directamente la productividad, sino que además incrementan la susceptibilidad a otros patógenos y provocan respuestas deficientes a la aplicación de vacunas (Balamurugan y Kataria, 2006). Entre los más destacados, por sus efectos adversos y alta prevalencia global, se encuentran el virus de Gumboro, el virus de la anemia infecciosa aviar y el virus de Marek. La interacción entre estos virus es crítica, aunque frecuentemente subestimada.

Aunque el control de una sola de estas enfermedades puede reducir la severidad de los brotes, no elimina el riesgo de las otras. La presencia de uno de estos virus puede facilitar la infección por los demás. Por lo tanto, la estrategia más efectiva es controlar todas las enfermedades inmunosupresoras simultáneamente. Para lograr esto, es fundamental conocer las características génicas y genómicas de las cepas en circulación, lo que permite seleccionar vacunas y tratamientos específicos.

En este capítulo, hemos desarrollado y estandarizado metodologías basadas en multiplex-PCR acoplada a secuenciación masiva, utilizando cebadores quiméricos como los diseñados para IBDV, con el fin de obtener de manera rápida y económica la secuencia genómica de CAV y las secuencias completas de los genes codificantes de la interleucina 8 viral (vIL-8), la oncoproteína Meq, la fosfoproteína pp38 y la glicoproteína L (gL) de MDV. Estos genes están relacionados con la infección, oncogenicidad y patogenicidad viral (Rajcani y Vojvodova, 1998; Tian et al., 2011). Aunque aún no se ha esclarecido completamente la base molecular del aumento de la virulencia del MDV, decidimos secuenciar y analizar estos genes debido a que se han utilizado en numerosos estudios para caracterizar las propiedades virulentas y oncogénicas de las cepas de

MDV (Add-Ellatieff et al., 2018; Prathibha et al., 2018; Ozan et al., 2021; Kannaki et al., 2022).

Las metodologías fueron estandarizadas utilizando las cepas vacunales que se utilizan en nuestro país para controlar estas enfermedades y se obtuvieron las secuencias completas con parámetros de coberturas adecuados (Sección 4.5.2.1.3 Figura 28A y B).

La metodología desarrollada en este capítulo para CAV se aplicó a muestras de campo provenientes de Uruguay y Argentina, lo que permitió obtener los genomas completos o casi completos de todas las cepas (Tabla 30). La caracterización genómica proporcionó información sobre la diversidad y evolución de CAV en ambos países. Ninguna de las cepas analizadas mostró evidencia de recombinación. Los análisis revelaron que las cepas uruguayas son genéticamente divergentes (Tabla 32), clasificándose en los clados II y III (Figura 29). Nuestro grupo documentó previamente la presencia de estos clados en Uruguay (Techera et al., 2021), sugiriendo que las cepas en circulación tienen orígenes diversos. La mayoría de estas cepas son de campo, aunque algunas podrían haber surgido por reversión de la cepa vacunal Del-Ros, como podría ser el caso de la cepa 262303 secuenciada en este capítulo. En contraste, las cepas argentinas se agruparon exclusivamente en el clado II, cuya circulación en Argentina fue registrada en 2007 (Craig et al., 2009). Además, esta metodología evidenció la existencia de variantes intrahospedero en las muestras secuenciadas (Tabla 33). La alta variabilidad intrahospedero en las cepas de CAV puede deberse en parte a la alta tasa de sustitución que tiene este virus, de $3{,}8 \times 10^{-4}$ sustituciones/sitio/año (Techera et al., 2021). Esta elevada tasa de sustitución contribuye significativamente a la diversidad genética observada dentro de los hospedadores individuales. Además, esta variabilidad también podría resultar de coinfecciones entre cepas pertenecientes al mismo clado. Asimismo, no podemos descartar la posibilidad de errores procedimentales en la reacción de polimerasa durante la secuenciación de Illumina (Petrackova et al., 2019), que también podrían contribuir a la variabilidad genética observada.

La metodología estandarizada en este capítulo para MDV se aplicó a cuatro muestras de campo uruguayas, obteniéndose las secuencias codificantes completas de los genes pp38, gL, vIL8 y Meq de las cuatro cepas, con parámetros de cobertura media adecuados (Tabla 31). Estas secuencias proporcionan una base fundamental para futuras

investigaciones y un mejor entendimiento de la variabilidad genética del virus en nuestro país.

En este capítulo, examinamos el gen pp38, que codifica una fosfoproteína esencial para la infección citolítica de linfocitos B, la producción de células T infectadas de manera latente y la transformación de linfocitos al prevenir la apoptosis. Además, pp38 desempeña un papel crucial en la reactivación viral y la transformación celular (Gimeno et al., 2005). La glutamina en la posición aminoacídica 107, correspondiente al cambio nucleotídico en la posición 320, está conservada en las cepas virulentas de MDV, mientras que la cepa vacunal CVI988 presenta una arginina en esta posición (Spatz et al., 2007). Este cambio en la posición 107 se considera un biomarcador confiable para diferenciar CVI988 de las cepas virulentas (Baigent et al., 2016). La cepa uruguaya 261906 fue la única que presentó glutamina en esta posición, lo que indica que es una cepa virulenta de MDV, mientras que las demás cepas analizadas mostraron la misma secuencia genética en este gen que la vacuna CVI988. La presencia de glutamato en la posición 109 es otro cambio asociado a la virulencia (Abd-Ellatieff et al., 2018). Sin embargo, este cambio no se detectó en la cepa 261906. Otro cambio observado en esta cepa es la presencia de isoleucina en la posición 176, correspondiente al cambio nucleotídico en la posición 526 (Figura 30A). Aunque este cambio no es útil para diferenciar entre cepas virulentas y CVI988, fue identificado en una cepa de campo virulenta uruguaya secuenciada por nuestro grupo (Tesis de Maestría Perbolianachis, 2021), la cual también presentó los mismos aminoácidos en las posiciones 107 y 109 que la cepa uruguaya 261906.

También analizamos el gen gL, que codifica la glicoproteína L (gL), una subunidad esencial en el complejo de entrada del virus. La glicoproteína L interactúa con la glicoproteína H (gH) para facilitar la fusión de la envoltura viral con la membrana celular del hospedador, un paso crucial para la infectividad viral. Las mutaciones o deleciones en gL pueden alterar su procesamiento y su capacidad para interactuar con gH, afectando así la eficiencia de la entrada viral y la patogenicidad del virus. La cepa uruguaya 261906 fue la única que presentó un cambio aminoacídico en la posición A180P, correspondiente a la posición nucleotídica 538 (Figura 30B), en comparación con el resto de las cepas. Este cambio no pudo asociarse a un patotipo específico. Para este gen, se ha reportado una deleción de 12 nucleótidos en el sitio de escisión, en las

posiciones 54 a 65, en algunas cepas vv+ de EE. UU. (Shamblin et al., 2004), dicha deleción no fue detectada en ninguna de las cepas uruguayas analizadas.

En cuanto al gen vIL-8, que está involucrado en las infecciones citolíticas tempranas en órganos linfoides y probablemente recluta linfocitos B o T, tiene un impacto menor en la reactivación y diseminación viral. La eliminación de vIL-8 reduce la activación de células T, disminuyendo la patogenicidad y la incidencia de tumores (Cui et al., 2004). El cambio aminoacídico V7A detectado en la cepa uruguaya 261906 no pudo asociarse a un patotipo específico. Además, los aminoácidos 4S, 20A, 31G, 55S, 66Q, 135E y 240L, que han sido reportados en cepas virulentas (Tian et al., 2011; Abd-Ellatieff et al., 2018; Prathibha et al., 2018; Kannaki et al., 2022), no están presentes en esta cepa. En las cepas uruguayas 032301 y 042301, se identificó una inserción de un nucleótido (A) en la posición nucleotídica 630 del gen vIL-8, resultando en un codón *stop* prematuro y una proteína truncada que carece de 13 aminoácidos en el C-terminal. Para la cepa vacunal CVI988, se han reportado aislados con versiones completas o truncadas de vIL-8, siendo las versiones truncadas de 11 y 13 aminoácidos más cortas que las de cepas oncogénicas de MDV (Spatz et al., 2007). Aunque los residuos carboxilo en IL-8 de mamíferos no son esenciales para la unión de neutrófilos, su función en vIL-8 o IL-8 aviar es menos clara (Kaiser et al., 1999). Los mutantes de MDV-1 sin vIL-8 muestran menor virulencia e incidencia de tumores, sugiriendo que las versiones truncadas pueden contribuir a un fenotipo atenuado (Cortes y Cardona, 2004; Cui et al., 2004).

En el análisis de variantes intrahospedero, detectamos tanto la variante con inserción como la variante sin inserción en la posición 630 en las cepas uruguayas 032301 y 042301 (Tabla 34). Estas variantes intrahospedero también se observaron en la cepa 462203 y en la vacuna CVI988. Dado que el gen tiene dos copias en el genoma, es posible que una copia contenga la inserción y la otra no, o que existan poblaciones mixtas de virus debido a la atenuación de CVI988 (Ortigas-Vásquez et al., 2024). La presencia de ambas variantes en la vacuna CVI988 y en las cepas uruguayas 032301, 042301 y 462203 respalda la hipótesis de que estas cepas uruguayas tienen un origen vacunal.

Finalmente, el gen Meq también se encuentra en dos copias en el genoma de MDV. En cepas virulentas, ambas copias tienen un tamaño de 1020 pb, codificando una proteína de 339 aminoácidos con un dominio de transactivación básico tipo leucina zipper (bZIP) en el extremo N-terminal y un dominio de transrepresión rico en prolina en el extremo C-

terminal. La dimerización y activación del dominio de transactivación contribuyen a la transformación celular y a la posterior tumorogénesis (Liu et al., 1999; Levy et al., 2005). En contraste, cepas menos virulentas o vacunales, como CVI988, CU-2 o JM, presentan una inserción en marco de 177 pb en una de las copias del gen Meq, lo que resulta en una inserción de 59 aminoácidos en la región C-terminal de la proteína (Chang et al., 2002). Utilizamos PCR con cebadores que flanquean esta región del gen Meq y encontramos que la única cepa uruguaya sin la inserción fue la cepa 261906 (Figura 31). Esto sugiere que la cepa 261906 es potencialmente virulenta, como se observó en el análisis del gen pp38. Las demás cepas uruguayas presentaron la inserción en una de las copias del gen Meq (Figura 31). Además, el análisis de la secuencia aminoacídica de las cepas 462203, 032301 y 042301 reveló que presentan los aminoácidos característicos de la cepa vacunal CVI988 en las posiciones 71 y 326 (para la proteína normal) o en la posición 385 (para la proteína con inserción) (Spatz et al., 2007). Por lo tanto, el análisis de los genes pp38, vIL-8 y Meq confirma el origen vacunal de las cepas uruguayas 462203, 032301 y 042301.

Tras identificar el potencial virulento de la cepa 261906, continuamos con el análisis de la secuencia aminoacídica del gen Meq. Las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 71 (A), 80 (Y), 115 (A) y 326 (T), presentes en esta cepa en comparación con la cepa vacunal CVI988, son típicas de las cepas virulentas (Tian et al., 2011; Mescolini et al., 2019; Kannaki et al., 2022). El dominio de transactivación de Meq se caracteriza por la presencia de repeticiones del motivo PPPP. Se ha observado que las cepas de MDV con mayor virulencia (vvMDV y vv+MDV) presentan interrupciones en estas repeticiones de prolina en la segunda posición, con cambios en los aminoácidos 153 (P→Q), 176 (P→A) y 217 (P→A). Además, se ha reportado una sustitución en la posición 119 (C→R) en cepas vv+MDV (Shamblin et al., 2004). Ninguno de estos cambios está presente en la cepa uruguaya 261906, lo que indica que, aunque esta cepa de campo es virulenta, no corresponde a los tipos leves (m) ni a vv+MDV. Esta conclusión se ve respaldada por el reporte de cepas brasileras colectadas en 2019, que presentan los mismos aminoácidos que la cepa 261906 en las posiciones previamente mencionadas y que han sido clasificadas como cepas vMDV (Chacón et al., 2024).

Es importante destacar que la determinación del patotipo de una cepa de MDV típicamente requiere métodos estandarizados *in vivo*. Sin embargo, la aplicación de

métodos moleculares, como los utilizados en este capítulo, permite predecir el potencial de virulencia de las cepas de MDV, aunque no proporcione información exacta sobre el patotipo. La caracterización detallada de cepas vacunales y cepas de campo virulentas de MDV es crucial para confirmar la eficacia de la vacunación, diagnosticar la enfermedad de Marek y explorar las causas de los fracasos vacunal, que podrían estar relacionados con coinfecciones por CAV y/o IBDV (de Boer et al., 1986; Landman y Verschuren, 2003; Witter et al., 2005; Baigent et al., 2016).

En cuanto a las coinfecciones detectadas entre IBDV-CAV e IBDV-MDV en esta tesis, se destaca que, en cinco de las seis muestras con coinfección entre IBDV y CAV, se identificaron cepas clásicas de IBDV, junto con cepas de CAV de los clados II (352001, 222201, 232303 y 262301) y III (262303). Las cepas clásicas de IBDV involucradas en estas coinfecciones son idénticas o casi idénticas a nivel aminoacídico (Tablas 14 y 22) con la cepa 150127/02, la cual presenta una patogenicidad consistente con cepas intermedias plus (Abed et al., 2018). Aunque no contamos con un registro de vacunación para estas aves, en Uruguay se utilizan vacunas que contienen este tipo de cepas. Por lo tanto, es posible que lo observado tenga un origen vacunal, bien sea por una vacunación directa con estas cepas o por una infección en campo con cepas similares. En cualquiera de los casos, estas cepas han demostrado causar lesiones moderadas a graves en la bursa de Fabricio, induciendo diversos grados de inmunodepresión (Mazariegos et al., 1990; Tsukamoto et al., 1995; Kumar et al., 2000; Rautenschlein et al., 2005). Esta inmunodepresión debilita el sistema inmunológico de las aves, haciéndolas más susceptibles a otras infecciones, como la generada por CAV (Prandini et al., 2016). Esto es consistente con lo señalado en otros estudios, donde se observa que las infecciones tempranas con virus inmunosupresores, como el IBDV, pueden aumentar la susceptibilidad a CAV hasta en 100 veces (Rosenberger y Cloud, 1998).

La gravedad de las lesiones en el sistema inmunológico de las aves también depende de la cepa de CAV que coinfecte con IBDV, ya que se han reportado diferencias en la patogenicidad entre las cepas de los clados II y III (Song et al., 2024). Sin embargo, este estudio no aclara si las variaciones en la patogenicidad se deben a diferencias genéticas entre los genomas de las cepas, tanto en las regiones codificantes como no codificantes, o si son el resultado de las diferencias en los títulos virales inoculados para cada cepa. Dado que la información sobre la patogenicidad de las cepas de CAV de diferentes

clados es limitada, es crucial realizar ensayos de patogenicidad con las cepas de CAV circulantes en nuestro país, ya que presentan variaciones aminoacídicas que podrían influir en una patogenicidad diferencial. En particular, es relevante comparar cepas como la 262303 (Clado III), que presenta lisina (K) en la posición 139 y ácido glutámico (E) en la posición 144 de VP1, con el resto de las cepas uruguayas, que tienen glutamina (Q) en ambas posiciones (Tabla 32). Estos aminoácidos juegan un papel crucial en el crecimiento y propagación del virus. Se ha descrito que la presencia de glutamina en estas posiciones se asocia con una disminución en la tasa de propagación del virus en cultivos celulares MDCC-MSB-1 (Renshaw et al., 1996).

Una correcta vacunación contra CAV es esencial para prevenir la infección en las aves. En Uruguay, la vacunación se realiza únicamente en las reproductoras, las cuales transfieren anticuerpos a los pollitos, proporcionando protección pasiva en las primeras etapas de su vida. Sin embargo, si las reproductoras no son vacunadas o si la vacunación es inadecuada, las aves pueden presentar bajos niveles de anticuerpos y enfrentar una infección temprana con diferentes cepas de CAV. Esta infección temprana puede comprometer la respuesta inmunológica de las aves, afectando la respuesta ante la vacunación contra IBDV. Como resultado, podría aumentar el riesgo de coinfecciones y complicar el manejo de ambas enfermedades, empeorando la situación epidemiológica.

En el caso de las coinfecciones entre IBDV y MDV, se detectó que las cepas de IBDV presentan entre uno y dos cambios de aminoácidos con la cepa vacunal D78 (Tabla 22), una cepa intermedia que también se utiliza en Uruguay y puede generar inmunodepresión. Las cepas de MDV detectadas en estas coinfecciones corresponden a la cepa vacunal CVI988. Tampoco se cuenta con un registro de vacunación para ambos patógenos en estas aves. Se ha demostrado en condiciones experimentales que la inmunodepresión generada por cepas intermedias e intermedias plus de IBDV puede afectar la respuesta de las aves a otras vacunaciones (Mazariegos et al., 1990; Kim et al., 1999; Rautenschlein et al., 2007).

En conclusión, el control efectivo de la enfermedad de Gumboro no debe limitarse a conocer las características patogénicas y genómicas de las cepas circulantes de IBDV y aplicar vacunas específicas basadas en esta información. Es fundamental adoptar un enfoque más global que considere el impacto de otras infecciones inmunosupresoras que afectan el sistema inmunológico de las aves. En este contexto, la coinfección con

virus como CAV y MDV, que también comprometen la función inmunológica, debe ser evaluada como parte integral del manejo de IBDV.

En este capítulo y el anterior, desarrollamos metodologías que permiten conocer de forma rápida y económica las características genómicas de las cepas de estos virus que coinfectan las muestras y comprometen el sistema inmunológico de las aves. Los siguientes pasos incluyen experimentos *in vivo* que simulen las coinfecciones de las cepas detectadas en este estudio, con el fin de seguir comprendiendo la relación entre estos patógenos.

La aplicación de vacunas vivas atenuadas, aunque común en nuestro país para controlar IBDV, puede acarrear problemas adicionales. Estas vacunas pueden inducir la generación de cepas reordenantes, como se detectó en el capítulo 3 de esta tesis, y provocar inmunodepresión. Esta inmunodepresión facilita la entrada de otros patógenos y afecta negativamente la eficacia de las vacunas contra otros patógenos.

En consecuencia, es crucial considerar no solo la selección adecuada de vacunas contra IBDV, sino también los efectos secundarios potenciales y su interacción con otros patógenos. Solo así se podrá asegurar un control más efectivo de estas enfermedades inmunosupresoras y mantener la eficacia general de los programas de vacunación.

5. Aportes

● Se determinó la patogenicidad de las cepas *Distinct* de IBDV en aves jóvenes, evidenciando su capacidad para inducir enfermedad y daño en el sistema inmunológico, lo que tiene implicaciones para el manejo y control de la enfermedad en la avicultura.

● Se desarrollaron metodologías confiables, rápidas y económicas para la caracterización genómica de IBDV, CAV y MDV, los principales virus inmunosupresores que afectan la avicultura a nivel mundial.

● Se obtuvo información epidemiológica relevante sobre estos virus en Uruguay y la región, lo que contribuyó a una mejor comprensión de su impacto en la salud aviar.

● Las metodologías desarrolladas y aplicadas en esta tesis han sido implementadas con éxito en otras problemáticas de salud humana y animal, como la pandemia de SARS-CoV-2, la influenza aviar y la encefalitis equina, como se refleja en las publicaciones incluidas en el Anexo 3. Estas publicaciones, en las que participé como coautora, demuestran cómo las técnicas y enfoques adquiridos en esta investigación fueron fundamentales para abordar dichos desafíos.

.

6. Perspectivas

- Continuar con el diagnóstico y la caracterización genética y genómica de muestras de campo de IBDV, CAV y MDV, para ampliar el conocimiento sobre la prevalencia y diversidad de estos virus en la industria avícola uruguaya.

- Evaluar la patogenicidad en aves SPF de la cepa reordenante de IBDV, con el objetivo de determinar si la nueva combinación de segmentos genera cambios en la patogenicidad.

- Evaluar la patogenicidad en aves SPF de las cepas de CAV de los clados II y III que circulan en Uruguay, para determinar si la variabilidad genética observada entre estas cepas está asociada con diferencias en su virulencia.

- Evaluar la patogenicidad en aves SPF de la cepa virulenta de MDV que circula en Uruguay.

- Realizar infecciones experimentales en aves SPF que simulen las coinfecciones detectadas en esta tesis, entre las diferentes cepas de los virus inmunosupresores analizados, con el fin de avanzar en el entendimiento de la interacción entre estos virus y su impacto en las aves de producción uruguayas.

7. Bibliografía

Abd-Ellatieff HA, Abou Rawash AA, Ellakany HF, Goda WM, Suzuki T, Yanai T 2018. Molecular characterization and phylogenetic analysis of a virulent Marek's disease virus field strain in broiler chickens in Japan. Avian Pathol 47: 47–57.

Abdul R, Murgia MV, Rodriguez-Palacios A, Lee CW, Saif YM 2013. Persistence and tissue distribution of infectious bursal disease virus in experimentally infected SPF and commercial broiler chickens. Avian Dis;57(4):759-66.

Abed M, Soubies S, Courtillon C, Briand FX, Allée C, Amelot M, Boisseson C De, Lucas P, Blanchard Y, Belahouel A, Kara R, Essalhi A, Temim S, Khelef D, Eterradossi N 2018. Infectious bursal disease virus in Algeria: Detection of highly pathogenic reassortant viruses. Infect Genet Evol 60: 48–57.

Abolnik C, Wandrag DB 2014. Avian gyrovirus 2 and avirulent Newcastle disease virus coinfection in a chicken flock with neurologic symptoms and high mortalities. Avian Dis;58(1):90-4.

Absalón AE, Cortés-Espinosa D v., Lucio E, Miller PJ, Afonso CL 2019. Epidemiology, control, and prevention of Newcastle disease in endemic regions: Latin America. Trop Anim Health Prod.

Adair BM 2000. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. Dev Comp Immunol 24: 247–255.

Adamu J, Owoade AA, Abdu PA, Kazeem HM, Fatihu MY 2013. Characterization of field and vaccine infectious bursal disease viruses from Nigeria revealing possible virulence and regional markers in the VP2 minor hydrophilic peaks. Avian Pathol;42(5):420-33.

Adlhoch C, Fusaro A, Gonzales JL, Kuiken T, Marangon S, Niqueux É, Staubach C, Terregino C, Muñoz Guajardo I, Lima E, Baldinelli F 2021. Avian influenza overview December 2020 – February 2021. EFSA J 19.

Alexander DJ, Chettle NJ 1998. Heat inactivation of serotype 1 infectious bursal disease virus. Avian Pathol. 27:97–99.

Alfonso-Morales A, Rios L, Martínez-Pérez O, Dolz R, Valle R, Perera CL, Bertran K, Frías MT, Ganges L, Díaz de Arce H, Majó N, Núñez JI, Pérez LJ 2015. Evaluation of a Phylogenetic Marker Based on Genomic Segment B of Infectious Bursal Disease Virus: Facilitating a Feasible Incorporation of this Segment to the Molecular Epidemiology Studies for this Viral Agent. PLoS One 10: e0125853.

Aliyu HB, Hamisu TM, Hair Bejo M, Omar AR, Ideris A 2022. Comparative pathogenicity of Malaysian variant and very virulent infectious bursal disease viruses in chickens. Avian Pathol;51(1):76-86.

Amos GCA, Logan A, Anwar S, Fritzsche M, Mate R, Bleazard T, Rijpkema S 2020. Developing standards for the microbiome field. Microbiome 8: 98.

Atkinson B, Graham V, Miles RW, Lewandowski K, Dowall SD, Pullan ST, Hewson R 2016. Complete Genome Sequence of Zika Virus Isolated from Semen. Genome Announc. 4(5): e01116-16.

Baigent SJ, Nair VK, Le Galludec H 2016. Real-time PCR for differential quantification of CVI988 vaccine virus and virulent strains of Marek's disease virus. J Virol Methods 239: 94–98.

Balamurugan V, Kataria JM 2006. Economically important non-oncogenic immunosuppressive viral diseases of chicken - Current status. Vet Res Commun 30: 541–566.

Banda A, Villegas P, El-Attrache J 2003. Molecular characterization of infectious bursal disease virus from commercial poultry in the United States and Latin America. Avian Dis. 47(1):87–95.

Banda A, Villegas P, El-Attrache J, Estévez C 2001. Molecular characterization of seven field isolates of infectious bursal disease virus obtained from commercial broiler chickens. Avian Dis. 45(3):620–630.

Banda A, Carlos Valladares-de la Cruz J, Alonso Navarro-Hernández J 1999. Caracterización clínico-patológica de tres aislamientos del virus de la infección de la bolsa de Fabricio, obtenidos en granjas comerciales de pollo de engorda en México. Veterinaria México;30(1):7.

Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 19(5):455-77.

Barrios PR, Moraes MP, Santos BM, Oliveira ES, Pena LJ, Pena DA, Marin SY 2006. Comparison of pathogenicity in IBDV isolates in embryonic eggs.

Barzon L, Lavezzo E, Militello V, Toppo S, Palù G 2011. Applications of Next-Generation Sequencing Technologies to Diagnostic Virology. Int J Mol Sci 12: 7861–7884.

Bayliss CD, Spies U, Shaw K, Peters RW, Papageorgiou A, Muller H, Boursnell MEG 1990. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. J Gen Virol 71: 1303–1312.

Becht H 1980. Infectious bursal disease virus. Current Topics in Microbiology and Immunology, 107-121.

Benton WJ, Cover MS, Rosenberger JK, Lake RS 1967. Physicochemical Properties of the Infectious Bursal Agent (IBA). Avian Dis 11: 438.

Bjerre RD, Hugerth LW, Boulund F, Seifert M, Johansen JD, Engstrand L 2019. Effects of sampling strategy and DNA extraction on human skin microbiome investigations. Sci Rep 9: 17287.

Bolatti EM, Hošnjak L, Chouhy D, Re-Louhau MF, Casal PE, Bottai H, Kocjan BJ, Stella EJ, Gorosito MD, Sanchez A, Bussy RF, Poljak M, Giri AA 2018. High prevalence of Gammapapillomaviruses (Gamma-PVs) in pre-malignant cutaneous lesions of immunocompetent individuals using a new broad-spectrum primer system, and identification of HPV210, a novel Gamma-PV type. Virology. 525:182-191.

Boot HJ, Hoekman AJ, Gielkens AL 2005. The enhanced virulence of very virulent infectious bursal disease virus is partly determined by its B-segment. Arch Virol. 150(1):137-44.

Boros Á, Pankovics P, Adonyi Á, Fenyvesi H, Day JM, Phan TG, Delwart E, Reuter G 2016. A diarrheic chicken simultaneously co-infected with multiple picornaviruses: Complete genome analysis of avian picornaviruses representing up to six genera. Virology. 489:63-74.

Böttcher B, Kiselev NA, Stel'Mashchuk VY, Perevozchikova NA, Borisov AV, Crowther RA 1997. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. J Virol 71: 325–330.

Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert RA, Vakharia VN 2001. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. J Virol 75: 11974–11982.

Broadbent A, Reddy V, Egana-Labrin S, Nazki S 2023. Antigenic cartography analysis of chimeric recombinant IBDV strains can be used to identify hyper variable region sequences that induce broadly cross-neutralizing antibody responses against diverse strains. In Proceedings of the 2023 AAAP Annual Meeting (p. 137). Jacksonville, United States.

Bublot M, Pritchard N, Gros FX Le, Goutebroze S 2007. Use of a Vectored Vaccine against Infectious Bursal Disease of Chickens in the Face of High-Titred Maternally Derived Antibody. J Comp Pathol 137: 246–253.

Buchfink B, Xie C, Huson DH 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. Nat Methods. 12(1):59-60.

Bullman S, Kearney K, O'Mahony M, Kelly L, Whyte P, Fanning S, Morgan JG 2014. Identification and genetic characterization of a novel picornavirus from chickens. J Gen Virol. 95(Pt 5):1094-1103.

Bumstead N, Reece RL, Cook JK 1993. Genetic differences in susceptibility of chicken lines to infection with infectious bursal disease virus. Poult Sci 72: 403–410.

Busnadiego I, Maestre AM, Rodríguez D, Rodríguez JF 2012. The infectious bursal disease virus RNA binding VP3 polypeptide inhibits PKR-mediated apoptosis. PLoS One 7: e46768

Cao YC, Yeung WS, Law M, Bi YZ, Leung FC, Lim BL 1998. Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. Avian Dis. 42(2):340-51.

Capobianchi MR, Giombini E, Rozera G 2013. Next-generation sequencing technology in clinical virology. Clin Microbiol Infect 19: 15–22.

Carroll MW, Matthews DA, Hiscox JA, Elmore MJ, Pollakis G, Rambaut A, Hewson R, García-Dorival I, Bore JA, Koundouno R, Abdellati S, Afrough B, Aiyepada J, Akhilomen P, Asogun D, Atkinson B, Badusche M, Bah A, Bate S, Baumann J, Becker D, Becker-Ziaja B, Bocquin A, Borremans B, Bosworth A, Boettcher JP, Cannas A, Carletti F, Castilletti C, Clark S, Colavita F, Diederich S, Donatus A, Duraffour S, Ehichioya D, Ellerbrok H, Fernandez-Garcia MD, Fizet A, Fleischmann E, Gryseels S, Hermelink A, Hinzmann J, Hopf-Guevara U, Ighodalo Y, Jameson L, Kelterbaum A, Kis Z, Kloth S, Kohl C, Korva M, Kraus A, Kuisma E, Kurth A, Liedigk B, Logue CH, Lüdtke A, Maes P, McCowen J, Mély S, Mertens M, Meschi S, Meyer B, Michel J, Molkenthin P, Muñoz-Fontela C, Muth D, Newman EN, Ngabo D, Oestereich L, Okosun J, Olokor T, Omiunu R, Omomoh E, Pallasch E, Pályi B, Portmann J, Pottage T, Pratt C, Priesnitz S, Quartu S, Rappe J, Repits J, Richter M, Rudolf M, Sachse A, Schmidt KM, Schudt G, Strecker T, Thom R, Thomas S, Tobin E, Tolley H, Trautner J, Vermoesen T, Vitoriano I, Wagner M, Wolff S, Yue C, Capobianchi MR, Kretschmer B, Hall Y, Kenny JG, Rickett NY, Dudas G, Coltart CE, Kerber R, Steer D, Wright C, Senyah F, Keita S, Drury P, Diallo B, de Clerck H, Van Herp M, Sprecher A, Traore A, Diakite M, Konde MK, Koivogui L, Magassouba N, Avšič-Županc T, Nitsche A, Strasser M, Ippolito G, Becker S, Stoecker K, Gabriel M, Raoul H, Di Caro A, Wölfel R, Formenty P, Günther S 2015. Temporal and spatial analysis of the 2014-2015 Ebola virus outbreak in West Africa. Nature 524: 97–101.

Chacón RD, Sánchez-Llatas CJ, L Pajuelo S, Diaz Forero AJ, Jimenez-Vasquez V, Médico JA, Soto-Ugaldi LF, Astolfi-Ferreira CS, Piantino Ferreira AJ 2024. Molecular characterization of the meq oncogene of Marek's disease virus in vaccinated Brazilian poultry farms reveals selective pressure on prevalent strains. Vet Q. 44(1):1-13.

Chacón JL, Nogueira EO, Brentano L, Gomes CR, Astolfi-Ferreira CS, Villarreal L, Ferreira AJ 2010. Detection of chicken anemia virus and infectious bursal disease virus co-infection in broilers. Braz J Vet Res Anim Sci 47: 293–297.

Chang KS, Ohashi K, Onuma M 2002. Diversity (polymorphism) of the meq gene in the attenuated Marek's disease virus (MDV) serotype 1 and MDV-transformed cell lines. J Vet Med Sci. 64(12):1097–1101.

Charre C, Ginevra C, Sabatier M, Regue H, Destras G, Brun S, Burfin G, Scholtes C, Morfin F, Valette M, Lina B, Bal A, Josset L 2020. Evaluation of NGS-based approaches for SARS-CoV-2 whole genome characterisation. Virus Evol. 6(2): veaa075.

Chen F, Liu J, Yan Z, Liu D, Ji J, Qin J, Li H, Ma J, Bi Y, Xie Q 2012. Complete genome sequence analysis of a natural reassortant infectious bursal disease virus in China. J Virol 86: 11942–11943.

Cheng MC, Lai GH, Tsai YL, Lien YY 2024. Circulating hypervirulent Marek's disease viruses in vaccinated chicken flocks in Taiwan by genetic analysis of meq oncogene. PLoS One 19: e0303371.

Chettle NJ, Eddy RK, Wyeth PJ 1985. Comparison of virus neutralizing and precipitating antibodies to infectious bursal disease virus and their effect on susceptibility to challenge. Br Vet J 141: 146–150.

Chevalier C, Galloux M, Pous J, Henry C, Denis J, Da Costa B, Navaza J, Lepault J, Delmas B 2005. Structural peptides of a nonenveloped virus are involved in assembly and membrane translocation. J Virol 79: 12253–12263.

Cheville NF 1967. Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen, and thymus of the chicken. Am J Pathol 51: 527–551.

Chin R, Yamamoto R, Lin W, Lam K, Farver T 1984. Serological survey of infectious bursal disease virus serotypes 1 and 2 in California turkeys. Avian Dis 28: 1026–1036.

Chu DK, Poon LL, Chiu SS, Chan KH, Ng EM, Bauer I, Cheung TK, Ng IH, Guan Y, Wang D, Peiris JS 2012. Characterization of a novel gyrovirus in human stool and chicken meat. J Clin Virol. 55(3):209-13.

Ciriaco E, Píñera PP, Díaz-Esnal B, Laurà R 2003. Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). Microsc Res Tech 62: 482–487.

Conradie AM, Bertzbach LD, Bhandari N, Parcells M, Kaufer BB 2019. A Common Live-Attenuated Avian Herpesvirus Vaccine Expresses a Very Potent Oncogene. mSphere. 4(5): e00658–19.

Cortes PL, Cardona CJ 2004. Pathogenesis of a Marek's disease virus mutant lacking vIL-8 in resistant and susceptible chickens. Avian Dis. 48(1):50–60.

Cosgrove AS 1962. An apparently new disease of chickens: Avian nephrosis. Avian Dis 6: 385.

Coulibaly F, Chevalier C, Gutsche I, Pous J, Navaza J, Bressanelli S, Delmas B, Rey FA 2005. The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. Cell 120: 761–772.

Craig MI, Rimondi A, Delamer M, Sansalone P, König G, Vagnozzi A, Pereda A 2009. Molecular characterization of chicken infectious anemia virus circulating in Argentina during 2007. Avian Dis. 53(3):331–335.

Cui X, Lee LF, Reed WM, Kung HJ, Reddy SM 2004. Marek's disease virus-encoded vIL-8 gene is involved in early cytolytic infection but dispensable for establishment of latency. J Virol. 78(9):4753–4760.

Da Costa B, Chevalier C, Henry C, Huet JC, Petit S, Lepault J, Boot H, Delmas B 2002. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. J Virol 76: 2393–2402.

Darteil R, Bublot M, Laplace E, Bouquet JF, Audonnet JC, Riviè M 1995. Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2

immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens. Virology 211: 481–490.

de Boer GF, Groenendal JE, Boerrigter HM, Kok GL, Pol JMA 1986. Protective efficacy of Marek's Disease Virus (MDV) CVI-988 CEF 65 Clone C against challenge infection with three very virulent MDV strains. Avian Dis. 30(2):276.

Delgui L, Rodríguez JF, Colombo MI 2013. The endosomal pathway and the Golgi complex are involved in the infectious bursal disease virus life cycle. J Virol 87: 8993–9007.

Delgui L, Oña A, Gutiérrez S, Luque D, Navarro A, Castón JR, Rodríguez JF 2009. The capsid protein of infectious bursal disease virus contains a functional alpha 4 beta 1 integrin ligand motif. Virology 386: 360–372.

Devaney R, Trudgett J, Trudgett A, Meharg C, Smyth V 2016. A metagenomic comparison of endemic viruses from broiler chickens with runting-stunting syndrome and from normal birds. Avian Pathol. 45(6):616-629.

Dey S, Pathak D, Ramamurthy N, Maity HK, Chellappa MM 2019. Infectious bursal disease virus in chickens: prevalence, impact, and management strategies. Vet Med Res Rep 10: 85–97.

Domanska K, Mato T, Rivallan G, Smietanka K, Minta Z, de Boisseson C, Toquin D, Lomniczi B, Palya V, Eterradossi N 2004. Antigenic and genetic diversity of early European isolates of infectious bursal disease virus prior to the emergence of the very virulent viruses: early European epidemiology of infectious bursal disease virus revisited? Archives of Virology; 149:465–480.

Dormitorio TV, Giambrone JJ, Hoerr FJ 2007. Transmissible proventriculitis in broilers. Avian Pathol. 36(2):87-91.

Duarte A, Silva FM, Brito CR, Teixeira DS, Melo FL, Ribeiro BM, Nagata T, Campos FS 2019. Faecal Virome Analysis of Wild Animals from Brazil. Viruses. 11(9):803.

Elthair YM, Qian K, Jin W, Wang P, Qin A 2011. Molecular epidemiology of chicken anemia virus in commercial farms in China. Virol J 8: 145.

Eregae ME, Dewey CE, McEwen SA, Ouckama R, Ojkić D, Guerin MT 2014. Flock prevalence of exposure to avian adeno-associated virus, chicken anemia virus, fowl adenovirus, and infectious bursal disease virus among Ontario broiler chicken flocks. Avian Dis 58: 71–77.

Escaffre O, Le Nouën C, Amelot M, Ambroggio X, Ogden KM, Guionie O, Toquin D, Müller H, Islam MR, Eterradossi N 2013. Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. J Virol 87: 80–93.

Eterradossi N, Saif YM 2013. Infectious Bursal Disease. In: Diseases of Poultry (Swayne D, Glisson J, McDougald L, Nolan L, Suarez D, Nair V, eds). Blackwell Publishing, Iowa, p. 1394.

Eterradossi N, Saif YM 2008. Infectious Bursal Disease. In: Diseases of Poultry, 12th ed. (Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE, eds). Wiley Blackwell, pp. 185–208.

