

CONICET



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Tesis para optar por el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

**CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES DEL VIRUS DE
BRONQUITIS INFECCIOSA QUE INFECTAN LOS PLANTELES
AVÍCOLAS DE LA ARGENTINA Y SU RELACIÓN CON LAS VACUNAS
COMERCIALES**

Med Vet. Rocío del Carmen Geréz Miranda

Director de Tesis: Dr. Ariel Eduardo Vagnozzi

Codirectora de Tesis: Dra. Ana Marandino

Instituto de Virología – CICVyA – INTA

2023

Tesis doctoral de Rocío del Carmen Geréz Miranda

Para optar al grado de Doctor

Por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA

Buenos Aires, 2023

El presente trabajo de Tesis Doctoral titulado “Caracterización de las variantes del Virus de Bronquitis Infecciosa que infectan los planteles avícolas de la Argentina y su relación con las vacunas comerciales”, fue realizado en el Instituto de Virología del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar, bajo la Dirección del Dr. Ariel Eduardo Vagnozzi y la Codirección de la Dra. Ana Marandino.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Med Vet. Rocío del Carmen Geréz Miranda

A handwritten signature in blue ink, featuring a large, stylized initial 'A' followed by a series of loops and a long horizontal stroke.

Dr. Ariel Eduardo Vagnozzi

A handwritten signature in black ink, with a large, stylized initial 'A' followed by a series of loops and a long horizontal stroke.

Dra. Ana Marandino

Los resultados parciales de esta tesis fueron publicados en el siguiente trabajo:

Avian Dis. 2021 Sep;65(3):456-462.

Evaluation of the Efficiency of Commercial Vaccines Against Infectious Bronchitis Virus (IBV) Belonging to the GI-16 Lineage Isolated in an Argentinean Outbreak

Rocío Geréz 1 2, Ana Marandino 3, Gonzalo Tomas 3, Valeria Olivera 1, Silvina Pinto 4, María Isabel Craig 1, Claudia Techera 3, Rubén Pérez 3, Ariel Vagnozzi 5

PMID: 34699143 DOI: 10.1637/0005-2086-65.3.456

DEDICATORIA

Para Isabel Isolina Miranda

AGRADECIMIENTOS

A mi director, el Dr. Ariel Vagnozzi, sin quien esta tesis no podría haber existido. Muchas gracias por darme un lugar en el Laboratorio de aves. A mi codirectora, la Dra. Ana Marandino, por su ayuda y disposición.

A mi familia, que me apoya en cada decisión, y siempre está para darme ánimos. A los viejos y nuevos integrantes. A mis sobrinitos, Madita y Nene, que me llenan de alegría.

A la gente que conocí en INTA, al laboratorio de Cultivo celular, a Estela, Osvaldo, Marta, Diego y Dani, que siempre estuvieron ahí para cada cosa que necesitara, sea ocupar la cabina de flujos, un consejo, o una golosina.

A los chicos de mantenimiento y Angelito, que siempre motivaron y ayudaron con cualquier tipo de problema con el que me presentara.

A las personas que siempre me prestaron los equipos, y mostraron la mejor disposición. En especial para Ro, Naty, Maxi, Juan, y Fer del Instituto de Virología; y a Juan y Pablo del Instituto de Biotecnología.

A mis compañeros de laboratorio, a Bessie, Vale, Digi, y en especial a Gustavo quien, a mi entender, se merece el premio a mejor compañero de INTA.

A mis amigas, que nunca dejaron de apoyarme durante toda la carrera, a Noe, Briyith, Gaby, y en especial a Sole, que fue incondicional durante toda esta etapa.

A Ulises, Miguel, Ro y Gus que aceptaron amablemente a dar los últimos detalles de edición a la tesis.

A Jon por estar al principio y al final de esta experiencia.

Índice

1. Introducción	7
1.1 Clasificación taxonómica del agente etiológico	7
1.2 Genoma viral y proteínas	9
1.3 Importancia de la proteína S.....	13
1.4 Replicación viral.....	14
1.5 Caracterización	15
1.6 Transmisión	16
1.7 Patogenia.....	17
1.8 Signos clínicos	18
1.9 Lesiones.....	18
1.9.1 Lesiones macroscópicas:.....	18
1.9.2 Lesiones microscópicas:	19
1.10 Diagnóstico.....	20
1.11 Prevención y control de la enfermedad	21
1.12 Contexto productivo	24
1.13 Historia	25
1.14 Presencia de IBV en sudamérica.....	26
1.15 Bronquitis infecciosa en Argentina	28
1.16 Propuesta de tesis.....	29
2. Hipótesis.....	31
3. Objetivos	32
3.1 Objetivo General:.....	32
3.2 Objetivos específicos:	32
4. Materiales y Métodos	34
4.1 Caracterización antigénica.....	34
4.1.1 Virus neutralización en embrión de pollo.....	34
4.1.2 Virus neutralización en cultivo celular	36

