



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Caracterización genómica y epidemiología molecular del
virus de la Bursitis infecciosa en España**

Jennifer S. Toskano Hurtado

Tesis Doctoral

Bellaterra, 2016



Caracterización genómica y epidemiología molecular del virus de la Bursitis infecciosa en España

Tesis doctoral presentada por Jennifer S. Toskano Hurtado para optar al grado de Doctor en Veterinaria dentro del programa de Doctorat en Medicina i Sanitat Animals, bajo la dirección de la Dra. Natàlia Majó i Masferrer y el Dr. José Ignacio Nuñez Garrote.

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Veterinària

Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals

Bellaterra, 2016

La Dra. NATÀLIA MAJÓ I MASFERRER, profesora titular del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, e investigadora adscrita al Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA) y el Dr. JOSE IGNACIO NUÑEZ GARROTE, investigador de IRTA,

Certifican:

Que la memoria titulada **“Caracterización genómica y epidemiología molecular del virus de la Bursitis infecciosa en España”** presentada por Jennifer S. Toskano Hurtado para optar al grado de Doctor en Veterinaria, se ha realizado en dichos centros y bajo su dirección.

Y para que conste a los efectos oportunos firman la presente en Bellaterra, a 31 de Mayo de 2016.

Dra. Natàlia Majó i Masferrer

Directora

Dr. José Ignacio Nuñez Garrote

Director

Jennifer S. Toskano Hurtado

Doctoranda

Aunque a veces distante

pero nunca ausente...

Para ti, mi pequeño Sebastián

Agradecimientos

A mis Padres

Por la confianza y el cariño que siempre recibí de ustedes a lo largo de la vida
en especial a ti Mamá,
sin tu ayuda hubiera sido imposible
ni siquiera pensar en retomar esta fase importante de mi vida,
gracias mil por cuidar de mi *ratolí* de la forma en cómo lo haces, con ese cariño y
esa dedicación...¡gracias mamá!

A mis hermanos

Por haber estado tan pendientes y apoyarme siempre...gracias Krys, gracias
Gerard, gracias Yoshiko y a ti Katty donde quiera que estés.

A mis directores

Natàlia y Jose Ignacio, mi más sincero agradecimiento por querer retomar esta
ardua tarea, por el esfuerzo, la orientación y el apoyo para alcanzar
la meta.

A mis amigos

Definitivamente aparte de los conocimientos me llevo
esas grandes cosas que no se encuentran así nada más,
la amistad de muchas personas que han hecho de este camino una experiencia
de vida, a quienes conocí cuando llegué
y que hasta hoy siguen formando parte de mi vida.

A Jenny que ha estado allí en la buenas y en las malas, Bibiana con quien
mantengo una linda amistad, Nilsa y Anna, mis incomparables compañeras de
piso con las que tengo innumerables anécdotas para contar durante toda mi
vejez, Lana y Glauber, los brasiquinhos, con quienes las cenas eran succulentas,
Mario y Ana Cris! por esas madrugadas de verano, Carolina , a Alí, a Nuria y
Alberto con quienes compartí un poco las preocupaciones de papás,
Sebas por los cafés interminables y el apoyo incondicional
Además tuve la suerte de tener padres de acogida, Alberto y Mar (Mare)...quien
me hizo parte de su familia y compartimos gratos momentos...por que fueron
realmente unos padres conmigo, moltes gràcies!

A la pequeña sociedad AP,
quienes siempre estuvieron dispuestos a colaborar
y a quienes invadí en esta última fase.

A las técnicos de CReSA que me enseñaron tantas cosas,
y a la nueva generación de becarios que sin conocerme
me cedieron sus sitios y compartieron
conmigo como una más.

Y a ti Martín que sin tu apoyo
hubiera sido casi imposible conseguirlo.

Por todo eso y por mucho más...

Gracias...

SJT

Especial agradecimiento a:
Centre de Sanitat Avícola de Catalunya, CESAC
y al Dr. Lester Perez
por la colaboración prestada.

INDICE

Abreviaturas	i
Resumen	iii
Abstract	vi
Capítulo I	1
Introducción General	3
1. Historia de la Bursitis infecciosa aviar	5
2. Virus de la Enfermedad de Gumboro	6
2.1 Clasificación Taxonómica	6
2.2 Estructura y genoma viral	7
2.3. Proteínas virales y su implicación en la replicación viral	10
3. Diversidad antigénica y patotípica	16
3.1 Variación antigénica	17
3.2 Variación patotípica	19
4. Epidemiología de la enfermedad	21
5. Patogénesis e inmunosupresión	22
6. Sintomatología clínica y lesiones	25
6.1 Formas de presentación de la enfermedad	25
6.2 Lesiones macroscópicas	26
6.3. Lesiones microscópicas	27
7. Diagnóstico de la enfermedad	28
a) Identificación mediante la prueba de precipitación en Agar-gel	28
b) Pruebas de neutralización vírica	29
c) Identificación mediante enzimo-inmunoensayo de captura antigénica (AC-ELISA)	29
d) Identificación mediante técnicas moleculares	29
e) Histología e inmunohistoquímica	30
8. Control y prevención	31
8.1 Tipos de vacunas	31
a) Vacunas vivas	31
b) Vacunas inactivadas	32
c) Vacunas de nueva generación	33
Vacunas de complejos virus-anticuerpos	33
Vacunas HVT recombinantes	33
Otros sistemas	33
Hipótesis y objetivos	35
Hiótesis y objetivos específicos	37
Capítulo II	39
Estudio 1. Caracterización molecular y análisis filogenético basados en la región hipervariable de la proteína VP2 del virus de la Bursitis infecciosa aviar de origen español desde 2000 hasta 2015	41

Introducción.....	43
Materiales y métodos	44
Resultados	48
Discusión	63
Estudio 2. Análisis espacio-temporal y fuerzas evolutivas que determinan la variabilidad genética y dispersión de los aislados del virus de la Bursitis Infecciosa en España	69
Introducción.....	71
Materiales y métodos	72
Resultados	81
Discusión	91
Estudio 3. Análisis del genoma completo de aislados españoles del virus de la Bursitis infecciosa aviar	95
Introducción.....	97
Materiales y métodos	98
Resultados	104
Discusión	118
Capítulo III	125
Discusión general.....	127
Conclusiones.....	137
Referencias bibliográficas.....	141
Anexos	155

AGP:	aglutinación en placa
AIC:	criterio de información de Akaike
ARN:	ácido ribonucleico
BrEt:	bromuro de etidio
cDNA:	ácido desoxirribonucleico complementario
CEF:	fibroblastos de embrión de pollo
CReSA:	Centre de Recerca en Sanitat Animal
C-terminal:	carboxilo terminal
DEPC:	dietilpirocarbonato
dn-ds:	sinónimos-nosinónimos
dNTPS:	desoxirribonucleótidos trifosfato
dsRNA:	ARN de doble cadena
ELISA:	ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
FAO:	Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura
GALT:	tejido linfoide asociado al intestino
HALT:	tejido linfoide asociado a la cabeza
IBD/at:	linaje atenuado del virus de la enfermedad de la bolsa
IBD/CI-at:	linaje clásico atenuado del virus de la enfermedad de la bolsa
IBD/Sp-var:	linaje variante español
IBD/vv:	virus muy virulento de la enfermedad infecciosa de la bolsa
IBD:	Enfermedad Infecciosa de la bolsa
IBDV:	virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa
IgG:	inmunoglobulinas G
IgM:	inmunoglobulinas M
Kda:	kilodalton
Mabs:	anticuerpos monoclonales
MCMC:	cadena de Markov Monte Carlo
mARN:	ácido ribonucleico mensajero
MMLV-RT	Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney)
NCBI:	base de datos de nucleótidos
N-terminal:	amino terminal
OIE:	Oficina Internacional de Epizootias
ORFs:	marco de lectura abierta
p.i.:	post infección
PDB:	banco de proteínas
pPoliprotein:	poliproteína
RdRp:	ARN polimerasa dependiente de ARN
RFLP:	polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
RHV:	región hipervariable
RT-PCR:	transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa
SN:	seroneutralización
Taq:	polimerasa Thermus aquaticus
tMRCA:	ancestro común más reciente
VP1:	proteína viral 1
VP2:	proteína viral 2

VP3: proteína viral 3
VP4: proteína viral 4
VP5: proteína viral 5

La Bursitis infecciosa está catalogada como una de las enfermedades infecciosas aviares más importantes debido a la pérdidas económicas que produce como consecuencia directa de la enfermedad así como por los efectos inmunosupresores de la misma. Con el propósito de profundizar en la situación epidemiológica actual del virus de la Bursitis Infecciosa (IBDV) en España, se plantearon 3 estudios. Para tener una visión general de la situación actual de IBD en España el primer estudio consistió en la caracterización genética de la región hipervariable de la proteína VP2 de los aislados remitidos al laboratorio de diagnóstico de CReSA y CESAC durante los años 1990 y 2015. Mediante la técnica de RT-PCR, la secuenciación y la obtención de la filogenia a partir del fragmento de 480 nucleótidos de RHV, 968 secuencias fueron analizadas y comparadas con las principales referencias del virus publicadas en GenBank. El análisis de secuencias y la filogenia revelaron que el 21% de las cepas en cuestión fueron cepas muy virulentas. Alrededor del 72% de las muestras analizadas se correspondió con el genotipo atenuado intermedio y que estuvieron altamente relacionadas a las cepas vacunales utilizadas con más frecuencia en la inmunización de las aves. Por otro lado, la filogenia nos muestra nuevos grupos de cepas nunca antes descritos en España. Así, se observa un grupo de aislados estrechamente relacionados a la cepa clásica atenuada V877 de origen australiano y un nuevo linaje que en el estudio denominamos IBDV/Sp-var, representando el 1,8% de los virus caracterizados.

Debido a estos hallazgos en el segundo estudio se planteó profundizar en la epidemiología molecular de IBDV en España. Para el estudio se consideraron 168 secuencias de la RHV de la VP2 obtenidas de GenBank con origen y año conocido, además de 33 secuencias derivadas de nuestro estudio anterior. El análisis filogenético utilizando inferencia bayesiana confirmó la presencia de 4 linajes: clásico (IBDV/CI), clásico atenuado (IBDV/CI-at), muy virulento (IBDV/vv) y el nuevo linaje IBDV/Sp-var. Se determinó la evolución de los aislados de IBDV

mediante la definición de las fuerzas selectivas que se ejecutaron durante la diversificación. El análisis de presión de selección detectó presión positiva dentro del linaje atenuado en donde se ubicó una cepa de tipo vacunal de virulencia intermedia. La evolución adaptativa evidenció una relación entre los linajes IBDV/at y IBDV/Sp-var, y mediante una comparación con un modelo de estructura cristalográfica de VP2 contenida en el banco de proteínas (Data Bank Protein, DBP), se determinó que mutaciones en los codones 251 y 273 favorecieron la emergencia del nuevo linaje IBDV/Sp-var. El análisis filogeográfico determinó el posible origen de los linajes IBDV/vv y IBDV/Sp-var, la expansión y difusión de estas poblaciones virales. El análisis muestra que las cepas IBDV/vv se dispersaron en España alrededor de los años 90 provenientes de la región asiática y que alrededor de los años 2002-2004 se genera una gran diversidad genética que en el tiempo se distribuye de una forma más heterogénea sobre todo en la región oriental del país, mientras que el análisis del linaje IBDV/Sp-var muestra que se originó alrededor de 1995 y se dispersó fundamentalmente en la región oriental de España.

Finalmente, la afirmación de diversos estudios moleculares del virus de IBD de que la virulencia no solo reside en la VP2, nos llevó a plantear el tercer estudio orientándolo básicamente a la caracterización completa de los segmentos A y B de 16 cepas IBDV/vv detectadas en distintas regiones de España en años distintos y fueron comparadas con otras cepas muy virulentas descritas en otros países, cepas clásicas y atenuadas, así como cepas vacunales. El alineamiento y filogenia de las cepas en cuestión define que los diferentes linajes (IBDV/vv y IBDV/CI-at) se agrupan junto a sus similares tanto en el análisis del segmento A como el segmento B identificando algunos residuos que permanecen constantes en todas las cepas del linaje IBDV/vv en ambos segmentos. Sin embargo, una de las cepas, IBDV/Spain/06/38, mostró mutaciones en la proteína VP3 respecto al resto de las cepas. El análisis de recombinación confirma mediante 6 de los 9

métodos empleados en la búsqueda de estos eventos que se trata de una cepa con alta probabilidad de haber sufrido un evento de recombinación.

Infectious Bursal Disease is listed as one of the most important avian infectious disease due to economic losses as a direct result of the disease and indirect by the immunosuppressive effects of it. In order to deepen the current epidemiological situation virus Infectious bursal disease (IBDV) in Spain, 3 studies were raised. To get an overview of the current situation of IBD in Spain the first study involved the genetic characterization of the hypervariable region of the VP2 protein strain sent to the diagnostic laboratory of CReSA and CESAC between 1990 and 2015. By RT-PCR, sequencing and phylogeny of the 480 bp fragment, RHV 968 sequences were analyzed and compared with the main references of the virus published in GenBank. Sequence analysis and phylogeny revealed that 21% of the strains in question were highly virulent strains. About 72% of the analyzed samples corresponded to the intermediate attenuated genotype and were highly related to the vaccine strains most commonly used in immunizing birds. By the other side phylogeny shows us new groups of strains never before described in Spain.

Therefore, an isolated group closely related to the vaccine strain V877 (classical attenuated Australian) and a new lineage in the study call IBDV/Sp-var, represents 1.8% of the viruses characterized.

Because of these findings a second deeper study is raised of the molecular epidemiology of IBDV in Spain. To the study we considered RHV 168 sequences of the VP2 obtained from GenBank with known origin and year, in addition were considered 33 sequences derived from our previous study. Phylogenetic analysis using Bayesian inference confirmed the presence of 4 lines: classic (IBDV/cl), attenuated classical (IBDV/CI-at), very virulent (IBDV/vv) and the new lineage IBDV/Sp-var. The evolution of IBDV isolates was determined by defining the selective forces that were conducted during diversification. Analysis of pressure selection detected positive pressure within the attenuated lineage where a vaccine strain type of intermediate virulence located. Adaptive evolution showed a

relationship between IBDV/at and IBDV/Sp-var lineages, and by a comparison with a model of crystallographic structure of VP2 contained in the protein bank (Data Bank Protein, DBP). It was determined that codons 251 and 273 favored the emergence of the new strain IBDV/Sp-var. The phylogeographic analysis determined the possible origin of the IBDV/vv and IBDV/Sp-var lineages and the expansion and dissemination of these viral populations. The analysis shows that the IBDV/vv strains are dispersed in Spain around 90s from Iran. Around the years 2002-2004 a large genetic diversity is distributed over time on a more heterogeneous form in the eastern region of the country. While the analysis of the lineage IBDV/Sp-var shows that its origin is around 1995 and is mainly distributed in the eastern region of Spain.

Finally, the statement of various molecular studies of IBD virus that virulence not only lies in the VP2 led us to propose the third study orientating it to the complete characterization of the genome. The segments A and B of 16 strains IBDV/vv detected in different regions of Spain in different years and are compared with other highly virulent strains described in other countries, classical and attenuated strains and vaccine strains. From the alignment and phylogeny, of the strains in question, is defined that different genotypes (IBDV/vv and IBDV/CI-at) are grouped with their relative part on the analysis of the segment A and also segment B. Residues are identified and remained the same in all strains of genotype IBDV/vv for both segments. However one of the IBDV/Spain/06/38 strains showed a mutated protein substitution VP3 when it is compared with the other strains. The recombination analysis confirmed by 6 of the 9 methods used in our research for recombination events confirms that its the only strain of the study that could have a recombinant event.

Capítulo I

Introducción

1. Historia de la Bursitis infecciosa

La Bursitis infecciosa aviar, también llamada enfermedad de Gumboro (*Infectious Bursal Disease*, IBD) fue descrita por primera vez por A.S. Cosgrove en 1962 en la ciudad de Gumboro, Delaware, Estados Unidos (Cosgrove, 1962).

En la misma década, Winterfield y Hitchner reconocieron al agente que provocaba lesiones a nivel bursal (Winterfield and Hitchner, 1962), y más tarde la enfermedad fue denominada "Enfermedad Infecciosa de la Bolsa, IBD" por las lesiones patognomónicas observadas en la bolsa de Fabricio (Hitchner, 1970).

En 1972, Allan y colaboradores, reportaron que el virus de la bursitis infecciosa producía inmunosupresión severa y prolongada en aves jóvenes, y por tanto una elevada susceptibilidad frente a patógenos oportunistas, hecho que despertó el interés en gran medida de controlar esta infección para evitar las pérdidas económicas que esta enfermedad pudiera ocasionar directa o indirectamente (Allan *et al.*, 1972).

Hasta los años 80, la enfermedad estuvo controlada con la aplicación de vacunas comerciales basadas en cepas vivas atenuadas y muertas (Negash *et al.*, 2004). Desafortunadamente a inicios de los años 80 la enfermedad reapareció en explotaciones de Delmarva, Estados Unidos. Estos nuevos subtipos o variantes se manifestaron mostrando cambios en sus propiedades antigénicas y sobrepasando la inmunidad maternal que bien protegía contra las cepas estándares presentes hasta entonces en la zona (Hernández *et al.*, 2015).

Más tarde, la identificación de un virus aislado a partir de bolsas de pavos que afectaba a pavos y patos sugiere la presencia de un nuevo serotipo, hecho que fue ratificado mediante ensayos de neutralización cruzada (McFerran *et al.*, 1980). Así, se designaron serotipos 1 y 2. Serotipo 1 al que pertenecen las cepas que causaban enfermedad en los pollos y serotipo 2 que se aísla de diversas especies

aviaries pero es apatógena y por esto se atribuyó propiedades de especificidad para los serotipos (Jackwood *et al.*, 1985).

En Europa en el año 1987, concretamente en Holanda, se reportaron los primeros casos de enfermedad aguda causada por cepas altamente virulentas (Chettle *et al.*, 1989). Estas nuevas cepas se diseminaron muy rápidamente por el resto de Europa incluyendo el Reino Unido y España (Majó *et al.*, 2002; van den Berg *et al.*, 1991; Zorman-Rojs *et al.*, 2003). Posteriormente se diseminaron por África, Asia, Sudamérica (Banda and Villegas, 2004; Di Fabio *et al.*, 1999; Hassan, 2004; Mardassi *et al.*, 2004; Parede *et al.*, 2003) y finalmente en Estados Unidos (Jackwood *et al.*, 2009; Stoute *et al.*, 2009), mas no han sido reportadas en Australia y Nueva Zelanda (Animal Health Australia, 2009; Chai *et al.*, 2001). Un informe de la Oficina Internacional de Epizootias realizado en 1995 ya reportaba que el 95% de los países miembros habían declarado casos de IBD (Etteradossi, 1995).

2. Virus de la Enfermedad de Gumboro

2.1 Clasificación Taxonómica

El virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (*Infectious Bursal Disease virus*, IBDV) pertenece a la familia *Birnaviridae*, nombre que recibe debido a que el virus consta de una doble cadena de ARN bisegmentado (Macdonald, 1980). Existen cuatro géneros reconocidos dentro de esta familia. El género *Aquabirnavirus* que incluye al virus de la pancreatitis necrótica de los peces (*Infectious Pancreatic Necrosis virus*, IPNV), a los virus de los moluscos bivalvos que afectan a la especie *Tellina tenuis* (*Tellina virus*, TV) y *Ostrea edulis* (*Oyster virus*, OV), el género *Entombirnavirus* al que pertenece el virus X de la *Drosophila melanogaster* (DXV) (Delmas, 2005; Van den Berg *et al.*, 2000), al género *Avibirnavirus* al que pertenece el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV) (Azad *et al.*, 1985; Delmas, 2005; Dobos *et al.*, 1979) y por último, al

género *Blosnavirus*, que incluye al virus de los peces cabeza de serpiente (*Blotched snakehead virus*, BSNV) (Delmas *et al.*, 2004). Además, existen algunos birnavirus recientes que no están clasificados aún en ningún género, como el virus de la proventriculitis transmisible de las aves (Guy *et al.*, 2011) y el virus Espíritu Santo aislado de mosquitos (Vancini *et al.*, 2012).

2.2 Estructura y genoma viral

Estudios realizados con tinción negativa en microscopio electrónico para examinar la estructura del virus, demostraron que el IBDV es un virus sin envoltura, que posee una cápside simple (Hirai and Shimakura, 1974) y que presenta una única envuelta proteica (Bottcher *et al.*, 1997; Caston *et al.*, 2001). Esta característica le confiere la particularidad de ser muy estable en el medio ambiente (Benton *et al.*, 1967) así como la capacidad de resistencia a soluciones como éter, cloroformo, fenol, al amonio cuaternario (solo), entre otros e incluso a la radiación por UV (Benton *et al.*, 1967; Delmas, 2005).

La cápside del virión muestra una topografía molecular basada en un número de triangulación $T=13$ y una típica forma icosaédrica, presentándose las subunidades fundamentales en forma de trímeros (*Figura 1*). La partícula, no presenta un carácter esférico, ya que entre los ejes de orden 5 tiene un diámetro de aproximadamente 72 nm, mientras que entre los ejes de orden 3 el diámetro aproximado es de 66 nm. Los virus suelen ser partículas altamente simétricas, por cuanto el mapa tridimensional revela aspectos de morfología propia del virus, de organización, forma de sus componentes, estequiometría y los cambios sistemáticos en la conformación de las unidades estructurales que permiten la formación de la cápside (Luque *et al.*, 2007). Así, la cara externa del virión está formada por un total de 260 protrusiones triméricas de VP2 que se disponen en cinco entornos locales (Garriga *et al.*, 2006; Letzel *et al.*, 2007a), algunas de ellas muy cercanas permitiendo interacciones entre algunos trímeros vecinos

(Figura 2).

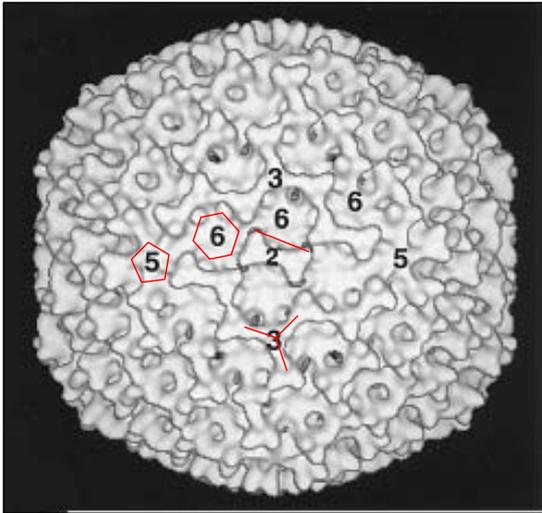


Figura 1. Vista en dos planos del virus completo de IBD. Se encuentran marcados algunos de los tipos de ejes de la estructura: dobles, triples, quintuple y sextuple. El patrón indica una arquitectura T = 13. Figura extraída y modificada de Bottcher *et al.*, 1997.

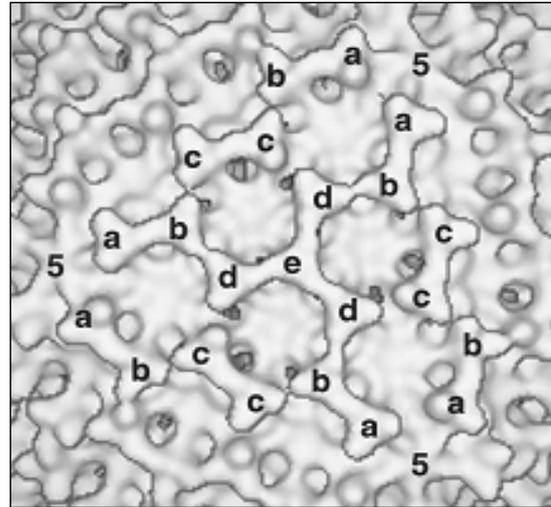


Figura 2. Vista en primer plano por el eje 3 de la partícula. Se muestra la naturaleza de agrupación trimérica en la superficie viral. Las cinco clases diferentes trímeros se indican con las letras a - e. Figura extraída y modificada de Bottcher *et al.*, 1997.

La cara interna de la cápside presenta 200 unidades morfológicas en forma de Y localizadas en las posiciones hexaméricas locales, mientras que en las posiciones pentaméricas aparecen unas densidades anulares como consecuencia del estrecho empaquetamiento de los trímeros en esas áreas (Luque *et al.*, 2007; Saugar *et al.*, 2005).

El IBDV al ser un birnavirus se caracteriza por poseer un genoma de doble ARN bisegmentado (dsRNA) (Kibenge *et al.*, 1988; Macdonald, 1980; Muller *et al.*, 1979a). El segmento A está compuesto por 3400 nucleótidos (Muller *et al.*, 2003; Van den Berg, 2000) y contiene dos marcos de lectura abierta (*Open Reading Frame*, ORF) que se solapan parcialmente. La ORF A1 codifica para una poliproteína de 110 KDa (NH₂-pVP2-VP4-VP3-COOH) que se autoprocresa por acción de la actividad proteolítica de la VP4 para originar tres polipéptidos: VPX o precursor de VP2 con 41 KDa, la VP3 con 28 KDa y VP4 con 32 KDa (Kibenge *et al.*, 1999; Lejal *et al.*, 2000; Sanchez and Rodriguez, 1999; Yu *et al.*, 2001). La ORF A2 codifica para una proteína de 17 KDa denominada VP5. La secuencia de

esta proteína es rica en Cisteína (Cys) y es muy conservada en la mayoría de cepas de ambos serotipos (Tacken *et al.*, 2003). El segmento B, cuenta con 2800 nucleótidos aproximadamente (Muller *et al.*, 2003; Van den Berg, 2000). Éste incluye una ORF y codifica para la proteína VP1 con un peso molecular de 90 KDa, la cual tiene actividad polimerasa ARN dependiente (RdRp) (Cao *et al.*, 1998; Spies and Muller, 1990; Zierenberg *et al.*, 2001) (Figura 3). Los análisis de estequiometría han permitido conocer la relación en término de número de copias de estas proteínas en una partícula de IBDV. En total existen 780 copias de VP2, 450 copias de VP3 y 12 copias de VP1 (Coulibaly *et al.*, 2005; Saugar *et al.*, 2005).

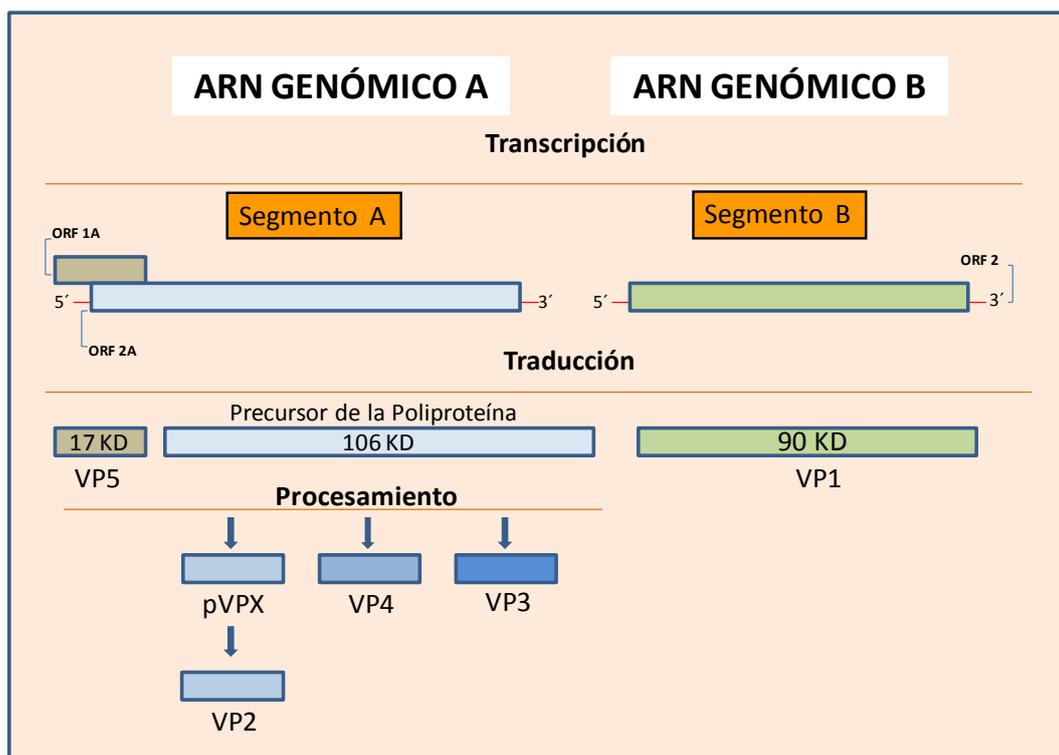


Figura 3. Genoma del virus de la Bursitis infecciosa. El segmento A contiene dos ORFs que dan origen a la proteína Vp5 y a la poliproteína respectivamente. La poliproteína se traduce dando lugar a las proteínas pVPX, VP4 y VP3. pVPX es procesada postraduccionalmente en su extremo carboxilo terminal para dar lugar a la forma madura VP2. El segmento B contiene una única ORF que da origen a la ARN polimerasa-dependiente ARN (RdRp), VP1.

2.3. Proteínas virales y su implicación en la replicación viral

La escueta estructura de los birnavirus requiere que sus componentes maximicen sus funciones, de modo que puedan suplir las diferencias de conformación que tienen frente a otros virus y que le permitan cumplir con su ciclo de replicación para desarrollar una progenie viable en la célula del hospedador. Las nuevas herramientas tecnológicas han permitido identificar las funciones e investigar acerca de las interacciones entre las mismas.

La VP2 y VP3 son las proteínas mayoritarias del virión maduro (Dobos *et al.*, 1979), las cuales forman la cápside T=13 icosaédrica. La primera localizada externamente y la segunda en la parte interna del virus (Bottcher *et al.*, 1997; Lombardo *et al.*, 1999). Aunque los primeros análisis indicaban que la cápside del virión maduro estaba constituida por VP2 y VP3 (Bottcher *et al.*, 1997), estudios posteriores han demostrado que está formada únicamente por trímeros cuasi-equivalentes de VP2, estabilizadas por un Ion de Ca²⁺ (Figura 4) (Coulibaly *et al.*, 2005; Saugar *et al.*, 2005).

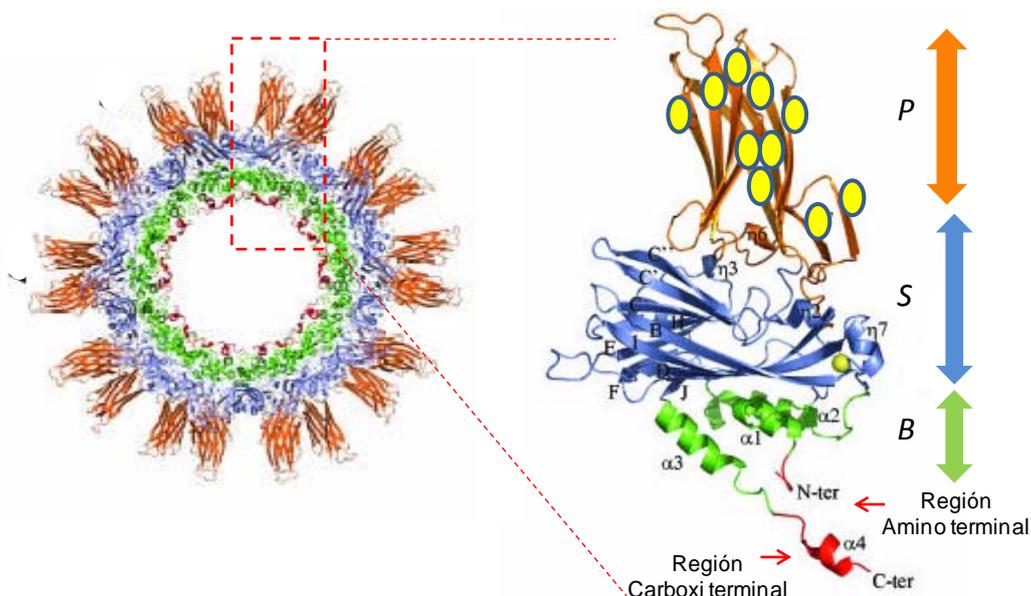


Figura 4. Estructura de VP2. Se muestra la estructura terciaria con tres dominios protuberante (P), armazón (S) y basal (B). El dominio P muestra en su parte más distal (esferas amarillas) las ubicaciones de las diferentes sustituciones que condicionan la virulencia, variación antigénica y patogenicidad. Figura extraída y modificada de Garriga *et al.*, 2006.

Esta estructura terciaria como el nombre lo indica posee tres dominios denominados protuberante (P), armazón (S), y basal (B); siendo el dominio B y S los más conservados mientras que el dominio P es el más variable, de hecho incluye la región denominada hipervariable (RHV) y contiene las sustituciones implicadas en virulencia, patogenicidad, así como los epítomos de anticuerpos neutralizantes (Figura 5) (Coulibaly *et al.*, 2005; Dormitorio *et al.*, 1997; van Loon *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 1996a). La RHV de la proteína está ubicada entre las posiciones 206-350 de la poliproteína (Bayliss *et al.*, 1990). Contiene 2 picos hidrofílicos mayores en las posiciones 212-224 (pico A) y 314-325 (Pico B). Existen dos picos menores ubicados en las posiciones 248-252 y 279-290 denominados 1 y 2 respectivamente (Durairaj *et al.*, 2011; van den Berg *et al.*, 1996). Conformacionalmente, el dominio P, contiene 4 bucles P_{BC}, P_{HI}, P_{DE} y P_{FG} dos de ellos, P_{DE} y P_{FG}, relacionados con la virulencia y tropismo celular, y los otros dos, P_{BC} and P_{HI}, relacionados con la antigenicidad de IBDV (Qi *et al.*, 2009) (Figura 5).

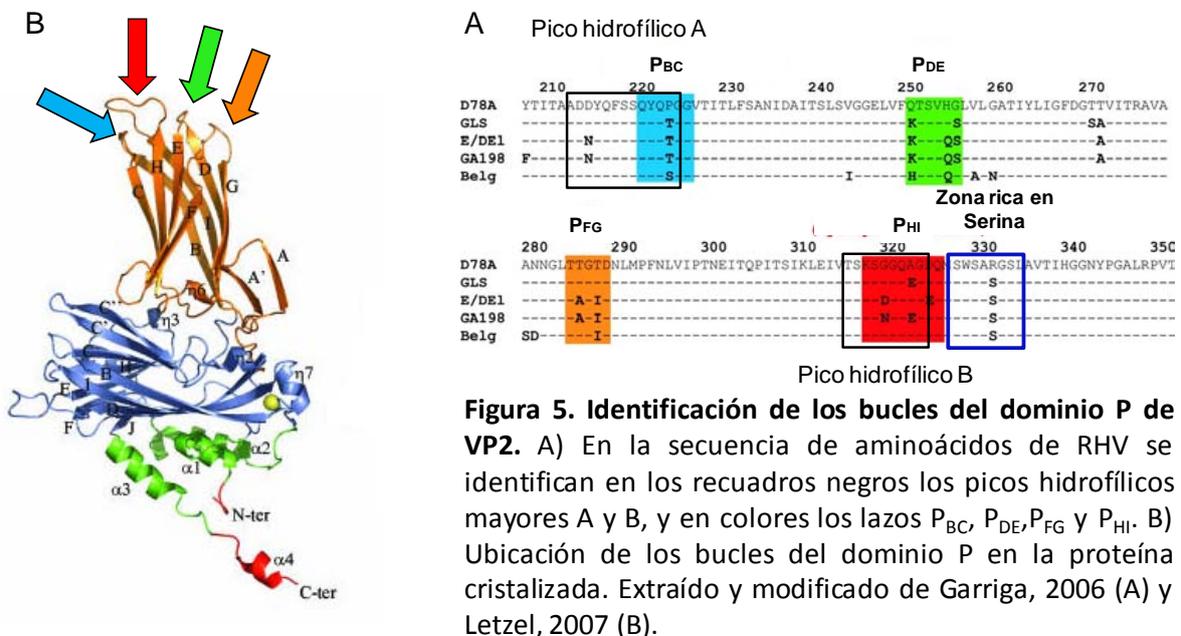


Figura 5. Identificación de los bucles del dominio P de VP2. A) En la secuencia de aminoácidos de RHV se identifican en los recuadros negros los picos hidrofílicos mayores A y B, y en colores los lazos P_{BC}, P_{DE}, P_{FG} y P_{HI}. B) Ubicación de los bucles del dominio P en la proteína cristalizada. Extraído y modificado de Garriga, 2006 (A) y Letzel, 2007 (B).

La proteína estructural VP3 de 257 aminoácidos (33 KDa) desempeña un papel multifuncional e interacciona con la pVP2 en el proceso de morfogénesis de la cápside y con otras proteínas del virión (Ferrero *et al.*, 2015; Ona *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2001). Se trata de una proteína clave en la organización y ensamblaje viral, así como en el empaquetamiento del genoma. Esta proteína que si bien es estructural, no induce la producción de anticuerpos neutralizantes (Pitcovski *et al.*, 1999), es considerada como un antígeno específico de grupo de ambos serotipos (Mahardika and Becht, 1995). Los birnavirus deben suplir la carencia de la cápsida T=2 mediante algunos de sus componentes estructurales. En este contexto, la interacción de VP3 con la polimerasa VP1 así como con el dsRNA viral apunta a un papel fundamental en la organización funcional de la cápside de IBDV tanto a nivel morfogénico como en el contexto de la transcripción y replicación del genoma viral (Ahlquist *et al.*, 2005; Tacken *et al.*, 2000).

La región implicada en esta interacción corresponde a una secuencia de 16 aminoácidos altamente cargada en la región C-terminal (carboxilo terminal) de VP3 (residuos 241 a 256). Esta secuencia es suficiente para determinar la interacción entre ambas proteínas *in vitro*, así como para interferir en la producción de virus *in vivo* (Maraver *et al.*, 2003). Por otra parte, la interacción *in vitro* entre VP3 y el ARN no es dependiente de secuencias específicas, lo que es consistente con el posible papel que juega VP3 como “andamio” al cual se unen los demás componentes del virión para formar una estructura estable (Kochan *et al.*, 2003).

También se ha demostrado que esta proteína tiene la capacidad de inhibir la respuesta inmune innata mediante el bloqueo de la unión del dsRNA con ciertos receptores enzimáticos (MDA5) en el citoplasma de la célula del hospedador (Busnadiego *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2014).

La VP4 es el más pequeño de los polipéptidos resultantes. Con un peso molecular de 27 KDa, comporta un total de 243 aminoácidos y se encarga del

procesamiento cotraduccional de la proteína. Este polipéptido no es estructural y presenta actividad proteolítica la cual está involucrada en el autoprocesamiento de la propia poliproteína para resultar en pVPX, VP3 y VP4 (Hudson *et al.*, 1986; Kibenge *et al.*, 1997; Muller and Becht, 1982). Así mismo procesa la región C-terminal de pVPX para generar la VP2 en su forma madura (Petit *et al.*, 2000).

Frente a la infección por IBDV la célula hospedadora reacciona de modo que se activan mecanismos de defensa enzimático intracelular que pueden o no detener el proceso de infección. La proteína VP4 tiene un papel importante en este proceso debido a que se implica en el mecanismo de enzimas catalizadoras (CypA) e inhibe la replicación viral (Wang *et al.*, 2015). A pesar de que no está del todo esclarecido el mecanismo molecular de como IBDV produce inmunosupresión, se ha demostrado que VP4 es un supresor del interferón tipo I que por interacción con la leucina inducida por glucocorticoides (*Glucocorticoid-induced leucine zipper protein*, GILZ) una proteína presente en la célula del hospedador, inhibe las respuestas celulares en la infección viral (Li *et al.*, 2013).

En esta proteína se encuentran sitios conservados de Serina (652) y Lisina (692) que son críticos para la actividad catalítica de VP4. La serina representa el residuo nucleofílico y la lisina el sitio catalítico. Estas dos sustituciones aminoacídicas se encuentran en todos los Birnavirus (Lejal *et al.*, 2000).

La VP5 es una proteína no estructural, con 145 aminoácidos y 17KDa ubicados a la altura de los aminoácidos 69-88 de la poliproteína (Tacken *et al.*, 2003). Su región codificante se solapa casi totalmente con el gen de la poliproteína, correspondiendo la primera base del codón del gen de la poliproteína a la tercera base del gen VP5. Esta proteína es muy conservada entre las diferentes cepas de IBDV (Mendez *et al.*, 2015). Predicciones de topología obtenidas mediante técnicas de fluorescencia (*Fluorescence Protease Protection*, FPP) muestran que VP5 es una proteína intracelular asociada a la membrana plasmática (Carballeda *et al.*, 2015).

La información en cuanto a las funciones que desempeña VP5 son controvertidas. Estudios primarios describen VP5 como un polipéptido con propiedades proapoptóticas y no esencial en el ciclo viral (Mundt *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 1998). Posteriormente se ha demostrado en virus mutantes deficientes en VP5 que la capacidad de replicación de estos virus se reduce considerablemente (Lombardo *et al.*, 2000; Mundt *et al.*, 1997) y que la expresión de VP5 aumenta el tamaño de la progenie del virus y promueve la liberación de virus (Liu and Vakharia, 2006; Qin *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 1998). Se ha observado que en fases tempranas de infección VP5 bloquea el mecanismo de muerte celular a través de la vía enzimática PI3K/AKT (Liu and Vakharia, 2006; Wei *et al.*, 2011), mediada por su extremo C-terminal electropositivo para favorecer la replicación viral (Méndez *et al.*, 2015). Al final del proceso de infección, VP5 se acumula en la membrana celular para formar estructuras porosas de diferente calibre y termina con la lisis de la misma y la liberación del virus (Lombardo *et al.*, 2000).

VP5 participa en la difusión de célula a célula, y la pérdida o ablación de la cola del extremo C-terminal provoca una reducción significativa de la progenie viral (Méndez *et al.*, 2015). Todos estos hallazgos indican que VP5 es un importante factor de virulencia y puede jugar un papel clave en la patogénesis viral.

