



**INCORPORACIÓN DE TÉCNICAS
MOLECULARES Y BIOINFORMÁTICAS
EN AVICULTURA PARA LA
INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA
Y EL DISEÑO DE ESTRATEGIAS
DE CONTROL Y PREVENCIÓN DE
GUMBORO Y BRONQUITIS
INFECCIOSA**

ENERO 2019

SERIE
FPTA-INIA

74

INCORPORACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES Y BIOINFORMÁTICAS EN AVICULTURA PARA LA INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y EL DISEÑO DE ESTRATEGIAS DE CONTROL Y PREVENCIÓN DE GUMBORO Y BRONQUITIS INFECCIOSA

FPTA - 319

Responsable del proyecto:

Dr. Ruben Pérez

Institución ejecutora:

Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Uruguay

Equipo de trabajo:

Dra. Ana Marandino,
Mag. Gonzalo Tomás,
Dra. Yanina Panzera
Lic. Martín Hernández,
Dr. Diego Hernández,
Lic. Andres Milano,
Mag. Claudia Techera,
Lic. Sofía Grecco.

Título: Incorporación de técnicas moleculares y bioinformáticas en avicultura para la investigación epidemiológica y el diseño de estrategias de control y prevención de Gumboro y Bronquitis Infecciosa

Responsable técnico del proyecto: Dr. Ruben Pérez

Institución ejecutora: Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Uruguay

Equipo de trabajo:

Dra. Ana Marandino,
Mag. Gonzalo Tomás,
Dra. Yanina Panzera,
Lic. Martín Hernández,
Dr. Diego Hernández,
Lic. Andres Milano,
Lic. Claudia Techera,
Lic. Sofía Grecco.

Serie: FPTA N° 74

ISBN: 978-9974-38-414-9

© 2019, INIA

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología de INIA
Andes 1365, Piso 12. Montevideo, Uruguay
<http://www.inia.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Este libro no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

D.M.T.V., Ph.D. José Luis Repetto - Presidente

Ing. Agr., Mag. Mariana Hill - Vicepresidenta



Ing. Agr. Jaime Gomes de Freitas

Ing. Agr. Jorge Peñaricano



Ing. Agr. Pablo Gorriti

Ing. Agr. Alberto Bozzo



FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18° de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 4o/oo del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

EL FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos a ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

- a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.
- b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.
- c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos.

De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.

Índice general

RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	10
Epidemiología molecular de virus aviares en la industria avícola uruguaya	11
INTRODUCCIÓN	11
Sanidad Aviar	11
Virus de Gumboro	12
Virus de la Bronquitis Infecciosa	14
El diagnóstico y caracterización como herramientas de control	14
Antecedentes del grupo de investigación	15
OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
Objetivo General	16
Objetivos Específicos	16
ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	16
PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DEL VIRUS DE GUMBORO EN URUGUAY.....	16
Identificación y caracterización genética.....	16
Caracterización antigénica.....	21
Comparación con cepas vacunales	22
Desarrollo de una metodología de caracterización específica	22
Conclusiones.....	24
PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR EN URUGUAY.....	24
Identificación y caracterización genética	24
Caracterización antigénica	26
Comparación con cepas vacunales.....	27
Desarrollo de metodologías de caracterización específica.....	27
Metodologías de secuenciación masiva (deep sequencing)	29
Conclusiones	31
CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	33

Responsable del Proyecto: Dr. Ruben Pérez

Institución ejecutora: Facultad de Ciencias,
Universidad de la República. Uruguay

Equipo de trabajo: Dra. Ana Marandino, Mag.
Gonzalo Tomás, Dra. Yanina Panzera, Lic. Martín
Hernández, Dr. Diego Hernández, Lic. Andres
Milano, Mag. Claudia Techera, Lic. Sofia Grecco

INCORPORACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES Y BIOINFORMÁTICAS EN AVICULTURA PARA LA INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y EL DISEÑO DE ESTRATEGIAS DE CONTROL Y PREVENCIÓN DE GUMBORO Y BRONQUITIS INFECCIOSA

FPTA 319

Período de ejecución:

Marzo 2014 - Agosto 2017

RESUMEN

Los virus de Gumboro y Bronquitis infecciosa generan graves pérdidas en la industria avícola mundial. Ambos virus están presentes en Uruguay, por lo que es necesario conocer su estado de situación local y diseñar planes de control y prevención ajustados a la realidad nacional. Durante esta investigación se obtuvo información epidemiológica para el control de estos virus mediante el desarrollo y aplicación de herramientas de análisis (genéticas, serológicas y bioinformáticas). Para determinar el escenario epidemiológico actual, las muestras fueron analizadas con métodos moleculares (RT-PCR, secuenciación y PCR en Tiempo Real). La caracterización genética del virus de Gumboro indicó que las cepas uruguayas eran de un mismo linaje genético, que denominamos *distinct*, separado del resto de las cepas tradicionales. Los avances en la caracterización antigénica indican que no solo son un linaje genético sino que pueden considerarse una nueva cepa, con un estatus taxonómico similar a las tres cepas que se describen tradicionalmente para el virus (clásicas, variantes e hipervirulentas). Se desarrolló una metodología de PCR en Tiempo Real específica para la identificación y cuantificación de las cepas *distinct*. La identificación de estas cepas es relevante para la evolución del virus, pero sobre todo por su impacto sanitario. La alta frecuencia que han alcanzado en Uruguay (> 90%), y también

en Argentina, junto con su prevalencia a lo largo del tiempo, sugieren que el nivel de protección de las vacunas que se utilizan para controlarlas no es óptimo. Esto se sustenta también por el nivel de divergencia genética con las vacunas y por las diferencias antigénicas que detectamos. Al tratarse de cepas con bajo nivel de patogenicidad, es probable que hayan pasado desapercibidas, aunque inmunosupriman a las aves y las dejan expuestas a patógenos secundarios sobre los cuales se realiza el tratamiento. Para el virus de la bronquitis infecciosa pudimos establecer que en Uruguay circulan virus de dos linajes diferentes, aunque uno de ellos con bajísima frecuencia. Al describir estos linajes con secuencias génicas completas, y realizar estudios bioinformáticos con cepas de todo el mundo, establecimos que estos linajes son los más importantes que circulan en la industria avícola sudamericana. El análisis evolutivo indicó también que uno de los linajes era de origen euroasiático, mientras que el otro era exclusivamente sudamericano, aportando al entendimiento del origen y dispersión del virus a escala global. Debido a la amplia dispersión de los linajes, desarrollamos metodologías de PCR en Tiempo Real específicas para su detección. Se desarrollaron también metodologías de análisis con secuenciación masiva (*deep sequencing*), obteniendo los primeros genomas completos sudamericanos para bronquitis. Se estableció también que los linajes genéticos sudamericanos son diferentes antigénicamente, lo cual tiene impacto a nivel del control. Debido

a que no existen aún vacunas para estos linajes, se evidencia la necesidad de continuar investigando para desarrollar nuevas vacunas que incluyan en su formulación cepas locales. En esta dirección, estamos actualmente atenuando cepas de estos linajes que podrían incluirse en las futuras vacunas de Bronquitis. Los estudios realizados en ambos virus muestran claramente la importancia de analizar la variabilidad genética de las cepas locales para estandarizar metodologías de diagnóstico y caracterización adecuadas a la realidad epidemiológica de la región. En la actualidad estamos avanzando hacia un diagnóstico y caracterización global de los microorganismos que residen en determinado hospedero y su ambiente, lo que nos permitirá una rápida descripción del microbioma asociado a un brote determinado.

SUMMARY

Gumboro and avian infectious bronchitis are viral diseases that generate great losses in the global poultry industry. Knowledge of the current epidemiological status of these diseases is required to develop control and prevention plans suited for national circumstances. During this project, epidemiological information was obtained through the development and application of analysis tools (genetic, serological and bioinformatic) in order to control these diseases. To determine the current epidemiological scenario, samples were analyzed using molecular methods (RT-PCR, sequencing, and Real Time PCR). Genetic characterization of infectious bursal disease virus revealed that Uruguayan strains belonged to a genetic lineage, denoted *distinct*, which is separated from the rest of the traditional strains. Progress made on the antigenic characterization indicated that not only they are a genetic lineage, but also they can be considered as a new strain, with the same taxonomic status as the classic, variant and very virulent strains. We developed a quantitative PCR (qPCR) assay for the specific detection and quantification of the *distinct* strains. Identification of this strain is of crucial importance to understand the evolution of this virus and because of its

sanitary relevance. The high frequency reached in Uruguay (> 90 %) and Argentina, in addition to its prevalence through time, suggests that the level of protection obtained from current control vaccination schedule is not sufficient. This assumption is also supported by the level of genetic and antigenic divergence that exists between the vaccines and the distinct strain. As the distinct strain has low level of pathogenicity, they are likely to have gone unnoticed, although they immunosuppress the birds and leave them exposed to secondary pathogens on which the treatment is carried out. Regarding infectious bronchitis virus we could establish that two different lineages circulate in Uruguay, one of them with very low frequency. The genome characterization of these lineages and the bioinformatic studies with global strains determined that they are the most important lineages circulating in the South American poultry industry. The evolutionary analysis also indicated that one of the lineages had Euro-Asiatic origin, while the other was exclusively South American, contributing to the understanding of the origin and dispersion of the virus on a global scale. Owing to the wide dispersion of lineages, we developed specific Real Time PCR methodologies for their detection. A high-throughput sequencing method was also developed, obtaining the first complete South American genomes for bronchitis virus. We established that the South American genetic lineages have antigenic differences, which has an impact on its control. Because there are still no vaccines against these lineages, there is a need for continuous research to develop new vaccines that include local strains in their formulation. With this aim, we are currently attenuating strains of these lineages that could be included in future Bronchitis vaccines. The studies carried out on both viruses clearly show the importance of analyzing the genetic variability of local strains to update diagnostic and characterization methodologies appropriate to the epidemiological context of the region. Currently, we are making progress towards the diagnosis and complete characterization of the microorganisms that exist in a given host and its environment, which will allow us a quick description of the microbiome associated with a specific outbreak.

Epidemiología molecular de virus aviarios en la industria avícola uruguaya.

Autores: Ana Marandino*, Gonzalo Tomás*, Yanina Panzera, Martín Hernández, Diego Hernández, Claudia Techera, Andrés Milano, Paula Perbolianachis, Sofía Grecco y Ruben Pérez**.

*Ambos autores contribuyeron de igual forma a este trabajo.

**Autor de correspondencia. E-mail: rperez@fcien.edu.uy

INTRODUCCIÓN

Desde mediados del siglo pasado la producción mundial de proteína de origen animal para consumo humano se ha acelerado notoriamente, en particular las carnes provenientes de especies de ciclo productivo corto como cerdos y aves. De acuerdo al informe incluido en la edición n° 55 del Statistical Yearbook-2010 elaborado por el departamento de estadísticas de la FAO (<http://unstats.un.org/unsd/syb/default.htm>), en la primer década del 2000 la producción de carne de ave experimentó un incremento muy superior al resto de las carnes, aumentando de 37,19 % en este período respecto a un 17,67 % de la de cerdo, y un 10,83 % de la carne vacuna. El liderazgo en el comercio mundial alcanzado por la industria avícola se explica esencialmente por la creciente demanda de sus productos y el poderoso impulso productivo de esta cadena de valor (USDA, Informe Aves de Corral 2011). El desarrollo y la transferencia de tecnologías de producción, faena y elaboración han mejorado la inocuidad y eficiencia de los productos avícolas, satisfaciendo las exigencias de la demanda y estimulando el ensamblaje de unidades productivas a gran escala.

El continente Americano ha experimentado un importante crecimiento en la producción de aves en los últimos años. Cerca del 44 % de la producción mundial se centra en solo siete países de América que producen 38 millones de toneladas de carne de ave al año. El cono sur, formado por Brasil, Argentina, y Uruguay, representa el 33 % de esa producción, siendo Brasil el mayor exportador mundial de carne de pollo de los últimos años. El crecimiento de la industria avícola en los países sudamericanos se debe principalmente a los altos rendimientos de su producción agrícola que los suple de materias primas de excelente calidad a

bajo costo, y a una mayor exportación por el gran incremento de la demanda mundial. Para enfrentar el constante crecimiento en la producción, la industria ha intensificado su incorporación de tecnología y promovido una integración vertical eficiente. De particular importancia ha sido el mejoramiento continuo de los sistemas de vigilancia sanitaria que permite mantener el buen estatus sanitario que ostentan varios países sudamericanos.

En años recientes, Uruguay presentó un incremento en la producción avícola que acompaña el desarrollo de la región. De acuerdo a datos brindados por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), a través de la Oficina de Programación y Política Agropecuaria (OPYPA) en su informe del Anuario 2012, la industria percibió un crecimiento de producción de casi 30 % en los últimos años (Errea, 2012). Aunque existe exportación, el mercado interno aún absorbe más del 80 % de la producción nacional. Este mercado interno continúa incrementándose y presenta un amplio margen de crecimiento potencial si se comparan los valores de consumo que se registran en los países vecinos; el consumo per cápita de pollo en Argentina es de 34.4 kg/habitante/año, en Brasil de 45,40 kg/habitante/año y en Uruguay de tan solo 22.6 kg/habitante/año.

El crecimiento de la producción avícola uruguaya a través del aumento gradual en la colocación de sus productos en el mercado externo y por un estímulo en el consumo del mercado interno, sugiere que esta industria presenta un potencial de desarrollo que se debe acompañar con organización e incorporación tecnológica en el sector para aprovechar eficientemente las oportunidades que se presenten.