Eterradossi N, Toquin D, Rivallan G, Guittet M 1997. Modified activity of a VP2-located neutralizing epitope on various vaccine, pathogenic and hypervirulent strains of infectious bursal disease virus. Archives of virology 142, 255–70.

Fadly AM, Nazerian K 1983. Pathogenesis of infectious bursal disease in chickens infected with virus at various ages. Avian Diseases 27, 714–723.

Fan L, Wang Y, Jiang N, Gao Y, Niu X, Zhang W, Huang M, Bao K, Liu A, Wang S, Gao L, Li K, Cui H, Pan Q, Liu C, Zhang Y, Wang X, Qi X 2022. Residues 318 and 323 in capsid protein are involved in immune circumvention of the atypical epizootic infection of infectious bursal disease virus. Front Microbiol. 13:909252.

Fan L, Wang Y, Jiang N, Chen M, Gao L, Li K, Gao Y, Cui H, Pan Q, Liu C, Zhang Y, Wang X, Qi X 2020. Novel variant infectious bursal disease virus suppresses Newcastle disease vaccination in broiler and layer chickens. Poult Sci 99, 6542–6548.

Fan L, Wu T, Wang Y, Hussain A, Jiang N, Gao L, Li K, Gao Y, Liu C, Cui H, Pan Q, Zhang Y, Wang X, Qi X 2020. Novel variants of infectious bursal disease virus can severely damage the bursa of Fabricius of immunized chickens. Vet Microbiol. 240:108507.

Fan L, Wu T, Hussain A, Gao Y, Zeng X, Wang Y, Gao L, Li K, Wang Y, Liu C, Cui H, Pan Q, Zhang Y, Liu Y, He H, Wang X, Qi X 2019. Novel variant strains of infectious bursal disease virus isolated in China. Vet Microbiol 230, 212–220.

Farkas T, Fey B, Hargitt E 3rd, Parcells M, Ladman B, Murgia M, Saif Y 2012. Molecular detection of novel picornaviruses in chickens and turkeys. Virus Genes. 44(2):262-72.

Fatoba AJ, Adeleke MA 2019. Chicken anemia virus: A deadly pathogen of poultry. Acta Virol 63, 19–25.

Fehér E, Pazár P, Kovács E, Farkas SL, Lengyel G, Jakab F, Martella V, Bányai K 2014. Molecular detection and characterization of human gyroviruses identified in the ferret fecal virome. Arch Virol;159(12):3401-6.

Feng X, Zhu N, Cui Y, Hou L, Zhou J, Qiu Y, Yang X, Liu C, Wang D, Guo J, Sun T, Shi Y, Han N, Mo M, Liu J 2022. Characterization and pathogenicity of a naturally reassortant and recombinant infectious bursal disease virus in China. Transbound Emerg Dis 69, e746–e758.

Galloux M, Libersou S, Morellet N, Bouaziz S, Costa B Da, Ouldali M, Lepault J, Delmas B 2007. Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. J Biol Chem 282, 20774–20784.

Gao L, Li K, Qi X, Gao Y, Wang Y, Gao H, Wang X 2018. N-terminal domain of the RNA polymerase of very virulent infectious bursal disease virus contributes to viral replication and virulence. Sci China Life Sci 61, 1127–1129.

Garriga D, Querol-Audí J, Abaitua F, Saugar I, Pous J, Verdaguer N, Castón JR, Rodriguez JF 2006. The 2.6-Ångstrom structure of infectious bursal disease virus-

derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. J Virol 80, 6895–6905.

Giambrone JJ, Dormitorio T, Brown T 2001. Safety and efficacy of in ovo administration of infectious bursal disease viral vaccines. Avian Diseases 45, 144–148.

Giambrone JJ, Clay RP 1986. Evaluation of the immunogenicity, stability, pathogenicity, and immunodepressive potential of four commercial live infectious bursal disease vaccines. Poult Sci 65, 1287–1290.

Giambrone JJ 1979. Effects of early infectious bursal disease virus infection on immunity to Newcastle disease in adult chickens. Poult Sci 58, 794–798.

Giménez MC, Zanetti FA, Terebiznik MR, Colombo MI, Delgui LR 2018. Infectious bursal disease virus hijacks endosomal membranes as the scaffolding structure for viral replication. J Virol 92.

Giménez MC, Rodríguez Aguirre JF, Colombo MI, Delgui LR 2015. Infectious bursal disease virus uptake involves macropinocytosis and trafficking to early endosomes in a Rab5-dependent manner. Cell Microbiol 17, 988–1007.

Gimeno IM, Schat KA 2018. Virus-induced immunosuppression in chickens. Avian Diseases 62, 272–285.

Gimeno IM, Witter RL, Hunt HD, Reddy SM, Lee LF, Silva RF 2005. The pp38 gene of Marek's disease virus (MDV) is necessary for cytolytic infection of B cells and maintenance of the transformed state but not for cytolytic infection of the feather follicle epithelium and horizontal spread of MDV. J Virol. 79(7):4545–4549.

Gire SK, Goba A, Andersen KG, Sealfon RS, Park DJ, Kanneh L, Jalloh S, Momoh M, Fullah M, Dudas G, Wohl S, Moses LM, Yozwiak NL, Winnicki S, Matranga CB, Malboeuf CM, Qu J, Gladden AD, Schaffner SF, Yang X, Jiang PP, Nekoui M, Colubri A, Coomber MR, Fonnie M, Moigboi A, Gbakie M, Kamara FK, Tucker V, Konuwa E, Saffa S, Sellu J, Jalloh AA, Kovoma A, Koninga J, Mustapha I, Kargbo K, Foday M, Yillah M, Kanneh F, Robert W, Massally JL, Chapman SB, Bochicchio J, Murphy C,

Nusbaum C, Young S, Birren BW, Grant DS, Scheiffelin JS, Lander ES, Happi C, Gevao SM, Gnirke A, Rambaut A, Garry RF, Khan SH, Sabeti PC 2014. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. Science 345, 1369–1372.

Glisson J, Jackwood M, Pearson J, Reed W, Swayne D, Woolcock P 2008. Isolation, identification, and characterization of avian pathogens. Am Assoc Avian Pathol.

Gohl DM, Garbe J, Grady P, Daniel J, Watson RHB, Auch B, Nelson A, Yohe S, Beckman KB 2020. A rapid, cost-effective tailed amplicon method for sequencing SARS-CoV-2. BMC Genomics. 21(1):863.

Guerbois M, Fernandez-Salas I, Azar SR, Danis-Lozano R, Alpuche-Aranda CM, Leal G, Garcia-Malo IR, Diaz-Gonzalez EE, Casas-Martinez M, Rossi SL, Del Río-Galván SL, Sanchez-Casas RM, Roundy CM, Wood TG, Widen SG, Vasilakis N, Weaver SC 2016. Outbreak of Zika Virus Infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and First Confirmed Transmission by Aedes aegypti Mosquitoes in the Americas. J Infect Dis. 214(9):1349-1356.

Guzmán M, Cádiz L, Guerrero-Moncayo A, Cáceres F, Vidal S, Lapierre L, Sáenz L, Hidalgo H 2022. Molecular characterization of Infectious Bursal Disease Virus isolated in Chile reveals several mutations in VP2 coding region and a reassortment in its genome. Vet Res Commun. 46(4):1281–1289.

Haddad EE, Whitfill CE, Avakian AP, Ricks CA, Andrews PD, Thoma JA, Wakenell PS 1997. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. Avian Diseases 41, 882.

Hassan MK, Al-Natour MQ, Ward LA, Saif YM 1996. Pathogenicity, attenuation, and immunogenicity of infectious bursal disease virus. Avian Dis;40(3):567-71.

He CQ, Ma LY, Wang D, Li GR, Ding NZ 2009. Homologous recombination is apparent in infectious bursal disease virus. Virology 384, 51–58.

He Z, Chen X, Fu M, Tang J, Li X, Cao H, Wang Y, Zheng SJ 2018. Infectious bursal disease virus protein VP4 suppresses type I interferon expression via inhibiting K48-

linked ubiquitylation of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ). Immunobiology 223, 374–382.

Heine HG, Boyle DB 1993. Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens. Arch Virol 131, 277–292.

Heine HG, Haritou M, Failla P, Fahey K, Azad A 1991. Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains. J Gen Virol. 72:1835–1843.

Hernández M, Tomás G, Marandino A, Iraola G, Maya L, Mattion N, Hernández D, Villegas P, Banda A, Panzera Y, Pérez R 2015. Genetic characterization of South American infectious bursal disease virus reveals the existence of a distinct worldwide-spread genetic lineage. Avian Pathol 44, 212–221.

Hernández M, Banda A, Hernández D, Panzera F, Pérez R 2006. Detection of very virulent strains of infectious bursal disease virus (vvIBDV) in commercial broilers from Uruguay. Avian Dis. 50:624–631.

Hitchner SB 1970. Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs. Poultry Science;49(2):511-516.

Hon CC, Lam TT, Yip CW, Wong RT, Shi M, Jiang J, Zeng F, Leung FC 2008. Phylogenetic evidence for homologous recombination within the family Birnaviridae. J Gen Virol 89, 3156–3164.

https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/tramites-y-servicios/servicios/vademecum-productos-veterinarios.

Hu X, Chen Z, Wu X, Ding Z, Huang Y, Fu Q, Chen Z, Wu H 2023. Phosphorylation of VP1 mediated by CDK1-Cyclin B1 facilitates infectious bursal disease virus replication. J Virol 97, e0194122.

Huang Z, Elankumaran S, Yunus AS, Samal SK 2004. A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. J Virol 78, 10054–10063.

Hussain A, Wu T, Li H, Fan L, Li K, Gao L, Wang Y, Gao Y, Liu C, Cui H, Pan Q, Zhang Y, Aslam A, Muti-Ur-Rehman K, Munir M, Butt SL, Wang X, Qi X 2019. Pathogenic characterization and full length genome sequence of a reassortant infectious bursal disease virus newly isolated in Pakistan. Virol Sin 34, 102–105.

ICTV. (2021). Virus Taxonomy: 2021 Release. International Committee on Taxonomy of Viruses

Ide PR, Schulte-Nordholt JA, Dewitt WF, Smith JD 1978. Broiler-breeder vaccination against infectious bursal disease and persistence of maternal antibody in progeny. Can Vet J 19: 123–127.

Ikuta N, El-Attrache J, Villegas P, García EM, Lunge VR, Fonseca, AS, Oliveira C, Marques EK 2001. Molecular characterization of Brazilian infectious bursal disease viruses. Avian Dis, 45, 297–306.

Isakov O, Bordería AV, Golan D, Hamenahem A, Celniker G, Yoffe L 2015. Deep sequencing analysis of viral infection and evolution allows rapid and detailed characterization of viral mutant spectrum. Bioinformatics 31: 2141–2150.

Islam MR, Nooruzzaman M, Rahman T, Mumu TT, Rahman MM, Chowdhury EH, Eterradossi N, Müller H 2021. A unified genotypic classification of infectious bursal disease virus based on both genome segments. Avian Pathol 50: 190–206.

Ismail N, Saif Y 1988. Immunological studies on infectious bursal disease viruses in chickens. In: Conf Res Workers Anim Dis, Chicago, p 344

Ismail N, Saif Y, Moorhead PD 1988. Lack of pathogenicity of five serotype 2 infectious bursal disease viruses in chickens. Avian Dis 32: 757.

Ismail N, Fadly AM, Chang TS 1987. Effect of bursal cell number on the pathogenesis of infectious bursal disease in chickens. Avian Dis 31: 546–555.

.

Iván J, Velhner M, Ursu K, Germán P, Mató T, Drén CN, Mészáros J 2005. Delayed vaccine virus replication in chickens vaccinated subcutaneously with an immune complex infectious bursal disease vaccine: Quantification of vaccine virus by real-time polymerase chain reaction. Can J Vet Res 69: 135–142.

Jackwood DJ, Stoute ST, Crossley BM 2016. Pathogenicity of genome reassortant infectious bursal disease viruses in chickens and turkeys. Avian Dis 60: 765–772.

Jackwood DJ 2012. Molecular epidemiologic evidence of homologous recombination in infectious bursal disease viruses. Avian Dis 56: 574–577.

Jackwood DJ, Sommer-Wagner SE, Crossley BM, Stoute ST, Woolcock PR, Charlton BR 2011. Identification and pathogenicity of a natural reassortant between a very virulent serotype 1 infectious bursal disease virus (IBDV) and a serotype 2 IBDV. Virology 420: 98–105.

Jackwood DJ, Sreedevi B, LeFever LJ, Sommer-Wagner SE 2008. Studies on naturally occurring infectious bursal disease viruses suggest that a single amino acid substitution at position 253 in VP2 increases pathogenicity. Virology 377: 110–116.

Jackwood DJ, Sommer-Wagner S 2007. Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. Virology; 365:369–375.

Jackwood DJ, Sommer SE 2002. Identification of infectious bursal disease virus quasispecies in commercial vaccines and field isolates of this double-stranded RNA virus. Virology. 304(1):105–113.

Jackwood DJ, Sommer SE, Knoblich HV 2001. Amino acid comparison of infectious bursal disease viruses placed in the same or different molecular groups by RT/PCR-RFLP. Avian Diseases; 45:330–339.

Jackwood DJ, Saif YM, Moorhead PD 1985. Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens. Avian Dis. 29(4):1184-94.

Jackwood DJ, Saif YM, Moorhead PD, Bishop G 1984. Failure of two serotype II infectious bursal disease viruses to affect the humoral immune response of turkeys. Avian Dis 28: 100–116.

Jackwood DJ, Saif YM, Hughes JH 1982. Characteristics and serologic studies of two serotypes of infectious bursal disease virus in turkeys. Avian Dis 26: 871–878.

Jagadish MN, Staton VJ, Hudson PJ, Azad AA 1988. Birnavirus precursor polyprotein is processed in Escherichia coli by its own virus-encoded polypeptide. J Virol 62: 1084–1087.

Jakka P, Reddy YK, Kirubaharan JJ, Chandran ND 2014. Evaluation of immune responses by live infectious bursal disease vaccines to avoid vaccination failures. Eur J Microbiol Immunol (Bp);4(2):123-7.

Jauk F 2019. Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y aplicaciones. Hematología 23: 21–38.

Jayasundara JMKGK, Walkden-Brown SW, Katz ME, Islam AFMF, Renz KG, McNally J, Hunt PW 2017. Pathogenicity, tissue distribution, shedding and environmental detection of two strains of IBDV following infection of chickens at 0 and 14 days of age. Avian Pathol;46(3):242-255.

Jeon WJ, Choi KS, Lee DW, Lee EK, Cha SH, Cho SH, Kwon JH, Yoon Y, Kim SJ, Kim JH, Kwon HJ 2009. Molecular epizootiology of infectious bursal disease (IBD) in Korea. Virus Genes; 39:342–351.

Jeurissen SH, Janse EM, Lehrbach PR, Haddad EE, Avakian A, Whitfill CE 1998. The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease. Immunology 95: 494–500.

Junnu S, Pohuang T 2023. Full-length coding sequence analysis of genome segments A and B of infectious bursal disease virus in Thailand: identification of Chinese-like and recombinant virus in the field. Avian Pathol 52: 339–350.

Kaiser P, Hughes S, Bumstead N 1999. The chicken 9E3/CEF4 CXC chemokine is the avian orthologue of IL8 and maps to chicken chromosome 4 syntenic with genes flanking the mammalian chemokine cluster. Immunogenetics. 49(7–8):673–684.

Kannaki TR, Priyanka E, Nishitha Y, Krishna SV, Haunshi S, Subbiah M 2022. Molecular detection and phylogenetic analysis of Marek's disease virus virulence-associated genes from vaccinated flocks in southern India reveals circulation of virulent MDV genotype. Transbound Emerg Dis 69: e244–e253.

Kibenge FS, Dhama V 1997. Evidence that virion-associated VP1 of avibirnaviruses contains viral RNA sequences. Arch Virol 142: 1227–1236.

Kibenge FS, Jackwood DJ, Mercado CC 1990. Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. J Gen Virol 71: 569–577.

Kim HR, Kwon YK, Bae YC, Oem JK, Lee OS 2010. Genetic characteristics of virion protein 2 genes of infectious bursal disease viruses isolated from commercial chickens with clinical disease in South Korea. Poult Sci. 89(8):1642–1646.

Kim IJ, Gagic M, Sharma JM 1999. Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. Avian Dis. 43(3):401–413.

Kumar K, Singh KC, Prasad CB 2000. Immune responses to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens. Trop Anim Health Prod. 32(6):357–360.

Kumar S, Stecher G, Tamura K 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol. 33(7):1870-4.

Kwon HM, Kim DK, Hahn TW, Han JH, Jackwood DJ 2000. Sequence of precursor polyprotein gene (segment A) of infectious bursal disease viruses isolated in Korea. Avian Diseases; 44:691–696.

Lambisia AW, Mohammed KS, Makori TO, Ndwiga L, Mburu MW, Morobe JM, Moraa EO, Musyoki J, Murunga N, Mwangi JN, Nokes DJ, Agoti CN, Ochola-Oyier LI, Githinji

G 2022. Optimization of the SARS-CoV-2 ARTIC Network V4 Primers and Whole Genome Sequencing Protocol. Front Med 9: 836728.

Landman WJM, Verschuren SBE 2003. Titration of Marek's Disease Cell Associated Vaccine Virus (CVI 988) of Reconstituted Vaccine and Vaccine Ampoules from Dutch Hatcheries. Avian Dis. 47(4):1458–1465.

Lau SKP, Woo PCY, Yip CCY, Li KSM, Fan RYY, Bai R, Huang Y, Chan KH, Yuen KY 2014. Chickens host diverse picornaviruses originated from potential interspecies transmission with recombination. J Gen Virol. 95(Pt 9):1929-1944.

Lazarus D, Pasmanik-Chor M, Gutter B, Gallili G, Barbakov M, Krispel S, Pitcovski J 2008. Attenuation of very virulent infectious bursal disease virus and comparison of full sequences of virulent and attenuated strains. Avian Pathol. 37(2):151-9.

Lee HJ, Jang I, Shin SH, Lee HS, Choi KS 2017. Genome Sequence of a Novel Reassortant and Very Virulent Strain of Infectious Bursal Disease Virus. Genome Announc. 5(34): e00730–17.

Legnardi M, Poletto F, Talaat S, Selim K, Moawad MK, Franzo G, Tucciarone CM, Cecchinato M, Sultan H 2023. First detection and molecular characterization of novel variant infectious bursal disease virus (genotype A2dB1b) in Egypt. Viruses. 15:1–14.

Legnardi M, Franzo G, Tucciarone CM, Koutoulis K, Duarte I, Silva M, Le Tallec B, Cecchinato M 2022. Detection and molecular characterization of a new genotype of infectious bursal disease virus in Portugal. Avian Pathol 51: 97–105.

Lejal N, Costa BD, Huet JC, Delmas B, Costa B Da 2000. Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. J Gen Virol 81: 983–992.

Letunic I, Bork P 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. Nucleic Acids Res 44: W242–W245.

Letzel T, Coulibaly F, Rey FA, Delmas B, Jagt E, Loon AAMW van, Mundt E 2007. Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. J Virol 81: 12827–12835.

Levy AM, Gilad O, Xia L, Izumiya Y, Choi J, Tsalenko A 2005. Marek's disease virus: Meq transforms chicken cells via the v-Jun transcriptional cascade: A converging transforming pathway for avian oncoviruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(41):14831–1486.

Li G, Kuang H, Guo H, Cai L, Chu D, Wang X, Hu J, Rong J 2020. Development of a recombinant VP2 vaccine for the prevention of novel variant strains of infectious bursal disease virus. Avian Pathol. 49:557–571.

Li G, Yuan S, He M, Zhao M, Hao X, Song M, Zhang L, Qiao C, Huang L, Zhang L, Li C, Wang G, Cheng Z 2018. Emergence of gyrovirus 3 in commercial broiler chickens with transmissible viral proventriculitis. Transbound Emerg Dis. 65(5):1170-1174.

Li H, Durbin R 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics 25(14):1754-60.

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R 2009. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics. 25(16): 2078-9.

Li K, Niu X, Jiang N, Zhang W, Wang G, Li K, Huang M, Gao Y, Qi X, Wang X 2023. Comparative Pathogenicity of Three Strains of Infectious Bursal Disease Virus Closely Related to Poultry Industry. Viruses;15(6):1257.

Li K, Courtillon C, Guionie O, Allée C, Amelot M, Qi X, Gao Y, Wang X, Eterradossi N 2015. Genetic, antigenic and pathogenic characterization of four infectious bursal disease virus isolates from China suggests continued evolution of very virulent viruses. Infect Genet Evol; 30:120-127.

Li X, Zhang K, Pei Y, Xue J, Ruan S, Zhang G 2020. Development and application of an MRT-qPCR assay for detecting coinfection of six vertically transmitted or immunosuppressive avian viruses. Front Microbiol 11: 1581.

Li Z, Wang Y, Xue Y, Li X, Cao H, Zheng SJ 2012. Critical role for voltage-dependent anion channel 2 in infectious bursal disease virus-induced apoptosis in host cells via interaction with VP5. J Virol 86: 1328–1338.

Lima DA, Cibulski SP, Tochetto C, Varela APM, Finkler F, Teixeira TF, Loiko MR, Cerva C, Junqueira DM, Mayer FQ, Roehe PM 2019. The intestinal virome of malabsorption syndrome-affected and unaffected broilers through shotgun metagenomics. Virus Res. 261:9-20.

Lima DA, Cibulski SP, Finkler F, Teixeira TF, Varela APM, Cerva C, Loiko MR, Scheffer CM, Dos Santos HF, Mayer FQ, Roehe PM 2017. Faecal virome of healthy chickens reveals a large diversity of the eukaryote viral community, including novel circular ssDNA viruses. J Gen Virol. 98(4):690-703.

Lin T-W, Lo C-W, Lai S-Y, Fan R-J, Lo C-J, Chou Y-M, Thiruvengadam R, Wang AH-J, Wang M-Y 2007. Chicken Heat Shock Protein 90 Is a Component of the Putative Cellular Receptor Complex of Infectious Bursal Disease Virus. J Virol 81: 8730–8741.

Liu JL, Lin SF, Xia L, Brunovskis P, Li D, Davidson I, Lee LF, Kung HJ 1999. MEQ and V-IL8: cellular genes in disguise? Acta Virol. 43(2–3):94–101.

Liu L, Li Y, Yin M, Zhao P, Guo L, Wang Y 2022. Genomic Characterization of Chicken Anemia Virus in Broilers in Shandong Province, China, 2020-2021. Front Vet Sci; 9: 816860.

Liu M, Vakharia VN 2006. Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. J Virol 80: 3369–3377.

Liu X, Giambrone JJ, Dormitorio T 1998. Simplified sample processing combined with a sensitive nested polymerase chain reaction assay for detection of infectious bursal disease virus in the bursa of Fabricus. Avian Dis 42: 480–485.

Lombardo E, Maraver A, Castón JR, Rivera J, Fernández-Arias A, Serrano A, Carrascosa JL, Rodriguez JF 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. J Virol 73: 6973–6983.

Lu Z, Zhang L, Wang N, Chen Y, Gao L, Wang Y, Gao H, Gao Y, Li K, Qi X, Wang X 2015. Naturally occurring reassortant infectious bursal disease virus in northern China. Virus Res. 203:92-5.

Luan Q, Jiang Z, Wang D, Wang S, Yin Y, Wang J 2022. A sensitive triple nanoparticle-assisted PCR assay for detection of fowl adenovirus, infectious bursal disease virus and chicken anemia virus. J Virol Methods 303: 114499.

Lucio B, Hitchner SB 1979. Infectious bursal disease emulsified vaccine: Effect upon neutralizing antibody levels in the dam and subsequent protection of the progeny. Avian Diseases; 23:466-78.

Luo J, Zhang H, Teng M, Fan J-M, You L-M, Xiao Z-J, Yi M-L, Zhi Y-B, Li X-W, Zhang G-P 2010. Surface IgM on DT40 cells may be a component of the putative receptor complex responsible for the binding of infectious bursal disease virus. Avian Pathol 39: 359–365.

Lupini C, Felice V, Silveira F, Mescolini G, Berto G, Listorti V, Cecchinato M, Catelli E 2020. Comparative in vivo pathogenicity study of an ITA genotype isolate (G6) of infectious bursal disease virus. Transbound Emerg Dis;67(2):1025-1031.

Luque D, Saugar I, Rejas MT, Carrascosa JL, Rodríguez JF, Castón JR 2009. Infectious bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. J Mol Biol 386: 891–901.

Mackie J, Kinoti WM, Chahal SI, Lovelock DA, Campbell PR, Tran-Nguyen LTT, Rodoni BC, Constable FE 2022. Targeted Whole Genome Sequencing (TWG-Seq) of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus Using Tiled Amplicon Multiplex PCR and Nanopore Sequencing. Plants (Basel). 11(20):2716.

Maggi F, Macera L, Focosi D, Vatteroni ML, Boggi U, Antonelli G, Eloit M, Pistello M 2012. Human gyrovirus DNA in human blood, Italy. Emerg Infect Dis;18(6):956-9.

Mandeville WF, Cook FK, Jackwood DJ 2000. Heat lability of five strains of infectious bursal disease virus. Poult Sci. 79:838–842.

Maraver A, Ona A, Abaitua F, Gonzalez D, Clemente R, Ruiz-Diaz JA, Caston JR, Pazos F, Rodriguez JF 2003. The Oligomerization Domain of VP3, the Scaffolding Protein of Infectious Bursal Disease Virus, Plays a Critical Role in Capsid Assembly. J Virol 77: 6438–6449.

Mata CP, Mertens J, Fontana J, Luque D, Allende-Ballestero C, Reguera D, Trus BL, Steven AC, Carrascosa JL, Castón JR 2018. The RNA-binding protein of a double-stranded RNA virus acts like a scaffold protein. J Virol 92.

Mazariegos LA, Lukert PD, Brown J 1990. Pathogenicity and immunosuppressive properties of infectious bursal disease "intermediate" strains. Avian Dis 34: 203–208.

McFerran JB, McNulty MS, McKillop ER, Connor TJ, McCracken RM, Collins DS, Allan GM 1980. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. Avian Pathol 9: 395–404.

McIlroy SG, Goodall EA, McCracken RM 1989. Economic effects of subclinical infectious bursal disease on broiler production. Avian Pathol 18: 465–480.

McNulty MS 1991. Chicken anaemia agent: a review. Avian Pathol 20: 187–203.

Mescolini G, Lupini C, Felice V, Guerrini A, Silveira F, Cecchinato M, Catelli E 2019. Molecular characterization of the meq gene of Marek's disease viruses detected in unvaccinated backyard chickens reveals the circulation of low- and high-virulence strains. Poult Sci. 98(8):3130–3137.

Metzker ML 2010. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet 11: 31–46.

Michel LO, Jackwood DJ 2017. Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. Arch Virol 162: 3661–3670.

Miller MM, Schat KA 2004. Chicken infectious anemia virus: an example of the ultimate host parasite relationship. Avian Dis 48: 734–745.

Minta Z, Roszkowski J, Karczewski W, Kozaczynski W 1985. Properties of indigenous strains of infectious bursal disease virus. II. Pathogenicity. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy;28-29:67-73.

Misencik MJ, Grubaugh ND, Andreadis TG, Ebel GD, Armstrong PM 2016. Isolation of a Novel Insect-Specific Flavivirus from Culiseta melanura in the Northeastern United States. Vector Borne Zoonotic Dis. 16(3):181-90.

Müller H, Mundt E, Eterradossi N, Islam MR 2012. Current status of vaccines against infectious bursal disease. Avian Pathol 41: 133–139.

Müller H, Scholtissek C, Becht H 1979. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. J Virol 31: 584–589.

Mundt E, Beyer J, Müller H 1995. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. J Gen Virol 76: 437–443.

Mundt E, Müller H 1995. Complete nucleotide sequences of 5'- and 3'- noncoding regions of both genome segments of different strains of infectious bursal disease virus. Virology 209: 10–18.

Muskett JC, Reed NE, Thornton DH 1985. Increased virulence of an infectious bursal disease live virus vaccine after passage in chicks. Vaccine;3(3):309-12.

Myint O, Suwanruengsri M, Araki K, Izzati UZ, Pornthummawat A, Nueangphuet P, Fuke N, Hirai T, Jackwood DJ, Yamaguchi R 2021. Bursa atrophy at 28 days old caused by variant infectious bursal disease virus has a negative economic impact on broiler farms in Japan. Avian Pathol. 50:6–17.

Nader K, Hardt O, Lanius R 2013. Systemic and local antibody responses to infectious bronchitis virus in chickens inoculated with infectious bursal disease virus and control chickens. Dialogues Clin Neurosci 15: 475–486.

Nair V, Gimeno I, Dunn J, Zavala G, Williams SM, Reece RL, Hafner S 2020. Neoplastic Diseases. In Diseases of Poultry, pp. 548–715.

Najimudeen SM, Hassan MSH, Cork SC, Abdul-Careem MF 2020. Infectious bronchitis coronavirus infection in chickens: Multiple system disease with immune suppression. Pathogens 9: 1–17.

Nick H, Cursiefen D, Becht H 1976. Structural and growth characteristics of infectious bursal disease virus. J Virol 18: 227–234.

Nielsen OL, Sørensen P, Hedemand JE, Laursen SB, Jørgensen PH 1998. Inflammatory response of different chicken lines and B haplotypes to infection with infectious bursal disease virus. Avian Pathol 27: 181–189.

Niu JT, Yi SS, Dong GY, Guo YB, Zhao YL, Huang HL, Wang K, Hu GX, Dong H 2019. Genomic Characterization of Diverse Gyroviruses Identified in the Feces of Domestic Cats. Sci Rep;9(1):13303.

Noor M, Mahmud MS, Ghose PR, Roy U, Nooruzzaman M, Chowdhury EH, Das PM, Islam MR, Müller H 2014. Further evidence for the association of distinct amino acid residues with in vitro and in vivo growth of infectious bursal disease virus. Arch Virol 159: 701–709.

Noteborn MH, Koch G 1995. Chicken anaemia virus infection: molecular basis of pathogenicity. Avian Pathol 24: 11–31.

Nouën C, Toquin D, Müller H, Raue R, Kean KM, Langlois P, Cherbonnel M, Eterradossi N 2012. Different domains of the RNA polymerase of infectious bursal disease virus contribute to virulence. PLoS One 7: e28064.

Nouën C, Rivallan G, Toquin D, Darlu P, Morin Y, Beven V, De Boisson C, Cazaban C, Comte S, Gardin Y, Eterradossi N 2006. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment B-reassorted isolate. J Gen Virol 87: 209–216.

Nunoya T, Otaki Y, Tajima M, Hiraga M, Saito T 1992. Occurrence of acute infectious bursal disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in specific-pathogen-free chickens. Avian Dis 36: 597.

OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030 2021. OECD.

Ojkic D, Martin E, Swinton J, Binnington B, Brash M 2007. Genotyping of Canadian field strains of infectious bursal disease virus. Avian Pathology; 36:427–433.

Oña A, Luque D, Abaitua F, Maraver A, Castón JR, Rodríguez JF 2004. The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. Virology 322: 135–142.

Ortigas-Vásquez A, Pandey U, Renner DW, Bowen CD, Baigent SJ, Dunn J, Cheng H, Yao Y, Read AF, Nair V, Kennedy DA, Szpara ML 2024. Comparative analysis of multiple consensus genomes of the same strain of Marek's disease virus reveals intrastrain variation. Virus Evol. 10(1): veae047.

Ozan E, Muftuoglu B, Sahindokuyucu I, Kurucay HN, Inal S, Kuruca N, Elhag AE, Karaca E, Tamer C, Gumusova S, Albayrak H, Barry G, Gulbahar MY, Yazici Z 2021. Marek's disease virus in vaccinated poultry flocks in Turkey: its first isolation with molecular characterization. Arch Virol 166: 559–569.

Pan J, Lin L, Tao YJ 2009. Self-guanylylation of birnavirus VP1 does not require an intact polymerase activity site. Virology 395: 87–96.

Pan J, Vakharia VN, Tao YJ 2007. The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 7385–7390.

Parkhurst RT 1964. On-the-farm studies of Gumboro disease in broilers. Avian Dis 8: 584.

Peck KM, Lauring AS 2018. Complexities of viral mutation rates. J Virol 92.

Perelman B, Heller ED 1983. The effect of infectious bursal disease virus on the immune system of turkeys. Avian Dis 27: 66–76.

Pérez R, Calleros L, Marandino A, Sarute N, Iraola G, Grecco S 2014. Phylogenetic and genome-wide deep-sequencing analyses of canine parvovirus reveal co-infection with field variants and emergence of a recent recombinant strain. PLoS One 9: e111779.

Petek M, D'Aprile PN, Cancellotti F 1973. Biological and physico-chemical properties of the infectious bursal disease virus (IBDV). Avian Pathol. 2:135–152.

Petrackova A, Vasinek M, Sedlarikova L, Dyskova T, Schneiderova P, Novosad T, Papajik T, Kriegova E 2019. Standardization of Sequencing Coverage Depth in NGS: Recommendation for Detection of Clonal and Subclonal Mutations in Cancer Diagnostics. Front Oncol. 9:851.

Phan TG, da Costa AC, Zhang W, Pothier P, Ambert-Balay K, Deng X, Delwart E 2015. A new gyrovirus in human feces. Virus Genes;51(1):132-5.

Phan TG, Li L, O'Ryan MG, Cortes H, Mamani N, Bonkoungou IJO, Wang C, Leutenegger CM, Delwart E 2012. A third gyrovirus species in human faeces. J Gen Virol. 93(Pt 6):1356-1361.

Pikuła A, Lisowska A, Domańska-Blicharz K 2023. Epidemiology of infectious bursal disease virus in Poland during 2016-2022. Viruses 15: 289.

Pikuła A, Śmietanka K, Perez LJ 2020. Emergence and expansion of novel pathogenic reassortant strains of infectious bursal disease virus causing acute outbreaks of the disease in Europe. Transbound Emerg Dis 67: 1739–1744.

Pikuła A, Lisowska A, Jasik A, Śmietanka K 2018. Identification and assessment of virulence of a natural reassortant of infectious bursal disease virus. Vet Res 49: 89.

Posada D 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. Mol Biol Evol 25: 1253–1256.

Prandini F, Simon B, Jung A, Pöppel M, Lemiere S, Rautenschlein S 2016. Comparison of infectious bursal disease live vaccines and a HVT-IBD vector vaccine and their effects on the immune system of commercial layer pullets. Avian Pathol 45: 114–125.

Prathibha Y, Sreedevi B, Vinod Kumar N, Srilatha C 2018. Molecular characterization and phylogenetic analysis of oncogenes from virulent serotype-1 Marek's disease virus in India. Acta Virol 62: 277–286.

Qi X, Zhang L, Chen Y, Gao L, Wu G, Qin L, Wang Y, Ren X, Gao Y, Gao H, Wang X 2013. Mutations of residues 249 and 256 in VP2 are involved in the replication and virulence of infectious bursal disease virus. PLoS One 8.

Qi X, Gao H, Gao Y, Qin L, Wang Y, Gao L, Wang X 2009. Naturally occurring mutations at residues 253 and 284 in VP2 contribute to the cell tropism and virulence of very virulent infectious bursal disease virus. Antiviral Res 84: 225–233.

Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, Oliveira G, Robles-Sikisaka R, Rogers TF, Beutler NA, Burton DR, Lewis-Ximenez LL, de Jesus JG, Giovanetti M, Hill SC, Black A, Bedford T, Carroll MW, Nunes M, Alcantara LC, Sabino EC, Baylis SA, Faria NR, Loose M, Simpson JT, Pybus OG, Andersen KG, Loman NJ 2017. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. Nat Protoc 12: 1261–1276.

Quiñones-Mateu ME, Avila S, Reyes-Teran G, Martinez MA 2014. Deep sequencing: Becoming a critical tool in clinical virology. J Clin Virol 61: 9–19.

Rajcani J, Vojvodova A 1998. The role of herpes simplex virus glycoproteins in the virus replication cycle. Acta Virol. 42(2):103–118.

Rautenschlein S, Kraemer C, Montiel E, Vanmarcke J, Haase C 2007. Bilateral effects of vaccination against infectious bursal disease and Newcastle disease in specific-pathogen-free layers and commercial broiler chickens. Avian Dis. 51(1):14–20.

Rautenschlein S, Kraemer Ch, Vanmarcke J, Montiel E 2005. Protective efficacy of intermediate and intermediate plus infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines against very virulent IBDV in commercial broilers. Avian Dis. 49(2):231-7.

Reed LJ, Muench H 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. American Journal of Hygiene; 27:493-497.

Renshaw RW, Soiné C, Weinkle T, O'Connell PH, Ohashi K, Watson S, Lucio B, Harrington S, Schat KA 1996. A hypervariable region in VP1 of chicken infectious

anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. J Virol. 70:8872–8878.

Rijsewijk FA, Dos Santos HF, Teixeira TF, Cibulski SP, Varela AP, Dezen D, Franco AC, Roehe PM 2011. Discovery of a genome of a distant relative of chicken anemia virus reveals a new member of the genus Gyrovirus. Arch Virol;156(6):1097-100.

Rosenberger JK, Cloud SS 1998. Chicken anemia virus. Poult Sci. 77(8):1190-2.

Rosenberger JK, Cloud SS 1989. The effects of age, route of exposure, and coinfection with infectious bursal disease virus on the pathogenicity and transmissibility of chicken anemia agent (CAA). Avian Dis 33: 753–759.

Rosenberger JK, Cloud SS, Gelb J, Odor E, Dohms JE 1985. Sentinel bird survey of Delmarva broiler flocks. Proceedings of the 20th National Meeting on Poultry Health and Condemnations. Ocean City, Maryland, USA. pp. 94–202.

Saif YM, Fletcher O 2020. Pathotyping of IBDV. Avian Dis;64(3):241-242.