Por último, la VP1 es una proteína de 878 aminoácidos (90 KDa). Es una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y es responsable de la replicación del genoma y de la síntesis de mARN. Estructuralmente, la VP1 contiene 3 regiones. La región N-terminal (1-67 Aminoácidos) responsable de la actividad de cebado de la proteína, la región central (168-658 aminoácidos) que contiene todos los motivos estructurales de la RdRp y finalmente la región C-terminal (659-878 aminoácidos), región altamente conservada en virus de la familia Birnaviridae que tiene la función de prevenir los errores (*back-primed*) durante el cebado de la proteína (Garriga *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2007).

La VP1 se encuentra asociada covalentemente a los extremos 5' de ARN genómico e interacciona con VP3, formando un complejo ribonucleoproteico (Lombardo *et al.*, 1999; Tacken *et al.*, 2000). Inicialmente se suponía que la polimerasa requería de la interacción con VP1 y VP3, así como sucede en otros virus ARN de doble cadena (Patton *et al.*, 1997), más tarde se tendría certeza de que VP1 es la polimerasa del virus (von Einem *et al.*, 2004) y que es capaz de realizar funciones de transcripción (Yu *et al.*, 2013) y de replicación del genoma bisegmentado (Pan *et al.*, 2007; von Einem *et al.*, 2004) debido a que cuenta con actividad de autoguanililación (Pan *et al.*, 2009; Shwed *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2004).

Estudios de la estructura tridimensional también han permitido dilucidar algunas funciones biológicas y mecanismos catalíticos de la enzima (Pan *et al.*, 2007). La estructura de la enzima es similar a la de una mano derecha con una palma, 4 dedos y un pulgar especialmente notorio. La región de la palma muestra un centro muy conservado de cuatro cadenas de hojas β con siete motivos denominados hoy en día y con el orden modificado: Motivo C, Motivo A, Motivo B, Motivo D, Motivo E, Motivo F y Motivo G (Duncan *et al.*, 1991; Gorbalenya *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2007; Shwed *et al.*, 2002). Se sugiere que el reconocimiento de nucleótidos es llevado a cabo por los Motivos A, B y F; la coordinación del catabolismo de iones, Motivo A y Motivo C; guardar la integridad estructural de la palma, Motivo D; cebado de nucleótidos y posicionamiento del dedo pulgar relativo a la palma, Motivo B, F y G (Garriga *et al.*, 2007; Letzel *et al.*, 2007b; Pan *et al.*, 2007). Adicionalmente el Motivo G participa en las funciones de autoguanililación durante el proceso de cebado de la proteína y por ello las partículas virales de los Birnavirus son transcripción-competente, y son capaces de producir mensajeros virales (Shwed *et al.*, 2002).

El uso de virus recombinantes utilizando el segmento A y B provenientes de virus con distinta patogenicidad han confirmado que esta proteína es capaz de modular

la virulencia *in vivo* (Liu and Vakharia, 2004). En otros virus estudiados, los cambios que se puedan dar en la polimerasa son asociados con cambios en la replicación y patogenicidad (Murayama *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2013)

El estudio molecular de VP1 confirma que una simple sustitución en la posición 4 de VP1 ubicada en la Región N-Terminal cambia el comportamiento del virus tanto *in vivo* como *in vitro* (chicken embryo fibroblast, CEF) (Yu *et al.*, 2013). Estos resultados también se apoyan en análisis de filogenia de RdRp que revelan que las cepas de IBVD muy virulentas, se agrupan en una sección diferente frente a las VP1 de todas las otras cepas. Esto se asocia con que esta proteína implica dentro de sus funciones un papel de virulencia (Alfonso-Morales *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2013) (Figura 6).

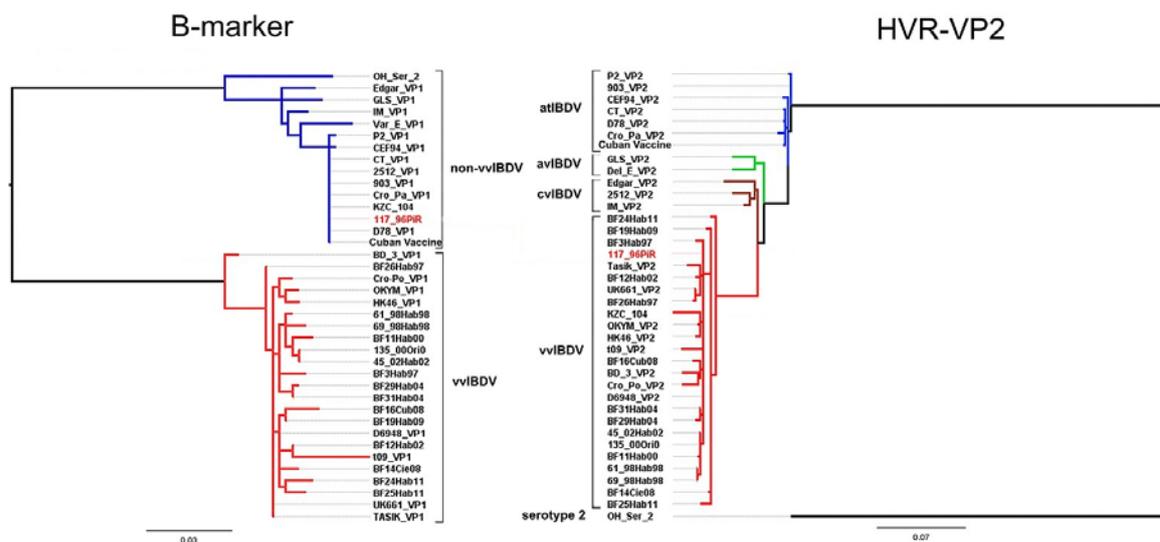


Figura 6. Filogenia parcial del segmento B y de la proteína Vp2. Relación de la filogenia de la RHV de VP2 frente a un fragmento del segmento B denominado "Marcador B". Figura extraída y modificada de Morales, 2015.

3. Diversidad antigénica y patotípica

Las secuencias de las cepas de campo que se vienen analizando demuestran que los patotipos están altamente diseminados en el mundo. Las altas tasas de mutación de los virus ARN y la alta presión de selección generada por los

intensos programas de vacunación de las aves, trae como consecuencia la emergencia de nuevos virus con nuevas propiedades que les permiten subsistir en las poblaciones inmunizadas aunque estén limitados en el tiempo y en el espacio y bajo condiciones particulares (Domanska *et al.*, 2004; Ikuta *et al.*, 2001; Jackwood *et al.*, 2006).

Tres criterios pueden ser utilizados para la caracterización de cepas del IBDV: antigenicidad, la relación genética y la patogenicidad.

3.1 Variación antigénica

Existen 2 serotipos antigénicos de IBDV obtenidos mediante pruebas de neutralización con paneles de anticuerpos monoclonales (*monoclonal antibodies*, Mabs) (Snyder *et al.*, 1988; Van der Marel *et al.*, 1990). El serotipo 1 es patogénico para pollos y el serotipo 2, aunque puede ser aislado tanto de pollos como de pavos, no se considera virulento para estas dos especies (Jackwood and Saif, 1987; McFerran *et al.*, 1980).

Dentro del serotipo 1, se reconocen dos grupos antigénicos: los virus clásicos (también llamadas estándares) y los virus variantes. La variación antigénica dentro del serotipo 1 se viene demostrando desde los años 80 con la aparición de las cepas variantes americanas que fueron capaces de provocar la enfermedad a pesar de las inmunizaciones con vacunas basadas en cepas estándares disponibles hasta ese momento, lo que indujo a pensar que estos nuevos virus eran antigénicamente diferentes (Durairaj *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2015).

Sapats y *col.* indican la presencia de dos grupos variantes antigénicamente dentro del serotipo 1 australiano que no están relacionadas con las cepas clásicas y variantes americanas (Sapats and Ignjatovic, 2002). Más tarde Jackwood y *col.* reportan la identificación de cepas de IBD genéticamente relacionadas con variantes americanas originarias de Francia y España que fueron aisladas de

aves asintomáticas pero fueron casos relacionados con inmunosupresión (Jackwood *et al.*, 2006).

En España concretamente, todas las cepas que se han venido identificando desde los 90 (Majó *et al.*, 2002) están relacionadas genéticamente con cepas atenuadas de virulencia intermedia que son utilizadas en la inmunización de las aves y con cepas muy virulentas (Dolz *et al.*, 2005). Sin embargo, controles genéticos rutinarios de las explotaciones avícolas evidencian la circulación de virus atípicos (Información no publicada). Más tarde estudios de patogénesis confirmarían que se trataba de cepas con un comportamiento similar al de las cepas variantes americanas (Dolz *et al.*, 2010).

Si bien no existen estructuras biológicas o moleculares descritas como responsables de estos cambios, muchos estudios se han dirigido básicamente a las proteínas estructurales del virus (Van den Berg, 2000). Aunque VP3 es una proteína estructural, no contiene epítomos de virus neutralización. A pesar de ello se han identificado 4 dominios antigénicos, y contienen epítomos específicos de grupo y de serotipo (Yamaguchi *et al.*, 1996a).

Es así que estudios extensivos de la proteína VP2 de numerosas cepas de IBDV han confirmado que los cambios en los bucles de la RHV son responsables de la variación antigénica y aunque es ampliamente aceptado que las sustituciones 222, 249, 254 son indicadores de variación antigénica (Brandt *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 2008), no se descarta que existan otros residuos fuera de la región hidrofílica que afecten indirectamente los cambios relacionados con antigenicidad (Durairaj *et al.*, 2011; van den Berg *et al.*, 1996). Adicional a esto cabe mencionar que sustituciones aminoacídicas características de ciertas cepas variantes americanas se están reconociendo en esas cepas atípicas aisladas alrededor del mundo (Durairaj *et al.*, 2011; Jackwood *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2002).

3.2 Variación patotípica

Los virus de IBD también se pueden clasificar en base a su patogenicidad y su poder protectorio (Saif, 2006).

Se distinguen tres patotipos del virus de la enfermedad de IBD dentro del serotipo 1 y se describen refiriéndose especialmente a la virulencia del virus: cepas clásicas, cepas variantes y cepas muy virulentas (Tabla 1).

Tipo de Cepa	Poder Inmunogénico
Cepas clásicas	Causan mortalidad (<20%) y lesiones severas en la Bolsa de Fabricio, con presencia de signos clínicos y son capaces de sobrepasar niveles moderados de anticuerpos maternos.
Cepas hipervirulentas	Causan mortalidad severa (20 al 100%) y lesiones agudas en la Bolsa con marcada sintomatología. Son capaces de sobrepasar niveles más elevados de anticuerpos maternos que las cepas clásicas.
Cepas variantes americanas	Sobrepasan niveles más altos de inmunidad materna causando infección temprana con atrofia severa de la Bolsa y ausencia de signos clínicos, resultando en inmunosupresión. La mortalidad suele ser menor a 5%.

Tabla 1. Patotipos y poder patogénico de IBDV. Tipos patogénicos de IBDV basada en la virulencia de los virus.

Precisamente a finales de los 80 en Europa aparecen nuevas cepas virales de IBD que provocaron la forma aguda de la enfermedad (Chettle and Wyeth, 1989). Estos nuevos virus aislados de aves jóvenes e inmunizadas, mostraron una virulencia más exacerbada a pesar de ser antigénicamente similares a los virus tanto de campo como vacunales reportados hasta entonces (Etteradossi *et al.*, 1992; van den Berg *et al.*, 1991; Van der Marel *et al.*, 1990)

La región implicada en proporcionar estos atributos al patotipo muy virulento reside en RHV de VP2 (Mundt, 1999; Qi *et al.*, 2009; van Loon *et al.*, 2002). Se ha comprobado que principalmente 4 sustituciones se encuentran envueltas en este

aspecto: 253, y 284 ubicadas en los bucles P_{DE} y P_{FG} respectivamente, 279 ubicada en el pico hidrofílico 2 y 330 ubicada en la región rica en serina (Dormitorio *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 1996b). El residuo 330 parece tener influencia en la habilidad para infectar células mientras que los roles que cumplen los residuos 253, 284 y 279 en cuanto a tropismo celular no están del todo claros (Li *et al.*, 2015). Recientemente se ha demostrado que los residuos 249 y 256 ubicados en las regiones P_{DE} y P_{FG} se pueden implicar indirectamente con la eficiencia en replicación viral y se especula que estas sustituciones interactúan con otras para determinar la virulencia (Qi *et al.*, 2013).

Todos estos estudios sugieren que unas pocas mutaciones de aminoácidos en estas posiciones de RHV de VP2 pueden significar un impacto en la virulencia del virus. No obstante, la dificultad de cultivar cepas muy virulentas en fibroblastos de embrión de pollo (CEF), sugiere que VP2 no es el único factor determinante de la virulencia (Boot *et al.*, 2000). Estudios de secuencias genómicas de cepas IBD atenuadas, revelan que existen cambios en otras proteínas del Segmento A que también se pueden relacionar con patogenicidad y virulencia como es el caso de las sustituciones observadas tanto en VP5, (45R, 78F-L, 133W) (Boot *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 2008) como en VP4 (680Y, 685N) y en VP3 990A, 1005A (Kong, *et al.* 2004; Wang *et al.*, 2007).

Así mismo, el análisis de VP1 también provee información genética para una caracterización más precisa. La filogenia de VP1 de varios patotipos se resuelve en dos grupos, por un lado la que proviene de los virus muy virulentos y por otro las provenientes del resto de las cepas y el serotipo 2 (Hon *et al.*, 2006).

En la proteína VP1 se describen dos factores que afectan por un lado la actividad polimerasa y por otro la replicación viral. El aumento de la actividad polimerasa se puede deber a la mutación de una sola sustitución 4V en la región N-terminal (Escaffre *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013) y las variaciones en la capacidad de replicación del virus como tal a la existencia de un triplete TDN en las posiciones

145, 146 y 147 (Gao *et al.*, 2014). Estas dos características también podrían ser indicadores de virulencia. Recientemente ha sido descrito un marcador filogenético de 430 pares de bases incluido en este segmento (Alfonso-Morales *et al.*, 2015), que está ubicado entre el dominio N-terminal y el dominio F. Este marcador se ha asociado con el proceso de cebado de la proteína e interactúa con los dominios de los dedos y el pulgar (Pan *et al.*, 2007) y el dominio F de VP1 que está relacionado con el reconocimiento de nucleótidos así como con el mecanismo de unión a la plantilla de ARN (Alfonso-Morales *et al.*, 2015; Garriga *et al.*, 2007).

En este sentido se puede decir que ambos segmentos podrían inducir variaciones en la virulencia y que es necesario realizar estudios de patogenicidad de los virus para catalogar el poder patógeno de una cepa.

4. Epidemiología de la enfermedad

IBD es una enfermedad que afecta a pollos jóvenes y está ampliamente distribuida por todo el mundo (Lukert and Saif, 1997; van den Berg *et al.*, 1996).

El virus ha sido aislado de forma natural de pollos, pavos (Ogawa *et al.*, 1998), así como de mosquitos (Howie and Thorsen, 1981) y roedores (Park *et al.*, 2010) sin evidencias de ser vectores o reservorios de la enfermedad. También se ha aislado de diversas especies aviares como avestruces (Gough *et al.*, 1997), pingüinos del Ártico (Gardner *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2008). Cabe también remarcar que se detectaron anticuerpos contra IBDV de ambos serotipos en aves salvajes, lo que podría jugar un papel importante en la epidemiología de la enfermedad (Ogawa *et al.*, 1998).

No existe evidencia de mayor incidencia en una época concreta del año. El virus se transmite horizontalmente por contacto directo e indirecto entre aves infectadas y aves susceptibles. Las aves infectadas eliminan el virus a través de las heces y

se difunde rápidamente por las instalaciones. Puede permanecer por meses en las instalaciones avícolas contaminadas y por semanas en el agua, alimento y heces con tendencia a permanecer en las instalaciones e infectando las parvadas subsiguientes. Es resistente a la mayoría de desinfectantes comunes, pero posee alguna susceptibilidad al formol y a los desinfectantes yodados (Trevizoli, 2011).

Existen evidencias de que las larvas del escarabajo *Alphitobius diaperinus* actúa como vector de la enfermedad y puede alojar el virus hasta 8 semanas (McAllister *et al.*, 1995)

La OIE, estima que el IBDV está presente en más del 95% de los países miembros (OIE, 1995). La forma clínica aguda de IBDV ocasionada por cepas muy virulentas, ha sido observada en más del 80% de estos países, en Europa, Asia, África, Sudamérica y Centroamérica. En 2009, fueron reportados los primeros casos de IBD causados por cepas muy virulentas en Estados Unidos afectando lotes de gallinas de puesta y causando altas mortalidades y lesiones patognomónicas en la bursa de Fabricio (Jackwood *et al.*, 2009).

En España específicamente el primer caso de la enfermedad fue reportada en 1991 en una explotación de las Islas Baleares (Pagès *et al.*, 1991). Seguidamente, estudios moleculares confirmaron la infección por cepas altamente virulentas (Majó *et al.*, 2002). Después de un periodo de silencio de la enfermedad se reportó un brote agudo de IBD en la primavera del 2002 en la región noreste de España que se diseminó rápidamente por el resto del país (Dolz *et al.*, 2005). La enfermedad actualmente no se ha erradicado y se siguen reportando casos esporádicos.

5. Patogénesis e inmunosupresión

La susceptibilidad de las aves a infectarse con IBD cubre todo el período de crecimiento (Chettle and Wyeth, 1989; Nunoya *et al.*, 1992; van den Berg *et al.*, 1991). IBDV afecta al sistema inmune de las aves cuyo órgano diana es la Bolsa

de Fabricio que es una fuente específica de linfocitos B IgM inmaduros (Kaufer and Weiss, 1980; Sharma and Fredericksen, 1987). Se ha demostrado que en aves bursectomizadas el virus no es capaz de replicarse (Hiraga *et al.*, 1994). La intensidad de la enfermedad está relacionada directamente con el número de células susceptibles, por tanto la edad de mayor susceptibilidad estaría entre la tercera y sexta semana de vida, donde el número de células inmaduras es mayor (Sharma *et al.*, 2000).

La inmunidad pasiva (los anticuerpos transmitidos de la madre a través de la yema de huevo) puede proteger a los pollitos contra desafíos tempranos de IBDV, resultando protectora contra el efecto inmunosupresivo del virus. El tiempo de vida media de los anticuerpos maternos suele ser de 3 a 5 días (Skeeles *et al.*, 1979).

Las aves se pueden contaminar por vía oral o vía respiratoria, aunque la forma más común sobre todo en condiciones naturales suele ser por vía oral. Tiene un periodo de incubación de 4 días aproximadamente (Van den Berg, 2000).

El virus es detectado a las 5 horas p.i. en los macrófagos y células linfáticas de duodeno, yeyuno y ciego (GAT), los cuales son los primeros sitios de replicación viral (Van den Berg, 2000; Williams and Davison, 2005). A través del tracto intestinal, el virus es transportado hacia otros tejidos por fagocitos. Por vía portal, 5 horas p.i. el virus llega hasta el hígado donde las células de Kupffer fagocitan una gran cantidad de virus y por el torrente sanguíneo llega hasta otros órganos como timo y bolsa de Fabricio. A las 13 horas p.i. muchos folículos bursales son positivos al virus. A las 16 horas p.i. una segunda viremia masiva ocurre (Muller *et al.*, 1979b). Los primeros síntomas son observados a las 64-72 horas p.i. Molecularmente el virus es detectado en la zona córtico-medular de la bolsa, lo cual puede corresponder al sitio de entrada y una vez en la médula el virus es capaz de colonizar todos los folículos (Ivanyi and Morris, 1976).

La cinética de replicación del virus es similar en todos los tipos del IBDV, pero cuanto más virulenta la cepa mayor capacidad de replicación viral lo cual resulta en un incremento en la severidad en los síntomas clínicos en la fase aguda (Van den Berg, 2000). Es ampliamente aceptado que las células diana son los linfocitos B inmaduros ubicados en la región cortical. Sin embargo estudios realizados por Williams and Davison, con IBDV/vv (UK661) demostraron que el antígeno viral fue detectado mayoritariamente en la región medular, donde hay mayor cantidad de linfocitos B maduros y solo después se diseminó por el córtex (Williams and Davison, 2005).

La fase aguda de la infección por IBDV causa un proceso lítico de los linfocitos B IgM y el número sufre una reducción drástica a medida que el virus se replica en los folículos. Este fenómeno es acompañado por la infiltración de células T (CD4 y CD8) alrededor de los sitios de replicación viral en los folículos bursales (Nieper and Muller, 1996; Sharma *et al.*, 2000; Williams and Davison, 2005), desde el primer día de la infección hasta 12 semanas después, habiendo desaparecido ya el antígeno (Sharma *et al.*, 2000). Las células T son resistentes a la infección por el IBDV pero el timo sufre una atrofia marcada y se observa apoptosis de timocitos durante la fase aguda de la infección. Pocos días después de la infección el timo puede retornar a su estado normal (Tanimura and Sharma, 1998).

La destrucción de los linfocitos es más pronunciada en la bolsa de Fabricio, lo que se asocia con la aparición de cuerpos esféricos de 3 a 5 días p.i. en la médula siendo éstos macrófagos activados (Williams and Davison, 2005). Este hecho se relaciona con un incremento de citoquinas inflamatorias reportadas durante la fase aguda de IBD (Kim *et al.*, 1998).

Los folículos linfoides comienzan a ser repoblados por linfocitos B y las aves recuperan la capacidad de producir anticuerpos a los 14 días p.i., pero pocos de esos linfocitos expresaron IgM y IgG detectables con anticuerpos monoclonales

(Kim *et al.*, 1999; Williams and Davison, 2005). Estudios recientes demostraron que la deficiencia de la inmunidad humoral inducida por el IBDV es reversible a partir de las 12 semanas p.i. y esa capacidad es paralela a la recuperación de la población de los folículos bursales. Si bien los virus tiene acción citolítica sobre los linfocitos B se cree que no es la única razón por la que las aves tienen la capacidad disminuida de generar anticuerpos sino que puede tener acciones sobre el funcionamiento normal de las células presentadoras de antígeno y sobre células T, tema que necesita ser más investigado (Sharma *et al.*, 2000).

6. Sintomatología clínica y lesiones

La severidad de los síntomas y las lesiones dependen de la virulencia del virus infectivo y del estado inmune de las aves infectadas. Existen dos formas de presentación de la enfermedad: la forma clínica y la forma subclínica.

6.1 Formas de presentación de la enfermedad

En la forma clínica se diferencian dos fases: la fase aguda (entre las 24 horas y los cuatro días p.i.), donde las lesiones observadas son de tipo inflamatorio, y la fase crónica (de los cinco a los diez días p.i.) caracterizada por lesiones degenerativas. La fase aguda se caracteriza por el rápido desarrollo de la enfermedad, surgimiento súbito de depresión, los animales se muestran anoréxicos, postrados y sin movimiento, con erizamiento de las plumas, diarrea frecuentemente acuosa y blanquecina y posteriormente mueren (Cosgrove, 1962).

La mortalidad y la morbilidad se empiezan a manifestar a los 3 días post infección, alcanza su pico y baja luego entre los 5 y 7 días. Cuando se trata de infecciones por cepas clásicas lo más común es encontrar mortalidades de hasta 20%. Generalmente las aves que mueren están deshidratadas (lo que causa lesiones renales). La sintomatología causada por infección de IBDV/vv es semejante a la causada por cepas convencionales del serotipo 1, pero la fase aguda es más exacerbada, generalizada y con mortalidad más elevada pudiendo llegar hasta un

90% (Van den Berg, 2000). La forma subclínica ocurre en aves expuestas al IBDV durante las 2 primeras semanas de vida y que tienen suficiente inmunidad maternal en el momento de la infección que previene la manifestación de la enfermedad clínica pero no la replicación del virus en la Bolsa.

Se caracteriza por atrofia de la Bolsa e inmunosupresión que resulta en aumento en la susceptibilidad a infecciones secundarias. Las infecciones secundarias (principalmente por *E. coli*) resultan en un continuo aumento en la tasa estándar de mortalidad diaria y una mala conversión alimenticia. No se observa un pico en la mortalidad como se evidencia en la infección clínica. Debido a la inmunosupresión puede haber una mala respuesta a vacunaciones posteriores.

6.2 Lesiones macroscópicas

A la necropsia de las aves muertas en fase aguda (desde las 24 horas hasta los 4 días p.i.) se observa que la bolsa de Fabricio se encuentra turgente, edematosa, con presencia de petequias en la mucosa y con un aumento considerable de tamaño, resultando posteriormente atrófica (entre 7 y 10 días p.i.) pudiendo alcanzar hasta una tercera parte de su tamaño normal. Esta atrofia puede ser más rápida después de una inoculación experimental (Tsukamoto *et al.*, 1992). Además, se observa un cuadro de nefritis a causa de la deshidratación y acumulación de uratos en los túbulos renales.

Las lesiones macroscópicas y microscópicas del IBDV/vv son similares a las lesiones causadas por virus clásicos, pero la fase aguda es más severa y más generalizada en la parvada.

En los músculos en general y en la mucosa del proventrículo se pueden observar hemorragias equimóticas y erosiones. En especial, en las aves afectadas con cepas IBDV/vv se observan frecuentemente lesiones hemorrágicas en los músculos pectorales y en los muslos debido al deterioro del mecanismo de la coagulación (Skeeles and Lukert, 1980). Particularmente la atrofia del timo se

asocia con la fase aguda de la enfermedad y podría tomarse como un indicativo de la virulencia del virus en cuestión aunque no esté asociado con la replicación viral extensiva en timocitos (Sharma *et al.*, 1993).

En casos de aves infectadas con cepas variantes se observó que el virus no indujo inflamación y se caracterizaron por la acentuada atrofia de la bolsa y las mortalidades bajas (5%) (Sharma *et al.*, 1989).

6.3. Lesiones microscópicas

Histológicamente se observa una alteración estructural del tejido caracterizada principalmente por la intensa depleción de linfocitos, provocada por necrosis y por apoptosis, inducidas por el virus, ya que estas células son particularmente susceptibles (Nieper *et al.*, 1999). En reemplazo se observa abundante infiltración heterófila y macrofágica (tanto en la bolsa como en otros órganos) (Tanimura *et al.*, 1995), hemorragias multifocales y edema, lesión que se observa muy escasamente en casos infección por cepas variantes (Sharma *et al.*, 1989). Cuando se trata de bolsas afectadas por virus variantes se nota claramente la ausencia de inflamación severa, pero se observa necrosis del tejido linfoide. La re-población del tejido linfoide no se produce hasta 7 días después de la infección.

En estados avanzados de la enfermedad, se observan cavidades, tanto en médula como en la región cortical, conteniendo material necrótico, fagocitosis de heterófilos y células plasmáticas (Lukert and Saif, 1997).

Los trombocitos también constituyen un blanco de IBDV y la enfermedad aguda se caracteriza por hemorragias diseminadas probablemente relacionadas por un daño en el mecanismo de coagulación (Skeeles *et al.*, 1980).

Las cepas muy virulentas causan, además de las lesiones en la Bolsa, lesiones severas en otros órganos linfoides como el timo, las tonsilas cecales y el bazo, tejido linfoide asociado al intestino (GALT), e incluso el tejido linfoide asociado a la

cabeza (HALT) como en glándula de Harder y tejido linfoide asociado a la conjuntiva.

7. Diagnóstico de la enfermedad

La enfermedad puede ser diagnosticada presuntivamente por medio de la sintomatología y lesiones macroscópicas de la Bolsa de Fabricio. Sin embargo, es necesaria la aplicación de técnicas laboratoriales para el diagnóstico definitivo.

El aislamiento y la identificación del agente proporcionan el diagnóstico más certero en IBD, pero habitualmente no se realiza con fines de diagnóstico rutinario pues el virus puede resultar difícil de aislar (Lukert, P. D. and Saif, Y. M. (1997).

En la práctica, el diagnóstico de laboratorio de IBD depende de la detección de anticuerpos específicos inducidos por el virus o de la detección del virus en los tejidos, utilizando métodos inmunológicos o moleculares.

Diversas pruebas pueden ser utilizadas para la detección de anticuerpos contra IBDV. Las más utilizadas son: AGP (Aglutinación en placa), SN (Suero neutralización), el test de ELISA (Inmunoensayo ligado a enzimas).

a) Identificación mediante la prueba de precipitación en Agar-gel (AGP)

La prueba de AGP es la prueba serológica más ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos específicos en el suero, o para detectar los anticuerpos o el antígeno vírico en el tejido bursal (no diferencia los serotipos) y no es cuantitativo. Las pruebas cuantitativas de inmunodifusión en gel de agar, puede resultar muy útil para medir los anticuerpos maternos o vacunales y para decidir sobre cuál puede ser el mejor momento para la vacunación (Etteradossi *et al.*, 1999). Sin embargo, esta prueba de determinación cuantitativa se ha reemplazado en la actualidad, en gran medida por el ELISA.

b) Pruebas de neutralización vírica

Las pruebas de virus neutralización se llevan a cabo en cultivo celular. La prueba es más laboriosa y costosa que la prueba de AGP, pero es más sensible para detectar anticuerpos y puede diferenciar los serotipos. Se debe enfatizar que existe una variedad de pruebas serológicas disponibles para la detección del virus y sus anticuerpos, pero sólo la técnica NV puede diferenciar entre serotipos y variantes. Adicionalmente los resultados de este tipo de pruebas correlacionan razonablemente bien con la inmunogenicidad del virus.

c) Identificación mediante enzimoimmunoensayo de captura antigénica (AC-ELISA)

Esta técnica se puede usar como técnica de diagnóstico valorando los títulos de anticuerpos, es más utilizada como un auxiliar de diagnóstico, para evaluar los programas de vacunación, la vacuna utilizada o el proceso de vacunación en sí. (Di Fabio, 2001).

Existen diversos protocolos para detectar virus del serotipo 1 de IBD utilizando un enzimoimmunoensayo de captura antigénica (AC-ELISA) (Ashraf *et al.*, 2006 ; De Wit, 2006) con anticuerpos específicos del IBDV. Dependiendo del protocolo AC-ELISA elegido, el anticuerpo de captura puede ser un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IBDV (MAb), o una mezcla de tales MAbs, o un suero policlonal de pollo anti-IBDV post-infección, por lo que los resultados generados en diferentes laboratorios pueden ser variables (Eterradossi and Saif, 2008).

Para la detección del agente viral se cuenta con técnicas como:

d) Identificación mediante técnicas moleculares

Anteriormente se practicaba RT/PCR-RFLP (*Reverse transcription polymerase chain reaction*, RT/PCR-*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) para la diferenciación de cepas con varios conjuntos de enzimas de restricción, obteniendo así un patrón de bandas diferentes para cada grupo molecular

(Jackwood and Jackwood, 1994). Debido a que en la actualidad se conoce que la virulencia de las cepas no solo está definida por VP2, se han descrito técnicas RT-PCR /RFLP que son capaces de discriminar cepas muy virulentas de cepas clásicas (Islam *et al.*, 2012), son sin duda herramientas que aportan información en el diagnóstico de IBDV. Sin embargo, todavía es necesario definir y validar los sitios de restricción relacionados con la virulencia, sumado a esto la desventaja que no aporta información acerca de la antigenicidad de las cepas. Es muy poco utilizada en la actualidad.

Dentro de los métodos moleculares existe una amplia aceptación de que el análisis de la RHV del gen VP2 del virus, es la región indicada para la identificación de los diferentes virus. La técnica más usada actualmente es la RT-PCR (Jackwood, 2006; Lin *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1992), con el uso de cebadores específicos para obtener un fragmento de tamaño definido, seguido de la secuenciación de nucleótidos y filogenia. Ambos constituyen la alternativa molecular más válida para la genotipificación de las cepas IBDV, no solo por la información detallada que nos proporciona la técnica sino también porque se puede utilizar información contenida en un banco de genes y se puede establecer mejor la relación genética de las mismas.

e) Histología e inmunohistoquímica

La identificación del virus con anticuerpos monoclonales o policlonales marcados son potencialmente útiles para el diagnóstico rápido y definitivo de la enfermedad infecciosa de la bolsa (Cho *et al.*, 1987). La valoración del estado histológico de la bolsa, proporciona un resultado inicial importante para el diagnóstico de IBD, donde el grado de inflamación, fibrosis, involución del tejido, hemorragia y depleción linfocitaria son parámetros significativos de daño bursal, siendo este último el aspecto más importante a considerar.

8. Control y prevención

La vacunación es el método más efectivo de prevención de IBD en las parvadas. Para establecer un programa efectivo de control de la enfermedad deben tomarse en cuenta los siguientes factores:

- Tipo de explotación avícola, edad de las aves y el estado sanitario de las mismas.
- Identificación y caracterización antigénicas e inmunogénicas de las cepas de IBDV presentes en el área y el grado de desafío en el campo
- Determinación del grado de virulencia de las cepas existentes.
- Reconocimiento de otros agentes infecciosos y no infecciosos que estén actuando como agentes inmunosupresores.

8.1 Tipos de vacunas

En la actualidad se utilizan distintos tipos de vacunas en la prevención de la enfermedad: vacunas que contienen IBDV vivo atenuado, vacunas con IBDV inactivado, vacunas recombinantes que contienen la proteína VP2 de IBDV y vacunas que contienen inmunocomplejos antígeno-anticuerpo. Los virus más utilizados en la producción de vacunas son los virus pertenecientes al serotipo 1.

a) Vacunas vivas

Estas vacunas tienen el poder de inducir inmunidad celular y humoral en las aves. Las vacunas con virus activo atenuado confieren una amplia protección y son de larga duración sin embargo su espectro antigénico puede variar y el virus puede conservar restos de patogenicidad, además puede presentar el riesgo de revertir a virulencia (Xu *et al.*, 2011) o transmitirse de forma horizontal y vertical, de acuerdo con el virus original, el grado de atenuación y el método de fabricación (Schijns and Brewer, 2008).

Las vacunas vivas clásicas han evolucionado desde que se crearon y se clasifican según grado de atenuación y por tanto de su capacidad de sobrepasar la

Tipo de Cepa	Poder Inmunogénico
Cepas Suaves	Son cepas altamente atenuadas, las cuales sobrepasan niveles muy bajos de inmunidad maternal y por lo general no son utilizadas en la avicultura moderna
Cepas Intermedias	Son cepas atenuadas que sobrepasan niveles de inmunidad maternal de $<6 \log_2$
Cepas Intermedias Plus	Son cepas atenuadas que sobrepasan niveles de inmunidad maternal de $<8 \log_2$

inmunidad maternal y generar inmunidad activa: vacunas suaves, vacunas intermedias y vacunas plus o también llamadas calientes (Rautenschlein *et al.*, 2005).

La inherente patogenicidad de las vacunas vivas es una desventaja potencial, especialmente de las vacunas intermedias plus y más aún para las vacunas basadas en cepas calientes, las cuales nunca deben ser aplicadas durante los primeros 10 días de edad o podría resultar en daño bursal e inmunosupresión.

b) Vacunas inactivadas

Estas vacunas son utilizadas para estimular anticuerpos uniformes, consiguiendo títulos elevados y duraderos. Normalmente se producen en huevos embrionados pero se pueden producir en cultivos celulares o bolsas de Fabricio. Estas vacunas se administran para reforzar la inmunidad de los reproductores. Un nivel alto de inmunidad en los reproductores resulta en niveles altos de anticuerpos maternos en la progenie.

c) Vacunas de nueva generación

- *Vacunas de complejos virus-anticuerpos*

Se trata de vacunas en las cuales los anticuerpos (inmunoglobulinas) específicos se mezclan en una concentración adecuada con el virus vacunal (Whitfill *et al.*, 1995). El proceso resulta en una vacuna de un complejo virus-anticuerpo (complejo inmune). La cantidad de anticuerpos en el complejo es tan pequeña que no se añade a la inmunidad maternal o neutraliza el virus. Por otra parte, la cantidad de anticuerpos añadidos al complejo es suficiente para atrasar por varios días el curso normal de replicación del virus vacunal. Esto permite la administración segura y el uso de cepas vacunales moderadamente atenuadas in ovo a los 18 días de edad (Negash *et al.*, 2004).

- *Vacunas HVT recombinantes*

El concepto de vacunas recombinantes es el de insertar genes de epítomos inmunogénicos críticos de un agente infeccioso en genes no esenciales de un virus vector. En el caso de IBD, se han diseñado vacunas recombinantes conteniendo el gen VP2 utilizando como vector al virus de Marek (MDV) (Tsukamoto *et al.*, 1999), al virus de la enfermedad de New Castle (NDV) (Huang *et al.*, 2004) pero el que se comercializa actualmente es el recombinante en virus Herpes del pavo (HVT)(Darteil *et al.*, 1995).

- *Otros sistemas*

La producción de vacunas de subunidades utilizando sistemas de baculovirus han demostrado su eficacia frente a las cepas estándar y variantes antigénicas (Dybing and Jackwood, 1998). Algunos autores han demostrado también que con vacunas de subunidades expresadas en sistema de *E. coli*, se induce protección en la aves, reduciendo las mortalidades, mas no el daño bursal frente a cepas IBDV/vv (Omar *et al.*, 2006). Actualmente se están desarrollando sistemas de vegetales transgénicos que incorporan el gen VP2 en su composición. Los

resultados obtenidos en aves SPF han sido favorables confiriendo excelente protección, casi comparables con la aplicación de vacunas vivas (Giambrone, 2006).

A pesar de que se ha comprobado que la mayoría de estas nuevas vacunas funcionan a nivel experimental, no son tan efectivas como las vacunas convencionales en el campo, debido a que no se conoce exactamente la base molecular de la inmunogenicidad del virus (Saif, 2006) y a que únicamente se trabaja con el gen VP2. Además, se tiene como inconveniente que los métodos son excesivamente caros para su producción en cantidades industriales, por lo que no se dispone de estas vacunas comercialmente.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Debido a que IBDV es un virus cuyo genoma está compuesto por ARN, posee un alto potencial de variación genética, lo que le permite evolucionar y adaptarse a nuevas condiciones ambientales o área geográfica. Así, aunque las variaciones en virulencia se han asociado mayoritariamente a cambios nucleotídicos en la RHV, específicamente en los picos hidrofílicos, numerosos estudios han demostrado que las demás proteínas que codifican el segmento A y B también participan en la definición de virulencia.

Con estos antecedentes, tenemos la hipótesis de que los virus detectados a inicios de los 90 que causaron el brote agudo de IBD han evolucionado desde entonces y se han ido diversificando, originando nuevos linajes con características genéticas distintas. Por esta razón, el objetivo principal de esta tesis es profundizar en la epidemiología molecular del virus de IBDV.

Objetivos específicos:

1. Clasificar las cepas circulantes de IBDV mediante la caracterización molecular y filogenia basada en la RHV de la VP2.
2. Elaborar la reconstrucción filogeográfica basada en la proteína VP2 para elucidar el posible origen de los linajes y la dinámica de dispersión de los mismos.
3. Caracterizar genéticamente las cepas de IBDV circulantes mediante la secuenciación completa del genoma.

Capítulo II

Estudio 1

Caracterización molecular y análisis filogenético basados en la región hipervariable de la proteína VP2 del virus de la Bursitis infecciosa aviar de origen español desde 2000 hasta 2015

Introducción

La IBD es una enfermedad que afecta al órgano inmunitario más importante de las aves en su fase de maduración, por lo cual la infección por cepas del serotipo 1, muy virulentas, cepas clásicas, y cepas variantes americanas de este birnavirus, resulta en un estado de inmunosupresión de los individuos afectados (Van den Berg *et al.*, 2000).

La proteína VP2 ha sido el blanco de muchos estudios desde el punto de vista antigénico y de virulencia ya que cuenta con una región hidrofóbica delimitada por dos pico mayores hidrofílicos A y B, donde se encuentran los residuos implicados en antigenicidad y virulencia (van den Berg *et al.*, 1996). La cristalización de esta proteína nos ha permitido reconocer en la región RHV de VP2, 4 regiones, los bucles P_{BC}, P_{DE}, P_{FG} y P_{HI} ubicadas en el dominio P, las cuales son las más susceptibles al cambio por ser las partes más expuesta de la proteína (Coulibaly *et al.*, 2005). Así, un pequeño cambio en la RHV puede ser suficiente para hacer variar la antigenicidad de las cepas (Adamu *et al.*, 2013; Heine *et al.*, 1991; Jackwood *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2002) y permitirle el escape a los anticuerpos neutralizantes (Heine *et al.*, 1991; Jackwood *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2002). Diversos estudios han establecido esas diferencias, las cuales se encuentran representadas por residuos específicos (222T, 249K, 286I y 318D) que intervienen en la antigenicidad (Jackwood, 2012) y se han designado ciertas sustituciones que influyen en el comportamiento patotípico de las cepas como marcadores de la virulencia (222A, 242I, 256I, 294I y 299S) (Hernández *et al.*, 2015).

Esta bastante documentado que la presión de selección ocasionada por los intensos programas de vacunación implementados en los establecimientos avícolas puede ser una causa de emergencia de nuevos virus, y aunque

perteneciendo a un subtipo específico, pueden mostrar rasgos diferentes en comparación con las cepas modelo de cada subtipo (Martin *et al.*, 2007).

En el presente estudio se realiza la caracterización filogenética de los virus IBD detectados en territorio español en un período de 25 años. Mediante el análisis de secuencias de una región crítica como es la RHV de VP2, plasmamos la relación de los virus detectados con cepas de referencia mundial y a su vez establecemos el perfil de posibles nuevos aislados diferentes a los comúnmente encontrados en España.

Materiales y métodos

Muestras

En el estudio se han incluido 967 casos positivos en los cuales se detectó IBDV a partir de muestras frescas de bursa de Fabricio y de frotis en tarjetas FTA[®] (Flinders Technology Associates), procedentes de pollos y gallinas de puesta comercial de diferentes regiones de España. Las muestras fueron procesadas en laboratorios del CESAC (Centre de Sanitat Avícola de Catalunya) y del CReSA (Centre de Recerca en Sanitat Animal). Todos los casos fueron nombrados como IBD, seguido del número de caso y el año de la detección.