Sanidad aviar

Mantener y mejorar la competitividad de la cadena de producción avícola es prioritario para continuar ofreciendo al mercado interno una fuente de proteína barata y de alta calidad, sustituta natural de la carne vacuna que cada vez presenta más frentes de exportación. Agregar eficiencia a la cadena productiva también es importante para continuar desarrollando el perfil exportador de la industria avícola. Para acceder a mercados internacionales no se deben descuidar factores excluyentes relacionados a la competitividad de la cadena productiva y al sistema de reglamentaciones internacionales.

El aspecto sanitario es considerado uno de los puntos de mayor impacto para la avicultura ya que incide sobre los parámetros zootécnicos y puede convertirse en un fundamento de restricciones comerciales en el mercado internacional. Basta con ver cómo enfermedades zoonóticas causan distorsiones económicas y sociales a escala global. La epizootia de Influenza Aviar Altamente Patógena en el Sur de Asia, África y Europa, es un claro ejemplo de cómo un compromiso sanitario genera consecuencias directas en la economía mundial, especialmente por sus derivaciones en la salud pública.

Además de los problemas sanitarios que generan restricciones comerciales inmediatas, como el de Influenza Aviar o la enfermedad de Newcastle, existen dolencias que provocan anualmente enormes pérdidas económicas. Enfermedades que están presentes persistentemente en la mayoría de los lugares del mundo en donde se practica la cría intensiva de aves, que no afectan la salud humana pero sí golpean constante y gravemente la productividad y economía de la industria avícola, son sin duda el mayor problema de la cadena de producción aviar (Fig. 1). Esto fue expresado en la 63ra. Sesión General de la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), donde las enfermedades de Gumboro (IBD) y Bronquitis Infecciosa (IB) fueron declaradas como dos de las afecciones más problemáticas en la avicultura industrial (Etteradossi 1995). Los fundamentos principales de esta declaratoria se basan en que ambas enfermedades, una inmunodepresora (IBD) y otra respiratoria (IB), tienen distribución mundial y requieren un control permanente mediante el diseño de planes específicos para las cepas y variantes locales. Las pérdidas ocasionadas por estas enfermedades deben minimizarse en los costos productivos, siendo su control una oportunidad para incorporar ventajas comparativas en la producción nacional. De acuerdo a su epidemiología, ambas enfermedades provocan sus mayores efectos negativos aproximadamente a partir de la mitad del ciclo productivo, cuando los costos incorporados al producto han llegado a ser muy significativos. Detectar e identificar rápidamente al agente infeccioso permite generar un plan de control ajustado a sus características genotípicas y antigénicas, proporcionando un pronto alivio económico al productor y volviendo más competitiva a la industria.

El conocimiento del estado de situación local de ambas enfermedades, mediante el desarrollo e

implementación de metodologías que permitan la identificación y caracterización integral de los virus que la generan, no solo permite diseñar planes de control y prevención ajustados a la realidad nacional, sino también brindar información sobre el estatus sanitario del país. En la actualidad los centros de vigilancia sanitaria del mundo como la OIE son muy rigurosos exigiendo metodologías de detección y caracterización de patógenos con el uso de tecnologías sensibles, rápidas, seguras, y estandarizadas. De esta manera se garantiza la legitimidad a la hora de reportar el brote de una enfermedad, y se conoce mejor su epidemiología, estableciendo una descripción lo más completa posible del patógeno responsable.



Figura 1. Industria avícola. La superpoblación de aves está asociada al incremento y prevalencia de diferentes patógenos.

Virus de Gumboro

El virus de Gumboro o de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (IBDV) es un virus desnudo del género *Avibirnavirus* de la familia *Birnaviridae* que presenta como blanco principal el tejido linfóide, especialmente la bursa de Fabricius. Es allí donde el virus se replica y destruye los linfocitos B inmaduros provocando estados de inmunodepresión e inmunosupresión en las aves (Hirai *et al.*, 1981). El genoma viral posee dos segmentos de RNA doble hebra. El segmento genómico A (3,3 Kb) codifica la proteína no estructural VP5, y una poliproteína que genera la proteína de cápside VP2 (que contiene los principales epítopes generadores de anticuerpos neutralizantes), la proteasa viral VP4, y la proteína interna de la cápside VP3. El segmento genómico B (2,9 Kb) codifica la RNA polimerasa RNA dependiente VP1.

Las cepas de IBDV suelen clasificarse en clásicas (cIBDV), variantes (vaIBDV), e hipervirulentas (vvIBDV). Las cepas cIBDV y vaIBDV generalmente provocan cuadros sub-clínicos de inmunodepresión en los que la enfermedad difícilmente se manifiesta pero permite la entrada de patógenos oportunistas que provocan su propio cuadro infeccioso. Por esta razón es difícil establecer su presencia por medio de diagnóstico clínico ya que generalmente se camuflan bajo síntomas de otra enfermedad. Las pérdidas que causan estas cepas son importantes pero difícil de cuantificar, dado que influyen constantemente en los parámetros zootécnicos durante mucho tiempo sin ser detectadas hasta que no se realizan los análisis específicos. Las cepas vvIBDV causan graves estados de inmunosupresión, y frecuentemente inmunosupresión, con tasas de mortalidad por encima del 20 % y altos niveles de morbilidad en lotes de aves jóvenes. La velocidad de detección e identificación de estas cepas es crítica para evitar los daños productivos que generan. Desde su emergencia en 1987 han sido motivo de gran preocupación para la industria, causando pérdidas millonarias a través de su rápida dispersión mundial (van den Berg *et al.*, 1991).

Determinar el tipo de cepa asociada a un brote puede ser complejo ya que existen diferentes criterios (patogénicos, antigénicos y genéticos) para su caracterización (van den Berg *et al.*, 2004). El criterio patogénico es poco utilizado porque, además de requerir análisis muy laboriosos y costosos, la patogenicidad es un carácter multifactorial que complica la interpretación de los resultados. La clasificación antigénica se realiza principalmente a través de ensayos de antígeno-captura enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA de captura de antígenos o AC-ELISA) utilizando diferentes paneles de anticuerpos monoclonales (Eterradossi *et al.*, 1997; Fahey *et al.*, 1991; Snyder *et al.*, 1992). Según la reacción de los virus con los diferentes anticuerpos se logra una clasificación en grupos antigénicos, los cuales se corresponden con cepas de referencia clásicas, variantes e hipervirulentas. Aunque estas metodologías se siguen utilizando, hay una clara tendencia hacia la utilización de criterios genéticos para la clasificación de IBDV. Las metodologías genéticas suelen ser rápidas, sensibles y fáciles de estandarizar. Además, brindan información de secuencias que permite analizar la epidemiología y evolución de los patógenos. La clasificación genética se realiza generalmente a través de la amplificación por RT-PCR (reacción en cadena

de la polimerasa precedida de retrotranscripción) de la región hipervariable de VP2 y su posterior secuenciación y análisis filogenéticos para establecer las relaciones de parentesco entre las diferentes cepas o variantes aisladas en el mundo. Sin embargo, una clasificación genética no necesariamente guarda relación con las características serológicas o patológicas de una cepa. Por esta razón, ante una cepa que muestre características genéticas singulares es aconsejable realizar estudios serológicos o patogénicos para su adecuada caracterización.

La clasificación se vuelve más compleja aún si consideramos que a mediados de la pasada década se realizó la descripción de virus de campo con reordenamiento de los segmentos genómicos A y B entre cepas hipervirulentas y clásicas (Le Nouën *et al.*, 2006) e incluso entre cepas hipervirulentas y cepas vacunales. En esta nueva forma de virus de Gumboro se ha reportado una mezcla entre caracteres moleculares, estructurales y funcionales, producto de la combinación de los segmentos de las cepas involucradas.

Debido a la particularidad de los cambios de caracteres antigénicos y patogénicos de IBDV, el diagnóstico representa un problema en el control de la enfermedad. Para el control de IBDV se han desarrollado vacunas inactivadas y atenuadas. Las primeras son administradas a los reproductores para incrementar la inmunidad pasiva en los pollitos, mientras que las vacunas atenuadas, además de aplicarla en reproductores, se administran a los pollitos para inducir y perpetuar protección luego de la caída de los anticuerpos maternos. Las cepas clásicas e hipervirulentas se controlan con el mismo tipo de vacuna, hechas a partir de virus semilla de cepa clásica. Por otro lado las cepas variantes, al ser antigénicamente muy diferentes, son controladas con vacunas realizadas a partir de virus semilla de cepa variante. Para mejorar la aplicación y el manejo de las vacunas en el campo, en los últimos años se han desarrollado biológicos de alta tecnología, como vacunas recombinantes y vacunas de complejo antígeno-anticuerpo (Muller *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar del mejoramiento en el diseño y efectividad de las vacunas, la presencia de IBDV continúa siendo elevada en las granjas de todo el mundo. La persistencia de IBDV puede deberse a muchas causas, tales como la resistencia del virus, un control deficiente o emergencia de variantes con nuevas propiedades biológicas.

Virus de la Bronquitis Infecciosa

El virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV) es un miembro del género Coronavirus, familia Coronaviridae. IBV posee un genoma de RNA simple hebra, de polaridad positiva y 27,6 kb de longitud. Este genoma codifica para cuatro proteínas estructurales y 15 proteínas no estructurales involucradas en la replicación y transcripción de los genes virales. La espícula de superficie del virus se halla constituida por dos polipéptidos, S1 y S2, que se originan a partir de un mismo precursor proteico codificado por el gen S. La fracción S1 es responsable de la adsorción viral y constituye el principal antígeno del virus; la fracción S2 funciona como anclaje de la proteína a la envoltura viral y produce la fusión de membranas virus/célula (Godet *et al.*, 1994).

El órgano blanco primario de IBV es el tracto respiratorio, en donde se replica provocando elevados índices de mortalidad y morbilidad. Al igual que en el virus de Gumboro, la infección por IBV se acompaña frecuentemente con infecciones secundarias, además de presentar una manifestación clínica similar al de otras enfermedades respiratorias, generando confusión cuando se realiza un diagnóstico clínico.

IBV se caracteriza por una elevada capacidad de cambio que radica en su alta tasa de mutación y recombinación de su genoma. Esto ha generado decenas de variantes genéticas y antigénicas que se distribuyen por todo el mundo. Los virus de IBV pueden clasificarse en protectotipos, serotipos y genotipos. La clasificación en protectotipos mide la respuesta inmune completa del ave contra una cepa de IBV y proporciona una información directa y precisa de la protección cruzada existente entre dos variantes virales. Esta clasificación establece la eficacia de una vacuna, o combinaciones de éstas, frente a una variante viral, pero es un método de clasificación laborioso, costoso y que requiere una infraestructura importante. La clasificación en serotipos se realiza mediante ensayos de virus neutralización en huevos embrionados o en cultivos celulares. Se considera que dos variantes de IBV (A y B) son del mismo serotipo cuando los títulos neutralizantes heterólogos (antisuero A con virus B, y antisuero B con virus A) difieren al menos 20 veces de los títulos homólogos (antisuero A con virus, antisuero B con virus B) en ambas direcciones (Hesselink, 1991). La agrupación de las variantes en genotipos se basa en la caracterización total o

parcial del genoma de IBV. La metodología más utilizada y que brinda información más directa es la secuenciación, pero también se realizan metodología de caracterización indirectas del genoma basadas en cortes con enzimas de restricción (polimorfismos de restricción o RFLP) y PCR en Tiempo Real. La genotipificación es actualmente la clasificación más utilizada y suele realizarse mediante el análisis de la región codificante de S1, la región más variable del genoma por codificar para los principales sitios antigénicos del virión.

La gran cantidad de variantes antigénicas y las diferentes manifestaciones de las infecciones por Bronquitis Infecciosa representan un problema continuo en el control de la enfermedad. En la década del 50 se comenzaron a utilizar las primeras vacunas a partir de cepas de campo atenuadas; 20 años después se desarrollaron vacunas inactivadas. A pesar de la vacunación sistemática, es muy común que surjan brotes de la enfermedad en lotes de aves correctamente vacunados, debido probablemente a que los aislados de campo difieren antigénicamente de los serotipos vacunales, y a que la mayoría de las vacunas no proporcionan inmunidad cruzada (Gelb *et al.*, 1991).

El diagnóstico y caracterización como herramientas de control

La identificación y caracterización de los virus de campo resulta imprescindible para comprender la epidemiología y establecer medidas de control idóneas y específicas, adaptadas al panorama epidemiológico. La elevada plasticidad genómica de los virus que genera variantes genéticas con características antigénicas y patogénicas particulares y variadas, representa un problema continuo en el control de las enfermedades virales. El desarrollo y la aplicación de metodologías que permitan seleccionar un plan de vacunación adecuado a las características antigénicas de los virus de campo locales son fundamentales para el control.

La identificación genética mediante PCR es la herramienta más utilizada por los centros mundiales de vigilancia sanitaria. Dicha herramienta permite la detección del genoma del agente patógeno y su posterior caracterización. Aunque la técnica de PCR siempre implica una serie de ciclos que permiten la amplificación de una secuencia de DNA específica (delimitada por un juego de cebadores

u oligonucleótidos), el método de detección de la amplificación varía dependiente de que sea a Tiempo Final o Real. En la PCR a Tiempo Final, el amplicón se visualiza en un soporte sólido (geles de agarosa o poliacrilamida) y su caracterización debe realizarse posteriormente, ya sea por secuenciación automática o por procedimientos indirectos, tales como un RFLP. En la PCR a Tiempo Real se registra el progreso de amplificación en tiempo real (en cada ciclo de amplificación) para registrar el incremento exponencial de las moléculas de DNA. La detección del producto amplificado se realiza mediante agentes fluorescentes intercalantes o a través del uso de sondas específicas marcadas con fluoróforos. El uso de una sonda le agrega a la técnica una mayor especificidad que la PCR en Tiempo Final, ya que se diseñan para hibridar únicamente con la secuencia que se desee amplificar. Existen distintos tipos de sondas específicas, siendo la más utilizada las sondas de hidrólisis (conocidas como sondas TaqMan). Durante una reacción de PCR, la fluorescencia es registrada por el equipo y la cantidad de fluorescencia emitida es una medida de la cantidad de amplicón generado. Esto hace que la PCR en Tiempo Real permita, además de la identificación y caracterización simultánea, la cuantificación del número de moléculas de un genoma viral presente en una muestra biológica.