Samy A, Courtillon C, Briand FX, Khalifa M, Selim A, Arafa AES, Hegazy A, Eterradossi N, Soubies SM 2020. Continuous circulation of an antigenically modified very virulent infectious bursal disease virus for fifteen years in Egypt. Infect Genet Evol. 78:104099.

Sánchez AB, Rodriguez JF 1999. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. Virology 262: 190–199.

Saugar I, Luque D, Oña A, Rodríguez JF, Carrascosa JL, Trus BL, Castón JR 2005. Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: An amphipathic α helix as a molecular switch. Structure 13: 1007–1017.

Sauvage V, Cheval J, Foulongne V, Gouilh MA, Pariente K, Manuguerra JC, Richardson J, Dereure O, Lecuit M, Burguiere A, Caro V, Eloit M 2011. Identification of the first human gyrovirus, a virus related to chicken anemia virus. J Virol;85(15):7948-50.

Schat KA, van Santen VL 2020. Chicken Infectious Anemia and Circovirus Infections in Commercial Flocks. In Diseases of Poultry (eds Swayne DE, Boulianne M, Logue CM,

McDougald LR, Nair V, Suarez DL, Wit S, Grimes T, Johnson D, Kromm M, Prajitno TY, Rubinoff I, Zavala G). Wiley

Schat KA 2009. Chicken Anemia Virus. Current Topics Microbiology Immunology. 331:151-183.

Schmieder R, Edwards R 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. Bioinformatics;27(6):863-4.

Shamblin CE, Greene N, Arumugaswami V, Dienglewicz RL, Parcells MS 2004. Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen pp38- and transformation antigen Meq-encoding genes: association of meq mutations with MDVs of high virulence. Vet Microbiol. 102(3–4):147–167.

Sharma JM, Dohms JE, Metz AL 1989. Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of specific-pathogen-free chickens. Avian Dis 33: 112–124.

Shcherbakova LO, Lomakin AI, Borisov AV, Drygin VV, Gusev AA 1998. Comparative analysis of the VP2 variable region of the gene from infectious bursal disease virus isolates. Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologiia i Virusologiia;1:35–40.

Silva FMF, Vidigal PMP, Myrrha LW, Fietto JLR, Silva A, Almeida MR 2013. Tracking the molecular epidemiology of Brazilian Infectious bursal disease virus (IBDV) isolates. Infection, Genetics and Evolution 13: 18–26.

Silva MS, Rissi DR, Swayne DE 2016. Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Produces More-Severe Disease and Lesions in Specific-Pathogen-Free (SPF) Leghorns Than in SPF Broiler Chickens. Avian Diseases 60: 63–66.

Silveira F, Felice V, Franzo G, Mescolini G, Catelli E, Cecchinato M, Berto G, Listorti V, Lupini C 2019. Inoculation of specific pathogen-free chickens with an infectious bursal disease virus of the ITA genotype (G6) leads to a high and persistent viral load in lymphoid tissues and to a delayed antiviral response. Vet Microbiol; 235:136-142.

Skeeles J, Lukert P, Buysscher E De, Fletcher O, Brown J 1979. Infectious bursal disease viral infections. II. The relationship of age, complement levels, virus-neutralizing antibody, clotting, and lesions. Avian Diseases 23: 107–117.

Snyder DB 1990. Changes in the field status of infectious bursal disease virus. Avian Pathol 19: 419–423.

Song H, Kim H, Kwon Y, Kim H 2024. Genetic characterization of chicken infectious anaemia viruses isolated in Korea and their pathogenicity in chicks. Front Cell Infect Microbiol. 14:1333596.

Spatz SJ, Petherbridge L, Zhao Y, Nair V 2007. Comparative full-length sequence analysis of oncogenic and vaccine (Rispens) strains of Marek's disease virus. J Gen Virol. 88(Pt 4):1080–1096.

Spies U, Müller H, Becht H 1987. Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. Virus Res 8: 127–140.

Statista 2024. Global production of meat 2016-2023. https://www.statista.com/statistics/237632/production-of-meat-worldwide-since-1990/.

Stehr-Green PA, Hewer P, Meekin GE, Judd LE 1993. The aetiology and risk factors for warts among poultry processing workers. Int J Epidemiol. 22(2):294-8.

Tacken MG, Thomas AA, Peeters BP, Rottier PJ, Boot HJ 2004. VP1, the RNA-dependent RNA polymerase and genome-linked protein of infectious bursal disease virus, interacts with the carboxy-terminal domain of translational eukaryotic initiation factor 4AII. Arch Virol 149: 2245–2260.

Tanimura N, Tsukamoto K, Nakamura K, Narita M, Maeda M 1995. Association between pathogenicity of infectious bursal disease virus and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry. Avian Dis;39(1):9-20.

Taylor SW 1980. A prevalence study of virus warts on the hands in a poultry processing and packing station. J Soc Occup Med. 30(1):20-3.

Techera C, Marandino A, Tomás G, Grecco S, Hernández M, Hernández D, Panzera Y, Pérez R 2021. Origin, spreading and genetic variability of chicken anaemia virus. Avian Pathol;50(4):311-320.

Techera C, Tomás G, Panzera Y, Banda A, Perbolianachis P, Pérez R, Marandino A 2019. Development of real-time PCR assays for single and simultaneous detection of infectious bursal disease virus and chicken anemia virus. Mol Cell Probes 43: 58–63.

Thai TN, Jang I, Kim HA, Kim HS, Kwon YK, Kim HR 2021. Characterization of antigenic variant infectious bursal disease virus strains identified in South Korea. Avian Pathol. 50(2):174–181.

Tian M, Zhao Y, Lin Y, Zou N, Liu C, Liu P, Cao S, Wen X, Huang Y 2011. Comparative analysis of oncogenic genes revealed unique evolutionary features of field Marek's disease virus prevalent in recent years in China. Virol J 8: 121.

Tippenhauer M, Heller DE, Weigend S, Rautenschlein S 2013. The host genotype influences infectious bursal disease virus pathogenesis in chickens by modulation of T cells responses and cytokine gene expression. Dev Comp Immunol 40: 1–10.

Tomás G, Marandino A, Techera C, Olivera V, Perbolianachis P, Fuques E, Grecco S, Hernández M, Hernández D, Calleros L, Craig MI, Panzera Y, Vagnozzi A, Pérez R 2020. Origin and global spreading of an ancestral lineage of the infectious bursal disease virus. Transbound Emerg Dis 67: 1198–1212.

Tomás G, Marandino A, Courtillon C, Amelot M, Keita A, Pikula A, Hernández M, Hernández D, Vagnozzi A, Panzera Y, Domańska-Blicharz K, Eterradossi N, Pérez R, Soubies SM 2019. Antigenicity, pathogenicity and immunosuppressive effect caused by a South American isolate of infectious bursal disease virus belonging to the “distinct” genetic lineage. Avian Pathology 48: 245–254.

Toro H, van Santen VL, Hoerr FJ, Breedlove C 2009. Effects of chicken anemia virus and infectious bursal disease virus in commercial chickens. Avian Dis 53: 94–102.

Tsukamoto K, Kojima C, Komori Y, Tanimura N, Mase M, Yamaguchi S 1999. Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek’s disease virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2. Virology 257: 352–362.

Tsukamoto K, Tanimura N, Mase M, Imai K 1995. Comparison of virus replication efficiency in lymphoid tissues among three infectious bursal disease virus strains. Avian Dis;39(4):844-52.

Vakharia VN, He J, Ahamed B, Snyder DB 1994. Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. Virus Res 31: 265–273.

van den Berg TP, Gonze M, Morales D, Meulemans G 1996. Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain. Avian Pathol 25, 751–768

van den Berg TP, Gonze M, Meulemans G 1991. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterisation of a highly virulent strain. Avian Pathol 20: 133–143.

Varela AP, Dos Santos HF, Cibulski SP, Scheffer CM, Schmidt C, Sales Lima FE, Silva AD, Esteves PA, Franco AC, Roehe PM 2014. Chicken anemia virus and avian gyrovirus 2 as contaminants in poultry vaccines. Biologicals;42(6):346-50.

Varsani A, Kraberger S, Opriessnig T, Maggi F, Celer V, Okamoto H, Biagini P 2023. Anelloviridae taxonomy update 2023. Arch Virol;168(11):277.

Vera F, Craig MI, Olivera V, Rojas F, König G, Pereda A, Vagnozzi A 2015. Molecular characterization of infectious bursal disease virus (IBDV) isolated in Argentina indicates a regional lineage. Arch Virol 160: 1909–1921.

Villanueva RA, Guacucano M, Pizarro J, Sandino AM 2005. Inhibition of virion-associated IPNV RNA polymerase, VP1, by radiolabeled nucleotide analogs. Virus Res 112: 132–135.

Von Einem UI, Gorbalenya AE, Schirrmeier H, Behrens S-E, Letzel T, Mundt E 2004. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. J Gen Virol 85: 2221–2229.

Wang C, Hou B, Shao G, Wan C 2023. Development of a one-step real-time TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for the detection of the novel variant infectious bursal disease virus (nVarIBDV) circulating in China. Viruses. 15:1–13.

Wang W, Shi J, Zhang Y, Qiao Y, Zuo W, Wang Z, Nong T, Hu S, Chen Y, Kong R, He X, Wei P 2023. Genetic and pathogenic characterizations of a naturally occurring reassortant and homologous recombinant strain of the classical infectious bursal disease virus re-emerging in chickens in southern China. Front Microbiol 14: 1293072.

Wang W, He X, Zhang Y, Qiao Y, Shi J, Chen R, Chen J, Xiang Y, Wang Z, Chen G, Huang J, Huang T, Wei T, Mo M, Wei P 2022. Analysis of the global origin, evolution and transmission dynamics of the emerging novel variant IBDV (A2dB1b): the accumulation of critical aa-residue mutations and commercial trade contributes to the emergence and transmission of novel variants. Transbound Emerg Dis. 69: e2832–e2851.

Wang W, Huang Y, Zhang Y, Qiao Y, Deng Q, Chen R, Chen J, Huang T, Wei T, Mo M, He X, Wei P 2022. The emerging naturally reassortant strain of IBDV (genotype A2dB3) having segment A from Chinese novel variant strain and segment B from HLJ 0504-like very virulent strain showed enhanced pathogenicity to three-yellow chickens. Transbound Emerg Dis 69: e566–e579.

Wang YL, Fan LJ, Jiang N, Gao L, Li K, Gao YL, Liu CJ, Cui HY, Pan Q, Zhang YP, Wang XM, Qi XL 2021. An improved scheme for infectious bursal disease virus genotype classification based on both genome-segments A and B. J Integr Agric 1372–1381.

Wei L, Zhu S, Ruan G, Hou L, Wang J, Wang B, Liu J 2011. Infectious bursal disease virus (IBDV): epidemiological trends and disease control. Virus Res 150: 68–73.

Wei Y, Li J, Zheng J, Xu H, Li L, Yu L 2006. Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. Biochem Biophys Res Commun 350: 277–287.

Witter RL, Calnek BW, Buscaglia C, Gimeno IM, Schat KA 2005. Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology. Avian Pathol. 34(2):75-90

Worobey M, Watts TD, McKay RA, Suchard MA, Granade T, Teuwen DE, Koblin BA, Heneine W, Lemey P, Jaffe HW 2016. 1970s and 'Patient 0' HIV-1 genomes illuminate early HIV/AIDS history in North America. Nature. 539(7627):98-101.

Wu H, Shi L, Zhang Y, Peng X, Zheng T, Li Y, Hu B, Zheng X, Zhou J 2019. Ubiquitination is essential for avibirnavirus replication by supporting VP1 polymerase activity. J Virol 93: e01899-18.

Wu T, Wang Y, Li H, Fan L, Jiang N, Gao L, Li K, Gao Y, Liu C, Cui H, Pan Q, Zhang Y, Wang X, Qi X 2020. Naturally occurring homologous recombination between novel variant infectious bursal disease virus and intermediate vaccine strain. Vet Microbiol 245: 108700.

Wu T, Perrings C 2018. The live poultry trade and the spread of highly pathogenic avian influenza: regional differences between Europe, West Africa, and Southeast Asia. PLoS ONE 13: e0196470.

Xu A, Pei Y, Zhang K, Xue J, Ruan S, Zhang G 2020. Phylogenetic analyses and pathogenicity of a variant infectious bursal disease virus strain isolated in China. Virus Res 276: 197833.

Yamaguchi T, Setiyono A, Kobayashi M, Takigami S, Fukushi H, Hirai K 2000. Infectious bursal disease live vaccines: changes in the virus population during serial passage in chickens and chicken embryo fibroblast cells. Avian Dis;44(2):284-90.

Yamazaki K, Ohta H, Kawai T, Yamaguchi T, Obi T, Takase K 2017. Characterization of variant infectious bursal disease virus from a broiler farm in Japan using immunized sentinel chickens. Journal of Veterinary Medical Science; 79:175–183.

Yang Y, Yan W, Hall AB, Jiang X 2021. Characterizing Transcriptional Regulatory Sequences in Coronaviruses and Their Role in Recombination. Mol Biol Evol. 38(4):1241-1248.

Ye C, Wang Y, Zhang E, Han X, Yu Z, Liu H 2018. VP1 and VP3 are required and sufficient for translation initiation of uncapped infectious bursal disease virus genomic double-stranded RNA. J Virol 92: e01345-17.

Ye C, Jia L, Sun Y, Hu B, Wang L, Lu X, Zhou J 2014. Inhibition of antiviral innate immunity by birnavirus VP3 protein via blockage of viral double-stranded RNA binding to the host cytoplasmic RNA detector MDA5. J Virol 88: 11154–11165.

Zachar T, Popowich S, Goodhope B, Knezacek T, Ojkic D, Willson P, Ahmed KA, Gomis S 2016. A 5-year study of the incidence and economic impact of variant infectious bursal disease viruses on broiler production in Saskatchewan, Canada. Can J Vet Res 80: 255–261.

Zeng T, Xie Z, Xie L, Deng X, Xie Z, Luo S, Huang L, Huang J 2015. Simultaneous detection of eight immunosuppressive chicken viruses using a GeXP analyser-based multiplex PCR assay. Virol J 12: 226.

Zhang W, Wang X, Gao Y, Qi X 2022. The over-40 years-epidemic of infectious bursal disease virus in China. Viruses. 14:2253.

Zhao Y, Aarnink AJA, Cambra-Lopez M, Fabri T 2013. Viral shedding and emission of airborne infectious bursal disease virus from a broiler room. Br Poult Sci 54: 87–95.

Zhou H, Zhu S, Quan R, Wang J, Wei L, Yang B, Xu F, Wang J, Chen F, Liu J 2015. Identification and Genome Characterization of the First Sicinivirus Isolate from Chickens in Mainland China by Using Viral Metagenomics. PLoS One. 10(10): e0139668.

8. Anexos

1. Secuencias usadas para análisis de recombinación y análisis filogenéticos.

a) Secuencias nucleotídicas de la región hipervariable de VP2 (Capítulo 2).

N° de acceso	Nombre de cepa	País de origen
JF811920	A-BH83	Brasil
MF969107	150127/0.2	Argelia
MZ740264	GXB02	China
EF418034	GA-1	USA
D00867	Cu1	
X84034	P2	
AF194428	CEF94	
MZ687395	1/chicken/PRT/7/21	Portugal
MZ687396	1/chicken/PRT/75/21	Portugal
MZ687398	1/chicken/PRT/118/21	Portugal
MZ687400	1/chicken/PRT/168/21	Portugal
MZ687401	1/chicken/PRT/189/21	Portugal
AF133904	Variant E	USA
JF736011	AL-2	USA
MF142503	105-Pennsylvania	USA
MF142506	113-Texas	USA
MF142520	285-Mexico	México
MF142583	7-Ohio	USA
MH879110	SHG120	China
MH879129	SHG350	China
MT087551	IBDV-JS19-13203	China
MT087552	IBDV-JS19-13804	China
MT087547	IBDV-SD19-9901	China
MN393076	SHG19	China
JQ340023	Mexico11M79	México
JQ340018	Mexico11M66	México
MF142575	760	México
AF498627	C-278	México
KY930929	IBDV/Italy/1829/2011	Italia
Z97002	IBDVRF-5/94	Rusia
MF142577	772-KSA	Arabia Saudita
MF142571	751-KSA	Arabia Saudita
AF381000	01/96	Australia
AF069577	V877	Australia
AJ878908	002/73	Australia
AF381005	N1/99	Australia

AF381006	K-2	Australia
MN313622	1/chicken/ARG/P3/15	Argentina
MN313637	1/chicken/URY/3501/12	Uruguay
MN313638	1/chicken/URY/1403/14	Uruguay
KM659892	M42/07	Uruguay
KM659893	421101	Uruguay
KM659894	221201	Uruguay
AF548656	P3	Hungría
Z97013	IBDVRF-8/96	Rusia
AJ508762	80/GA	Polonia
JF682317	POR241-09	Portugal
L42284	KS	Israel
AF159212	N10	Nigeria
X92760	UK661	Reino Unido
AF247006	UPM97/61	Malasia
AF322444	TASIK	Indonesia
AF240686	D6948	
Y14956	89163	Francia
AF281238	T1	USA
AY368653	GLS	USA
X54858	E/DEL	USA
DQ355819	2512	USA
AY029166	Irwin Moulthrop	USA
EU162087	D78	USA
DQ202329	B87	China
AF362773	23/82	Reino Unido
U30818	OH	USA
MF142536	429	Rusia
KM659895	M04/09	Uruguay
KM659890	M06/10	Uruguay
KM659887	171101	Uruguay
MN313639	1/chicken/URY/1305/16	Uruguay
MK800152	PK33	Pakistán
DQ927040	mb	Israel
KY610528	154	Egipto
OP978037	134/20/Poland/2020	Polonia
OP978030	34/16/Poland/2016	Polonia
GQ451330	HLJ-0504	China
FJ695138	YS07	China
JN852985	ITA-01	Italia
JN852986	ITA-02	Italia
DQ916210	Mexico04M101	México
JQ340015	Mexico11M63	México
AM084688	S002	Argentina

	462204	Uruguay
	442202	Uruguay
	442201	Uruguay
	262303	Uruguay
	262302	Uruguay
	262301	Uruguay
	232304	Uruguay
	232303	Uruguay
	232302	Uruguay
	42301	Uruguay
	32301	Uruguay
	471902	Uruguay
OR206429	31901	Uruguay
OR206430	222201	Uruguay
OR206431	222202	Uruguay
OR206432	352001	Uruguay
OR206433	451901	Uruguay
OR206434	471901	Uruguay

b) Secuencias nucleotídicas codificantes del segmento A de IBDV (Capítulo 3).

N° de acceso	Nombre de cepa	País de origen
AB368970	KMRG-48	Tanzania
AF133904	variant E	USA
AF194428	CEF94	
AF240686	D6948	Países Bajos
AF247006	UPM97/61	Malasia
AF322444	TASIK	Indonesia
AF362773	23/82	Reino Unido
AF362776	BD 3/99	Bangladesh
AF499929	D78	
AF527039	UPM94/273	Malasia
AY029166	Irwin Moulthrop	USA
AY099456	T09	Nigeria
AY368653	GLS	USA
AY444873	Gx	China
AY462027	9109	USA
AY598356	GZ/96	China
AY918948	Lukert	USA
D00867	Cu1	Alemania
DQ403248	Gt	China
DQ906921	B87	China

DQ927040	mb	Israel
DQ927042	ks	Israel
EF418034	GA-1	USA
EF646853	J1C7	Japón
EU184685	Cro-Ig/02	Croacia
EU184689	Cro-Pa/98	Croacia
FJ695138	YS07	China
GQ166972	B-SD-RZ	China
GQ451330	HLJ-0504	China
HG974563	89163	Francia
JF811920	A-BH83	Brasil
JX134483	GX-NNZ-11	China
JX134485	GX-NN-L	China
JX682709	QL	China
JX682711	ZZ-11	China
KC603937	IC-IBDV-Br	Brasil
KF569801	HeB10XS02	China
KF569803	SD10LY01	China
KF569805	HuB-1	China
KJ198843	SK53	Tailandia
KJ198844	KK54	Tailandia
KP642112	IBDV/Turkey/PA/00924/14	USA
KP676467	IBD13HeB01	China
KT336459	dIBDV/UY/2014/2202	Uruguay
KU958716	UPM04/190	Malasia
KY610528	154	Egipto
KY610529	160019	Egipto
KY610530	160021	Egipto
MF969107	150127/0.2	Argelia
MF969113	150136/1.1	Argelia
MF996499	PK2	Pakistán
MG739298	li4129/2014	Finlandia
MH644846	DD1	Rusia
MK472711	S18	China
MK501731	IBDV-PSNgp-India	India
MK800149	PK12	Pakistán
MK800150	PK19	Pakistán
MK800151	PK28	Pakistán
MK800152	PK33	Pakistán
MK800153	PK47	Pakistán
MN313610	1/chicken/ARG/P33/15	Argentina
MN313611	M04/09	Uruguay
MN313612	421101	Uruguay
MN313613	221201	Uruguay
MN313614	1/chicken/URY/2701/12	Uruguay

MN313615	1/chicken/URY/1302/16	Uruguay
MN393076	SHG19	China
MN485880	SD-2013-1	China
MN485882	ZD-2018-1	China
MN604241	IBD17JL01	China
MN814843	GA/1479/2004	USA
MT179720	SHG352	China
MT179721	SHG358	China
MT505339	IBS536/2017	Malasia
MT505340	IBS624/2017	Malasia
MT505342	UPM1056/2018	Malasia
MT505343	UPM1432/2019	Malasia
MT629830	Bug/03/Poland/2003	Polonia
MT629831	117/14/Poland/2014	Polonia
MT629831	2117/14/Poland/2014	Polonia
MT629832	75/11/Poland/2011	Polonia
MW030633	LJ-5	China
MW245064	NN1172	China
MZ066613	QZ191002	China
MZ740264	GXB02	China
NC004178	UK661	
OP978030	34/16/Poland/2016	Polonia
OP978031	320/16/Poland/2016	Polonia
OP978037	134/20/Poland/2020	Polonia
OP978039	90/22/Poland/2022	Polonia
U30818	OH	USA
X03993	002-73	Australia
X84034	P2	Alemania
EU184687	Cro-Po/00	Croacia
	352001	Uruguay
	451901	Uruguay
	471901	Uruguay
	471902	Uruguay

c) Secuencias nucleotídicas codificantes del segmento B de IBDV (Capítulo 3).

N° de acceso	Nombre de cepa	País de origen
NC004179	UK661	
U30819	OH	USA
KP642111	IBDV/Turkey/PA/00924/14	USA
AB368971	KMRG-48	Tanzania
AF194429	CEF94	
AF240687	D6948	Países Bajos
AF322445	TASIK	Indonesia

AF362770	BD 3/99	Bangladesh
AF362774	23/82	Reino Unido
AF527038	UPM94/273	Malasia
AF527040	UPM97/61	Malasia
DQ927043	ks	Israel
GQ166971	B-SD-RZ	China
AY099457	T09	Nigeria
EU184686	Cro-Ig/02	Croacia
EU184688	Cro-Po/00	Croacia
FJ695139	YS07	China
GQ449693	HuB-1	China
HG974564	89163	Francia
KF569804	SD10LY01	China
KU958717	UPM04/190	Malasia
KY597859	154	Egipto
KY597860	160021	Egipto
KY597863	160019	Egipto
MF969114	150136/1.1	Argelia
MH644847	DD1	Rusia
MT505344	IBS536/2017	Malasia
MT505345	IBS624/2017	Malasia
MT505346	UPM766/2018	Malasia
MT505347	UPM1056/2018	Malasia
MT629835	75/11/Poland/2011	Polonia
DQ927041	mb	Israel
MN485881	SD-2013-1	China
AY598355	GZ-96	China
KJ198845	SK53	Tailandia
GQ451331	HLJ-0504	China
KF569802	HeB10XS02	China
JX134486	GX-NN-L	China
MK472712	S18	China
JX682712	ZZ-11	China
MW245065	NN1172	China
MT446362	LJ-5	China
M19336	002-73	Australia
JX682710	QL	China
AY705393	Gx	China
MK919703	PK12	Pakistán
MK919706	PK33	Pakistán
MF996500	PK2	Pakistán
MK919707	PK47	Pakistán
MK919705	PK28	Pakistán
MK919704	PK19	Pakistán
MZ066616	YL160304	China

MG739299	li4129/2014	Finlandia
OP978040	34/16/Poland/2016	Polonia
OP978041	320/16/Poland/2016	Polonia
OP978043	134/20/Poland/2020	Polonia
OP978044	90/22/Poland/2022	Polonia
MT629833	Bug/03/Poland/2003	Polonia
MT629834	117/14/Poland/2014	Polonia
MN313616	1/chicken/ARG/P33/15	Argentina
MN313617	M04/09	Uruguay
MN313618	421101	Uruguay
MN313619	221201	Uruguay
MN313620	1/chicken/URY/2701/12	Uruguay
MN313621	1/chicken/URY/1302/16	Uruguay
KT336458	dIBDV/UY/2014/2202	Uruguay
AY368654	GLS	USA
AY918949	Edgar	USA
MZ740265	GXB02	China
MN814844	GA/1479/2004	USA
AY918947	Lukert	USA
MT550880	19D38	Corea del Sur
MT550881	19D44	Corea del Sur
AY029165	Irwin Moulthrop	USA
KJ198846	KK54	Tailandia
JF811921	A-BH83	Brasil
AY459321	9109	USA
MF969108	150127/0.2	Argelia
AF133905	variant E	USA
EF646854	J1C7	Japón
X84035	P2	Alemania
DQ906922	B87	China
AF362772	Cu1	Alemania
KC603936	IC-IBDV-Br	Brasil
KP676468	IBD13HeB01	China
AF499930	D78	
DQ403249	Gt	China
EU162094	GA-1	USA
MN393077	SHG19	China
JX134484	GX-NNZ-11	China
MT179723	SHG358	China
MT179722	SHG352	China
EU184690	Cro-Pa/98	Croacia
MZ066615	QZ191002	China
MT505348	UPM1432/2019	Malasia
	451901	Uruguay
	471901	Uruguay

	471902	Uruguay
	352001	Uruguay

d) Secuencias nucleotídicas de genomas completos codificantes de CAV (Capítulo 3)

N° de acceso	Nombre de cepa	País de origen
MK423866	Vietnam/HN2/16	Vietnam
MN103402	GX1904A	China
MT799750	1621TW	Taiwán
MW239170	19AD011	Corea del Sur
MW579761	GX2020-D3	China
MW579762	GX2020-D6	China
MZ666088	CIAV TN 7-1	Tunez
OQ850268	JZ2101	China
OQ850275	JZ2108	China
OQ869210	AH2202	China
OR261068	JS2107211	China
PP354990	JS2007Chen	China
PP355000	JS2107Liu	China
PP355006	JS221021	China
AB027470	TR20	
	VAC Nobilis P4	
KY888910	1311CH07	Taiwán
MG846491	RS/BR/15/1R	Brasil
MK687563	CAV/Bashkortostan/262/2012	
MT671980	CAV	Brasil
MW091342	19AQ001	Corea del Sur
PP354995	JS2105A	China
DQ124935	AH6	China
KU641015	SD1511	China
JF507715	CIAV89-69	Corea del Sur
AF395114	BD-3	Bangladesh
AF285882	SMSC-1	Malasia
DQ124936	AH4	China
KJ872513	CAV-10	Argentina
KJ872514	CAV-18	Argentina
KY024579	RS/BR/15	Brasil
AF227982	CAU269/7	Australia
EF683159	3711/Chicken/Australia	Australia
U65414	704	Australia
D31965	82-2	Japón
DQ991394	01-4201	USA
	M14/03	Uruguay
	M06/10B	Uruguay

	421102	Uruguay
	361501	Uruguay
	351201	Uruguay
	361402	Uruguay
	141404	Uruguay
	471602	Uruguay
	M43	Uruguay
	M34	Uruguay
KP780292	CAV/Vietnam/VP10/13	Vietnam
KP780291	CAV/Vietnam/VP9/13	Vietnam
KX377124	NGP-1	India
KT276305	IR	Irán
KJ728827	18	Taiwán
KJ728828	19	Taiwán
AF313470	Del-Ros	
M55918	Cuxhaven-1	
	352001	Uruguay
	031901	Uruguay

e) Secuencias nucleotídicas completas del gen VP1 de CAV, GyVg1 y GyV4 (Capítulo 3).

N°de acceso	Especie viral	Nombre de cepa	País de origen	Año	Hospedero
AF227982	Gyrovirus-chickenanemia	CAU269/7	Australia		*Gallus gallus*
AJ888524	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/Abeokuta.NIE/19.04/118	Nigeria	2004	*Gallus gallus*
AJ888525	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/Abeokuta.NIE/19.04/117	Nigeria	2004	*Gallus gallus*
AJ888528	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/Lanlate.NIE/11.02/71	Nigeria	2002	*Gallus gallus*
AJ888529	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/Lanlate.NIE/11.02/12	Nigeria	2002	*Gallus gallus*
AM407820	Gyrovirus-chickenanemia	CH-CK/05-01/GD/683	China	2005	*Gallus gallus*
AM407825	Gyrovirus-chickenanemia	CH-CK/05-04/GD/3592	China	2005	*Gallus gallus*
AM407827	Gyrovirus-chickenanemia	CH-CK/05-05/GD/5258	China	2005	*Gallus gallus*
AM407843	Gyrovirus-chickenanemia	CH-CK/05-05/GD/4960	China	2005	*Gallus gallus*
AM407846	Gyrovirus-chickenanemia	CH-CK/05-01/GD/58	China	2005	*Gallus gallus*
AM407849	Gyrovirus-chickenanemia	CH-CK/05-01/HN/520	China	2005	*Gallus gallus*
AM407863	Gyrovirus-chickenanemia	CH-SCK/05-01/GD/656	China	2005	*Gallus gallus*
AM407864	Gyrovirus-chickenanemia	CH-CK/04-01/GD/98	China	2004	*Gallus gallus*
AM407868	Gyrovirus-chickenanemia	CH-CK/05-05/GD/4661	China	2005	*Gallus gallus*
AM407871	Gyrovirus-chickenanemia	CH-CK/05-05/GD/5652	China	2005	*Gallus gallus*
AM407875	Gyrovirus-chickenanemia	CH-CK/05-04/GD/3088	China	2005	*Gallus gallus*
EF683159	Gyrovirus-chickenanemia	3711/chicken/Australia	Australia		*Gallus gallus*
FJ883781	Gyrovirus-chickenanemia	INDTN06	India	2006	*Gallus gallus*
FJ883782	Gyrovirus-chickenanemia	INDAP07	India	2007	*Gallus gallus*
FJ896818	Gyrovirus-chickenanemia	INDKA06	India	2006	*Gallus gallus*

JF712621	Gyrovirus-chickenanemia	India	India	2009	*Gallus gallus*
JX964755	Gyrovirus-chickenanemia	GXC060821	China	2006	*Gallus gallus*
KF224927	Gyrovirus-chickenanemia	GD-C-12	China	2012	*Gallus gallus*
KF224930	Gyrovirus-chickenanemia	GD-F-12	China	2012	*Gallus gallus*
KF224931	Gyrovirus-chickenanemia	GD-G-12	China	2011	*Gallus gallus*
KF224932	Gyrovirus-chickenanemia	GD-H-12	China	2012	*Gallus gallus*
KF224933	Gyrovirus-chickenanemia	GD-I-12	China	2011	*Gallus gallus*
KF224934	Gyrovirus-chickenanemia	GD-J-12	China	2012	*Gallus gallus*
KF224935	Gyrovirus-chickenanemia	GD-K-12	China	2012	*Gallus gallus*
KF224936	Gyrovirus-chickenanemia	GD-L-12	China	2012	*Gallus gallus*
KF224937	Gyrovirus-chickenanemia	GD-M-12	China	2012	*Gallus gallus*
KF224938	Gyrovirus-chickenanemia	GD-N-12	China	2012	*Gallus gallus*
KJ004667	Gyrovirus-chickenanemia	G5/79	Japón	1979	*Gallus gallus*
KJ004668	Gyrovirus-chickenanemia	HY/80	Japón	1980	*Gallus gallus*
KJ004669	Gyrovirus-chickenanemia	NI/77	Japón	1977	*Gallus gallus*
KJ728814	Gyrovirus-chickenanemia	1	Taiwán	2012	*Gallus gallus*
KJ728815	Gyrovirus-chickenanemia	2	Taiwán	2012	*Gallus gallus*
KJ728818	Gyrovirus-chickenanemia	7	Taiwán	2012	*Gallus gallus*
KJ728819	Gyrovirus-chickenanemia	8	Taiwán	2012	*Gallus gallus*
KJ728820	Gyrovirus-chickenanemia	9	Taiwán	2012	*Gallus gallus*
KJ728821	Gyrovirus-chickenanemia	10	Taiwán	2012	*Gallus gallus*
KJ728822	Gyrovirus-chickenanemia	12	Taiwán	2012	*Gallus gallus*
KJ728823	Gyrovirus-chickenanemia	13	Taiwán	2012	*Gallus gallus*
KJ728825	Gyrovirus-chickenanemia	16	Taiwán	2012	*Gallus gallus*
KJ728826	Gyrovirus-chickenanemia	17	Taiwán	2012	*Gallus gallus*
KJ728827	Gyrovirus-chickenanemia	18	Taiwán	2012	*Gallus gallus*
KJ728828	Gyrovirus-chickenanemia	19	Taiwán	2012	*Gallus gallus*
KJ728829	Gyrovirus-chickenanemia	20	Taiwán	2012	*Gallus gallus*
KJ728830	Gyrovirus-chickenanemia	22	Taiwán	2012	*Gallus gallus*
KJ872513	Gyrovirus-chickenanemia	CAV-10	Argentina	2007	*Gallus gallus*
KJ872514	Gyrovirus-chickenanemia	CAV-18	Argentina	2007	*Gallus gallus*
KM226337	Gyrovirus-chickenanemia	A1/76	Japón	1976	*Gallus gallus*
KM226338	Gyrovirus-chickenanemia	AO/77	Japón	1977	*Gallus gallus*
KM458172	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/LOD5/13	Polonia	2013	*Gallus gallus*
KM458173	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/LUB5W1/13	Polonia	2013	*Gallus gallus*
KM458174	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/LUB5W8/13	Polonia	2013	*Gallus gallus*
KM458175	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/MPL2/13	Polonia	2013	*Gallus gallus*
KM458176	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/MPL3/13	Polonia	2013	*Gallus gallus*
KM458177	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/OPL1/13	Polonia	2013	*Gallus gallus*
KM458178	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/OPL3/13	Polonia	2013	*Gallus gallus*
KM458179	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/POD1/13	Polonia	2013	*Gallus gallus*
KM458181	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/SLA2/13	Polonia	2013	*Gallus gallus*
KM458182	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/SLA3/13	Polonia	2013	*Gallus gallus*
KM458183	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/SLA12/13	Polonia	2014	*Gallus gallus*
KM458184	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/ZPOM8/13	Polonia	2013	*Gallus gallus*

KM496301	Gyrovirus-chickenanemia	SC-DL1	China	2014	*Gallus gallus*
KM496303	Gyrovirus-chickenanemia	SC-HY	China	2014	*Gallus gallus*
KM496305	Gyrovirus-chickenanemia	SC-MS	China	2014	*Gallus gallus*
KM496306	Gyrovirus-chickenanemia	SC-MZ	China	2013	*Gallus gallus*
KM496309	Gyrovirus-chickenanemia	SC-NC2	China	2013	*Gallus gallus*
KM496310	Gyrovirus-chickenanemia	SC-PS	China	2013	*Gallus gallus*
KP090251	Gyrovirus-chickenanemia	NAM227	India	2010	*Gallus gallus*
KP090256	Gyrovirus-chickenanemia	CAVVP1NAMM01	India	2011	*Gallus gallus*
KP120755	Gyrovirus-chickenanemia	CAVNAMKS5	India	2010	*Gallus gallus*
KP120758	Gyrovirus-chickenanemia	CAVNAMKS1	India	2009	*Gallus gallus*
KP120759	Gyrovirus-chickenanemia	CAVNAMKS6	India	2010	*Gallus gallus*
KP120760	Gyrovirus-chickenanemia	CAVNAMKS7	India	2010	*Gallus gallus*
KP780287	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/Vietnam/BN1/13	Vietnam	2013	*Gallus gallus*
KP780290	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/Vietnam/VP8/13	Vietnam	2013	*Gallus gallus*
KU095829	Gyrovirus-chickenanemia	Tunisia-1328-09	Túnez	2009	*Gallus gallus*
KU641013	Gyrovirus-chickenanemia	LN1401	China	2014	*Gallus gallus*
KU645508	Gyrovirus-chickenanemia	SD1502	China	2015	*Gallus gallus*
KU645509	Gyrovirus-chickenanemia	JS1503	China	2015	*Gallus gallus*
KU645513	Gyrovirus-chickenanemia	BJ1406	China	2014	*Gallus gallus*
KU645514	Gyrovirus-chickenanemia	HB1404	China	2014	*Gallus gallus*
KU645516	Gyrovirus-chickenanemia	HB1517	China	2015	*Gallus gallus*
KU645518	Gyrovirus-chickenanemia	JS1501	China	2015	*Gallus gallus*
KU645521	Gyrovirus-chickenanemia	SD1514	China	2015	*Gallus gallus*
KU645523	Gyrovirus-chickenanemia	SD1505	China	2015	*Gallus gallus*
KX377124	Gyrovirus-chickenanemia	NGP-1	India	2012	*Gallus gallus*
KX377129	Gyrovirus-chickenanemia	NGP-10	India	2015	*Gallus gallus*
KX377130	Gyrovirus-chickenanemia	NGP-11	India	2015	*Gallus gallus*
KY024579	Gyrovirus-chickenanemia	RS/BR/15	Brasil	2015	*Gallus gallus*
MG720294	Gyrovirus-chickenanemia	CAV-A5-IS1-LDH	India	2017	*Gallus gallus*
MG827100	Gyrovirus-chickenanemia	CAV-SK4-2017	Egipto	2017	*Gallus gallus*
MG846491	Gyrovirus-chickenanemia	RS-BR-15-1R	Brasil	2015	*Gallus gallus*
MH001553	Gyrovirus-chickenanemia	CAV-EG-2	Egipto	2017	*Gallus gallus*
MH001558	Gyrovirus-chickenanemia	CAV-EG-12	Egipto	2017	*Gallus gallus*
MH001560	Gyrovirus-chickenanemia	CAV-EG-13	Egipto	2017	*Gallus gallus*
MH001562	Gyrovirus-chickenanemia	CAV-EG-23	Egipto	2017	*Gallus gallus*
MH001563	Gyrovirus-chickenanemia	CAV-EG-27	Egipto	2017	*Gallus gallus*
MH001565	Gyrovirus-chickenanemia	CAV-EG-14	Egipto	2017	*Gallus gallus*
MH001567	Gyrovirus-chickenanemia	CAV-EG-21	Egipto	2017	*Gallus gallus*
MH001568	Gyrovirus-chickenanemia	CAV-EG-15	Egipto	2017	*Gallus gallus*
MH536105	Gyrovirus-chickenanemia	G17/33/5	Vietnam	2017	*Gallus gallus*
MH801130	Gyrovirus-chickenanemia	AHAU-CAV2	China	2017	*Gallus gallus*
MK376315	Gyrovirus-chickenanemia	1623TW	Taiwán	2016	*Gallus gallus*
MK376316	Gyrovirus-chickenanemia	1636TW	Taiwán	2016	*Gallus gallus*
MK386570	Gyrovirus-chickenanemia	1705PT	Taiwán	2016	*Gallus gallus*
MK423866	Gyrovirus-chickenanemia	Vietnam/HN2/16	Vietnam	2018	*Gallus gallus*