Extracción del ARN, amplificación por RT-PCR y secuenciación

El ARN viral fue extraído en dos fases, una primera fase de extracción se realizó de forma manual empleando solución D (Chomczynski and Sacchi, 1987) y una segunda empleando un kit de extracción comercial (Nucleo Spin[®] RNA Virus, Macherey-Nagel). El ARN fue eluído en un volumen de 50 µl de agua DEPC. Para la reacción de retrotranscripción (RT) el producto de extracción fue desnaturalizado a una temperatura de 70°C durante 5 min.

Cada reacción RT contenía 2µl del ARN extraído, 2µl del oligonucleótido GUM R, ubicado desde la posición 1194 hasta 1212 de acuerdo a la numeración del

sistema de Bayliss (Bayliss *et al.*, 1990; Dolz *et al.*, 2005) a una concentración de 10µM, 10µl de agua DEPC y 8 µl de la mezcla de RT que contenía, 40U RNase OUT (Invitrogen Life Technologies), 100 mM de dNTPs (Ecogen S.R.L), 50U de MMLV Retrotranscriptasa (Ecogen S.R.L.) y 2,35 µl de agua DEPC, la mezcla fue incubada a 42° C durante 1 h, y 70°C durante 10 min.

Se amplificó mediante PCR una región de 480 nucleótidos ubicada en la región hipervariable de la proteína VP2. Los *primers* utilizados para esta amplificación fueron: el cebador *forward* denominado GUM-F ubicado desde la posición 733 hasta 750, de acuerdo al sistema de Bayliss et al. (Bayliss *et al.*, 1990) y el cebador *reverse* GUM-R. El cDNA fue amplificado en un volumen de 50 µl., utilizando 10µl del producto de la reacción de transcripción reversa y una mezcla de 40µl conteniendo 3µl de Cl₂Mg 25mM (Promega), 2,5µl de cada cebador a una concentración de 10µM, 0,4µl de dNTPs 100mM total, 0,5µl Taq DNA Polimerasa 5U/µl (Promega), 5µl Buffer 10X y 26,1 µl de agua DEPC. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C durante 5 min., 35 ciclos a 94°C por 30 seg., 56°C por 30 seg., 72°C por 1 min y finalmente 72°C durante 5 min. El producto de PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% usando bromuro de etidio (*Br Et*) para su visualización mediante transiluminación de rayos UV.

Los productos de PCR se purificaron a partir del gel de agarosa al 2%, según el protocolo de MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Inc), los cuales fueron secuenciados usando los mismos cebadores que fueron empleados para la amplificación a una concentración de 5 µM y utilizando el kit ABI PRISM Big Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing ready reaction (PE Biosystems) con el método dideoxy-mediate Chain-terminations. La reacción de secuenciación se realizó con las siguientes condiciones: 96°C por 1 min., y 25 ciclos a 96°C por 10seg, 50°C por 5 seg. y 60°C por 4 min. Los resultados de la secuenciación fueron analizados

con el programa ABI 3100 Avant (PE biosystem). El ensamblaje de las secuencias se realizó con el programa BIOEDIT Sequence Alignment Editor 7.2.5.

Análisis Filogenético

Con el objetivo de realizar el estudio filogenético, las secuencias nucleotídicas fueron sometidas a BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) en el portal NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> para comprobar su similitud con cepas ya reportadas.

Para reflejar la máxima diversidad con el mínimo número de aislados, las 967 secuencias nucleotídicas fueron sometidas a una criba en base a una matriz de identidades. De la base de datos inicial fueron eliminadas las secuencias redundantes, es decir con similitud del 100% dentro de cada genotipo, y las secuencias resultantes se utilizaron para construir el árbol filogenético basado en los 480 nucleótidos de la RHV junto a diversas secuencias de cepas de referencia ya publicados en el GenBank y secuencias de cepas vacunales utilizadas frecuentemente en la inmunización de las aves obtenidas durante el estudio (Tabla 1). Para ello se empleó el programa MEGA 6.06, con el método de Máxima Verosimilitud, y el modelo de sustitución Tamura-Nei y la precisión topológica del árbol se estimó con Bootstrap con 1000 repeticiones (Tamura *et al.*, 2011).

Serotipo	Patotipo	Número de Acceso Gen Bank	Nombre	Origen		
Serotipo 1	Muy Virulento	AF362776	BD3/99	Bangladesh		
		X95883	849VB	Bélgica		
		AY780423.1	Isolate JNeto-BR	Brasil		
		AY769979.1	Isolate Suruvi-BR	Brasil		
		AY769978.1	Isolate Ipumirim-BR	Brasil		
		AY525119.1	Isolate JR-a	Brasil		
		AY525110.1	Isolate Br-6	Brasil		
		AF006700	HK46	China		
		AY134874.1	SH95	China		
		AF281651.1	CAO 2000	China		
		AF322444.1	TASIK	Indonesia		
		AY44912.1	IRAN	Irán		
		L42284.1	KS	Israel		
		D49706	OKYM	Japón		
		AF240686	D6948	Países Bajos		
		Z25482.1	Netherlands 1986	Países Bajos		
		AY083925	VG248	España		
		-	Girona	España		
		-	SP/41/02	España		
		AY770593.1	SP/31/02	España		
		AY770592.1	SP/50/02	España		
		AY770591.2	SP/33/02	España		
		AY770590.1	SP/49/02	España		
		AY770583.1	SP/13/02	España		
		AY770582.1	SP/44/02	España		
		AY770581.1	SP/03/02	España		
		X92760	UK661	Reino Unido		
		DQ297823.1	Uy-3	Uruguay		
			Cepas Clásicas	D00869	52/70	Reino Unido
				AF362747	Cu-1wt	Alemania
			Cepas de virulencia Intermedia	AY770584.1	SP/04/02	España
				AY770589.1	SP/05/02	España
				AY770586.1	SP/09/02	España
		AY770585.1		SP/14/02	España	
		AY770587.1		SP/28/02	España	
		AY770588.1		SP/29/02	España	
		D00499		STC	EE UU	
		AY918948		LUKERT	EE UU	
		A33255	EDGAR	EE UU		
		AF279288	Winterfield			
		Atenuadas	AF194428	CEF94	Países Bajos	
			X16107	CU-1	Alemania	
			X88034	P2	Alemania	
	AY094618		LKS	Méjico		
	AF413069		BJ836	Singapur		
	AY311479		Kal2001	Egipto		
	AF312371		T2	China		
	Clásicas Australianas	HM071991.1	V877-W	Australia		
		AJ878908.1	002/73	Australia		
	Variantes	AF133904	Variante E	EE UU		
		X54858	E-DEL	EE UU		
		M97346	GLS	EE UU		
		M64285	Variante A	EE UU		
	Cepas Vacunales	*	HipraGumboro-GM97			
		*	HipraGumboro-CH/80			
		*	Int 228E			
		*	D78			
		*	PRECISE/AVIPRO			
		*	IBDX/AVIPRO			
		AF498631	BURSINE 2			
		AF498632	BURSINE PLUS			
		AF498633	BURSAVAC			
	EU549160.1	Poulval-Bursa F				

Tabla 1. Detalles de las secuencias de IBDV incluidas en la filogenia. Los asteriscos indican las cepas vacunales que fueron secuenciadas para su comparación en el estudio.

En cuanto al análisis filogenético de las secuencias (155 aminoácidos deducidos, ubicadas desde la posición 202 hasta la 357) de las cepas representativas de cada genotipo se sometieron a una segunda criba, eliminando las secuencias aminoacídicas con una similitud del 100%, de modo que el análisis se basó únicamente en secuencias aminoacídicas distintas.

Estimación de la presión de selección

La presión de selección se calculó de dos formas. La primera sobre la región completa de RHV de VP2, mediante las diferencias de las tasas entre no sinónimos y sinónimos y la segunda, sobre el codón individual. Ambas fueron calculadas empleando el método Nei-Gojobori (Ganeshan *et al.*, 1997) implementado en la Web SNAP (<http://hivweb.lanl.gov>). Los valores (d_N-d_S) < 0 son indicativos de presión de selección negativa, los valores iguales a 0, son indicativos de evolución neutral y los > 0 indican presión positiva.

Resultados

Selección de secuencias

Con el objeto de condensar el número de secuencias a estudiar sin que se viera afectada la variación genética existente, en una primera fase, las secuencias en base a nucleótidos que reflejaron una similitud del 100% fueron eliminadas resultando únicamente en 267 secuencias nucleotídicas. En una segunda fase, la deducción de aminoácidos de esas 267 secuencias fue sometidas a una segunda criba, eliminando del mismo modo todas las secuencias con una similitud del 100%, resultando así en 120 el número secuencias las cuales fueron consideradas para los estudios de comparación y filogenia.

Análisis Filogenético

El análisis de filogenia consistió en incluir todas las cepas del estudio (967) basadas en nucleótidos para obtener la clasificación total por tipo y por año. Esta

filogenia muestra que las cepas se reúnen en agrupaciones comúnmente observadas en la clasificación por genotipo de IBVD como son cepas atenuadas, intermedias, clásicas y muy virulentas, y además advierte agrupaciones nuevas o no descritas antes en España.

El árbol filogenético de las cepas basadas en nucleótidos expone 4 grandes clados (Figura 1). Del primer gran clado se disgrega 4 clados más pequeños, las cepas atenuadas tipo D78 y tres grupos de cepas intermedias (según el grado de atenuación) a las cuales nombraremos como G1 a las cepas del tipo 228E, G2 a las cepas del tipo Lukert y G3 a las cepas del tipo Winterfield 2512.

Se observa un primer grupo soportado por un bootstrap de 94%, que conforma el clado de las cepas atenuadas. Este clado representa alrededor del 17% del total de las cepas estudiadas (Tabla 2), muestran un porcentaje de similitud del 99.05% entre ellas (Tabla 3.A) y están altamente relacionadas a las cepas atenuadas o suaves utilizadas comúnmente en nuestro medio en la inmunización de las aves CH80, D78 y LC75.

El segundo clado (G1) soportado por un bootstrap de 95% agrupa el 8% de cepas estudiadas (Tabla 2) que muestran una similitud del 99.4% (Tabla 3.A) y se asocian con cepas vacunales de virulencia intermedia plus como son las cepas 228E y GM97 y una cepa descrita en España en el 2002 (SP/05/02).

El tercer grupo (G2) conformado por un número reducido de cepas (1%) y soportado por un bootstrap de 99%, se asocia con cepas vacunales atenuadas intermedias como es la cepa Lukert (Tabla 2 y tabla 3.A)

El cuarto clado (G3) soportadas por un bootstrap de 69%, alberga el 47,5% de las cepas estudiadas, las cuales se relacionan muy cercanamente con la cepa vacunal Winterfield 2512 y la cepa V217 utilizada en la elaboración de la vacuna

Avipro IBDX empleada cada vez con mayor frecuencia en la inmunización de las aves.

En un segundo gran clado se observa una quinta agrupación más pequeña soportada por un bootstrap del 66%, conformado por los aislados clásicos representando el 1,5% del total de las secuencias analizadas.

De este segundo gran clado se desprende una rama que muestra que el 21% de los aislados se encuentran asociados a IBDV/vv con un porcentaje de similitud de 97,5% entre ellos (Tabla 3.A). El 32% de ellos se asocian al aislado SP/41/02 detectada en España durante el brote del 2002 y otro grupo reuniendo el 64% de los aislados se agrupan con algunas cepas de referencia mundial y los aislados españoles Girona y SP/50/02. Además se distingue un aislado IBD/204.5/09 que no está incluida en el clado. Esto es confirmado con la elaboración de un segundo árbol filogenético en el que se incluyen únicamente los aislados muy virulentos del estudio (Figura 2).

Tipo de Cepa		TOTAL	%	Número de secuencias distintas en base a nucleótidos	Número de secuencias distintas en base a aminoácidos
Cepas atenuadas	Tipo D78	162	16,8	53	41
	Tipo 228E (G1)	81	8,4	22	15
Cepas atenuadas intermedias	Tipo Lukert (G2)	5	0,5	3	3
	Tipo Winterfield 2512 (G3)	460	47,6	68	33
Cepas clásicas		15	1,6	15	2
Cepas muy virulentas		208	21,5	90	25
Nuevo linaje IBDV/Sp-var		17	1,8	16	9
Cepas clásicas australianas		19	2,0	3	1
		967		270	130

Tabla 2. Clasificación de cepas por tipo. En la columna de la derecha se nombran los subtipos en los que las secuencias del estudio han sido clasificadas según la filogenia. La columna total indica el número de cepas por tipo seguido de su representación porcentual. La columna secuencias nucleotídicas indica el número de secuencias distintas en base a nucleótidos por cada subtipo incluidas en el estudio. Paralelamente el número de secuencias diferentes en base a aminoácidos utilizadas en la comparación.

Adicional a esta clasificación tradicional, en el árbol filogenético (Figura 1) se observa que el resto de los aislados analizados se agrupan en dos ramas claramente diferenciadas. La primera agrupación, descrita en este estudio como IBDV/Sp-Var, comprende únicamente aislados de origen español, que parece evolucionar de forma independiente. Un brazo con un aislado que no es asociado a ningún otro aislado ni del estudio ni de referencia y finalmente grupo soportado por un bootstrap de 73%, es de especial interés puesto que los aislados, aunque en número reducido (2%), se agrupan con cepas clásicas atenuadas australianas, mostrando alta similitud con la cepa V877-W.

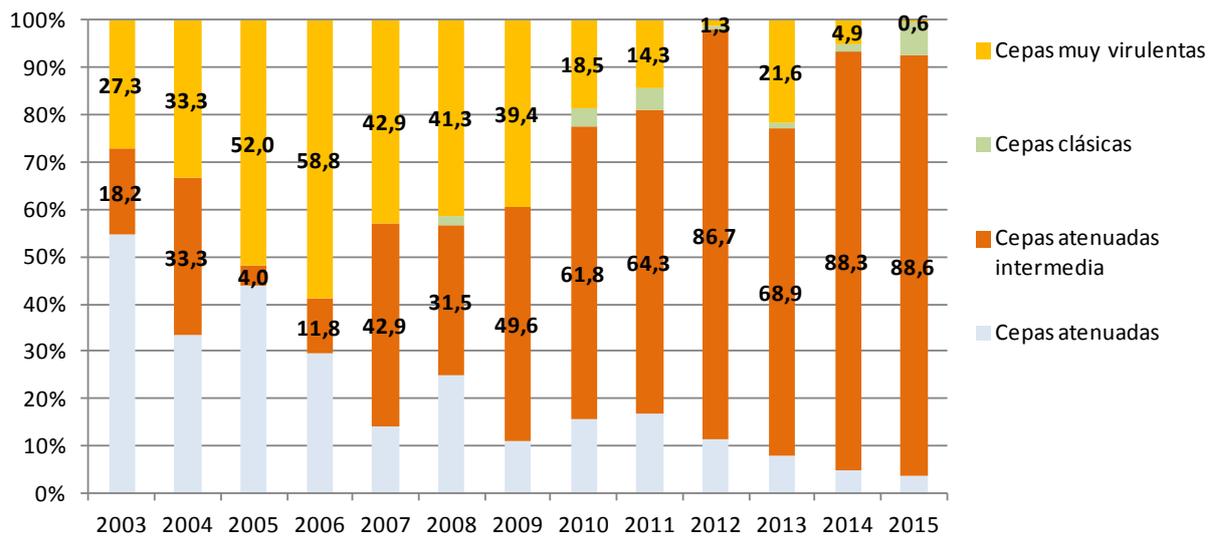


Gráfico 1. Detección de cepas por año. Representación porcentual de cada subtipo en el total de cepas detectadas por año.

A

Genotipos	Porcentajes de similitud
Atenuado tipo D78	99, 05
Atenuado intermedio G1	99, 44
Atenuado intermedio G2	99, 18
Atenuado intermedio G3	99, 38
Clásicos	99, 57
Muy virulentos	97, 53
Nuevo linaje Sp-Var	94, 78
Clásico atenuado australiano	99, 78

B

Genotipos	Porcentajes de similitud
Atenuado tipo D78	97, 25
Atenuado intermedio G1	98, 43
Atenuado intermedio G2	98, 28
Atenuado intermedio G3	99, 32
Clásicos	98, 70
Muy virulentos	97, 30
Nuevo linaje Sp-Var	98, 30
Clásico atenuado australiano	100

Tabla 3. Estimaciones de Similitudes expresada en porcentajes basada en secuencias de nucleótidos (A) y aminoácidos (B) dentro de cada uno de los grupos. El análisis fue llevado a cabo usando el modelo compuesto de Máxima Verosimilitud (*Maximum Composite Likelihood*), basado en 271 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codones incluidas fueron 1st+2nd+3rd+No codificantes. Se eliminaron todas las posiciones conteniendo gaps y posiciones vacías. El análisis llevado a cabo con el programa MEGA 6.06.

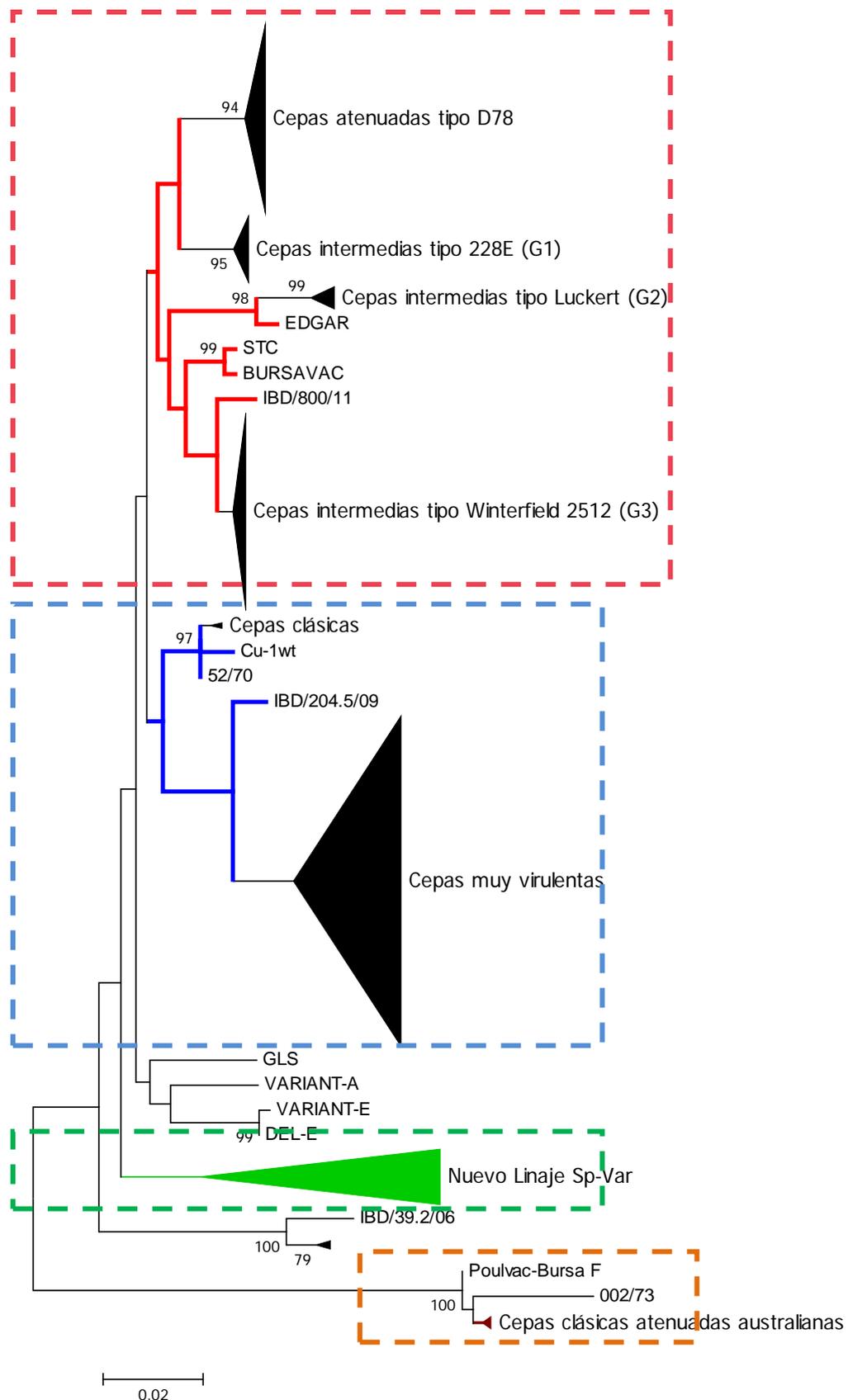


Figura 1. Árbol Filogenético en base a Nucleótidos de los aislados Españoles de IBD, identificadas mediante amplificación de RHV de la VP2. El árbol fue elaborado utilizando el método de Máxima Verosimilitud, y el modelo de sustitución Tamura-Nei incluidos en el programa MEGA 6.0. Los 4 grandes clados son identificados en línea discontinua.

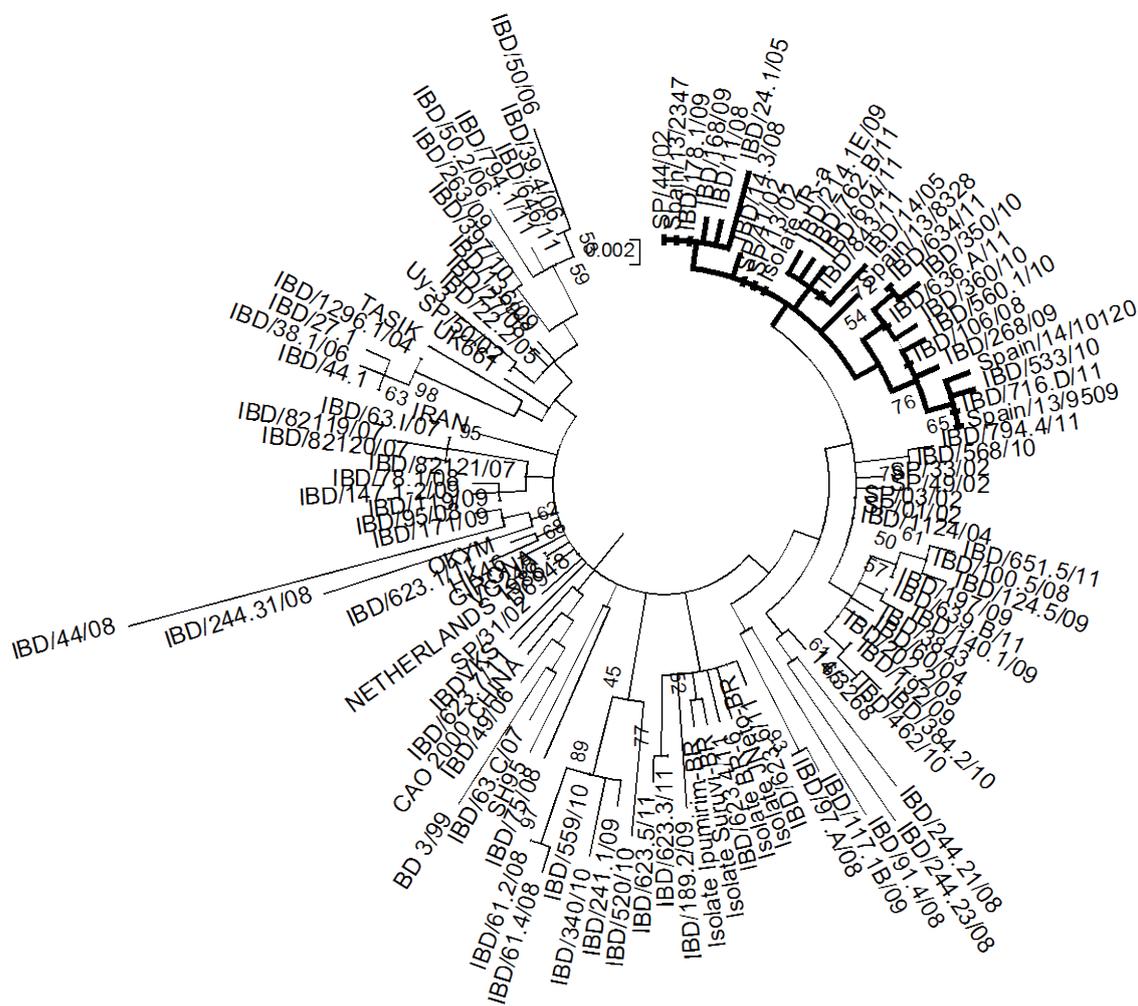


Figura 2. Filogenia de los aislados muy virulentos de IBD detectados en España. El brazo resaltado en negro demuestra que aproximadamente el 30% de ellos se asocian con aislados descritos en el 2002, mientras el 60% restante se asocia a aislados más antiguos y de referencia mundial. El árbol fue elaborado utilizando el método de Máxima Verosimilitud, y el modelo de sustitución Tamura-Nei incluidos en el programa MEGA 6.0.

Con el fin de analizar la presión de selección de los aislados en cuestión, se calculó la diferencia entre sustituciones no sinónimas y sinónimas (d_N-d_S) de la RHV. Los resultados revelan que existe una presión de selección global menor a 0. Sin embargo, se observan ciertos aminoácidos ubicados en 4 regiones susceptibles de la proteína como son los bucles P_{BC}, P_{DE}, P_{FG} con presión de selección positiva, aunque con valores bajos. También se observa selección positiva en algunos aminoácidos ubicados en la zona rica en serina (residuos 329 y 330). En solo uno de los bucles, P_{HI}, los aminoácidos muestran valores de presión de selección negativos (Figura 3).

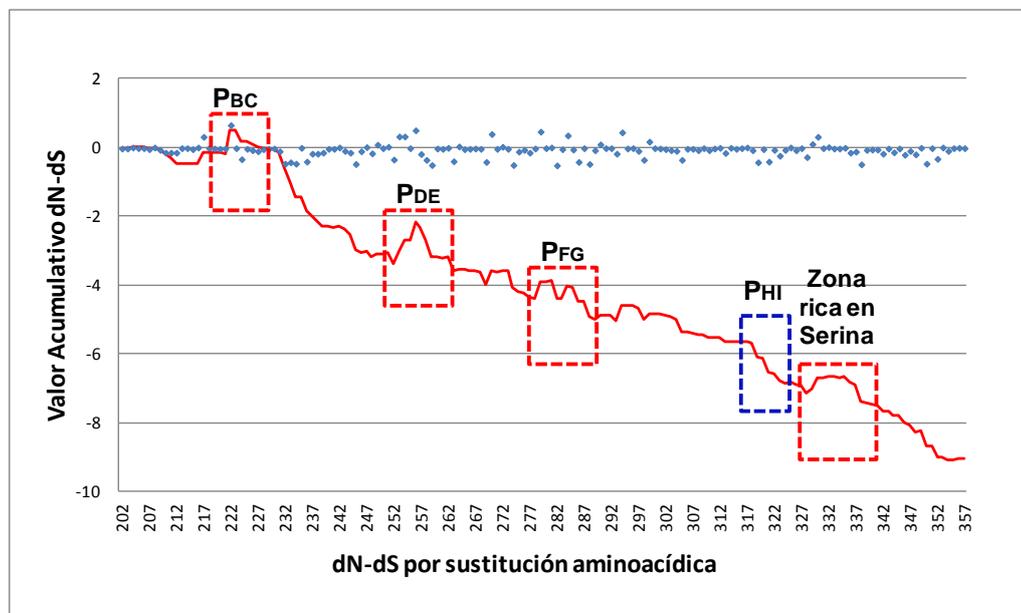


Figura 3. Diferencia entre sustituciones no sinónimas-sinónimas (d_N-d_S). Valores acumulados (línea roja continua) y valores individuales (puntos en azul) de las tasas de sustituciones no sinónimas y sinónimas (d_N-d_S) para la RHV del gen VP2. Los números en el eje horizontal representan la posición del aminoácido analizado y en el eje vertical se indica el valor de la resta de las sustituciones d_N-d_S .

Análisis de secuencia de aminoácidos

El análisis de las secuencias de aminoácidos se realizó según su clasificación por genotipos siguiendo el orden de la filogenia.

Los aislados atenuados y de atenuación intermedia del grupo 3 poseen las sustituciones 222P mientras que en los aislados intermedias G1 y G2 se observa la sustitución 222S (excepto en 3 de ellas). La sustitución 249Q está presente en la mayoría de los virus (excepto en el subgrupo G2 en que se observa histidina y en una cepa atenuada Q→K). La sustitución 253Q es observada en todos os aislados de atenuación intermedia. Pese a que el residuo 253Q está presente en algunas aislados atenuados, en esta misma posición se observa una variedad de sustituciones, como N, K y D. La sustitución 279N se observa en aislados atenuados y de atenuación intermedia G1, 279D en aislados de atenuación intermedia G2 y G3 (excepto en las cepas IBD/62.1/08 en las que se observa Asparagina). El residuo 284T se observa en el grupo de los aislados atenuados (excepto en 4 de ellas) y en los aislados de atenuación intermedia G2 y 284A en aislados de atenuación intermedia del grupo G1 y G3. El residuo 299 es Asparagina en aislados atenuados y de atenuación intermedia. Finalmente, el residuo 330R es observado solo en aislados atenuados y 330S en las cepas intermedias G1, G2, G3 y algunas aislados atenuados (Tabla 4) (Detalle del alineamiento de cepas atenuadas e intermedia G1, G2 y G3, Figura 4,5,6 y 7).

Clado 1	Residuos							
	222	249	253	254	279	284	299	330
Cepas atenuadas	P	Q	Q, N, K, D	G	N	T	N	R
(G1)	S	Q	Q	G	N	A	N	S
Cepas atenuadas intermedias	S	H	Q	G	D	T	N	S
(G2)	S	H	Q	G	D	T	N	S
(G3)	P	Q	Q	G	D	A	N	S

Tabla 4. Resumen de residuos aminoacídicos hallados en los aislados españoles atenuados y de atenuación intermedia.

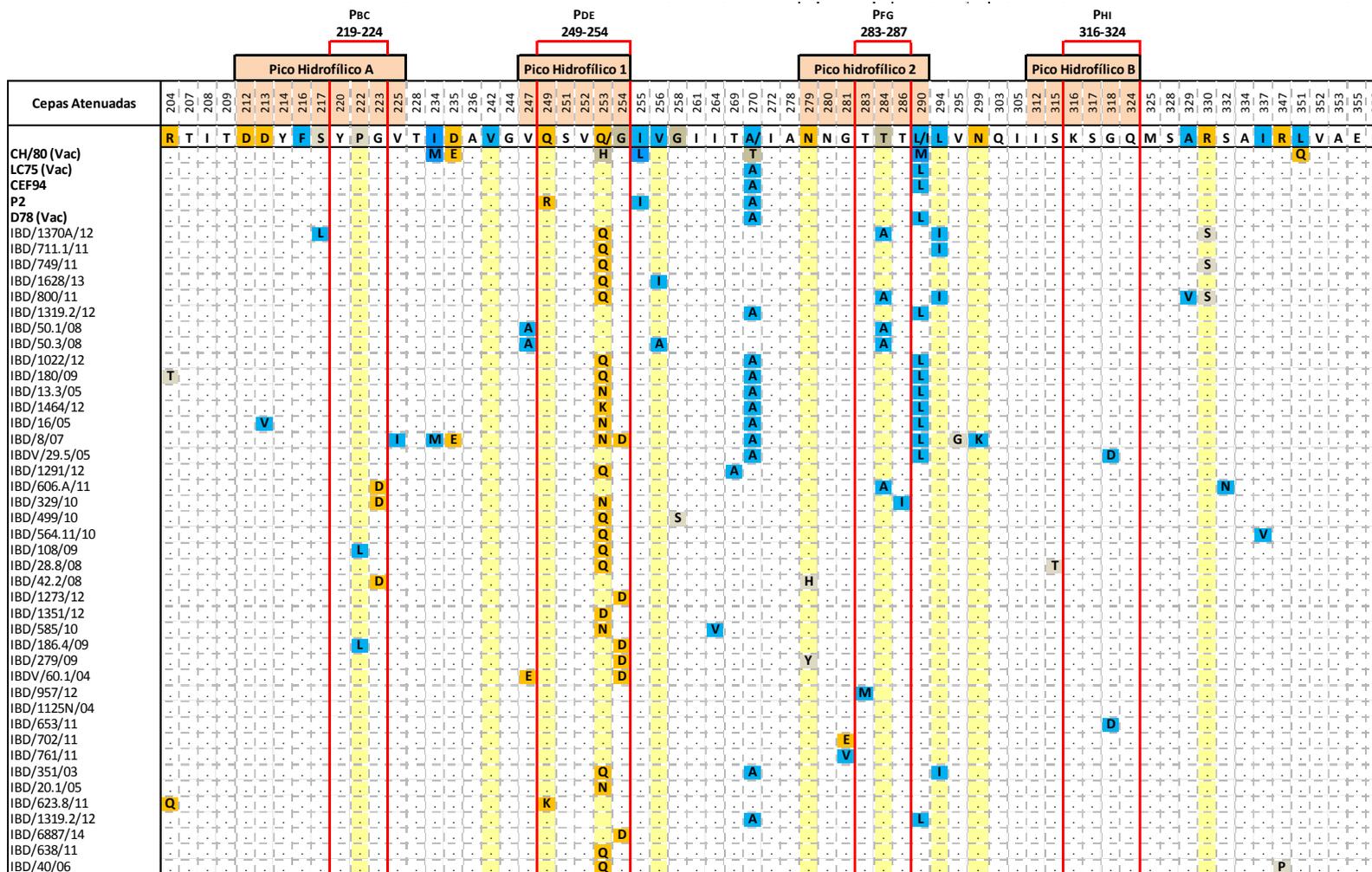


Figura 4. Resumen del patrón de aminoácidos de los aislados atenuados. En la figura se resaltan con una sombra amarilla tenue los residuos implicados en atenuación. Las posiciones sombreadas en rosa resaltan los picos hidrofílicos mayores A y B y menores 1 y 2. Los recuadros en rojo remarcaban la ubicación de los bucles de mayor exposición de la proteína. Las posiciones mutadas se resaltan según sus características hidropáticas: naranja para las mutaciones hidrofílicas, azul para las mutaciones hidrofóbicas y gris para las mutaciones neutrales.

Los aislados clasificados como clásicos se resumen únicamente a 2 secuencias, el aislado IBD/6048/13 mostrando una elevada similitud frente a la cepa clásica 52/70 y el aislado IBD/3133.1/14 mostrando sólo 2 cambios aminoácidos en la región final de secuencia en posición 349 V→L y en posición 353 A→T.

Los aislados clasificados como muy virulentos conservan las sustituciones características 222A, 242I, 256I, 294I, 299S y la región rica en serina, excepto los aislados, IBD/204.5/09, IBD/91.4/08, IBD/21/05, que muestran mutaciones particulares. Es de recalcar que todas las secuencias muestran mutaciones en los bucles del dominio P de RHV y otras fuera de estas regiones (Figura 8).

El análisis de la secuencia de aminoácidos de los aislados IBD/Sp-Var muestran un perfil muy particular pues poseen sustituciones únicas en su secuencia de aminoácidos 222S, 249Q, 254N (IBD330/10 N→D) (Figura 9). El residuo 254N no se encuentra en ninguno de los aislados de los otros genotipos analizados. Además de esas mutaciones también se pueden observar otras sustituciones en los picos hidrofílicos 251S→N (excepto en los aislados IBD/330/10 y IBD/158/09), 281I→T 318D→G (excepto aislado IBD/330/10G), 321A→T -V (excepto IBD/158/09, IBD/345/02, IBD/234-2/09T, IBD/101.1V), 323E (excepto IBD/330/10D),

Fuera de las regiones hidrofílicas, también se muestran mutadas ciertas posiciones 269T→S (en 7 de las cepas), y 328K (excepto cepa 330/10T), un residuo que solo se observa en estas variantes españolas y finalmente el heptapéptido rico en serina (residuo 330S) se conserva en t (Figura 9).

Discusión

En la actualidad IBD sigue siendo una de las enfermedades más importantes de la industria avícola mundial. Desde la aparición de la forma muy virulenta de IBD en los años 80 en Europa y cumpliendo las medidas específicas de la OIE, los países miembros han venido trabajando para establecer sistemas de diagnóstico y vigilancia epidemiológica y orientar el trabajo hacia la identificación molecular de posibles marcadores virales suficientemente fiables para determinar los distintos subtipos del virus (OIE, 1995).

Pese a que es ampliamente conocido que los factores de virulencia no solo residen en la proteína VP2 (Boot *et al.*, 2005; Brandt *et al.*, 2001; Liu and Vakharia, 2004), muchos estudios moleculares se basan en la secuenciación del dominio hipervariable de esta proteína debido a que codifica para los epítomos que son reconocidos por anticuerpos neutralizantes y que contiene varios marcadores de virulencia (Coulibaly *et al.*, 2005; Durairaj *et al.*, 2011). Con estos antecedentes y con el objetivo de tener una aproximación acerca de la diversidad de los virus que circulan en España, que nos permita entender mejor la epidemiología de la enfermedad, caracterizamos 967 secuencias genómicas de IBDV provenientes de pollos de engorde y gallinas de puesta procedentes de todo el país.

La filogenia nos muestra una clasificación bastante bien soportada de los genotipos que se vienen describiendo en España, tal y como son los virus muy virulentos, clásicos y atenuados, además de dos pequeños grupos que conforman unos clados independientes.

La presencia de virus muy virulentos según nuestros resultados, representan un porcentaje relativamente bajo (21%) con tendencia a minorar en los últimos años (Gráfico 1) quizás debido a la implementación de nuevos sistemas de vacunación

(Comunicación personal Dr. Branko Alva). Por otro lado, es de considerar que el 74% de las muestras remitidas fueron identificadas como virus vacunales, con similitudes muy altas a las secuencias de cepas extraídas de vacunas utilizadas en el medio.

Desde su primera descripción, los aislados IBDV/vv españoles han mostrado el perfil genético típico de virulencia (Majó *et al.*, 2002). Los aislados de nuestro estudio muestran la tendencia a agruparse en dos ramas, una de ellas con una similitud mayor frente a las primeras aislados virulentos descritos en Europa como OKYM, HK46, UK661, D6948, incluso con la cepa Girona que fue una de las primeras cepas descritas en España durante los años 90 (Majó *et al.*, 2002), y otra rama con una identidad mayor con cepas descritas más recientemente. Sin embargo, el análisis de las secuencias de aminoácidos demuestra que algunos aislados exhiben cambios en la RHV de VP2 y conforman un grupo atípico, con múltiples mutaciones ubicadas especialmente en los bucles del dominio P de VP2 (Figura 8) relacionadas con antigenicidad. Este es el caso de los residuos 249Q→K y 254G→S, que además son distintivos de las cepas variantes americanas (Jackwood *et al.*, 2006). Todos los cambios que se han observado en diversos estudios en el pico hidrofílico mayor B, también están asociados a escapes de la respuesta inmune (Durairaj *et al.*, 2011; Jackwood and Sommer-Wagner, 2011). Concretamente en el bucle P_{HI}, un grupo de aislados muestra una mutación particular 321A→V. Cambios en esta posición han sido descritos en la cepas variante americana GLS (Vakharia *et al.*, 1994), en las cepas 94432 de origen francés (Eterradossi *et al.*, 1998) y en una cepa detectada en Egipto en 1999 (Eterradossi *et al.*, 2004), las cuales tienen un comportamiento antigénico variado frente a las típicas IBDV muy virulentas. Aunque no tenemos más información acerca de la procedencia de este grupo de cepas muy virulentas atípicas, vemos en la filogenia que están más relacionadas con cepas antiguas y probablemente sean descendientes de estas cepas descritas en 1998 y 2004,

aunque no se tiene claro como se han podido diseminar entre estas regiones. Aunque este grupo representa un porcentaje bajo del total de las cepas muy virulentas estudiadas, estos hallazgos nos sugieren que al evolucionar estos virus están adoptando cambios que podrían proporcionarles la habilidad de escapar a la respuesta inmune.

Fuera de los picos hidrofílicos, se observa un residuo 299S→N que está presente sólo en cepas atenuadas. La asparagina (N) es un aminoácido hidrofílico, en mayor grado que la serina (S), por lo que se encuentra frecuentemente en las superficies de las proteínas donde se da la interacción con las moléculas de agua, tiene un mayor tamaño por lo que podría alterar la forma de la cadena aminoacídica desde la base del plegamiento y afectar finalmente a la forma cuaternaria de la proteína (Coulibaly *et al.*, 2005). Nuestros resultados muestran que este residuo al parecer no está restringido a cambios y que puede estar seleccionado positivamente, aunque con un valor bajo. Esta mutación no es constante en los aislados muy virulentos, y aunque podría ser una forma de evolución adaptativa debido a las diferentes presiones que pueden variar entre regiones geográficas y hacen que estos aislados adquieran mutaciones características (Li *et al.*, 2015), podría actuar también como un marcado regional (Adamu *et al.*, 2013)

Complementariamente, el análisis de presión de selección de VP2 revela que sólo el 22% de los codones parecen estar sometidos a presión de selección positiva. Con esto se deduce que la proteína está sujeta a restricciones de cambio para no alterar la estabilidad del homotrímero (unidad que forma la cápside viral) del virión de modo que éste siga siendo funcional (Coulibaly *et al.*, 2005; Letzel *et al.*, 2007) y le permita persistir en el medio. Los residuos 253H, 279N, 284T y 330R/K, son referenciados por muchos autores como residuos relacionados con la adaptación celular y atenuación (Cao *et al.*, 1998; van Loon *et al.*, 2002), los cuales se hayan presentes en todas las cepas atenuadas del estudio. Sin embargo en algunos

aislados que están más asociados a virus más atenuados, en posición 253 también se observan otros residuos como L, N, K, y sobre todo Q, residuo que se ha referenciado como indicativo de virulencia (Mundt, 1999) y que también se encuentra en cepas vacunales clásicas (Patel *et al.*, 2016). En determinados aislados atenuados se observan algunos residuos catalogados como indicadores de cepas virulentas: 256I, 294I, 299S y 330S. No podemos descartar la posibilidad de que estos virus hayan desarrollado reversión a virulencia, ya que es uno de los riesgos que implica el uso de vacunas vivas (Jackwood *et al.*, 2008).