ÍNDICE

4.2. Estudio de evolución viral	40
4.2.1 Obtención de las secuencias de trabajo.....	40
4.2.2 Análisis de secuencia de S1.....	41
4.2.3 Análisis de secuencias del genoma completo	41
4.2.4 Métodos de Secuenciación.....	41
4.2.5 Ensamblado de las secuencias del genoma completo	42
4.2.6 Análisis filogenético	42
4.3. Desarrollo de modelo de Infección y obtención de parámetros de cuantificación	43
4.3.1 Pasajes en serie en hospedador natural forzando el tropismo renal.....	43
4.3.2 Análisis de la patogenicidad de los pasajes K13 y KD11	44
4.3.3 Desarrollo y optimización de la técnica de RT- PCR en tiempo real para cuantificación viral	45
4.3.4 Determinación de la carga viral de los pasajes K12 a K20	48
4.3.5 Ensayo de modelo de infección con el inóculo K16	48
4.4. Evaluación de la cepa A13 como vacuna y su comparación con otras vacunas comerciales	49
4.4.1 Ensayo de inocuidad	49
4.4.2 Ensayo de inmunogenicidad de A13p50.....	50
4.4.3 Detección de anticuerpos en fluidos traqueobronquiales	51
4.4.4 Test de reversión de la virulencia	51
4.4.5 Prueba de ciliostasis provocada por la vacunación con diferentes cepas	52
4.4.6 Prueba de eficiencia de vacuna.....	52
4.5. Técnicas de uso general	54
4.5.1 RT-PCR	54
4.5.2 ELISA	56
4.5.3 Análisis histopatológico	57
4.5.4 Ciliostasis.....	58
4.5.5 Análisis estadístico.....	58
5. Resultados	59
5.1. Caracterización antigénica.....	59
5.1.1 Virus neutralización cruzada en embrión de pollo	59
5.1.2. Virus neutralización en cultivo celular.....	63

ÍNDICE

5.2. Evolución viral	68
5.2.1 Análisis de las secuencias S1	68
5.2.2. Análisis de las secuencias del genoma completo.....	75
5.3. Modelo de infección	81
5.3.1 Pasajes en serie en hospedador natural forzando el tropismo renal.....	81
5.3.2 Análisis de la patogenicidad de los pasajes K13 y KD11	82
5.3.2. Puesta a punto de la técnica de RT-PCR en tiempo real para cuantificación viral	87
5.3.3 Determinación de la carga viral de los pasajes K12 a K20	93
5.3.4 Ensayo de modelo de infección con el inóculo K16	94
5.4. Obtención de una cepa atenuada de GI-16 para ser evaluada como vacuna atenuada	100
5.4.1 Atenuación.....	100
5.4.2 Titulación	101
5.4.3 Ensayo de inocuidad	101
5.4.4 Ensayo de inmunogenicidad	104
5.4.5 Detección de anticuerpos en lavajes traqueobronquiales	105
5.4.6 Test de reversión de la virulencia	105
5.4.7 Prueba de ciliostasis entre vacunas.....	106
5.4.8 Prueba de eficiencia de las vacunas ante el desafío	107
6. Discusión.....	114
7. Conclusiones	131
8. Bibliografía	133
9. Anexo.....	156

ABREVIATURAS

aa	aminoácido
ARV	Reovirus Aviar
BI	Bronquitis Infecciosa
ChEK	Cultivo primario en riñón de embrión de pollo
CIAV	Anemia infecciosa aviar
DIE50	Dosis infecciosa del embrión 50
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpi	Días post-infección
EC	Efecto citopático
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EP	Embrión de Pollo
ERGIC	Compartimento intermedio del retículo endoplasmático-Golgi
FAdV	Adenovirus aviar
hpi	horas post-inoculación/ horas post-infección
hs	horas
IB	Infectious Bronchitis
IBDV	Virus de la enfermedad infecciosa de la bursa
IBV	Virus de la Bronquitis Infecciosa
ILTV	Laringotraqueitis infecciosa
LTB	Lavaje traqueobronquial
Mass	Massachusetts
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
ND50	Dosis Neutralizante 50
nt	nucleótido
PBS	Solución salina amortiguada por fosfatos
pi	Post-infección
pv	Post-vacunación
RNA	Ácido ribonucleico
RBD	Dominios de unión al receptor
RdRp	RNA polimerasa viral RNA dependiente
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real
S1	Subunidad S1, porción N-terminal de la proteína de la espícula
S2	Subunidad S2, porción C-terminal de la proteína de la espícula
SFB	Suero fetal bovino
SPF	Libre de Patógenos específicos
TCID	Dosis Infecciosa en Cultivo Tisular 50
TRS	Secuencias regulatorias de transcripción
VN	Virus neutralización