MK423867	Gyrovirus-chickenanemia	Vietnam/BN2/16	Vietnam	2018	*Gallus gallus*
MK423868	Gyrovirus-chickenanemia	Vietnam/BN1/17	Vietnam	2018	*Gallus gallus*
MK423869	Gyrovirus-chickenanemia	Vietnam/HB1/17	Vietnam	2018	*Gallus gallus*
MK423870	Gyrovirus-chickenanemia	Vietnam/HP1/17	Vietnam	2018	*Gallus gallus*
MK423871	Gyrovirus-chickenanemia	Vietnam/HN1/17	Vietnam	2018	*Gallus gallus*
MK423872	Gyrovirus-chickenanemia	Vietnam/HN3/17	Vietnam	2018	*Gallus gallus*
MK423874	Gyrovirus-chickenanemia	Vietnam/VP1/18	Vietnam	2018	*Gallus gallus*
MK484615	Gyrovirus-chickenanemia	GX1804	China	2018	*Gallus gallus*
MK484616	Gyrovirus-chickenanemia	GX1810	China	2018	*Gallus gallus*
MK624991	Gyrovirus-chickenanemia	HS1/17	Japón	2017	*Gallus gallus*
MK687563	Gyrovirus-chickenanemia	CAV/Bashkortostan/262/2012		2012	*Gallus gallus*
MN175605	Gyrovirus-chickenanemia	BR/DF3	Brasil	2016	*Gallus gallus*
MT118004	Gyrovirus-chickenanemia	U051601	Uruguay	2016	*Gallus gallus*
MT118003	Gyrovirus-chickenanemia	U071601	Uruguay	2016	*Gallus gallus*
MT117999	Gyrovirus-chickenanemia	U141404	Uruguay	2014	*Gallus gallus*
MT118010	Gyrovirus-chickenanemia	U171401	Uruguay	2014	*Gallus gallus*
MT118006	Gyrovirus-chickenanemia	U171502	Uruguay	2015	*Gallus gallus*
MT118002	Gyrovirus-chickenanemia	U181601	Uruguay	2016	*Gallus gallus*
MT118008	Gyrovirus-chickenanemia	U201502	Uruguay	2015	*Gallus gallus*
MT118007	Gyrovirus-chickenanemia	U211501	Uruguay	2015	*Gallus gallus*
MT118013	Gyrovirus-chickenanemia	U221401	Uruguay	2014	*Gallus gallus*
MT118012	Gyrovirus-chickenanemia	U221402	Uruguay	2014	*Gallus gallus*
MT118014	Gyrovirus-chickenanemia	U351201	Uruguay	2012	*Gallus gallus*
MT118009	Gyrovirus-chickenanemia	U361401	Uruguay	2014	*Gallus gallus*
MT118023	Gyrovirus-chickenanemia	U361402	Uruguay	2014	*Gallus gallus*
MT118022	Gyrovirus-chickenanemia	U361501	Uruguay	2015	*Gallus gallus*
MT118016	Gyrovirus-chickenanemia	U421102	Uruguay	2011	*Gallus gallus*
MT118005	Gyrovirus-chickenanemia	U451502	Uruguay	2015	*Gallus gallus*
MT118001	Gyrovirus-chickenanemia	U471602	Uruguay	2016	*Gallus gallus*
MT118000	Gyrovirus-chickenanemia	U471604	Uruguay	2016	*Gallus gallus*
MT118018	Gyrovirus-chickenanemia	UM0509	Uruguay	2009	*Gallus gallus*
MT118017	Gyrovirus-chickenanemia	UM06/10B	Uruguay	2010	*Gallus gallus*
MT118011	Gyrovirus-chickenanemia	UM14/03	Uruguay	2014	*Gallus gallus*
	Gyrovirus-chickenanemia	031901	Uruguay	2019	*Gallus gallus*
	Gyrovirus-chickenanemia	352001	Uruguay	2020	*Gallus gallus*
FR823283	Gyrovirus-galga1	915 F 06 007 FD	Francia	2009	*Homo sapiens*
JQ690763	Gyrovirus-galga1		China		*Homo sapiens*
KJ452213	Gyrovirus-galga1	G17	Hungría	2011	*Mustela putorius*
KJ452214	Gyrovirus-galga1	G13	Hungría	2011	
KU168250	Gyrovirus-galga1	S53/It	Italia	2014	*Gallus gallus*
KX708506	Gyrovirus-galga1	HLJ1506-1	China	2015	*Gallus gallus*
KX708507	Gyrovirus-galga1	HLJ1510	Francia	2009	*Homo sapiens*
KX708508	Gyrovirus-galga1	NX1506-1	China	2015	*Gallus gallus*
KX708509	Gyrovirus-galga1	NX1506-2	China	2015	*Gallus gallus*
KX708510	Gyrovirus-galga1	HLJ1508	China	2015	*Gallus gallus*

KX708511	Gyrovirus-galga1	JL1508	China	2015	*Gallus gallus*
KX708512	Gyrovirus-galga1	BJ1509	China	2015	*Gallus gallus*
KX708513	Gyrovirus-galga1	NX1510	China	2015	*Gallus gallus*
KX708514	Gyrovirus-galga1	HE1511	China	2015	*Gallus gallus*
KX708515	Gyrovirus-galga1	LN1511	China	2015	*Gallus gallus*
KX708516	Gyrovirus-galga1	JL1511	China	2015	*Gallus gallus*
KX708517	Gyrovirus-galga1	GS1512	China	2015	*Gallus gallus*
KX708518	Gyrovirus-galga1	GZ1601	China	2016	*Gallus gallus*
KX708519	Gyrovirus-galga1	JX1602	China	2016	*Gallus gallus*
KX708520	Gyrovirus-galga1	HLJ1603-1	China	2016	*Gallus gallus*
KX708521	Gyrovirus-galga1	HLJ1603-2	China	2016	*Gallus gallus*
KY039279	Gyrovirus-galga1	RS/BR/2015	Brasil	2015	*Gallus gallus*
MG846492	Gyrovirus-galga1	RS/BR/15/2S	Brasil	2015	*Gallus gallus*
MK089244	Gyrovirus-galga1	17CC0315	China	2017	*Felis catus*
MK089245	Gyrovirus-galga1	16CC1103	China	2016	*Felis catus*
MK089246	Gyrovirus-galga1	17CC0810	China	2017	*Felis catus*
MK840982	Gyrovirus-galga1	HB2018S1	China	2018	
NC_015396	Gyrovirus-galga1		Brasil	2006	*Gallus gallus*
OQ116648	Gyrovirus-galga1	36-HLJ201909	China	2019	*Gallus gallus*
	Gyrovirus-galga1	352001	Uruguay	2020	*Gallus gallus*
JX310702	Gyrovirus-homsa3	D137	Hong-Kong	2011	*Homo sapiens*
KY024580	Gyrovirus-homsa3	RS/BR/15	Brasil	2015	*Gallus gallus*
KJ452215	Gyrovirus-homsa3	G14	Hungría	2011	*Mustela putorius*
MG846493	Gyrovirus-homsa3	RS/BR/15/1R	Brasil	2015	*Gallus gallus*
MT671983	Gyrovirus-homsa3	GyV4	Brasil	2018	*Gallus gallus*
NC_018401	Gyrovirus-homsa3	D137	Hong-Kong	2011	*Homo sapiens*
	Gyrovirus-homsa3	352001	Uruguay	2020	*Gallus gallus*

f) Secuencias nucleotídicas codificantes del segmento A de IBDV (Capítulo 4).

N° de acceso	Nombre de cepa	País de origen
MK501731	IBDV-PSNgp-India	India
AY918948	Lukert	USA
MN604241	IBD17JL01	China
KY610529	160019	Egipto
NC004178	UK661	
X03993	002-73	Australia
MK800152	PK33	Pakistán
MK800149	PK12	Pakistán
OP978031	320/16/Poland/2016	Polonia
OP978037	134/20/Poland/2020	Polonia
OP978039	90/22/Poland/2022	Polonia
OP978030	34/16/Poland/2016	Polonia
MF969107	150127/0.2	Argelia
MN313612	421101	Uruguay

KT336459	dIBDV/UY/2014/2202	Uruguay
MN313615	1/chicken/URY/1302/16	Uruguay
MN814843	GA/1479/2004	USA
JX134483	GX-NNZ-11	China
AY462027	9109	USA
AF362773	23/82	Reino Unido
KP642112	IBDV/Turkey/PA/00924/14	USA
AY368653	GLS	USA
AF133904	variant E	USA
MZ740264	GXB02	China
U30818	OH	USA
MT629830	Bug/03/Poland/2003	Polonia
MT629831	117/14/Poland/2014	Polonia
MZ066613	QZ191002	China
MN393076	SHG19	China
MT179720	SHG352	China
MT179721	SHG358	China
MT505343	UPM1432/2019	Malasia
MN485882	ZD-2018-1	China
DQ927040	mb	Israel
MT629832	75/11/Poland/2011	Polania
MH644846	DD1	Rusia
MT505339	IBS536/2017	Malasia
MT505340	IBS624/2017	Malasia
MT505341	UPM766/2018	Malasia
MT505342	UPM1056/2018	Malasia
MW245064	NN1172	China
MW030633	LJ-5	China
MK800150	PK19	Pakistán
MK800151	PK28	Pakistán
MK800153	PK47	Pakistán
MN313610	1/chicken/ARG/P33/15	Argentina
MN313611	M04/09	Uruguay
MN313613	221201	Uruguay
MN313614	1/chicken/URY/2701/12	Uruguay
MN485880	SD-2013-1	China
MK472711	S18	China
KY610528	154	Egipto
KY610530	160021	Egipto
MF996499	PK2	Pakistán
MG739298	li4129/2014	Finlandia
MF969113	150136/1.1	Argelia
KU958716	UPM04/190	Malasia
AB368970	KMRG-48	Tanzania
KP676467	IBD13HeB01	China

HG974563	89163	Francia
KF569801	HeB10XS02	China
KF569803	SD10LY01	China
KF569805	HuB-1	China
KJ198843	SK53	Tailandia
KJ198844	KK54	Tailandia
KC603937	IC-IBDV-Br	Brasil
JX682709	QL	China
JX682711	ZZ-11	China
JX134485	GX-NN-L	China
JF811920	A-BH83	Brasil
GQ451330	HLJ-0504	China
FJ695138	YS07	China
GQ166972	B-SD-RZ	China
MT066169	SH19	China
EU184685	Cro-Ig/02	Croacia
EU184687	Cro-Po/00	Croacia
EU184689	Cro-Pa/98	Croacia
EF418034	GA-1	USA
DQ927042	ks	Israel
AY444873	Gx	China
EF646853	J1C7	Japón
DQ403248	Gt	China
DQ906921	B87	China
AY598356	GZ/96	China
AF499929	D78	
AY099456	T09	Nigeria
AY029166	Irwin Moulthrop	USA
AF527039	UPM94/273	Malasia
X84034	P2	Alemania
D00867	Cu1	Alemania
AF322444	TASIK	Indonesia
AF247006	UPM97/61	Malasia
AF362776	BD 3/99	Bangladesh
AF240686	D6948	Países Bajos
AF194428	CEF94	
	397-11	Argentina
	397-12	Argentina
	1210	Argentina
	2566B	USA
	2567C	USA
	2567D	USA
	31901	Uruguay
	222201	Uruguay
	222202	Uruguay

	352001	Uruguay
	451901	Uruguay
	471901	Uruguay
	A333D	Argentina
	A350A	Argentina

g) Secuencias nucleotídicas codificantes del segmento B de IBDV (Capítulo 4).

N° de acceso	Nombre de cepa	País de origen
AB368971	KMRG-48	Tanzania
AF133905	variant E	USA
AF194429	CEF94	
AF240687	D6948	Países Bajos
AF322445	TASIK	Indonesia
AF362770	BD 3/99	Bangladesh
AF362772	Cu1	Alemania
AF362774	23/82	Reino Unido
AF499930	D78	
AF527038	UPM94/273	Malasia
AF527040	UPM97/61	Malasia
AY029165	Irwin Moulthrop	USA
AY099457	T09	Nigeria
AY368654	GLS	USA
AY459321	9109	USA
AY598355	GZ-96	China
AY918947	Lukert	USA
AY705393	Gx	China
DQ403249	Gt	China
DQ906922	B87	China
DQ927041	mb	Israel
DQ927043	ks	Israel
EF646854	J1C7	Japón
EU162094	GA-1	USA
EU184686	Cro-Ig/02	Croacia
EU184688	Cro-Po/00	Croacia
EU184690	Cro-Pa/98	Croacia
FJ695139	YS07	China
GQ166971	B-SD-RZ	China
GQ449693	HuB-1	China
GQ451331	HLJ-0504	China
HG974564	89163	Francia
JF811921	A-BH83	Brasil
JX134484	GX-NNZ-11	China
JX134486	GX-NN-L	China

JX682710	QL	China
JX682712	ZZ-11	China
KC603936	IC-IBDV-Br	Brasil
KF569802	HeB10XS02	China
KF569804	SD10LY01	China
KJ198845	SK53	Tailandia
KJ198846	KK54	Tailandia
KP642111	IBDV/Turkey/PA/00924/14	USA
KP676468	IBD13HeB01	China
KT336458	dIBDV/UY/2014/2202	Uruguay
KU958717	UPM04/190	Malasia
KY597859	154	Egipto
KY597860	160021	Egipto
KY597863	160019	Egipto
M19336	002-73	Australia
MF969108	150127/0.2	Argelia
MF969114	150136/1.1	Argelia
MF996500	PK2	Pakistán
MG739299	li4129/2014	Finlandia
MH644847	DD1	Rusia
MK472712	S18	China
MK501732	IBDV-PSNgp-India	India
MK919703PK12	Pakistan	
MK919704	PK19	Pakistán
MK919705	PK28	Pakistán
MK919706	PK33	Pakistán
MK919707	PK47	Pakistán
MN313616	1/chicken/ARG/P33/15	Argentina
MN313617	M04/09	Uruguay
MN313618	421101	Uruguay
MN313619	221201	Uruguay
MN313620	1/chicken/URY/2701/12	Uruguay
MN313621	1/chicken/URY/1302/16	Uruguay
MN393077	SHG19	China
MN485881	SD-2013-1	China
MN485883	ZD-2018-1	China
MN604242	IBD17JL01	China
MN814844	GA/1479/2004	USA
MT066170	SH19	China
MT179722	SHG352	China
MT179723	SHG358	China
MT446362	LJ-5	China
MT505344	IBS536/2017	Malasia
MT505345	IBS624/2017	Malasia
MT505346	UPM766/2018	Malasia

MT505347	UPM1056/2018	Malasia
MT505348	UPM1432/2019	Malasia
MT550880	19D38	Corea del Sur
MT550881	19D44	Corea del Sur
MT629833	Bug/03/Poland/2003	Polonia
MT629834	117/14/Poland/2014	Polonia
MT629835	75/11/Poland/2011	Polonia
MW245065	NN1172	China
MZ066615	QZ191002	China
MZ066616	YL160304	China
MZ740265	GXB02	China
NC	4179	UK661
OP978040	34/16/Poland/2016	Polonia
OP978041	320/16/Poland/2016	Polonia
OP978043	134/20/Poland/2020	Polonia
OP978044	90/22/Poland/2022	Polonia
U30819	OH	USA
X84035	P2	Alemania
	031901	Uruguay
	1210	Argentina
	222201	Uruguay
	222202	Uruguay
	2566B	USA
	2567C	USA
	2567D	USA
	352001	Uruguay
	397-11	Argentina
	397-12	Argentina
	451901	Uruguay
	471901	Uruguay
	A333D	Argentina
	A350A	Argentina

h) Secuencias nucleotídicas codificantes del segmento A de IBDV utilizadas para la caracterización genómica de las cepas de campo uruguayas y argentinas (Capítulo 4).

N° de acceso	Nombre de cepa	País de origen
AF362773	23/82	Reino Unido
KP642112	IBDV/Turkey/PA/00924/14	USA
U30818	OH	USA
X03993.1	002-73	Australia
MN313613	221201	Uruguay
MN313610	1/chicken/ARG/P33/15	Argentina

MN313612	421101	Uruguay
MN313615	1/chicken/URY/1302/16	Uruguay
KT336459	dIBDV/UY/2014/2202	Uruguay
EF418035	H-30	USA
KY930929	IBDV/Italy/1829/2011	Italia
AY029166	Irwin Moulthrop	USA
JF811920	A-BH83	Brasil
MZ740264	GXB02	China
KJ198844	KK54	Tailandia
MF969107	150127/0.2	Argelia
MN814843	GA/1479/2004	USA
D00867	Cu1	Alemania
EU184689	Cro-Pa/98	Croacia
EF418034	GA-1	USA
DQ403248	Gt	China
DQ906921	B87	China
X84034	P2	Alemania
KC603937	IC-IBDV-Br	Brasil
AF194428	CEF94	Italia
EF646853	J1C7	Japón
AY368653	GLS	USA
AY462027	9109	USA
AF133904	variant E	USA
MZ066614	YL160304	China
JX134483	GX-NNZ-11	China
MW767374	LN-2020-1	China
MN485882	ZD-2018-1	China
MT179720	SHG352	China
MW767375	LN-2020-2	China
MZ593902	FJ2021	China
MZ066613	QZ191002	China
MW767998	HB-2020-1	China
MT505343	UPM1432/2019	Malasia
MW700332	IBDV-JS19-14701	China
MT179721	SHG358	China
MN393076	SHG19	China
MF996499	PK2	Pakistán
MK800151	PK28	Pakistán
MT505340	IBS624/2017	Malasia
MT505342	UPM1056/2018	Malasia
AY099456	T09	Nigeria
OP311684	VRD-18-71 19VIR8426-6/2018	Nigeria
OP311682	VRD-19-048 19VIR8426 10/2019	Nigeria
OP311683	VRD-17-460 19VIR8426-5/2017	Nigeria
OP311685	VRD-18-119 19VIR8426-8/2018	Nigeria

AF527039	UPM94/273	Malasia
MT629832	75/11/Poland/2011	Polonia
KU958716	UPM04/190	Malasia
AB368970	KMRG-48	Tanzania
EU184685	Cro-Ig/02	Croacia
MF969113	150136/1.1	Argelia
KY610528	154	Egipto
KY610530	160021	Egipto
OP978031	320/16/Poland/2016	Polonia
OP978037	134/20/Poland/2020	Polonia
OP978039	90/22/Poland/2022	Polonia
OP978030	34/16/Poland/2016	Polonia
MT629830	Bug/03/Poland/2003	Polonia
MG739298	li4129/2014	Finlandia
MT629831	117/14/Poland/2014	Polonia
MH644846	DD1	Rusia
AF322444	TASIK	Indonesia
AF240686	D6948	Países Bajos
HG974563	89163	Francia
AY444873	Gx	China
AY598356	GZ/96	China
DQ927040	mb	Israel
DQ927042	ks	Israel
EU184687	Cro-Po/00	Croacia
KF569805	HuB-1	China
AF362776	BD 3/99	Bangladesh
GQ166972	B-SD-RZ	China
KF569803	SD10LY01	China
MN485880	SD-2013-1	China
MK472711	S18	China
MW030633	LJ-5	China
JX682709	QL	China
JX682711	ZZ-11	China
FJ695138	YS07	China
MW245064	NN1172	China
JX134485	GX-NN-L	China
KJ198843	SK53	Tailandia
MT505341	UPM766/2018	Malasia
KP676467	IBD13HeB01	China
GQ451330	HLJ-0504	China
KF569801	HeB10XS02	China
	471902	Uruguay
	462204	Uruguay
	442202	Uruguay

	442201	Uruguay
	262303	Uruguay
	262302	Uruguay
	262301	Uruguay
	232304	Uruguay
	232303	Uruguay
	232302	Uruguay
	42301	Uruguay
	32301	Uruguay
	A397-1	Argentina
	A397-9	Argentina
	A397-2	Argentina
	A327J	Argentina
	A397-7	Argentina
	A363E	Argentina
	A335I	Argentina
	A329B	Argentina
	A397-18	Argentina
	A397-5	Argentina
	A397-6	Argentina
	A397-22	Argentina
	A397-23	Argentina
	A397-27	Argentina
	A397-32	Argentina
	A397-21	Argentina
	A397-29	Argentina
	A397-30	Argentina

i) Secuencias nucleotídicas codificantes del segmento B de IBDV utilizadas para la caracterización genómica de las cepas de campo uruguayas y argentinas (Capítulo 4).

N° de acceso	Nombre de cepa	País de origen
MN393077	SHG19	China
MT179711	IBD16HeN01	China
MW767378	LN-2020-1	China
MW767377	HB-2020-1	China
JX134484	GX-NNZ-11	China
MT505348	UPM1432/2019	Malasia
MZ066615	QZ191002	China
MN485883	ZD-2018-1	China
MT179722	SHG352	China
MZ593903	FJ2021	China
MW767379	LN-2020-2	China

MT179723	SHG358	China
MT550880	19D38	Corea del Sur
MT550881	19D44	Corea del Sur
AF133905	variant E	USA
AY368654	GLS	USA
EF646854	J1C7	Japón
AF194429	CEF94	Italia
AF362772	Cu1	Alemania
KP676468	IBD13HeB01	China
EU162090	D78	USA
EU162093	CS-2-35	USA
KC603936	IC-IBDV-Br	Brasil
EU184690	Cro-Pa/98	Croacia
DQ403249	Gt	China
EU162094	GA-1	USA
DQ906922	B87	China
X84035	P2	Alemania
AY029165	Irwin Moulthrop	USA
JF811921	A-BH83	Brasil
KJ198846	KK54	Tailandia
AY459321	9109	USA
MN814844	GA/1479/2004	USA
MF969108	150127/0.2	Argelia
MZ740265	GXB02	China
ON100666	80GA	
MN313616	1/chicken/ARG/P33/15	Argentina
MN313619	221201	Uruguay
MN313618	421101	Uruguay
MN313621	1/chicken/URY/1302/16	Uruguay
KT336458	dIBDV/UY/2014/2202	Uruguay
AF362774	23/82	Reino Unido
KP642111	IBDV/Turkey/PA/00924/14	USA
U30819	OH	USA
MF996500	PK2	Pakistán
MK919705	PK28	Pakistán
JX682712	ZZ-11	China
KJ198845	SK53	Tailandia
MF969108	150127/0.2	Argelia
KF569802	HeB10XS02	China
MZ066616	YL160304	China
MW245065	NN1172	China
JX134486	GX-NN-L	China
JX682710	QL	China
MN485881	SD-2013-1	China
AY598355	GZ-96	China

AY705393	Gx	China
MK472712	S18	China
MT446362	LJ-5	China
M19336	002-73	Australia
OP978041	320/16/Poland/2016	Polonia
OP978043	134/20/Poland/2020	Polonia
OP978044	90/22/Poland/2022	Polonia
MT629833	Bug/03/Poland/2003	Polania
OP978040	34/16/Poland/2016	Polonia
MG739299	li4129/2014	Finlandia
MT629834	117/14/Poland/2014	Polonia
MT505345	IBS624/2017	Malasia
MT505346	UPM766/2018	Malasia
KY597860	160021	Egipto
KY597863	160019	Egipto
GQ166971	B-SD-RZ	China
KF569804	SD10LY01	China
MT629835	75/11/Poland/2011	Polonia
GQ449693	HuB-1	China
DQ927043	ks	Israel
DQ927041	mb	Israel
MH644847	DD1	Rusia
AF240687	D6948	Países Bajos
HG974564	89163	Francia
AF322445	TASIK	Indonesia
EU184686	Cro-Ig/02	Croacia
KY597859	154	Egipto
EU184688	Cro-Po/00	Croacia
AF527038	UPM94/273	Malasia
AB368971	KMRG-48	Tanzania
FJ695139	YS07	China
AF362770	BD 3/99	Bangladesh
MF969114	150136/1.1	Argelia
KU958717	UPM04/190	Malasia
AY099457	T09	Nigeria
MT505347	UPM1056/2018	Malasia
OP311689	VRD-18-119 19VIR8426-8/2018	Nigeria
OP311687	VRD-17-460 19VIR8426-5/2017	Nigeria
OP311688	VRD-18-71 19VIR8426-6/2018	Nigeria
OP311686	VRD-19-048 19VIR8426-10/2019	Nigeria
	471902	Uruguay
	462204	Uruguay
	442202	Uruguay
	442201	Uruguay
	262303	Uruguay

	262302	Uruguay
	262301	Uruguay
	232304	Uruguay
	232303	Uruguay
	232302	Uruguay
	42301	Uruguay
	32301	Uruguay
	A327J	Argentina
	A363E	Argentina
	A329B	Argentina
	A335I	Argentina
	A397-1	Argentina
	A397-9	Argentina
	A397-22	Argentina
	A397-23	Argentina
	A397-21	Argentina
	A397-30	Argentina
	A397-5	Argentina
	A397-6	Argentina
	A397-29	Argentina
	A397-32	Argentina
	A397-27	Argentina
	A397-18	Argentina
	A397-2	Argentina
	A397-7	Argentina

2. Secuencias de cebadores

a) Secuencia de cebadores diseñados para amplificar el genoma completo de IBDV. Se muestran únicamente las secuencias específicas de IBDV (los adaptadores de Illumina se representan en la Figura 22A. Se indica en qué *pool* se incorpora cada cebador.

Segmento A		
Cebador	**Secuencia nucleotídica (5´-3´)**	***Pool***
IBDV_SEGA_1_Fw	GGATACGATCGGTCTGACC	1
IBDV_SEGA_1_Rv	GTGTCCCCCACAGTCAAAT	1
IBDV_SEGA_1.2_Rv	CTGACCTGAGAGTGTGCT	1
IBDV_SEGA_2_Fw	GACAAACGATCGYAGCGATG	2
IBDV_SEGA_2_Rv	CATTGYTCTGCAGTGTGTAG	2
IBDV_SEGA_3_Fw	CACAGGGTCAGGRCTAATTG	1
IBDV_SEGA_3_Rv	GCAGACATCAACCCATTGTAG	1
IBDV_SEGA_4_Fw	AACGCCGTGACCTTCCAAG	2
IBDV_SEGA_4_Rv	ATGGTGTARACTCTGGGCCTG	2
IBDV_SEGA_5_Fw	ACCCCATTCCHGCTATAGG	1

IBDV_SEGA_5_Rv	CCGYAGTCCCATCAAAGC	1
IBDV_SEGA_5.2_Fw	ACCCCATACCTGCCGTAG	1
IBDV_SEGA_6_Fw	GTGTTYCAAACAAGCGTCC	2
IBDV_SEGA_6_Rv	CTTGCYGACCATGACATCTG	2
IBDV_SEGA_6.2_Fw	GATGCYATCACAAGCCTCA	2
IBDV_SEGA_6.2_Rv	CTTGCCGACCATGACATTTG	2
IBDV_SEGA_6.3_Fw	GTGTTCAAAACCAGCATCC	2
IBDV_SEGA_6.3_Rv	TGCCGACCACGACATCTG	2
IBDV_SEGA_7_Fw	TCACATCCATYAAACTGGAGATAG	1
IBDV_SEGA_7_Rv	TAGTTCATDGCTCCTGGGTC	1
IBDV_SEGA_8_Fw	GAGYAACTTCGAGCTGATCC	2
IBDV_SEGA_8_Rv	GGCACAGCTATCCTCCTTAD	2
IBDV_SEGA_8.2_Fw	TGGCAACAGGATCYGTCG	2
IBDV_SEGA_8.2_Rv	TATCCTCCTTADGGCCCG	2
IBDV_SEGA_8.3_Rv	GGCACAGCTATCTTCCTTATG	2
IBDV_SEGA_9_Fw	TCAACTCTCCCCTGAAGATTG	1
IBDV_SEGA_9_Rv	GATTCTGGGGCACCTGRA	1
IBDV_SEGA_9.2_Fw	TCAATTCTCCCCTGAAGATTG	1
IBDV_SEGA_10_Fw	ATAAGGCAGCTDACTCTCGC	2
IBDV_SEGA_10_Rv	GGAGGTTGGAGRTCTTCTCG	2
IBDV_SEGA_11_Fw	CCATGACACCCAAAGCAYTG	1
IBDV_SEGA_11_Rv	CCCACAATAGGAGGTATGGGR	1
IBDV_SEGA_12_Fw	GGAGACTGGGAGAGAYTACAC	2
IBDV_SEGA_12_Rv	GCCAACTTGAGGCCAAGTC	2
IBDV_SEGA_13_Fw	TAGAAGCACCAAGCTCGC	1
IBDV_SEGA_13_Rv	GCAGATTGGAAYAGTGGGTCC	1
IBDV_SEGA_14_Fw	GCHTCAGAGTTCAAAGAGACC	2
IBDV_SEGA_14_Rv	CCTGCTGTCCCGTAYTTG	2
IBDV_SEGA_15_Fw	CAAACGCDCCACAAGCAG	1
IBDV_SEGA_15_Rv	CTTCTCTGCATGCACRTAGTC	1
IBDV_SEGA_15.2_Fw	CAAATGCACCACAAGCGGGC	1
IBDV_SEGA_16_Fw	CTRAAGTACTGGCAGAACACAC	2
IBDV_SEGA_16_Rv	TCGCAGTCARGAGCAGATC	2
IBDV_SEGA_17_Fw	GCCCHAACCAAGAACAGATG	1
IBDV_SEGA_17_Rv	GAACGGATCCAATTTGGGAT	1
IBDV_SEGA_17.2_Fw	CCCCAACCAAGAGCAGATG	1
IBDV_SEGA_17.2_Rv	GGGGACCCGCGAACGGAT	1

Segmento B

Cebador	**Secuencia nucleotídica (5´-3´)**	***Pool***
IBDV_SEGB_1_Fw	GGATACGATGGGTCTGACC	1
IBDV_SEGB_1_Rv	TCTCTGAGGAACTTDGCCAG	1
IBDV_SEGB_2_Fw	TTCAAYAGTCCACAGGCG	2
IBDV_SEGB_2_Rv	CCAATGGGGAGAGATAGRGT	2
IBDV_SEGB_3_Fw	TCCCAGACYTAGCATGGATG	1
IBDV_SEGB_3_Rv	YCCCATGTAGGTCCCACT	1

IBDV_SEGB_4_Fw	RAGTGGGACCTACATGGG	2
IBDV_SEGB_4_Rv	GTCCACTTGATGACTTGAGG	2
IBDV_SEGB_4.2_Fw	TGTTTCTCCAGGTTCCNGA	2
IBDV_SEGB_4.2_Rv	GACGGCACYCTTGTGAGT	2
IBDV_SEGB_5_Fw	TGGGTACACYTTTGAGAGC	1
IBDV_SEGB_5_Rv	CTGGTTTGAGATRGCTATCATC	1
IBDV_SEGB_6_Fw	TATGTWGGTCGCACCAAAGG	2
IBDV_SEGB_6_Rv	ATCATDGAGATCATGAGGTGTG	2
IBDV_SEGB_7_Fw	CGKAACATATGGTCAGCTCC	1
IBDV_SEGB_7_Rv	CTTCTCTAGGTCAATTGAGTACC	1
IBDV_SEGB_8_Fw	GACAACATATACATYGTCCACTC	2
IBDV_SEGB_8_Rv	TTGTTGATGAACGTDGCTGC	2
IBDV_SEGB_8.2_Fw	CTGACAACATATACATTGTTCACTC	2
IBDV_SEGB_8.2_Rv	TGTTGATGAAGGTGGCTGC	2
IBDV_SEGB_9_Fw	CGTGYCTGATAATGAACCTGC	1
IBDV_SEGB_9_Rv	GCTCWACAGTTGGGCTGG	1
IBDV_SEGB_9.2_Fw	CATCATGTCTGATTATGAACCTTC	1
IBDV_SEGB_10_Rv	GTGGRTAGTTCCAACCACC	2
IBDV_SEGB_10.2_Fw	TGCACAACCAGGGTACCT	2
IBDV_SEGB_10.2_Rv	TRTTCTTGCAGGCTTTGTTC	2
IBDV_SEGB_10.3_Fw	GCAAGCTGARACAGCTTGT	2
IBDV_SEGB_11_Fw	GATCGAGCARGCATACAAGG	1
IBDV_SEGB_11_Rv	GTGTTGACTGGTCTGTTGAC	1
IBDV_SEGB_12_Fw	GCTGACCGTAACATCYGAG	2
IBDV_SEGB_12_Rv	CCAGTCTGCATCRGGGTC	2
IBDV_SEGB_12.2_Fw	CTGACAGTAACACCGGAGAG	2
IBDV_SEGB_13_Fw	GCCGAGAARCTCCACAAG	1
IBDV_SEGB_13_Rv	GAGAAGAGCDGCCTGGAC	1
IBDV_SEGB_14_Fw	YAAGAACCCACAGACCGC	2
IBDV_SEGB_14_Rv	AGGCGAAGGCCGGGGATA	2
IBDV_SEGB_14.2_Rv	GATACGGGGTCTGGGRTTA	2

b) Secuencia de cebadores diseñados para amplificar el genoma completo de CAV. Se muestran únicamente las secuencias específicas de CAV. Se indica en qué *pool* se incorpora cada cebador.

Cebador	**Secuencia nucleotídica (5´-3´)**	***Pool***
CAV_1 FW	GCACTCAATAAACGYAGCA	1
CAV_1 RV	CTGATTGGCTGTGACGTAC	1
CAV_2 FW	AGGCGTTCCCGTACAGG	2
CAV_2 RV	TCTTGGAGAGCGTTCATTTGA	2
CAV_3 FW	GGCAGTGAATCGGCGCTTA	1
CAV_3 RV	CAGTGCTTTCTGAATTGTCCGC	1
CAV_4 FW	CTCTATCGCTGTGTGGCTGC	2

CAV_4 RV	GGCGTAAAATCDGCCTCTCG	2
CAV_5 FW	AAAGCTTGATTACCACTACTCCCA	1
CAV_5 RV	CCTTGRAAGCGGATAGTCAT	1
CAV_6 FW	GACGAGCTTTTAGGAAGGCCTT	2
CAV_6 RV	AATCAACTCACCGGCGATGG	2
CAV_7 FW	GAGTTCCTSCTAGCGTCAATGA	1
CAV_7 RV	AGRTGCCAGCCCCCAAA	1
CAV_8 FW	CTTGCCGGTTYTTTAATCACCC	2
CAV_8 RV	TGTTGCTCGTCGGGTCTCAT	2
CAV_9 FW	ACAGCAGCGATCACCAGAAC	1
CAV_9 RV	CGTCTAGAAACTGAACGTTG	1
CAV_10 FW	CTCGGTGCACAATGGTCTTT	2
CAV_10 RV	GCCCATGMATCGCTCTTC	2
CAV_11 FW	GGCACAGCTACATACGCG	-
CAV_11 RV	TGGAATAGTAACCACTCGGAATGC	-

c) Secuencia de cebadores utilizados para amplificar la secuencia codificante completa de los genes Meq, gL, vIL8 y pp38 de MDV. Se muestran únicamente las secuencias específicas de MDV. Se indica en qué *pool* se incorpora cada cebador.