Antecedentes del grupo de investigación

Desde principios del 2000, el Laboratorio de la Sección Genética Evolutiva de Facultad de Ciencias mantiene un programa general de investigación vinculado a Sanidad Animal que incluye patógenos caninos (parvovirus y Distemper), bovinos (*Campylobacter fetus*) y aviares (Gumboro, Bronquitis, Anemia, etc.). Mediante el uso de técnicas moleculares se realiza investigación básica y aplicada para entender la epidemiología, evolución y capacidades funcionales de los patógenos seleccionados. De esta manera, colaboramos con el desarrollo de planes de control de patógenos que afectan la sanidad animal y tienen impacto en el sector productivo.

Los antecedentes del grupo de investigación en relación a las enfermedades aviares comienzan a generarse en el año 2004 cuando se presentó un problema sanitario que estaba afectando una empresa del sector avícola. Para colaborar en el estudio de este caso, se efectuaron los

primeros estudios moleculares del virus de la enfermedad de Gumboro (IBDV) en Uruguay, adaptando una metodología de PCR en Tiempo Final previamente publicada. Los resultados obtenidos tuvieron una aplicación inmediata para controlar el brote de Gumboro que fuera identificado como una cepa de alta patogenia. Se realizaron los análisis descriptivos de regiones específicas del genoma de IBDV y se propusieron marcadores moleculares asociados a las cepas de alta patogenia (Hernández *et al.*, 2006). A partir de dicho momento comenzaron a desarrollarse estudios de caracterización genética de otras regiones genómicas de IBDV, análisis comparativos de secuencias, y estudios de relaciones evolutivas. Los resultados de esta etapa de la investigación revelaron que los IBDV hipervirulentos uruguayos presentan ciertas particularidades en su genoma. En el segmento genómico A existe un acortamiento del marco de lectura del gen que codifica para una proteína reguladora (VP5) que interviene en el ciclo replicativo del virus. Los estudios realizados también revelaron que dicho gen se encuentra evolucionando bajo un complejo sistema de presiones selectivas, producto de su superposición con un segundo marco de lectura que codifica para las proteínas estructurales. Además se agregó nueva evidencia a la propuesta de que este gen se habría originado posteriormente en el tiempo respecto al resto de los genes del virus, utilizando un mecanismo de sobreescritura genética (*overprinting*). Los detalles de los análisis realizados y los principales avances obtenidos de este estudio se describen en Hernández *et al.* (2010).

Los resultados obtenidos con IBDV representaron un importante avance para nuestro grupo de investigación en el abordaje de aspectos básicos de la evolución viral, aspecto fundamental para identificar regiones genómicas y marcadores genéticos de utilidad para el diseño de metodologías de diagnóstico y caracterización. A partir de la experiencia adquirida, nos propusimos avanzar en el campo de la biotecnología mediante el desarrollo de metodologías de diagnóstico molecular actualizadas, integrando conceptos epidemiológicos y evolutivos que incluyeran los últimos avances en el conocimiento de la enfermedad. Para ello implementamos y desarrollamos nuevas metodologías de diagnóstico, en una primera instancia con PCR en Tiempo Final. Para el virus de Gumboro se desarrolló un método de un solo ensayo que permite discriminar los vvIBDV del resto de las cepas, y además, por tratarse de

un virus con genoma bisegmentado, permite detectar casos con reordenamiento genómico (Hernández *et al.*, 2011). Las investigaciones con Bronquitis Infecciosa tuvieron un avance similar. Se estandarizó una prueba que tuvo en cuenta la alta frecuencia de mutación y capacidad de recombinación genómica entre variantes de IBV. Posteriormente y por primera vez en el país, se comenzaron a desarrollar metodologías de PCR en Tiempo Real para estos virus. Los métodos fueron cuidadosamente diseñados tomando en cuenta características particulares del proceso evolutivo de ambos virus e integrando las más recientes tecnologías disponibles. Para IBDV se diseñó un ensayo que detecta y discrimina simultáneamente cepas de baja patogenicidad de los vvIBDV (Tomás *et al.*, 2012). Asimismo se estandarizó una metodología diagnóstica para IBV que detecta todas las variantes existentes.

Gracias en buena parte al desarrollo de estas metodologías fue posible la identificación de casos positivos para ambas enfermedades y hoy en día contamos con diversas cepas virales de Gumboro y Bronquitis, pudiendo analizar los cambios genómicos que han ocurrido a lo largo del tiempo. Para ambos virus hemos observado una importante variabilidad genética con la circulación de variantes particulares en Uruguay, lo que presenta interés sanitario y evolutivo, no solo para el país, sino también para la región y el mundo. Estos resultados epidemiológicos sustentan profundizar en el relevamiento de muestras de campo, así como de investigar con mayor detalle los virus detectados, en virtud del impacto que ambas enfermedades estarían teniendo en la producción nacional (Hernández *et al.*, 2012). Para cumplir con esta tarea nos hemos fijado los siguientes objetivos generales y específicos

OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Mejorar la sanidad aviar local y regional mediante la incorporación de tecnología que permita optimizar la prevención y el control de las enfermedades de Gumboro y Bronquitis Infecciosa. Para esto se obtuvo información epidemiológica actualizada mediante el desarrollo y aplicación de diferentes herramientas de análisis (genéticas, serológicas y bioinformáticas) de los virus implicados (IBDV e IBV).

Objetivos específicos

Brindar un panorama epidemiológico de la circulación de los virus de Gumboro y Bronquitis en Uruguay.

Caracterizar los virus desde el punto de vista genético y serológico.

Desarrollar nuevas herramientas de identificación y caracterización genética adaptadas al panorama epidemiológico nacional.

Evaluar la similitud de las cepas circulantes con las principales vacunas empleadas en Uruguay para colaborar en el control de los virus.

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

La estrategia desarrollada para cumplir con los objetivos de la investigación consistió en aplicar las metodologías genéticas previamente desarrolladas por el grupo para generar una base actualizada del estado de situación epidemiológica de IBDV e IBV en la producción nacional. En base a este panorama epidemiológico se diseñaron nuevas técnicas de detección y caracterización genética que aportaron más información sobre las variantes circulantes. Paralelamente se estandarizaron metodologías de caracterización antigénica mediante la puesta a punto de ensayos serológicos. Finalmente se realizó un análisis bioinformático de los datos de epidemiología molecular para obtener información orientada a la selección de vacunas y el diseño de planes de control.

PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DEL VIRUS DE GUMBORO EN URUGUAY

Identificación y caracterización genética

Los reportes oficiales para la Enfermedad de Gumboro realizados por la OIE sugieren que la enfermedad está presente en nuestro país desde 1996. En el año 2004, describimos y caracterizamos genéticamente cepas hipervirulentas de IBDV en Uruguay (Hernández *et al.*, 2006). Este brote fue el único de cepas hipervirulentas que hemos detectado, ya que a partir de esa fecha se han identificados solamente casos de IBDV no-hipervirulentos (Tabla 1). Este relevamiento inicial se realiza utilizando una metodología de PCR en

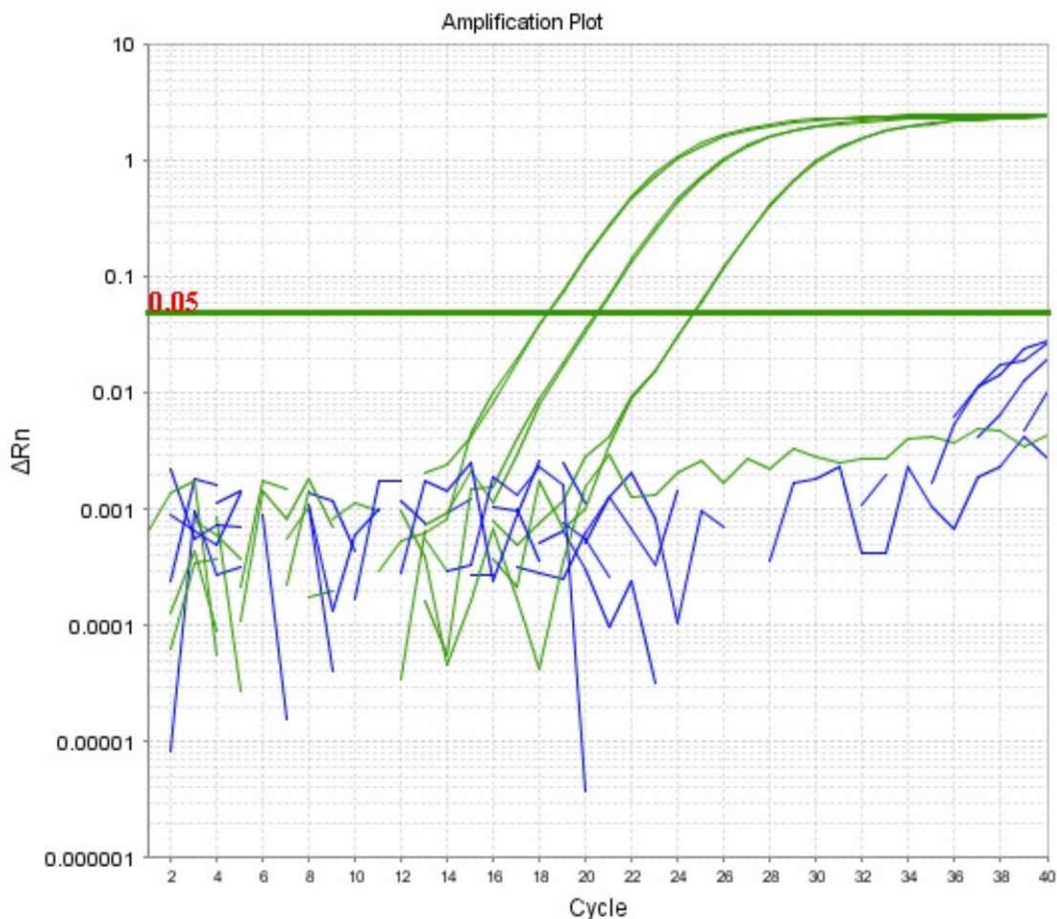


Figura 2. Gráfico de amplificación correspondiente a la metodología de PCR en Tiempo Real de discriminación alélica para IBDV. Las tres muestras analizadas presentan amplificación correspondiente a la sonda específica de las cepas no-hipervirulentas (señal en verde) por encima del umbral de fluorescencia establecido de 0,05, mientras que no muestran fluorescencia correspondiente a las cepas hipervirulentas (señal en azul).

Tiempo Real desarrollada en el laboratorio (Tomás *et al.*, 2012) que diferencia cepas hipervirulentas de no-hipervirulentas, pero no diferencia a qué tipo de cepa no-hipervirulenta pertenece (clásicas o variantes). La metodología de PCR en Tiempo Real utilizada consiste básicamente en amplificar una región del virus y detectar un cambio nucleotídico (SNP) que diferencia las cepas hipervirulentas del resto. La detección se realiza por medio de dos

sondas de hidrólisis Taqman-MGB (Taqman-Minor Groove Binding) muy específicas que se unen únicamente a secuencias con homología completa. Como las sondas están marcadas con diferente fluorocromo es posible identificar la variante presente en la muestra mediante la detección del tipo de fluorescencia que se produce cuando la sonda se une a su secuencia complementaria y se hidroliza (Fig. 2).

En el período 2012-2017 se analizaron más de 80 muestras, detectando la presencia de IBDV en más del 24 % de las mismas (Tabla 1).

La mayoría de las cepas no-hipervirulentas que detectamos en Uruguay eran genéticamente

divergentes de las cepas clásicas (cIBDV), variantes (vaIBDV) e hipervirulentas (vvIBDV) descritas en otros países. El análisis filogenético reveló que las cepas uruguayas constituyen un linaje genético particular, tanto a nivel del segmento A como del segmento B (Fig. 3 y 4).

Tabla 1. Muestras uruguayas positivas para IBDV y/o IBV por PCR en Tiempo Real. Se detalla el nombre de la muestra, el año en que fue colectada, el tipo de ave (P- parrilleros, R- reproductoras, Pon- ponedoras), la edad del animal y la presencia de IBDV o IBV.

Nº	Año	Tipo	Edad	Virus
28-1	2013	P	49 días	IBDV
29-1	2013	P	40 días	IBDV
14-1	2014	P	28 días	IBV, IBDV
14-3	2014	P	42 días	IBV, IBDV
14-5	2014	P	47 días	IBV
17-1	2014	P	45 días	IBV, IBDV
17-2	2014	P	24 días	IBV
22-1	2014	P	56 días	IBDV
22-2	2014	P	27 días	IBV, IBDV
36-1	2014	P	Nd	IBV, IBDV
36-2	2014	P	Nd	IBV
38-2	2014	P	35 días	IBV
43-1	2014	R	27 sem	IBV
44-1	2014	R	28 sem	IBV
17-2	2015	P	42 días	IBV, IBDV
29-1	2015	R	Nd	IBV
36-1	2015	P	Nd	IBV, IBDV
45-2	2015	Pon	Nd	IBV
07-1	2016	P	49 días	IBV, IBDV
10-1	2016	Pon	42 sem	IBV
13-1	2016	Pon	45 sem	IBV
13-2	2016	P	25 días	IBDV
13-3	2016	P	33 días	IBDV
13-4	2016	P	41 días	IBDV
13-5	2016	P	48 días	IBDV
18-1	2016	P	41 días	IBV, IBDV
22-1	2016	Pon	9 sem	IBV
46-1	2016	Pon	Nd	IBV
47-3	2016	P	27 días	IBDV
18-1	2017	Pon	Nd	IBV
18-2	2017	Pon	80 sem	IBV
20-2	2017	R	Nd	IBV
20-3	2017	Pon	9 sem	IBV, IBDV

Nd- No hay datos.