ABREVIATURAS

VNC	Virus neutralización cruzada
-----	------------------------------

RESUMEN

La Bronquitis Infecciosa (BI) de las aves es una enfermedad viral altamente contagiosa que afecta a todas las categorías productivas en la industria avícola. El agente etiológico es el virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), un miembro de la familia *Coronaviridae*. Es un virus pleomórfico, cuyo genoma de RNA de simple cadena (+ssRNA) codifica 4 proteínas estructurales. Entre ellas, la más importante es la proteína de la espícula (S) por su rol en la adherencia a la célula hospedadora, tropismo e inmunogenicidad. La respuesta inmune se basa en la producción de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra determinantes antigénicos de dominios ubicados en la subunidad S1 de la proteína S. Estos dominios presentan alta variabilidad, por lo que existen diversas variantes de IBV con escasa o nula protección cruzada. Las variantes pueden ser caracterizadas mediante ensayos de virus neutralización con sueros de referencia lo que permite establecer serotipos virales. En general, se considera que la infección o vacunación con un serotipo otorga protección baja o insignificante contra la infección de un virus heterólogo. La región genómica que codifica la subunidad S1 también ha sido empleada para la caracterización genética de IBV. En base a esta caracterización se ha determinado que en Argentina existen dos variantes de campo pertenecientes a los linajes GI-11 y GI-16, siendo este último el más prevalente en la actualidad. En nuestro país, durante décadas el control de la enfermedad estuvo basada en el uso de dos serotipos vacunales, Massachusetts (Mass) y Connecticut (Conn), hasta que en el 2013 se autorizó el uso del serotipo 793/B. Sin embargo, solo recientemente, y en nuestro laboratorio, se comenzó a trabajar en estudiar las similitudes antigénicas de las cepas de campo y los serotipos vacunales.

En esta tesis se alcanzó el objetivo de caracterizar antigénicamente a la cepa de campo A13 (linaje GI-16) determinando su relación con las vacunas comerciales. Ello se logró mediante la técnica de virus neutralización cruzada empleando (en una primera instancia) embriones de pollo (EP). Posteriormente, se implementó un sistema de cultivo primario de riñón de embrión de pollo (ChEK) mucho menos laborioso y costoso que el de EP. De este modo, se estableció que las cepas A13 (GI-16), CHu8 (GI-11), Ma5 (GI-1) y CR88 (GI-13) pertenecen a serotipos diferentes. Este resultado sugiere la necesidad de replantear las actuales estrategias de prevención considerando el uso de una vacuna homóloga a la variante de campo (GI-16), que al día de la fecha no existe disponible comercialmente. De este modo, la posibilidad de contar con una vacuna perteneciente al linaje GI-16 contribuiría al control de BI en nuestro país. Para ello es necesario, en primer lugar, contar con una cepa perteneciente al linaje GI-16 con potencial para ser usada como vacuna atenuada. Es así como en este trabajo primero se obtuvo, mediante pasajes en serie en EP, una cepa (A13) atenuada, que posteriormente fue evaluada para ponderar su potencial como candidata vacunal. Esta evaluación se basó en la aplicación de las

RESUMEN

siguientes las pruebas: i) inocuidad, administrada en dosis elevada ($10^{9,624}$ DIE₅₀/ml) a pollitos de un día no generó trastornos de salud), ii) inmunogenicidad, adecuados títulos de anticuerpos en todos los pollos inoculados (a una dosis de 10^5 DIE₅₀/ml), iii) estabilidad (no revirtió luego de 4 pasajes por contacto natural) y iv) mayor eficiencia ante el desafío con una cepa homóloga (comparada con vacunas comerciales de los serotipos Massachusetts y 793/B). Para la prueba de desafío se desarrollaron y/o adaptaron técnicas que fueron optimizadas para su empleo. Dos de ellas fueron críticas para la evaluación: i) la cuantificación de la carga viral en tráquea y riñón mediante una RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) y ii) la prueba de la ciliostasis en muestras de tráquea (mediante sistema de scores).