Cebador	**Secuencia nucleotídica (5´-3´)**	**Gen**	***Pool***
F19575	GGCCTTTCACACATCCCAACAG	gL	1
R19845	GCCTTAATAAAAATGCCCGTGGGA	gL	1
F19756	GGGCTCGACTGCCTTCCGAAC	gL	2
R20036	GTCTAAGAGGTCCATTGGGTCC	gL	2
F19968	GTCTGTGAAGGTGGGACTTCTTAC	gL	1
R20204	GGGCATTGGCTCGTCGGCT	gL	1
F139304	GGAGACCCAATAACAGGGAAATCG	vIL8	1
R139567	GACATGCCAGAGACGAAACCC	vIL8	1
F139467	GTGGTAAGTAGGGGAAGAGAACTC	vIL8	2
R139741	GCACGTCAACAGCGATAATAGGC	vIL8	2
F139641	GTAGGCATATCACTGGAGAGTCTC	vIL8	1
R139917	GAGGGTCCACACATACCTTCC	vIL8	1
F139866	GTCCCTTTTGTAGCTTTGCTCTC	vIL8	2
R140117	GGTGCCTTCTTTTAATTACAGGAGG	vIL8	2
F127532	GAGTCAGAGAATGCAACAATGC	pp38	1
R127241	GTCGCTTAATCTCCGCCTCCAAC	pp38	1
F127701	GCAGTGCGAAGGAGGAACATA	pp38	2
R127478	CAGAACAGATCAATGTAACCAGC	pp38	2
F127915	CTATTCCAATAAAGGGTGATGGGA	pp38	1
R127646	CAACAGCTTGCTCTGCTTCG	pp38	1
F128135	CTGACGGCGTCTTGGGTCG	pp38	2

R127867	GTTAGCTCCTGGCATTCTATCG	pp38	2
F128246	GTCATCTTCAACCCACAGCCATCC	pp38	1
R127973	TCTGGACCCGATCCAAAGC	pp38	1
F136009	GGGCACGGTACAGGTGTAAAGAG	Meq	1
R136296	GCATGYTTCATGGAGTTTGTCTAC	Meq	1
F136183	GCCTATCTGAGGAGGAGAAACAGA	Meq	2
R136406	GTAGGGCAAACTGGCTCATG	Meq	2
F136338	GTTCGAGATCTAAGGACTGAGWGC	Meq	1
R136553	GGGGTACAGATAGGAGGTTGGG	Meq	1
F136509	GCTAACGCTCCACATTGCTCC	Meq	2
R136982	GACAATGCAGGGAAGATGCC	Meq	2
F136913	GATCTGTACTCCCCATTCCCT	Meq	1
R137154	GCCCGAATACAAGGAATCCTGT	Meq	1
F137016	GCGGGGACGGTTTACGCTCA	Meq	2
R137266	GGCATAGACGATGTGCTGCTGAG	Meq	2

3. Anexo de publicaciones.

Los primeros dos trabajos incluidos en este anexo corresponden a resultados obtenidos directamente en el marco de esta tesis. También se presentan otras publicaciones realizadas durante su desarrollo. Estás publicaciones abordan temáticas relacionadas con otros virus, pero en ellas apliqué las metodologías de secuenciación masiva aprendidas en esta tesis, así como los conocimientos en genética de virus aviares.

Journal of Virological Methods 322 (2023) 114807

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet

Protocols

A rapid and affordable amplicon-based method for next-generation genome sequencing of the infectious bursal disease virus

Claudia Techera [a,1], Gonzalo Tomás [a,1], Sofía Grecco [a], Joaquín Williman [a], Martín Hernández [a], Valeria Olivera [b], Alejandro Banda [c], Ariel Vagnozzi [b], Yanina Panzera [a], Ana Marandino [a,*], Ruben Pérez [a,*]

[a] Sección Genética Evolutiva, Departamento de Biología Animal, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay
[b] Instituto de Virología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 1712 Buenos Aires, Argentina
[c] Poultry Research and Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, Pearl, MS, United States

ARTICLE INFO

Keywords:
Gumboro disease virus
Whole genome sequencing
Genome evolution
Avian

ABSTRACT

The infectious bursal disease virus (IBDV) causes a severe immunosuppressive disorder in young chickens. IBDV evolution resulted in the emergence of strains with divergent genetic, antigenic, and pathogenic characteristics. Genetic classification is typically performed by sequencing the coding region of the most immunogenic region of the viral protein 2 (VP2). Sequencing both double-stranded RNA genome segments is essential to achieve a more comprehensive IBDV classification that can detect recombinants and reassortments. Here, we report the development and standardization of a tiled PCR amplicon protocol for the direct and cost-effective genome sequencing of global IBDV strains using next-generation technology. Primers for tiled PCR were designed with adapters to bypass expensive and time-consuming library preparation steps. Sequencing was performed on Illumina MiniSeq equipment, and fourteen complete genomes of field strains were assembled using reference sequences. The PCR-enrichment step was used to obtain genomes from low-titer biological samples that were difficult to amplify using traditional sequencing. Phylogenetic analyses of the obtained genomes confirmed previous strain classification. By combining the enrichment methodology with massive sequencing, it is possible to obtain IBDV genomic sequences in a fast and affordable manner. This procedure can be a valuable tool to better understand virus epidemiology.

1. Introduction

The infectious bursal disease is a significant immunosuppressive disorder in chickens that causes severe economic losses in the global poultry industry (Jackwood, 2017; Müller et al., 2003). Its etiologic agent is the infectious bursal disease virus (IBDV), currently denominated as *Avibirnavirus gumboroense* (ICTV, 2023), which belongs to the genus *Avibirnavirus* within the family *Birnaviridae* (Dobos et al., 1979). The virus replicates in the bursa of Fabricius and other lymphoid tissues, resulting in immunosuppression, which leads to an increased susceptibility to other infectious agents and a lack of humoral response to vaccinations (Allan et al., 1972; Faragher et al., 1974; Rosenberger and Gelb, 1978).

The IBDV has a viral genome with two segments of double-stranded RNA (Segment A and B). Segment A (3.3 kb) encodes a polyprotein that is self-cleaved to release the capsid protein VP2, the viral protease VP4, the ribonucleoprotein VP3, and four peptides necessary for viral entry and assembly (Chevalier et al., 2005; Da Costa et al., 2002; Lejal et al., 2000; Luque et al., 2009; Sánchez and Rodriguez, 1999). A 5′-terminal overlapping open reading frame encodes the non-structural protein VP5 (Mundt et al., 1995). Segment B (2.9 kb) encodes the RNA-dependent RNA polymerase VP1 (Spies et al., 1987).

The IBDV genome evolves via mutation, recombination, and reassortment, resulting in considerable genetic variation that significantly influences the virus phenotype (Abed et al., 2018; Feng et al., 2022; Guzmán et al., 2022; He et al., 2009; Jackwood, 2012; Le Nouën et al., 2006; Lee et al., 2017; Pikuła et al., 2018; Wu et al., 2020). There are two IBDV serotypes, but only serotype 1 is pathogenic to poultry (Ismail

* Corresponding authors.
E-mail addresses: amarandino@fcien.edu.uy (A. Marandino), rperez@fcien.edu.uy (R. Pérez).
[1] Claudia Techera and Gonzalo Tomás contributed equally.

https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2023.114807
Received 11 July 2023; Received in revised form 1 September 2023; Accepted 5 September 2023
Available online 6 September 2023
0166-0934/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

et al., 1988; Jackwood et al., 1985; McFerran et al., 1980). Viruses within serotype 1 have been classified into classic, variant, and very virulent strains using pathogenic, antigenic, and molecular criteria (Chettle et al., 1989). Viruses of these three types have been disseminated globally and are currently present in most countries with a developed poultry industry.

As the polymerase chain reaction (PCR) and sequencing techniques became more popular, the classification of IBDV relied heavily on the phylogenetic analysis of the hypervariable domain of VP2 (hvVP2). This region encodes the most important immunogenic regions of the protein (Azad et al., 1987; Bayliss et al., 1990). Michel and Jackwood (2017) proposed a classification comprising seven well-supported genogroups (G). Accordingly, the classic, variant, and very virulent strains correspond to G1, G2, and G3, respectively. Genogroups 4–7 include the 'distinct' clade (d) (G4), a group of presumed recombinant Mexican isolates (G5), a divergent clade mainly from Italy (G6) and Australian strains (G7) (Hernández et al., 2015; Ignjatovic and Sapats, 2002; Jackwood, 2012; Lupini et al., 2016). Recently, there have been efforts to include segment B in the IBDV classification (Islam et al., 2021; Wang et al., 2021). Wang et al. (2021) proposed a classification scheme with eight genogroups (A1-A8) for Segment A and four genogroups (B1-B4) for Segment B. The genogroups A1-A7 are equivalent to G1-G7, and genogroup A8 represents attenuated strains of IBDV. Genogroup B1 associates former classic, variant, distinct, and attenuated strains. Genogroup B2 includes very virulent strains, while genogroup B3 contains HLJ0504-like strains sharing Segment B from a unique ancestor. Genogroup B4 comprises the emerging transitional-lineage strains from Poland and Finland. The classic, variant, very virulent, and attenuated strains of IBDV that do not undergo recombination or reassortment are assigned to genotypes A1B1, A2B1, A3B2, and A8B1, respectively.

Access to complete sequences of both genomic segments is essential for improving IBDV classification (Michel and Jackwood, 2017). However, less than 200 full-length genomes are deposited in the GenBank database. Developing new genome sequencing methodologies can significantly enhance our understanding of virus epidemiology and improve our ability to monitor and manage local strains.

Next-generation sequencing (NGS) techniques are increasingly used for obtaining genomes in different organisms (Barzon et al., 2011; Capobianchi et al., 2013; Quiñones-Mateu et al., 2015). NGS significantly reduces the per-base costs and time to obtain genomes compared to traditional sequencing (Metzker, 2010). In addition, it also provides a deeper analysis of viral populations by detecting co-infection, recombination, and rearrangement events, as well as quasispecies diversity (Isakov et al., 2015; Pérez et al., 2014; Yang et al., 2020).

One obstacle to obtaining viral genomes by massive sequencing is the low viral nucleic acid loads in clinical samples versus the host genome. Target enrichment is often required for full-length genome sequencing in clinical samples. Enrichment can be achieved directly through culture isolation, oligonucleotide bait probes, PCR enrichment, or indirectly via host nucleic acid depletion. PCR enrichment is one of the most popular procedures because it is simpler, cheaper, and faster than other methods (Quick et al., 2017). This procedure usually implies the generation of tiled PCR amplicons that cover the complete genome before NGS. This technique is widely used for sequencing SARS-CoV-2 and Zika genomes (Lambisia et al., 2022; Quick et al., 2017).

The present study reports the development and standardization of a tiled amplicon protocol for the direct and cost-effective genome sequencing of global IBDV strains.

2. Materials and methods

2.1. IBDV samples

We used IBDV-positive bursal samples from Argentina (n = 5), the United States (n = 3), and Uruguay (n = 6) collected between 2010 and 2022 (Table 1). Genotyping was performed by amplifying and sequencing 492 and 594 bp fragments corresponding to the hvVP2 and the VP1 gene following previously described conditions (Hernández et al., 2006).

Table 1
IBDV strains sequenced in this work.

Strain name	Origin	Collection Date	Genotype	Genogroup	Ct
031901	Uruguay	2019	A4B1	Distinct (G4)	31,51
451901	Uruguay	2019	A4B1	Distinct (G4)	19,20
471901	Uruguay	2019	A4B1	Distinct (G4)	15,63
397_11	Argentina	2022	A4B1	Distinct (G4)	23,47
352001	Uruguay	2020	A1B1	Classic (G1)	23,72
222201	Uruguay	2022	A1B1	Classic (G1)	24,74
222202	Uruguay	2022	A1B1	Classic (G1)	19,66
1210	Argentina	2012	A1B1	Classic (G1)	26,96
397_12	Argentina	2022	A1B1	Classic (G1)	28,23
A333D	Argentina	2021	A3B2	Very virulent (G3)	20,00
A350A	Argentina	2021	A3B2	Very virulent (G3)	20,99
2566B	USA	2010	A2B1	Variant (G2)	22,54
2567C	USA	2010	A2B1	Variant (G2)	24,61
2567D	USA	2010	A2B1	Variant (G2)	25,83

2.2. RNA extraction, reverse transcription, and qPCR

Tissue-infected samples were processed starting with 50 mg of bursae internal folds. Nucleic acids were extracted using the Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep kit (Zymo Research, Irvine, CA) following the manufacturer's instructions. The extracted DNA/RNA was eluted in 50 μL of DNase/RNase-free water.

The reverse transcription was performed from 11 μL of extracted nucleic acids using the RevertAid™ Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and random primers.

The presence of IBDV was confirmed by qPCR, and the threshold cycle (Ct) was determined for each sample following Techera et al. (2019) the Ct values were interpolated to the standard curve previously obtained to estimate the viral copy number.

2.3. Sequences analysis and primer design

Complete and partial IBDV sequences were retrieved from GenBank and aligned with newly obtained sequences using the MUSCLE algorithm (Kumar et al., 2016) of the MEGA version 7 software. The primers were designed to amplify regions between 200 and 300 bp. Amplicons were partially overlapped to obtain the complete genome sequence of IBDV (Fig. 1B; Supplementary Table 1). The sequences of the Illumina adapters were added to the 5′ end of each primer (Fig. 1A).

To minimize the generation of non-specific amplification products, chimeric primers were designed with hybridization temperatures exceeding 60 °C.

To ensure the specificity of the primer sequences, a BLAST search was performed to check for any potential non-specific homology with other regions of the IBDV or the chicken genomes.

2.4. Primer pools

Two primer pools (pool 1 and pool 2) were used to avoid obtaining small amplicons in the multiplex PCR reactions. For primer pooling, 10 μL of each 100 μM primer stock was diluted to a final concentration of 2 μM or 0.2 μM each.

2.5. Standardization of multiplex PCR

Each multiplex PCR reaction (pool 1 and pool 2) was standardized with the thermostable Immolase DNA polymerase from ImmoMix

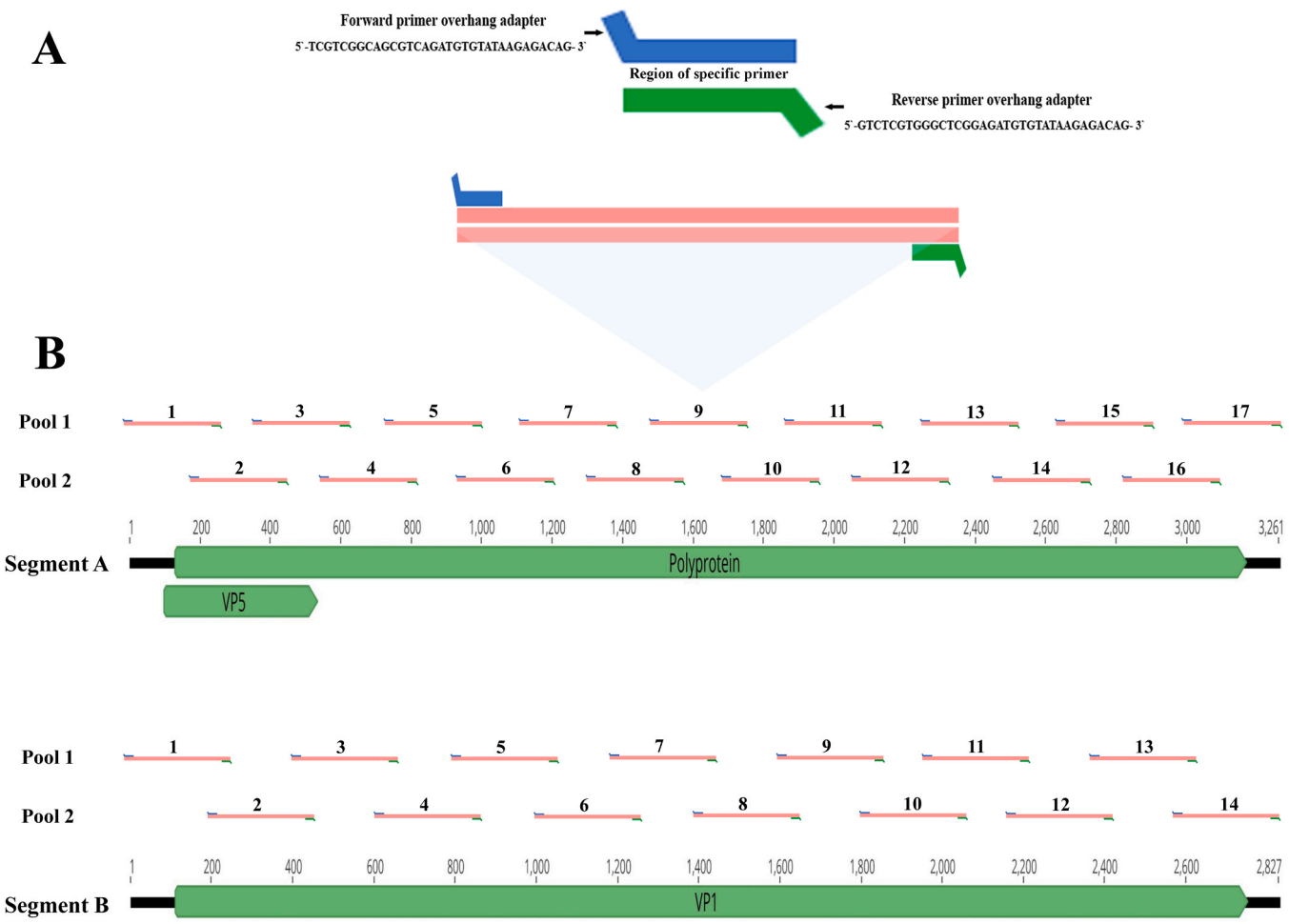


Fig. 1. (A) Representation of chimeric primers for independent sequencing of commercial Illumina library preparation kits. (B) Schematic showing expected amplicon products for each pool in genomic context for IBDV.

(Meridian Bioscience, Memphis, TN). Optimal amplification was evaluated using 58, 60, and 62 °C annealing temperatures with final primer concentrations of 0.3 μM and 0.02 μM each.

The PCR reactions (25 μL) were set up using 2.5 μL template cDNA, 12.5 μL 2× ImmoMix (Meridian Bioscience, Memphis, TN), 3.75 μL (2 μM) or 2.5 μL (0.2 μM) of each primer pools, and nuclease-free water.

The cycling conditions included a 10 min denaturation step at 95 °C, followed by 35 cycles at 95 °C for 30 s, hybridization and extension were performed simultaneously at 58/60/62 °C for 5 min without a final extension step.

PCR products were visualized on 0.8% agarose gels. Amplicons were combined and purified using 1:1.8 AMPureXP magnetic beads (Beckman Coulter, Brea, CA). Quantification was performed with a Qubit Fluorometer using the Qubit dsDNA HS Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

2.6. Multiplex PCR-next-generation sequencing

Input material did not require tagmentation because the amplicons already had the Illumina adapters and the desired fragment length of about 300 bp. The indexation reaction was performed in a 25 μL reaction volume containing 5 μL 5 × Q5 Reaction Buffer, 1 μL (10 mM) dNTPs, 0.25 μL Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2000 U/ml) (New England Biolabs, Ipswich, MA), 10 μL Index Nextera™ DNA CD Indexes (Illumina, San Diego, CA), and 8.75 μL template DNA (100 ng total). The cycling conditions were: 68 °C for 3 min, 98 °C for 3 min, followed by 5 cycles of 98 °C for 45 s, 62 °C for 30 s and 68 °C for 2 min, and a final step of 68 ºC for 1 min.

The indexed amplicons were purified with AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter, Brea, CA) and quantified by Qubit Fluorometer and using the Qubit dsDNA HS Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The quality and length of the indexed amplicons were assessed with the Standard Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit (Agilent, Santa Clara, CA) using a Fragment Analyzer ™ 5200 System (Advanced Analytical Technologies, Inc., Heidelberg, Germany, Europe).

Sequencing was performed on the Illumina MiniSeq (Illumina, San Diego, CA) genomic platform of the Universidad de la República with the MiniSeq™ Mid Output Reagent Cartridge (300 cycles, paired-end reads).

2.7. Genome assembly and annotation

Assembly and annotation were performed using Geneious Prime 2021.2.2 (Kearse et al., 2012). The raw Illumina reads were filtered using the BBDuk to remove adapters, primers, low-quality reads (quality values <30), and reads less than 60 bp in length. Clean reads were mapped to the reference sequences AY029166 (segment A) and AY029165 (segment B) using Minimap2. The majority consensus for each genome was obtained, and annotations were transferred from reference strains. Annotated genomes were newly assembled with clean reads and used for intra-host variants detection.

The BLASTn algorithm (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) was used to search for sequence similarity in public databases.

The new sequences obtained in this study were submitted to the GenBank database and assigned accession numbers for hvVP2 (OR206423 to OR206436), Segment A (OR206437-OR206450), and Segment B (OR206451 to OR206464).

2.8. Analysis of consensus sequences

Phylogenetic analyses were performed with the consensus coding sequences of Segment A (3070 nt) and Segment B (2634 nt). Strains were compared with reference sequences retrieved from the NCBI database (Supplementary Tables 2 and 3).

Sequences were aligned using the MUSCLE algorithm implemented in MEGA 7 (Kumar et al., 2016). The best-fit model of nucleotide substitution was selected under the Akaike criterion implemented in jModelTest2 (Darriba et al., 2012; Guindon and Gascuel, 2003). Maximum-likelihood phylogenetic trees were inferred using the phylogeny.fr server with an approximate likelihood ratio test for internal node support (Dereeper et al., 2008). Tree visualization was performed using the iTOL v4 online tool (Letunic and Bork, 2016).

2.9. Determination of intra-host variants

The intra-host nucleotide variations were studied with the software Geneious Prime 2021.2.2 (Kearse et al., 2012), setting frequencies of minimum variants of 0.10 and minimum coverage of 100.

2.10. Detection of recombinant sequences

Recombinant sequences were identified with the complete genome datasets using the RDP4 v4.95 software (Martin et al., 2015), which implements seven distinct algorithms to characterize recombinant sequences. A recombination event was deemed positive only if detected by at least three methods.

3. Results

3.1. Primer design for the tiled PCR enrichment

We designed 47 primers for obtaining Segment A of IBDV and 37 primers for Segment B. Some primers were degenerated to target the whole variant spectrum (Supplementary Table 1). A nucleotide BLAST search of each primer showed only similarity with the expected IBDV genome regions.

3.2. Standardization of multiplex-PCR assays

Primers for multiplex-PCR were separated into two pools (pools 1 and 2) to avoid amplifying overlapping regions (Fig. 1, Supplementary Table 1). To standardize the multiplex-PCR reactions, we utilized IBDV strains with different Ct values (from 31.51 to 15.63), which roughly correspond to a range of 10^3 to 10^8 genome copies/μL (Table 1).

The best results were obtained using a final volume of 25 μL with 2.5 μL template cDNA, 7.5 μL nuclease-free water, 12.5 μL 2 × ImmoMix (Meridian Bioscience, Memphis, TN), and 2.5 μL primer pool 1 or 2 (0.2 μM each). A hybridization temperature of 62 °C provides optimal amplification.

The concentration of purified PCR products was between 50 and 150 ng/μL. The amplicons were diluted, and 8.75 μL (100 ng total) was used for indexation.

3.3. Multiplex PCR – next-generation sequencing

The concentration of the indexed amplicons was between 25−75 ng/μL. A non-Gaussian distribution with discrete sizes between 300 and 500 bp was observed in all cases.

The Illumina sequencing generated about 5×10^5 reads for each of the fourteen samples. The reads were assembled, and majority-rule consensus genome sequences were obtained. Sequences have a 98.6–99.9% breadth of coverage for Segment A and 98.4−99.5% for Segment B. The coverage means of both segments of every strain are detailed in Table 2.

The consensus sequences were identical to those of hvVP2 and VP1 obtained by traditional or Sanger sequencing and used for strain classification.

3.4. Recombinant and phylogenetic analyses

Before conducting the phylogenetic analysis, the datasets underwent examination to identify any potential recombinant strains. However, all sequences acquired in this study were found to be non-recombinant and were subsequently utilized for alignment and phylogenetic analyses.

The complete coding sequence of Segment A was analyzed with reference sequences of genogroups A1, A2, A3, A4, A7, and A8 of serotype 1 and sequences of serotype 2. Unfortunately, no complete genomic sequences from A5 or A6 strains are available. The phylogeny revealed that serotype 1 strains clustered into six well-supported clades, while serotype 2 (AII) strains occupied a basal position. (Fig. 2).

Sequences of serotype 1 genogroups (B1-B4) and serotype 2 were analyzed for Segment B. The phylogeny revealed that serotype 1 strains formed four strongly supported clades (Fig. 2).

The Uruguayan and Argentine strains 031901, 451901, 471901, and 397_11 were closely related to distinct strains (Table 1). The new genotyping scheme classified these strains in the A4B1 genotype. The strains shared high similarity, ranging from 97.2% - 99.4% for Segment A and 98.5% - 99.5% for Segment B, with the distinct South American strains identified from 2011 to 2016.

The Uruguayan and Argentine strains 352001, 222201, 222202, 1210, and 397_12 were grouped with classic strains and assigned to the A1B1 genotype. They exhibited greater identity (99.9–100% for Segment A and Segment B) with the classic 150127/0.2 vaccine strain (MF969107).

The Argentine strains A333D and A350A fell in the very virulent clades and were assigned to the A3B2 genotype. They shared a high degree of similarity, 99.9% for Segment A and 99.9–100% for Segment B, to the very virulent vaccine strain mb (DQ927040).

The American strains 2566B, 2567C, and 2567D clustered with variant strains and were assigned to the A2B1 genotype. They shared a greater identity (97.5%) with the variant E strain for Segment A and were closer to the Korean (19D38–19D44) and American (9109) strains (97.8–99.6%) for Segment B.

The genotypes of the sequenced strains (A1B1, A2B1, A4B1, A3B2) correspond to non-reassortant strains.

Table 2
IBDV Segment A and B coverage means.

	Coverage means	
	Segment A	Segment B
031901	4402	5678
451901	4139	12832
471901	3847	13504
397_11	10118	12806
352001	5733	3506
222201	6423	4844
222202	3660	2484
1210	6080	5333
397_12	12182	11380
A333D	6836	5087
A350A	3428	2878
2566B	8252	6656
2567C	5640	5199
2567D	4709	4131

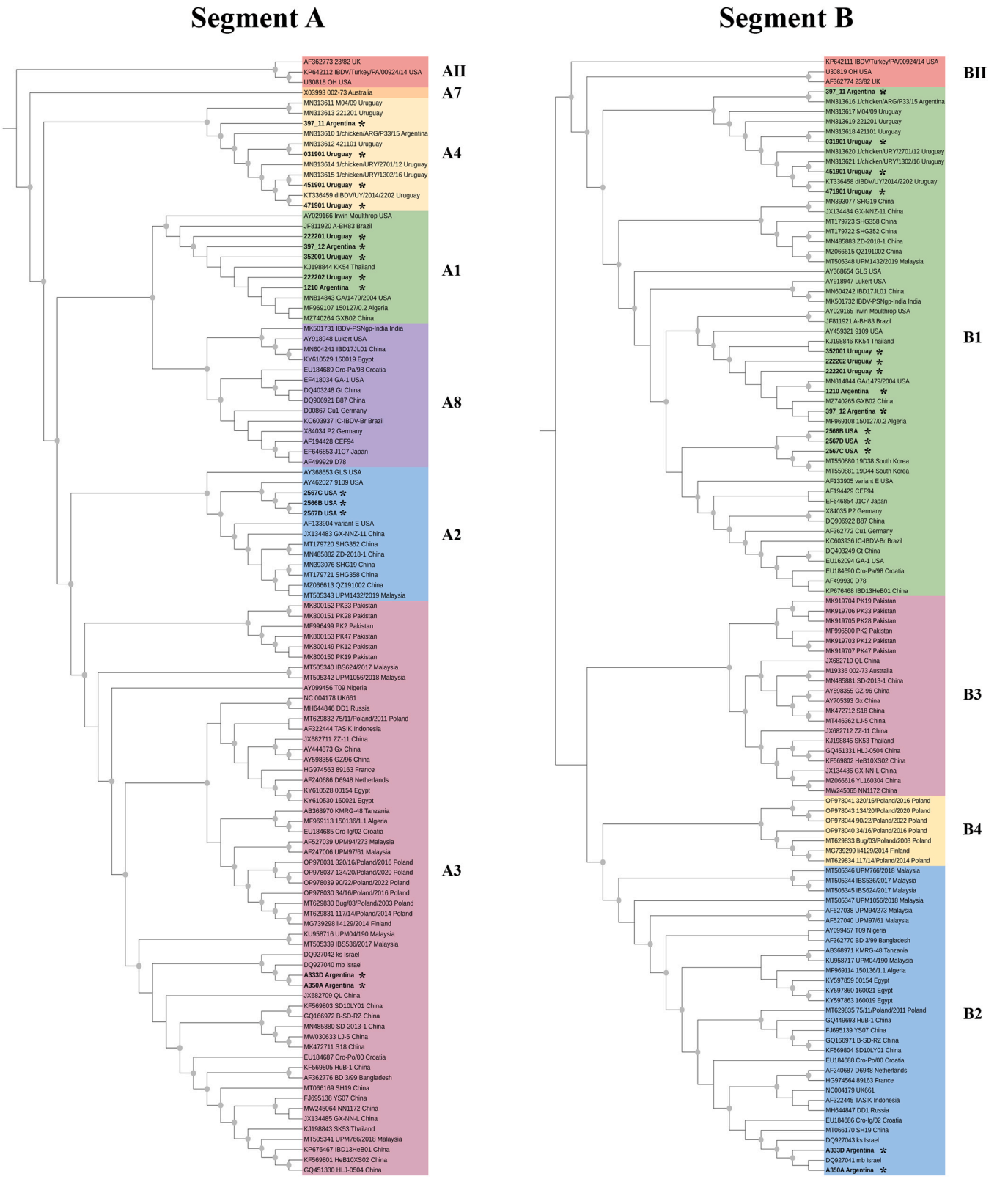


Fig. 2. Maximum likelihood-based phylogenetic trees using a 3070-nt fragment of the IBDV genome segment A (left) and a 2634-nt fragment corresponding to the IBDV genome segment B (right). The GTR + I + G nucleotide substitution model was used in both cases. The genogroups of Segment A and Segment B are denoted with designation and colors. Nodes with aLRT support values above 0.7 are marked with gray circles. The sequences obtained in this work are indicated in bold and with an asterisk.

3.5. Intra-host variants

Intra-host genetic variation was observed in Segment A and Segment B in the analyzed samples. In certain positions, the frequency of variants was over 10%. Variations consisted of single nucleotide changes that occasionally alter the amino acid sequences. Supplementary Tables 4 and 5 specify the intra-host variants observed for Segment A and B, respectively.

4. Discussion

IBDV evolution resulted in the emergence of strains with divergent genetic, antigenic, and pathogenic characteristics. The genomic characterization of circulating strains and new IBDV isolates is critical to understanding viral evolution and adjusting vaccination schemes that better fit local scenarios. Here, we developed a tailed amplicon method for streamlined IBDV genome sequencing. The PCR-enrichment step assures sequencing directly from samples with low titers that are difficult to amplify using traditional sequencing methods. PCR enrichment is usually applied in recently emerged viruses such as SARS-CoV-2 and Zika or those with a consistent sequence that facilitates primer design (Lambisia et al., 2022; Mackie et al., 2022; Quick et al., 2017; Worobey et al., 2017). Although IBDV is relatively stable for an RNA virus, it requires more effort in primer design. To account for the nucleotide diversity of IBDV strains, we included degenerated bases in the variable positions of the alignment (Supplementary Table 1).

Our chimeric primers include the IBDV genome complementary region and the Illumina adapters (Fig. 1). This procedure permits streamlined sequencing library preparation. Furthermore, only indexing of the samples is required for sequencing. Using primers with adapters is widely applied in metagenomic studies in bacteria (Amos et al., 2020; Bjerre et al., 2019) and SARS-CoV-2 (Gohl et al., 2020) but has not been used in avian viruses yet. Enriching viruses through chicken embryonated eggs and cell culture propagation may be used, but it can be time-consuming and requires specialized expertize (Atkinson et al., 2016; Guerbois et al., 2016; Misencik et al., 2016). Furthermore, most field viruses do not easily replicate in cell cultures and may require several passages for adaptation. Similarly, hybridization capture probes are pricier, and the procedures take longer than PCR.

Coupling the enrichment methodology with massive sequencing is easy to implement and provides IBDV genomic sequences quickly and reliably. We successfully obtained and characterized the consensus genomic sequences of both IBDV segments for all the samples. Even when the qPCR diagnosis showed high Ct values, indicating a low viral load of about 10^3 copies/μL, the coverage parameters were still appropriate.

The IBDV workflow performance was evaluated with previously genotyped samples circulating in South and North America belonging to the classic, variant, very virulent, and distinct IBDV strains (Table 1). Phylogenetic analysis with complete genomes confirmed the initial classification performed with partial Sanger sequencing. The pattern of clustering observed in this study is consistent with those reported in recent studies that utilized both partial and full-length genome sequences (Pikuła et al., 2023; Wang et al., 2021). According to the new classification system, strains were assigned to genotypes A1B1 (classic), A2B1 (variant), A3B2 (very virulent), and A4B1 (distinct).

The strains clustered in the A4B1 genotype were associated with previously reported distinct strains circulating in Argentina and Uruguay (Tomás et al., 2019). The strains have the amino acid markers for the distinct genogroup and the signature SEG in VP1 position 145–147, characteristic of the distinct strains circulating in Uruguay and Argentina (Tomás et al., 2019; Vera et al., 2015).

The strains categorized under the classic strains or A1B1 genotype showed a close association with the 150127/0.2 strain. This strain is highly similar to the CEVAC-IBDL live virus vaccine that contains the Winterfield 2512 strain. This vaccine strain shows a pathogenic profile consistent with an intermediate plus vaccine strain (low morbidity, no mortality, and evident bursal atrophy) (Abed et al., 2018). The detection of vaccine isolates was not unexpected because it is widely used in Uruguay and Argentina to control the disease.

Argentina applied the MB-1 live virus containing the attenuated mb strain derived from a very virulent ks (Kiryat Shmona) strain (Lazarus et al., 2008). This vaccine strain and the Argentine strains A333D and A350A were grouped into the A3B2 genotype. The attenuated mb strain had 3 and 5 nucleotide changes concerning both Argentine very virulent strains, with only one leading to an amino acid change at position 279 (Asn →Asp) of VP2. The 279Asp is not involved in attenuation and can be found in attenuated and virulent strains (Lazarus et al., 2008). It is worth noting that the farms in Argentina, where the samples were collected, were vaccinated with the MB-1 vaccine. Therefore, the highly virulent strains identified in this study may correspond to vaccine viruses.

The North American strains were grouped with variant strains in both segments, belonging to the A2B1 genotype. This genotype emerged in the 1980s in the United States (Jackwood et al., 1985) and is currently prevalent. There are also reports of their presence in China, South Korea, South Africa, Spain, and several Latin American countries (Banda et al., 2003; Cao et al., 1998; Jackwood and Sommer-Wagner, 2007; Kim et al., 2010). The Segment, A coding sequence of the three American strains, displayed higher similarity with the Variant E strain, one of the first variant strains circulating in the USA (Rosenberger et al., 1985). The Segment B coding sequences showed greater identity with Korean strains 19D38 and 19D44, which are genetically close to the American variant strains (Thai et al., 2021), and with variant strain 9109, which was isolated in the United States (Banda et al., 2001). Therefore, these strains are probable field viruses that have accumulated changes and evolved from the ancestral US variant strains.

The methodology developed here allows, in addition to providing the consensus sequence, the detection of intra-host variants (Supplementary Tables 4 and 5). Through analyzing the intra-host variants in the Argentine sample 397_11, we gained insight into the origin of this variation. These intra-host variants were linked on a single read and resulted in haplotypes at the VP2 gene, involving nucleotide positions 627, 661, 664, 672, and 675, and VP1 gene, involving nucleotide positions 1095, 1125, 1131, 2166, 2190, and 2290.

The nucleotide variants in the VP1 gene are mainly found in a non-informative region of the genome, so we could not determine to which genogroup these intra-host variants belong. The haplotype of variants found in the VP2 gene (627, 661, 664, 672, and 675) is characteristic of very virulent strains. This haplotype is found in the region hvVP2, and one of the variants (664) generates S222A (Supplementary Table 4), a well-known amino acid marker of very virulent strains. This haplotype is also present in the very virulent vaccine strain mb, which has been increasingly used since 2016 to prevent the disease in Argentina.

It is possible that co-infection with the vaccine strain may account for certain intra-host variants, such as in sample 397_11. This sample comes from chickens with no vaccination record for MB-1, but the vaccine is commonly used on the farm and may be present in the field. Co-infection events between different IBDV strains in field samples have been previously reported (Thai et al., 2021). In the case of co-infection, the vaccine strain could replicate alongside the field strains, resulting in lower detection levels in the sample. Identifying instances of co-infection between field and vaccine strains could be of relevance as they can lead to an increase in the likelihood of recombinants and rearrangements (Abed et al., 2018; Feng et al., 2022; Guzmán et al., 2022; He et al., 2009; Jackwood, 2012; Le Nouën et al., 2006; Lee et al., 2017; Pikuła et al., 2018; Wu et al., 2020).

The rest of the intra-host variants detected may occur by co-infection of strains of the same type or quasispecies that have already been reported for IBDV (Jackwood and Sommer, 2002). Furthermore, we cannot exclude procedural errors in the reverse transcription or polymerase reaction, although they are infrequently in Illumina sequencing

(Petrackova et al., 2019).

In summary, we developed an amplicon-tiled methodology coupled with massive sequencing for the genomic characterization of IBDV. This method is reliable, fast, and economical compared to other whole genome sequencing procedures. In addition, it provides in-depth knowledge of this virus's genetic and evolutionary characteristics, allowing the detection of co-infection events in the field. We expect this methodological approach will aid in disease surveillance and outbreak management in the poultry industry.

CRediT authorship contribution statement

Claudia Techera: Conceptualization, Methodology, Validation, Writing – original draft. **Gonzalo Tomás:** Conceptualization, Methodology, Resources, Funding acquisition, Validation. **Sofía Grecco:** Formal analysis. **Joaquín Williman:** Formal analysis. **Martín Hernández:** Formal analysis. **Valeria Olivera:** Formal analysis. **Alejandro Banda:** Sample collection, Diagnosis, Clinical diagnosis. **Ariel Vagnozzi:** Sample collection, Diagnosis, Clinical diagnosis. **Yanina Panzera:** Methodology, Validation, Formal analysis. **Ana Marandino:** Conceptualization, Visualization, Methodology. **Ruben Pérez:** Conceptualization, Resources, Funding acquisition, Writing – original draft. All authors revised and approved the manuscript.

Declaration of Competing Interest

There is not any conflict of interest in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by PEDECIBA [Grant Number: Research 2018/2021], Agencia Nacional de Investigación e Innovación [POS_FMV_2018_1_1007820], Comisión Académica de Posgrado, and CSIC 2018 (grant: Equipment, Genomic Platform, Faculty of Science).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.jviromet.2023.114807.

References

Abed, M., Soubies, S., Courtillon, C., Briand, F.X., Allée, C., Amelot, M., De Boisseson, C., Lucas, P., Blanchard, Y., Belahouel, A., Kara, R., Essalhi, A., Temim, S., Khelef, D., Eterradossi, N., 2018. Infectious bursal disease virus in Algeria: detection of highly pathogenic reassortant viruses. Infect. Genet. Evol. 60, 48–57. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.01.029.