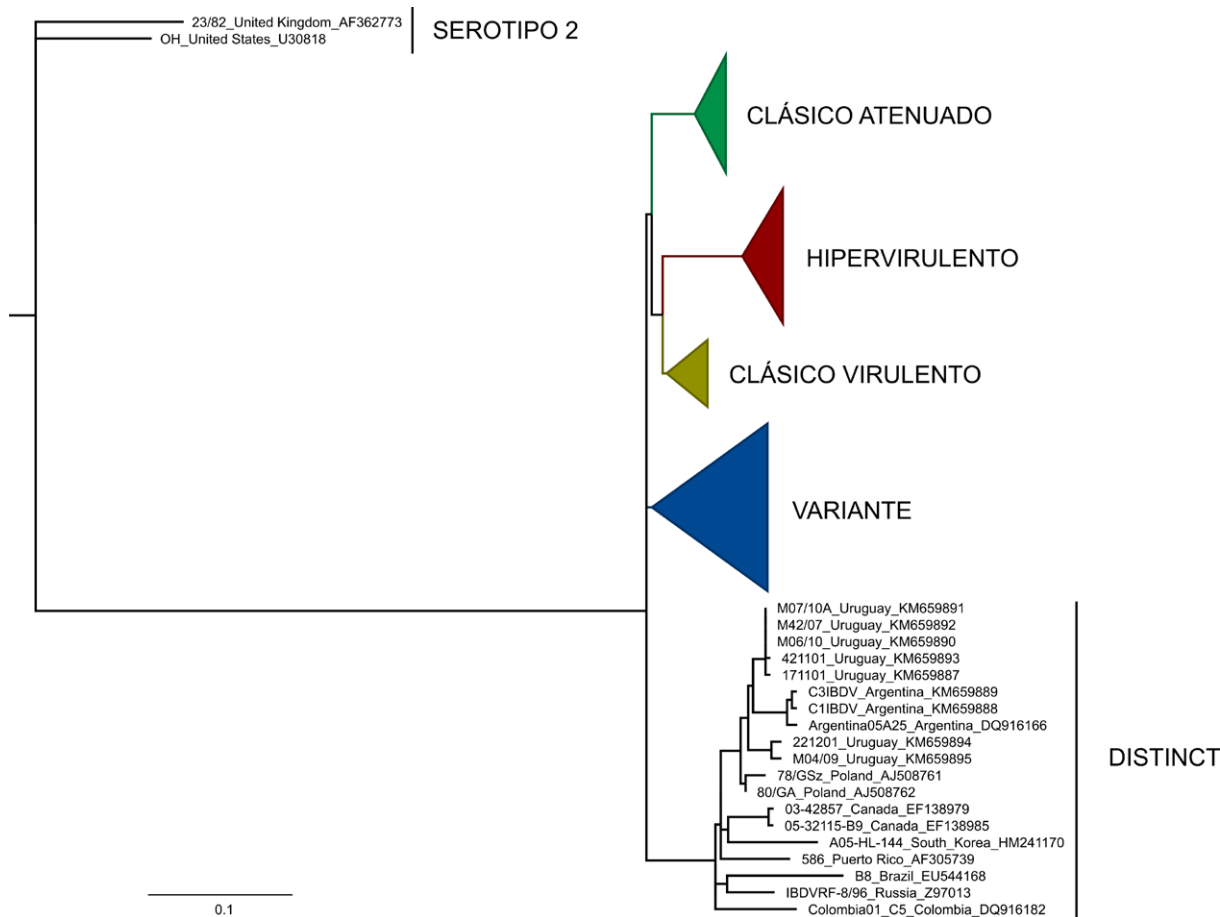


Figura 3. Árbol filogenético de las cepas de Gumboro construido utilizando la región hipervariable de VP2. Se observa como las cepas uruguayas forman parte de un linaje diferente que incluye también cepas de otras partes del mundo (*distinct*). Cepas pertenecientes al serotipo 2 (no patogénico) son utilizadas como grupo externo.

La comparación de sus secuencias con otras depositadas en el GenBank sugiere que estas cepas están también distribuidas en otros países de Europa, Asia y América (Fig. 5). A pesar de que hay reportes de cepas similares a las nuestras desde ya hace más de 30 años, nunca se las había

descrito como un linaje diferente, sino que se las consideraba variantes locales raras (Domanska *et al.*, 2004; Ikuta *et al.*, 2001; Jackwood & Sommer-Wagner, 2007; Kwon *et al.*, 2001; Ojkic *et al.*, 2007; Remorini *et al.*, 2006).

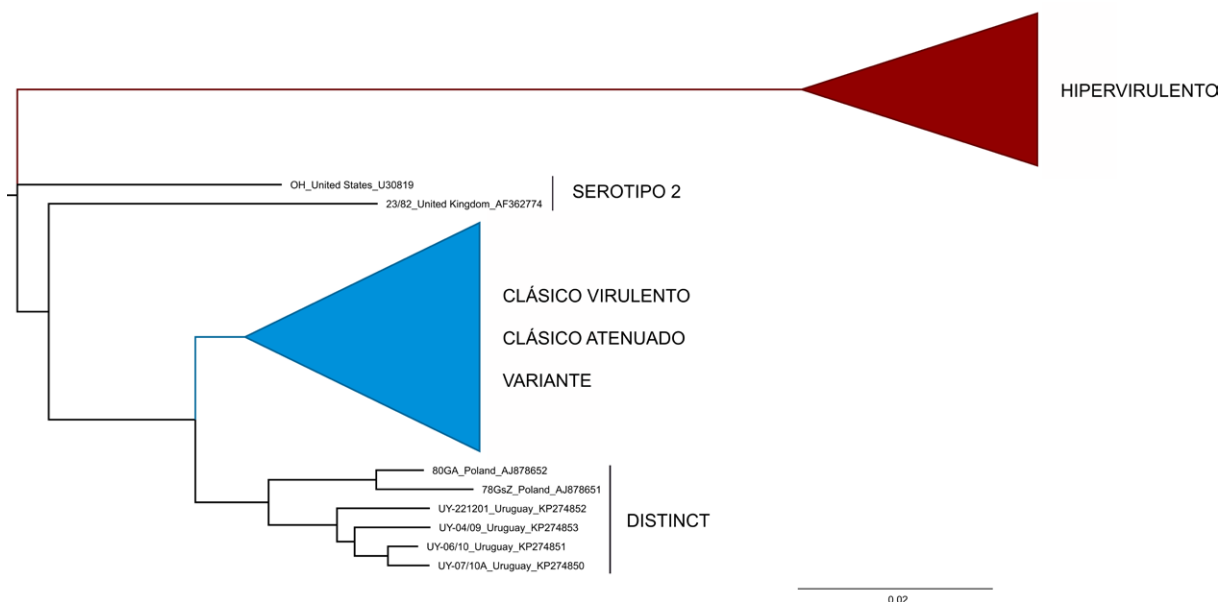


Figura 4. Árbol filogenético de las cepas de Gumboro construido utilizando una región parcial de la polimerasa VP1. Se observa como las cepas uruguayas junto con cepas húngaras forman un linaje aparte del resto de las cepas (*distinct*).

Basados en el análisis filogenético comparativo de las cepas uruguayas y en su nivel de variabilidad, establecimos que formaban parte de un linaje genético de distribución mundial, por lo que las denominamos cepas *distinct* (distintas) o divergentes (dIBDV).



Figura 5. Mapa político mundial en el que se indican con rojo aquellos países donde se ha encontrado al menos un aislado de IBDV perteneciente al linaje *distinct*.

Los análisis de secuencias nucleotídicas y de amino ácidos determinaron una composición particular en su VP2, incluyendo una variación en la fórmula de marcadores aminoacídicos de diferenciación (Fig. 6). Estos resultados se publicaron en Avian Pathology (Hernández *et al.*, 2015), revista de referencia para la avicultura mundial. El interés sobre nuestras cepas divergentes se incrementó posteriormente por su descripción en Argentina, donde también muestra una alta prevalencia (Vera *et al.*, 2015). Las cepas uruguayas son actualmente reconocidas como representativas de un linaje genético particular con un estatus taxonómico similar a las cepas clásicas, variantes e hipervirulentas (Islam, 2015; Michel & Jackwood, 2017).

Para continuar con la caracterización genética de estas cepas, estandarizamos metodologías para la obtención de su genoma completo. La secuencia se obtuvo mediante la secuenciación

y resúmenes en congresos internacionales durante el presente año y recientemente ha sido aceptada su publicación final (Tomás *et al.*, 2019).

Comparación con cepas vacunales

Se analizó la similitud nucleotídica y aminoacídica de las cepas *distinct* (dIBDV) de Gumboro con las vacunas comerciales más comúnmente utilizadas en Uruguay. La zona genómica utilizada corresponde a la región hipervariable de la proteína VP2, comprendida entre los aminoácidos 212 y 350 (Tabla 2). Los niveles de similitud a nivel nucleotídico son menores al 94 %, mientras que a nivel de aminoácidos son menores o iguales al 93 %.

Teniendo en cuenta que VP2 es la principal proteína reconocida por los anticuerpos neutralizantes, y que las vacunas comerciales existentes hasta el momento son realizadas a partir de cepas clásicas, variantes e hipervirulentas, se puede especular con que los virus *distinct* podrían no ser correctamente neutralizados por las vacunas. Esto se sustenta también con los análisis antigénicos que indican una importante variabilidad. Para evaluar de forma precisa el nivel de protección que estas vacunas generan frente a desafíos con virus de la cepa *distinct*, sería necesario realizar estudios complementarios de protección vacunal en aves.

Tabla 2: Similitud nucleotídica (nt) y aminoacídica (aa) de las cepas *distinct* (dIBDV) con cepas incluidas en las vacunas comerciales más comúnmente utilizadas en Uruguay.

Cepa	Similitud (%)	
	nt	aa
Winterfield 2512	92,3 – 93,0	92,0
F52/70	92,3 – 93,3	92,0
LIBDV	90,9 – 91,6	89,1
Lukert	91,8 – 92,6	88,4
D78	92,6 – 93,3	92,0
IrwinMoulthrop	91,8 – 92,8	91,3
S-706	92,3 – 93,3	92,0

Desarrollo de una metodología de caracterización específica

Dadas las características genéticas particulares del linaje dIBDV, sumado a su alta prevalencia en nuestro territorio, desarrollamos y validamos un ensayo de diagnóstico basado en PCR en Tiempo Real, utilizando una sonda de discriminación alélica (TaqMan-MGB). Este método permite la detección rápida, sensible y certera de los virus de Gumboro predominantes en Uruguay, o sea la cepa *distinct*, lo cual es fundamental para desarrollar planes estratégicos de control de forma inmediata y específica.

Para diseñar los cebadores y la sonda se realizaron alineamientos nucleotídicos de VP2, incluyendo secuencias de cepas hipervirulentas, clásicas y variantes, además de las secuencias uruguayas dIBDV. El diseño de cebadores y sonda se realizó en una región genómica que poseía cambios capaces de diferenciar este tipo viral del resto de las cepas. En base a las posiciones correspondientes a los marcadores aminoacídicos exclusivos de las cepas uruguayas, se diseñó la sonda y el juego de cebadores que amplifican un fragmento de 72 pb (Tabla 3). La amplificación se puso a punto utilizando un equipo ABI 7500 (Applied Biosystems) de nuestro grupo de investigación. Una vez estandarizada la amplificación, se realizó la validación del método mediante análisis de especificidad y desempeño analítico. El ensayo desarrollado tiene una buena especificidad, no detectándose amplificación cuando se enfrentó la sonda con muestras de cepa hipervirulenta, clásica o variante, y patógenos que podrían estar presentes en el mismo tejido que IBDV, como el virus de la Bronquitis infecciosa y el virus de la Anemia infecciosa (Fig. 7). La validación se realizó generando una curva estándar a partir de transcritos de RNA, analizando la eficiencia, coeficiente de determinación y rango dinámico (Fig. 8 y 9). La eficiencia de 91 % es adecuada para un ensayo de PCR a Tiempo Real, al igual que el valor de coeficiente de determinación (0,9991). El amplio rango dinámico, establecido entre 1×10^3 - 1×10^8 copias de cDNA por reacción, indica que el ensayo incluso puede ser utilizado para estudios de cuantificación viral, con un límite de cuantificación inferior de 10^3 copias de cDNA por reacción. Los valores mínimos obtenidos de los coeficientes de variación (CVs) intra- e inter-ensayo indican una alta reproducibilidad de la metodología.

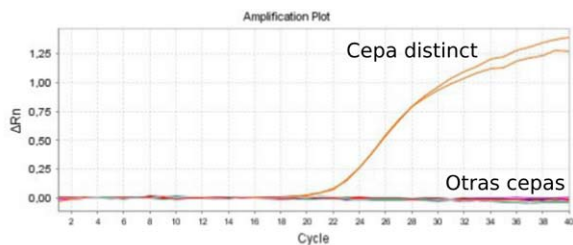


Figura 7. Gráfico de amplificación correspondiente al análisis de especificidad del ensayo de PCR en Tiempo Real de la cepa dIBDV. Se ve como el ensayo amplifica únicamente la cepa *distinct*, a diferencia del resto de las cepas de IBDV y las otras especies virales analizadas.