En la filogenia observamos que un grupo de cepas se relacionan con cepas clásicas australianas. Las cepas de nuestro trabajo tienen una similitud del 100% en base a aminoácidos con la cepa V877, virus vacunal que es ampliamente utilizado en países donde la infección por virus muy virulentos representan grandes problemas ya que esta cepa puede sobrepasar títulos altos de anticuerpos y causar pocos daños a nivel bursal (Geerligts *et al.*, 2015). En primer lugar, tenemos que considerar que muchos casos remitidos a nuestro laboratorio fueron para control rutinario de las granjas, y quizás estas muestras procedían de aves que no presentaron sintomatología y probablemente no se sospechó de infección por IBDV, y en segundo lugar puede que se estén aplicando biológicos que antes no se utilizaban en el país lo que queda claramente evidenciado en el análisis de secuencia.

La aparición de nuevos grupos de virus como IBD/Sp-var donde la mayoría de los residuos mutados se encuentran en las regiones hidrofílicas y además con características peculiares, dejan ver que el IBDV evoluciona y coexiste con los otros subtipos descritos en esta región. Nuestros resultados sugieren que este nuevo linaje está circulando hace años ya que algunos de los virus estudiados datan del año 2002. Estos virus muestran en su secuencia de aminoácidos, sustituciones que están involucradas en tropismo celular (279N y 284A) y virulencia (253Q) (Jackwood *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 1999) y mantienen un residuo,

330S, que sólo se suele observar en virus muy virulentos. Además, poseen ciertas características que hace que los aislados se agrupen independientemente, 254N y 328K. El residuo 222S que se observa en este linaje también es un residuo que se encuentra en la cepa Lukert de virulencia intermedia, y en una cepa belga que ha sido considerada una variante Europea (Letzel *et al.*, 2007; Rudd *et al.*, 2002), por tanto este residuo define un perfil antigénico distinto que le podría permitir escapar a la neutralización por anticuerpos. Estudios de patogénesis de una cepa de este nuevo linaje han demostrado un comportamiento similar al de las cepas variantes americanas *in vivo*, traspasando títulos medios de anticuerpos maternos y ocasionando depleción linfocítica severa (Dolz *et al.*, 2011).

Estudio 2

Análisis espacio-temporal y fuerzas evolutivas que determinan la variabilidad genética y dispersión de los aislados del virus de la Bursitis Infecciosa en España.

Introducción

La IBD se considera una de las enfermedades más importantes por las pérdidas económicas directas e indirectas que ocasiona en la industria avícola mundial (Van den Berg *et al.*, 2000). Desde la aparición del virus muy virulento en los años 90, la visión epidemiológica de la enfermedad ha cambiado consistentemente. Aunque estos virus inicialmente estaban circunscritos únicamente a Europa, actualmente están ampliamente diseminados por el mundo (Fernandes *et al.*, 2009; Hassan, 2004; Hernández *et al.*, 2006).

En España, el diagnóstico molecular basado en el gen que codifica la proteína VP2 nos ha permitido tener una información rápida de los aislados virales a los que nos enfrentamos en el campo y ha evidenciado los cambios genéticos que se van dando en esta proteína a lo largo de tiempo. No obstante, aunque hemos sido capaces de identificar el agente causal, creemos interesante conocer el origen y como se han ido diseminando estos aislados en el país. Un trabajo previo de la distribución filogeográfica de los aislados muy virulentos españoles realizado en 2010, nos proporciona una primera aproximación del comportamiento del virus en el país (Cortey *et al.*, 2012).

Herramientas estadísticas como la inferencia Bayesiana, aplicada a la filogeografía (Lemey *et al.*, 2009a), es ampliamente utilizada en epidemiología de enfermedades que afectan la salud humana como la fiebre dengue, rabia, gripe e incluso en el estudio del virus de la inmunodeficiencia humana (Lemey *et al.*, 2009b; Siriyasatien *et al.*, 2016; Streicker *et al.*, 2012). En este trabajo utilizamos inferencia bayesiana para vislumbrar la dinámica del virus de IBD en el tiempo y en el espacio, conocer sus posibles orígenes y la propagación de los diferentes linajes que circulan en el país, de manera que podamos entender mejor la epidemiología de la enfermedad.

Materiales y métodos.

Muestras

Se partió de 33 casos en los cuales se detectó IBDV a partir de muestras frescas de bursa de Fabricio y de frotis en tarjetas FTA[®] (Flinders Technology Associates), procedentes de pollos y gallinas de puesta comercial de diferentes regiones de España (Tabla 1). Todas las muestras fueron procesadas en el laboratorio de diagnóstico de enfermedades aviares del Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA). Estos 33 casos fueron elegidos por tener año y lugar de origen conocidos y fueron nombrados como IBDV, seguido del número de caso y el origen.

Extracción del ARN vírico

El ARN vírico fue obtenido homogenizando el tejido (300 mg) en 500 µl de solución D (0.0076% β-mercapto etanol, 4.23M tiocianato de guanidina, 26.4mM citrato de sodio: 0.53% sarcosina). Posteriormente fue incubado durante 20 min. en dos gradientes distintas, 10 min. a 37° C y 10 min. a 60°C. seguido de una centrifugación de 10 minutos a 14000 rpm. Un volumen de 150 µl de sobrenadante fue empleado en la extracción mediante un kit comercial según el protocolo recomendado (Nucleo Spin [®]RNA Virus, Macherey-Nagel). El producto de extracción fue eluído en 50 µl de agua DEPC (diethylpyrocarbonato) y fue conservado a -80°C hasta su procesamiento.

RT-PCR y secuenciación

Inicialmente se realizó la reacción de transcripción reversa (*Reverse transcription*, RT). El producto de la extracción fue desnaturalizado a una temperatura de 70°C durante 5 min.

AISLADO	ORIGEN	AÑO
IBDV/3/BAL	Islas Baleares	1990
IBDV/4/CAT	Cataluña	1990
IBDV/5/ORE	Orense	1990
IBDV/8/CAT	Cataluña	2000
IBDV/13/CAT	Cataluña	2002
IBDV/214/CAT-TAR	Cataluña	2002
IBDV/345/ARA-ZAR	Aragón	2002
IBDV/5366/CAT-LLE	Cataluña	2002
IBDV/6/AND	Anadalucía	2002
IBDV/16/CAT	Cataluña	2002
IBDV/14/VAL	Valencia	2004
IBDV/1/VAL	Valencia	2004
IBDV/10/IB	Islas Baleares	2005
IBDV/7/GAL	Galicia	2005
IBDV/18/Cle	León	2005
IBDV/12/Cle	León	2006
IBDV/21/Cle	León	2006
IBDV/2/Cle	León	2006
IBDV/11/CAT	Cataluña	2007
IBDV/9/GAL	Galicia	2007
IBDV/101.1/VAL-CAS	Valencia	2008
IBDV/101.3/VAL-CAS	Valencia	2008
IBDV/92.14/LE-SOR	León	2008
IBDV/158/HUE-ALC	Aragón	2009
IBDV/278/CAT-TAR	Cataluña	2009
IBDV/231.4/	Cataluña	2009
IBDV/231.3/	Cataluña	2009
IBDV/234.2/CAT-LLE	Cataluña	2009
IBDV/234.3/CAT-LLE	Cataluña	2009
IBDV/236.8/CAT-LLE	Cataluña	2009
IBDV/245.3/CAT-LLE	Cataluña	2009
IBDV/330/GAL-OUR	Galicia	2010
IBDV/453/CAT-LLE	Cataluña	2010

Tabla 1. Aislados españoles empleados en el estudio. Identificación de las 33 muestras empleadas en el estudio, procedencia y año de aislamiento.

Cada reacción contenía 2µl del ARN extraído, 2µl del cebador *reverse* denominado GUM-R, ubicado desde la posición 1194 hasta 1212 de acuerdo a la numeración del sistema de Bayliss (Dolz *et al.*, 2005). a una concentración de 10µM, 10µl de agua DEPC y 8 µl de la mezcla de RT que contenían, 40U RNase OUT (Invitrogen Life Technologies), 100 mM de dNTPs (Ecogen S.R.L), 50U de MMLV Retrotranscriptasa (Ecogen S.R.L) y 2,35 µl de agua DEPC a 42 durante 1 h, y 70°C durante 10 min. A partir del cDNA se amplificó una región de 480 nucleótidos ubicada en la región hipervariable de la proteína VP2. La amplificación se realizó en un volumen de 50 µl., utilizando 10µl del producto de la reacción de RT y una mezcla de 40µl conteniendo 3µl de Cl₂Mg 25mM (Promega), 2,5µl del cebador *forward* denominado GUM-F ubicado desde la posición 733 hasta 750 y el cebador GUM-R a una concentración de 10µM, 0,4µl de dNTPs 100mM total, 0,5µl Taq DNA Polimerasa 5U/µl (Promega Corporation), y 26,1 µl de agua DEPC. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C durante 5 min., 35 ciclos a 94°C por 30 seg., 56°C por 30 seg., 72°C por 1 min y finalmente 72°C durante 5 min. El producto de PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% usando bromuro de etidio (*Br Et*) para su visualización en un transiluminador de rayos UV.

Los productos de PCR se purificaron a partir del gel de agarosa al 2%, según el protocolo de MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Inc.), los cuales fueron secuenciados usando los mismos cebadores que fueron empleados para la amplificación a una concentración de 5 µM y utilizando el kit ABI PRISM Big Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing ready reaction (PE Biosystems) con el método dideoxy-mediate Chaín-terminations. La reacción de secuenciación se realizó con las siguientes condiciones: 96°C por 1 min., y 25 ciclos a 96°C por 10seg, 50°C por 5 seg. y 60°C por 4 min.

Los resultados de la secuenciación fueron analizados con el programa ABI 3100 Avant (PE biosystem). El ensamblaje de las secuencias se realizó con el programa BIOEDIT Sequence Alignment Editor 7.2.5.

Selección, alineamiento múltiple de secuencias y análisis filogenético

Las 33 secuencias de IBDV obtenidas fueron alineadas con las 168 secuencias extraídas de GenBank, incluyendo una colección de secuencias cubanas caracterizadas en un trabajo anterior realizado en nuestro centro de investigación (Alfonso-Morales *et al.*, 2013) (Tabla 2). Sólo se incluyeron en el estudio las secuencias en donde se especificaba el año de aislamiento.

Las secuencias se alinearon con el uso del programa Clustal W incluido en el programa BIOEDIT 7.2.5. La selección del modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustaba a nuestros datos se determinó con el programa JModeltest (Posada, 2008), utilizando dos estrategias de selección diferentes: criterio de información de Akaike (*Akaike Information Criterion*, AIC) y el criterio de información Bayesiano (*Bayesian Information Criterion*, BIC) con el empleo del algoritmo recientemente desarrollado Jmodel test, a partir del cual se estimaron las frecuencias de bases, la tasa de sustituciones así como los parámetros de distribución gamma y la distribución de sitios invariables (Tabla 3).

La relación filogenética de la RHV entre los aislados de IBDV se estableció mediante inferencia Bayesiana y la filogenia se construyó a partir de las secuencias alineadas usando el programa MR Bayes 3.1 con la simulación estadística MCMC para un total de 4 cadenas y 5 millones de generaciones. El modelo seleccionado fue: Transition Model 2- Plus Gama (TIM2+G) (Tabla 3).

Tabla 2. Relación de secuencias seleccionadas para el estudio. Año, nombre de la cepa vírica, origen y número de acceso a GenBank, correspondiente a la secuencia de RHV de VP2.

AÑO	CEPA	ORIGEN	NUMERO DE ACCESO EN GENBANK
1967	IM	EUA	AY029166
1967	Edgar	EUA	AY918950
1967	STC	EUA	D00499
1970	52/70	Reino Unido	D00869
1975	Cu1	Alemania	D00867
1976	PBG-98	Reino Unido	D00868
1978	Clon derivado de la	Cepa Vacunal	Y14962
1981	RT275/81	Iran	DQ630455
1982	RT75D/82	Iran	DQ630451
1982	s/n	EUA	M66722
1985	s/n	EUA	M64285
1985	E/DEL	EUA	X54858
1987	849VB	Bélgica	AY321949
1987	s/n	EUA	M97346
1988	DV86	Holanda	D16630
1989	K406/89	Egipto	AF159218
1989	D6948	Holanda	AF240686
1989	UK661	Reino Unido	X92760
1989	89163	Francia	Y14956
1990	VG248	España	AY083925
1990	5939	España	AY083926
1990	6145	España	AY083930
1991	Ehime91	Japón	AB024076
1991	91247	Francia	AJ001944
1992	SH/92	Korea	AF533670
1994	HK46	Hong Kong-China	AF092943
1994	01/95	Australia	AF148076
1995	08/96	Australia	AF148081
1995	BF35Hab95	Cuba	HF547306
1996	96108	Francia	AY321950
1996	29/96XHab96	Cuba	HF547305
1996	BF63Hab96	Cuba	HF547307
1996	117/96PIR96	Cuba	HF547333
1997	Spain97SP1	España	DQ916240
1997	Spain97SP2	España	DQ916242
1997	Spain97SP3	España	DQ916243
1997	BF9Hab97	Cuba	HF547308
1997	BF28Hab97	Cuba	HF547309
1997	BF3Hab97	Cuba	HF547310
1997	BF26Hab97	Cuba	HF547311
1997	BF6Gra97	Cuba	HF547334
1997	BF53CiA97	Cuba	HF547341
1997	BF52Cam97	Cuba	HF547342
1997	BF51Cam97	Cuba	HF547343
1997	BF7VCI97	Cuba	HF547344
1997	BF4Gra97	Cuba	HF547345
1998	61/98Hab98	Cuba	HF547314
1998	BF67PiR98	Cuba	HF547340
1999	99009	Brasil	AJ878902
1999	Br/99/BN	Brasil	EU835867
2000	00/40	Polonia	AJ508758
2000	BF11Hab00	Cuba	HF547317
2001	Kal2001	Egipto	AY311479
2001	Spain01_S1	España	DQ916237
2001	Spain01_S8	España	DQ916238
2001	MG-7	Brasil	JF811919
2002	SP/03/02	España	AY770581
2002	SP/44/02	España	AY770582
2002	SP/13/02	España	AY770583

Continuación de la Tabla 2.

AÑO	CEPA	ORIGEN	NUMERO DE ACCESO EN GENBANK
2002	SP/05/02	España	AY770584
2002	SP/14/02	España	AY770585
2002	SP/09/02	España	AY770586
2002	SP/28/02	España	AY770587
2002	SP/29/02	España	AY770588
2002	SP/28/02	España	AY770589
2002	SP/49/02	España	AY770590
2002	SP/33/02	España	AY770591
2002	SP/50/02	España	AY770592
2002	SP/31/02	España	AY770593
2002	BF12Hab02	Cuba	HF547321
2003	Br/03/DT	Brasil	EU835873
2003	Br/03/DU	Brasil	EU835874
2004	BF29Hab04	Cuba	HF547322
2004	BF31Hab04	Cuba	HF547323
2004	CL1296-04	España (León)	JF682244
2004	CAT60-04	España (Cataluña)	JF682245
2004	MU1124-04	España (Murcia)	JF682246
2004	CAT72-04	España (Cataluña)	JF682247
2005	GAL284-05	España (Galicia)	JF682248
2005	CL183-05	España (León)	JF682249
2005	VAL14-05	España (Valencia)	JF682250
2005	BAL21-05	España (Islas Baleares)	JF682251
2005	CL20-05	España (León)	JF682253
2005	GAL222-05	España (Galicia)	JF682254
2005	GAL224-05	España (Galicia)	JF682255
2005	BAL24-05	España (Islas Baleares)	JF682256
2006	CAT265-06	España (Cataluña)	JF682257
2006	CL271-06	España (León)	JF682258
2006	CL272-06	España (León)	JF682259
2006	CAT34-06	España (Cataluña)	JF682260
2007	CL584-07	España (León)	JF682261
2007	GAL59-07	España (Galicia)	JF682262
2007	SP80-07	Indeterminado	JF682263
2007	SP81-07	Indeterminado	JF682264
2007	GAL61-07	España (Galicia)	JF682265
2007	SP82-07	Indeterminado	JF682266
2007	SP83-07	Indeterminado	JF682267
2007	SP85-07	Indeterminado	JF682269
2008	BF16Hab08	Cuba	HF547325
2008	BF14Cie08	Cuba	HF547337
2008	CLe06-08	España (León)	JF682270
2008	SP10-08	Indeterminado	JF682271
2008	MU11-08	España (Murcia)	JF682272
2008	GAL27-08	España (Galicia)	JF682273
2008	CAT54-08	España (Cataluña)	JF682274
2008	NAV78-08	España (Navarra)	JF682275
2008	CAT73-08	España (Cataluña)	JF682276
2008	CAT74-08	España (Cataluña)	JF682277
2008	NAV781-08	España (Navarra)	JF682278
2008	NAV783-08	España (Navarra)	JF682279
2008	GAL83-08	España (Galicia)	JF682280
2008	AND84-08	España (Andalucía)	JF682281
2008	VAL96-08	España (Valencia)	JF682282
2008	CAT1010-08	España (Cataluña)	JF682283
2008	CAT1014-08	España (Cataluña)	JF682284
2008	CAT1013-08	España (Cataluña)	JF682285
2008	CAT1014-08	España (Cataluña)	JF682286
2008	CAT1005-08	España (Cataluña)	JF682287

Continuación de la Tabla 2.

AÑO	CEPA	ORIGEN	NUMERO DE ACCESO EN GENBANK
2008	CAT106-08	España (Cataluña)	JF682288
2009	Spain01_S9	España	DQ916239
2009	CAT251-09	España	F682319
2009	P98/02	Taiwan	GQ866120
2009	P98/20	Taiwan	GU299810
2009	PY45	Taiwan	GU299811
2009	BF19Hab09	Cuba	HF547326
2009	BF18Hab09	Cuba	HF547329
2009	BF17Mat09	Cuba	HF547336
2009	VAL109-09	España (Valencia)	JF682289
2009	CAT113-09	España (Cataluña)	JF682290
2009	NAV118-09	España (Navarra)	JF682291
2009	RIO119-09	España (La Rioja)	JF682292
2009	AND121-09	España (Andalucía)	JF682293
2009	CAT124-09	España (Cataluña)	JF682294
2009	GAL136-09	España (Galicia)	JF682295
2009	AR140-09	España (Aragón)	JF682296
2009	GAL141-09	España (Galicia)	JF682297
2009	AND144-09	España (Andalucía)	JF682298
2009	AND147-09	España (Andalucía)	JF682299
2009	CAT169-09	España (Cataluña)	JF682300
2009	CAT1741-09	España (Cataluña)	JF682301
2009	AR1742-09	España (Aragón)	JF682302
2009	AR1744-09	España (Aragón)	JF682303
2009	NAV177-09	España (Navarra)	JF682304
2009	AR1781-09	España (Aragón)	JF682305
2009	GAL178-09	España (Galicia)	JF682306
2009	AR1783-09	España (Aragón)	JF682307
2009	CAT186-09	España (Cataluña)	JF682308
2009	AR192-09	España (Aragón)	JF682309
2009	CAT197-09	España (Cataluña)	JF682310
2009	AR202-09	España (Aragón)	JF682311
2009	CAT204-09	España (Cataluña)	JF682312
2009	CAT213-09	España (Cataluña)	JF682313
2009	CAT214-09	España (Cataluña)	JF682314
2009	AND1472-09	España (Andalucía)	JF682315
2009	CAT234-09	España (Cataluña)	JF682316
2009	CEN244-09	España (no identificado)	JF682318
2009	CAT251-09	España (Cataluña)	JF682319
2009	CAT252-09	España (Cataluña)	JF682320
2010	BF20Hab10	Cuba	HF547327
2010	BF22Hab10	Cuba	HF547328
2011	Spain97SP11	España	DQ916241
2011	BF23Hab11	Cuba	HF547331
2011	Cepa Vacunal	Cuba	HF547335
2011	BF24Hab11	Cuba	HF547347

TIM2+G	
Modelo promediado	
Parámetros	Estimaciones
fA	0.2743
fC	0.2791
fG	0.2323
fT	0.2142
kappa	60.604
titv	29.565
rAC	36.923
rAG	132.981
rAT	37.993
rCG	0.7630
rCT	150.059
rGT	10.000
pinv(I)	0.4927
alpha(G)	0.3790

Tabla 3. Parámetros evaluados y estimaciones obtenidas mediante el programa JModeltest. Modelo seleccionado TIM2+G. Resultados obtenidos aplicando los principios AICc y BICc.

Determinación de las fuerzas evolutivas que rigen la diversidad genética del virus en España: selección natural y adaptación.

El análisis para detectar selección positiva en un linaje particular, así como en sitios de RHV, se efectuó empleando el programa PAML v4.7 sobre la base de 201 secuencias de origen Español. Para eliminar los falsos positivos y confirmar la veracidad de estos resultados, se aplicaron modelos para detectar selección neutral M1vsM2 y M7vsM8 como se describe en Pérez *et al.* (2012).

El análisis de presión de selección entre linajes y clados se realizó con el programa PAMLv4.7. La hipótesis nula se definió con una $w_2=1$, y la hipótesis alternativa con $W=estimada$. Cada uno de los clados y linajes fueron evaluados por separado y se definieron con "foreground" y el resto con "background". En este análisis se siguió la metodología previamente descrita por (Rosnow *et al.*, 2014).

Para analizar la divergencia funcional o ventaja adaptativa entre linajes y clados definidas, se consideró solo divergencia tipo I descrita en el programa Diverge (<http://xgu1.zool.iastate.edu>) (Gu and Vander Velden, 2002). Para este análisis se empleó la estructura cristalográfica de la proteína VP2 depositada en la base de datos de proteínas Protein Data Bank (PDB) con el ID: 2DF7 (Lee *et al.*, 2006), así como las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas de la VP2 de los aislados españoles.

Determinación de la dinámica genética de cada uno de los linajes de IBDV descritos en España.

Para determinar el ancestro común más reciente (*tMRCA*) de cada uno de los linajes analizados (IBD/vv, IBD/CI-at, IBD/CI-int, IBD/Sp-var), y las tasas de sustitución por sitio y por año, se empleó una aproximación Bayesiana: Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC).

Para evaluar la diversidad genética respecto al tiempo se empleó el reloj molecular relajado. Se calculó el perfil demográfico bayesiano o Bayesian Skyline plot (BSP), método que estima la distribución del tamaño poblacional efectivo a través del tiempo a partir de un conjunto de secuencias (Drummond *et al.*, 2005). El análisis se llevó a cabo mediante el empleo del programa BEAST (Drummond and Rambaut, 2007).

Las secuencias seleccionadas previamente fueron procesadas con la aplicación BEAUti, incluida en el paquete BEAST v1.8.1 (<http://beast.bio.ed.ac.uk>) para generar el documento de entrada para realizar el análisis Bayesiano.

Análisis de la distribución filogeográfica del virus

La distribución filogeográfica de los aislados IBD/vv y los aislados IBD/Sp-var del virus de IBD fue analizada con diferentes criterios:

La distribución de los aislados IBDV/vv se evaluó desde el punto de vista discreto y continuo, mientras que para el linaje IBD/Sp-var solo se evaluó el patrón continuo debido a que este linaje emergió en España, por lo tanto el origen del mismo ya se conoce. Para asociar la filogenia y el patrón de estructura geográfico se empleó el programa BaTS (*Bayesian Analysis for time series*) (<http://bioinfo.na.iac.cnr.it/bats>). En un primer análisis se incluyeron todas las secuencias de los aislados muy virulentos eliminando únicamente los virus vacunales. Posteriormente se realizó el análisis para los aislados españoles.

La dispersión de los aislados IBDV/vv y IBD/Sp-var se estimó con el método bayesiano para ver la inferencia de evolución histórica en el tiempo y en el espacio (Lemey *et al.*, 2010), empleando un modelo relajado de dispersión al azar (*Relaxed Random Walk*, "RRW"). Los resultados de ambos análisis se procesaron con el programa SPREAD (*Spatial Phylogenetic Reconstruction of Evolutionary Dynamics*) <http://www.phylogeography.org/SPREAD.html>, y los resultados fueron visualizados con el uso de Google Earth (<https://earth.google.com>).

Resultados

La relación filogenética basada en la RHV de los aislados del estudio y las extraídas de GenBank se estableció mediante inferencia Bayesiana empleando el modelo seleccionado a partir de los principios de AIC y BIC. El análisis evidenció que en España circulan 4 linajes del IBDV: clásico, clásico atenuado, muy virulento y un nuevo linaje que en este estudio denominamos variantes españolas de IBD (IBD/Sp-var) (Anexo: Fig. suplementaria 1). Al evidenciar una elevada variabilidad del virus en España, así como en las secuencias de los aislados previamente clasificados, se construyó un segundo árbol filogenético sólo con secuencias originarias de España (Figura 1).

En la Figura 1 se observa en panel izquierdo el árbol filogenético con todas las secuencias seleccionadas en este estudio (Tabla 1 y 2). Los valores de soporte de los nodos también se denotan. En el panel derecho se observa el árbol filogenético obtenido a partir de todas los aislados de origen español estudiadas (Tabla 1 y 2), se denotan los principales linajes y los clados definidos dentro de cada uno de los linajes.

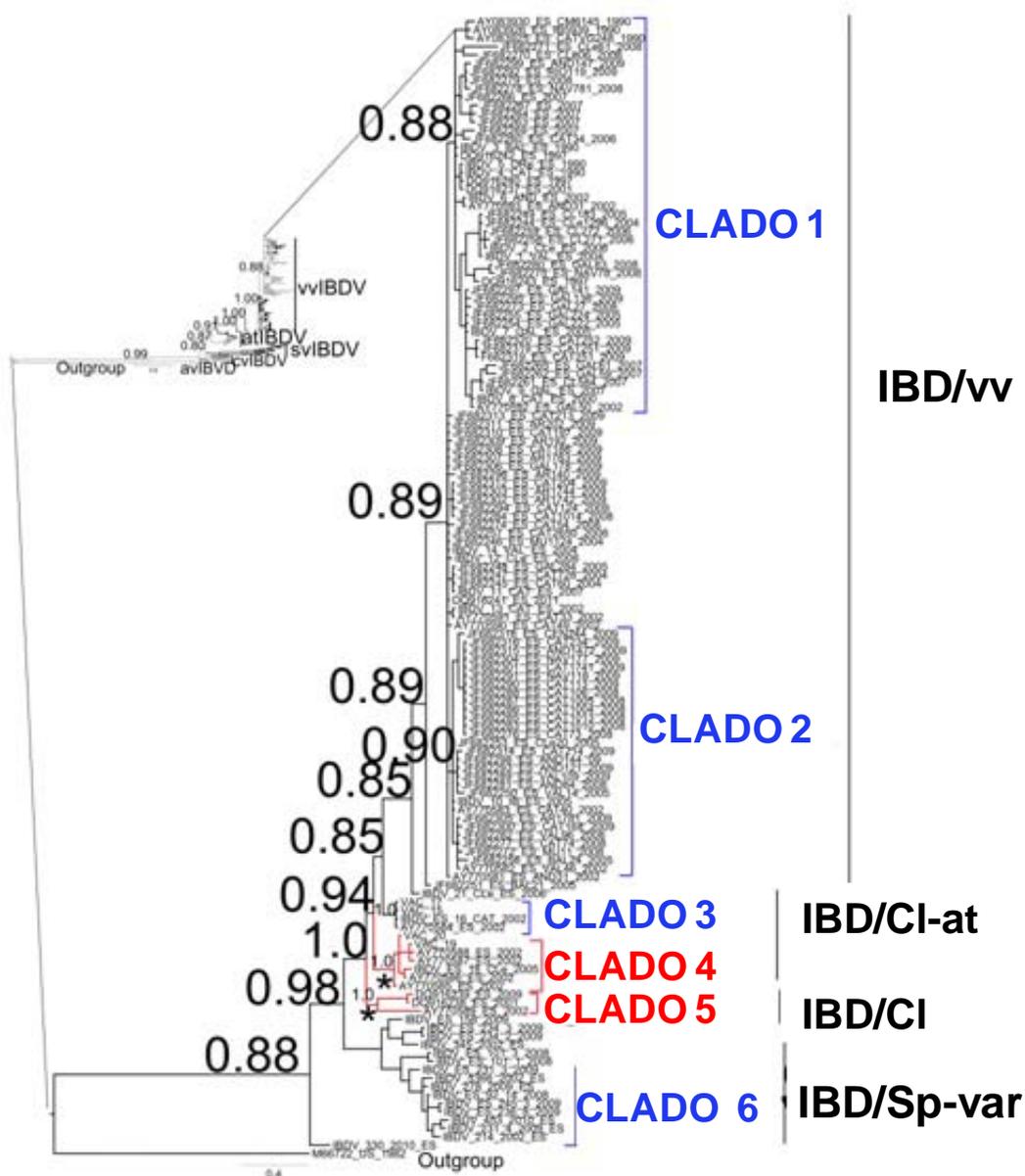


Figura 1. Filogenia realizada a partir de las secuencias de RHV incluidas en el estudio. El modelo empleado para la inferencia Bayesiana fue TIM2+G $\alpha=0,3790$. En el panel izquierdo superior se muestra la filogenia originada del análisis de todas las secuencias incluidas en el estudio. Los aislados de origen español, tanto los aislados de GenBank como los del estudio, son mostrados en la filogenia del panel derecho. El árbol filogenético muestra claramente los 4 genotipos que circulan en España.

El análisis de presión de selección entre sitios no determinó ningún sitio bajo selección positiva (Tabla 4). El análisis de presión de selección por ramas-sitios (*branch-site*) evidenció que ninguno de los linajes mostró una presión de selección positiva entre ellos (Tabla 5a).

Modelo nulo	Parámetros	-lnL	Modelo con selección positiva	Parámetros	-lnL	-2ΔlnL	Sitios seleccionados positivamente
M1a	$P_0=0,5$ $P_1=0,5$ $\omega_0=0,066$ $\omega_1=1,000$	1585,256	M2a	$P_0=0,90205$ $P_1=0,09661$ $P_2=0,00134$ $\omega_0=0,12126$ $\omega_1=1,000$ $\omega_2=999,00$	1518,967	132,578	
M7	$P=0,21294$ $q=0,20343$	1586,43792	M8	$P_0=0,99873$ $P=0,49503$ $(P1=0,00127)$ $q=2,216$ $\omega_2=999,00$	1512,98994	-146,89596	

Tabla 4. Resultados del análisis de presión de selección positiva entre sitios. No se observó ningún sitio seleccionado positivamente

Tabla 5. Análisis para la Identificación de episodios de presión de selección positiva entre los linajes generados en la filogenia (A) y entre clados (B). Obsérvese que no existen sitios de presión de selección positiva entre linajes y si se observan sitios afectados por presión de selección en los clados 4 y 5 correspondiente a los aislados clásicos y clásicos atenuados. InL: log-likelihood scores; n.m: modelo nulo; a.m: modelo alternativo * $p < 0,05$, $\chi^2 = 3,84$; ** $p < 0,01$, $\chi^2 = 5,99$.

A

Ramas definidas en la hipótesis alternativa (Foreground branches)	Parámetros ^{n.m}	-lnL ^{n.m}	Parámetros ^{a.m}	-lnL ^{a.m}	-2ΔlnL	Sitios seleccionados positivamente
Linaje IBD/vv	P ₀ = 0,715 P ₁ = 0,099 P _{2a} = 0,163 P _{2b} = 0,022 ω ₀ = 0,079 ω ₁ =1,000 ω ₂ = 1,000 P ₀ = 0,878	1455,721353	P ₀ = 0,715 P ₁ = 0,099 P _{2a} = 0,163 P _{2b} = 0,022 ω ₀ = 0,079 ω ₁ =1,000 ω ₂ = 1,000 P ₀ = 0,878	1455,721085	-0,000536	
Linaje IBD/at	P ₁ = 0,122 P _{2a} = 0,000 P _{2b} = 0,000 ω ₀ = 0,082 ω ₁ =1,000 ω ₂ = 1,000 P ₀ = 0,878	1456,733228	P ₁ = 0,122 P _{2a} = 0,000 P _{2b} = 0,000 ω ₀ = 0,082 ω ₁ =1,000 ω ₂ = 1,000 P ₀ = 0,878	1456,733164	-0,000128	
Linaje IBD/cv	P ₁ = 0,122 P _{2a} = 0,000 P _{2b} = 0,000 ω ₀ = 0,082 ω ₁ =1,000 ω ₂ =1,000 P ₀ = 0,870	1456,733197	P ₁ = 0,122 P _{2a} = 0,000 P _{2b} = 0,000 ω ₀ = 0,082 ω ₁ =1,000 ω ₂ = 3,102 P ₀ = 0,878	1456,733165	-6,40E-05	
Linaje IBD/Sp-var	P ₁ = 0,122 P _{2a} = 0,007 P _{2b} = 0,001 ω ₀ = 0,082 ω ₁ =1,000 ω ₂ = 1,000	1456,728717	P ₁ = 0,122 P _{2a} = 0,007 P _{2b} = 0,001 ω ₀ = 0,082 ω ₁ =1,000 ω ₂ = 1,000	1456,728685	-6,40E-05	

B

Ramas definidas en la hipótesis alternativa (Foreground branches)	Parámetros ^{n.m}	-lnL ^{n.m}	Parámetros ^{a.m}	-lnL ^{a.m}	-2ΔlnL	Sitios seleccionados positivamente
CLADO 1	P ₀ = 0,878 P ₁ = 0,122 P _{2a} = 0,000 P _{2b} = 0,000 ω ₀ = 0,082 ω ₁ =1,000 ω ₂ = 1,000	1456,733197	P ₀ = 0,878 P ₁ = 0,122 P _{2a} = 0,000 P _{2b} = 0,000 ω ₀ = 0,082 ω ₁ =1,000 ω ₂ = 1,000	1456,733229	-6,40E-05	
CLADO 2	P ₀ = 0,878 P ₁ = 0,122 P _{2a} = 0,000 P _{2b} = 0,000 ω ₀ = 0,082 ω ₁ =1,000 ω ₂ = 1,000	1456,733197	P ₀ = 0,878 P ₁ = 0,122 P _{2a} = 0,000 P _{2b} = 0,000 ω ₀ = 0,082 ω ₁ =1,000 ω ₂ = 1,000	1456,733164	-6,60E-05	
CLADE 3	P ₀ = 0,878 P ₁ = 0,122 P _{2a} = 0,000 P _{2b} = 0,000 ω ₀ = 0,082 ω ₁ =1,000 ω ₂ = 1,000	1456,733197	P ₀ = 0,878 P ₁ = 0,122 P _{2a} = 0,000 P _{2b} = 0,000 ω ₀ = 0,082 ω ₁ =1,000 ω ₂ = 1,000	1456,733165	-6,40E-05	
CLADO 4	P ₀ = 0,738 P ₁ = 0,099 P _{2a} = 0,144 P _{2b} = 0,019 ω ₀ = 0,077 ω ₁ = 1,000 ω ₂ =1,000	1455257132	P ₀ = 0,881 P ₁ = 0,102 P _{2a} = 0,016 P _{2b} = 0,002 ω ₀ = 0,085 ω ₁ =1,000 ω₂= 27,861	1449,221789	-12,070686	29Q, 57 G, 66M
CLADO 5	P ₀ = 0,447 P ₁ = 0,041 P _{2a} = 0,469 P _{2b} = 0,043 ω ₀ = 0,066 ω ₁ =1,000 ω ₂ =1,000	1441273329	P ₀ = 0,686 P ₁ = 0,063 P _{2a} = 0,023 P _{2b} = 0,021 ω ₀ = 0,066 ω ₁ =1,000 ω₂=3,864	1438,203545	-6,139568	18I; 25Q; 32I; 34G ; 39L; 54A; 55D; 60A; 62T; 70I; 76E

Dentro del linaje IBD/at, en los clados 4 y 5 algunas posiciones mostraron presión de selección positiva (Tabla 5b). Dentro de estos clados se localizaron virus vacunales de atenuación intermedia que fueron aislados de casos crónicos en el año 2002 (Dolz *et al.*, 2005).

El análisis de divergencia funcional tipo I o ventaja adaptativa evidenció una relación entre los linajes IBD/at y IBD/Sp-var y ninguna relación entre IBD/at y IBD/vv así como IBD/vv y IBD/Sp-var. De este modo las variaciones en las posiciones 251 y 273 favorecieron la emergencia del linaje IBD/Sp-var (Figura 2) y tabla 6).

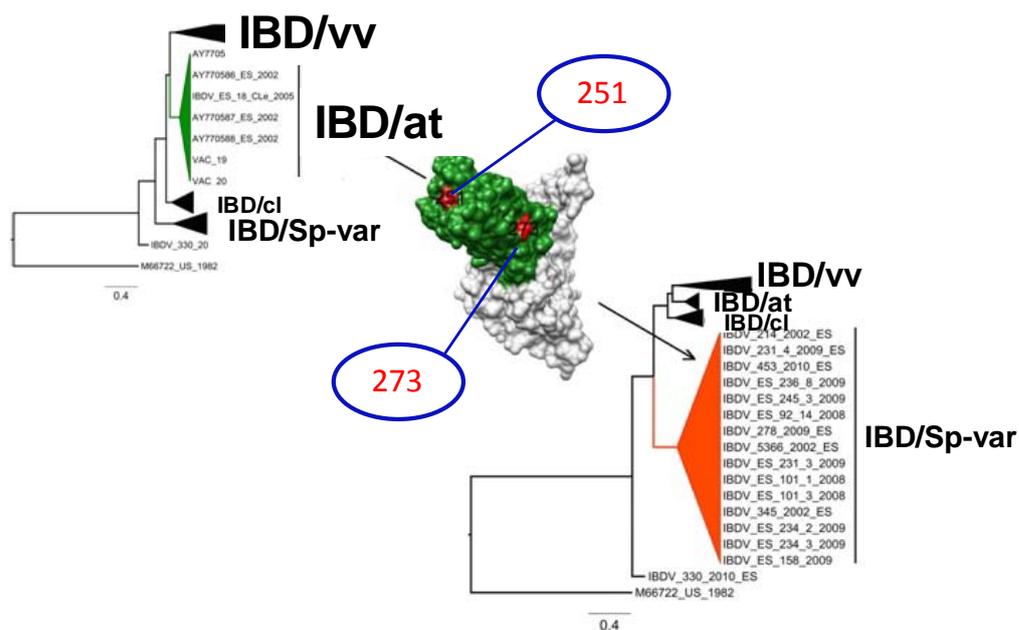


Figura 2. Identificación de las posiciones que han favorecido la emergencia del linaje Sp-var. La posición 251 localizada en el bucle P_{DE} y la posición 273 ubicada en la hoja beta F (PF) demuestran el cambio adaptativo que sufre el genotipo atenuado para favorecer la emergencia de nuevos linajes IBD/Sp-var.

Los tiempos de emergencia de cada uno de los linajes analizados se muestran en la Figura 3. El linaje con mayor variabilidad fue el IBD/vv con una tasa de evolución de 8.64×10^{-3} sustituciones/sitio/año (s/s/a), seguido por el linaje IBD/at con 3.85×10^{-3} (s/s/a), siendo el linaje más estable el IBD/Sp-var 1.94×10^{-3} (s/s/a).

Subgenotipo	θ_{ML}	θ_{SE}	θ_{LTR}	Qk	P
IBDV/at - IBDV/Sp-Var	1.354.785	0.459988	6.733.906	251, 273	P<0.01
IBDV/at - IBDV/vv	0.059400	0.343930	0.016597	None	
IBDV/vv - IBDV/Sp-var	0.244853	0.631509	0.068844	None	

Tabla 6. Estimaciones de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) del coeficiente de divergencia funcional de tipo I (θ) de comparación por pares entre VP2 de los aislados.

El análisis de BSP además evidencia como la variabilidad genética de los 3 linajes difiere considerablemente (Fig. 3). En el caso de los aislados IBD/vv tras la emergencia de este linaje ha ocurrido un aumento considerable de la diversidad genética del mismo en los años 2002-2004, año en el que también es máxima la variabilidad genética del linaje IBD/CI-at (Fig. 3). A partir del año 2006 se observa una disminución drástica de la variabilidad, para mantenerse estable después del año 2009. Las aisladas variantes españolas han mantenido unas tasas de variabilidad constantes desde su emergencia alrededor de 1995, manteniendo un patrón de evolución independiente del resto de linajes circulantes.