Allan, W.H., Faragher, J.T., Cullen, G.A., 1972. Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunised against Newcastle disease. Vet. Rec. 90, 511–512.

Amos, G.C.A., Logan, A., Anwar, S., Fritzsche, M., Mate, R., Bleazard, T., Rijpkema, S., 2020. Developing standards for the microbiome field. Microbiome 8, 1–13. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00856-3.

Atkinson, B., Graham, V., Miles, R.W., Lewandowski, K., Dowall, S.D., Pullan, S.T., Hewson, R., 2016. Complete genome sequence of Zika virus isolated from semen. Genome Announc 4, 5–6. https://doi.org/10.1128/genomeA.01116-16.

Azad, A.A., Jagadish, M.N., Brown, M.A., Hudson, P.J., 1987. Deletion mapping and expression in Escherichia coli of the large genomic segment of a birnavirus. Virology 161, 145–152. https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90180-2.

Banda, A., Villegas, P., El-Attrache, J., 2003. Molecular characterization of infectious bursal disease virus from commercial poultry in the United States and Latin America. Avian Dis. 47, 87–95. https://doi.org/10.1637/0005-2086(2003)047[0087:MCOIBD]2.0.CO;2.

Banda, A., Villegas, P., El-Attrache, J., Estévez, C., 2001. Molecular characterization of seven field isolates of infectious bursal disease virus obtained from commercial broiler chickens. Avian Dis. 45, 620–630. https://doi.org/10.2307/1592903.

Barzon, L., Lavezzo, E., Militello, V., Toppo, S., Palù, G., 2011. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. Int. J. Mol. Sci. 12, 7861–7884. https://doi.org/10.3390/ijms12117861.

Bayliss, C.D., Spies, U., Shaw, K., Peters, R.W., Papageorgiou, A., Muller, H., Boursnell, M.E.G., 1990. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. J. Gen. Virol. 71, 1303–1312. https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-6-1303.

Bjerre, R.D., Hugerth, L.W., Boulund, F., Seifert, M., Johansen, J.D., Engstrand, L., 2019. Effects of sampling strategy and DNA extraction on human skin microbiome investigations. Sci. Rep. 9, 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-53599-z.

Cao, Y.C., Yeung, W.S., Law, M., Bi, Y.Z., Leung, F.C., Lim, B.L., 1998. Molecular characterization of seven chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. Avian Dis. 42, 340–351.

Capobianchi, M.R., Giombini, E., Rozera, G., 2013. Next-generation sequencing technology in clinical virology. Clin. Microbiol. Infect. 19, 15–22. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12056.

Chettle, N., Stuart, J.C., Wyeth, P.J., 1989. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. Vet. Rec. 125, 271–272.

Chevalier, C., Galloux, M., Pous, J., Henry, C., Denis, J., Da Costa, B., Navaza, J., Lepault, J., Delmas, B., 2005. Structural peptides of a nonenveloped virus are involved in assembly and membrane translocation. J. Virol. 79, 12253–12263. https://doi.org/10.1128/jvi.79.19.12253-12263.2005.

Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J.-C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H., Delmas, B., 2002. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. J. Virol. 76, 2393–2402. https://doi.org/10.1128/jvi.76.5.2393-2402.2002.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat. Methods 9, 772. https://doi.org/10.1038/nmeth.2109.

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M., Gascuel, O., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res. 36, 465–469. https://doi.org/10.1093/nar/gkn180.

Dobos, P., Hill, B.J., Hallett, R., Kells, D.T.C., Becht, H., Teninges6, D., 1979. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. J. Virol.

Faragher, J.T., Allan, W.H., Wyeth, P.J., 1974. Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease. Vet. Rec. 95, 385–388.

Feng, X., Zhu, N., Cui, Y., Hou, L., Zhou, J., Qiu, Y., Yang, X., Liu, C., Wang, D., Guo, J., Sun, T., Shi, Y., Han, N., Mo, M., Liu, J., 2022. Characterization and pathogenicity of a naturally reassortant and recombinant infectious bursal disease virus in China. Transbound. Emerg. Dis. 69, e746–e758. https://doi.org/10.1111/tbed.14347.

Gohl, D.M., Garbe, J., Grady, P., Daniel, J., Watson, R.H.B., Auch, B., Nelson, A., Yohe, S., Beckman, K.B., 2020. A rapid, cost-effective tailed amplicon method for sequencing SARS-CoV-2. BMC Genom. 21, 1–10. https://doi.org/10.1186/s12864-020-07283-6.

Guerbois, M., Fernandez-Salas, I., Azar, S.R., Danis-Lozano, R., Alpuche-Aranda, C.M., Leal, G., Garcia-Malo, I.R., Diaz-Gonzalez, E.E., Casas-Martinez, M., Rossi, S.L., Del Río-Galván, S.L., Sanchez-Casas, R.M., Roundy, C.M., Wood, T.G., Widen, S.G., Vasilakis, N., Weaver, S.C., 2016. Outbreak of zika virus infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and first confirmed transmission by Aedes aegypti mosquitoes in the Americas. J. Infect. Dis. 214, 1349–1356. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw302.

Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst. Biol. 52, 696–704. https://doi.org/10.1080/10635150390235520.

Guzmán, M., Cádiz, L., Guerrero-Moncayo, A., Cáceres, F., Vidal, S., Lapierre, L., Sáenz, L., Hidalgo, H., 2022. Molecular characterization of Infectious Bursal Disease Virus isolated in Chile reveals several mutations in VP2 coding region and a reassortment in its genome. Vet. Res. Commun. 1281–1289. https://doi.org/10.1007/s11259-022-09956-x.

He, C.Q., Ma, L.Y., Wang, D., Li, G.R., Ding, N.Z., 2009. Homologous recombination is apparent in infectious bursal disease virus. Virology 384, 51–58. https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.009.

Hernández, M., Banda, A., Hernández, D., Panzera, F., Pérez, R., 2006. Detection of very virulent strains of infectious bursal disease virus (Vvibdv) in commercial broilers from Uruguay. e25–e25 Avian Dis. Dig. 1. https://doi.org/10.1637/7782.1.

Hernández, M., Tomás, G., Marandino, A., Iraola, G., Maya, L., Mattion, N., Hernández, D., Villegas, P., Banda, A., Panzera, Y., Pérez, R., 2015. Genetic characterization of South American infectious bursal disease virus reveals the existence of a distinct worldwide-spread genetic lineage. Avian Pathol. 44, 212–221. https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1025696.

ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy: 2022 Release (MSL #38) 2023.https://talk.ictvonline.org/taxonomy/.

Ignjatovic, J., Sapats, S., 2002. Confirmation of the existence of two distinct genetic groups of infectious bursal disease virus in Australia. Aust. Vet. J. 80, 689–694. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2002.tb11299.x.

Isakov, O., Bordería, A.V., Golan, D., Hamenahem, A., Celniker, G., Yoffe, L., Blanc, H., Vignuzzi, M., Shomron, N., 2015. Deep sequencing analysis of viral infection and evolution allows rapid and detailed characterization of viral mutant spectrum. Bioinformatics 31, 2141–2150. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv101.

Islam, M.R., Nooruzzaman, M., Rahman, T., Mumu, T.T., Rahman, M.M., Chowdhury, E. H., Eterradossi, N., Müller, H., 2021. A unified genotypic classification of infectious bursal disease virus based on both genome segments. Avian Pathol. 50, 190–206. https://doi.org/10.1080/03079457.2021.1873245.

Ismail, N., Saif, Y., Moorhead, P., 1988. Lack of pathogenicity of five serotype 2 infectious bursal disease viruses in chickens. In: Ismail, N.M., Saif, Y.M., Moorhead, P.D. Avian Pathology. American Association of Avian Pathologists Stable, 32, pp. 757–759. URL: ⟨https://www.jstor.org/stable/159⟩..

Jackwood, D.J., 2017. Advances in vaccine research against economically important viral diseases of food animals: infectious bursal disease virus. Vet. Microbiol. 206, 121–125. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.022.

Jackwood, D.J., 2012. Molecular epidemiologic evidence of homologous recombination in infectious bursal disease viruses. Avian Dis. 56, 574–577. https://doi.org/10.1637/10053-010912-ResNote.1.

Jackwood, D.J., Saif, Y.M., Moorhead, P.D., 1985. Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens. Avian Dis. 29, 1184–1194. https://doi.org/10.2307/1590472.

Jackwood, D.J., Sommer-Wagner, S., 2007. Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. Virology 365, 369–375. https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.046.

Jackwood, D.J., Sommer, S.E., 2002. Identification of infectious bursal disease virus quasispecies in commercial vaccines and field isolates of this double-stranded RNA virus. Virology 304, 105–113. https://doi.org/10.1006/viro.2002.1724.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28, 1647–1649. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199.

Kim, H.R., Kwon, Y.K., Bae, Y.C., Oem, J.K., Lee, O.S., 2010. Genetic characteristics of virion protein 2 genes of infectious bursal disease viruses isolated from commercial chickens with clinical disease in South Korea. Poult. Sci. 89, 1642–1646. https://doi.org/10.3382/ps.2010-00790.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33, 1870–1874. https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSW054.

Lambisia, A.W., Mohammed, K.S., Makori, T.O., Ndwiga, L., Mburu, M.W., Morobe, J.M., Moraa, E.O., Musyoki, J., Murunga, N., Mwangi, J.N., Nokes, D.J., Agoti, C.N., Ochola-Oyier, L.I., Githinji, G., 2022. Optimization of the SARS-CoV-2 ARTIC network V4 primers and whole genome sequencing protocol. Front. Med. 9, 1–8. https://doi.org/10.3389/fmed.2022.836728.

Lazarus, D., Pasmanik-Chor, M., Gutter, B., Gallili, G., Barbakov, M., Krispel, S., Pitcovski, J., 2008. Attenuation of very virulent infectious bursal disease virus and comparison of full sequences of virulent and attenuated strains. Avian Pathol. 37, 151–159. https://doi.org/10.1080/03079450801910206.

Le Nouën, C., Rivallan, G., Toquin, D., Darlu, P., Morin, Y., Beven, V., de Boisseson, C., Cazaban, C., Comte, S., Gardin, Y., Eterradossi, N., 2006. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. J. Gen. Virol. 87, 209–216. https://doi.org/10.1099/vir.0.81184-0.

Lee, H.J., Jang, I., Shin, S.H., Lee, H.S., Choi, K.S., 2017. Genome sequence of a novel reassortant and very virulent strain of infectious bursal disease virus. Genome Announc 5, 1–2. https://doi.org/10.1128/genomeA.00730-17.

Lejal, N., Costa, B., Da, Huet, J.C., Delmas, B., 2000. Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. J. Gen. Virol. 81, 983–992. https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-4-983.

Letunic, I., Bork, P., 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. Nucleic Acids Res. 44, W242–W245. https://doi.org/10.1093/NAR/GKW290.

Lupini, C., Giovanardi, D., Pesente, P., Bonci, M., Felice, V., Rossi, G., Morandini, E., Cecchinato, M., Catelli, E., 2016. A molecular epidemiology study based on VP2 gene sequences reveals that a new genotype of infectious bursal disease virus is dominantly prevalent in Italy. Avian Pathol. 45, 458–464. https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1165792.

Luque, D., Saugar, I., Rejas, M.T., Carrascosa, J.L., Rodríguez, J.F., Castón, J.R., 2009. Infectious bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. J. Mol. Biol. 386, 891–901. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.11.029.

Mackie, J., Kinoti, W.M., Chahal, S.I., Lovelock, D.A., Campbell, P.R., Tran-Nguyen, L.T. T., Rodoni, B.C., Constable, F.E., 2022. Targeted whole genome sequencing (TWG-Seq) of cucumber green mottle mosaic virus using tiled amplicon multiplex PCR and nanopore sequencing. Plants 11. https://doi.org/10.3390/plants11202716.

Martin, D.P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., Muhire, B., 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. Virus Evol. 1, 1–5. https://doi.org/10.1093/ve/vev003.

McFerran, J.B., McNulty, M.S., McKillop, E.R., Connor, T.J., McCracken, R.M., Collins, D. S., Allan, G.M., 1980. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. Avian Pathol. 9, 395–404. https://doi.org/10.1080/03079458008418423.

Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies the next generation. Nat. Rev. Genet. 11, 31–46. https://doi.org/10.1038/nrg2626.

Michel, L.O., Jackwood, D.J., 2017. Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. Arch. Virol. 162, 3661–3670. https://doi.org/10.1007/s00705-017-3500-4.

Misencik, M.J., Grubaugh, N.D., Andreadis, T.G., Ebel, G.D., Armstrong, P.M., 2016. Isolation of a novel insect-specific flavivirus from Culiseta melanura in the Northeastern United States. Vector-Borne Zoonotic Dis. 16, 181–190. https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1889.

Müller, H., Islam, M.R., Raue, R., 2003. Research on infectious bursal disease - the past, the present and the future. Vet. Microbiol. 97, 153–165. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.08.005.

Mundt, E., I, J.B., Miillert, H., 1995. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. J. Gen. Virol. 82, 437–443.

Pérez, R., Calleros, L., Marandino, A., Sarute, N., Iraola, G., Grecco, S., Blanc, H., Vignuzzi, M., Isakov, O., Shomron, N., Carrau, L., Hernández, M., Francia, L., Sosa, K., Tomás, G., Panzera, Y., 2014. Phylogenetic and genome-wide deep-sequencing analyses of canine parvovirus reveal co-infection with field variants and emergence of a recent recombinant strain. PLoS One 9, e111779. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111779.

Petrackova, A., Vasinek, M., Sedlarikova, L., Dyskova, T., Schneiderova, P., Novosad, T., Papajik, T., Kriegova, E., 2019. Standardization of sequencing coverage depth in NGS: recommendation for detection of clonal and subclonal mutations in cancer diagnostics. Front. Oncol. 9, 1–6. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00851.

Pikuła, A., Lisowska, A., Domańska-Blicharz, K., 2023. Epidemiology of infectious bursal disease virus in Poland during 2016–2022. Viruses 15. https://doi.org/10.3390/v15020289.

Pikuła, A., Lisowska, A., Jasik, A., Śmietanka, K., 2018. Identification and assessment of virulence of a natural reassortant of infectious bursal disease virus. Vet. Res. 49, 89. https://doi.org/10.1186/s13567-018-0586-y.

Quick, J., Grubaugh, N.D., Pullan, S.T., Claro, I.M., Smith, A.D., Gangavarapu, K., Oliveira, G., Robles-Sikisaka, R., Rogers, T.F., Beutler, N.A., Burton, D.R., Lewis-Ximenez, L.L., Jesus, J.G. de, Giovanetti, M., Hill, S., Black, A., Bedford, T., Carroll, M.W., Nunes, M., Jr, L.C.A., Sabino, E.C., Baylis, S.A., Faria, N., Loose, M., Simpson, J.T., Pybus, O.G., Andersen, K.G., Loman, N.J., 2017. Zika and other virus genomes directly from clinical samples. Nat. Protoc. 12, 1261–1276. https://doi.org/10.1038/nprot.2017.066.Multiplex.

Quiñones-Mateu, M.E., Avila, S., Reyes-teran, G., Martinez, M.A., 2015. Deep sequencing: becoming a critical tool in clinical virology. J. Clin. Virol. 61, 9–19. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.06.013.Deep.

Rosenberger, J.K., Cloud, S.S., Gelb, J., Odor, E., Dohms, J.E., 1985. Sentinel bird survey of Delmarva broiler flocks. In: Proceedings of the 20th National Meeting on Poultry Health and Condemnations. Ocean City, MD, pp. 94–101.

Rosenberger, J.K., Gelb, J., 1978. Response to several avian respiratory viruses as affected by infectious bursal disease virus. Avian Dis. 22, 95–105. https://doi.org/10.2307/1589512.

Sánchez, A.B., Rodriguez, J.F., 1999. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: Identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. Virology 262, 190–199. https://doi.org/10.1006/viro.1999.9910.

Spies, U., Miiller, H., Becht, H., 1987. Properties of RNA Polymerase Activity Associated with Infectious Bursal Disease Virus and Characterization of Its Reaction Products, 8, pp. 127–140.

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

Thai, T.N., Jang, I., Kim, Hyun-a, Kim, Hyun-soo, Kwon, Y., 2021. Characterization of Antigenic Variant Infectious Bursal Disease Virus Strains Identified in South Korea. ⟨https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1869698⟩.

Tomás, G., Marandino, A., Techera, C., Olivera, V., Perbolianachis, P., Fuques, E., Grecco, S., Hernández, M., Hernández, D., Calleros, L., Craig, M.I., Panzera, Y., Vagnozzi, A., Pérez, R., 2019. Origin and global spreading of an ancestral lineage of the infectious bursal disease virus. Transbound. Emerg. Dis. 67, 1198–1212. https://doi.org/10.1111/tbed.13453.

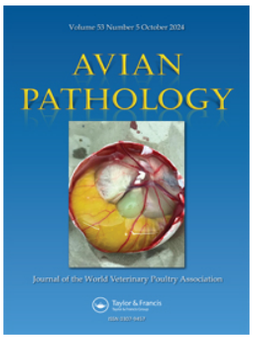
Vera, F., Craig, M.I., Olivera, V., Rojas, F., Kŏnig, G., Pereda, A., Vagnozzi, A., 2015. Molecular characterization of infectious bursal disease virus (IBDV) isolated in Argentina indicates a regional lineage. Arch. Virol. 160, 1909–1921. https://doi.org/10.1007/s00705-015-2449-4.

Wang, Y. long, Fan, L. jin, Jiang, N., Gao, L., Li, K., Gao, Y. long, Liu, C. jun, Cui, H. yu, Pan, Q., Zhang, Y. ping, Wang, X. mei, Qi, X. le, 2021. An improved scheme for infectious bursal disease virus genotype classification based on both genome-segments A and B. J. Integr. Agric. 1372–1381. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63424-4.

Worobey, M., Watts, T.D., Mckay, R.A., Suchard, M.A., Teuwen, D.E., Koblin, B.A., Heneine, W., Lemey, P., Jaffe, W., 2017. History in North America, 539, pp. 98–101. ⟨https://doi.org/10.1038/nature19827.1970s⟩.

Wu, T., Wang, Y., Li, H., Fan, L., Jiang, N., Gao, L., Li, K., Qi, X., 2020. Naturally occurring homologous recombination between novel variant infectious bursal disease virus and intermediate vaccine strain. Vet. Microbiol. 245, 108700 https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108700.

Yang, Y., Yan, W., Hall, A.B., Jiang, X., 2020. Characterizing Transcriptional Regulatory Sequences in Coronaviruses and Their Role in Recombination, 38, pp. 1241–1248. ⟨https://doi.org/10.1093/molbev/msaa281⟩.



Avian Pathology

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: www.tandfonline.com/journals/cavp20

Genomic characterization of infectious bursal disease virus in Argentina provides evidence of the recent transcontinental spread of Chinese genotype A2dB1b

Gonzalo Tomás, Claudia Techera, Ana Marandino, Valeria Olivera, Joaquín Williman, Yanina Panzera, Ruben Pérez & Ariel Vagnozzi

To cite this article: Gonzalo Tomás, Claudia Techera, Ana Marandino, Valeria Olivera, Joaquín Williman, Yanina Panzera, Ruben Pérez & Ariel Vagnozzi (2024) Genomic characterization of infectious bursal disease virus in Argentina provides evidence of the recent transcontinental spread of Chinese genotype A2dB1b, Avian Pathology, 53:5, 430-438, DOI: 10.1080/03079457.2024.2355918

To link to this article: https://doi.org/10.1080/03079457.2024.2355918

View supplementary material

Published online: 04 Jun 2024.

Submit your article to this journal

Article views: 153

View related articles

View Crossmark data

Citing articles: 1 View citing articles

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=cavp20

AVIAN PATHOLOGY
2024, VOL. 53, NO. 5, 430–438
https://doi.org/10.1080/03079457.2024.2355918

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ORIGINAL ARTICLE

Check for updates

Genomic characterization of infectious bursal disease virus in Argentina provides evidence of the recent transcontinental spread of Chinese genotype A2dB1b

Gonzalo Tomás[a], Claudia Techera[a], Ana Marandino[a], Valeria Olivera[b], Joaquín Williman[a], Yanina Panzera[a], Ruben Pérez[a] and Ariel Vagnozzi[b]

[a]Sección Genética Evolutiva, Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Instituto de Biología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; [b]Laboratorio de Aves, Instituto de Virología e Innovación Tecnológica, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina

ABSTRACT

The infectious bursal disease virus (IBDV) is a significant pathogen affecting the poultry industry worldwide. Its epidemiological history has been marked by the emergence of strains with different antigenic, pathogenic, and genetic features, some of which have shown notable spread potential. The A2dB1b genotype, also known as novel variant, has become widespread and gained increased relevance in IBDV epidemiology. This genotype was described in China in the 2010s and rapidly spread in Asia and Africa. The present study describes the circulation of the A2dB1b genotype in Argentina. Applying a next-generation sequencing approach, we obtained the complete coding sequence of 18 Argentine viruses. The high level of genomic homogeneity observed amongst these viruses, their monophyletic clustering in both partial and complete segments A and B derived phylogenies, and their close relatedness to some Chinese strains suggest that a unique transcontinental spread event from China to Argentina occurred recently. The apparent success of the A2dB1b genotype spreading throughout Asia, Africa, and South America may partially be due to specific amino acid characteristics. Novel residues in the hypervariable region of VP2 may help A2dB1b IBDVs evade the protection elicited by the applied commercial vaccines. Our findings underscore the importance of continuous characterization of field samples and evaluation of the control measures currently applied to fight against this specific IBDV genotype.

ARTICLE HISTORY
Received 3 March 2024
Revised 24 April 2024
Accepted 10 May 2024

KEYWORDS
IBDV; genotype; A2dB1b; South America; origin; evolution

Introduction

Infectious bursal disease (IBD) is an immunosuppressive disease that affects young chickens, resulting in an increased susceptibility to infectious agents and poor vaccination response (Allan *et al.*, 1972; Faragher *et al.*, 1974; Rosenberger & Gelb, 1978). Due to its global presence and economic impact, IBD is a critical threat to the poultry industry (Zachar *et al.*, 2016; Tulu, 2019).

Infectious bursal disease virus (IBDV), also known as *Avibirnavirus gumboroense*, is the causative agent of IBD. This virus is the only member of the genus *Avibirnavirus* within the family *Birnaviridae*. It is characterized by a non-enveloped icosahedral capsid and a double-stranded RNA genome consisting of segments A and B. Segment A (3.2 kb) encodes the capsid protein VP2, the scaffold protein VP3, the viral protease VP4, and four small peptides in an open reading frame (ORF). Additionally, a non-structural protein VP5 is encoded in a partially overlapped ORF (Mundt *et al.*, 1995; Sánchez & Rodriguez, 1999; Lejal *et al.*, 2000; Da Costa *et al.*, 2002; Luque *et al.*, 2009). Segment B (2.9 kb) encodes the viral RNA polymerase VP1 (Spies *et al.*, 1987).

Cross-neutralization test distinguishes two IBDV serotypes, but only serotype 1 causes clinical disease in chickens (McFerran *et al.*, 1980; Jackwood *et al.*, 1984; Ismail *et al.*, 1988). Serotype 1 IBDVs are conventionally divided into classic, variant, and very virulent strains using antigenic and pathogenic criteria (Rosenberger & Cloud, 1985; Chettle *et al.*, 1989). However, the cumulative emergence of new strains with different characteristics led to the recent proposal of more up-to-date classification schemes based solely on phylogenetic inferences of the hypervariable region of VP2 (hvVP2) (Michel & Jackwood, 2017) or in combination with a partial fragment of VP1 (pVP1) (Islam *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). One disadvantage of the hvVP2-based scheme is that it does not provide any information about segment B, thus limiting the possibility of detecting reassortments. The hvVP2 and pVP1 combined schemes classify each genomic segment into genogroups, and strain genotypes are denoted by indicating the corresponding genogroup for segments A and B.

CONTACT Ruben Pérez rperez@fcien.edu.uy; Ariel Vagnozzi vagnozzi.ariel@inta.gob.ar
Supplemental data for this article can be accessed online at https://doi.org/10.1080/03079457.2024.2355918.
© 2024 Houghton Trust Ltd

The first study on IBDV in Argentina was performed by Remorini *et al.* (2006). Of the eight samples from 2003 that were analysed, four corresponded to distinct (genogroup A4) viruses. The remaining viruses were two classic virulent (genogroup A1), one classic attenuated (genogroup A8), and one very virulent (genogroup A3). The analysis of 51 samples collected between 2005 and 2011 identified 82% A4, 14% A1, and 4% A3 (Vera *et al.*, 2015). The pVP1 was also analysed for 21 samples, indicating that genotype A4B1 (distinct) was prevalent. This genotype spread to Uruguay, a neighbouring country, and also became prevalent (Hernández *et al.*, 2015; Tomás *et al.*, 2020). However, no information about the IBDVs circulating in Argentina has been published recently.

In the present study, we analysed recently collected samples and performed their preliminary genotyping to shed light on the current circulation of IBDV in Argentina. Then, we applied a newly developed next-generation sequencing-based method (Techera *et al.*, 2023) to obtain the coding sequence of some of the IBDVs showing low nucleotide identity with previously detected viruses in Argentina to characterize the genomes comprehensively.

Materials and methods

Sample origin and preliminary analysis

During 2020–2022, bursal samples were received from 113 farms in Argentina's central chicken-farming regions with a history of immunosuppressive conditions. Due to an ongoing project, samples came mainly from farms applying the MB very virulent vaccine strain. However, samples from farms using other vaccination programmes were also received as part of routine diagnostic activities.

For IBDV detection, the samples were processed starting with 50 mg of bursae internal folds. Total RNA was extracted using the Quick-RNA™ Miniprep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The extracted RNA was eluted in 50 µl of RNase-free water and stored at −80°C till use. Complementary DNA was generated using the ProtoScript® II Reverse Transcriptase (NEB, Ipswich, MA, USA) with random hexamer primers. A 492-bp fragment corresponding to the hvVP2 was amplified using previously described primers and conditions (Hernández *et al.*, 2006). Positive samples ($n = 60$) were Sanger-sequenced using both forward and reverse primers. Obtained sequences were assembled and edited utilizing the Geneious Prime software (http://www.geneious.com/). Final curated sequences were subjected to a BLAST search for preliminary identification.

Genome sequencing

The complete coding sequences of both genome segments were obtained through next-generation sequencing; the genome was previously amplified using a multiplex primer panel that covered the entire genome (Techera *et al.*, 2023). Sequencing was performed on an Illumina MiniSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA) with the MiniSeq™ Mid Output Reagent Cartridge (300 cycles, paired-end reads). Processing of the obtained Illumina reads was performed using the Geneious Prime software. The raw reads were filtered using the BBDuk Trimmer to remove primers, low-quality bases ($Q < 30$), and reads less than 60 bp in length. Clean reads were mapped to the segment A (MN393076) and B (MN393077) sequences of the Chinese SHG19 strain using the Minimap2 alignment software. The new sequences obtained in this study were submitted to GenBank, and accession numbers PP393702 and PP393737 were assigned.

Phylogenetic and amino acid sequence analyses

Phylogenetic analyses were performed with partial and complete genome datasets comprising representative strains of each genotype. The Wang *et al.* (2021) classification scheme was followed, with the addition of genogroup B5 (Nigerian strains) proposed by Islam *et al.* (2021) and genogroup A9 (Portuguese strains) proposed by Legnardi *et al.*, (2022), to represent the current IBDV diversity better. Complete segment A and B datasets comprised 93 and 95 sequences, respectively. In the case of the hvVP2 and pVP1 datasets, 69 and 45 sequences were used. All the sequences were retrieved from the GenBank database. After including the Argentine sequences in the datasets, multiple alignments were carried out using MAFFT (Katoh & Standley, 2013). The best-fit nucleotide substitution model was selected with the jModelTest2 software under the Akaike criterion (Guindon & Gascuel, 2003; Darriba *et al.*, 2012). Maximum-likelihood phylogenetic trees were inferred using the PhyML v3.0 with an approximate likelihood ratio test as internal node support (Guindon *et al.*, 2010). The visualization and editing of the trees were carried out using the iTOL v6 online tool (Letunic & Bork, 2016). The amino acid sequences corresponding to VP5, polyprotein, and VP1 of the Argentine viruses were compared to reference strains using partial and complete coding sequences.

Detection of recombinant sequences

To determine the possible presence of recombinant sequences within the Argentine viruses, a search of recombinant sequences was assessed using the RDP,

GENECONV, Chimaera, MaxChi, BootScan, SiScan, and 3Seq methods implemented in the RDP5 v5.33 software (Martin *et al.*, 2021). Recombinants were considered when detected by at least five methods, with *P*-Value < 0.05 and Bonferroni correction.

Results

Preliminary nucleotide sequence analysis

From the preliminary analysis of 60 hvVP2 sequences, 42 showed high nucleotide identity (> 98%) with some of the previously detected strains in Argentina: 28 with the MB very virulent vaccine strain (A3), 13 with field strains previously described in Argentina (A4), and one with the W2512 classic vaccine strain (A1). Interestingly, 18 sequences showed low nucleotide identity (< 90%) with these strains; thus, the corresponding samples were selected for their complete coding genome sequencing and characterization (Table 1).

Complete coding sequencing

The almost complete segments A (3207 nt) and B (2751 nt) of the 18 viruses, including the complete coding regions, were successfully sequenced. The divergence between the Argentine sequences was measured through the nucleotide identity percentage, which ranged between 99.3% and 100% for segment A and between 99.2% and 99.9% for segment B. After performing a BLAST search on all sequences, it was found that the Chinese SHG19 strain belonging to the A2dB1b genotype had the highest similarity for segments A and B of those 18 viruses, with percentages ranging from 98.7% to 99.1% and 98.9% to 99.2%, respectively.

Phylogenetic analyses

None of the 18 Argentine viruses sequenced were recombinant or reassortant. The phylogenetic analyses of the hvVP2 and pVP1 resolved the nine (A1 to A9) and five (B1 to B5) previously described genogroups, respectively (Figure 1(A,B)). The 18 Argentine viruses clustered in monophyletic clades within the A2d and B1b genogroups, closely related to the Chinese SHG19 strain.

The phylogenies using full-length segment A and B coding sequences showed the same clustering as those using partial sequences (online supplementary Figure S1A, B).

Open reading frame analysis

The amino acid (aa) sequences of the polyprotein, VP1, and VP5 from the 18 Argentine viruses were compared to the remaining IBDV complete genome sequences. The polyprotein and VP1 showed the typical lengths of 1012 aa and 879 aa, respectively. Interestingly, segment A contains the A50T nucleotide substitution (numbering according to sequence AY029166), which generates an additional initiation codon (AUG) in the VP5 open reading frame at position 49, in addition to those typically found at positions 85 and 97. This codon might be used as an alternative translation start, resulting in a VP5 of 161 aa in length, in contrast to the 149 aa and 145 aa commonly observed in other IBDV strains. The comparison with other IBDV entire segment A sequences indicated that this A50T substitution is also present in most Chinese A2d strains.

Amino acid sequence analysis

Within the hypervariable region of VP2, we detected that 252I was a unique marker shared by all the A2d strains and confirmed 249K as a strong A2 marker (Figure 2). Upon analysing the complete coding sequences, seven amino acid residues emerged as strong markers for A2dB1b, all present in the Argentine viruses (Figure 2; Tables S1 and S2). These were 3R, 40P, 88R, and 143E in VP5, 252I in VP2, 951L in VP3, and 240E in VP1. Interestingly, the residue 72D in VP1 was only present in the Argentine viruses instead of the 72E typical of the other genotypes, including B1b.

Discussion

Since its first detection in the late 1950s, various strains of IBDV have emerged worldwide. These strains have exhibited diverse spreading behaviours over the years, with some showing high adaptability and establishing themselves in multiple geographic regions, while others remain confined to specific areas. Traditional classic (A1B1), variant (A2B1), and very virulent (A3B2) strains have been described on different continents and over extended periods. Conversely, strains like the Mexican (A5, segment B unavailable), Italian (A6B1), and Australian (A7B1) strains have been exceptionally described outside their limited circulating regions. The detection of the A2dB1b genotype in Argentina, in addition to Asian and African countries, confirms its widespread distribution and remarkable intercontinental spread (Aliyu *et al.*, 2021; Myint *et al.*, 2021; Thai *et al.*, 2022; Legnardi, Poletto *et al.*, 2023).

The first occurrence of the A2dB1b genotype was detected in Argentina in 2020. However, an early arrival of this genotype cannot be ruled out. While this article was under review, Jaton *et al.* (2024) published a study analysing 11 partial VP2 sequences from Argentine samples collected in 2022. The study detected the Chinese A2dB1b genotype in the country and suggests that it arrived in 2014 based on a

Table 1. Argentine samples belonging to the A2dB1b genotype used in this study.

Sample	Location	Collection date	Flock type	Age	Vaccines	Accession number	
						Seg A	Seg B
A327J	ER[a]	August 2020	Broiler	28	LA-very virulent[c]	PP393705	PP393720
A329B	ER	October 2020	Broiler	27	LA-very virulent	PP393709	PP393722
A335I	ER	February 2021	Broiler	28	LA-very virulent	PP393708	PP393723
A363E	ER	August 2021	Broiler	26	LA-very virulent	PP393707	PP393721
A397-1	ER	April 2022	Broiler	28	IC-classic[d]	PP393702	PP393724
A397-2	ER	April 2022	Broiler	22	IC-classic	PP393704	PP393736
A397-5	ER	April 2022	Broiler	27	IC-classic	PP393711	PP393730
A397-6	ER	April 2022	Broiler	29	IC-classic	PP393712	PP393731
A397-7	ER	April 2022	Broiler	29	IC-classic	PP393706	PP393737
A397-9	ER	April 2022	Broiler	36	IC-classic	PP393703	PP393725
A397-18	ER	May 2022	Broiler	21	IC-classic	PP393710	PP393735
A397-21	BA[b]	May 2022	Broiler	28	IC-classic	PP393717	PP393728
A397-22	BA	May 2022	Broiler	24	IC-classic	PP393713	PP393726
A397-23	BA	May 2022	Broiler	27	IC-classic	PP393714	PP393727
A397-27	BA	June 2022	Broiler	32	IC-classic	PP393715	PP393734
A397-29	BA	June 2022	Broiler	15	IC-classic	PP393718	PP393732
A397-30	BA	June 2022	Broiler	32	IC-classic	PP393719	PP393729
A397-32	BA	June 2022	Broiler	35	IC-classic	PP393716	PP393733

[a]ER: Entre Ríos.
[b]BA: Buenos Aires.
[c]LA: live attenuated vaccine.
[d]IC: immune complex vaccine.

phylodynamic analysis (Jaton *et al.*, 2024). A time lag is expected between the genotype's arrival and its first detection. This may result from a very low initial prevalence combined with limited sampling. As the genotype became more successful and its prevalence increased, the probability of detection rose correspondingly. Retrospective analysis of poultry samples that have not been diagnosed or characterized may help shed light on this topic.

The phylogenetic analyses of the partial and complete segments A and B of the Argentine A2dB1b viruses indicate that they form a genetically homogeneous monophyletic group (Figure 1(A,B), online supplementary Figure S1A, B). The monophyletic feature and the low level of genetic divergence suggest a recent and single introduction into Argentina. Our findings also reveal that the Argentine A2dB1b viruses are more closely related to Chinese strains than those circulating in Japan, South Korea, Malaysia, and Egypt, suggesting a direct origin from China. However, the mechanism through which the virus travelled from China to Argentina remains unclear. The commercial trade of live birds and poultry products likely facilitated the spread from China to Japan, Malaysia, and South Korea (Wang, He, *et al.*, 2022). However, according to the United Nations Comtrade Database (https://comtradeplus.un.org/), there are no reports of such trade from China to Argentina. A similar situation occurred in Egypt (Legnardi, Poletto *et al.*, 2023). It is plausible that the high resistance of IBDV to various physicochemical conditions may have facilitated its long-distance spread through alternative means (fomites) not involving live birds or their derived products (Petek *et al.*, 1973; Alexander & Chettle, 1998; Mandeville *et al.*, 2000). Regardless of the entry route of the A2dB1b genotype into Argentina, our results confirm that China is a significant hub for the spread of this genotype.

The emergence of the A2dB1b genotype in Argentina could represent a significant epidemiological shift and severely threaten the local poultry industry. Although this is not an epidemiological study (the sampling was partially biased), the results suggest that the A2dB1b genotype is becoming more prevalent at the expense of the A4B1 (distinct) genotype. This latter genotype represented over 80% of IBDV-positive samples a few years ago (Vera *et al.*, 2015), whereas it dropped to 22% in this study. This apparent replacement should be closely monitored and confirmed through routine sampling in the coming years. Another potential consequence of the introduction of the A2dB1b genotype in Argentina is the emergence of reassortant viruses. This genetic variation mechanism has been successfully exploited by IBDV, leading to problematic strains with significant spreading potential (Pikuła *et al.*, 2020; Legnardi, Franzo *et al.*, 2023). Reassortment is associated with two of more different co-circulating genotypes in the same region, allowing for the simultaneous co-infection of the same host. This can result in the formation of viral particles with shuffled genome segments. In China, the co-circulation of A3B3 and A2dB1b genotypes facilitated the emergence of reassortant viruses, such as the recently reported A2dB3 (Wang, Huang *et al.*, 2022). However, we detected no reassortments in Argentina despite co-circulation of A2dB1b with A4B1 and various classic and very virulent vaccines. Possibly, reassortment events, if they occurred, could have reduced fitness and remain at undetectable frequencies in the poultry population. In any case, continuous analysis of field samples is essential to enhance the likelihood of early detection of reassortment events.