La prueba está basada únicamente en el segmento A, ya que observamos que este genotipo no presenta reordenamientos y la información que se obtiene de ambos segmentos es la misma (Hernández *et al.*, 2015). Para detectar otras variantes, incluido cepas vacunales, asociamos la prueba desarrollada con la metodologías de PCR en Tiempo Real descrita anteriormente (Tomás *et al.*, 2012).

La metodología de identificación de dIBDVs fue publicada en la revista Avian Pathology (Tomás *et al.*, 2016), y se utiliza actualmente para diagnosticar

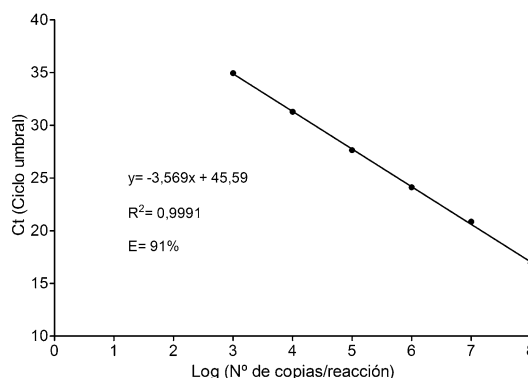


Figura 8. Curva estándar correspondiente al ensayo de PCR en Tiempo Real de la cepa dIBDV.

las muestras que llegan a nuestro laboratorio. Junto con las metodologías ya estandarizadas, podemos detectar e identificar en forma rápida todos los linajes circulantes del virus de Gumboro. Algunas de las cepas son posteriormente caracterizadas mediante la secuenciación del segmento A y del segmento B para la realización de estudios evolutivos.

Recientemente hemos publicado una nueva metodología que permite identificar en forma simultánea el virus de Gumboro y el de la Anemia Infecciosa Aviar (Techera *et al.*, 2019).

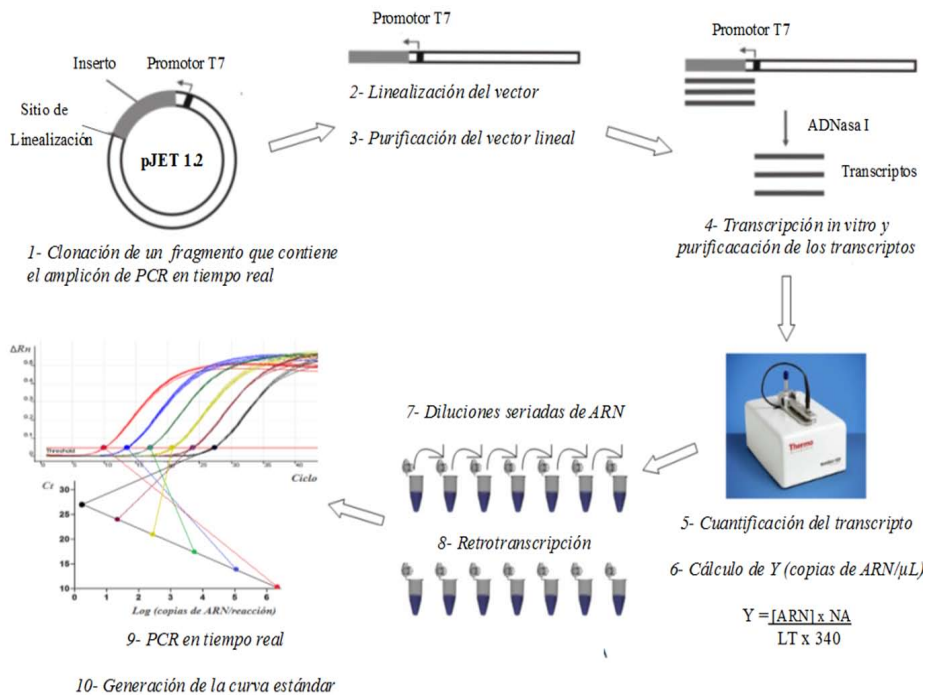


Figura 9. Metodología empleada para la generación de la validación de la metodología de PCR en Tiempo Real que identifica cepas uruguayas. Para realizar la curva estándar (relación lineal entre el Log10 del número de copias de RNA viral y el Ct) se clonó un fragmento que contiene el amplicón de PCR en Tiempo Real, se linealizó y purificó el plásmido, se transcribió in vitro el fragmento clonado y se calculó el número de copias de RNA/μL (Y) obtenido en el protocolo de transcripción. A partir del transcrito se realizaron diluciones seriadas que se sometieron a una reacción de retrotranscripción seguida de una PCR en Tiempo Real. Con los Ct resultantes y el Y calculado se generó la curva estándar.

Tabla 3. Cebadores (Ceb) y sonda utilizados para detectar las cepas *distinct* uruguayas por PCR en Tiempo Real. Se amplifica una región de 72 pb que se reconoce con una sonda de hidrólisis Taqman-MGB.

Secuencia 5' → 3'	Pos ^a
Ceb-F AAACAATGGGCTRACGGC	964-81
Ceb-R GTTATCTCGYTGGTCGGRAA	1016-35
Sonda NED-AGRTTGAATGGAAYAGGA-MGB	994-1011

^a Posición (Pos) de acuerdo a la cepa vvIBDV D6948 segmento A (AF240686).

Conclusiones

Se estableció que durante el período 2012-2017 en Uruguay circula una cepa particular del virus de Gumboro que denominamos dIBDV (*distinct* IBDV). Esta cepa es predominante en Uruguay y también en Argentina (Vera *et al.*, 2015) y constituye un linaje genético que no había sido previamente identificado como tal. Se publicó esta información (Hernández *et al.*, 2015) que fue aceptada por la comunidad científica, siendo nuestro trabajo referenciado en publicaciones de otros investigadores (Islam, 2015; Michel & Jackwood, 2017). Se obtuvo el genoma completo de una cepa *distinct* y los resultados de caracterización fueron publicados (Tomás *et al.*, 2019). Se desarrolló una metodología de PCR en Tiempo Real que identifica de forma específica este tipo de cepas y su estandarización fue publicada (Tomás *et al.*, 2016).

Actualmente, en colaboración con el INTA, estamos analizando las secuencias de varios genomas uruguayos y argentinos (Tomás *et al.*, en preparación).

PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR EN URUGUAY

Identificación y caracterización genética

Desde fines del año 2009 hasta la actualidad, la circulación de IBV en granjas vacunadas de la industria avícola uruguaya se detecta en nuestro laboratorio mediante técnicas moleculares basadas en PCR. Esta etapa es de gran importancia porque el diagnóstico clínico de la Bronquitis Infecciosa es dificultoso debido a su sintomatología poco específica. Los signos clínicos respiratorios asociados a esta patología, tales como tos, estornudos, exudados nasales y oculares, estridor y disnea, están presentes también en la enfermedad de Newcastle, la Laringotraqueitis Infecciosa y en las infecciones por Pneumovirus (Shalk *et al.*, 1931). Inicialmente el diagnóstico se realizaba por PCR a Tiempo Final, pero en la actualidad empleamos técnicas basadas en Tiempo Real.

Durante la primera etapa de este estudio se trabajó en la identificación de casos positivos de IBV por PCR en Tiempo Real para su posterior caracterización por secuenciación. La metodología de diagnóstico amplifica un fragmento del 5' UTR del genoma viral y es capaz de identificar todas las variantes circulantes del virus, incluido las cepas vacunales (Callison *et al.*, 2006). Esta metodología se caracteriza por su sensibilidad y especificidad, siendo un instrumento importante para los veterinarios responsables de las granjas avícolas. Como control interno del procedimiento, que asegura que la extracción y la amplificación funcionaron correctamente, se utilizó un ensayo de PCR en Tiempo Real para un gen aviar (*beta*-actina), desarrollado en nuestro laboratorio (Fig. 10). La aplicación de esta metodología reveló

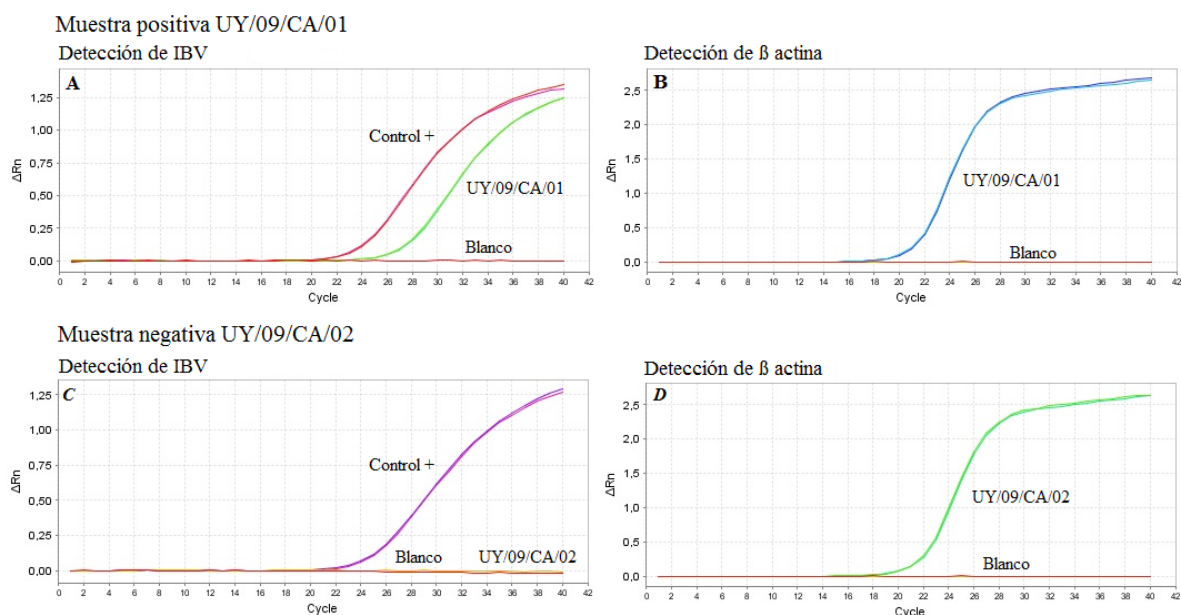


Figura 10. Ensayo de diagnóstico de IBV por PCR en Tiempo Real de una muestra positiva (UY/09/CA/01) y una muestra negativa (UY/09/CA/02). Para cada ensayo se muestran las curvas de amplificación de detección del genoma de IBV (A y C) y de detección del gen de la β actina aviar (control interno) (B y D).

que el genoma de IBV estaba presente en más del 40 % de las muestras analizadas (Tabla 1). Es posible que los síntomas clínicos de las aves negativas para IBV estén asociados a otra afección respiratoria con signos clínicos similares. Otra posibilidad es que las muestras presuntamente negativas tengan una carga viral muy baja en el momento de la toma de la muestra. La carga viral de una muestra depende de varios factores, entre ellos la edad del ave, la cepa de virus infectante y el órgano infectado (Alvarado *et al.*, 2006).

Para caracterizar las cepas circulantes se decidió secuenciar toda la región codificante de S1 (glicoproteína de superficie). La secuenciación completa de S1 se considera la mejor metodología para caracterizar el virus, aunque existen relativamente pocos estudios en Sudamérica. Los estudios sudamericanos suelen secuenciar parcialmente diferentes fragmentos de la región codificante de S1, lo cual dificulta los estudios comparativos.

La caracterización genética reveló que en Uruguay, Argentina y Brasil circulan dos linajes genéticos principales, denominados en la actualidad como GI-11 y GI-16 (Valastro *et al.*, 2016). La descripción de estos linajes en Uruguay la publicamos en la revista *Journal of General Virology* (Marandino *et al.*, 2015), reconocida en el área virológica. En Uruguay circulan con alta prevalencia las cepas del linaje GI-11, antes denominado SA1 (Fig. 11). Este linaje circula con alta prevalencia también en Brasil y con menor frecuencia en Argentina. GI-11 es un linaje muy restringido geográficamente ya que solo se reportó en Argentina, Brasil y Uruguay. Argentina tiene una situación epidemiológica diferente a Uruguay y Brasil, en donde co-circulan los linajes GI-11 y GI-16. GI-16 también está presente en otros países sudamericanos como Chile y Perú (Sesti *et al.*, 2016; de Wit *et al.*, 2017), además de ser uno de los linajes de IBV más distribuidos en el mundo conjuntamente con GI-1 (Massachusetts), GI-13 (793B) y GI-19 (QX) (Valastro *et al.*, 2016).