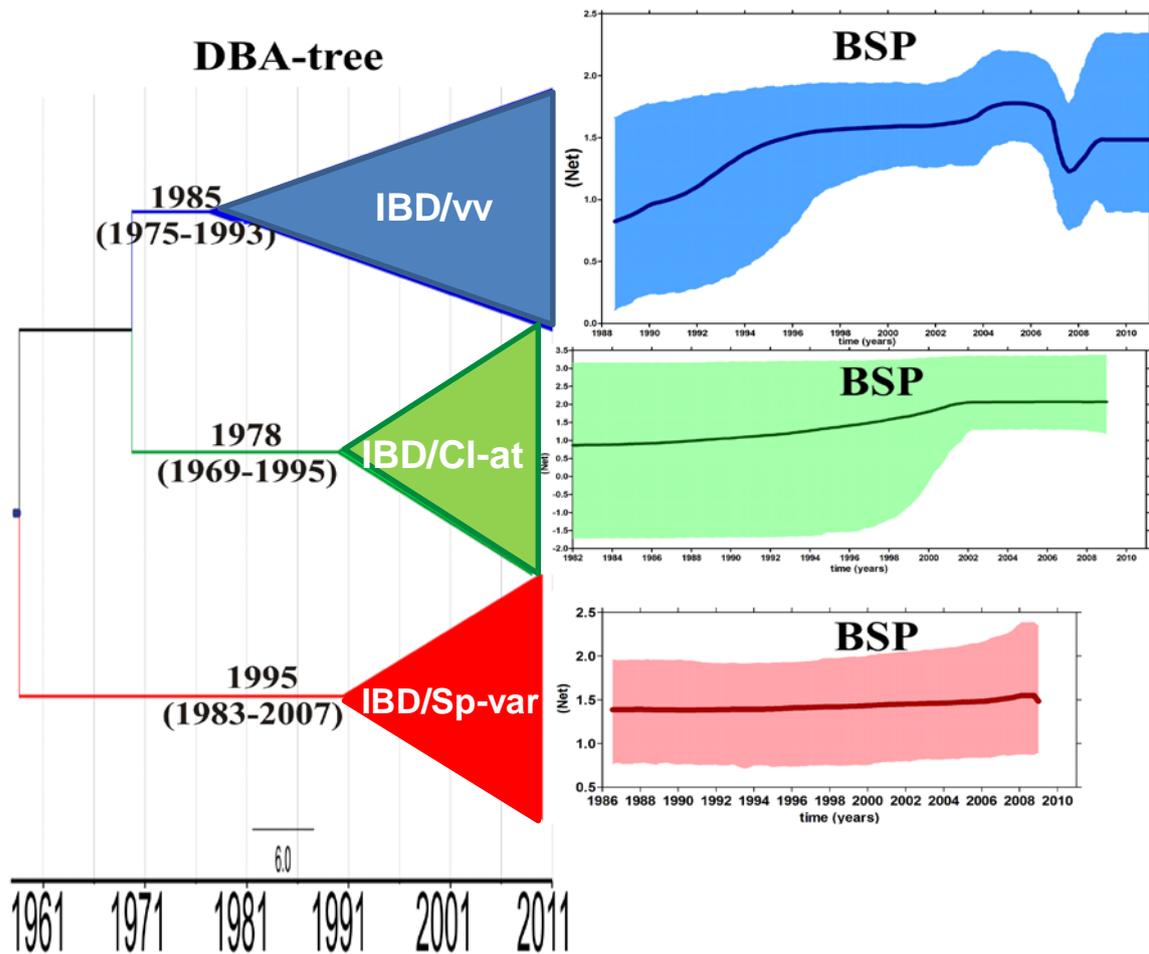


Figura 3. Filodinámica del virus de la Bursitis Infecciosa. Representación de la desviación en el tiempo de las fechas correspondientes a los ancestros comunes más recientes de los linajes analizados (tMRCA). El año aproximado en el que el ancestro generó la emergencia de cada uno de los linajes se muestra en el nodo interno. La columna de la derecha muestra un gráfico BSP representando la diversidad genética relativa de los aislados que circulan en España en el tiempo. Los genotipos son identificados con colores distintos, azul para los aislados muy virulentos, verde para los aislados atenuados y rojo para los aislados del nuevo linaje Sp-var.

El análisis filogeográfico evidenció que los aislados IBD/vv se dispersaron por el país alrededor de los años 90, con un origen directamente relacionado con los aislados que emergieron en Irán en el año 1981, que también dieron lugar al brote en los Países bajos (Figura 4). La distribución de este linaje por España ha sido heterogénea con una mayor difusión en la región oriental del país, pero con focos de dispersión en el centro y norte, tal como lo demostró la dispersión obtenida por

el análisis de filogeografía continua (Figura 5). A diferencia del linaje IBD/vv el linaje IBD/Sp-var mostró una distribución homogénea con una dispersión o diseminación fundamentalmente en la región oriental de España (Figura 6).

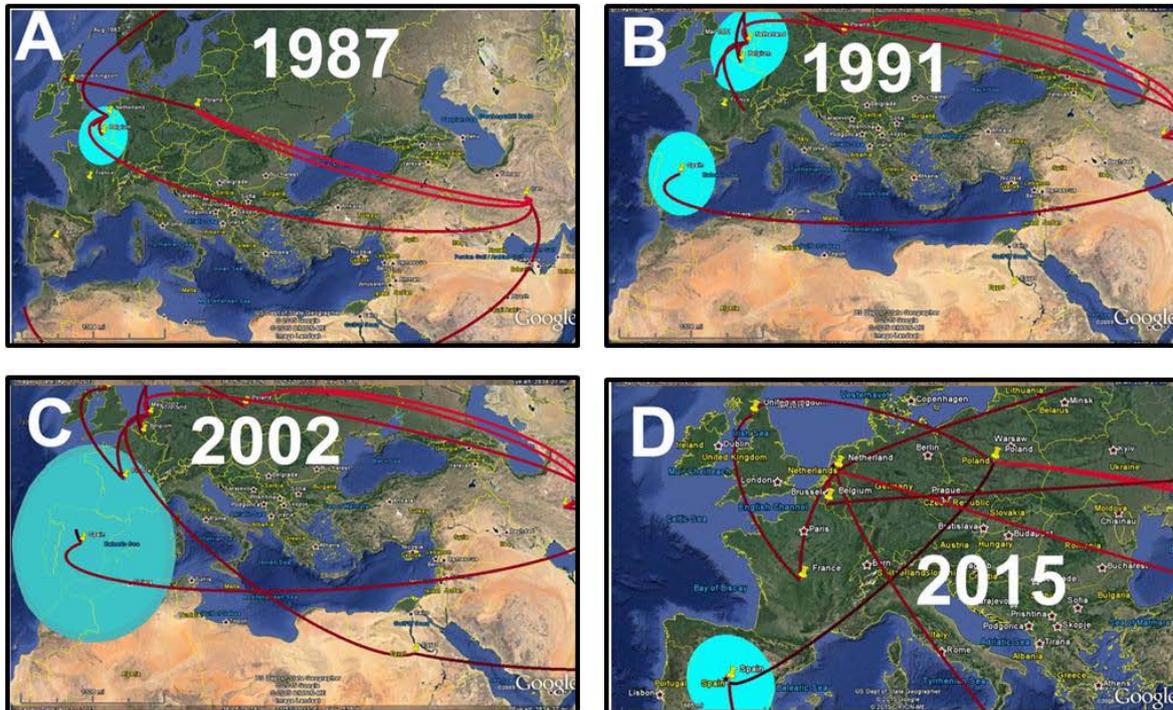


Figura 4. Dinámica de difusión en el tiempo y en el espacio de IBD/vv entre Asia y Europa (1987). En la figura A, se muestra el ingreso del virus a Europa desde Irán. En la figura B se observa el ingreso del virus a España desde Irán que fue estimado en 1991. En la figura C y D se muestra el comportamiento estable de linaje IBD/vv desde 2002 hasta el 2015. Solo los valores de $B\geq 5$ fueron considerados significantes para la elaboración del gráfico. Los resultados fueron visualizados usando las bases de Google Earth.

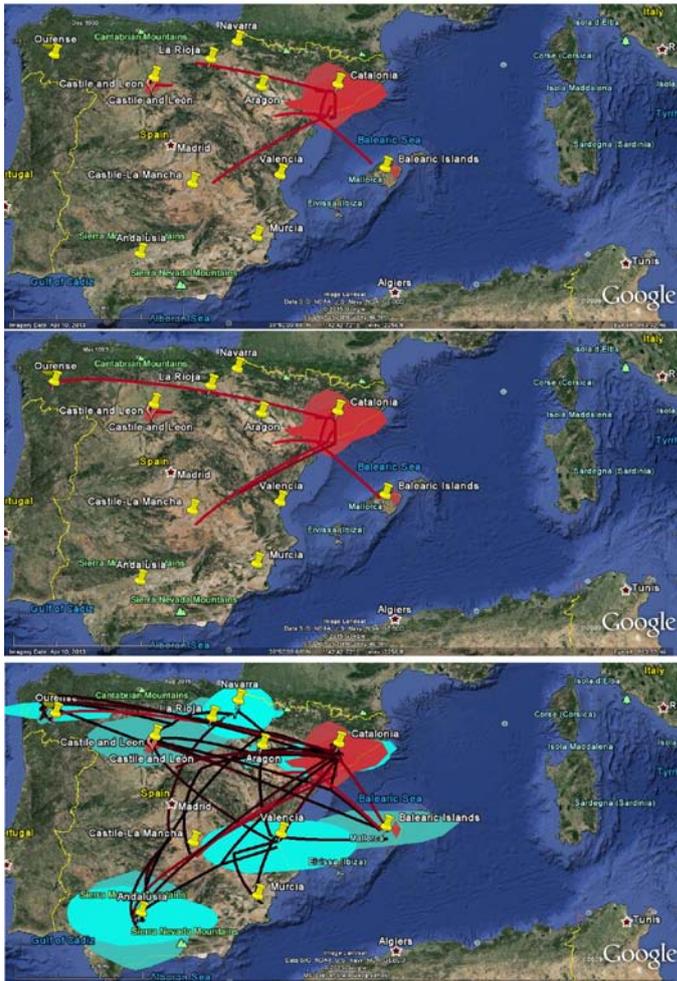


Figura 5. Difusión del linaje IBD/vv en España. Este linaje se disemina más heterogéneamente, con una mayor difusión en la zona este del país y con focos de dispersión más intensos hacia el sur y norte del país.

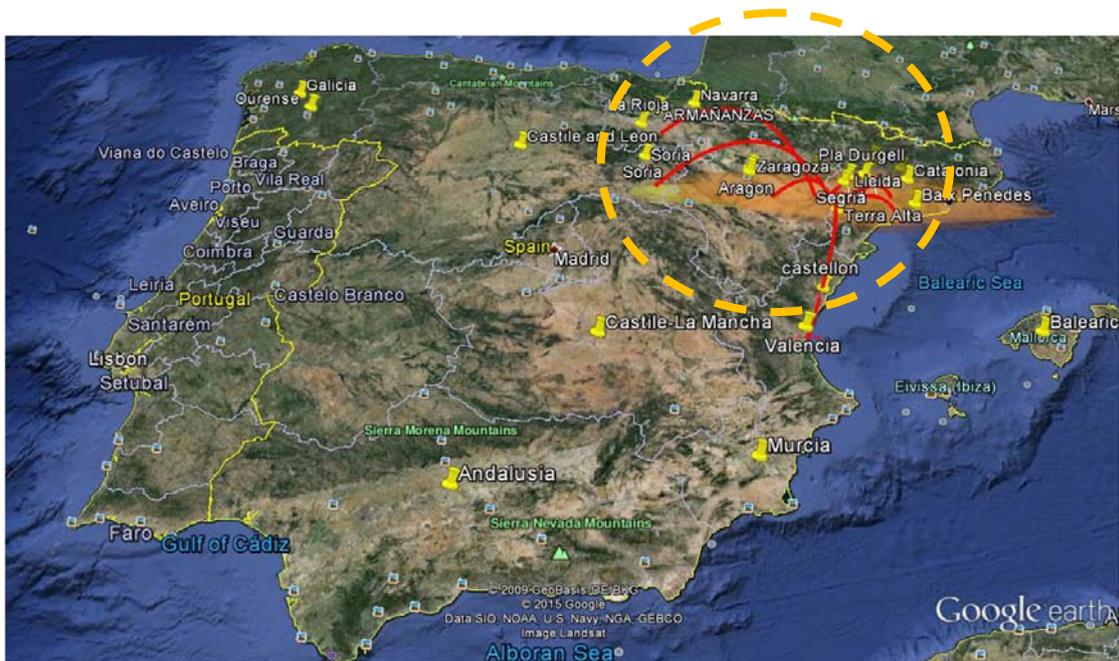


Figura 6. Difusión del nuevo linaje IBD/Sp-var. Véase en el mapa que el linaje Sp-var se distribuye homogéneamente y la difusión de los aislados prevalece en la región oriental de España.

Discusión

Si bien todos estos años se ha venido caracterizando genéticamente los virus a partir de muestras de aves sospechosas de tener la enfermedad procedente de diversos lugares, ha sido de suma importancia conocer aspectos como la dispersión y la evolución del virus para esclarecer desde dónde y cómo se han difundido estos virus en el país. El uso de herramientas como la filogeografía y la inferencia bayesiana nos ha permitido definir y visualizar la dinámica espacial y temporal de los linajes virales presentes en España.

Con el fin de entender mejor la epidemiología de IBD, en el presente estudio se realizó la reconstrucción filogeográfica para explicar el origen y la propagación de los aislados de IBD presentes en España, analizando la diversidad genética y la dinámica espacio-temporal de las mismas. EL estudio de la filodinámica de IBDV ratifica que la emergencia de IBD/vv corresponde con la emergencia mundial para este linaje desde los ancestros emergidos en Irán alrededor de los años 70 (Figura 3), hasta el ingreso a Europa a través de Bélgica (1981-1987)(Alfonso-Morales *et al.*, 2013).

Inicialmente se pensaba que los virus detectados en España habían emergido desde los Países bajos a finales de los 80. Sin embargo, el análisis de la distribución filogeográfica de IBD/vv españoles analizados en este estudio determinó que tienen origen en Irán, como sucede con los virus de los Países Bajos, habiendo evolucionado de forma individual e independiente. Estos virus llegaron a España años después probablemente como consecuencia de la expansión a través de las ruta de aves migratorias que cubren Asia y Europa (Jeon *et al.*, 2008) tal y como ha ocurrido con la expansión de otros virus como Influenza aviar (FAO, 2005).

El análisis filogeográfico evidenció que en España los aislados muy virulentos se dispersaron por todo el país en los años 90 y se relaciona con los casos de la

enfermedad aguda descritos a finales de los 90 (Majó *et al.*, 2002).

En general, la rápida diseminación de este linaje en un período corto se pudo deber a varios factores, entre ellos la ineficiente inmunización por falta de biológicos adecuados en ese momento. El continuo movimiento de aves de corral entre centros y quizás los desplazamientos de aves salvajes han contribuido a la distribución de los virus muy virulentos dentro de España, la cual ha sido heterogénea y con una mayor tasa de difusión en el este del país, pero con focos de dispersión en el centro sur y norte del país, tal como lo muestra el análisis de filogeografía continua. Estos resultados quizás no sean tan concretos puesto que nuestro centro recibe un volumen mucho mayor de muestras procedentes del este del país. Además, cabe destacar que la introducción de vacunas de virulencia intermedia para el control de la forma aguda probablemente derivó en una disminución de la diversidad genética de la población de virus durante un periodo y la enfermedad fue controlada, aunque no erradicada. Sin embargo, hasta el año 2015 no se observaron introducciones adicionales para este linaje, con lo que la evolución y variabilidad del virus parece depender únicamente de la interacción con otros aislados circulantes en el país: En este sentido, sugerimos que la evolución del virus en España depende de las medidas de control con vacunas que por reintroducciones de otros virus.

Cuando analizamos la emergencia de todos los linajes en el país, la emergencia del linaje clásicos también se corresponde con la emergencia mundial para este tipo de virus (Alfonso-Morales *et al.*, 2013). Según los resultados obtenidos, la adaptación y posterior divergencia de estos aislados dieron lugar a la emergencia de un nuevo linaje IBD/Sp-var, que puede surgir como un linaje de escape a la vacunación aplicada en España, luego de la introducción de virus atenuados de atenuación intermedia. Curiosamente, el aumento de la diversidad genética tanto de los virus muy virulentos como de virus clásicos atenuados logra un valor máximo hacia los años 2002-2004, lo que podría coincidir con la introducción en

campo y adaptación de los virus vacunales intermedios. Este hecho influye considerablemente en la disminución de la variabilidad del linaje IBD/vv lo que indica que la introducción de virus vacunales de tipo intermedio ayudó a controlar la diversidad en campo de los aislados IBD/vv en España, pero influyó en el incremento en la diversidad del linaje IBD/CI-at. De ahí se deduce que este tipo de vacuna pueda haber disminuido la competencia de los linajes e inducido una mejor adaptación de los virus del linaje IBD/Sp-var.

A diferencia del linaje muy virulento, el linaje IBD/Sp-var se mantiene estable en el tiempo con una distribución homogénea y dispersión en la región oriental de país, por lo que no se ha podido establecer poblaciones por regiones geográficas. Este comportamiento que no es característico en los linajes emergentes, sin embargo, podría darse si se tiene en cuenta que este linaje pudo haber emergido como escape a partir de IBD/CI-at.

En la secuencia aminoacídica de RHV podemos observar que la posición 251 se localiza en el lazo externo P_{DE} de la proteína, en la región más expuesta, por lo tanto una variación en este sitio puede suponer un escape a la respuesta inmune inducida por anticuerpos neutralizantes, lo cual ha sido sugerido anteriormente por (Coulibaly *et al.*, 2005). La posición 273 se localiza en la lámina beta F (P_F), la cual ha sido asociada a cambios en la virulencia y patogenicidad (Coulibaly *et al.*, 2005). Así estos cambios adaptativos del linaje IBD/CI-at sugieren inicialmente un escape a la respuesta inmune circulante en la población y posteriormente un cambio tanto en la virulencia como en la patogenicidad viral, que pudo facilitar la emergencia y establecimiento del linaje IBD/Sp-var.



Fig. Suplementaria 1. Árbol filogenético basado en la RHV. Filogenia Bayesiana inferida con el modelo TIM2+G. Las secuencias de aislados IBDV españoles empleados en este estudio se resaltan en azul (Tabla 1) y las secuencias de aislados seleccionados de GenBank se remarcan en negro. La reconstrucción filogenética se basa en RHV de VP2. Además del serotipo 2, se observan clados bien soportados que identifican a los subtipos del IBD/vv (muy virulento), IBD/CI (Clásico), IBDV-Cl-at (Clásico atenuado), IBD/CI-at (Clásico atenuado), IBD/Var (Variantes antigénicas) y el nuevo linaje IBD/Sp-var. Los aislados de origen español se encuentran identificadas en los clados IBD/vv, IBD/CI, IBD/CI-at y IBD/Sp-var.

Estudio 3

Análisis del genoma completo de aislados españoles del virus de la
Bursitis infecciosa aviar

Introducción

El conocimiento de las bases moleculares del IBDV que están implicadas en la virulencia de las cepas, sigue siendo tema de investigación (Jackwood and Sommer, 2005). Desde ya hace años, la caracterización molecular del virus se ha enfocado en el estudio de la RHV de VP2 revelando las mutaciones que podrían influir en la virulencia de las cepas (Brandt *et al.*, 2001). Aún así, mediante sistemas de genética reversa, se ha demostrado que la sustitución de VP2 de un fenotipo clásico por uno muy virulento no resulta en un incremento de virulencia del virus mosaico obtenido y, por consiguiente, se ha reconocido que la VP2 no es el única proteína determinante de virulencia del virus (Boot *et al.*, 2000). Diversos estudios concluyen que la proteína VP1 interviene en la eficacia de la replicación vírica y, por ende, en la virulencia (Islam *et al.*, 2001; Liu and Vakharia, 2004; Zierenberg *et al.*, 2004). En base a estos resultados, se hipotetiza, que los factores de virulencia del IBDV podrían encontrarse en varias de las proteínas virales o deberse a interacciones de las mismas y probablemente juegan un papel decisivo en la replicación del genoma viral, en la transcripción y traducción, en el ensamblaje vírico y, finalmente, en la liberación de virus al medio extracelular (Hon *et al.*, 2006; Tacken *et al.*, 2003). Desafortunadamente, existen pocos estudios que comparen las secuencias completas de diferentes IBDV y permitan correlacionar cambios genéticos con características fenotípicas de las distintas cepas virales.

La generación *in vitro* de virus *reassortant* con capacidad infecciosa indujo la idea de la existencia de este tipo de IBDV en la naturaleza (Lana *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2005; Mundt and Vakharia, 1996). En 2006, Le Nouen y col. reportaron los primeros virus *reassortant* encontrados de forma natural y posteriormente se han descrito por diversos autores en diferentes países (Chen *et al.*, 2012; He *et al.*, 2014; Jackwood *et al.*, 2011; Le Nouen *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2006). Dichos aislamientos que presentaban el segmento A relacionado filogenéticamente al

linaje IBDV/vv y el segmento B con características de aislados clásicos desarrollaron una patogenicidad intermedia (Le Nouen *et al.*, 2006). Adicionalmente, varios estudios de filogenia han demostrado que el segmento B de los aislados IBDV/vv se suelen agrupar en un clado diferente al de los aislados clásicos y esto también soporta la hipótesis de que la expresión del segmento A no es suficiente para regular la virulencia (Eterradossi *et al.*, 1999; Islam *et al.*, 2001).

Así como este tipo de eventos en donde estos virus bisegmentados intercambian de segmento, también se han reportado virus que incorporan sustituciones provenientes de una misma región desde otro virus similar, esta forma denominada recombinación homóloga también ha sido descrita en IBD (Hon *et al.*, 2008)

Con el objetivo de comprender un poco más los posibles marcadores de virulencia y atenuación y la relación entre los distintos genes del IBDV, en este estudio se realizó la secuenciación completa de los segmentos codificantes A y B de 2 aislados atenuados y 16 aislados del virus muy virulento de IBDV, procedentes de diferentes regiones del país.

Materiales y métodos

Virus

Para el presente estudio, se seleccionaron 18 aislados de IBDV (16 IBDV/vv y 2 atenuadas) de campo que habían sido detectados en distintos años y regiones españolas (Tabla 1). También se seleccionaron 4 aislados de IBDV vacunales utilizados ampliamente en el sector avícola español.

Aislado	Genotipo	Origen	Año de detección
IBDV/Spain/90/Gir	Muy virulenta	ND	Primeras cepas aisladas en España
IBDV/Spain/90/AX	Muy virulenta	ND	Primeras cepas aisladas en España
IBDV/Spain/02/GUM 05	Clásica atenuada	ND	2002
IBDV/Spain/02/GUM 31	Muy virulenta	Región Sur	2002
IBDV/Spain/02/GUM 50	Muy virulenta	Región Nor Oeste	2002
IBDV/Spain/02/GUM 33	Muy virulenta	ND	2002
IBDV/Spain/04/60	Muy virulenta	Cataluña	2004
IBDV/Spain/04/1296	Muy virulenta	Castilla León	2004
IBDV/Spain/04/BOR	Muy virulenta	Murcia	2004
IBDV/Spain/05/20	Clásica atenuada	Castilla León	2005
IBDV/Spain/05/21	Muy virulenta	Islas Baleares	2005
IBDV/Spain/04/22	Muy virulenta	Galicia	2005
IBDV/Spain/05/27	Muy virulenta	Castilla León	2006
IBDV/Spain/06/37	Muy virulenta	Castilla León	2006
IBDV/Spain/06/38	Muy virulenta	Castilla León	2006
IBDV/Spain/07/MP	Muy virulenta	Galicia	2007
IBDV/Spain/07/51	Muy virulenta	ND	2007
D78	Clásica atenuada	Cepa vacunal Laboratorios Intervet	
228E	Clásica atenuada	Cepa vacunal Laboratorios Intervet	
CH80	Clásica atenuada	Cepa vacunal Laboratorios Hipra	
GM97	Clásica atenuada	Cepa vacunal Laboratorios Hipra	

Tabla 1. Relación de aislados incluidos en el estudio. Se indica el nombre del aislado, genotipo al que pertenecen, el lugar y año de detección. La genotipificación estuvo basada en la caracterización de la RHV de VP2.

Extracción del ARN vírico

La extracción del ARN vírico a partir de tejidos se realizó en dos pasos como está descrito previamente en el Estudio 1. La extracción de los virus vacunales se llevó a cabo a partir de 100 µl de una dilución 1:1000 empleando únicamente el kit para extracción, RNA Isolation NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel). Finalmente, el ARN fue cuantificado con un Espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) y almacenado a -80°C.

Obtención del cDNA

La amplificación del Segmento A y B fue realizada optimizando una RT-PCR maestra con ajustes de la misma por cada juego de cebadores. Se utilizaron 6 pares de cebadores 1A, 2A, 3A para el segmento A y 1B, 2B y 3B para el segmento B, (Tabla 2).

Cebador	Secuencia (5'-3')	Segmento	Producto (pb)	Localización	Tm/°C
A1F	GGATGG ^R ACTCCTCCTTCT	A		SEG A 61-81	53
A1R	CTCGAAGTTGCTCACCCC	A	1092	SEG A 1228-1245	55
A2F	ACATCCATCAAACCTGGA	A		SEG A 1045-1061	47,6
A2R	GGGGTCTCTTTGAACTC	A	1373	SEG A 2401-2418	49
A3R	AGGAGCCTCACTCAAGGTCC	A		SEG A 2202-2221	58,7
A3F	CAAGCTCGCCACTGCACACC	A	973	SEG A 3156-3175	61,8
1BF	TTAGAA ^T TCTAGGATACGATGGGTCTGAC	B		SEG B 5'	57
1BR	CACGGGCCAGGTTATCATTGAG	B	1200	SEG B 1157-1178	58
2BF	GCTGCTCAGCATGCTAAGTGAC	B		SEG B 1019-1040	58,5
2BR	GATCCCRAGATCTTTGCTGTA	B	900	SEG B 1842-1862	53
3BF	CCTTGCAACAACAGGGTACCTGAG	B		SEG B 1751-1774	61
3BR	TGGGGGCCCCCGCAGGCGAA	B	1000	SEG B 3'	69,8

Tabla 2. Cebadores para la amplificación del segmento A y B.

Los productos de amplificación fueron obtenidos mediante RT-PCR en un solo paso utilizando el kit SuperScript™III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen Corporation). La mezcla maestra de la reacción consistió en 1µl de mix de enzimas SuperScript™ III RT/ Platinum® Taq de alta fidelidad, 25µl de buffer conteniendo 0.4 mM de cada dNTP, 2.4 mM de MgSO₄ y 2µl de primer (forward y reverse) en una concentración de 10µM sumado a 40ng de muestra eluída en 2µl de agua ultra pura, todo esto en un volumen total de 50µl. Las condiciones de los ciclos de amplificación se determinaron según la recomendación del fabricante y modificando la temperatura de hibridación según los cebadores usados (Tabla 3 y 4). El producto de PCR fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% usando Bromuro de Etidio para el revelado. Cada fragmento fue purificado usando el kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel).

Clonación de los fragmentos obtenidos

Una vez obtenido el fragmento purificado fue clonado en el sistema Zero Blunt® TOPO® (Figura 1). Para la transformación de los plásmidos en células E. Coli DH10B electro competentes se empleó el kit One Shot® Electroporation (Invitrogen Corporation). La detección de colonias positivas se realizó mediante el empleo de una PCR específica con cebadores incluidos en el Kit (Figura 1). Estos

clones fueron cultivados en LB con 50 ug/ml kanamicina y el DNA plasmídico fue extraído con NucleoSpin® Plasmid kit (Macherey-Nagel).

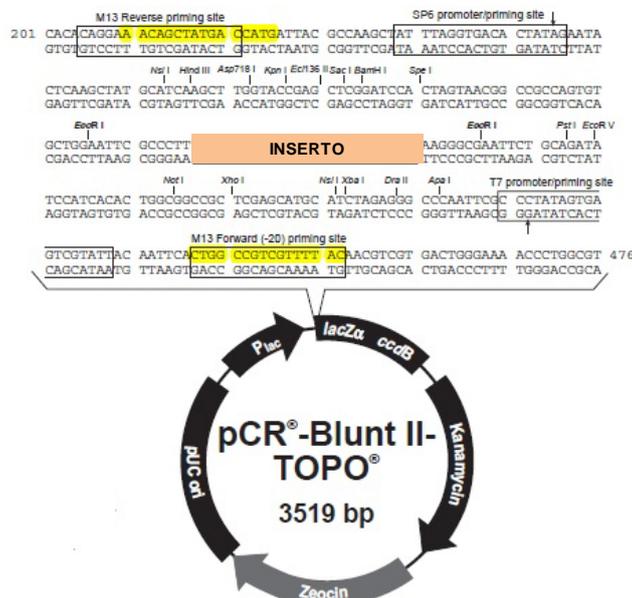


Figura 1. Mapa del vector de clonación Zero Blunt® TOPO®

Secuenciación

La secuenciación de los fragmentos se llevó a cabo a partir de 5 colonias para cada fragmento distinto. Se realizó una cuantificación por densitometría mediante la utilización de diferentes concentraciones del plásmido pUC19. Estos productos fueron secuenciados usando los mismos cebadores empleados en la amplificación (en ambos sentidos) a una concentración de 5 uM, utilizando el kit ABI PRISM Big Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing ready reaction (Applied Biosystems). La reacción de secuenciación se realizó con las siguientes condiciones: 96°C por 1 min., y 25 ciclos a 96°C por 10seg, 50°C por 5 seg. y 60°C por 4 min. Seguidamente estos productos fueron purificados con el sistema Montage SEQ96 cleanup kit (Millipore Corporation, Billerica, MA). Los productos de la secuenciación fueron analizados mediante electroforesis capilar en ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems). Las secuencias fueron analizadas en primera

instancia con el software Sequencing Analysis Software v5.1 (Applied Biosystems). Para el ensamblaje de las secuencias se utilizaron los softwares ChromasPro (Technelysium Pty Ltd) y BIOEDIT Sequence Alignment Editor 7.0.

Reconstrucción filogenética

La filogenia fue inferida utilizando el método de máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*) con el empleo del modelo Tamura- Nei. Los árboles que se muestran son los conseguidos con la más alta probabilidad. En todos los casos, el árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo mediante la aplicación del método Neighbor-Joining a una matriz de distancias por parejas estimadas, utilizando el método de máxima verosimilitud Compuesto (MCL). Los árboles están dibujados a escala, con longitudes de rama medidas como el número de sustituciones por sitio (s/s). Todas las posiciones conteniendo guiones o espacios vacíos fueron eliminadas. El análisis se llevó a cabo con el programa MEGA 6.0.

El análisis evolutivo se realizó de diversas formas. Primero realizando una filogenia a partir de los segmentos completos A y B, y después realizando el análisis con las proteínas VP5, VP2, VP4 y VP3 independientemente. En ambos casos se incluyeron dieciséis aislados de referencia previamente publicados en Gen Bank (Tabla 3).

Cepa Viral	Genotipo	Número de Acceso en GenBank		Origen
		Segmento A	Segmento B	
UK661	Muy Virulenta	X92760	X92761	Reino Unido
BD 3/99	Muy Virulenta	AF362776	AF362770	Bangladesh
SH95	Muy Virulenta	AY134874	AY134875	China
HK46	Muy Virulenta	AF092943	AF092944	Hong Kong
OKYM	Muy Virulenta	D49706	D49707	Japón
UPM97/61	Muy Virulenta	AF247006	AF527040	Malasia
D6948	Muy Virulenta	AF240686	AF240687	Países Bajos
Winterfield 2512	Clásica atenuada	ND	AF083092	Estados Unidos
P2	Clásica atenuada	X84034	X84035	Alemania
CU1	Clásica atenuada	D00867	AF362775	Alemania
Lukert	Clásica atenuada	AY918948	AY918947	Estados Unidos
CEF94	Clásica atenuada	AF194428	AF194429	Países Bajos
52/70	Clásica	D00869	D12610	Estados Unidos
STC	Clásica	D00499	ND	Estados Unidos
CU1 (wt)	Clásica	AF362747	AF362748	Alemania
Variante E	Variante americana	AF133904	AF133905	Estados Unidos
OH	Serotipo 2	U030818	U030819	Estados Unidos

Tabla 3. Cepas de referencia utilizadas en el estudio. ND, no disponible en GenBank.

Divergencia

Estimamos la divergencia evolutiva dentro de los grupos muy virulento y atenuado para los segmentos completos y las proteínas independientes. El análisis fue efectuado usando el modelo Maximum Composite Likelihood (MCL) con el programa MEGA6.

Análisis de recombinación

Con el objetivo de verificar si existe recombinación en las secuencias de los aislados del estudio y poder interpretar mejor las genealogías, las 22 secuencias tanto de virus vacunales como de aislados de campo fueron tratados con el programa RDP Beta versión 4.56. Los sitios de recombinación fueron examinados utilizando 9 métodos: RDP, GENECONV, Chimaera, MaxChi, 3Seq, Bootscan y Siscan con un valor $p < 0.05$. Los árboles elaborados se basaron en el método Neighbour-Joining con el modelo Jukes y Cantor (Jukes T.H. and Cantor C.R., 1969) y un bootstrap de 1000 repeticiones.

Resultados

Análisis de secuencia y filogenia

La filogenia comparativa de los segmentos completos A y B de cada uno de los genotipos analizados se agrupan en clados separados (Figura 2), en el caso del segmento A, los aislados IBDV/vv se asocian en el árbol con el segmento A de otros aislados IBDV/vv de referencia mostrando una distancia de 0,013 entre ellos. Un comportamiento idéntico presenta las secuencias del segmento A de los aislados atenuados pues se ven asociados formando un clado, mostrando una distancia media en base nucleotídica de 0.015 entre ellas.

Por otro lado, la filogenia del segmento B, asocia a los aislados IBDV/vv del estudio con los aislados IBDV/vv de referencia en un solo clado, mostrando una distancia de 0.016 entre ellos y el segmento B de los aislados atenuados se asocian en otro clado con los aislados clásicos, atenuados y variante E de referencia y su comparación con estos aislados muestran una distancia de 0.011 en base nucleotídica.

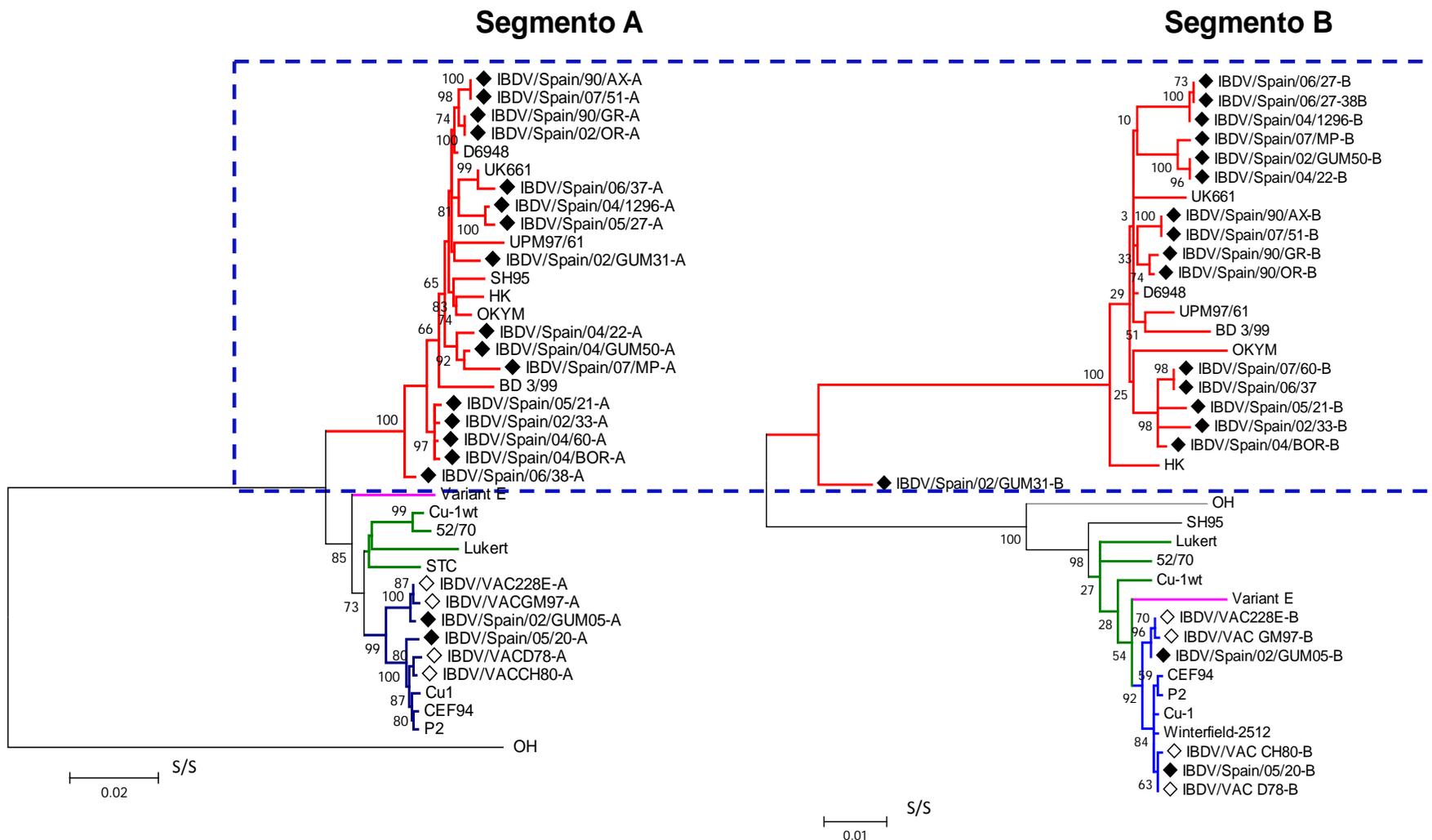


Figura 2. Reconstrucción filogenética de IBDV basados en la secuencia completa del Segmento A (Izquierda) y B (Derecha). La inferencia filogenética fue calculada usando el método Maximum Likelihood, con un Bootstrap de 1000 réplicas. Se denotan el linaje IBD/vv (línea roja) y el linaje IBD/CI-at (línea azul). El símbolo \blacklozenge indica las secuencias de aislados de campo y el símbolo \diamond indica las secuencias de virus vacunales. El recuadro de líneas entrecortadas muestra como el linaje IBD/vv adopta la misma misma distribución en la filogenia cuando se analiza tanto el segmento A como el B.

Análisis del segmento A

El segmento A está constituido por 3457 nucleótidos en todos los aislados del estudio. La ORF 1 que origina la proteína VP5 resultó en 415 nucleótidos los cuales codifican para 138 aminoácidos. La ORF 2 codificante de la poliproteína VP2-VP4-VP3 resultó en 3039 nucleótidos los cuales codificaron para un total de 1012 aminoácidos. Para el análisis de secuencias y la elaboración de la filogenia se consideraron las proteínas independientemente. Las secuencias de nucleótidos mostraron una alta similitud entre los aislados estudiados y se obtuvieron valores de distancia media entre aislados de 0,004 para el linaje IBDV/vv y 0,01 para el linaje atenuado. Los valores de divergencia entre los aislados de cada genotipo no se vieron influenciada por los factores lugar y año de colección de los aislados.

VP5

La filogenia asocia claramente las secuencias de VP5 de aislados virulentos (tanto de los aislados del estudio como de las aislados de referencia) en un clado soportado por un bootstrap de 77% y los de aislados atenuados en otro clado soportado por un bootstrap de 86% (Figura 3).

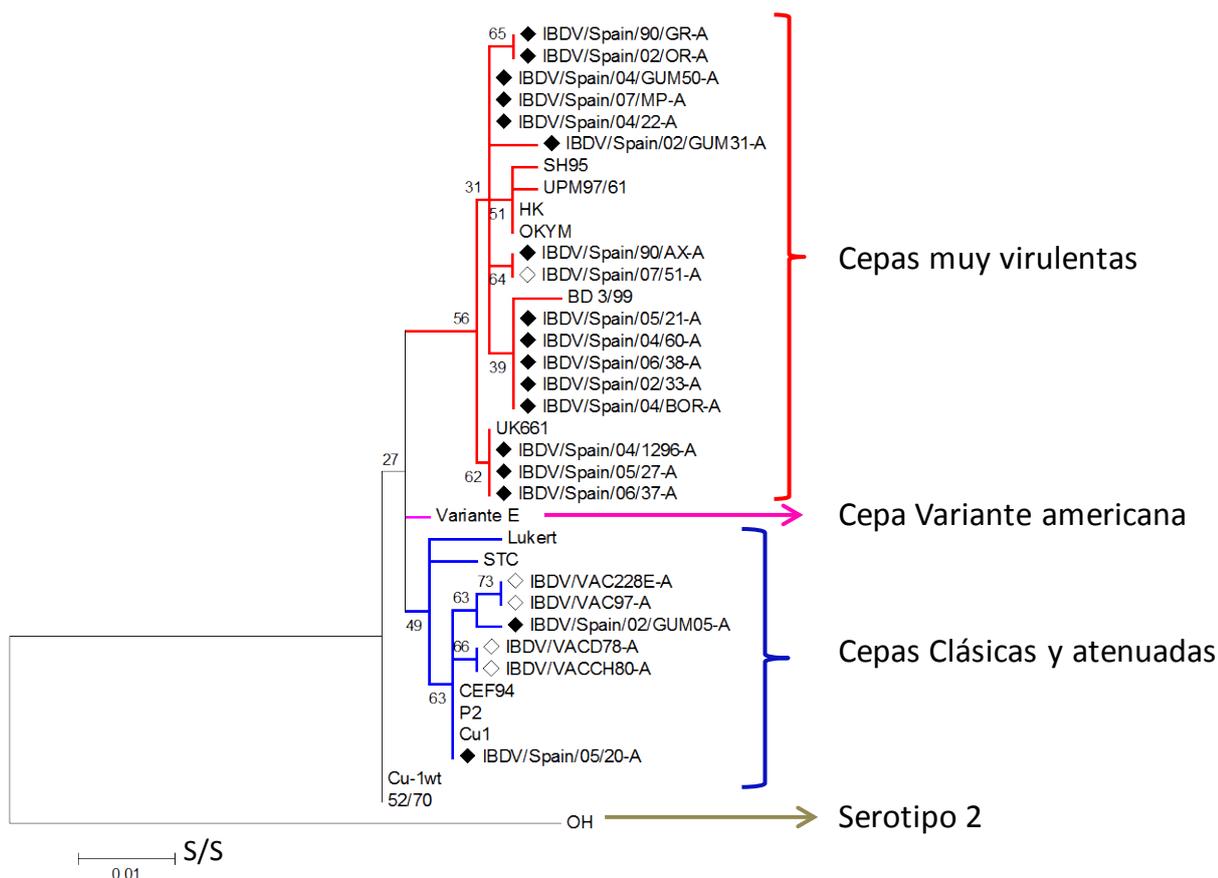


Figura 3. Árbol filogenético de la proteína VP5 basado en nucleótidos. Filogenia elaborada con el método Maximum Likelihood basado en el modelo Tamura-Nei. El análisis se llevó a cabo con el programa MEGA 6.0. Los aislados de campo secuenciados son marcados con el símbolo \blacklozenge , y los virus vacunales se denotan con el símbolo \diamond . Los linajes son diferenciados por el color de la línea, rojo para las virulentas, azul para atenuadas y rosa para la cepa de referencia Variante E.