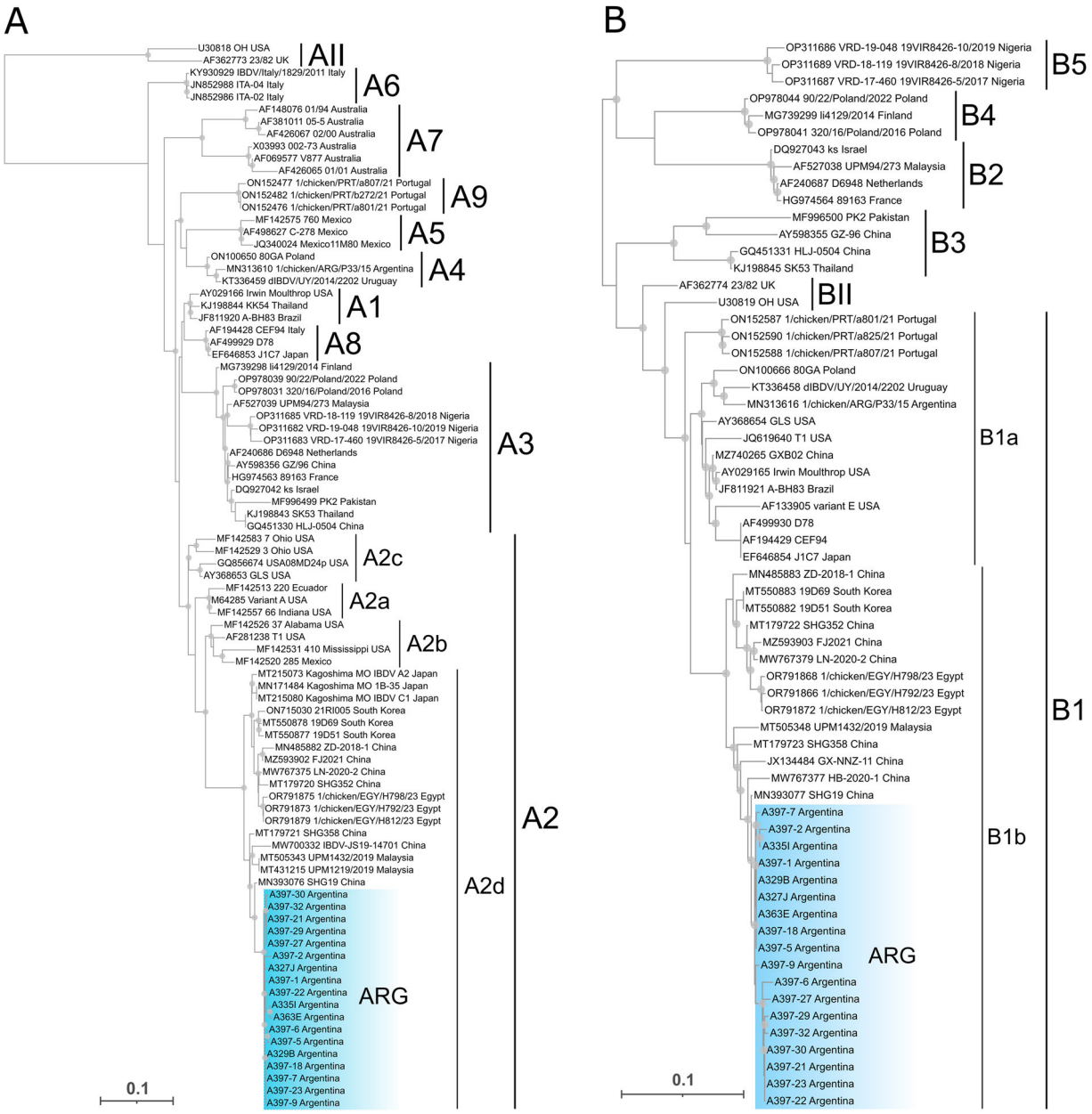


Figure 1. Phylogenies of IBDV strains according to Wang *et al.* (2021) with modifications. Node support values (aLRT) above 0.75 are indicated as grey circles. The Argentine viruses are marked in shaded rectangles. (A) Phylogenetic inference of the hvVP2 region. (B) Phylogenetic inference of the pVP1 region.

The spread of the A2dB1b genotype to various countries and its establishment as a circulating field strain, even in countries with intensive vaccination, may result from specific amino acid characteristics (Zhang *et al.*, 2022). In this regard, A2dB1b strains exhibit residues identical to the North American Variant E strain in critical positions within the P_{HI} loop in the hvVP2 (318D and 323E) (Figure 2). These residues are crucial in reducing the protection elicited by classic vaccines against Variant E (Heine *et al.*, 1991). They are also responsible for reducing the protection of very virulent vaccines against the Chinese A2dB1b strains (Fan *et al.*, 2020, 2022; Li *et al.*, 2020). Since classic and very virulent vaccines are commonly administered in Argentina, and they were indeed the types of vaccines applied on the farms where the samples were collected (Table 1), this may partially explain the observed success of A2dB1b in the country. However, the effectiveness of the currently applied vaccines against infection with the A2dB1b genotype in the country should be experimentally analysed to draw firm conclusions. Interestingly, a recent study demonstrated that Variant E and SHG19 (A2dB1b) strains are antigenically closely related (Broadbent *et al.*, 2023). This suggests that Variant E-derived vaccines could be suitable candidates for effectively controlling the A2dB1b genotype.

We identified seven amino acid changes as markers for the A2dB1b genotype (Figure 2; online supplementary Tables S1 and S2). These changes occur in VP5 (3R, 40P, 88R, and 143E), VP2 (252I), VP3 (951L) and VP1 (240E). Although other amino

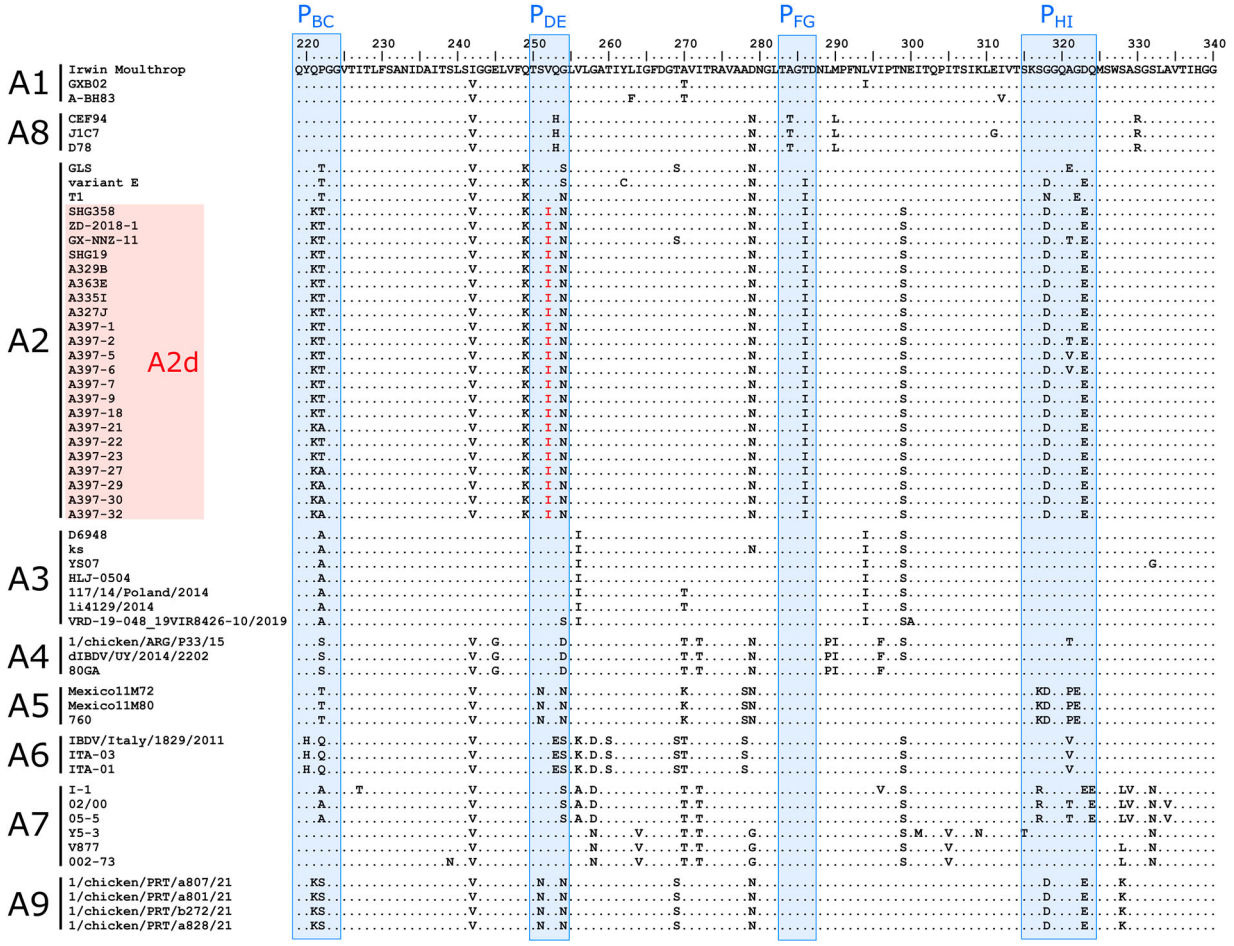


Figure 2. Amino acids in the hvVP2 region of representative strains of the different genogroups. The A2d genogroup strains and the VP2 projection loops (P_{BC}, P_{DE}, P_{FG}, P_{HI}) are highlighted with shaded rectangles. The A2d genogroup has the amino acid marker residue isoleucine (I) at position 252.

acid markers were previously described (e.g. 221K, 299S), our analysis also indicates their occurrence in other genogroups (Figure 2). Interestingly, an additional, premature VP5 translation start site was described for the A2dB1b genotype, including the Argentine viruses here sequenced. Whether or not these larger VP5 proteins have a cellular expression should be further analysed. Moreover, all the Argentine A2dB1b viruses display one substitution in VP1 (E72D) undetected in any database sequence (Table S2). Therefore, it acts as an amino acid marker for the circulating A2dB1b viruses in South America. The biological implications of these amino acid markers remain unknown. Other amino acid residues occurred in some Argentine viruses analysed (Figure 2, online supplementary Tables S1 and S2). Among them, noteworthy changes included T222A, A321T, and A321V in the hvVP2 (Figure 2). These changes have previously been associated with variations in the antigenicity and pathogenicity of IBDV (Letzel *et al.*, 2007; Jackwood & Sommer-Wagner, 2011; Escaffre *et al.*, 2013; Samy *et al.*, 2020). The substitutions in these crucial residues may indicate that the virus is exploring different evolutionary landscapes, likely driven by adaptation to the local environment.

The A2dB1b genotype will likely continue spreading throughout Argentina, possibly reaching other countries in South America. A similar pattern was previously observed for the A4B1 genotype, where two independent spread events from Argentina to Uruguay were demonstrated (Tomás *et al.*, 2020). Implementing specific surveillance programmes for early detection of the A2dB1b genotype is advisable in all South American countries. An RT-qPCR system for the detection of A2dB1b strains was already designed, offering a rapid and cost-effective alternative for surveillance, especially in large sample numbers (Wang *et al.*, 2023). It is particularly relevant to closely monitor the possible arrival of this genotype in Brazil, as it could significantly impact the country, given its status as one of the world's major poultry producers (United States Department of Agriculture, 2024).

In conclusion, we identified the presence and spreading of the A2dB1b genotype in Argentina. The comprehensive analysis of both genome segments revealed low genetic divergence within the Argentine viruses, suggesting that this genotype arrived as part of a recent invasion event from China. Due to the specific amino-acidic characteristics of these viruses, the effectiveness of the currently administered

vaccines in Argentina is questioned, and their evaluation is strongly recommended. The epidemiological scenario in Argentina, and probably other South American countries, will likely undergo a progressive change in the following years with the introduction of this IBDV genotype. The continuous surveillance of field samples and preparedness for the specific control of A2dB1b are deemed essential to minimize its consequences.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

Alexander, D.J. & Chettle, N.J. (1998). Heat inactivation of serotype 1 infectious bursal disease virus. *Avian Pathology*, 27, 97–99.

Aliyu, H.B., Hair-Bejo, M., Omar, A.R. & Ideris, A. (2021). Genetic diversity of recent infectious bursal disease viruses isolated from vaccinated poultry flocks in Malaysia. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 1–17.

Allan, W.H., Faragher, J.T. & Cullen, G.A. (1972). Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunised against Newcastle disease. *The Veterinary Record*, 90, 511–512.

Broadbent, A., Reddy, V., Egana-Labrin, S. & Nazki, S. (2023). Antigenic cartography analysis of chimeric recombinant IBDV strains can be used to identify hypervariable region sequences that induce broadly cross-neutralizing antibody responses against diverse strains. In *Proceedings of the 2023 AAAP Annual Meeting* (p. 137). Jacksonville, United States.

Chettle, N., Stuart, J.C. & Wyeth, P.J. (1989). Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *The Veterinary Record*, 125, 271–272.

Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J.-C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H. & Delmas, B. (2002). The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *Journal of Virology*, 76, 2393–2402.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. (2012). Jmodeltest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.

Escaffre, O., Le Nouën, C., Amelot, M., Ambroggio, X., Ogden, K.M., Guionie, O., Toquin, D., Müller, H., Islam, M.R. & Eterradossi, N. (2013). Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, 87, 2767–2780.

Fan, L., Wang, Y., Jiang, N., Gao, Y., Niu, X., Zhang, W., Huang, M., Bao, K., Liu, A., Wang, S., Gao, L., Li, K., Cui, H., Pan, Q., Liu, C., Zhang, Y., Wang, X. & Qi, X. (2022). Residues 318 and 323 in capsid protein are involved in immune circumvention of the atypical epizootic infection of infectious bursal disease virus. *Frontiers in Microbiology*, 13, 909252.

Fan, L., Wu, T., Wang, Y., Hussain, A., Jiang, N., Gao, L., Li, K., Gao, Y., Liu, C., Cui, H., Pan, Q., Zhang, Y., Wang, X. & Qi, X. (2020). Novel variants of infectious bursal disease virus can severely damage the bursa of Fabricius of immunized chickens. *Veterinary Microbiology*, 240, 108507.

Faragher, J.T., Allan, W.H. & Wyeth, P.J. (1974). Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease. *The Veterinary Record*, 95, 385–388.

Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59, 307–321.

Guindon, S. & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696–704.

Heine, H.-G., Haritou, M., Failla, P., Fahey, K. & Azad, A. (1991). Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains. *Journal of General Virology*, 72, 1835–1843.

Hernández, M., Banda, A., Hernández, D., Panzera, F. & Pérez, R. (2006). Detection of very virulent strains of infectious bursal disease virus (vvIBDV) in commercial broilers from Uruguay. *Avian Diseases*, 50, 624–631.

Hernández, M., Tomás, G., Marandino, A., Iraola, G., Maya, L., Mattion, N., Hernández, D., Villegas, P., Banda, A., Panzera, Y. & Pérez, R. (2015). Genetic characterization of South American infectious bursal disease virus reveals the existence of a distinct worldwide-spread genetic lineage. *Avian Pathology*, 44, 212–221.

Islam, M.R., Nooruzzaman, M., Rahman, T., Mumu, T.T., Rahman, M.M., Chowdhury, E.H., Eterradossi, N. & Müller, H. (2021). A unified genotypic classification of infectious bursal disease virus based on both genome segments. *Avian Pathology*, 50, 190–206.

Ismail, N.M., Saif, Y.M. & Moorhead, P.D. (1988). Lack of pathogenicity of five serotype 2 infectious bursal disease viruses in chickens. *Avian Diseases*, 32, 757–759.

Jackwood, D.J., Saif, Y.M., Moorhead, P.D. & Bishop, G. (1984). Failure of two serotype II infectious bursal disease viruses to affect the humoral immune response of turkeys. *Avian Diseases*, 28, 100–116.

Jackwood, D.J. & Sommer-Wagner, S.E. (2011). Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease Birnavirus (IBDV). *Virology*, 409, 33–37.

Jaton, J., Lozano, L.C., Gambini, P., Ponti, M., Gómez, E., König, G.A. & Zoth, S.C. (2024). Characterization and phylodynamic analysis of new infectious bursal disease virus variants circulating in Argentina. *Poultry Science*, 103, 103623.

Katoh, K. & Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 772–780.

Legnardi, M., Franzo, G., Tucciarone, C.M., Koutoulis, K. & Cecchinato, M. (2023). Infectious bursal disease virus in Western Europe: the rise of reassortant strains as the dominant field threat. *Avian Pathology*, 52, 25–35.

Legnardi, M., Franzo, G., Tucciarone, C.M., Koutoulis, K., Duarte, I., Silva, M., Le Tallec, B. & Cecchinato, M. (2022). Detection and molecular characterization of a new genotype of infectious bursal disease virus in Portugal. *Avian Pathology*, 51, 97–105.

Legnardi, M., Poletto, F., Talaat, S., Selim, K., Moawad, M.K., Franzo, G., Tucciarone, C.M., Cecchinato, M. & Sultan, H. (2023). First detection and molecular characterization of novel variant infectious bursal disease virus (genotype A2dB1b) in Egypt. *Viruses*, 15, 1–14.

Lejal, N., Costa, B.D., Huet, J.C., Delmas, B. & Da Costa, B. (2000). Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease

activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *Journal of General Virology*, 81, 983–992.

Letunic, I. & Bork, P. (2016). Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research*, 44, W242–W245.

Letzel, T., Coulibaly, F., Rey, F.A., Delmas, B., Jagt, E., van Loon, A.A.M.W. & Mundt, E. (2007). Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, 81, 12827–12835.

Li, G., Kuang, H., Guo, H., Cai, L., Chu, D., Wang, X., Hu, J. & Rong, J. (2020). Development of a recombinant VP2 vaccine for the prevention of novel variant strains of infectious bursal disease virus. *Avian Pathology*, 49, 557–571.

Luque, D., Saugar, I., Rejas, M.T., Carrascosa, J.L., Rodríguez, J.F. & Castón, J.R. (2009). Infectious bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. *Journal of Molecular Biology*, 386, 891–901.

Mandeville, W.F., Cook, F.K. & Jackwood, D.J. (2000). Heat lability of five strains of infectious bursal disease virus. *Poultry Science*, 79, 838–842.

Martin, D.P., Varsani, A., Roumagnac, P., Botha, G., Maslamoney, S., Schwab, T., Kelz, Z., Kumar, V. & Murrell, B. (2021). RDP5: a computer program for analyzing recombination in, and removing signals of recombination from, nucleotide sequence datasets. *Virus Evolution*, 7, 87.

McFerran, J.B., McNulty, M.S., McKillop, E.R., Connor, T.J., McCracken, R.M., Collins, D.S. & Allan, G.M. (1980). Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. *Avian Pathology*, 9, 395–404.

Michel, L.O. & Jackwood, D.J. (2017). Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Archives of Virology*, 162, 3661–3670.

Mundt, E., Beyer, J. & Müller, H. (1995). Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *Journal of General Virology*, 76, 437–443.

Myint, O., Suwanruengsri, M., Araki, K., Izzati, U.Z., Pornthummawat, A., Nueangphuet, P., Fuke, N., Hirai, T., Jackwood, D.J. & Yamaguchi, R. (2021). Bursa atrophy at 28 days old caused by variant infectious bursal disease virus has a negative economic impact on broiler farms in Japan. *Avian Pathology*, 50, 6–17.

Petek, M., D'Aprile, P.N. & Cancellotti, F. (1973). Biological and physico-chemical properties of the infectious bursal disease virus (IBDV). *Avian Pathology*, 2, 135–152.

Pikuła, A., Śmietanka, K. & Perez, L.J. (2020). Emergence and expansion of novel pathogenic reassortant strains of infectious bursal disease virus causing acute outbreaks of the disease in Europe. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67, 1739–1744.

Remorini, P., Calderón, M.G., Aguirre, S., Periolo, O., La Torre, J. & Mattion, N. (2006). Characterization of infectious bursal disease viruses from Argentina. *Avian Diseases*, 50, 245–251.

Rosenberger, J.K. & Cloud, S.S. (1985). Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189, 357.

Rosenberger, J.K. & Gelb, J. (1978). Response to several avian respiratory viruses as affected by infectious bursal disease virus. *Avian Diseases*, 22, 95–105.

Samy, A., Courtillon, C., Briand, F.X., Khalifa, M., Selim, A., Arafa, A.E.S., Hegazy, A., Eterradossi, N. & Soubies, S.M. (2020). Continuous circulation of an antigenically modified very virulent infectious bursal disease virus for fifteen years in Egypt. *Infection, Genetics and Evolution*, 78, 104099.

Sánchez, A.B. & Rodriguez, J.F. (1999). Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*, 262, 190–199.

Spies, U., Müller, H. & Becht, H. (1987). Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Research*, 8, 127–140.

Techera, C., Tomás, G., Grecco, S., Williman, J., Hernández, M., Olivera, V., Banda, A., Vagnozzi, A., Panzera, Y., Marandino, A. & Pérez, R. (2023). A rapid and affordable amplicon-based method for next-generation genome sequencing of the infectious bursal disease virus. *Journal of Virological Methods*, 322, 114807.

Thai, T.N., Yoo, D.S., Jang, I., Kwon, Y.K. & Kim, H.R. (2022). Dynamics of the emerging genogroup of infectious bursal disease virus infection in broiler farms in South Korea: a nationwide study. *Viruses*, 14, 1604.

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

Tulu, D. (2019). Epidemiology, status and economic importance of infectious bursal disease in poultry production, Ethiopia. *Epidemiology International Journal*, 3, 1–13.

United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service. (2024). Livestock and Poultry: World Markets and Trade. (p. 15).

Vera, F., Craig, M.I., Olivera, V., Rojas, F., König, G., Pereda, A. & Vagnozzi, A. (2015). Molecular characterization of infectious bursal disease virus (IBDV) isolated in Argentina indicates a regional lineage. *Archives of Virology*, 160, 1909–1921.

Wang, C., Hou, B., Shao, G. & Wan, C. (2023). Development of a one-step real-time TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for the detection of the novel variant infectious bursal disease virus (nVarIBDV) circulating in China. *Viruses*, 15, 1–13.

Wang, W., He, X., Zhang, Y., Qiao, Y., Shi, J., Chen, R., Chen, J., Xiang, Y., Wang, Z., Chen, G., Huang, J., Huang, T., Wei, T., Mo, M. & Wei, P. (2022). Analysis of the global origin, evolution and transmission dynamics of the emerging novel variant IBDV (A2dB1b): the accumulation of critical aa-residue mutations and commercial trade contributes to the emergence and transmission of novel variants. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69, e2832–e2851.

Wang, W., Huang, Y., Zhang, Y., Qiao, Y., Deng, Q., Chen, R., Chen, J., Huang, T., Wei, T., Mo, M., He, X. & Wei, P. (2022). The emerging naturally reassortant strain of IBDV (genotype A2dB3) having segment A from Chinese novel variant strain and segment B from HLJ

0504-like very virulent strain showed enhanced pathogenicity to three-yellow chickens. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69, e566–e579.

Wang, Y.L., Fan, L.J., Jiang, N., Gao, L., Li, K., Gao, Y.L., Liu, C.J., Cui, H.Y., Pan, Q., Zhang, Y.P., Wang, X.M. & Qi, X.L. (2021). An improved scheme for infectious bursal disease virus genotype classification based on both genome-segments A and B. *Journal of Integrative Agriculture*, 20, 1372–1381.

Zachar, T., Popowich, S., Goodhope, B., Knezacek, T., Ojkic, D., Willson, P., Ahmed, K.A. & Gomis, S. (2016). A 5-year study of the incidence and economic impact of variant infectious bursal disease viruses on broiler production in Saskatchewan, Canada. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 80, 255–261.

Zhang, W., Wang, X., Gao, Y. & Qi, X. (2022). The over-40-years-epidemic of infectious bursal disease virus in China. *Viruses*, 14, 2253.

AVIAN DISEASES 65:456–462, 2021

Research Note—

Evaluation of the Efficiency of Commercial Vaccines Against Infectious Bronchitis Virus (IBV) Belonging to the GI-16 Lineage Isolated in an Argentinean Outbreak

Rocio Gerez,[AB] Ana Marandino,[C] Gonzalo Tomas,[C] Valeria Olivera,[A] Silvina Pinto,[D] Maria Isabel Craig,[A] Claudia Techera,[C] Ruben Perez,[C] and Ariel Vagnozzi[AE]

[A]Instituto de Virología, CICVyA, INTA, Hurlingham, Buenos Aires 1686, Argentina
[B]Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ciudad Autonoma de Buenos Aires 1425, Argentina
[C]Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay
[D]Area Patología Básica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Av San Martin 5285, Ciudad Autonoma de Buenos Aires 1217, Argentina

Received 17 June 2021; Accepted 21 June 2021; Published ahead of print 26 August 2021

SUMMARY. In this study we evaluated the effectiveness of adding serotype 793B vaccine to an immunization program in order to control the infectious bronchitis virus (IBV) GI-16 lineage. Therefore, two different experiments were performed. First, a virus cross-neutralization test was carried out, which indicated that neither the Massachusetts (Mass) nor 793B serotypes are antigenically related to the field isolate A13 (GI-16). We also performed a challenge trial to evaluate if the Mass/793B combination is more efficient than Mass/Connecticut (Conn) to protect chickens against the Argentinian variant A13. Thus, 40 chickens were organized in four groups. Chickens in Group A were vaccinated at 1 day of age with Mass serotype and then at 14 days old with Mass plus Conn serotypes. Chickens in Group B received Mass and 793B serotypes at 1 and 14 days old, respectively. Groups C and D remained unvaccinated. At 28 days of age, Groups A, B, and C were challenged with the A13 isolate, while Group D remained as the negative control. The statistical analysis of the ciliostasis evaluation, performed at 7 days postchallenge (dpch), indicated that the difference between Mass/793B and Mass/Conn was not significant ($p > 0.05$). However, the comparison against the negative control showed that only Group A was significantly different, suggesting a slightly better performance on blocking ciliostasis for the Mass/793B combination. On the other hand, no significant differences were observed in the viral load, quantified by reverse-transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) in tracheal swabs and kidneys (at 3 and 7 dpch, respectively) between vaccinated groups. Furthermore, some amounts of the viral genome were found in both vaccinated groups that could indicate that neither the Mass/793B nor the Mass/Conn combinations totally inhibited the viral replication. Such viral replication in vaccinated chickens should seriously be taken into consideration because it could promote the selection of new variants in the future.

RESUMEN. *Nota de investigación*—Evaluación de la eficacia de vacunas comerciales contra el virus de la bronquitis infecciosa (IBV) perteneciente al linaje GI-16 aislado durante un brote argentino.

En este estudio se evaluó la efectividad de agregar la vacuna del serotipo 793B a un programa de inmunización para controlar al virus de la bronquitis infecciosa (con las siglas en inglés IBV) linaje GI-16. Por tanto, se realizaron dos experimentos diferentes. Primeramente, se llevó a cabo una prueba de neutralización cruzada de virus, que indicó que ni los serotipos Massachusetts (Mass) ni 793B están antigénicamente relacionados con el aislado de campo A13 (GI-16). También se realizó una prueba de desafío para evaluar si la combinación Massachussets/793B era más eficiente que Massachussets/Connecticut (Conn) para proteger a los pollos contra la variante argentina A13. De esta forma, 40 pollos se organizaron en cuatro grupos. Los pollos del Grupo A se vacunaron al día de edad con el serotipo Massachussets y luego a los 14 días con los serotipos Massachussets más Connecticut. Los pollos del Grupo B recibieron los serotipos Massachussets y 793B a los 1 y 14 días de edad, respectivamente. Los grupos C y D permanecieron sin vacunar. A los 28 días de edad, los Grupos A, B y C fueron desafiados con el aislado A13, mientras que el Grupo D permaneció como control negativo. El análisis estadístico de la evaluación de la ciliostasis, realizada a los 7 días después del desafío (dpch), indicó que la diferencia entre el tratamiento Massachussets/793B y Massachussets/Connecticut no fue significativa ($P > 0.05$). Sin embargo, la comparación con el control negativo mostró que solo el Grupo A fue significativamente diferente, lo que sugiere un desempeño ligeramente mejor en el bloqueo de la ciliostasis para la combinación Massachussets/793B. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la carga viral, cuantificada mediante transcripción reversa y PCR cuantitativa en tiempo real de hisopos traqueales y riñones (a 3 y 7 días después del desafío, respectivamente) entre los grupos vacunados. Además, se encontraron algunas cantidades del genoma viral en ambos grupos vacunados que podrían indicar que ni las combinaciones Massachussets/793B ni Massachussets/Connecticut inhibieron totalmente la replicación viral. Esta replicación viral en pollos vacunados debe tenerse muy en cuenta porque podría promover la selección de nuevas variantes en el futuro.

[E]Corresponding author. E-mail: vagnozzi.ariel@inta.gob.ar
The authors declare no potential conflict of interest.

Downloaded From: https://bioone.org/journals/Avian-Diseases on 07 Feb 2023
Terms of Use: https://bioone.org/terms-of-use Access provided by Universidad de la Republica

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Microbiology Resource Announcements

GENOME SEQUENCES

Genome Sequences of SARS-CoV-2 P.1 (Variant of Concern) and P.2 (Variant of Interest) Identified in Uruguay

Yanina Panzera,[a] Natalia Goñi,[b] Lucía Calleros,[a] Natalia Ramos,[c] Sandra Frabasile,[c] Ana Marandino,[a] Gonzalo Tomás,[a] Claudia Techera,[a] Sofía Grecco,[a] Eddie Fuques,[a] Viviana Ramas,[b] Leticia Coppola,[b] María Rosa Flieller,[b] Noelia Morel,[b] María Noel Cortinas,[b] Cristina Mogdasy,[b] Juan Arbiza,[c] Adriana Delfraro,[c] Ruben Pérez,[a] Héctor Chiparelli[b]

[a]Sección Genética Evolutiva, Departamento de Biología Animal, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
[b]Centro Nacional de Referencia de Influenza y otros Virus Respiratorios, Departamento de Laboratorios de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública, Montevideo, Uruguay
[c]Sección Virología, Instituto de Biología e Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

ABSTRACT Two severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) variants associated with increased transmission and immune evasion, P.1 and P.2, emerged in Brazil and spread throughout South America. Here, we report genomes corresponding to these variants that were recently detected in Uruguay. These P.1 and P.2 genomes share all substitutions that are characteristic of these variants.

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is a novel member of the genus *Betacoronavirus* (family *Coronaviridae*) and the causative agent of the ongoing coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic (1). The analysis of the SARS-CoV-2 RNA genome has been crucial for understanding its origin and spread and for controlling the virus. The high evolutionary rate of SARS-CoV-2, usual for an RNA virus, has led to a number of mutations that appear to impact virus fitness (2). Genetic variants of SARS-CoV-2 can be classified into variants of concern (VOCs) and variants of interest (VOIs) (3). VOCs have been associated with an increased transmissibility and reduction in neutralization by natural or vaccine-derived antibodies and may cause more severe symptoms. VOCs share the N501Y change in the receptor binding domain (amino acids 319 to 541) of the spike glycoprotein (S) that provides a higher affinity toward the ACE2 host receptor (4, 5). These VOCs or lineages were originally detected in the United Kingdom (B.1.1.7), South Africa (B.1.351), and Brazil (B.1.1.28.1 or P.1). The VOIs have specific genetic markers (i.e., E484K) that might affect infectivity and immune response (6), and they comprise the B.1.536 and B.1.525 variants from New York and B.1.1.28.2 (P.2) from Brazil.

The research described in this study was performed in adherence to the Declaration of Helsinki; no specific authorization was required, because the activities were conducted as part of a routine virological surveillance (anonymously, without identification of patients) by the Uruguayan official Institution for Surveillance of Influenza and Other Respiratory Viruses of the Ministry of Public Health (DLSP-MSP).

The variants P.1 and P.2, which emerged in Brazil, have spread to other parts of South America (7, 8). Here, we describe the genomes of SARS-CoV-2 variants P.1 (SARS-CoV-2/human/URY/374/2021) and P.2 (SARS-CoV-2/human/URY/380/2021) detected in Uruguay.

Nasopharyngeal swab samples were collected in March 2021 in the Uruguayan Rivera department bordering Brazil and came from two symptomatic cases. The samples tested positive for SARS-CoV-2 using a standard quantitative PCR (qPCR) procedure (9); both patients had a threshold cycle (C_T) value of <18. RNA was extracted with a QIAmp viral minikit (Qiagen, USA). Genome amplification was achieved using ARTIC 3 primers (https://artic.network/ncov-2019). First, cDNA strand analysis, Nextera DNA

Citation Panzera Y, Goñi N, Calleros L, Ramos N, Frabasile S, Marandino A, Tomás G, Techera C, Grecco S, Fuques E, Ramas V, Coppola L, Flieller MR, Morel N, Cortinas MN, Mogdasy C, Arbiza J, Delfraro A, Pérez R, Chiparelli H. 2021. Genome sequences of SARS-CoV-2 P.1 (variant of concern) and P.2 (variant of interest) identified in Uruguay. Microbiol Resour Announc 10:e00410-21. https://doi.org/10.1128/MRA.00410-21.

Editor Simon Roux, DOE Joint Genome Institute

Copyright © 2021 Panzera et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Ruben Pérez, rperez@fcien.edu.uy, or Héctor Chiparelli, hchiparelli@msp.gub.uy.

Received 22 April 2021
Accepted 3 May 2021
Published 27 May 2021

Received: 8 December 2020 | Revised: 15 January 2021 | Accepted: 21 January 2021

DOI: 10.1111/tbed.14002

RAPID COMMUNICATION

Transboundary and Emerging Diseases WILEY

A deletion in SARS-CoV-2 ORF7 identified in COVID-19 outbreak in Uruguay

Yanina Panzera[1] | Natalia Ramos[2] | Sandra Frabasile[2] | Lucía Calleros[1] | Ana Marandino[1] | Gonzalo Tomás[1] | Claudia Techera[1] | Sofía Grecco[1] | Eddie Fuques[1] | Natalia Goñi[3] | Viviana Ramas[3] | Leticia Coppola[3] | Héctor Chiparelli[3] | Cecilia Sorhouet[4] | Cristina Mogdasy[3] | Juan Arbiza[2] | Adriana Delfraro[2] | Ruben Pérez[1]

[1]Sección Genética Evolutiva, Departamento de Biología Animal, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

[2]Sección Virología. Instituto de Biología e Instituto de Química Biológica. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

[3]Departamento de Laboratorios de Salud Pública. Ministerio de Salud Pública, Centro Nacional de Referencia de Influenza y otros Virus Respiratorios, Montevideo, Uruguay

[4]Laboratorio de Biología Molecular, Mutualista Médica Uruguaya, Montevideo, Uruguay

Correspondence
Ruben Pérez, Sección Genética Evolutiva, Departamento de Biología Animal, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay.
Email: rperez@fcien.edu.uy

Adriana Delfraro, Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
Email: adriana@fcien.edu.uy

Funding information
Facultad de Ciencias and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Fundación Manuel Pérez, UdelaR.

[Correction added on 4 May 2021, after first online publication: Adriana Delfraro was added as co-corresponding author]

Abstract

The analysis of genetic diversity in SARS-CoV-2 is the focus of several studies, providing insights into how the virus emerged and evolves. Most common changes in SARS-CoV-2 are single or point nucleotide substitutions; meanwhile, insertions and deletions (indels) have been identified as a less frequent source of viral genetic variability. Here, we report the emergence of a 12-nucleotide deletion in ORF7a, resulting in a 4-amino acid in-frame deletion. The Δ12 variant was identified in viruses from patients of a single outbreak and represents the first report of this deletion in South American isolates. Phylogenetic analysis revealed that Δ12 strains belong to the lineage B.1.1 and clustered separated from the remaining Uruguayan strains. The Δ12 variant was detected in 14 patients of this outbreak by NGS sequencing and/or two rapid and economic methodologies: Sanger amplicon sequencing and capillary electrophoresis. The presence of strong molecular markers as the deletion described here are useful for tracking outbreaks and reveal a significant aspect of the SARS-CoV-2 evolution on the robustness of the virus to keep its functionality regardless loss of genetic material.

1 | INTRODUCTION

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is responsible for the global pandemic of coronavirus disease 2019 (COVID-19), the most serious threat to human health in the 21st century with a huge social and economic impact worldwide. SARS-CoV-2 (order Nidovirales, family *Coronaviridae*) is an enveloped, positive-sense single-stranded RNA virus with the largest known RNA genome (~ 30 kb) (Gorbalenya et al., 2006). SARS-CoV-2 exhibits a significant genetic diversity (Khailany et al., 2020) which is

Yanina Panzera and Natalia Ramos contributed equally to this work.

 © 2021 Wiley-VCH GmbH

AVIAN PATHOLOGY
2021, VOL. 50, NO. 4, 311–320
https://doi.org/10.1080/03079457.2021.1919289

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ORIGINAL ARTICLE

Check for updates

Origin, spreading and genetic variability of chicken anaemia virus

Claudia Techera, Ana Marandino, Gonzalo Tomás, Sofía Grecco, Martín Hernández, Diego Hernández, Yanina Panzera and Ruben Pérez

Sección Genética Evolutiva, Departamento de Biología Animal, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República Montevideo, Uruguay

ABSTRACT

Chicken anaemia virus (CAV) is a widespread pathogen that causes immunosuppression in chickens. The virus-induced immunosuppression often results in secondary infections and a sub-optimal response to vaccinations, leading to high mortality rates and significant economic losses in the poultry industry. The small circular ssDNA genome (2.3 kb) has three partially overlapping genes: vp1, vp2 and vp3. VP1 capsid protein is highly variable and contains the neutralizing epitopes. Here, we analysed CAV strains from Uruguay using the full-length vp1 gene and performed a global comparative analysis to provide new evidence about the origin, dispersion and genetic variability of the virus. The phylogenetic analysis classified CAV in three or four major clades. Two clades (II and III) grouped most of the strains circulating worldwide including the Uruguayan strains. The phylodynamic analyses indicated that CAV emerged in the early 1900s and diverged to originate clade II and III. This early period of viral emergence was characterised by local diversification promoted by the extremely high substitution rate inferred for the virus (3.8×10^{-4} substitutions/site/year). Later, the virus underwent a global spreading by intra- and inter-continental migrations that correlates with a significant rise in the effective population size. In South America, CAV was introduced in three different migratory events and spread across the continent. Our findings suggest that the current CAV distribution is the consequence of its continuous expansion capability that homogenizes the populations and prevents the detection of clear temporal and geographic patterns of evolution in most strains.