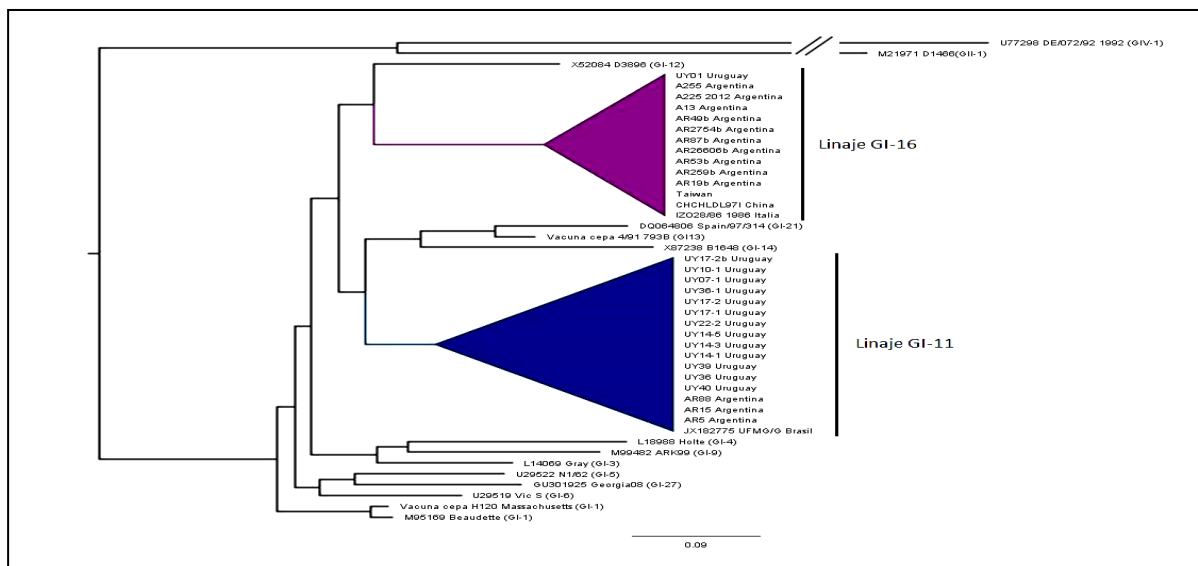


Figura 11. Árbol filogenético de cepas de Bronquitis infecciosa aviar construido utilizando la secuencia codificante de S1. Las cepas uruguayas pertenecen al linaje GI-11, con excepción de una única cepa que fue identificada como perteneciente al linaje GI-16.

Caracterización antigénica

La caracterización antigénica de las cepas uruguayas de IBV se realizó en colaboración con el Dr. Ariel Vagnozzi del laboratorio de Virología del INTA (Buenos Aires, Argentina). A finales del 2016 realizamos un convenio entre dicha

institución y la Universidad de la República, en el cual establecemos el compromiso de colaborar en investigación y formación de investigadores. La caracterización antigénica de las cepas uruguayas de ambos linajes (G-11 y G-16) se realizó mediante ensayos de virus neutralización en huevos embrionados libres de patógenos específicos SPF (Fig. 12). En la primera etapa se adaptaron aislamientos de ambos linajes, los cuales produjeron lesiones características en los embriones: enanismo, alteraciones en las patas y plumas rizadas (Fig. 13). En el caso de GI-11 además se observó hemorragia y muerte del embrión a los 5 o 6 días post-inoculación. Para establecer la relación antigénica entre los linajes GI-11 y GI-16, se generaron antisueros contra estas variantes mediante la infección en pollos SPF, y se seleccionó el suero de cada cepa que presentó mayor reactividad en el ELISA. Cada suero se enfrentó a su cepa homóloga y heteróloga a través de un ensayo de virus neutralización beta (Fig. 12). Se realizaron controles negativos (huevos embrionados sin inocular) y positivos (huevos embrionados inoculados).

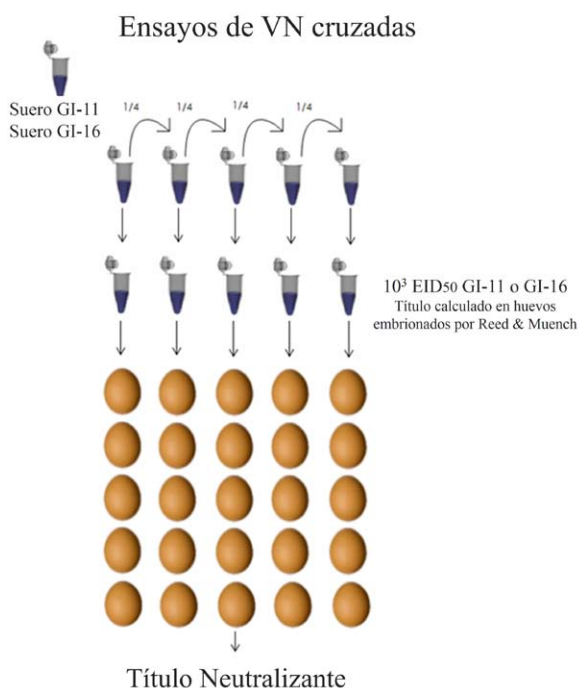


Figura 12. Protocolo utilizado para los ensayos de virus neutralización.

Según la definición de Hesselink, los virus GI-11 y GI-16 pertenecen a diferentes serotipos ya que los títulos neutralizantes heterólogos difieren más de 20 veces de los títulos homólogos, en ambas direcciones (Marandino *et al.* enviado a publicar; con participación del INTA).



Figura 13. Lesiones producidas por las cepas uruguayas GI-11 (superior) y GI-16 (inferior) en embriones libres de otros patógenos (SPF).

También se obtuvieron resultados de los ensayos de virus neutralización con sueros comerciales de los serotipos Massachusetts, Arkansas y Connecticut (cepas vacunales). Los resultados indicaron que todos los sueros testados presentan baja capacidad neutralizante contra cepas de los linajes GI-11 y GI-16, siendo esta capacidad incluso menor con los sueros Arkansas y Connecticut que con el Massachusetts.

Otros investigadores han realizado ensayos de virus neutralización y estudios de protección *in vivo* para evaluar el nivel de protección cruzada entre cepas similares a las descritas en nuestro país (GI-11 y GI-16) y la cepa vacunal Massachusetts. Un ensayo de virus neutralización realizado con aislamientos brasileños GI-11 y un antisuero derivado de la cepa vacunal, mostró una baja relación antigénica entre ambas (29 a 33 %) (Chacón *et al.*, 2011). El mismo ensayo de virus neutralización realizado con un aislamiento de origen chino del genotipo GI-16 reveló también una baja relación antigénica entre esta variante y el serotipo Massachusetts (Yu *et al.*, 2001). También se evaluó en pollos SPF, a través de morbilidad, mortalidad y re-aislamiento viral de las aves, la protección conferida por 4 cepas vacunales comerciales (Massachusetts, JASS, Jilin y J9) al desafío de un aislado chino del genotipo GI-16 (Liu *et al.*, 2009), indicando que todas estas vacunas confiere baja protección contra la cepa desafío. En base a estos resultados, es necesario evaluar la relación antigénica de los linajes GI-11 y GI-16 y otras vacunas comerciales disponibles en el mercado. Además es importante considerar la atenuación de cepas de los linajes GI-11 y GI-16 para el desarrollo de nuevas vacunas.

Comparación con cepas vacunales

Los genotipos uruguayos son muy divergentes, en base a la secuencia nucleotídica y aminoacídica de S1, con respecto a la única cepa vacunal autorizada

en nuestro territorio y en todo Sudamérica (cepa del serotipo Massachusetts) (Hernández *et al.*, 2012). Se obtuvo una similitud de 78,3 % a 80,6 % entre el linaje GI-11 y el genotipo Massachusetts. Para el caso del linaje GI-16, la similitud fue del 77,2 %. Recientemente se autorizó el uso en Uruguay y Chile de la vacuna del serotipo 793B, la cual puede ser usada junto con Massachusetts para controlar IBV. Nuestro análisis de la similitud nucleotídica en base a la región completa de S1 entre las cepas uruguayas y la cepa vacunal 793B fue relativamente baja: 76 % a 78 % (793B y GI-11) y 79,4 % (4/91 y GI-16).

Desarrollo de metodologías de caracterización específica

PCR en Tiempo Real

Se diseñaron, estandarizaron y validaron metodologías basadas en PCR en Tiempo Real para la identificación de los linaje GI-11 y GI-16. Para la identificación del genotipo GI-11 se diseñó una sonda de hidrólisis TaqMan que hibrida con una inserción de nueve nucleótidos en el gen de la glicoproteína de superficie (S) exclusiva de este genotipo, y un par de cebadores que amplifican una región de 116 pb. Para la identificación del linaje GI-16 se diseñó una sonda TaqMan-MGB que hibrida con la secuencia codificante del sitio de clivaje S1-S2, exclusivo de este linaje (Fig. 14). La sensibilidad clínica de los ensayos se corroboró utilizando 20 cepas de IBV pertenecientes a estos linajes, aisladas durante los años 2009 y 2012. También se corroboró la especificidad clínica del ensayo utilizando la cepa vacunal Massachusetts, así como en otros virus RNA que también pueden estar en la muestra problema: virus de Gumboro (IBDV), Metapneumovirus aviar (aMPV) y virus de Newcastle (NDV).

La validación analítica se realizó mediante la generación de curvas estándar y el cálculo de los valores de eficiencia, coeficiente de determinación y coeficiente de variación intra- e inter-ensayo de los valores de ciclo umbral (Ct) (Fig. 15). La curva estándar para la metodología de identificación del linaje GI-11 mostró un rango dinámico lineal de 1×10^1 - 1×10^7 copias de RNA por reacción, en este rango el protocolo se comporta de forma cuantitativa. La eficiencia (E) fue de 97 % y el coeficiente de determinación (R²) de 0,9977. La curva estándar para la metodología de identificación del genotipo GI-16

mostró un rango dinámico lineal de 1×10^2 - 1×10^7 copias de RNA por reacción. Esta metodología mostró una eficiencia de 90 % y coeficiente de determinación (R^2) de 0,9992. En ambas curvas, los valores mínimos obtenidos de los CVs intra- e inter-ensayo de los valores de Ct (ciclo umbral) indicaron que la reproducibilidad de las metodologías es alta. Los valores E y R^2 sustentan también la validez y adecuación de las metodologías a estándares internacionales, donde los valores aceptables de eficiencia son entre 90-110 % y los del coeficiente de determinación mayores a 0,98.

Las metodologías diseñadas se validaron en el Poultry Research and Diagnostic Laboratory de la Universidad Estatal de Mississippi bajo la dirección del Dr. Alejandro Banda. En este laboratorio se aplicó la técnica de PCR en Tiempo Real en 50 muestras de campo pertenecientes a

los genotipos de IBV circulantes en Norteamérica: Arkansas, Massachusetts, Delaware, Connecticut y Georgia 08. No se observó amplificación en ninguna de estas cepas, corroborando la especificidad de los ensayos. Como control positivo de los ensayos se utilizó cDNA de varias cepas sudamericanas de ambos linajes, las cuales amplificaron perfectamente con los equipos y reactivos disponibles en el laboratorio de Estados Unidos.

Estas metodologías fueron publicadas en la revista *Journal of virological methods* (Marandino *et al.*, 2016). Su utilización, en conjunción con el método de diagnóstico general que tenemos estandarizado en nuestro laboratorio, nos permiten en la actualidad diagnosticar en forma rápida y certera las variantes de Bronquitis circulantes en nuestro país y la región, diferenciándose claramente de las cepas vacunales.

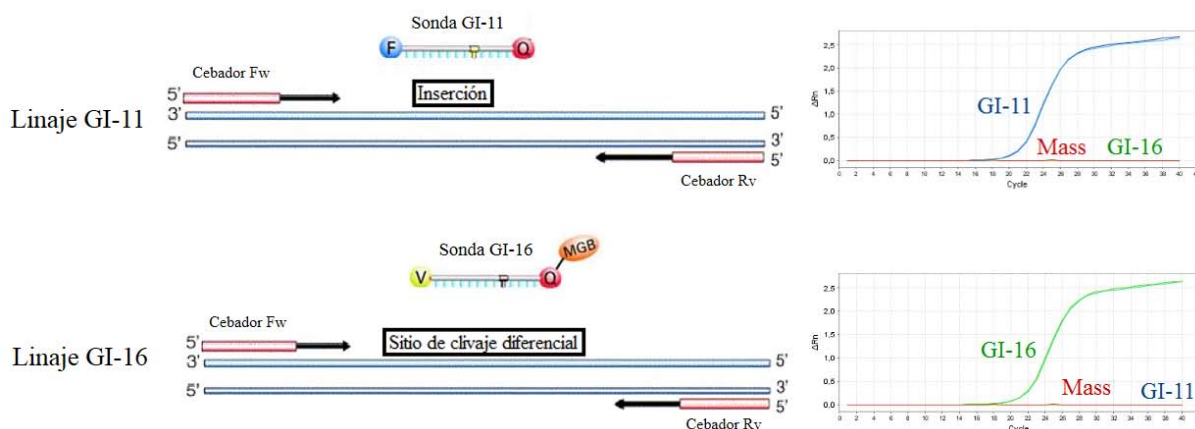


Figura 14. Metodología de PCR por Tiempo Real para la identificación de cepas de Bronquitis pertenecientes a los dos linajes circulantes en Sudamérica.

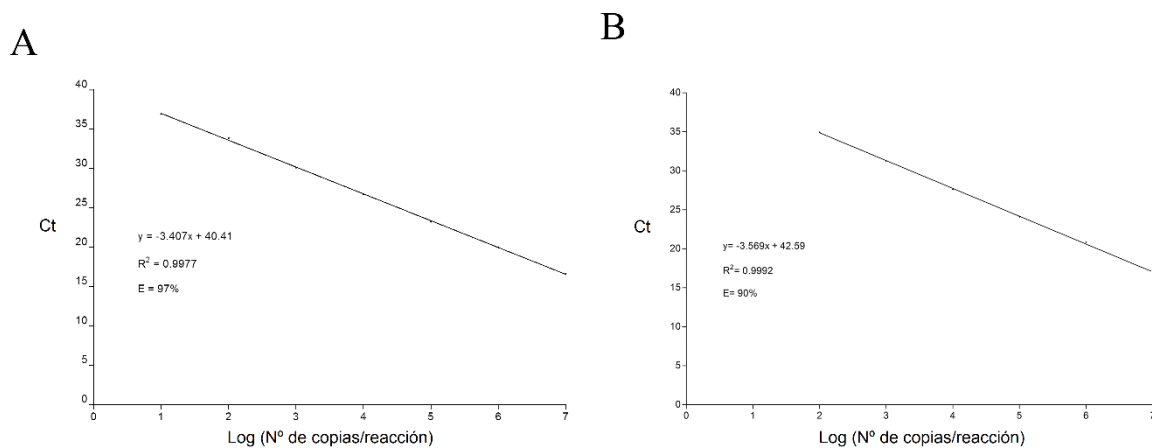


Figura 15. Curvas estándares correspondientes a los ensayos de PCR en Tiempo Real del linaje GI-11 (A) y GI-16 (B) de IBV.