A pesar de que esta proteína es muy conservada entre los aislados, como se muestra en la tabla 6, se observan mutaciones puntuales frente a los aislados de referencia tanto en el linaje IBDV/vv como en el linaje atenuado (Tabla 5).

Residuo	Cepa consenso IBDV/vv UK661	Cepas muy virulentas	Cepas clásicas atenuadas
45	R	R	G
74	L	F-L	I
105	G	G	G-V
112	A	A-T-V	A
125	P	P	S
133	W	W	R
134	H	H-N	H
135	H	H-D	H

Tabla 5. Listado de residuos mutados en el gen que codifica para la proteína VP5 de los aislados del estudio. Posición de aminoácidos basada en la cepa UK661. Los recuadros sombreados en gris indican los residuos exclusivos del linaje IBDV/vv.

		1	2	3	4	5
1	Cepas muy virulentas					
2	Cepas clásicas	0.034				
3	Cepas atenuadas	0.039	0.019			
4	Serotipo 2	0.233	0.22	0.231		
5	Variante E	0.035	0.015	0.019	0.224	

Tabla 6. Estimación de la divergencia evolutiva. Valores obtenidos del análisis de divergencia entre linajes basado en 138 residuos aminoacídicos.

VP2

La proteína VP2 fue ubicada entre las posiciones aminoacídicas 1 y 512 de la poliproteína. Existe alta similitud de esta proteína entre subtipos (Tabla 8), y la distancia media entre aislados del linaje IBDV/vv en base nucleotídica fue de 0.011 y 0.021 para el linaje atenuado. En el árbol filogenético las secuencias se ven asociadas por subtipo, reuniéndose los aislados IBDV/vv en un clado soportado por un bootstrap de 100%, y los aislados atenuados entre los que se encuentran virus vacunales asociadas en otro clado (Figura 4).

El alineamiento consenso muestra que los aislados clasificados como IBDV/vv poseen los residuos característicos de IBDV/vv 222A, 256I, 294I, 299S, 330S y los residuos que están involucrados en atenuación y adaptación a cultivo celular en los aislados clasificados como atenuadas 279N, 284T, 253H, no fueron conservados (Tabla 7). Solo el residuo 279N se mantiene, así como en las cepas Cu1, P2 y CEF94.

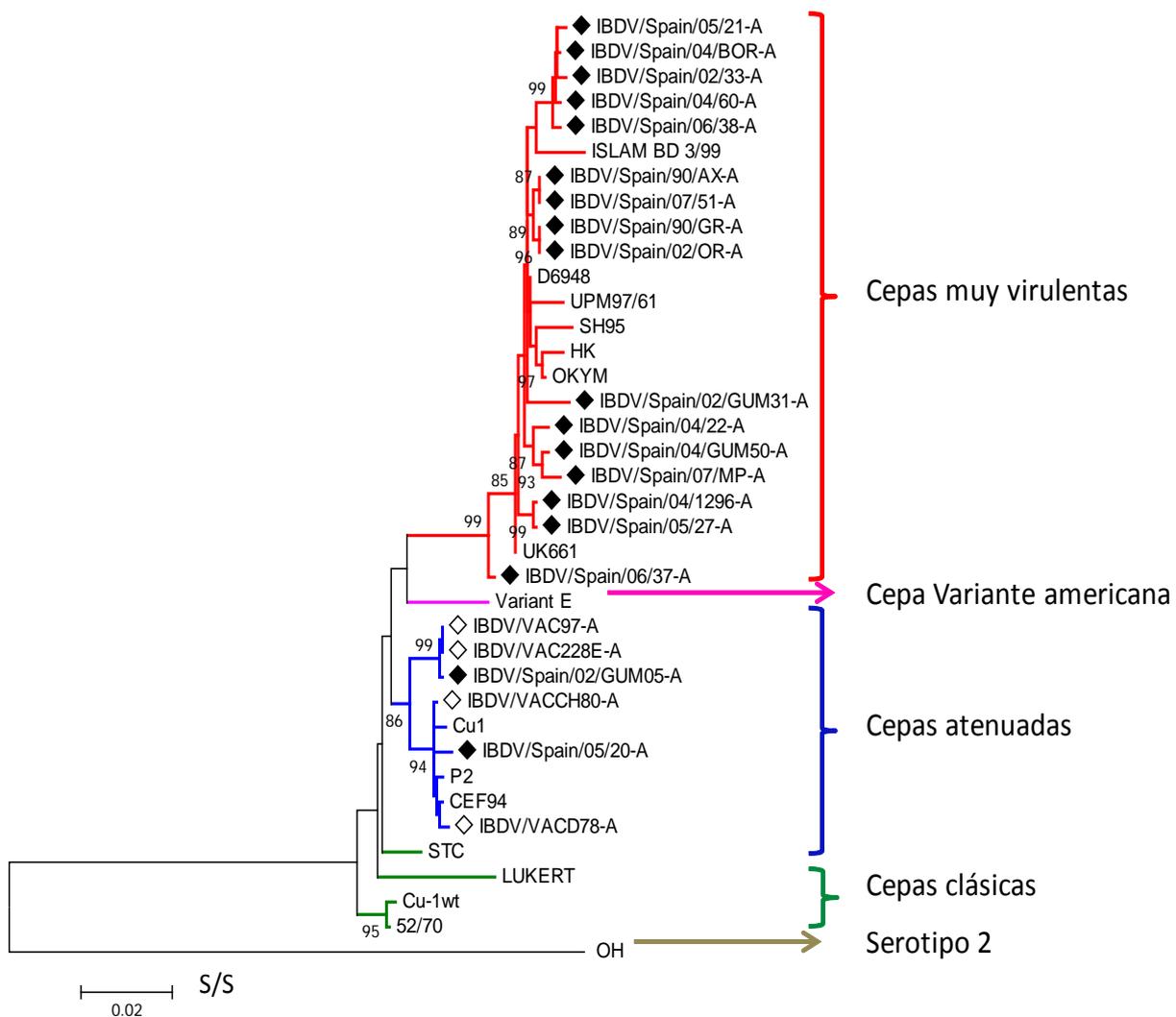


Figura 4. Árbol filogenético de la proteína VP2 basado en nucleótidos. Filogenia elaborada con el método Maximum Likelihood basado en el modelo Tamura-Nei. El análisis se llevó a cabo con el programa MEGA 6.0. Los aislados de campo secuenciados son marcadas con el símbolo \blacklozenge , y los virus vacunales se denotan con el símbolo \diamond . Los linajes son diferenciados por colores según los clados.

El residuo 253Q se observa en aislados IBDV/vv, Variante E y la cepa clásica 52/70 y en la cepa IBD/Spain/02/GUM05 el residuo aminoacídico 253N. El residuo 284T se observa solo en la cepa atenuada 05/20 mientras que el residuo 284A se identifica en la cepa IBD/Spain/02/GUM05, así como en la mayoría de los aislados IBDV/vv. En ninguno de los aislados estudiados se observaron residuos asociados a virus variantes americanas. Finalmente, el residuo 451L es conservado entre el linaje IBDV/vv y varía entre los aislados atenuados de nuestro estudio como se muestra en la tabla 7. Otros residuos que se observan mutado

son 264V que se observan en los aislados de referencia IBDV/vv UK661 (264I) y SH95 (264K) y 359A observada también en la cepa OH (Tabla 7).

Residuo	Cepa consenso IBDV/vv UK661	Cepas muy virulentas	Cepas atenuadas
67	I	I	T-I
94	S	A	S
222	A	A	S-P
242	I	I	V
253	Q	Q	Q-N
256	I	I	I-V
264	I	I-V	I
270	A	A-T	T
279	D	D-N	N
284	A	A	A-T
294	I	I	L
299	S	S-N	N
330	S	S	S-R
323	D	D-E	D
329	A	A	A-V
359	T	T-A	T
451	L	L	L-I

Tabla 7. Listado de mutaciones observadas en proteína VP2 de los aislados del estudio. Posición de aminoácidos con referencia al alineamiento basado en la cepa UK661. Los recuadros sombreados en gris indican los residuos exclusivos del linaje IBDV/vv.

		1	2	3	4	5
1	Cepas muy virulentas					
2	Cepas clásicas	0,021				
3	Cepas atenuadas	0,021	0,023			
4	Serotipo 2	0,031	0,029	0,033		
5	Variante E	0,531	0,527	0,535	0,533	

Tabla 8. Estimación de la divergencia evolutiva de VP2. Valores obtenidos del análisis de divergencia entre linajes basado en 512 residuos aminoácidos.

VP4

Un total de 243 aminoácidos deducidos a partir de 735 nucleótidos componen la proteína VP4, desde la posición 512 hasta la posición 755 en la secuencia aminoacídica. La filogenia en este caso nos muestra que los aislados IBDV/vv se asocian en un solo clúster soportado por un bootstrap de 99% separando así este linaje del resto de aislados.

La divergencia genética denota una distancia media de 0.02 para los aislados IBDV/vv y 0.021 para los aislados clásicos atenuados en su base de nucleótidos. Es altamente conservada entre los linajes como se muestra en la tabla 10.

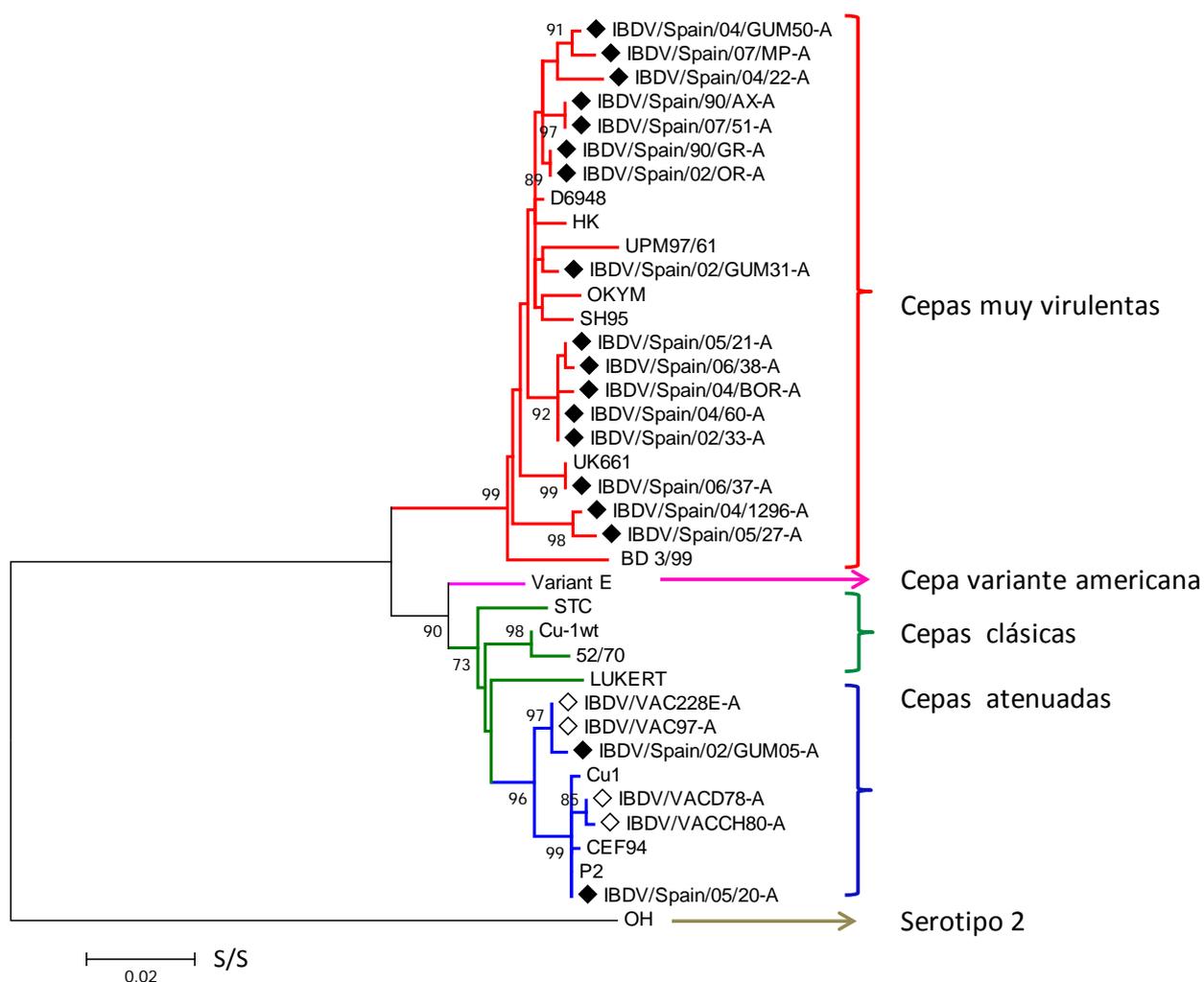


Figura 5. Arbol filogenético de la proteína VP4 basado en nucleótidos. Filogenia elaborada con el método Maximum Likelihood basado en el modelo Tamura-Nei. El análisis se llevó a cabo con el programa MEGA 6.0. Los aislados de campo secuenciados son marcados con el símbolo \blacklozenge , y los virus vacunales se denotan con el símbolo \diamond . Los linajes son diferenciados por el color de la línea, rojo para las virulentas, azul para atenuadas, verde para las clásicas y rosa para la cepa de referencia Variante E.

El análisis de las secuencias revela 5 aminoácidos únicos en los aislados IBDV/vv del estudio (Tabla 9). El residuo 528K fue el único encontrado en 5 aislados del linaje IBDV/vv de nuestro estudio (IBDV/Spain/05/21, IBDV/Spain/04/60, IBDV/Spain/06/38, IBDV/Spain/02/GUM33, IBDV/Spain/04/BOR).

Residuo	Cepa consenso IBDV/vv UK661	Cepas muy virulentas	Cepas atenuadas
528	Q	Q-K	Q
541	I	I	V
680	Y	Y	C
685	N	N	K
715	S	S	P
751	D	D	H

Tabla 9. Lista de residuos mutados en la proteína VP4. Posición de aminoácidos con referencia al alineamiento basado en la cepa UK661. Los residuos sombreados en gris se observan exclusivamente en el linaje IBD/vv.

	1	2	3	4	5
1 Cepas muy virulentas					
2 Cepas clásicas	0,021				
3 Cepas atenuadas	0,023	0,004			
4 Serotipo 2	0,090	0,083	0,085		
5 Variante E	0,025	0,014	0,013	0,086	

Tabla 10. Estimación de la divergencia evolutiva de VP4. Valores obtenidos del análisis de divergencia entre linajes basado en 242 residuos aminoácídicos.

VP3

La región que codifica VP3 engloba un total de 863 nucleótidos que se traducen en 257 aminoácidos. La distancia media fue de 0,019 en base nucleotídica para los aislados IBDV/vv y 0,015 para los aislados atenuados. Esta proteína se mantiene muy conservada entre los subtipos como se muestra en la tabla 12. En el alineamiento se observan 5 sustituciones, una de ellas 981P exclusiva para el linaje IBDV/vv.

Las sustituciones 922Q está presente en la cepa atenuada IBDV/Spain/02/GUM05 y IBDV/Spain/06/38 del linaje IBDV/vv, así como también en los virus vacunales GM97 y Lukert. El residuo 1004M (IBDV/Spain/05/21, IBDV/Spain/04/60, IBDV/Spain/02/33, IBDV/Spain/04/BOR), y finalmente la sustitución 1005V (IBDV/Spain/07/MP).



Figura 6. Árbol filogenético de la proteína VP3 basado en nucleótidos. Filogenia elaborada con el método Maximum Likelihood basado en el modelo Tamura-Nei. El análisis se llevó a cabo con el programa MEGA 6.0. Los aislados de campo secuenciados son marcados con el símbolo ◆, y los virus vacunales se denotan con el símbolo ◇. Los linajes son diferenciados por colores según los clados.

Residuo	Cepa consenso IBDV/vv UK661	Cepas muy virulentas	Cepas atenuadas
922	L	L-Q	L-Q
981	P	P	P-L
1004	R	R-M	R
1005	A	A-V	A

Tabla 11. Lista de residuos mutados en la proteína VP3. Posición de aminoácidos con referencia al alineamiento basado en la cepa UK661. Los recuadros en gris indican las mutaciones exclusivas del linaje IBDV/vv.

		1	2	3	4	5
1	Cepas muy virulentas					
2	Cepas clásicas	0,114				
3	Cepas atenuadas	0,112	0,017			
4	Serotipo 2	0,117	0,019	0,025		
5	Variante E	0,11	0,047	0,046	0,052	

Tabla 12. Estimación de la divergencia evolutiva de VP3. Valores obtenidos del análisis e divergencia entre linajes basado en 257 residuos aminoacídicos.

Análisis del segmento B

El segmento B en los aislados del estudio comprende 2827 bases nucleotídicas, que codificaron para la proteína VP1 con 881 aminoácidos.

Las secuencias IBDV/vv y atenuadas del estudio muestran estar altamente relacionadas entre ellas mostrando una distancia de 0,018 y 0,07 respectivamente.

	1	2	3	4	5
1 Cepas muy virulentas					
2 Cepas clásicas	0,037				
3 Cepas atenuadas	0,043	0,021			
4 Serotipo 2	0,166	0,154	0,159		
5 Variante E	0,051	0,032	0,0035	0,172	

Tabla 14. Estimación de la divergencia evolutiva de VP1. Valores obtenidos del análisis de divergencia entre linajes basado en 881 residuos aminoácidos.

El análisis de divergencia y la comparación de aminoácidos deducidos demuestra la existencia de variabilidad de los aislados (Tabla 14), aunque existen residuos que diferencian el linaje IBDV/vv del atenuado: 61I, 145T, 147N, 242E, 287A, 390M (excepto en IBDV/02/Spain/GUM31) 393D, (excepto en IBDV/Spain/02/GUM31 y la cepa OKYM), 562P (excepto en la cepa IBDV/Spain/02/GUM31), 687P, 695R (Tabla 15).

Algunos residuos además de estar presentes en el linaje IBDV/vv también se observan en otros aislados utilizados en la comparación: OH (4V, 508K, 511S, 546P, 646S); aislados clásicos (13K, 546P) y en la cepa variante E (546P).

Residuo	Cepa consenso IBDV/vv UK661	Cepas muy virulentas	Cepas clásicas atenuadas
4	V	V	I
13	K	K	T
61	I	I	V
145	T	T	N
146	D	D	D-E
147	N	N	G
242	E	E	D
287	A	A	T
390	M	M	L
393	D	D	E
508	K	K-R	R
511	S	S-R	R
546	P	P	L
562	P	P	S
646	S	S	G
687	P	P	S
695	R	R	K

Tabla 15. Residuos observados en las secuencias de los aislados analizados. En los recuadros de color gris se denotan los residuos que son observados únicamente en el linaje IBDV/vv.

Se construyó un árbol filogenético a partir de la región incluida como marcador B (Alfonso-Morales *et al.*, 2015), para el que se ha descrito que constituye una adecuada región con información filogenética. Este árbol define de forma clara el linaje IBDV/vv en un clado muy diferenciado del resto de los aislados.

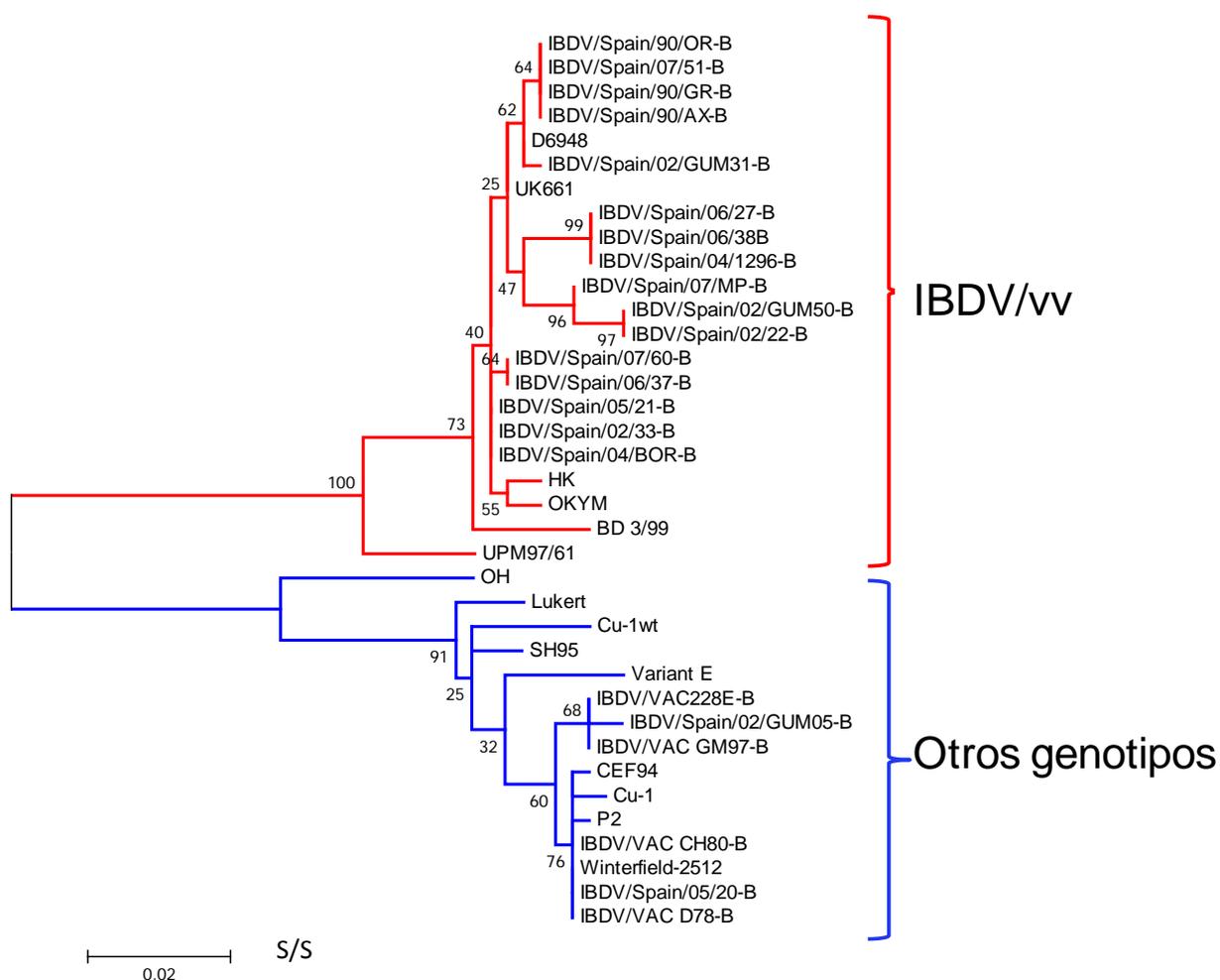


Figura 7. Filogenia del Marcador B. Inferencia obtenida del alineamiento del marcador B identificado en los aislados del estudio mediante el método de Máxima verosimilitud (ML).

Análisis de Recombinación

Las secuencias del segmento B sometidas al análisis de recombinación mediante la aplicación de 7 métodos no mostraron ningún evento recombinante. Por lo contrario, el segmento A mostró una posible recombinación de 636 nucleótidos ubicados en la región final de poliproteína correspondiente a la proteína VP3 de la cepa IBDV/Spain/06/38 (Tabla 14; Gráfico 2). El análisis resultó positivo a 6 de los 9 métodos probados mostrando como padre potencial mayor a la cepa IBDV/Spain/06/37 y como a un posible padre menor a la cepa vacunal GM97.

Métodos	Número de secuencias detectadas	P-Val	Ubicación de posible recombinación
RDP	1	1,199x10 ⁻⁰⁹	629pb 2429-3067
GENECONV	1	6,395x10 ⁻⁰⁹	629pb 2429-3067
BootScan	-		
MaxChi	1	1,125x10 ⁻⁰³	629pb 2429-3067
Chimaera	1	7,942x10 ⁻⁰⁶	629pb 2429-3067
Siscan	1	1,963x10 ⁻⁰⁸	629pb 2429-3067
PhylPro	-		
LARD	-		
3Seq	1	2,621x10 ⁻⁰⁹	629pb 2429-3067

Tabla 14. Identificación del evento recombinante. Métodos con los que se detectó el evento de recombinación en el aislado IBDV/Spain/06/38.

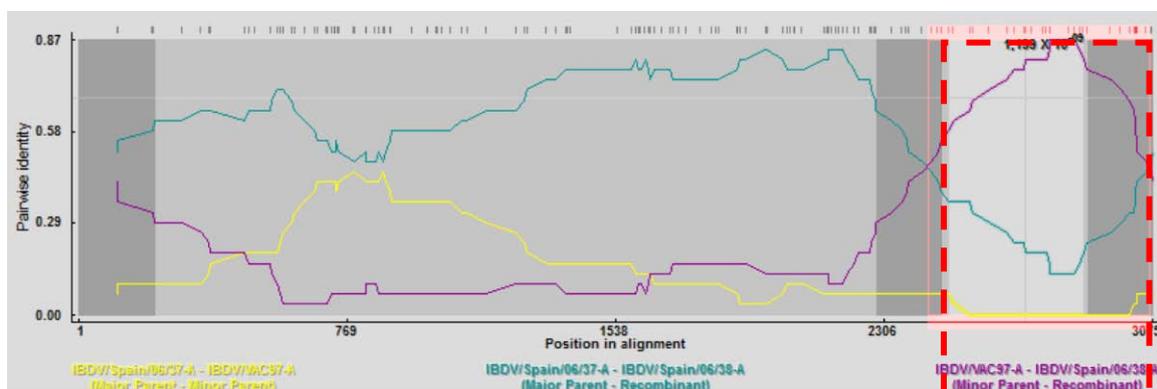


Gráfico 2. Cromatograma del evento recombinante con el método RDP. En el recuadro de líneas entrecortadas se muestra el evento recombinante entre el aislado IBDV/Spain/06/37 como ancestro mayor y al virus vacunal GM97 como ancestro menor.

Discusión

Aunque está muy aceptado que las bases del tropismo y virulencia de IBDV se encuentran asociadas a secuencias del segmento A, específicamente en la proteína VP2 (Brandt *et al.*, 2001; van Loon *et al.*, 2002), algunos estudios han revelado que VP2 no es la única proteína que posee los factores de virulencia que contribuyen a la patogenicidad (Boot *et al.*, 2000). Más recientemente se ha descrito casos de virus “*reassortants*” naturales con el segmento B proveniente de aislados muy virulentos, variantes o vacunales con distinta patogenicidad in vivo (He *et al.*, 2016). Todos estos hallazgos han llevado a la presunción de que ambos segmentos están involucrados en la virulencia. En este contexto el estudio

completo de los genomas de IBDV incluyendo aislados de diferente virulencia es valioso para identificar posibles factores de virulencia.

En este trabajo caracterizamos los segmentos A y B de 16 aislados IBDV/vv y 2 aislados atenuados, procedentes de diferentes regiones y detectadas en distintos años. El análisis global indica que los segmentos A y B están muy conservados, por consiguiente, existe una alta similitud de los segmentos entre los aislados, tanto para el linaje IBDV/vv como para el IBDV/at, agrupándose de forma similar en la filogenia inferida en base a nucleótidos. Los bajos valores de divergencia del segmento A entre el linaje IBDV/vv demuestra que los aislados no se ven influenciados por el año o la zona donde fueron detectados y que son más bien homogéneos a pesar de que este segmento es más susceptible a presión de selección y adaptación por que contiene la proteína VP2.

La comparación de los árboles filogenéticos obtenidos a partir de las secuencias de los segmentos A y B no ha permitido identificar posibles casos de reordenamientos genómicos entre los distintos virus analizados. Este hecho parece indicar, contrariamente a lo que ocurre en otras regiones como Asia donde cada vez parece más frecuente la detección de casos de reordenamientos de los dos segmentos entre distintos virus (He *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2015), un comportamiento evolutivo diferente.

Frente a la clasificación previa mediante la amplificación por RT-PCR, secuenciación y análisis filogenético de RHV de VP2, las secuencias de los 18 aislados de campo procesadas concordaron pertenecer 2 de ellas al linaje atenuado y 16 al linaje muy virulento, exceptuando uno de los aislados que parece estar relacionado con IBDV/vv (IBDV/Spain/06/38) sin embargo al ser traducida a aminoácidos adoptó otra ubicación en el árbol filogenético.

La filogenia individual de las proteínas nos llevó a realizar una lectura detallada de los alineamientos.

El análisis de divergencia de las proteínas nos muestra que VP3, VP4 y VP5 son más parecidas entre los aislados del serotipo 1, sin embargo, VP3 muestra un poco más diferencia entre los linajes. Lo contrario ocurre con VP2 que refleja ser divergente consistentemente únicamente con la cepa apatógena OH del serotipo 2. De alguna manera esto nos indica que VP2 sigue siendo la región con más probabilidad de portar mutaciones que determinen virulencia sin contar que estas puedan interaccionar con otros residuos de otras proteínas.

Al analizar el alineamiento comparativo en VP5 observamos 8 cambios, 3 de ellos 45R, 74L o F y 133W conservados entre el linaje IBDV/vv y según se describe quizás son responsables de aumento en la virulencia de IBDV/vv por un aumento de la actividad de la proteína (Xia *et al.*, 2008).

En la posición 74 los aislados virulentos comparten los residuos L o F, aunque también es observada en la cepa OH del serotipo 2. La sustitución 74F fue designada como un indicador de virulencia al observar que este residuo sufrió una mutación tras un proceso de atenuación en células CEF 74F (Wang *et al.*, 2007), resultado que corroboraría el presente estudio. El residuo 74L se observa en la cepa UK661 y se observa también en algunas de nuestros aislados IBDV/vv. Se sabe que VP5 está asociada a funciones de propagación viral, dentro de la cual se ve involucrado el extremo C-terminal de la proteína. Este región C-terminal contiene el dominio policatiónico (cargado positivamente) que le permite interaccionar con la membrana plasmática [132-133 (KR), 136,137,138 (KRR), 142-143 (RK)] y cambios en estas posiciones podrían afectar la unión con la membrana plasmática (Mendez *et al.*, 2015). En el linaje IBDV/vv observamos que este residuo muta a 133W disminuyendo la carga positiva de esta región y probablemente disminuyendo la capacidad de unión a los aniones lipídicos de la superficie de la membrana plasmática (Mendez *et al.*, 2015). Adicionalmente en algunas de esos aislados se observa la mutación 134N (también observada en la cepa IBDV/vv BD3/99) y 135D ubicadas entre dos los factores (KR y KRR) que en

teoría no afectaría la carga electropositiva de la región C-terminal, pero no se conoce exactamente como estos cambios podrían afectar la función de la proteína viral.

Al analizar la proteína VP2, no hallamos mayor diferencia que la encontrada analizando el fragmento de 160 aminoácidos en el que inicialmente nos basamos para la elección de los aislados a estudiar, pues el análisis de 512 residuos aminoacídicos muestran distancias similares en la filogenia. No obstante, esta proteína permite una mejor segregación en el árbol filogenético frente a las otras proteínas analizadas y, por lo tanto, nuestros resultados corroboran que el análisis de la secuencia de la RHV de la VP2 sigue siendo un buen método para el diagnóstico y clasificación de los aislados circulantes.

Los aminoácidos implicados en virulencia 253Q, 279D y 284A se observan en los aislados del linaje IBDV/vv. En los aislados IBDV/Spain/05/20 y IBDV/Spain/02/GUM05 clasificados como atenuados encontramos 253Q-N y 284A respectivamente. Estas sustituciones también son observadas en el linaje IBDV/vv, la cepa clásica 52/70 y también se han reportado en la cepa 002/73 (no incluida en el estudio) la cual no causa mortalidad, (Rudd *et al.*, 2002). Esto ha sido comentado por otros autores como la evidencia de que la virulencia no está determinada únicamente por los denominados "marcadores" y que existen otros residuos que podrían colaborar en la determinación de virulencia.

El heptapéptido rico en serina (SWSASGS) se observó conservado en el linaje IBD/vv y en uno de los dos aislados atenuados del estudio se muestra mutado S→R como se describe en la mayoría de virus atenuados y no patógenos (Cao *et al.*, 1998; Heine *et al.*, 1991). Sin embargo, en la cepa IBDV/Spain/02/GUM05 que mantiene 330S como en las cepas clásicas Lukert, Cu-1wt, 52/70 y en la cepa vacunal 228E. Por otro lado, el residuo 299S ha sido descrito como un indicador de virulencia, sin embargo, en el 50% de los aislados IBDV/vv del estudio aparece N como sustitución residuo que se observa ampliamente en cepas clásicas, cepas

vacunales y la cepa Variante E y que en nuestro primer estudio lo describimos como un cambio adaptativo propio de diversificación local. El residuo 451L que es un residuo propuesto como indicador de virulencia se mantiene constante entre el linaje IBDV/vv el cual difiere del resto de los aislados incluidos en el estudio (451I). Solo uno de los aislados del linaje atenuado IBD/Spain/05/20 muestra este último residuo. No se han efectuado estudios de mutagénesis directa sobre este residuo para confirmar su implicación en virulencia.

El alineamiento múltiple de la proteína VP4 exhibió 2 sustituciones ubicadas en los motivos serino-proteasa III (644-661) y IV (697-705) (Birghan *et al.*, 2000), 651S y 701F respectivamente. La primera similar a la observada en la cepa europea UK661 por lo que quizás este residuo no afecte la actividad de la enzima y la segunda es un residuo único observado en la cepa IBD/Spain/02/GUM05, que no ha sido descrito antes. Por otro lado se observó en los aislados del linaje IBDV/vv residuos propuestos por algunos autores como marcadores de virulencia 680Y y 685N (Kong *et al.*, 2004).

Adicionalmente encontramos 2 residuos mutados en todos los aislados del linaje IBD/vv: 715S y 751D, el primero ubicado justo después del IV motivo proteasa y el segundo ubicado muy cerca de la región de unión de VP4 y VP3. Aunque ambas podrían influenciar la actividad proteasa, se ha comprobado que el residuo 751D altera la forma tridimensional de la proteína y modifica el sitio de unión VP4-VP3 (Rudd *et al.*, 2002), lo cual apoya la teoría de que el fenotipo muy virulento es multifactorial.

Los pocos cambios observados en VP3 990A, 1004M y 1005A se ubican el primero en sitio de unión de la proteína y los dos últimos en la región C-terminal y la cual se cree cumple un rol en la reducción de la patogenicidad (Boot *et al.*, 2002; Tacken *et al.*, 2003). 990A no es un residuo conservado entre los aislados del linaje IBD/vv (990A-V). Sin embargo, está presente en todas las cepas atenuadas, clásicas, variante E y OH incluyendo las cepas vacunales, excepto en

D78, lo cual indicaría que no influye en virulencia. El residuo 1005A se conserva en todas los aislados IBDV/vv excepto en el aislado IBDV/Spain/07/MP (1005V) y ya fue descrito previamente por Kong y col, 2004 como un posible determinante de virulencia (Kong *et al.*, 2004). En esta proteína observamos un evento recombinante en una cepa clasificada como muy virulenta. Un fragmento de 638 nucleótidos proveniente de una cepa vacunal intermedia es reconocido en la región C-terminal de la misma. Dos residuos aminoacídicos se deduce que son provenientes de la cepa vacunal 922Q y 990A. Trabajos recientes con cepas asiáticas han descrito este tipo de evento dentro del segmento A implicando a VP2, una recombinación a este nivel originó un virus con una clasificación distinta de esta proteína frente al segmento A completo (He *et al.*, 2016). Este es el primer caso de virus recombinantes que encontramos en España, quizás limitado por el hecho de que el diagnóstico y la mayoría de los estudios se basa únicamente en la secuenciación de una región del segmento A considerada la más apropiada para tal fin.

Basado en la construcción de virus *reassortants* se ha demostrado que efectivamente VP1 está implicada en la eficiencia de replicación y transcripción viral (Spies *et al.*, 1987; von Einem *et al.*, 2004), e induce daño bursal y aumento de la virulencia in vivo (Liu and Vakharia, 2004). La filogenia y el análisis de divergencia demuestran que VP1 se mantiene altamente conservada en los aislados del estudio, aunque con algunas diferencias. De las 17 mutaciones de IBDV/vv frente a aislados atenuados sólo 10 fueron exclusivas del linaje IBD/vv.

La topología obtenida a partir de la secuencia de VP1 muestra que las secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducidos se reúnen en un clado junto a otros virus IBDV/vv ya descritos, lejos de los aislados atenuados, cepas clásicas, cepa variante E y cepa OH del serotipo 2. Esta distancia está definida principalmente por los residuos, ubicadas en la región N-terminal (61I, 145T, 147N) reconocido como sitio de autoguanililación; 5 ubicadas en la región central (242E, 287A,

390M, 393D, 562P) fuera de los motivos esenciales para la actividad de la enzima y 2 ubicadas en la región C-terminal (687P, 695R) (Garriga *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2007) posiblemente tengan que ver con el incremento de la misma y, en consecuencia, con la virulencia.

Adicionalmente, realizamos una reconstrucción filogenética basada en un fragmento de 430 nucleótidos previamente publicado que podría ser empleado en el diagnóstico de aislados IBDV/vv (Alfonso-Morales *et al.*, 2015). Este fragmento denominado "marcador B" ubicado en posición 110-252, entre la región N-terminal y el dominio central de la polimerasa, se observó conservado entre los aislados IBDV/vv con algunas mutaciones que no influyeron en la reconstrucción filogenética diferenciando claramente los linajes muy virulento y atenuado, tal y como lo describe Alfonso-Morales y col (2015). Dicho segmento contiene los residuos 145T, 147N, 242E que previamente indicamos son observados únicamente en los aislados IBDV/vv de nuestro estudio.

Una observación en el análisis del segmento B es que una cepa, a pesar de localizarse dentro del clado IBDV/vv se encuentra desagregada del total del grupo, mostrando una distancia genética menor respecto a los aislados atenuados. Esa localización puede sugerir un evento de recombinación entre aislados IBDV/vv y aislados atenuados, aunque el análisis de RDP no lo detecta, quizá porque no estén incluidas en la filogenia los aislados parentales. Esta suposición nos muestra la necesidad de aumentar el número de secuencias completas ya que ya que se puede enmascarar eventos de recombinación.

Capítulo III

Discusión General

La Bursitis infecciosa hoy en día sigue siendo una enfermedad de suma importancia en la industria avícola, pese a los grandes avances conseguidos para el control de la enfermedad. Sin embargo, en estos últimos años se han venido detectando variaciones en los virus que quizás contribuyan a evadir la respuesta inmune (Jackwood, 2012).

Con este antecedente, en el presente trabajo valoramos el comportamiento epidemiológico basado en el análisis filogenético de IBDV de los virus detectados en España en los últimos 15 años. Inicialmente, con el propósito de tener un conocimiento más exacto de la diversidad de los virus de IBDV circulantes en nuestro país, realizamos la caracterización de 967 aislados de IBDV procedentes de diferentes regiones de España y con el objetivo de caracterizar mejor algunos de estos virus y de encontrar o corroborar los indicadores de virulencia ya existentes realizamos la secuenciación completa del genoma de 18 aislados IBDV. Por otro lado, no se tenía conocimiento del origen de los linajes descritos en España, por lo cual se planteó un estudio dirigido a valorar la emergencia y dispersión de estos linajes en nuestro país.

Los resultados, basados en la comparación de la secuencia parcial del gen de la VP2, indican que los virus muy virulentos responsables de los brotes agudos de los años 90 y 2002 con su máximo exponente en 2007, permanecen circulando 15 años después de la primera detección, aunque la detección de estos se ha reducido en un 99% en el total de las muestras analizadas. Por el contrario, en el devenir de los años la detección de los virus clásicos atenuados con altas similitudes a los virus vacunales se han venido incrementando hasta el punto que supone más del 80% de los virus diagnosticados por PCR y secuenciación, por lo que es muy probable que ésta sea la causa de la disminución de los casos agudos.

Filogenéticamente, cuando se tiene una elevada cantidad de secuencias representativas de distintas localizaciones y colectadas en tiempos distintos para

el análisis comparativo, más probabilidad de tener una filogenia más exacta. Los resultados de filogenia además de mostrarnos la clasificación genética que normalmente se describe en España, nos mostró dos nuevas agrupaciones.

Si bien los virus muy virulentos diagnosticados en España siempre han presentado esa huella genética característica de este linaje se han encontrado variaciones en su secuencia que provocan la diversidad del linaje y la aparición de aislados IBDV/vv atípicos, con mutaciones que afectan directamente el patrón de aminoácidos involucrados con la antigenicidad como son residuos 249Q y 254G→S observados en la cepa Delaware E, (Jackwood *et al.*, 2006) y 321A→V observado en los aislados con variación antigénica comprobada (Eterradossi *et al.*, 1998; Vakharia *et al.*, 1994). Aunque estos virus conforman un porcentaje bajo del total de virus analizados, nos deja ver una posible forma de escape a los anticuerpos neutralizantes. Por otro lado, algunos de los aislados clasificados como clásicos atenuados detectados en muestras de campo que exponen sus residuos típicos 253H, 279N, 284T y 330R/K (Cao *et al.*, 1998; van Loon *et al.*, 2002), al parecer son descendientes de diversos virus vacunales. Lo que llamó nuestra atención es que algunos de estos aislados muestran algunos residuos implicados en virulencia: 253Q y 284A (Rudd *et al.*, 2002), que nos lleva a entender que posiblemente se traten de virus que han revertido a la virulencia. Estas variaciones múltiples no solo afectan a los linajes ya definidos, sino que dan origen a grupos filogenéticos nuevos como el linaje IBD/Sp-var. Este linaje es muy particular pues en él encontramos residuos que determinan atenuación, otros que determinan virulencia y además tiene algunas características propias como los residuos 222S (observada en aislados de atenuación intermedia y en un aislado que es considerado una variante europea), 254N y 328K. Tan solo considerando el residuo 222S podría verse afectado el perfil antigénico de los aislados (Jackwood and Sommer-Wagner, 2011). Todo ello de alguna forma se ve reflejado en el estudio de patogénesis llevado a cabo con una cepa de este nuevo

linaje donde se observó un comportamiento distinto al causado por IBDV/vv y similar al de las cepas variantes americanas (Dolz *et al.*, 2011). Varios de estos virus datan del año 2002, lo cual nos dice que son virus que siempre han estado presentes, aunque quizás como no presentan una sintomatología clínica clara, no se sospecha de que estén provocando infección y por ende no se detectan frecuentemente en el laboratorio.