RESEARCH HIGHLIGHTS

- Current strains of chicken anaemia virus emerged in Asia in the early 1900s.
- Chicken anaemia virus has a high substitution rate.
- The phylogenetic analysis classified chicken anaemia virus in four major clades.
- Evolution in South America was characterized by long migration and local spreading.

ARTICLE HISTORY
Received 14 December 2020
Accepted 14 April 2021

KEYWORDS
Chicken anaemia virus; phylogenetic; phylodynamic; evolution

Introduction

Intensive poultry rearing brings large numbers of birds into close contact with one another, providing a favourable context for increasing infectious disease transmission and emergence of new pathogen variants (Gilbert *et al.*, 2017). Immunosuppressive viruses are among the most relevant infectious agents because they are ubiquitous, persistent, and possess a remarkable evolutionary plasticity to adapt to changing environments. One of the most relevant viral immunosuppressive agents is infectious chicken anaemia virus. This virus causes high mortality and economic losses by increasing the susceptibility to secondary infections and by causing sub-optimal response to vaccinations (Schat, 2009; Zhang *et al.*, 2017).

Chicken anaemia virus (CAV) is transmitted either vertically or horizontally and infects birds of all ages. The clinical manifestations of very early CAV infections usually start around 2 weeks of age; infected birds usually show clinical signs such as paleness, depression and decreased weight gain (Schat & Santen, 2020). The subclinical form of the disease occurs in older birds, once maternal antibodies against CAV have decreased (3–4 weeks old).

CAV replicates in the stem cells of the bone marrow and in lymphoblasts or immature lymphocytes in the thymus (Adair, 2000; Miller & Schat, 2004). The destruction of the stem cells in the bone marrow, which is evident after 8 days of infection, produces anaemia, haemorrhages, and secondary bacterial infections due to a decrease in the innate immune response (Engström & Luthman, 1984). Depletion of lymphocytes results in immunosuppression and increased susceptibility to various viral and bacterial pathogens (Adair, 2000). In addition, the immune

CONTACT Ruben Pérez rperez@fcien.edu.uy
Supplemental data for this article can be accessed https://doi.org/10.1080/03079457.2021.1919289.
© 2021 Houghton Trust Ltd

viruses

MDPI

Article

Origin of New Lineages by Recombination and Mutation in Avian Infectious Bronchitis Virus from South America

Ana Marandino [1,*], Ariel Vagnozzi [2], Gonzalo Tomás [1], Claudia Techera [1], Rocío Gerez [2], Martín Hernández [1], Joaquín Williman [1], Mauricio Realpe [3], Gonzalo Greif [4], Yanina Panzera [1] and Ruben Pérez [1,*]

1 Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay
2 Instituto de Virología, CICVyA, INTA-Castelar, Castelar 1712, Buenos Aires, Argentina
3 Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Jalisco 44214, Mexico
4 Unidad de Biología Molecular, Instituto Pasteur de Montevideo, Montevideo 11400, Uruguay
* Correspondence: amarandino@fcien.edu.uy (A.M.); rperez@fcien.edu.uy (R.P.); Tel.: +598-25258619 (A.M. & R.P.)

Abstract: The gammacoronavirus avian infectious bronchitis virus (IBV) is a highly contagious respiratory pathogen of primary economic importance to the global poultry industry. Two IBV lineages (GI-11 and GI-16) have been widely circulating for decades in South America. GI-11 is endemic to South America, and the GI-16 is globally distributed. We obtained full-length IBV genomes from Argentine and Uruguayan farms using Illumina sequencing. Genomes of the GI-11 and GI-16 lineages from Argentina and Uruguay differ in part of the spike coding region. The remaining genome regions are similar to the Chinese and Italian strains of the GI-16 lineage that emerged in Asia or Europe in the 1970s. Our findings support that the indigenous GI-11 strains recombine extensively with the invasive GI-16 strains. During the recombination process, GI-11 acquired most of the sequences of the GI-16, retaining the original S1 sequence. GI-11 strains with recombinant genomes are circulating forms that underwent further local evolution. The current IBV scenario in South America includes the GI-16 lineage, recombinant GI-11 strains sharing high similarity with GI-16 outside S1, and Brazilian GI-11 strains with a divergent genomic background. There is also sporadic recombinant in the GI-11 and GI-16 lineages among vaccine and field strains. Our findings exemplified the ability of IBV to generate emergent lineage by using the S gene in different genomic backgrounds. This unique example of recombinational microevolution underscores the genomic plasticity of IBV in South America.

Keywords: infectious bronchitis virus; genomic evolution; lineage; South America; recombination

check for updates

Citation: Marandino, A.; Vagnozzi, A.; Tomás, G.; Techera, C.; Gerez, R.; Hernández, M.; Williman, J.; Realpe, M.; Greif, G.; Panzera, Y.; et al. Origin of New Lineages by Recombination and Mutation in Avian Infectious Bronchitis Virus from South America. *Viruses* **2022**, *14*, 2095. https://doi.org/10.3390/v14102095

Academic Editors: Shengwang Liu, Huixin Li and Xin Zhang

Received: 27 July 2022
Accepted: 11 September 2022
Published: 21 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Coronavirus (order *Nidovirales*, family *Coronaviridae*) are enveloped, positive-sense single-stranded RNA viruses with the largest genome (26–32 kb) of all known RNA viruses so far [1]. Some species are pathogens of high sanitary relevance and produce enzootic respiratory and enteric infections in birds and mammals, including severe acute respiratory syndrome (SARS), Middle East respiratory syndrome (MERS), 2019 coronavirus disease (COVID-19) in humans, transmissible gastroenteritis (TGE) in pigs, and feline infectious peritonitis (FIP) in cats [2]. This current scenario has increased the interest in studying the rapid adaptation to new hosts and ecological niches in the Coronaviridae, characteristics associated with the viral ability to recombine and mutate at high rates [3–5].

Four genera of coronavirus are clearly characterized, namely, Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Deltacoronavirus, and Gammacoronavirus [1]. Evolutionary analyses have shown that mammals are associated with most Alpha and Betacoronavirus, while birds are the primary target of Delta and Gammacoronavirus.

Research Note: High genetic diversity of infectious bronchitis virus from Mexico

Lizbeth Mendoza-González,* Ana Marandino,† Yanina Panzera,† Gonzalo Tomás,† Joaquín Williman,† Claudia Techera,† Amanda Gayosso-Vázquez ,‡ Vianey Ramírez-Andoney,‡ Rogelio Alonso-Morales ,‡ Mauricio Realpe-Quintero,* and Ruben Pérez †,1

*Animal Science Research Laboratory, Department of Veterinary Medicine, University of Guadalajara, Jalisco, Mexico; †Evolutionary Genetic Section, Biology Institute, Faculty of Sciences, University of the Republic, 11400, Montevideo, Uruguay; and ‡Department of Genetic and Biostatistics, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, National Autonomous University of Mexico, Mexico City 04510, Mexico

ABSTRACT The avian infectious bronchitis virus (**IBV**) is a highly mutable coronavirus that causes an acute and highly contagious disease responsible for economic losses to the poultry industry worldwide. Preventing and controlling bronchitis disease is difficulted by the numerous IBV circulating types with limited antigenic cross-protection that hamper the prevention and control by heterologous vaccines. The coding region of the variable spike S1 receptor-attachment domain is used to classify IBV in 7 genotypes (GI−GVII) comprising 35 viral lineages (1−35). Knowledge of the circulating IBV types causing outbreaks in a specific geographic region is beneficial to select better the appropriate vaccine(s) and contribute to disease control. In the study, 17 avian infectious bronchitis virus strains were obtained from chickens showing signs of illness in Mexico from 2007 to 2021. We detected 4 lineages within genotype I, three already known (GI-3, GI-9, GI-13) and one newly described (GI-30). In addition, we identified 2 divergent monophyletic groups that are tentatively described as lineages of new genotypes (GVIII-1 and GIX-1). Our findings revealed that Mexico's high genetic IBV diversity results from the co-circulation of divergent lineages belonging to different genotypes. Mexican IBV lineages differ significantly from Massachusetts and Connecticut vaccine strains, indicating that the currently used vaccines may need to be updated.

Key words: IBV, Mexico, genetic lineage, respiratory illness, poultry

2022 Poultry Science 101:102076
https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102076

INTRODUCTION

The avian gammacoronavirus Infectious Bronchitis Virus (**IBV**) is the causative agent of an acute and highly contagious disease that affects chickens and poses a major economic burden on the poultry industry (Cavanagh, 2007). The virus can affect the upper respiratory and reproductive tracts, and some strains cause nephritis.

IBV has a single-stranded positive-sense RNA of nearly 27 kb genome surrounded by a lipid envelope. The membrane spike glycoprotein (∼1,145 amino acids), which forms club-shaped projections on the viral surface, is the major inducer of neutralizing and serotype-specific antibodies and is responsible for virus binding and entry to host cells. The precursor S protein is post-translationally cleaved by proteases into 2 non-covalently bound polypeptides (S1 and S2). The amino-terminal S1 (∼535 amino acids) subunit forms the tip of the spike, and the carboxyl-terminal S2 (∼627 amino acids) subunit anchors the S1 into the viral membrane.

The virus has extraordinary genetic variability, promoting pathogen complexity and challenging prevention and control. Variant strains and new genotypes of IBV are continuously emerging worldwide.

IBV has many serotypes, challenging vaccine efficacy due to poor cross-protection. An effective control strategy involves identifying the virus type causing outbreaks, followed by vaccination with a closely-related vaccine strain. However, only a few different kinds of IBV vaccines are available, in contrast with the numerous types and variants of the virus worldwide. Considering the IBV antigenic variability, the characterization of strains based on genotype or serotype is beneficial to elucidating disease epidemiology. The genotype

© 2022 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Received May 19, 2022.
Accepted July 19, 2022.

[1]Corresponding author: rperez@fcien.edu.uy

Gene Reports 29 (2022) 101703

Contents lists available at ScienceDirect

Gene Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/genrep

Emergence and spreading of the largest SARS-CoV-2 deletion in the Delta AY.20 lineage from Uruguay

Yanina Panzera [a], María Noel Cortinas [b], Ana Marandino [a], Lucía Calleros [a], Victoria Bormida [b], Natalia Goñi [c], Claudia Techera [a], Sofía Grecco [a], Joaquín Williman [a], Viviana Ramas [c], Leticia Coppola [c], Cristina Mogdasy [c], Héctor Chiparelli [c], Ruben Pérez [a,*]

[a] *Sección Genética Evolutiva, Departamento de Biología Animal, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay*

[b] *Genómica, Departamento de Laboratorios de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública, Alfredo Navarro 3051 (entrada N), 11600 Montevideo, Uruguay*

[c] *Centro Nacional de Referencia de Influenza y otros Virus Respiratorios, Departamento de Laboratorios de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública, Alfredo Navarro 3051 (entrada N), 11600 Montevideo, Uruguay*

ARTICLE INFO

Edited by: Christine Thien

Keywords:
SARS-CoV-2
Largest deletion
Accessory ORFs
Recombination hotspot

ABSTRACT

The genetic variability of SARS-CoV-2 (genus *Betacoronavirus*, family *Coronaviridae*) has been scrutinized since its first detection in December 2019. Although the role of structural variants, particularly deletions, in virus evolution is little explored, these genome changes are extremely frequent. They are associated with relevant processes, including immune escape and attenuation. Deletions commonly occur in accessory ORFs and might even lead to the complete loss of one or more ORFs. This scenario poses an interesting question about the origin and spreading of extreme structural rearrangements that persist without compromising virus viability. Here, we analyze the genome of SARS-CoV-2 in late 2021 in Uruguay and identify a Delta lineage (AY.20) that experienced a large deletion (872 nucleotides according to the reference Wuhan strain) that removes the 7a, 7b, and 8 ORFs. Deleted viruses coexist with wild-type (without deletion) AY.20 and AY.43 strains. The Uruguayan deletion is like those identified in Delta strains from Poland and Japan but occurs in a different Delta clade. Besides providing proof of the circulation of this large deletion in America, we infer that the 872-deletion arises by the consecutive occurrence of a 6-nucleotide deletion, characteristic of delta strains, and an 866-nucleotide deletion that arose independently in the AY.20 Uruguayan lineage. The largest deletion occurs adjacent to transcription regulatory sequences needed to synthesize the nested set of subgenomic mRNAs that serve as templates for transcription. Our findings support the role of transcription sequences as a hotspot for copy-choice recombination and highlight the remarkable dynamic of SARS-CoV-2 genomes.

1. Introduction

The pandemic coronavirus disease 2019 (COVID-19) is one of the most concerning and challenging global health threats. Massive research has focused on its causative agent, the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (Gorbalenya et al., 2020). Like other coronaviruses, SARS-CoV-2 is an enveloped virus with a positive polarity single-stranded RNA genome of ~30,000 nucleotides with high mutation and recombination rates (Duchene et al., 2020).

The multicistronic SARS-CoV-2 genome is organized in open reading frames (ORFs) that code for structural and non-structural proteins. The largest 1a/1ab ORF constitutes the 5′-proximal two-thirds of the genome and gives rise to the non-structural proteins associated with the replication process. In addition, some ORFs encoding the structural proteins spike, envelope, membrane, and nucleocapsid are found downstream, interspaced with ORFs encoding accessory proteins 3a, 6, 7a, 7b, and 8 (Kim et al., 2020; Pancer et al., 2020). The large 1a/1ab ORF is directly expressed by the replication–transcription complex (RTC) from genomic RNA. Still, other viral proteins' expression is achieved using subgenomic mRNAs produced during replication (Lai and Cavanagh, 1997). Subgenomic mRNAs arise by discontinuous transcription produced by the RTC template switch from the transcription regulatory sequences (TRS),

Abbreviations: Δ, deletion; ORF, open reading frame; RTC, replication–transcription complex; TRS, transcription-regulating sequence; VOC, variants of concern.

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

https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101703
Received 21 September 2022; Received in revised form 24 October 2022; Accepted 26 October 2022
Available online 29 October 2022
2452-0144/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Consecutive deletions in a unique Uruguayan SARS-CoV-2 lineage evidence the genetic variability potential of accessory genes

Yanina Panzera[1☯], Lucía Calleros[1☯], Natalia Goñi[2], Ana Marandino[1], Claudia Techera[1], Sofía Grecco[1], Natalia Ramos[3], Sandra Frabasile[3], Gonzalo Tomás[1], Emma Condon[1], María Noel Cortinas[2], Viviana Ramas[2], Leticia Coppola[2], Cecilia Sorhouet[4], Cristina Mogdasy[2], Héctor Chiparelli[2], Juan Arbiza[3], Adriana Delfraro[3]*, Ruben Pérez[1]*

1 Departamento de Biología Animal, Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, **2** Departamento de Laboratorios de Salud Pública, Centro Nacional de Referencia de Influenza y otros Virus Respiratorios, Ministerio de Salud Pública, Montevideo, Uruguay, **3** Facultad de Ciencias, Sección Virología, Instituto de Biología e Instituto de Química Biológica, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, **4** Laboratorio de Biología Molecular, Mutualista Médica Uruguaya, Montevideo, Uruguay

☯ These authors contributed equally to this work.
* adelfraro@fcien.edu.uy (AD); rperez@fcien.edu.uy (RP)

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Panzera Y, Calleros L, Goñi N, Marandino A, Techera C, Grecco S, et al. (2022) Consecutive deletions in a unique Uruguayan SARS-CoV-2 lineage evidence the genetic variability potential of accessory genes. PLoS ONE 17(2): e0263563. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263563

Editor: Herman Tse, Hong Kong Children's Hospital, HONG KONG

Received: October 8, 2021

Accepted: January 24, 2022

Published: February 17, 2022

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263563

Copyright: © 2022 Panzera et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Yes - all data are fully available without restriction Viral sequences were deposited in the GenBank with the accession

Abstract

Deletions frequently occur in the six accessory genes of SARS-CoV-2, but most genomes with deletions are sporadic and have limited spreading capability. Here, we analyze deletions in the ORF7a of the N.7 lineage, a unique Uruguayan clade from the Brazilian B.1.1.33 lineage. Thirteen samples collected during the early SARS-CoV-2 wave in Uruguay had deletions in the ORF7a. Complete genomes were obtained by Illumina next-generation sequencing, and deletions were confirmed by Sanger sequencing and capillary electrophoresis. The N.7 lineage includes several individuals with a 12-nucleotide deletion that removes four amino acids of the ORF7a. Notably, four individuals underwent an additional 68-nucleotide novel deletion that locates 44 nucleotides downstream in the terminal region of the same ORF7a. The simultaneous occurrence of the 12 and 68-nucleotide deletions fuses the ORF7a and ORF7b, two contiguous accessory genes that encode transmembrane proteins with immune-modulation activity. The fused ORF retains the signal peptide and the complete Ig-like fold of the 7a protein and the transmembrane domain of the 7b protein, suggesting that the fused protein plays similar functions to original proteins in a single format. Our findings evidence the remarkable dynamics of SARS-CoV-2 and the possibility that single and consecutive deletions occur in accessory genes and promote changes in the genomic organization that help the virus explore genetic variations and select for new, higher fit changes.

Transmission cluster of COVID-19 cases from Uruguay: emergence and spreading of a novel SARS-CoV-2 ORF6 deletion

Yanina Panzera[1], Natalia Ramos[2], Lucía Calleros[1], Ana Marandino[1], Gonzalo Tomás[1], Claudia Techera[1], Sofía Grecco[1], Sandra Frabasile[2], Eddie Fuques[1], Leticia Coppola[3], Natalia Goñi[3], Viviana Ramas[3], Cecilia Sorhouet[3], Victoria Bormida[3], Analía Burgueño[3], María Brasesco[3], Maria Rosa Garland[3], Sylvia Molinari[3], Maria Teresa Perez[3], Rosina Somma[3], Silvana Somma[3], Maria Noelia Morel[3], Cristina Mogdasy[3], Héctor Chiparelli[3], Juan Arbiza[2], Adriana Delfraro[2]/+, Ruben Pérez[1]/+

[1]Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Instituto de Biología, Departamento de Biología Animal, Sección Genética Evolutiva, Montevideo, Uruguay
[2]Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Instituto de Biología e Instituto de Química Biológica, Sección Virología, Montevideo, Uruguay
[3]Ministerio de Salud Pública, Centro Nacional de Referencia de Influenza y Otros Virus Respiratorios, Departamento de Laboratorios de Salud Pública, Montevideo, Uruguay

BACKGROUND Evolutionary changes in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) include indels in non-structural, structural, and accessory open reading frames (ORFs) or genes.

OBJECTIVES We track indels in accessory ORFs to infer evolutionary gene patterns and epidemiological links between outbreaks.

METHODS Genomes from Coronavirus disease 2019 (COVID-19) case-patients were Illumina sequenced using ARTIC_V3. The assembled genomes were analysed to detect substitutions and indels.

FINDINGS We reported the emergence and spread of a unique 4-nucleotide deletion in the accessory ORF6, an interesting gene with immune modulation activity. The deletion in ORF6 removes one repeat unit of a two 4-nucleotide repeat, which shows that directly repeated sequences in the SARS-CoV-2 genome are associated with indels, even outside the context of extended repeat regions. The 4-nucleotide deletion produces a frameshifting change that results in a protein with two inserted amino acids, increasing the coding information of this accessory ORF. Epidemiological and genomic data indicate that the deletion variant has a single common ancestor and was initially detected in a health care outbreak and later in other COVID-19 cases, establishing a transmission cluster in the Uruguayan population.

MAIN CONCLUSIONS Our findings provide evidence for the origin and spread of deletion variants and emphasise indels' importance in epidemiological studies, including differentiating consecutive outbreaks occurring in the same health facility.

Key words: genetics - indels - accessory gene - repetitive sequence - coronavirus

Human severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is a novel member of the genus *Betacoronavirus* (subgenus *Sarbecovirus*) that causes the pandemic coronavirus disease 2019 (COVID-19).[1]

Like other coronaviruses, SARS-CoV-2 has a relatively large RNA genome (~30 kb) with well-characterised open reading frames (ORFs) coding for proteins involved in replication and transcription of the viral genome (nsp1-16) and the structure of the virion (spike, matrix, small envelope, and nucleocapsid). The genome also contains ORFs that code for accessory proteins (3a, 6, 7a, 7b, 8, and 10) that are not directly required for virus viability in cell culture but interfere with cellular processes or modulate the infection process in the natural host.[2,3]

The coronavirus genome has high plasticity, as evidenced by the fast evolution driven by point mutations, deletions and insertions (indels), and recombination. This feature contributes to the ongoing rapid transmission and global spread of SARS-CoV-2 in humans and animals and the emergence of strains with new biological properties.[4]

Examining the entire repertoire of genetic variants is crucial to understand better the evolutionary, pathogenic, and antigenic potential of SARS-CoV-2[5,6,7] and to detect changes in primer and probe binding sites that affect the sensitivity of diagnostic tests.[8] In addition, identifying mutations is acquiring more relevance with the emergence of genetic variants of concern that potentially impact virus control and vaccine development.[9,10,11]

The most common changes in SARS-CoV-2 are single nucleotide polymorphisms (SNPs),[12,13] but indels are also detected at high frequency. Indels evidence another aspect of genomic evolution and provide additional data about the virus's capability to maintain its functional-

doi: 10.1590/0074-02760210275
Financial support: This study was supported by the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) (Grant CSIC Equipamiento, Plataforma Genómica Facultad de Ciencias) and the Fundación Manuel Pérez, UdelaR (Grant Fondo Manuel Pérez).
YP and NR contributed equally to this work.
+ Corresponding authors: adriana@fcien.edu.uy / rperez@fcien.edu.uy
https://orcid.org/ 0000-0003-3701-9621 / https://orcid.org/ 0000-0003-4961-4743
Received 15 August 2021
Accepted 3 November 2021

CC BY

viruses

MDPI

Article

Genome Variability of Infectious Bronchitis Virus in Mexico: High Lineage Diversity and Recurrent Recombination

Ana Marandino [1], Lizbeth Mendoza-González [2], Yanina Panzera [1], Gonzalo Tomás [1], Joaquín Williman [1], Claudia Techera [1], Amanda Gayosso-Vázquez [3], Vianey Ramírez-Andoney [3], Rogelio Alonso-Morales [3], Mauricio Realpe-Quintero [2,*] and Ruben Pérez [1,*]

[1] Sección Genética Evolutiva, Departamento de Biología Animal, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay; amarandino@fcien.edu.uy (A.M.); ypanzera@fcien.edu.uy (Y.P.); gtomas@fcien.edu.uy (G.T.); jwilliman@fcien.edu.uy (J.W.); ctechera@fcien.edu.uy (C.T.)
[2] Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarías, Universidad de Guadalajara, Zapopan 44600, JAL, Mexico; liichi1614@gmail.com
[3] Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, CP, Mexico; amandagv66@hotmail.com (A.G.-V.); vianny102@hotmail.com (V.R.-A.); ralonsom@unam.mx (R.A.-M.)
* Correspondence: mrealpe@cucba.udg.mx (M.R.-Q.); rperez@fcien.edu.uy (R.P.); Tel.: +598-25258619-141 (R.P.); Fax: +598-25258617-31 (R.P.)

Abstract: The avian infectious bronchitis virus (IBV) is a coronavirus that mutates frequently, leading to a contagious and acute disease that results in economic losses to the global poultry industry. Due to its genetic and serological diversity, IBV poses a challenge in preventing and controlling the pathogen. The full-length S1 sequence analysis identifies seven main genotypes (GI–GVII) comprising 35 viral lineages. In addition to the previously described lineage, a new GI lineage (GI-30) and two lineages from novel genotypes (GVIII-1 and GIX-1) have been described in Mexico. To prevent the spread of IBV outbreaks in a specific geographic location and select the suitable vaccine, it is helpful to genetically identify the circulating IBV types. Moreover, sequencing genomes can provide essential insights into virus evolution and significantly enhance our understanding of IBV variability. However, only genomes of previously described lineages (GI-1, GI-9, GI-13, and GI-17) have been reported for Mexican strains. Here, we sequenced new genomes from Mexican lineages, including the indigenous GI-30, GVIII-1, and GIX-1 lineages. Comparative genomics reveals that Mexico has relatively homogenous lineages (i.e., GI-13), some with greater variability (i.e., GI-1 and GI-9), and others extremely divergent (GI-30, GVIII-1, and GIX-1). The circulating lineages and intra-lineage variability support the unique diversity and dynamic of Mexican IBV.

Keywords: IBV; Mexico; genomes; lineages

check for updates

Citation: Marandino, A.; Mendoza-González, L.; Panzera, Y.; Tomás, G.; Williman, J.; Techera, C.; Gayosso-Vázquez, A.; Ramírez-Andoney, V.; Alonso-Morales, R.; Realpe-Quintero, M.; et al. Genome Variability of Infectious Bronchitis Virus in Mexico: High Lineage Diversity and Recurrent Recombination. *Viruses* **2023**, *15*, 1581. https://doi.org/10.3390/v15071581

Academic Editors: Shengwang Liu, Huixin Li and Xin Zhang

Received: 30 May 2023
Revised: 15 July 2023
Accepted: 16 July 2023
Published: 20 July 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Coronaviruses, which belong to the family Coronaviridae and subfamily Orthocoronavirinae, can cause severe respiratory and digestive illnesses in birds and mammals. The subfamily comprises four genera that exhibit specific host preferences. Delta and Gammacoronavirus are associated with birds, while Alpha and Betacoronavirus are associated with mammals. The first discovered coronavirus was the avian gammacoronavirus infectious bronchitis virus (IBV, later included in the *Avian coronavirus* species) (International Committee on Taxonomy of Viruses, http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp, accessed on 15 February 2023). It is the most important and best-studied *Gammacoronavirus*, serving as the prototype of the genus, and is found worldwide in industrial and backyard chickens [1–3]. IBV was identified in the first third of the 20th century as the causative agent of an acute and highly contagious chicken disease, posing a significant economic burden

Detection and genome characterisation of SARS-CoV-2 P.6 lineage in dogs and cats living with Uruguayan COVID-19 patients

Yanina Panzera[1]/+, Santiago Mirazo[2,3], Mariana Baz[4], Claudia Techera[1], Sofía Grecco[1], Florencia Cancela[2], Eddie Fuques[1], Emma Condon[1], Lucía Calleros[1], Natalia Camilo[5], Andrea Fregossi[5], Inés Vaz[5], Paula Pessina[6], Nikita Deshpande[4], Ruben Pérez[1], Alejandro Benech[5]

[1]Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Instituto de Biología, Departamento de Biología Animal, Sección Genética Evolutiva, Montevideo, Uruguay
[2]Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Sección Virología, Montevideo, Uruguay
[3]Universidad de la República, Facultad de Medicina, Instituto de Higiene, Departamento de Bacteriología y Virología, Montevideo, Uruguay
[4]WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza, Peter Doherty Institute, Melbourne, Victoria, Australia
[5]Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, Unidad de Clínica y Hospital Veterinario, Montevideo, Uruguay
[6]Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, Laboratorio Clínico del Hospital Veterinario, Montevideo, Uruguay

BACKGROUND Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infections in domestic animals have occurred from the beginning of the pandemic to the present time. Therefore, from the perspective of One Health, investigating this topic is of global scientific and public interest.

OBJECTIVES The present study aimed to determine the presence of SARS-CoV-2 in domestic animals whose owners had coronavirus disease 2019 (COVID-19).

METHODS Nasopharyngeal and faecal samples were collected in Uruguay. Using quantitative polymerase chain reaction (qPCR), we analysed the presence of the SARS-CoV-2 genome. Complete genomes were obtained using ARTIC enrichment and Illumina sequencing. Sera samples were used for virus neutralisation assays.

FINDINGS SARS-CoV-2 was detected in an asymptomatic dog and a cat. Viral genomes were identical and belonged to the P.6 Uruguayan SARS-CoV-2 lineage. Only antiserum from the infected cat contained neutralising antibodies against the ancestral SARS-CoV-2 strain and showed cross-reactivity against the Delta but not against the B.A.1 Omicron variant.

MAIN CONCLUSIONS Domestic animals and the human SARS-CoV-2 P.6 variant comparison evidence a close relationship and gene flow between them. Different SARS-CoV-2 lineages infect dogs and cats, and no specific variants are adapted to domestic animals. This first record of SARS-CoV-2 in domestic animals from Uruguay supports regular surveillance of animals close to human hosts.

Key words: SARS-CoV-2 – domestic animals – next-generation sequencing – serology – One Health

Coronaviruses (subfamily *Orthocoronavirinae*, family *Coronaviridae*, order *Nidovirales*) are a recognised cause of disease in humans and animals. They are classified into four genera based on their genetic and antigenic properties: *Alpha*, *Beta*, *Gamma* and *Deltacoronavirus*. *Alpha* and *Betacoronavirus* infect mammals, while Gamma and *Deltacoronavirus* infect mainly birds.[1]

Betacoronavirus includes the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the causative agent for the coronavirus disease 2019 (COVID-19) in humans.[2] Since March 2020, SARS-CoV-2 (subgenus *Sarbercovirus*) has been the most significant public health crisis, devastatingly affecting the global economy.

SARS-CoV-2, like other coronaviruses, has a relatively large single-stranded positive-sense RNA genome (~ 30 kb) with well-characterised open reading frames (ORFs) coding for proteins engaged in viral replication and transcription (nsp1-16) and the structure of the virion (spike, matrix, small envelope and nucleocapsid). The genome also contains ORFs for accessory proteins (3a, 6, 7a, 7b, 8 and 10) that modulate the infection process in the natural host.[3,4]

The coronavirus genome has fast evolution and high plasticity driven by point mutations, deletions and insertions (indels) and recombination. This feature contributes to the rapid transmission and global spread of SARS-CoV-2 and the emergence of new strains with new biological properties.[5,6]

SARS-CoV-2 has an ancestral zoonotic origin from bats and probably includes a hitherto unknown intermediate host.[7] The initial outbreak in the human population occurred in December 2019 in China, and from then, the virus spread worldwide by interpersonal transmission.[8-10] The possible anthroponotic transmission between humans and animals (production, recreation animals and domestic animals) raises awareness and concerns. It alerts health authorities to take significant measures to identify receptive species and avoid transmission cycles.[11]

doi: 10.1590/0074-02760220177
Financial support: CSIC (grant: Equipment, Genomic Platform, Faculty of Science and "Specialised knowledge to face the emergency posed by COVID-19 and its impacts").
+ Corresponding author: ypanzera@fcien.edu.uy
https://orcid.org/0000-0002-7459-7810
Received 04 August 2022
Accepted 07 November 2022

CC BY

Archives of Virology (2023) 168:87
https://doi.org/10.1007/s00705-023-05717-6

BRIEF REPORT

A multiplex-NGS approach to identifying respiratory RNA viruses during the COVID-19 pandemic

Natalia Ramos[1] · Yanina Panzera[2] · Sandra Frabasile[1] · Gonzalo Tomás[2] · Lucía Calleros[2] · Ana Marandino[2] · Natalia Goñi[3] · Claudia Techera[2] · Sofía Grecco[2] · Eddie Fuques[2] · Leticia Coppola[3] · Viviana Ramas[3] · Maria Noelia Morel[3] · Cristina Mogdasy[3] · Héctor Chiparelli[3] · Juan Arbiza[1] · Ruben Pérez[2] · Adriana Delfraro[1]

Received: 15 December 2022 / Accepted: 6 January 2023 / Published online: 14 February 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2023

Abstract

A methodological approach based on reverse transcription (RT)-multiplex PCR followed by next-generation sequencing (NGS) was implemented to identify multiple respiratory RNA viruses simultaneously. A convenience sampling from respiratory surveillance and SARS-CoV-2 diagnosis in 2020 and 2021 in Montevideo, Uruguay, was analyzed. The results revealed the cocirculation of SARS-CoV-2 with human rhinovirus (hRV) A, B and C, human respiratory syncytial virus (hRSV) B, influenza A virus, and metapneumovirus B1. SARS-CoV-2 coinfections with hRV or hRSV B and influenza A virus coinfections with hRV C were identified in adults and/or children. This methodology combines the benefits of multiplex genomic amplification with the sensitivity and information provided by NGS. An advantage is that additional viral targets can be incorporated, making it a helpful tool to investigate the cocirculation and coinfections of respiratory viruses in pandemic and post-pandemic contexts.

Keywords COVID-19 pandemic · SARS-CoV-2 · human respiratory RNA viruses · multiplex PCR-NGS · viral coinfections

Respiratory viral coinfections have often been described, focusing mainly on viruses that are associated with acute bronchiolitis in children, although their clinical consequences are not always well understood. Among the viral coinfections in children, the most studied viruses in a non-pandemic setting are human respiratory syncytial virus (hRSV), human metapneumovirus (hMPV), influenza A virus, and human parainfluenza virus (hPIV) [1, 2]. Although less is known about human rhinoviruses (hRVs), some studies have shown their importance in coinfections with other pathogens [3, 4]. During the H1N1pdm09 influenza pandemic, the cocirculation pattern of traditional seasonal viruses was altered, and coinfections were usually identified in younger patients, most frequently with hRSV [1, 5]. At the beginning of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, reports about viral coinfections mainly focused on case reports [6, 7]. Since 2021, there have been additional studies concerning SARS-CoV-2 and other respiratory virus coinfections [8, 9]. In addition, changes in the seasonal cycles of respiratory viral diseases and the impact of the pandemic on the circulation of respiratory viruses have also been examined. However, regional data about the

Handling Editor William G Dundon

Natalia Ramos and Yanina Panzera equally contributed.

✉ Ruben Pérez
rperez@fcien.edu.uy

✉ Adriana Delfraro
adriana@fcien.edu.uy

[1] Sección Virología, Instituto de Biología e Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 4225, 11400 Iguá, Montevideo, Uruguay

[2] Sección Genética Evolutiva, Departamento de Biología Animal, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 4225, 11400 Iguá, Montevideo, Uruguay

[3] Departamento de Laboratorios de Salud Pública. Ministerio de Salud Pública, Centro Nacional de Referencia de Influenza y otros Virus Respiratorios, Alfredo Navarro 3051 (entrada N), 11600 Montevideo, Uruguay

https://doi.org/10.1038/s44298-024-00078-6

Diagnosis and genomic characterization of the largest western equine encephalitis virus outbreak in Uruguay during 2023–2024

Check for updates

Gonzalo Tomás[1], Ana Marandino[1], Sirley Rodríguez[2], Gabriel Luz Wallau[3,4], Filipe Zimmer Dezordi[3], André Luiz Sá de Oliveira[5], Claudia Techera[1], Lucía Calleros[1], Sofía Grecco[1], Joaquín Williman[1], Ramiro Pérez[2], Lucía Bassetti[2], Raúl Negro[2], Lucía Moreira Marrero[6], Adriana Delfraro[6], Roberto Vidal[7], Yanina Panzera[1] ✉ & Ruben Pérez[1] ✉

The Western equine encephalitis virus is transmitted between mosquitoes and wild birds. Mosquitoes spread the virus to horses and human populations, causing severe encephalitis and death. The most recent large outbreak occurred in South America from November 2023 to April 2024. We identified and genetically characterized Uruguayan strains during this outbreak to understand their evolutionary trends and rapid expansion. We obtained genomes from 15 strains using a novel multiplex PCR assay combined with next-generation Illumina sequencing. The phylogenetic analysis revealed that viruses from Uruguay and Brazil collected during the outbreak and an Argentine strain from 1958 share a common evolutionary origin and are distinct from North American strains. Phylogenetic and epidemiological data suggest that the outbreak originated in Argentina and spread to Uruguay and Brazil, likely by movements of infected birds. Genomic analysis also revealed mispairing in real-time PCR primers and probes that may affect official diagnostic protocols.

Arthropod-borne viruses (arboviruses) are high-burden priority pathogens of global concern[1]. Among these, viruses belonging to the *Alphavirus* genus (*Togaviridae* family) inflict considerable morbidity and mortality in animals and humans[2]. This genus is broadly split into old world and new world alphaviruses, each with distinct characteristics and impact on health[3–5]. The old world alphaviruses comprise Semliki Forest, O'Nyong-nyong, Ross River, chikungunya, and Sindbis viruses. The new world alphaviruses include the Mayaro virus, the Venezuelan equine encephalitis virus, the Eastern equine encephalitis virus, and the Western equine encephalitis virus[6].

The Western equine encephalitis virus (WEEV) is transmitted between mosquitoes (*Culex tarsalis* in North America and *Aedes albifasciatus* in South America) and avian hosts, having wild birds as primary enzootic cycle reservoirs[7,8]. The virus might spill over into horses and human populations through mosquitoes that opportunistically feed on mammals and start epizootic cycles. Equine and human infections, though typically asymptomatic, can lead to severe encephalitis and death, with case-fatality rates ranging from 3% to 4% in humans and 15–20% in equines[9]. Horses and humans are dead-end hosts and do not contribute to further epizootic transmissions[7]. There are no effective treatments for active WEEV infection, but vaccines are available for the prophylactic therapy of equines[10].

Most data available from WEEV epizootic outbreaks was registered from passive surveillance and outbreak events between the 1940s and the 1990s in North America. The first large-scale outbreak was recorded in the

[1]Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. [2]División de Laboratorios Veterinarios "Miguel C. Rubino," Departamento de Virología, Dirección General de Servicios Ganaderos, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay. [3]Departamento de Entomología, Núcleo de Bioinformática, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Campus da UFPE—Cidade Universitária, Recife, Brazil. [4]Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, WHO Collaborating Center for Arbovirus and Hemorrhagic Fever Reference and Research, National Reference Center for Tropical Infectious Diseases, Hamburg, Germany. [5]Núcleo de Estatística e Geoprocessamento, Instituto Aggeu Magalhães (IAM)- Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Campus da UFPE—Cidade Universitária, Recife, Brazil. [6]Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. [7]División de Sanidad Animal, Departamento de Programas Sanitarios, Dirección General de Servicios Ganaderos, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay. ✉e-mail: ypanzera@fcien.edu.uy; rperez@fcien.edu.uy