Metodologías de secuenciación masiva (*deep sequencing*)

La metodología de secuenciación tradicional aplicada a los genomas del IBV es particularmente laboriosa porque los coronavirus tienen los genomas de RNA conocidos más largos (Lai & Cavanagh, 1997). Se requiere la amplificación de más de 30 fragmentos de PCR solapados seguidos por secuenciación de Sanger para cubrir los cerca de 28 kb del genoma (Abro *et al.*, 2012; Mondal & Cardona, 2007). Los enfoques de secuenciación profunda o masiva reducen drásticamente los requerimientos de tiempo y costo para la obtención de la secuencia genómica. Las ventajas adicionales de esta metodología son el aumento significativo en la cobertura y profundidad de secuencias que permiten estudiar eventos de co-infección, recombinación y diversidad de cuasi-especies (Isakov *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2014).

Durante la investigación se pusieron a punto metodologías de secuenciación masiva para obtener genomas virales. Para ello se estandarizó un protocolo de purificación de partículas virales de IBV para la secuenciación directa de sus genomas

mediante metodologías de secuenciación masiva (Fig. 16). El protocolo estandarizado incluye las siguientes tres etapas:

- a) aislamiento viral en cavidad alantoidea de huevos embrionados comerciales de 9 días de edad.
- b) concentración del líquido alantoideo en un colchón de sacarosa 20 % mediante ultracentrifugación.
- c) purificación viral mediante filtración o en gradiente de sacarosa.

El genoma viral se extrajo de las partículas purificadas y se realizó la síntesis del cDNA doble hebra necesario para preparar las librerías de secuenciación. La secuenciación se realizó en la plataforma Illumina MiSeq del Instituto de Pasteur de Montevideo. Las lecturas generadas por el secuenciador se analizaron y ensamblaron utilizando herramientas bioinformáticas (plataforma Galaxy y Software Lasergene).

Los protocolos de purificación y secuenciación aquí estandarizados permitieron obtener los primeros genomas completos (UTRs y secuencias

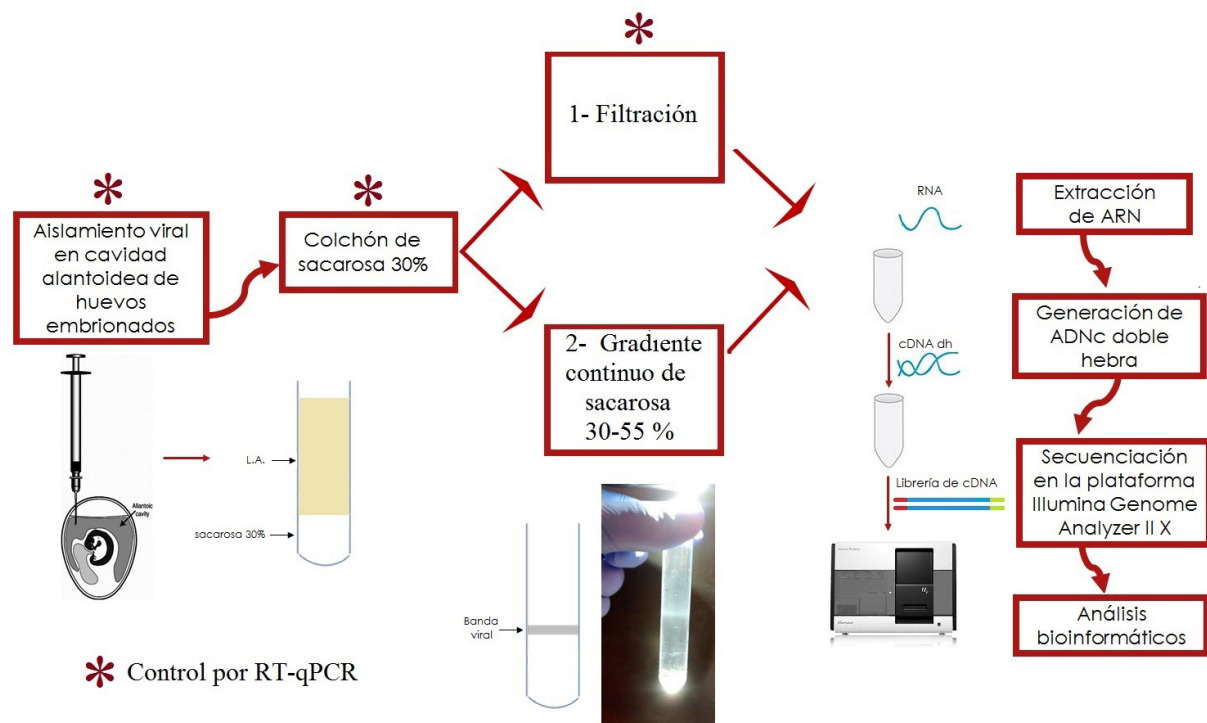


Figura 16. Esquema de la metodología de purificación de partículas virales de IBV, construcción de librerías y secuenciación masiva para bronquitis infecciosa aviar.

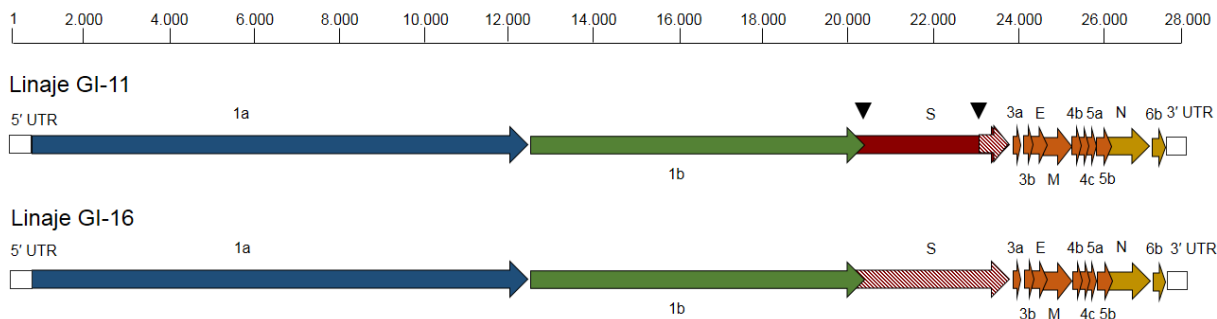


Figura 17. Organización de los genomas de las cepas uruguayas de IBV.

codificantes) de cepas de IBV de los linajes GI-11 y GI-16 en Sudamérica. Los genomas completos del linaje GI-11 tienen un tamaño de 27.621, excluyendo la cola poli (A). El tamaño del genomas de las cepas del linaje GI-16 es de 27.638 nucleótidos. Todas las cepas tienen trece ORFs (1a-1b-S-3a-3b-E-M-4b-4c-5a-5b-N-6b) (Fig. 17). Los ORFs tienen la misma longitud, excepto los ORF 1a y S que difieren en 24 y 36 nucleótidos entre las cepas de diferentes linajes.

La diferencia primordial entre los genomas de los linajes GI-11 y GI-16 se encuentra en la mayor parte del ORF S. El resto del genoma, incluido los últimos 437 nucleótidos del ORF S, es sorprendentemente similar entre todas las cepas uruguayas analizadas.

Estos resultados junto con la comparación con cepas de diferentes linajes permitieron profundizar sobre el origen y evolución global de este virus. En base a este análisis y los resultados filogenéticos con secuencias parciales se propone un escenario evolutivo para explicar el patrón de variabilidad en las cepas de los linajes GI-11 y GI-16. El linaje GI-16 se originó y se propagó en Eurasia en los años 70, antes de ser introducido en nuestro continente. Una vez introducido en Sudamérica, las cepas del linaje GI-16 recombinaron con las del linaje GI-11 locales para generar nuevas variantes genéticas. Resultados parciales de esta investigación ya han sido publicados en la revista *Genetics*, *Infection and Evolution* (Marandino *et al.*, 2017).

Conclusiones

La epidemiología molecular de IBV en Sudamérica es muy interesante por la coexistencia de dos linajes genéticos con diferente distribución geográfica. El estudio del origen y evolución de estos linajes tiene impacto en la evolución del virus en el continente. Será necesario analizar más cepas de otros países para completar el escenario epidemiológico en el continente sudamericano. Los nuevos análisis deberán realizarse utilizando el genoma entero ya que hemos evidenciado que estos genomas pueden ser verdaderos mosaicos con diferentes historias evolutivas. El virus de Bronquitis parece ser bastante divergente y poco protegido por las vacunas, como lo sugiere la divergencia genética y la diversidad antigénica que presentan los linajes genéticos. La realidad es que como son variantes particulares, no hay ninguna vacuna que las incluya en su formulación. Esto nos abre la posibilidad de una línea de investigación tendiente a desarrollar o mejorar vacunas específicas para el control de estos linajes.

CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN

La expectativa inicial de la investigación era que las cepas circulantes de los virus de Gumboro y Bronquitis en la industria avícola uruguaya fueran clasificadas dentro de los grupos taxonómicos disponibles para ambos virus. El panorama resultó mucho más complejo y desafiante, indicando que los estudios genéticos/evolutivos de estos virus se centraban en buena medida en cepas norteamericanas o europeas, estando las cepas latinoamericanas desatendidas. La investigación realizada brindó un panorama detallado de la epidemiología molecular de ambos virus. Esta descripción es una de las más completa realizada en Sudamérica para estos virus. A pesar de la importancia sanitaria que tienen, sólo Brasil y Argentina han desarrollado programas tendientes a analizar molecularmente estos virus a lo largo del tiempo, siendo relativamente pocos los estudios genéticos y evolutivos que se han publicado en la región.

A través de la caracterización de Gumboro, pudimos establecer las cepas circulantes en Uruguay, y determinar que formaban parte de un linaje aún no

descrito dentro del virus. Esto nos permitió aportar al conocimiento evolutivo global de este patógeno (Hernández *et al.*, 2015). Tan sorprendente como su presencia, es la alta prevalencia que este linaje ha alcanzado en el territorio uruguayo, donde más del 90 % de las muestras son clasificadas dentro de este grupo. Debido a que este linaje también está en otros países, aunque siempre considerado como variantes locales atípicas, la importancia de esta descripción aumenta. Actualmente podemos considerar a la población uruguaya como un modelo para el estudio de este linaje genético y analizar su comportamiento desde el punto de vista genético, serológico y patogénico. Los avances en la caracterización antigénica indican que no solo son un linaje genético sino que pueden considerarse una nueva cepa, con un estatus taxonómico similar a las cepas clásicas, variantes e hipervirulentas que han sido descritas en la literatura. Esto nos brindó la posibilidad de desarrollar metodologías de Real Time específicas para el linaje, brindando una herramienta importante para el control (Tomás *et al.*, 2016).

La identificación de estas cepas es relevante para la evolución del virus, pero sobre todo por su impacto sanitario. La alta frecuencia que han alcanzado en Uruguay, y también en Argentina, junto con su prevalencia a lo largo del tiempo, sugieren que el nivel de protección de las vacunas que se utilizan para controlarlas no es óptimo. Esto se sustenta también por el nivel de divergencia genética con las vacunas y por las diferencias antigénicas. Al tratarse de cepas con bajo nivel de patogenicidad, es probable que hayan pasado desapercibidas, aunque inmunosupriman a las aves y las dejan expuestas a patógenos secundarios sobre los cuales se realiza el tratamiento. El desarrollo de una vacuna específica para esta cepa podría ser importante en la región y abrir nuevas posibilidades de interacción entre el sector académico y la industria.

Con las muestras de Bronquitis infecciosa nos encontramos con un panorama casi tan sorprendente. Aunque se había realizado estudios de caracterización usando secuencias parciales en otros países, nunca se había analizado el virus en un contexto continental. Pudimos establecer que en Uruguay han circulado virus de dos linajes diferentes (GI-11 y GI-16), aunque uno de ellos con bajísima frecuencia (GI-16). Al describir estos linajes con secuencias génicas completas, y realizar estudios bioinformáticos con cepas de todo el mundo, fuimos capaces de establecer que estos eran en realidad

los dos linajes más importantes que circulan en la industria avícola Sudamericana (Marandino *et al.*, 2015). El análisis evolutivo indicó también que uno de los linajes era de origen euroasiático, mientras que el otro era exclusivamente sudamericano. La posibilidad de analizar la expansión inter e intra continental de linajes genéticos es algo raro en la literatura y permite adentrarse en el estudio de la dinámica viral a un nivel general. Esto justificó aún más el desarrollo de metodologías específicas para su detección desarrolladas en el transcurso de la investigación, ya que su utilidad no se limita a Uruguay, sino a todos los países donde estas cepas circulan (Marandino *et al.*, 2016). Tuvimos además la oportunidad de desarrollar metodologías de análisis con secuenciación masiva, obteniendo los primeros genomas completos sudamericanos para Bronquitis (Marandino *et al.*, 2017). Estos linajes genéticos resultaron también ser serotipos diferentes, lo cual tiene impacto a nivel del control. Las vacunas generadas en base a un linaje, no suelen proteger con la misma capacidad cepas de linajes diferentes. Debido a que no existen aún vacunas para estos linajes, se evidencia la necesidad de continuar investigando para testar otras vacunas o desarrollar nuevas vacunas que incluyan en su formulación cepas locales. En esta dirección, estamos actualmente atenuando cepas de estos linajes que podrían incluirse en las futuras vacunas de IBV.