Otro nuevo grupo en la filogenia del estudio fue el de los aislados españoles incluidos con cepas clásicas atenuadas australianas, asociadas básicamente al virus V877, un virus clásico australiano utilizado en vacunas comerciales cuyo uso está dirigido para el control de IBDV muy virulento y probablemente se haya implementado como parte del programa vacunal de broilers en el país.

La reconstrucción filogeográfica nos ayudó a entender el origen de los linajes que circulan en el país y cómo se han distribuido en el tiempo. La inferencia bayesiana nos mostró un resultado similar al que obtuvimos analizando únicamente la RHV en cuanto a distribución de aislados en genotipos. Los aislados de origen español, tanto los obtenidos de GenBank como los obtenidos de estudios propios, se clasifican en tres linajes: linaje atenuado, linaje muy virulento y un nuevo linaje Sp-var. El análisis tMRCA nos confirma por un lado que la aparición de del linaje IBDV/vv se corresponde con la emergencia mundial en los años 80 (Alfonso-Morales *et al.*, 2013) y que éstas se dispersaron en los años 90 en España, de una forma independiente. El análisis filogeográfico nos indica que, contradictoriamente hasta lo que hoy se suponía, estos aislados no provienen de los Países Bajos sino que tienen su origen en Irán, al igual que lo sucedido en otras países europeos (Alfonso-Morales *et al.*, 2013), sospechando así de las aves migratorias que circulan en la ruta aérea del Mar negro y el Mar mediterráneo como posible vía de expansión desde Irán. Aunque se sabe que las aves salvajes pueden portar el virus (Jeon *et al.*, 2008), lamentablemente esto no es comprobable en nuestra región debido a los pocos estudio realizados en esta

dirección. Dentro de España posiblemente la difusión de estos aislados se haya realizado también a través de aves salvajes y de las rutas comerciales de aves.

En el tiempo, la dispersión del linaje IBDV/vv se ve controlada con la aplicación de vacunas comerciales de virulencia intermedia la cual favoreció la divergencia genética del linaje IBD/CI-at, pero a su vez provocó la aparición del nuevo linaje IBD/Sp-var. El origen de este linaje estuvo definido por la adaptación y divergencia de las mismas como posible vía de escape del virus, definiendo así que los residuos involucrados en esta adaptación se encuentran en las posiciones 251, ubicado en el P_{DE}, y 273, la hoja B_F, que están asociados a la respuesta inmune y virulencia del virus, respectivamente (Coulibaly *et al.*, 2005).

Toda esta información basada en VP2, nos indicó que posiblemente otras regiones del virus también se vean afectadas por estos cambios de adaptación que se generan para la subsistencia del virus. Aunque ha sido muy referenciado que VP2 está implicada en estas variaciones de antigenicidad y virulencia, muchos estudios han determinado que esta última también involucra a otras proteínas (Boot *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2004; Nouen *et al.*, 2012). La caracterización completa del genoma y su comparación con cepas referentes nos ha proporcionado información para corroborar que existen sustituciones en otras proteínas de IBDV/vv y que se pueden entender como indicadores de virulencia, aunque es necesario su comprobación a través de otras técnicas como la mutagénesis directa.

La obtención de las secuencias completas de 16 aislados del linaje IBD/vv y 2 aislados atenuados provenientes de muestras de campo con diferentes orígenes nos permitió realizar una caracterización genómica exhaustiva y ampliar los estudios filogenéticos. Los virus analizados mostraron poca divergencia en los segmentos A y B de ambos subtipos frente a sus congéneres. La filogenia obtenida a partir de la poliproteína mostró una mejor disgregación de los linajes,

ya que se observaron claramente diferenciados los linajes clásico, atenuado y muy virulento. La filogenia inferida a partir del segmento B nos reveló dos grupos diferenciándolos en un clado los aislados IBDV/vv y otro conteniendo al resto de los virus en donde se incluye la cepa variante E, cepas atenuadas y de virulencia intermedia. además de las la cepa apatógena OH la cual no se puede considerar como *outgroup* en el segmento B porque está muy relacionada con el resto de los virus.

El análisis individual de las proteínas del segmento A, nos arroja resultados más concisos. En primer lugar, todas las proteínas (VP5, VP2, VP4, VP3) muestran ser similares a sus congéneres con poca divergencia entre ellas, excepto en una cepa IBDV/Spain/06/38 que, aunque pertenece al linaje IBD/vv, se observa claramente separada del grupo. Hon y col en 2008 reportaron una situación similar, pues la secuencia y filogenia del segmento A completo que analizaban no se correspondía con los resultados del análisis de RHV del mismo virus (Hon *et al.*, 2008). Esto demostró en ese estudio que se trataba de un caso de recombinación homóloga natural de una RHV de un virus vacunal y un restante segmento A de IBDV/vv. En nuestro caso la secuenciación del segmento completo y el análisis individual de las proteínas nos llevó a ver que existían incongruencias del análisis general del segmento A y el análisis particular de la proteína VP3 de este virus en particular. El análisis arrojó consistentemente que esta cepa se trataba de un virus recombinante que tenía como ascendencia mayor un virus IBD/vv y que esos 638 nucleótidos incorporados tenían como ascendencia menor la cepa vacunal GM97. Si bien eventos recombinantes han sido descritos en RHV, esta es la primera vez que se describe recombinación en la proteína VP3, que, si bien no participa en la interacción antígeno anticuerpo, está implicada con la VP1 en replicación viral.

El alineamiento de secuencias ha permitido identificar cambios para los que se ha descrito que pueden estar implicados en virulencia. Se describen 11 sustituciones conservadas entre los aislados del linaje IBD/vv y los aislados del linaje atenuado,

dos de ellas en VP5, 45R y 133W. Éste último quizás sea el más importante debido a que se encuentra en el dominio que le permite interaccionar con la membrana plasmática (Méndez 2015). A diferencia de otros estudios (Kong *et al.*, 2004; Lojkic *et al.*, 2008) en los que se describe al residuo 74F como un residuo conservado, no podemos afirmar esto ya que 2 de nuestros aislados IBDV/vv no lo poseen.

Al analizar el gen de la proteína VP2 completo, no hallamos mayor diferencia que la encontrada analizando el fragmento de 150 aminoácidos de la RHV. Además, de los 4 residuos ya descritos como marcadores de virulencia 222A, 256I, 294I y 330S (Boot *et al.*, 2000; Brandt *et al.*, 2001) se observó otro residuo conservado entre las cepa muy virulentas: 451I. A diferencia de otros estudios en los que se indica que la mutación 299S sería un indicador de virulencia (Cao *et al.*, 1998; Heine *et al.*, 1991), en nuestro caso no es conservada ya que observamos la sustitución 299N en un número elevado de secuencias clasificadas como muy virulentas. Por otro lado, el hallazgo de cambios en los residuos 253Q y 284A que están implicados en virulencia y adaptación celular fueron observados en aislados clasificados como atenuados, lo que soportaría la teoría de que la virulencia no reside únicamente en los llamados marcadores de virulencia de RHV (Jackwood and Sommer-Wagner, 2007). Los residuos en las proteínas VP4 (680Y) y VP3 (715S, 751D) han sido descritos previamente como posibles marcadores del linaje IBD/vv (Kong *et al.*, 2004). Estos residuos ubicados cerca del sitio activo de VP4 y de la zona de unión VP4-VP3 respectivamente podría mejorar la actividad proteolítica de VP4, lo que podría mejorar el procesamiento de las proteína virales (Lejal *et al.*, 2000).

El análisis de VP1 nos deja reflejado que se trata de una proteína altamente conservada entre los distintos linajes y que existe una diferencia entre los virus patógenos y poco patógenos. Ello queda demostrado con la filogenia en donde se ve que solo dos clados reúnen al total de los virus. Por un lado, el clado de las

cepas muy virulentas y por otro el clado que agrupa a los virus clásicos, atenuados, variante E y la cepa del serotipo 2 empleada en el estudio. De nuestro estudio podemos extraer que solo 10 residuos se mantienen conservados en el linaje IBDV/vv 61I, 145T, 147N, 242E, 287A, 390M, 393D, 562P, 687P, 695R. En nuestro caso el residuo 61I se mantiene entre las cepas muy virulentas y difiere de los virus apatógenos 61V, no así el residuo 146D, descrito como parte de un triplete involucrado en virulencia (Gao *et al.*, 2014; Lojkic *et al.*, 2008), que también es observado en una de las cepas atenuadas del estudio.

Todos estos hallazgos nos advierten que el uso de RHV para la clasificación de los aislados nos proporciona información parcial, por lo que se hace necesaria la secuenciación de los segmentos completos para clasificar filogenéticamente las cepas de IBD.

Por otro lado realizamos la búsqueda de posibles virus *reassortants* originados de forma natural (He *et al.*, 2016; He *et al.*, 2014). El análisis conjunto del segmento A y B no detectó este tipo de eventos, sin embargo, no descartamos que pueda ocurrir si aumentamos el número de cepas analizadas en el estudio.

Algunos de los resultados y conclusiones de esta tesis podrían ser más consistentes si se dispusiera de un mayor número de secuencias completas de IBDV en las bases de datos. Por ello una de las aportaciones de este trabajo fue la obtención del genoma completo de 18 virus detectados en España, que aumenta la información de secuencia disponible para IBDV.

Conclusiones

1. El análisis filogenético basado en la secuencia de la proteína estructural VP2, revela que los genotipos de IBDV que han circulado en España en un espacio de tiempo de 15 años, desde 2000 hasta 2015 han sido cuatro: muy virulento, clásico atenuado, clásico atenuado australiano y un nuevo linaje denominado Sp-var.
2. El linaje muy virulento de IBDV que protagonizó su máxima expresión en volumen de casos registrados hacia el año 2009, es aparentemente controlado por el uso de cepas clásicas atenuadas como virus vacunales, disminuyendo el número de casos positivos detectados mediante RT-PCR hasta un 99% e incrementando considerablemente la detección de cepas de tipo vacunal en muestras de campo.
3. El estudio filogeográfico ha permitido identificar el origen de las cepas IBDV/vv españolas en Irán, las cuales se diseminaron probablemente a través de rutas de aves migratorias o bien mediante rutas comerciales terrestres, y no como hasta ahora se asumía, que dicho linaje provenía de los Países Bajos, sino que en ambas localizaciones se desarrollaron como eventos paralelos.
4. El linaje divergente Sp-var se originó a mediados de los 90 por la adaptación de cepas clásicas atenuadas, las cuales tuvieron una distribución en el tiempo y en espacio limitada y estuvo determinada por dos residuos aminoacídicos 253 y 279.
5. Se han obtenido por primera vez secuencias completas de IBDV españolas que aumentan la información disponible para este virus. Su análisis ha permitido detectar un evento de recombinación en la VP3, lo que indica que el estudio de los segmentos A y B es ineludible para la caracterización más estrecha de las cepas ya que incrementa la posibilidad de ver la evolución y observar cambios que se puedan asociar a la virulencia o patogenicidad.

Referencias Bibliográficas

- Adamu, J., Owoade, A. A., Abdu, P. A., Kazeem, H. M. and Fatihu, M. Y. (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, 420-433.
- Ahlquist, P., Schwartz, M., Chen, J., Kushner, D., Hao, L. and Dye, B. T. (2005). Viral and host determinants of RNA virus vector replication and expression. *Vaccine*, 23, 1784-1787.
- Alfonso-Morales, A., Martinez-Perez, O., Dolz, R., Valle, R., Perera, C. L., Bertran, K., Frias, M. T., Majó, N., Ganges, L. and Perez, L. J. (2013). Spatiotemporal Phylogenetic Analysis and Molecular Characterisation of Infectious Bursal Disease Viruses Based on the VP2 Hyper-Variable Region. *PLoS One*, 8, e65999.
- Alfonso-Morales, A., Rios, L., Martinez-Perez, O., Dolz, R., Valle, R., Perera, C. L., Bertran, K., Frias, M. T., Ganges, L., Díaz de Arce, H., Majó, N., Nunez, J. I. and Perez, L. J. (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.
- Allan, W. H., Faragher, J. T. and Cullen, G. A. (1972). Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunised against Newcastle disease. *Vet Rec*, 90, 511-512.
- Animal Health Australia, A. (2009). Response Policy Briefs, A. V. E. Plan, Ed.
- Ashraf, S., Abdel-Alim, G. and Saif, Y. M. (2006). Detection of antibodies against serotypes 1 and 2 infectious bursal disease virus by commercial ELISA kits. *Avian Dis*, 50, 104-109.
- Azad, A. A., Barrett, S. A. and Fahey, K. J. (1985). The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus. *Virology*, 143, 35-44.
- Banda, A. and Villegas, P. (2004). Genetic characterization of very virulent infectious bursal disease viruses from Latin America. *Avian Dis*, 48, 540-549.
- Bayliss, C. D., Spies, U., Shaw, K., Peters, R. W., Papageorgiou, A., Muller, H. and Bournsnel, M. E. (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 (Pt 6), 1303-1312.
- Benton, W. J., Cover, M. S., Rosenberger, J. K. and Lake, R. S. (1967). Physicochemical properties of the infectious bursal agent (IBA). *Avian Dis*, 11, 438-445.
- Birghan, C., Mundt, E. and Gorbalenya, A. E. (2000). A non-canonical Ion proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *Embo J*, 19, 114-123.
- Boot, H. J., ter Huurne, A. H. and Peeters, B. P. (2000). Generation of full-length cDNA of the two genomic dsRNA segments of infectious bursal disease virus. *J Virol Methods*, 84, 49-58.
- Boot, H. J., ter Huurne, A. A., Hoekman, A. J., Peeters, B. P. and Gielkens, A. L. (2000). Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *J Virol*, 74, 6701-6711.
- Boot, H. J., Hoekman, A. J. and Gielkens, A. L. (2005). The enhanced virulence of very virulent infectious bursal disease virus is partly determined by its B-segment. *Arch Virol*, 150, 137-144.
- Boot, H. J., ter Huurne, A. A., Hoekman, A. J., Pol, J. M., Gielkens, A. L. and Peeters, B. P. (2002). Exchange of the C-terminal part of VP3 from very virulent infectious bursal disease virus results in an attenuated virus with a unique antigenic structure. *J Virol*, 76, 10346-10355.
- Bottcher, B., Kiselev, N. A., Stel'Mashchuk, V. Y., Perevozchikova, N. A., Borisov, A. V. and Crowther, R. A. (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, R. A. and Vakharia, V. N. (2001). Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J Virol*, 75, 11974-11982.
- Busnadiago, I., Maestre, A. M., Rodriguez, D. and Rodriguez, J. F. (2012). The infectious bursal disease virus RNA-binding VP3 polypeptide inhibits PKR-mediated apoptosis. *PLoS One*, 7, e46768.
- Cao, Y. C., Yeung, W. S., Law, M., Bi, Y. Z., Leung, F. C. and 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.
- Carballeda, J. M., Maroniche, G., Lucero, M. S., Richetta, M., Gomez, E., Chimeno Zoth, S. and Berinstein, A. (2015). Infectious Bursal Disease Virus non-structural protein VP5 is not a transmembrane protein. *Virology*, 483, 312-317.
- Caston, J. R., Martinez-Torrecuadrada, J. L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodriguez, J. F., Casal, J. I. and Carrascosa, J. L. (2001). C terminus of infectious bursal disease virus major capsid

- protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J Virol*, 75, 10815-10828.
- Cosgrove, A. S. (1962). An apparently new disease of chickens-avian nephrosis. *Avian Dis*, 6, 385-389.
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas, B. and Rey, F. A. (2005). The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell*, 120, 761-772.
- Chai, Y. F., Christensen, N. H., Wilks, C. R. and Meers, J. (2001). Characterisation of New Zealand isolates of infectious bursal disease virus. *Arch Virol*, 146, 1571-1580.
- Chen, F., Liu, J., Yan, Z., Liu, D., Ji, J., Qin, J., Li, H., Ma, J., Bi, Y. and Xie, Q. (2012). Complete genome sequence analysis of a natural reassortant infectious bursal disease virus in China. *J Virol*, 86, 11942-11943.
- Chettle, N., Stuart, J. C. and Wyeth, P. J. (1989). Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Vet Rec*, 125, 271-272.
- Chettle, N. J. and Wyeth, P. J. (1989). Failure of maternally derived infectious bursal disease antibodies to serotypes 1 and 2 to protect against heterologous virus. *Br Vet J*, 145, 165-169.
- Cho, B. R., Snyder, D. B., Lana, D. P. and Marquardt, W. W. (1987). An immunoperoxidase monoclonal antibody stain for rapid diagnosis of infectious bursal disease. *Avian Dis*, 31, 538-545.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, 162, 156-159.
- Cortey, M., Bertran, K., Toskano, J., Majó, N. and Dolz, R. (2012). Phylogeographic distribution of very virulent infectious bursal disease virus isolates in the Iberian Peninsula. *Avian Pathol*, 41, 277-284.
- Darteil, R., Bublot, M., Laplace, E., Bouquet, J. F., Audonnet, J. C. and Riviere, 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.
- Delmas, B., F.S.B. Kibenge, J.C. Leong. E. Mundt, V.N. Vakharia, and J.L. Wu (2004). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses : Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*.
- Delmas, B., F.S.B. Kibenge, J.C. Leong. E. Mundt, V.N. Vakharia, and J.L. Wu (2005). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses : Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Birnaviridae*. London.
- Di Fabio, J., Rossini, L. I., Eterradossi, N., Toquin, M. D. and Gardin, Y. (1999). European-like pathogenic infectious bursal disease viruses in Brazil. *Vet Rec*, 145, 203-204.
- Di Fabio, J. (2001). Diagnóstico Sorológico da Doença de Gumboro. IISimpósio da Doença de Gumboro. Fundação APINCO de Ciencia e Tecnologia Avícolas. Brasil.
- Dobos, P., Hill, B. J., Hallett, R., Kells, D. T., Becht, H. and Teninges, D. (1979). Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol*, 32, 593-605.
- Dolz, R., Majó, N., Ordonez, G. and Porta, R. (2005). Viral genotyping of infectious bursal disease viruses isolated from the 2002 acute outbreak in Spain and comparison with previous isolates. *Avian Dis*, 49, 332-339.
- Dolz, R., Strauss, J., Bertran, K., Bobi, J., Perez, M., Majó, N., Dinámica de la infección por un nuevo genotipo de virus de Gumboro en pollos de engorde comerciales de 7 y 21 días de edad. XLVIII Simposio científico de avicultura. Santiago de Compostela, Octubre 2011. p.201.
- Domanska, K., Mato, T., Rivallan, G., Smietanka, K., Minta, Z., de Boisseson, C., Toquin, D., Lomniczi, B., Palya, V. and 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? *Arch Virol*, 149, 465-480.
- Dormitorio, T. V., Giambrone, J. J. and Duck, L. W. (1997). Sequence comparisons of the variable VP2 region of eight infectious bursal disease virus isolates. *Avian Dis*, 41, 36-44.
- Drummond, A. J. and Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol*, 7, 214.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B. and Pybus, O. G. (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol*, 22, 1185-1192.
- Duncan, R., Mason, C. L., Nagy, E., Leong, J. A. and Dobos, P. (1991). Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a

- putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology*, 181, 541-552.
- Durairaj, V., Sellers, H. S., Linnemann, E. G., Icard, A. H. and Mundt, E. (2011). Investigation of the antigenic evolution of field isolates using the reverse genetics system of infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch Virol*, 156, 1717-1728.
- Dybing, J. K. and Jackwood, D. J. (1998). Antigenic and immunogenic properties of baculovirus-expressed infectious bursal disease viral proteins. *Avian Dis*, 42, 80-91.
- Escaffre, O., Le Nouen, C., Amelot, M., Ambroggio, X., Ogden, K. M., Guionie, O., Toquin, D., Muller, H., Islam, M. R. and Eterradossi, N. (2013). Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J Virol*, 87, 2767-2780.
- Eterradossi, N. (1995). Comprehensive reports on technical items presented to the International Committee or to Regional Commissions. *Progress in the Diagnosis and Prophylaxis of Infectious Bursal Disease.*, pp. 75-82.
- Eterradossi, N., Arnauld, C., Toquin, D. and Rivallan, G. (1998). Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch Virol*, 143, 1627-1636.
- Eterradossi, N., Arnauld, C., Tekaiia, F., Toquin, D., Le Coq, H., Rivallan, G., Guittet, M., Domenech, J., van den Berg, T. P. and Skinner, M. A. (1999). Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate. *Avian Pathol*, 28, 36-46.
- Eterradossi, N., Gauthier, C., Reda, I., Comte, S., Rivallan, G., Toquin, D., de Boisseson, C., Lamande, J., Jestin, V., Morin, Y., Cazaban, C. and Borne, P. M. (2004). Extensive antigenic changes in an atypical isolate of very virulent infectious bursal disease virus and experimental clinical control of this virus with an antigenically classical live vaccine. *Avian Pathol*, 33, 423-431.
- Eterradossi N and Saif Y.M. Infectious Bursal Disease. In: Diseases of Poultry, edited by Saif Y.M. Iowa: Blackwell Publishing, 2008, p.185-208
- Eterradossi, N., Picault, J. P., Drouin, P., Guittet, M., L'Hospitalier, R. and Bennejean, G. (1992). Pathogenicity and preliminary antigenic characterization of six infectious bursal disease virus strains isolated in France from acute outbreaks. *Zentralbl Veterinarmed B*, 39, 683-691.
- Eterradossi, N., Rivallan, G., Toquin, D. and Guittet, M. (1997). Limited antigenic variation among recent infectious bursal disease virus isolates from France. *Arch Virol*, 142, 2079-2087.
- FAO, 2005 Preparándose para la Influenza Aviar Altamente Patógena. El riesgo de introducción y diseminación de Influenza Aviar. p-7-8.
- Fernandes, M. J., Simoni, I. C., Vogel, M. G., Harakava, R., Rivas, E. B., Oliveira, M. B., Kanashiro, A. M., Tessari, E. N., Gama, N. M. and Arns, C. W. (2009). Molecular characterization of Brazilian infectious bursal disease virus isolated from 1997 to 2005. *Avian Dis*, 53, 449-454.
- Ferrero, D., Garriga, D., Navarro, A., Rodriguez, J. F. and Verdaguer, N. (2015). Infectious Bursal Disease Virus VP3 Upregulates VP1-Mediated RNA-Dependent RNA Replication. *J Virol*, 89, 11165-11168.
- Ganeshan, S., Dickover, R. E., Korber, B. T., Bryson, Y. J. and Wolinsky, S. M. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 genetic evolution in children with different rates of development of disease. *J Virol*, 71, 663-677.
- Gao, L., Li, K., Qi, X., Gao, H., Gao, Y., Qin, L., Wang, Y., Shen, N., Kong, X. and Wang, X. (2014). Triplet amino acids located at positions 145/146/147 of the RNA polymerase of very virulent infectious bursal disease virus contribute to viral virulence. *J Gen Virol*, 95, 888-897.
- Gardner, H., Kerry, K., Riddle, M., Brouwer, S. and Gleeson, L. (1997). Poultry virus infection in Antarctic penguins. *Nature*, 387, 245.
- Garriga, D., Navarro, A., Querol-Audi, J., Abaitua, F., Rodriguez, J. F. and Verdaguer, N. (2007). Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20540-20545.
- Garriga, D., Querol-Audi, J., Abaitua, F., Saugar, I., Pous, J., Verdaguer, N., Caston, J. R. and Rodriguez, J. F. (2006). The 2.6-Angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. *J Virol*, 80, 6895-6905.
- Geerligts, H. J., Ons, E., Boelm, G. J. and Vancraeynest, D. (2015). Efficacy, Safety, and Interactions of a Live Infectious Bursal Disease Virus Vaccine for Chickens Based on Strain IBD V877. *Avian Dis*, 59, 114-121.
- Giambrone, J. J. (2006). Virus de la enfermedad de Gumboro: Pasado, presente y futuro. Estrategias de Vacunación. In: *El libro blanco de la Enfermedad de Gumboro*, Hipra S.A.

- Gorbalenya, A. E., Pringle, F. M., Zeddarn, J. L., Luke, B. T., Cameron, C. E., Kalmakoff, J., Hanzlik, T. N., Gordon, K. H. and Ward, V. K. (2002). The palm subdomain-based active site is internally permuted in viral RNA-dependent RNA polymerases of an ancient lineage. *J Mol Biol*, 324, 47-62.
- Gough, R. E., Drury, S. E., Capua, I., Courtenay, A. E., Sharp, M. W. and Dick, A. C. (1997). Isolation and identification of adenoviruses from ostriches (*Struthio camelus*). *Vet Rec*, 140, 402-403.
- Gu, X. and Vander Velden, K. (2002). DIVERGE: phylogeny-based analysis for functional-structural divergence of a protein family. *Bioinformatics*, 18, 500-501.
- Guy, J. S., West, A. M. and Fuller, F. J. (2011). Physical and genomic characteristics identify chicken proventricular necrosis virus (R11/3 virus) as a novel birnavirus. *Avian Dis*, 55, 2-7.
- Hassan, M. K. (2004). Very virulent infectious bursal disease virus in Egypt: epidemiology, isolation and immunogenicity of classic vaccine. *Vet Res Commun*, 28, 347-356.
- Hassan, M. K. (2004). Very virulent infectious bursal disease virus in Egypt: epidemiology, isolation and immunogenicity of classic vaccine. *Vet Res Commun*, 28, 347-356.
- He, C. Q., Ma, L. Y., Wang, D., Li, G. R. and Ding, N. Z. (2009). Homologous recombination is apparent in infectious bursal disease virus. *Virology*, 384, 51-58.
- He, X., Chen, G., Yang, L., Xuan, J., Long, H. and Wei, P. (2016). Role of naturally occurring genome segment reassortment in the pathogenicity of IBDV field isolates in Three-Yellow chickens. *Avian Pathol*, 45, 178-186.
- He, X., Xiong, Z., Yang, L., Guan, D., Yang, X. and Wei, P. (2014). Molecular epidemiology studies on partial sequences of both genome segments reveal that reassortant infectious bursal disease viruses were dominantly prevalent in southern China during 2000-2012. *Arch Virol*, 159, 3279-3292.
- Heine, H. G., Haritou, M., Failla, P., Fahey, K. and 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 (Pt 8), 1835-1843.
- Hernández, M., Banda, A., Hernández, D., Panzera, F. and Perez, R. (2006). Detection of very virulent strains of infectious bursal disease virus (vvIBDV) in commercial broilers from Uruguay. *Avian Dis*, 50, 624-631.
- Hernández, M., Tomas, G., Marandino, A., Iraola, G., Maya, L., Mattion, N., Hernández, D., Villegas, P., Banda, A., Panzera, Y. and Perez, 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.
- Hiraga, M., Nunoya, T., Otaki, Y., Tajima, M., Saito, T. and Nakamura, T. (1994). Pathogenesis of highly virulent infectious bursal disease virus infection in intact and bursectomized chickens. *J Vet Med Sci*, 56, 1057-1063.
- Hirai, K. and Shimakura, S. (1974). Structure of infectious bursal disease virus. *J Virol*, 14, 957-964.
- Hitchner, S. B. (1970). Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs. *Poult Sci*, 49, 511-516.
- Hon, C. C., Lam, T. T., Yip, C. W., Wong, R. T., Shi, M., Jiang, J., Zeng, F. and Leung, F. C. (2008). Phylogenetic evidence for homologous recombination within the family Birnaviridae. *J Gen Virol*, 89, 3156-3164.
- Hon, C. C., Lam, T. Y., Drummond, A., Rambaut, A., Lee, Y. F., Yip, C. W., Zeng, F., Lam, P. Y., Ng, P. T. and Leung, F. C. (2006). Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent infectious bursal disease virus and reassortment of its genome segment B. *J Virol*, 80, 8503-8509.
- Howie, R. I. and Thorsen, J. (1981). Identification of a strain of infectious bursal disease virus isolated from mosquitoes. *Can J Comp Med*, 45, 315-320.
- Huang, Z., Elankumaran, S., Yunus, A. S. and Samal, S. K. (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.
- Hudson, P. J., McKern, N. M., Power, B. E. and Azad, A. A. (1986). Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res*, 14, 5001-5012.
- Ikuta, N., El-Attrache, J., Villegas, P., Garcia, E. M., Lunge, V. R., Fonseca, A. S., Oliveira, C. and Marques, E. K. (2001). Molecular characterization of Brazilian infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*, 45, 297-306.
- Islam, M. R., Rahman, S., Noor, M., Chowdhury, E. H. and Muller, H. (2012). Differentiation of infectious bursal disease virus (IBDV) genome segment B of very virulent and classical lineage by RT-PCR amplification and restriction enzyme analysis. *Arch Virol*, 157, 333-336.

- Islam, M. R., Zierenberg, K. and Muller, H. (2001). The genome segment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains. *Arch Virol*, 146, 2481-2492.
- Ivanyi, J. and Morris, R. (1976). Immunodeficiency in the chicken. IV. An immunological study of infectious bursal disease. *Clin Exp Immunol*, 23, 154-165.
- Jackwood, D. J., Sommer-Wagner, S. E., Crossley, B. M., Stoute, S. T., Woolcock, P. R. and Charlton, B. R. (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, D. J. and Sommer, S. E. (2005). Molecular studies on suspect very virulent infectious bursal disease virus genomic RNA samples. *Avian Dis*, 49, 246-251.
- Jackwood, D. J., Sreedevi, B., LeFever, L. J. and Sommer-Wagner, S. E. (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, D. H. and Saif, Y. M. (1987). Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*, 31, 766-770.
- Jackwood, D. J. (1990). Development and characterization of nucleic acid probes to infectious bursal disease viruses. *Vet Microbiol*, 24, 253-260.
- Jackwood, D. J. (2012). Molecular epidemiologic evidence of homologous recombination in infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*, 56, 574-577.
- Jackwood, D. J. (2006). Avances en el diagnóstico molecular de la enfermedad de Gumboro. In: *El libro blanco de la Enfermedad de Gumboro*, U. d. A. d. L. Hipra, Ed, Hipra S.A, pp. 47-55.
- Jackwood, D. J., Cookson, K. C., Sommer-Wagner, S. E., Le Galludec, H. and de Wit, J. J. (2006). Molecular characteristics of infectious bursal disease viruses from asymptomatic broiler flocks in Europe. *Avian Dis*, 50, 532-536.
- Jackwood, D. J. and Jackwood, R. J. (1994). Infectious bursal disease viruses: molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype 1 viruses. *Avian Dis*, 38, 531-537.
- Jackwood, D. J., Saif, Y. M. and Moorhead, P. D. (1985). Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens. *Avian Dis*, 29, 1184-1194.
- Jackwood, D. J. and Sommer-Wagner, S. (2007). Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virology*, 365, 369-375.
- Jackwood, D. J. and Sommer-Wagner, S. E. (2011). Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease Birnavirus (IBDV). *Virology*, 409, 33-37.
- Jackwood, D. J., Sommer-Wagner, S. E., Stoute, A. S., Woolcock, P. R., Crossley, B. M., Hietala, S. K. and Charlton, B. R. (2009). Characteristics of a very virulent infectious bursal disease virus from California. *Avian Dis*, 53, 592-600.
- Jeon, W. J., Lee, E. K., Joh, S. J., Kwon, J. H., Yang, C. B., Yoon, Y. S. and Choi, K. S. (2008). Very virulent infectious bursal disease virus isolated from wild birds in Korea: epidemiological implications. *Virus Res*, 137, 153-156.
- Jukes, T.H. & Cantor, C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132, Academic Press, New York.
- Kaufer, I. and Weiss, E. (1980). Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. *Infect Immun*, 27, 364-367.
- Kibenge, F. S., Dhillon, A. S. and Russell, R. G. (1988). Growth of serotypes I and II and variant strains of infectious bursal disease virus in Vero cells. *Avian Dis*, 32, 298-303.
- Kibenge, F. S., Qian, B., Cleghorn, J. R. and Martin, C. K. (1997). Infectious bursal disease virus polyprotein processing does not involve cellular proteases. *Arch Virol*, 142, 2401-2419.
- Kibenge, F. S., Qian, B., Nagy, E., Cleghorn, J. R. and Wadowska, D. (1999). Formation of virus-like particles when the polyprotein gene (segment A) of infectious bursal disease virus is expressed in insect cells. *Can J Vet Res*, 63, 49-55.
- Kim, I. J., Gagic, M. and Sharma, J. M. (1999). Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, 43, 401-413.
- Kim, I. J., Karaca, K., Pertile, T. L., Erickson, S. A. and Sharma, J. M. (1998). Enhanced expression of cytokine genes in spleen macrophages during acute infection with infectious bursal disease virus in chickens. *Vet Immunol Immunopathol*, 61, 331-341.
- Kochan, G., Gonzalez, D. and Rodriguez, J. F. (2003). Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of Infectious bursal disease virus. *Arch Virol*, 148, 723-744.

- Kong, L. L., Omar, A. R., Hair-Bejo, M., Aini, I. and Seow, H. F. (2004). Sequence analysis of both genome segments of two very virulent infectious bursal disease virus field isolates with distinct pathogenicity. *Arch Virol*, 149, 425-434.
- Lana, D. P., Beisel, C. E. and Silva, R. F. (1992). Genetic mechanisms of antigenic variation in infectious bursal disease virus: analysis of a naturally occurring variant virus. *Virus Genes*, 6, 247-259.
- Lee, C. C., Ko, T. P., Chou, C. C., Yoshimura, M., Doong, S. R., Wang, M. Y. and Wang, A. H. (2006). Crystal structure of infectious bursal disease virus VP2 subviral particle at 2.6Å resolution: implications in virion assembly and immunogenicity. *J Struct Biol*, 155, 74-86.
- Lejal, N., Da Costa, B., Huet, J. C. and 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.
- Lemey, P., Rambaut, A., Drummond, A. J. and Suchard, M. A. (2009a). Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput Biol*, 5, e1000520.
- Lemey, P., Rambaut, A., Welch, J. J. and Suchard, M. A. (2010). Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Mol Biol Evol*, 27, 1877-1885.
- Lemey, P., Suchard, M. and Rambaut, A. (2009b). Reconstructing the initial global spread of a human influenza pandemic: A Bayesian spatial-temporal model for the global spread of H1N1pdm. *PLoS Curr*, 1, RRN1031.
- Letzel, T., Coulibaly, F., Rey, F. A., Delmas, B., Jagt, E., van Loon, A. A. and Mundt, E. (2007a). Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *J Virol*, 81, 12827-12835.
- Letzel, T., Mundt, E. and Gorbalenya, A. E. (2007b). Evidence for functional significance of the permuted C motif in Co2+-stimulated RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, 88, 2824-2833.
- Li, Z., Qi, X., Ren, X., Cui, L., Wang, X. and Zhu, P. (2015). Molecular characteristics and evolutionary analysis of a very virulent infectious bursal disease virus. *Sci China Life Sci*, 58, 731-738.
- Li, L., Huang, Y. W., Wang, L. S., Wan, W. J. and Yu, L. (2005). Synthesis of reassortant infectious bursal disease virus in chickens injected directly with infectious clones from different virus strains. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 37, 192-198.
- Li, Z., Wang, Y., Li, X., Li, X., Cao, H. and Zheng, S. J. (2013). Critical roles of glucocorticoid-induced leucine zipper in infectious bursal disease virus (IBDV)-induced suppression of type I Interferon expression and enhancement of IBDV growth in host cells via interaction with VP4. *J Virol*, 87, 1221-1231.
- Lim, B. L., Cao, Y., Yu, T. and Mo, C. W. (1999). Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2. *J Virol*, 73, 2854-2862.
- Lin, Z., Kato, A., Otaki, Y., Nakamura, T., Sasmaz, E. and Ueda, S. (1993). Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis*, 37, 315-323.
- Liu, J., Zhou, J. and Kwang, J. (2002). Antigenic and molecular characterization of recent infectious bursal disease virus isolates in China. *Virus Genes*, 24, 135-147.
- Liu, M. and Vakharia, V. N. (2004). VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. *Virology*, 330, 62-73.
- Liu, M. and Vakharia, V. N. (2006). Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *J Virol*, 80, 3369-3377.
- Lojkcic, I., Bidin, Z. and Pokric, B. (2008). Sequence analysis of both genome segments of three Croatian infectious bursal disease field viruses. *Avian Dis*, 52, 513-519.
- Le Nouen, C., Rivallan, G., Toquin, D., Darlu, P., Morin, Y., Beven, V., de Boisseson, C., Cazaban, C., Comte, S., Gardin, Y. and Etteradossi, N. (2006). Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. *J Gen Virol*, 87, 209-216.
- Lombardo, E., Maraver, A., Castán, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. and Rodríguez, J. F. (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.
- Lombardo, E., Maraver, A., Espinosa, I., Fernández-Arias, A. and Rodríguez, J. F. (2000). VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology*, 277, 345-357.
- Lu, Z., Zhang, L., Wang, N., Chen, Y., Gao, L., Wang, Y., Gao, H., Gao, Y., Li, K., Qi, X. and Wang, X. (2015). Naturally occurring reassortant infectious bursal disease virus in northern China. *Virus Res*, 203, 92-95.

- Lukert, P. D. and Saif, Y. M. (1997). Infectious bursal disease. In: Disease of Poultry. Calnek B.W.; Barnes, H.J.; Beard, C.W.; McDougald, L.R., Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA., pp. 721-738.
- Luque, D., Saugar, I., Rodriguez, J. F., Verdaguer, N., Garriga, D., Martin, C. S., Velazquez-Muriel, J. A., Trus, B. L., Carrascosa, J. L. and Caston, J. R. (2007). Infectious bursal disease virus capsid assembly and maturation by structural rearrangements of a transient molecular switch. *J Virol*, 81, 6869-6878.
- Macdonald, R. D. (1980). Immunofluorescent detection of double-stranded RNA in cells infected with reovirus, infectious pancreatic necrosis virus, and infectious bursal disease virus. *Can J Microbiol*, 26, 256-261.
- Mahardika, G. N. and Becht, H. (1995). Mapping of cross-reacting and serotype-specific epitopes on the VP3 structural protein of the infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch Virol*, 140, 765-774.
- Majó, N., El-Attrache, J., Banda, A., Villegas, P., Ramis, A., Pages, A. and Ikuta, N. (2002). Molecular characterization of Spanish infectious bursal disease virus field isolates. *Avian Dis*, 46, 859-868.
- Maraver, A., Ona, A., Abaitua, F., Gonzalez, D., Clemente, R., Ruiz-Diaz, J. A., Caston, J. R., Pazos, F. and Rodriguez, J. F. (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.
- Martín, A. M., Fallacara, F., Barbieri, I., Tosi, G., Rivallan, G., Eterradossi, N., Ceruti, R. and Cordioli, P. (2007). Genetic and antigenic characterization of infectious bursal disease viruses isolated in Italy during the period 2002-2005. *Avian Dis*, 51, 863-872.
- Mardassi, H., Khabouchi, N., Ghram, A., Namouchi, A. and Karboul, A. (2004). A very virulent genotype of infectious bursal disease virus predominantly associated with recurrent infectious bursal disease outbreaks in Tunisian vaccinated flocks. *Avian Dis*, 48, 829-840.
- McAllister, J. C., Steelman, C. D., Newberry, L. A. and Skeeles, J. K. (1995). Isolation of infectious bursal disease virus from the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). *Poult Sci*, 74, 45-49.
- McFerran, J. B., McNulty, M. S., McKillop, E. R., Conner, T. J., McCracken, R. M., Collins, D. S. and Allan, G. M. (1980). Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkey and duck: Demonstration of a second serotype. *Avian Pathol*, 9, 395-404.
- Mendez, F., de Garay, T., Rodriguez, D. and Rodriguez, J. F. (2015). Infectious bursal disease virus VP5 polypeptide: a phosphoinositide-binding protein required for efficient cell-to-cell virus dissemination. *PLoS One*, 10, e0123470.
- Muller, H. and Becht, H. (1982). Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *J Virol*, 44, 384-392.
- Muller, H., Islam, M. R. and Raue, R. (2003). Research on infectious bursal disease--the past, the present and the future. *Vet Microbiol*, 97, 153-165.
- Muller, H., Scholtissek, C. and Becht, H. (1979a). The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J Virol*, 31, 584-589.
- Muller, R., Kaufer, I., Reinacher, M. and Weiss, E. (1979b). Immunofluorescent studies of early virus propagation after oral infection with infectious bursal disease virus (IBDV). *Zentralbl Veterinarmed B*, 26, 345-352.
- Mundt, E. (1999). Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *J Gen Virol*, 80 (Pt 8), 2067-2076.
- Mundt, E. and Vakharia, V. N. (1996). Synthetic transcripts of double-stranded Birnavirus genome are infectious. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 11131-11136.
- Mundt, E., Kollner, B. and Kretzschmar, D. (1997). VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J Virol*, 71, 5647-5651.
- Murayama, A., Weng, L., Date, T., Akazawa, D., Tian, X., Suzuki, T., Kato, T., Tanaka, Y., Mizokami, M., Wakita, T. and Toyoda, T. (2010). RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. *PLoS Pathog*, 6, e1000885.
- Negash, T., al-Garib, S. O. and Gruys, E. (2004). Comparison of in ovo and post-hatch vaccination with particular reference to infectious bursal disease. A review. *Vet Q*, 26, 76-87.
- Nieper, H. and Muller, H. (1996). Susceptibility of chicken lymphoid cells to infectious bursal disease virus does not correlate with the presence of specific binding sites. *J Gen Virol*, 77 (Pt 6), 1229-1237.
- Nieper H. and Müller H. (1996). Susceptibility of chicken lymphoid cells to infectious bursal disease virus does not correlate with the presence of specific binding sites. *J Gen Virol*. 77 1229-1237.