El conocimiento generado durante la investigación fue la base para el desarrollo de una aplicación web para la caracterización genética de ambos virus aviares. La misma permite realizar de forma rápida, sencilla y de fácil interpretación, la caracterización genética de una muestra viral problema. Esta aplicación además, pretende nuclear y difundir el conocimiento adquirido en

torno a los virus causantes de estas enfermedades, ofreciendo links de interés, publicaciones recientes, proyectos de investigación en marcha e incluso un formulario de contacto donde presentar dudas y/o sugerencias. La aplicación se encontrará disponible a la brevedad y entendemos que será de utilidad para avanzar en la caracterización genética de las cepas virales en la industria avícola nacional e internacional.

Además de la investigación, durante la investigación se formaron recursos humanos (a nivel de grado y posgrado) en aspectos moleculares y serológicos, que han permitido consolidar nuestro grupo de investigación. Hemos establecido importantes colaboraciones con instituciones extranjeras con las que continuaremos intercambiando estudiantes y realizando investigaciones conjuntas.

El grupo de investigación se haya consolidado y contamos con el equipamiento, las instalaciones y los recursos humanos que nos permiten realizar investigaciones de primer nivel. Además, hemos conseguido experiencia en diversos aspectos de sanidad aviar que nos permitían estandarizar o desarrollar metodologías para la identificación y caracterización de prácticamente todos los patógenos virales o bacterianos que afectan a las aves, e incluso otros animales de producción. Adquirimos gran experiencia en los estudios evolutivos para comparar cepas de campo y vacunales, pudiendo aplicar todo lo aprendido en diversos modelos. En la actualidad estamos avanzando hacia un diagnóstico y caracterización global de los microorganismos que residen en determinado hospedero y su ambiente, lo que nos permitirá realizar, en un futuro próximo, una rápida descripción del microbioma asociado a un brote determinado.

BIBLIOGRAFÍA

ABRO, S. H., RENSTRÖM, L. H. M., ULLMAN, K., ISAKSSON, M., ZOHARI, S., JANSSON, D. S., BALAK, S., BAULE, C. 2012. Emergence of novel strains of avian infectious bronchitis virus in Sweden. *Veterinary Microbiology* 155(2-4): 237-246.

ALVARADO, I.R., VILLEGAS, P., EL-ATTRACHE, J., JACKWOOD, M.W. 2006. Detection of Massachusetts and Arkansas serotypes of infectious bronchitis virus in broilers. *Avian Disease*, 50:292-297.

CALLISON, S.A., HILT, D.A., BOYNTON, T.O., SAMPLE, B.F., ROBISON, R., SWAYNE, D.E., JACKWOOD, M.W. 2006. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *Journal of Virological Methods* 138:60-65.

CHACÓN, J., NOGUEIRA, J., ASSAYAG, M., PELOSO, C., PEDROSO, A., PIANTINO, A. 2011. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Pathology*, 40:153-162.

DE WIT, J.J., DIJKMAN, R., GUERRERO, P., CALVO, J., GONZALEZ, A., HIDALGO, H. 2017. Variability in biological behaviour, pathogenicity, protectotype and induction of virus neutralizing antibodies by different vaccination programmes to infectious bronchitis virus genotype Q1 strains from Chile. *Avian Pathology*, 46(6):666-675.

ERREA, E. 2012. Carne aviar: situación y perspectivas. *Anuario OPYPA* 2011. 97-105.

ETERRADOSSI, N. 1995. Progress in the Diagnosis and Prophylaxis of Infectious Bursal Disease in Poultry. *Comprehensive reports on technical items presented to the International Committee or to regional Commissions* (pp. 75–82). Paris: OIE.

ETERRADOSSI, N., RIVALLAN, G., TOQUIN, D. & GUITTET, M. 1997. Limited antigenic variation among recent infectious bursal disease virus isolates from France. *Archives of Virology*, 142:2079-2087.

FAHEY, K.J., CHAPMAN, A.J., MACREADIE, I.G., VAUGHAN, P.R., MCKERN, N.M., SKICKO, J.I., WARD, C.W. & AZAD, A.A. 1991. A recombinant subunit vaccine that protects progeny chickens from infectious bursal disease. *Avian Pathology*, 20:447-460.

GELB, J., WOLFF, J., MORAN, C. 1991. Variant Serotypes of Infectious Bronchitis Virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian Disease*, 35:82-87.

GODET, M., GROSCLAUDE, J., DELMAS, B., LAUDE, H. 1994. Major receptor-binding and neutralization determinants are located within the same domain of the transmissible gastroenteritis virus (coronavirus) spike protein. *Journal of Virology*, 68:8008-8016.

HERNÁNDEZ, M., TOMÁS, G., HERNÁNDEZ, D., VILLEGAS, P., BANDA, A., MAYA, L., PANZERA, Y., PÉREZ, R. 2011. Novel multiplex RT-PCR/RFLP diagnostic test to differentiate low- from high pathogenic strains and to detect reassortant Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Disease*, 55(3):368-374.

HERNÁNDEZ, M., TOMÁS, G., MARANDINO, A., PANZERA, Y., HERNÁNDEZ, D., VILLEGAS, P., BANDA, A., PÉREZ, R. 2012. Desarrollo de tecnología en sanidad aviar para la detección y caracterización de los virus de la Bronquitis Infecciosa y de Gumboro. *Ediciones Especiales N° 043 - INIA*: <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429280213102651.pdf>

HERNÁNDEZ, M., VILLEGAS, P., HERNÁNDEZ, D., BANDA, A., MAYA, L., ROMERO, V., TOMÁS, G., PÉREZ, R. 2010. Sequence variability and evolution of the terminal overlapping VP5 gene of the infectious bursal disease virus. *Virus Genes*, 41:59-66.

HERNÁNDEZ, M., BANDA, A., HERNÁNDEZ, D., PANZERA, F., PÉREZ, R. 2006. Detection of very virulent strains of infectious bursal disease virus (vvIBDV) in commercial broilers from Uruguay. *Avian Diseases*, 50:624-631.

- HERNÁNDEZ, M., TOMÁS, G., MARANDINO, A., IRAOLA, G., MAYA, L., MATTION, N., HERNÁNDEZ, D., VILLEGAS, P., BANDA, A., PANZERA, Y., PÉREZ, R. 2015. Genetic characterization of South American infectious bursal disease virus reveals the existence of a distinct worldwide-spread genetic lineage. *Avian Pathology* 2015; 44(3):212-21.
- HESSELINK, W.G. 1991. Serotyping avian infectious bronchitis virus: selection of a unified method. In E.F. Kaleta & U. Heffels-Redmann (Eds.). *Proceedings of the 2nd International Symposium on Infectious Bronchitis* (pp. 87-97). Rauschholzhausen, Germany.
- ISAKOV, O., BORDERÍA, A.V., GOLAN, D., HAMENAHÉM, A., CELNIKER, G., YOFFE, L., *Et al.* 2015. *Deep sequencing* analysis of viral infection and evolution allows rapid and detailed characterization of viral mutant spectrum. *Bioinformatics*, 31(13):2141-2150.
- LAI, M., CAVANAGH, C. 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 48:1-100.
- LE NOUËN, C., RIVALLAN, G., TOQUIN, D., DARLU, P., MORIN, Y., BEVEN, V., DE BOISSESON, C., CAZABAN, C., COMTE, S., GARDIN, Y. & ETERRADOSSI, N. 2006. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. *Journal of General Virology*, 87:209-216.
- LIU, S., ZHANG, X., WANG, Y., LI, C., LIU, Q., HAN, Z., ZHANG, Q., KONG, X., TONG, G. 2009. Evaluation of the protection conferred by commercial vaccines and attenuated heterologous isolates in China against the CK/CH/LDL/971 strain of infectious bronchitis coronavirus. *Veterinary Journal*, 179(1):130-136.
- MARANDINO, A., PEREDA, A., TOMÁS, G., HERNÁNDEZ, M., IRAOLA, G., CRAIG, M.I., HERNÁNDEZ, D., BANDA, A., VILLEGAS, P., PANZERA, Y., PÉREZ, R. 2015. Phylodynamics analysis of infectious bronchitis virus in South America. *Journal of General Virology*, 96:1340-1346
- MARANDINO, A., TOMÁS, G., HERNÁNDEZ, M., PANZERA, Y., CRAIG, M., VAGNOZZI, A., VERA, F., TECHERA, C., GRECCO, S., BANDA, A., HERNÁNDEZ, D., PÉREZ, R. 2016. Development of RT-qPCR assays for the specific identification of two major genotypes of avian infectious bronchitis virus. *Journal of Virological Methods*, 235:21-5
- MARANDINO, A., TOMÁS, G., PANZERA, Y., GREIF, G., PARODI-TALICE, A., HERNÁNDEZ, M., TECHERA, C., HERNÁNDEZ, D., PÉREZ, R. 2017. Whole-genome characterization of Uruguayan strains of avian infectious bronchitis virus reveals extensive recombination between the two major South American lineages. *Infection, Genetics and Evolution*, 54:245-250.
- MONDAL, S.P., CARDONA, C.J. 2007. Genotypic and phenotypic characterization of the California 99 (Cal99) variant of infectious bronchitis virus. *Virus Genes*, 34(3):327-341.
- MÜLLER, H., MUNDT, E., ETERRADOSSI, N., ISLAM, M.R. 2012. Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathology*, 41:133-139.
- PÉREZ, R., CALLEROS, L., MARANDINO, A., SARUTE, N., IRAOLA, G., GRECCO, S., *et al.*, 2014. Phylogenetic and genome-wide deep-sequencing analyses of canine parvovirus reveal co-infection with field variants and emergence of a recent recombinant strain. *PLoS One*, 9(11):e111779.
- SHALK, A. & HAWN, M. 1931. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J Am Vet Med Assoc.* 78:413.
- SNYDER, D.B., VAKHARIA, V.N. & SAVAGE, P.K. 1992. Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. *Archives of Virology*, 127:89-101.
- TECHERA, C., TOMÁS, G., PANZERA, Y., BANDA, A., PERBOLIANACHIS, P., PÉREZ, R., MARANDINO, A. 2019. Development of real-time PCR assays for single and simultaneous detection of infectious bursal disease virus and chicken anemia virus. *Mol Cell Probes*, 43:58-63.

TOMÁS, G., HERNÁNDEZ, M., MARANDINO, A., PANZERA, Y., MAYA, L., HERNÁNDEZ, D., PEREDA, A., BANDA, A., VILLEGAS, P., AGUIRRE, S., PÉREZ, R. 2012. Development and validation of a TaqMan-MGB real-time RT-PCR assay for simultaneous detection and characterization of infectious bursal disease virus. *Journal of Virological Methods*, 185:101-107.

TOMÁS, G., MARANDINO, A., COURTILLON, C., AMELOT, M., KEITA, A., PIKULA, A., HERNÁNDEZ, M., HERNÁNDEZ, D., VAGNOZZI, A., PANZERA, Y., DOMAŃSKA-BLICHARZ, K., ETERRADOSSI, N., PÉREZ, R., SOUBIES, SM. 2019. Antigenicity, pathogenicity and immunosuppressive effect caused by a South American isolate of infectious bursal disease virus belonging to the 'distinct' genetic lineage. *Avian Pathology*, 21: 1-31. [Epub ahead of print]

VALASTRO, V., HOLMES, E.C., BRITTON, P., FUSARO, A., JACKWOOD, M.W., CATTOLI, G., *Et al.*, 2016. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infection, Genetics and Evolution*, 39:349-64.

VAN DEN BERG, T., MORALES, D., ETERRADOSSI, N., RIVALLAN, G., TOQUIN, D., RAUE, R., ZIERENBERG, K., ZHANG, M.F., ZHU, Y.P., WANG, C.Q., ZHENG, H.J., WANG, X., CHAN, G.C., LIM, B.L. & MU"LLER, H. 2004. Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. *Avian Pathology*, 33:470-476.

VAN DEN BERG, T.P., GONZE, M. & MEULEMANS, G. 1991. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Pathology*, 20:133-143.

YU, L., JIANG, Y., LOW, S., WANG, Z., NAM, S.J., LIU, W., KWANGAC J. 2001. Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Disease*, 452:416-424.

INIA Dirección Nacional
Andes 1365 P. 12
Montevideo
Tel.: ++598 2902 0550
Fax: ++598 2902 3633
iniadn@inia.org.uy

INIA La Estanzuela
Ruta 50 Km. 11
Colonia
Tel.: ++598 4574 8000
Fax: ++598 4574 8012
iniale@le.inia.org.uy

INIA Las Brujas
Ruta 48 Km. 10
Canelones
Tel.: ++598 2367 7641
Fax: ++598 2367 7609
inia_lb@lb.inia.org.uy

INIA Salto Grande
Camino al Terrible
Salto
Tel.: ++598 4733 5156
Fax: ++598 4732 9624
inia_sg@sg.inia.org.uy

INIA Tacuarembó
Ruta 5 Km. 386
Tacuarembó
Tel.: ++598 4632 2407
Fax: ++598 4632 3969
iniatbo@tb.inia.org.uy

INIA Treinta y Tres
Ruta 8 Km. 281
Treinta y Tres
Tel.: ++598 4452 2023
Fax: ++598 4452 5701
iniatt@tyt.inia.org.uy