- Nieper, H., Teifke, J. P., Jungmann, A., Löhr, C. V. and Müller, H. (1999). Infected and apoptotic cells in the IBDV-infected bursa of Fabricius, studied by double-labelling techniques. *Avian Pathol*, 28, 279-285.
- Nouen, C. L., Toquin, D., Muller, H., Raue, R., Kean, K. M., Langlois, P., Cherbonnel, M. and Etteradossi, N. (2012). Different domains of the RNA polymerase of infectious bursal disease virus contribute to virulence. *PLoS One*, 7, e28064.
- Nunoya, T., Otaki, Y., Tajima, M., Hiraga, M. and 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, 597-609.
- Ogawa, M., Wakuda, T., Yamaguchi, T., Murata, K., Setiyono, A., Fukushi, H. and Hirai, K. (1998). Seroprevalence of infectious bursal disease virus in free-living wild birds in Japan. *J Vet Med Sci*, 60, 1277-1279.
- Office International des Epizooties, OIE. (1995). Resolution N° XVIII. Progress in the diagnosis and control of serious poultry diseases: Salmonellosis and Gumboro Disease. Bull OIE 107 (5). SG/RF, Ed, Paris, Francia., pp. 89-91.
- Omar, A. R., Kim, L. C. and Bejo, M. H. (2006). Efficacy of VP2 protein expressed in *E.coli* for protection against highly virulent infectious bursal disease virus. *J Vet Sci*, 7, 241-247.
- Ona, A., Luque, D., Abaitua, F., Maraver, A., Caston, J. R. and Rodriguez, J. F. (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.
- Pagès, A., Pujol, P., Durán, D., Fernández, F. and Hernando, A. (1991). Estudios clínicos y laboratoriales de una cepa de la enfermedad de gumboro (IBD) aislada en baleares. *Med. Vet.*, 8, 476-480.
- Pan, J., Lin, L. and Tao, Y. J. (2009). Self-guanylation of birnavirus VP1 does not require an intact polymerase activity site. *Virology*, 395, 87-96.
- Pan, J., Vakharia, V. N. and Tao, Y. J. (2007). The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 7385-7390.
- Parede, L. H., Sapats, S., Gould, G., Rudd, M., Lowther, S. and Ignjatovic, J. (2003). Characterization of infectious bursal disease virus isolates from Indonesia indicates the existence of very virulent strains with unique genetic changes. *Avian Pathol*, 32, 511-518.
- Park, M. J., Park, J. H. and Kwon, H. M. (2010). Mice as potential carriers of infectious bursal disease virus in chickens. *Vet J*, 183, 352-354.
- Patel, A. K., Vinod C. Pandey, Joy K. Pal1 Evidence of genetic drift and reassortment in infectious bursal disease virus and emergence of outbreaks in poultry farms in India. *VirusDis*. DOI 10.1007/s13337-016-0306-z.
- Patton, J. T., Jones, M. T., Kalbach, A. N., He, Y. W. and Xiaobo, J. (1997). Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J Virol*, 71, 9618-9626.
- Petit, S., Lejal, N., Huet, J. C. and Delmas, B. (2000). Active residues and viral substrate cleavage sites of the protease of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol*, 74, 2057-2066.
- Pitcovski, J., Levi, B. Z., Maray, T., Di-Castro, D., Safadi, A., Krispel, S., Azriel, A., Gutter, B. and Michael, A. (1999). Failure of viral protein 3 of infectious bursal disease virus produced in prokaryotic and eukaryotic expression systems to protect chickens against the disease. *Avian Dis*, 43, 8-15.
- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*, 25, 1253-1256.
- Qi, X., Gao, H., Gao, Y., Qin, L., Wang, Y., Gao, L. and 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.
- Qi, X., Zhang, L., Chen, Y., Gao, L., Wu, G., Qin, L., Wang, Y., Ren, X., Gao, Y., Gao, H. and 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, e70982.
- Qin, L., Qi, X., Gao, Y., Gao, H., Lu, X., Wang, Y., Bu, Z. and Wang, X. (2010). VP5-deficient mutant virus induced protection against challenge with very virulent infectious bursal disease virus of chickens. *Vaccine*, 28, 3735-3740.
- Rautenschlein, S., Kraemer, C., Vanmarcke, J. and 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, 231-237.
- Rosnow, J. J., Edwards, G. E. and Roalson, E. H. (2014). Positive selection of Kranz and non-Kranz C4 phosphoenolpyruvate carboxylase amino acids in Suaedoideae (Chenopodiaceae). *J Exp Bot*, 65, 3595-3607.

- Rudd, M. F., Heine, H. G., Sapats, S. I., Parede, L. and Ignjatovic, J. (2002). Characterisation of an Indonesian very virulent strain of infectious bursal disease virus. *Arch Virol*, 147, 1303-1322.
- Streicker, D. G., Lemey, P., Velasco-Villa, A. and Rupprecht, C. E. (2012). Rates of viral evolution are linked to host geography in bat rabies. *PLoS Pathog*, 8, e1002720.
- Saif, Y. M. (2006). Tipos antigénicos de la enfermedad de Gumboro. In: *El libro blanco de la Enfermedad de Gumboro*, U. d. A. d. L. Hipra, Ed, Hipra S.A, pp. 21-25.
- Sanchez, A. B. and 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.
- Sapats, S. I. and Ignjatovic, J. (2002). Restriction fragment length polymorphism analysis of the VP2 gene of Australian strains of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol*, 31, 559-566.
- Saugar, I., Luque, D., Ona, A., Rodriguez, J. F., Carrascosa, J. L., Trus, B. L. and Caston, J. R. (2005). Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic alpha helix as a molecular switch. *Structure*, 13, 1007-1017.
- Schijns, V. E. and Brewer, J. M. (2008). New views on immunopotentiators in modern vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 7, 877-879.
- Sharma, J. M., Dohms, J., Walser, M. and Snyder, D. B. (1993). Presence of lesions without virus replication in the thymus of chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, 37, 741-748.
- Sharma, J. M., Dohms, J. E. and Metz, A. L. (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.
- Sharma, J. M. and Fredericksen, T. L. (1987). Mechanism of T cell immunosuppression by infectious bursal disease virus of chickens. *Prog Clin Biol Res*, 238, 283-294.
- Sharma, J. M., Kim, I. J., Rautenschlein, S. and Yeh, H. Y. (2000). Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev Comp Immunol*, 24, 223-235.
- Shwed, P. S., Dobos, P., Cameron, L. A., Vakharia, V. N. and Duncan, R. (2002). Birnavirus VP1 proteins form a distinct subgroup of RNA-dependent RNA polymerases lacking a GDD motif. *Virology*, 296, 241-250.
- Siriyasatien, P., Phumee, A., Ongruk, P., Jampachaisri, K. and Kesorn, K. (2016). Analysis of significant factors for dengue fever incidence prediction. *BMC Bioinformatics*, 17, 166.
- Silva, F. M., Vidigal, P. M., Myrrha, L. W., Fietto, J. L., Silva, A., Jr. and Almeida, M. R. (2013). Tracking the molecular epidemiology of Brazilian Infectious bursal disease virus (IBDV) isolates. *Infect Genet Evol*, 13, 18-26.
- Skeeles, J. K., Lukert, P. D., De Buyscher, E. V., Fletcher, O. J. and Brown, J. (1979). Infectious bursal disease viral infections. II. The relationship of age, complement levels, virus-neutralizing antibody, clotting, and lesions. *Avian Dis*, 23, 107-117.
- Skeeles, J. K., Slavik, M., Beasley, J. N., Brown, A. H., Meinecke, C. F., Maruca, S. and Welch, S. (1980). An age-related coagulation disorder associated with experimental infection with infectious bursal disease virus. *Am J Vet Res*, 41, 1458-1461.
- Skeeles, J.K. & Lukert, P.D. (1980). Studies with on attenuated cellculture adapted infectious bursal disease virus: replication sites and persistence of the virus in specific pathogen free chicken. *Avian Disease*, 24, 43– 47.
- Smith, K. M., Karesh, W. B., Majluf, P., Paredes, R., Zavalaga, C., Reul, A. H., Stetter, M., Braselton, W. E., Puche, H. and Cook, R. A. (2008). Health evaluation of free-ranging Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in Peru. *Avian Dis*, 52, 130-135.
- Snyder, D. B., Lana, D. P., Savage, P. K., Yancey, F. S., Mengel, S. A. and Marquardt, W. W. (1988). Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. *Avian Dis*, 32, 535-539.
- Snyder, D. B., Vakharia, V. N. and Savage, P. K. (1992). Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. *Arch Virol*, 127, 89-101.
- Spies, U., Muller, H. and 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.
- Spies, U. and Muller, H. (1990). Demonstration of enzyme activities required for cap structure formation in infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group. *J Gen Virol*, 71 (Pt 4), 977-981.

- Stoute, S. T., Jackwood, D. J., Sommer-Wagner, S. E., Cooper, G. L., Anderson, M. L., Woolcock, P. R., Bickford, A. A., Senties-Cue, C. G. and Charlton, B. R. (2009). The diagnosis of very virulent infectious bursal disease in California pullets. *Avian Dis*, 53, 321-326.
- Tacken, M. G., Rottier, P. J., Gielkens, A. L. and Peeters, B. P. (2000). Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. *J Gen Virol*, 81, 209-218.
- Tacken, M. G., Van Den Beuken, P. A., Peeters, B. P., Thomas, A. A., Rottier, P. J. and Boot, H. J. (2003). Homotypic interactions of the infectious bursal disease virus proteins VP3, pVP2, VP4, and VP5: mapping of the interacting domains. *Virology*, 312, 306-319.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28, 2731-2739.
- Tanimura, N. and Sharma, J. M. (1998). In-situ apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease virus. *J Comp Pathol*, 118, 15-27.
- Tanimura, N., Tsukamoto, K., Nakamura, K., Narita, M. and Maeda, M. (1995). Association between pathogenicity of infectious bursal disease virus and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry. *Avian Dis*, 39, 9-20.
- Tsukamoto, K., Kojima, C., Komori, Y., Tanimura, N., Mase, M. and 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., Hihara, H., Shirai, J., Imai, K., Nakamura, K. and Maeda, M. (1992). Isolation of virulent infectious bursal disease virus from field outbreaks with high mortality in Japan. *J Vet Med Sci*, 54, 153-155.
- Vakharia, V. N., He, J., Ahamed, B. and Snyder, D. B. (1994). Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res*, 31, 265-273.
- Van den Berg, T. P. (2000). Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol*, 29, 175-194.
- Van den Berg, T. P., Eterradossi, N., Toquin, D. and Meulemans, G. (2000). Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev Sci Tech*, 19, 509-543.
- van den Berg, T. P., Gonze, M. and Meulemans, G. (1991). Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Pathology*, 20, 133-143.
- van den Berg, T. P., Gonze, M., Morales, D. and Meulemans, G. (1996). Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of highly virulent strain. *Avian Pathol*, 25, 751-768.
- Van der Marel, P., Snyder, D. and Luttkick, D. (1990). Antigenic characterization of IBDV field isolates by their reactivity with a panel of monoclonal antibodies. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 97, 81-83.
- van Loon, A. A., de Haas, N., Zeyda, I. and Mundt, E. (2002). Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. *J Gen Virol*, 83, 121-129.
- Vancini, R., Paredes, A., Ribeiro, M., Blackburn, K., Ferreira, D., Kononchik, J. P., Jr., Hernández, R. and Brown, D. (2012). Espirito Santo virus: a new birnavirus that replicates in insect cells. *J Virol*, 86, 2390-2399.
- von Einem, U. I., Gorbalenya, A. E., Schirrmeier, H., Behrens, S. E., Letzel, T. and Mundt, E. (2004). VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol*, 85, 2221-2229.
- Wang, N., Zhang, L., Chen, Y., Lu, Z., Gao, L., Wang, Y., Gao, Y., Gao, H., Cui, H., Li, K., Liu, C., Zhang, Y. and Qi, X. (2015). Cyclophilin A Interacts with Viral VP4 and Inhibits the Replication of Infectious Bursal Disease Virus. 2015, 719454.
- Wang, X., Zhang, H., Gao, H., Fu, C., Gao, Y. and Ju, Y. (2007). Changes in VP3 and VP5 genes during the attenuation of the very virulent infectious bursal disease virus strain Gx isolated in China. *Virus Genes*, 34, 67-73.
- Wei, L., Hou, L., Zhu, S., Wang, J., Zhou, J. and Liu, J. (2011). Infectious bursal disease virus activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway by interaction of VP5 protein with the p85alpha subunit of PI3K. *Virology*, 417, 211-220.
- Wei, Y., Li, J., Zheng, J., Xu, H., Li, L. and Yu, L. (2006). Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. *Biochem Biophys Res Commun*, 350, 277-287.
- Whitfill, C. E., Haddad, E. E., Ricks, C. A., Skeeles, J. K., Newberry, L. A., Beasley, J. N., Andrews, P. D., Thoma, J. A. and Wakenell, P. S. (1995). Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV. *Avian Dis*, 39, 687-699.

- Williams, A. E. and Davison, T. F. (2005). Enhanced immunopathology induced by very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Pathol*, 34, 4-14.
- Winterfield, R. W. and Hitchner, S. B. (1962). Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am J Vet Res*, 23, 1273-1279.
- Wu, C. C., Lin, T. L., Zhang, H. G., Davis, V. S. and Boyle, J. A. (1992). Molecular detection of infectious bursal disease virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis*, 36, 221-226.
- Xia, R. X., Wang, H. Y., Huang, G. M. and Zhang, M. F. (2008). Sequence and phylogenetic analysis of a Chinese very virulent infectious bursal disease virus. *Arch Virol*, 153, 1725-1729.
- Xu, H. T., Si, W. D. and Dobos, P. (2004). Mapping the site of guanylylation on VP1, the protein primer for infectious pancreatic necrosis virus RNA synthesis. *Virology*, 322, 199-210.
- Xu, X. G., Tong, D. W., Wang, Z. S., Zhang, Q., Li, Z. C., Zhang, K., Li, W. and Liu, H. J. (2011). Baculovirus virions displaying infectious bursal disease virus VP2 protein protect chickens against infectious bursal disease virus infection. *Avian Dis*, 55, 223-229.
- Yamaguchi, T., Iwata, K., Kobayashi, M., Ogawa, M., Fukushi, H. and Hirai, K. (1996a). Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of infectious bursal disease virus. *Arch Virol*, 141, 1493-1507.
- Yamaguchi, T., Kondo, T., Inoshima, Y., Ogawa, M., Miyoshi, M., Yanai, T., Masegi, T., Fukushi, H. and Hirai, K. (1996b). In vitro attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus: some characteristics of attenuated strains. *Avian Dis*, 40, 501-509.
- Yao, K., Goodwin, M. A. and Vakharia, V. N. (1998). Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions. *J Virol*, 72, 2647-2654.
- Ye, C., Jia, L., Sun, Y., Hu, B., Wang, L., Lu, X. and 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.
- Yu, F., Ren, X., Wang, Y., Qi, X., Song, J., Gao, Y., Qin, L., Gao, H. and Wang, X. (2013). A single amino acid V4I substitution in VP1 attenuates virulence of very virulent infectious bursal disease virus (vvIBDV) in SPF chickens and increases replication in CEF cells. *Virology*, 440, 204-209.
- Yu, L., Li, J. R., Huang, Y. W., Dikki, J. and Deng, R. (2001). Molecular characteristics of full-length genomic segment A of three infectious bursal disease viruses in China: two attenuated strains and one virulent field strain. *Avian Dis*, 45, 862-874.
- Zierenberg, K., Raue, R. and Müller, H. (2001). Rapid identification of "very virulent" strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis. *Avian Pathol*, 30, 55-62.
- Zierenberg, K., Raue, R., Nieper, H., Islam, M. R., Eterradossi, N., Toquin, D. and Muller, H. (2004). Generation of serotype 1/serotype 2 reassortant viruses of the infectious bursal disease virus and their investigation in vitro and in vivo. *Virus Res*, 105, 23-34.
- Zorman-Rojs, O., Barlic-Maganja, D., Mitevski, D., Lubke, W. and Mundt, E. (2003). Very virulent infectious bursal disease virus in southeastern Europe. *Avian Dis*, 47, 186-192.

ANEXOS

MUESTRA	CODIGO DE MUESTRA	CLASIFICACION	EDAD	TIPO DE AVE
1	a	MUY VIRULENTA	24	POLLO
2	b	MUY VIRULENTA	-	POLLO
3	c	MUY VIRULENTA	-	POLLO
5	e	MUY VIRULENTA	28	POLLO
6	f	MUY VIRULENTA	38	POLLO
7	g	MUY VIRULENTA	-	POLLO
8	h	MUY VIRULENTA	35	POLLO
9	i	MUY VIRULENTA	-	POLLO
10	j	MUY VIRULENTA	-	POLLO
11	k	MUY VIRULENTA	40	POLLO
12	l	MUY VIRULENTA	28	POLLO
13	m	MUY VIRULENTA	42	POLLO
14	n	MUY VIRULENTA	-	POLLO
15	o	MUY VIRULENTA	37	POLLO
16	p	MUY VIRULENTA	-	POLLO
17	q	MUY VIRULENTA	-	POLLO
18	r	MUY VIRULENTA	30	POLLO
19	s	MUY VIRULENTA	34	POLLO
20	t	MUY VIRULENTA	-	POLLO
21	u	MUY VIRULENTA	-	POLLO
22	v	MUY VIRULENTA	40	POLLO
23	w	MUY VIRULENTA	41	POLLO
24	x	MUY VIRULENTA	37	POLLO
25	y	MUY VIRULENTA	-	POLLO
26	z	MUY VIRULENTA	-	POLLO
27	a	MUY VIRULENTA	-	POLLO
28	b	MUY VIRULENTA	47	POLLO
29	c	MUY VIRULENTA	-	POLLO
30	e	MUY VIRULENTA	21	POLLO
31	f	MUY VIRULENTA	-	POLLO
32	g	MUY VIRULENTA	32	POLLO
33	h	MUY VIRULENTA	36	POLLO
34	i	MUY VIRULENTA	35	POLLO
35	j	MUY VIRULENTA	-	POLLO
36	k	MUY VIRULENTA	-	POLLO
37	l	MUY VIRULENTA	37	POLLO
38	m	MUY VIRULENTA	37	POLLO
39	n	MUY VIRULENTA	37	POLLO
40	o	MUY VIRULENTA	37	POLLO
41	p	MUY VIRULENTA	40	POLLO
42	q	MUY VIRULENTA	35	POLLO
43	r	MUY VIRULENTA	29	POLLO
44	s	MUY VIRULENTA	-	POLLO
45	t	MUY VIRULENTA	-	POLLO
46	u	MUY VIRULENTA	-	POLLO
47	v	MUY VIRULENTA	-	POLLO
48	w	MUY VIRULENTA	-	POLLO
49	x	MUY VIRULENTA	-	POLLO
50	y	MUY VIRULENTA	-	POLLO
51	z	MUY VIRULENTA	-	POLLO
52	a	MUY VIRULENTA	-	POLLO
53	b	MUY VIRULENTA	-	POLLO
54	c	MUY VIRULENTA	-	POLLO
55	e	MUY VIRULENTA	-	POLLO
56	f	MUY VIRULENTA	-	POLLO
57	g	MUY VIRULENTA	-	POLLO
58	h	MUY VIRULENTA	-	POLLO
59	i	MUY VIRULENTA	-	POLLO
60	j	MUY VIRULENTA	-	POLLO
61	k	MUY VIRULENTA	-	POLLO
62	l	MUY VIRULENTA	38	POLLO
63	m	MUY VIRULENTA	30	POLLO
64	n	MUY VIRULENTA	48	POLLO
65	o	MUY VIRULENTA	-	POLLO
66	p	MUY VIRULENTA	41	POLLO
67	q	MUY VIRULENTA	42	POLLO
68	r	MUY VIRULENTA	34	POLLO
69	s	MUY VIRULENTA	38	POLLO
70	t	MUY VIRULENTA	-	POLLO

71	s	ICEPA 2512	32
72	t	ICEPA 2512	33
73	u	ICEPA 2512	-
74	v	ICEPA 2512	-
75	w	ICEPA 2512	-
76	x	ICEPA 2512	42
77	y	ICEPA 2512	44
78	z	ICEPA 2512	39
79	a	ICEPA 2513	-
80	b	ICEPA 2514 Y VV	36
81	c	ICEPA 2514 Y VV	35
82	d	ICEPA 2512	-
83	e	ICEPA 2512	-
84	f	ICEPA 2512	-
85	g	ICEPA 2512	31
86	h	ICEPA 2512	28
87	i	ICEPAS 2512	31
88	j	ICEPA 2512	39
89	k	ICEPA 2512	22
90	l	ICEPA 2512	37
91	m	ICEPA 2512	-
92	n	ICEPA 2512	-
93	o	ICEPA POCO ATENUADA	42
94	p	ICEPA POCO ATENUADA	-
95	q	ICEPA 2512	-
96	r	ICEPA 2512	-
97	s	ICEPA 2512	38
98	t	ICEPA 2512	33
99	u	ICEPA 2512	33
100	v	ICEPA 2512	35
101	w	ICEPA 2512	-
102	x	ICEPA 2512	-
103	y	ICEPA 2512	33
104	z	ICEPA 2513	33
105	a	ICEPA 2513	29d
106	b	ICEPA 2512	38d
107	c	ICEPA 2512	38
108	d	ATENUADA	-
109	e	ICEPA 2512	31
110	f	ATENUADA	42
111	g	ICEPA POCO ATENUADA	46
112	h	CLASICA TIPO 2512	-
113	i	Cepa bajo grado atenuación	-
114	j	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
115	k	Cepa bajo grado atenuación	-
116	l	ATENUADA	28
117	m	Cepa clásica y clásicas de virulencia	30
118	n	ATENUADA	36
119	o	ATENUADA	42
120	p	Cepa clásica (tipo 2512)	30
121	q	Cepa clásica (tipo 2513)	30
122	r	ATENUADA	-
123	s	Cepa clásica (tipo 2512)	43
124	t	ATENUADA	-
125	u	ICEPA 2512	22
126	v	ICEPA 2512	28
127	w	ICEPA 2512	28
128	x	ICEPA 2512	24
129	y	ICEPA 2512	34
130	z	ICEPA 2512	34
131	a	ICEPA 2512	30
132	b	ICEPA 2512	34
133	c	ICEPA 2512	-
134	d	ICEPA 2512	39
135	e	ICEPA CLASICA TIPO 2512	34
136	f	ICEPA CLASICA TIPO 2512	-
137	g	ICEPA 2512	44
138	h	ATENUADA	38
139	i	ATENUADA	-
140	j	ATENUADA	-

141	k	ATENUADA	39
142	l	CEPA 2512	45
143	m	CEPA 2512	36
144	n	CEPA POCO ATENUADA	28
145	o	ATENUADA	-
146	p	ATENUADA	41
147	q	CEPA CLASICA 2512	42
148	r	CEPA CLASICA 2512	28
149	s	CEPA CLASICA 2512	52
150	t	CEPA CLASICA 2512	38
151	u	CEPA CLASICA 2512	38
152	v	CEPA CLASICA 2512	31
153	w	CEPA CLASICA 2512	31
154	x	CEPA POCO ATENUADA	31
155	y	CEPA CLASICA 2512	32
156	z	CEPA CLASICA 2512	32
157	a	ATENUADA	29
158	b	CEPA CLASICA 2512	34
159	c	ATENUADA	35
160	d	CEPA CLASICA 2512	32
161	e	CEPA CLASICA 2512	35
162	f	CEPA CLASICA 2512	35
163	g	CEPA CLASICA 2512	35
164	h	CEPA CLASICA 2512	25
165	i	CEPA CLASICA 2512	23
166	j	CEPA CLASICA 2512	23
167	k	CEPA CLASICA 2512	-
168	l	CEPA POCO ATENUADA	-
169	m	CEPA CLASICA 2512	49
170	n	CEPA CLASICA 2512	49
171	o	ATENUADA	-
172	p	CEPA CLASICA 2512	29
173	q	CEPA CLASICA 2512	37
174	r	CEPA CLASICA 2512	49
175	s	CEPA CLASICA 2512	-
176	t	CEPA CLASICA 2512	35
177	u	CEPA CLASICA 2512	41
178	v	CEPA CLASICA 2512	42
179	w	CEPA CLASICA 2513	42
180	x	CEPA CLASICA 2512	-
181	y	CEPA CLASICA 2512	-
182	z	CEPA CLASICA 2512	49
183	a	CEPA CLASICA 2512	-
184	b	CEPA CLASICA 2512	38
185	c	CEPA CLASICA 2512	42
186	d	ATENUADA	39
187	e	ATENUADA	39
188	f	ATENUADA	39
189	g	CEPA CLASICA 2512	44
190	h	ATENUADA	42
191	i	CEPA CLASICA 2512	42
192	j	CEPA CLASICA 2512	32
193	k	CEPA CLASICA 2512	33
194	l	ATENUADA	39
195	m	ATENUADA	39
196	n	ATENUADA	39
197	o	ATENUADA	39
198	p	ATENUADA	39
199	q	CEPA POCO ATENUADA	40
200	r	CEPA CLASICA 2512	35
201	s	ATENUADA	28
202	t	ATENUADA	28
203	u	CEPA CLASICA 2512	28
204	v	CEPA CLASICA 2513	31
205	w	ATENUADA	34
206	x	ATENUADA	34
207	y	CEPA CLASICA 2513	42
208	z	CEPA CLASICA 2513	42
209	a	CEPA POCO ATENUADA	38
210	b	CEPA CLASICA 2513	35

211	c	CEPA CLASICA 2513	31
212	d	ATENUADA	-
213	e	CEPA CLASICA 2513	40
214	f	CEPA POCO ATENUADA	-
215	g	CEPA CLASICA 2513	35
216	h	CEPA CLASICA 2513	40
217	i	CEPA POCO ATENUADA	-
218	j	CEPA POCO ATENUADA	45
219	k	CEPA CLASICA 2513	26
220	l	CEPA CLASICA 2512	35
221	m	CEPA CLASICA 2512	36
222	n	CEPA CLASICA 2512	31
223	o	Cepa clásica 2512	35
224	p	Cepa clásica 2513	35
225	q	CEPA CLASICA 2512	36
226	r	ATENUADA	44
227	s	CEPA CLASICA 2512	-
228	t	CEPA CLASICA 2512	39
229	u	ATENUADA	-
230	v	CEPA CLASICA 2512	30
231	w	CEPA CLASICA 2512	36
232	x	CEPA CLASICA 2512	30
233	y	CEPA CLASICA 2512	36
234	z	CEPA CLASICA 2512	36
235	a	CEPA CLASICA 2512	37
236	b	CEPA CLASICA 2512	30
237	c	CEPA CLASICA 2512	37
238	d	CEPA CLASICA 2512	32
239	e	CEPA CLASICA 2512	29
240	f	CEPA CLASICA 2512	37
241	g	ATENUADA	45
242	h	ATENUADA	-
243	i	ATENUADA	44
244	j	CEPA CLASICA WINTERFIELD 2512	33?
245	k	cepa poco atenuada	33
246	l	CEPA CLASICA 2512	29
247	m	CEPA CLASICA 2513	36
248	n	CEPA CLASICA 2514	37
249	o	CEPA CLASICA 2515	30
250	p	CEPA CLASICA 2512	37
251	q	CEPA CLASICA 2517	30
252	r	CEPA CLASICA 2518	37
253	s	CEPA CLASICA 2512	36
254	t	CEPA CLASICA 2512	39
255	u	CEPA CLASICA 2512	32
256	v	CEPA CLASICA 2512	32
257	w	CEPA POCO ATENUADA	42
258	x	ATENUADA	-
259	y	CEPA POCO ATENUADA	8 SEM
260	z	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
261	a	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
262	b	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
263	c	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
264	d	ATENUADA	42
265	e	CEPA POCO ATENUADA	-
266	f	CEPA POCO ATENUADA	-
267	g	VAC ATENUADA	-
268	h	Cepa clásica (Winterfield 2512)	37
269	i	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
270	j	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
271	k	ATENUADA	39
272	l	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
273	m	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
274	n	Cepa clásica (Winterfield 2512)	43
275	o	Cepa clásica (Winterfield 2512)	43
276	p	Cepa atenuada	-
277	q	Cepa atenuada	36
278	r	Cepa atenuada	18
279	s	Cepa clásica (Winterfield 2512)	27
280	t	Cepa atenuada	43

281	u	ATENUADA	-
282	v	ATENUADA	-
283	w	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
284	x	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
285	y	ATENUADA	48
286	z	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
287	a	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
288	b	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
289	c	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
290	d	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
291	e	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
292	f	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
293	g	CEPA POCO ATENUADA	44
294	h	Cepa clásica (Winterfield 2512)	48
295	i	Cepa clásica (Winterfield 2512)	39
296	j	CEPA VACUNAL ATENUADA	-
297	k	CEPA POCO ATENUADA	-
298	l	Cepa clásica (Winterfield 2512)	34
299	m	CEPA VACUNAL ATENUADA	48
300	n	CEPA VACUNAL ATENUADA	46
301	o	CEPA VACUNAL ATENUADA	-
302	p	CEPA VACUNAL ATENUADA	45
303	q	CEPA VACUNAL ATENUADA	-
304	r	CEPA VACUNAL ATENUADA	42
305	s	CEPA VACUNAL ATENUADA	47
306	t	CEPA VACUNAL ATENUADA	42
307	u	Cepa clásica (Winterfield 2512)	26-34
308	v	ATENUADA	40
309	w	Cepa clásica (Winterfield 2512)	50
310	x	Cepa clásica (Winterfield 2512)	43
311	y	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
312	z	CEPA VACUNAL ATENUADA	40
313	a	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
314	b	Cepa clásica (Winterfield 2512)	37
315	c	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
316	d	Cepa clásica (Winterfield 2512)	26
317	e	Cepa clásica (Winterfield 2512)	40
318	f	CEPA CLÁSICA ATENUADA	28
319	g	ATENUADA	35
320	h	CEPA POCO ATENUADA	31
321	i	Cepa clásica (Winterfield 2512)	27
322	j	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
323	k	Cepa clásica (Winterfield 2512)	23
324	l	Cepa clásica (Winterfield 2512)	34
325	m	CEPA VACUNAL ATENUADA	-
326	n	Cepa clásica (Winterfield 2512)	40
327	o	Cepa clásica (Winterfield 2512)	40
328	p	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
329	q	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
330	r	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
331	s	Cepa clásica (Winterfield 2512)	29
332	t	Cepa clásica (Winterfield 2512)	45
333	u	Cepa clásica (Winterfield 2512)	42
334	v	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
335	w	CEPA VACUNAL ATENUADA	43
336	x	Cepa clásica (Winterfield 2512)	31
337	y	Cepa clásica (Winterfield 2512)	22
338	z	Cepa clásica (Winterfield 2512)	37
339	a	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
340	b	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
341	c	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
342	d	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
343	e	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
344	f	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
345	g	Cepa clásica (Winterfield 2512)	39
346	h	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
347	i	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
348	j	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
349	k	CEPA VACUNAL ATENUADA	-
350	l	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33

351	m	Cepa clásica (Winterfield 2512)	45
352	n	Cepa clásica (Winterfield 2512)	34
353	o	CEPA VACUNAL ATENUADA	29
354	p	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
355	g	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
356	r	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
357	s	Cepa clásica (Winterfield 2512)	40
358	t	Cepa clásica (Winterfield 2512)	41
359	u	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
360	v	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
361	w	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
362	x	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
363	y	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
364	z	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
365	a	Cepa clásica (Winterfield 2512)	31 Y 36
366	b	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
367	c	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
368	d	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
369	e	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
370	f	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
371	g	Cepa clásica (Winterfield 2512)	38
372	h	Cepa clásica (Winterfield 2512)	39
373	i	Cepa clásica (Winterfield 2512)	31
374	j	Cepa clásica (Winterfield 2512)	39
375	k	Cepa clásica (Winterfield 2512)	29
376	l	Cepa clásica (Winterfield 2512)	29
377	m	Cepa clásica (Winterfield 2512)	48
378	n	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
379	o	Cepa clásica (Winterfield 2512)	32
380	p	Cepa clásica (Winterfield 2512)	49
381	g	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
382	r	CEPA ATENUADA	44
383	s	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
384	t	CEPA POCO ATENUADA	34
385	u	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
386	v	Cepa clásica (Winterfield 2512)	34
387	w	CEPA atenuada	34
388	x	Cepa clásica (Winterfield 2512)	??
389	y	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
390	z	Cepa clásica (Winterfield 2512)	45
391	a	ATENUADA	32
392	b	ATENUADA	40
393	c	CEPA ATENUADA	40
394	d	Cepa clásica (Winterfield 2512)	29
395	e	Cepa clásica (Winterfield 2512)	39
396	f	ATENUADA	44
397	g	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
398	h	CEPA POCO ATENUADA	31
399	i	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
400	j	Cepa clásica (Winterfield 2512)	27
401	k	Cepa clásica (Winterfield 2512)	34
402	l	Cepa clásica (Winterfield 2512)	32-34
403	m	CEPA ATENUADA	30
404	n	CEPA ATENUADA	57
405	o	Cepa clásica (Winterfield 2512)	42
406	p	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
407	q	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
408	r	Cepa clásica (Winterfield 2512)	31
409	s	Cepa clásica (Winterfield 2512)	29
410	t	Cepa clásica (Winterfield 2512)	32-39
411	u	Cepa clásica (Winterfield 2512)	24
412	v	CEPAS ATENUADA	40
413	w	ATENUADA	-
414	x	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
415	y	CEPA ATENUADA	27
416	z	CEPA ATENUADA	41
417	a	Cepa clásica (Winterfield 2512)	47
418	b	CEPA ATENUADA	37
419	c	Cepa clásica (Winterfield 2512)	31
420	d	CEPA POCO ATENUADA	35

421	e	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
422	f	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
423	g	CEPA ATENUADA	42
424	h	CEPA ATENUADA	39
425	i	Cepa clásica (Winterfield 2512)	34
426	j	Cepa clásica (Winterfield 2512)	43
427	k	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
428	l	CEPA ATENUADA	36
429	m	CEPA POCO ATENUADA	31
430	n	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
431	o	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
432	p	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
433	q	Cepa clásica (Winterfield 2512)	37
434	r	Cepa clásica (Winterfield 2512)	24
435	s	Cepa clásica (Winterfield 2512)	21
436	t	CEPA POCO ATENUADA	44
437	u	CEPA ATENUADA	38
438	v	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
439	w	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
440	x	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
441	y	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
442	z	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
443	a	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
444	b	Cepa clásica (Winterfield 2512)	27
445	c	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
446	d	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
447	e	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
448	f	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
449	g	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
450	h	Cepa clásica (Winterfield 2512)	45
451	i	CEPA ATENUADA	32
452	j	Cepa clásica (Winterfield 2512)	31
453	k	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
454	l	Cepa clásica (Winterfield 2512)	31
455	m	Cepa clásica (Winterfield 2512)	32
456	n	CEPA ATENUADA	35
457	o	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
458	p	Cepa clásica (Winterfield 2512)	21
459	q	Cepa clásica (Winterfield 2512)	34
460	r	Cepa clásica (Winterfield 2512)	40
461	s	Cepa clásica (Winterfield 2512)	40
462	t	Cepa clásica (Winterfield 2512)	32
463	u	CEPA ATENUADA	-
464	v	CEPA POCO ATENUADA	-
465	w	CEPA ATENUADA	-
466	x	Cepa clásica (Winterfield 2512)	42
467	y	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
468	z	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
469	a	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
470	b	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
471	c	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
472	d	Cepa clásica (Winterfield 2512)	42
473	e	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
474	f	Cepa clásica (Winterfield 2512)	43
475	g	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
476	h	CEPA ATENUADA	-
477	i	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
478	j	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
479	k	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
480	l	Cepa clásica (Winterfield 2512)	37
481	m	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
482	n	CEPA ATENUADA	-
483	o	CEPA ATENUADA	35
484	p	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
485	q	CEPA ATENUADA	42
486	r	Cepa clásica (Winterfield 2512)	34
487	s	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
488	t	Cepa clásica (Winterfield 2512)	34
489	u	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
490	v	Cepa clásica (Winterfield 2512)	34

491	w	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
492	x	Cepa clásica (Winterfield 2512)	41
493	y	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
494	z	CEPA ATENUADA	34
495	a	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
496	b	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
497	c	CEPA ATENUADA	-
498	d	Cepa clásica (Winterfield 2512)	40
499	e	Cepa clásica (Winterfield 2512)	50
500	f	Cepa clásica (Winterfield 2512)	46
501	g	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
502	h	Cepa clásica (Winterfield 2512)	29
503	i	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
504	j	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
505	k	Cepa clásica (Winterfield 2512)	40
506	l	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
507	m	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
508	n	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
509	o	CEPA ATENUADA	26
510	p	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
511	q	Cepa clásica (Winterfield 2512)	34
512	r	Cepa clásica (Winterfield 2512)	41
513	s	Cepa clásica (Winterfield 2512)	41
514	t	Cepa clásica (Winterfield 2512)	34
515	u	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
516	v	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
517	w	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
518	x	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
519	y	Cepa clásica (Winterfield 2512)	27
520	z	CEPA ATENUADA	30
521	a	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
522	b	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
523	c	Cepa clásica (Winterfield 2512)	40
524	d	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
525	e	CEPA ATENUADA	37
526	f	Cepa clásica (Winterfield 2512)	37
527	g	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
528	h	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
529	i	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
530	j	Cepa clásica (Winterfield 2512)	34
531	k	Cepa clásica (Winterfield 2512)	34
532	l	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
533	m	Cepa clásica (Winterfield 2512)	43
534	n	Cepa clásica (Winterfield 2512)	43
535	o	Cepa clásica (Winterfield 2512)	47
536	p	Cepa clásica (Winterfield 2512)	45
537	q	CEPA ATENUADA	40
538	r	Cepa clásica (Winterfield 2512)	42
539	s	CEPA POCO ATENUADA	53
540	t	Cepa clásica (Winterfield 2512)	39
541	u	Cepa clásica (Winterfield 2512)	42
542	v	CEPA POCO ATENUADA	32
543	w	CEPA POCO ATENUADA	36
544	x	Cepa clásica (Winterfield 2512)	26
545	y	Cepa clásica (Winterfield 2512)	29
546	z	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
547	a	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
548	b	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
549	c	Cepa clásica (Winterfield 2512)	39
550	d	Cepa clásica (Winterfield 2512)	26
551	e	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
552	f	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
553	g	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
554	h	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
555	i	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
556	j	CEPA POCO ATENUADA	26
557	k	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
558	l	CEPA POCO ATENUADA	31
559	m	Cepa clásica (Winterfield 2512)	31
560	n	Cepa clásica (Winterfield 2512)	38

561	o	Cepa clásica (Winterfield 2512)	32
562	p	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
563	q	CEPA ATENUADA	43
564	r	Cepa clásica (Winterfield 2512)	43
565	s	CEPA POCO ATENUADA	46
566	t	CEPA ATENUADA	-
567	u	Cepa clásica (Winterfield 2512)	40
568	v	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
569	w	Cepa clásica (Winterfield 2512)	31
570	x	Cepa clásica (Winterfield 2512)	34
571	y	Cepa clásica (Winterfield 2512)	31
572	z	Cepa clásica (Winterfield 2512)	29
573	a	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
574	b	Cepa clásica (Winterfield 2512)	37
575	c	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
576	d	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
577	e	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
578	f	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
579	g	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
580	h	Cepa clásica (Winterfield 2512)	??
581	i	Cepa clásica (Winterfield 2512)	31
582	j	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
583	k	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
584	l	Cepa clásica (Winterfield 2512)	32
585	m	Cepa clásica (Winterfield 2512)	27
586	n	CEPA ATENUADA	33
587	o	CEPA ATENUADA	33
588	p	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
589	q	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
590	r	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
591	s	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
592	t	Cepa clásica (Winterfield 2512)	32
593	u	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
594	v	Cepa clásica (Winterfield 2512)	39
595	w	CEPA POCO ATENUADA	30
596	x	Cepa clásica (Winterfield 2512)	42
597	y	Cepa clásica (Winterfield 2512)	31
598	z	Cepa clásica (Winterfield 2512)	41-44
599	a	Cepa clásica (Winterfield 2512)	37
600	b	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
601	c	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
602	d	Cepa clásica (Winterfield 2512)	31
603	e	Cepa clásica (Winterfield 2512)	44
604	f	Cepa clásica (Winterfield 2512)	45
605	g	CEPA ATENUADA	37
606	h	CEPA ATENUADA	37
607	i	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
608	j	Cepa clásica (Winterfield 2512)	38
609	k	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
610	l	Cepa clásica (Winterfield 2512)	41
611	m	Cepa clásica (Winterfield 2512)	42
612	n	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
613	o	CEPA ATENUADA	41
614	p	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
615	q	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
616	r	Cepa clásica (Winterfield 2512)	29
617	s	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
618	t	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
619	u	Cepa clásica (Winterfield 2512)	33
620	v	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
621	w	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
622	x	Cepa clásica (Winterfield 2512)	38
623	y	CEPA ATENUADA	38
624	z	Cepa clásica (Winterfield 2512)	39-38
625	a	CEPA ATENUADA	40
626	b	Cepa clásica (Winterfield 2512)	34
627	c	Cepa clásica (Winterfield 2512)	37
628	d	Cepa clásica (Winterfield 2512)	35
629	e	Cepa clásica (Winterfield 2512)	40
630	f	Cepa clásica (Winterfield 2512)	37
631	g	Cepa clásica (Winterfield 2512)	28
632	h	Cepa clásica (Winterfield 2512)	29
633	i	Cepa clásica (Winterfield 2512)	41
634	j	Cepa clásica (Winterfield 2512)	41
635	k	Cepa clásica (Winterfield 2512)	46
636	l	Cepa clásica (Winterfield 2512)	30
637	m	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
638	n	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
639	o	Cepa clásica (Winterfield 2512)	-
640	p	Cepa clásica (Winterfield 2512)	32
641	q	CEPA ATENUADA	18
642	r	Cepa clásica (Winterfield 2512)	15
643	s	Cepa clásica (Winterfield 2512)	36
EDAD/PROMEDIO			35,28