Por otro lado, en este trabajo también se realizó un estudio de evolución viral empleando como insumo algunos pasajes en serie (en distintos soportes biológicos) de diferentes cepas de IBV. El objetivo fue obtener variantes que contengan cambios fenotípicos (virulencia) y evaluar si los mismos estaban relacionados a cambios del genoma. Además, algunos de esos pasajes sirvieron para otros ensayos de esta tesis (obtención del candidato vacunal y el virus de desafío para el ensayo de eficiencia). El estudio de evolución viral demostró que la mayoría de los cambios de nucleótidos (y aminoácidos codificados) se producen en el ORF1 y en el gen S (fundamentalmente en la subunidad S1). Lamentablemente, en este estudio no se ha logrado detectar un patrón de cambios en la secuencia de nucleótidos que permita asociarlos a la replicación en un hospedador en particular o a cambios en la virulencia.

En síntesis, los resultados obtenidos en esta tesis permitieron caracterizar antigénicamente a la cepa de mayor circulación en la industria avícola argentina, determinar su falta de relación con las vacunas comerciales, y obtener un candidato vacunal que cumple con los estándares de seguridad y otorga una adecuada respuesta inmune ante un desafío homólogo.

ABSTRACT

Avian Infectious Bronchitis (IB) is a highly contagious disease of chickens that affects all productive categories in the poultry industry. The etiological agent is Infectious Bronchitis Virus (IBV), a member of the *Coronaviridae* family. IBV is a pleomorphic virus, with a positive-sense single-stranded RNA (+ssRNA) that codes for 4 structural proteins. The spike protein (S) is the most important among them because its roles in i) attachment to the host cell; ii) tropism; and iii) immunogenicity. The immune response is based on the production of neutralizing antibodies directed against the antigenic determinants located on some domains of the subunit S1 of S protein. Those domains are highly variable regions (HVR), which are poorly conserved among the different strains, which is the cause of existence of a diversity of IBV variants with limited or no cross protection. The IBV variants can be characterized through virus neutralization essays by use of reference antisera, which allows to determine viral serotypes. In general, it is considered that infection or vaccination against a serotype grants low to insignificant protection against a heterologous virus. The genomic area that encodes S1 was also used for genotyping. The genotype characterization has shown that in Argentina two field variants belonging to the lineages GI-11 and GI-16 co-exist, being the latter the most prevalent. Until 2013, the IBV control in our country was based on two vaccine serotypes; Massachusetts (Mass) and Connecticut (Conn), since then the 793/B serotype was added to the catalog of authorized vaccines. However, only recently (and in our lab), we started to evaluate the antigenic similarities between field strains and vaccine serotypes.

In this thesis, we completed the antigenic characterization of A13 strain (GI-16 lineage), determining its relationship with the commercial vaccine's serotypes. This achievement was accomplished by cross virus-neutralization (CVN) tests, performed first on chicken embryos (ChE) and after that on primary cell culture. For the latter, we adapted a chicken embryo kidney cell (ChEK) culture, which is less time and costs demanding when it is compared with ChE. Therefore, we determined that A13 (GI-16), CHu8 (GI-11), Ma5 (GI-1) and CR88 (GI-13) belong to different serotypes. That result strongly suggests that we need to review the IB control programs, considering the potential use of a vaccine strain that is homologous to the field variant (GI-16), which is currently not commercially available. Thus, it would be a remarkable contribution to the IB control in Argentina, if we had a vaccine belonging to GI-16 lineage. So, it becomes essential to obtain an attenuated strain of IBV (GI-16 lineage), that could be considered for vaccination. Accordingly, an attenuated A13 strain was obtained by serial passages in ChE, and its potential as vaccine candidate was evaluated afterwards. Those evaluations were based upon the use of the following essays: i) safety trial (strain A13 was inoculated at high dose [$10^{9.624}$ EID₅₀/ml] without disease signs or lesions appearance in the birds); ii) immunogenicity (strain A13 was

ABSTRACT

inoculated at a lower dose [10^5 EID₅₀/ml] inducing a proper antibody titer); iii) stability (no reversion after 4 serial infections by natural contact); and iv) vaccine efficiency against a challenge with a homologous strain (compared with the protection given by vaccination with commercial vaccines of Massachusetts and 793/B serotypes). In order to perform the challenge trial, we developed (or adapted) and optimized techniques, which resulted of critical importance for the vaccine evaluation. They were: i) viral load quantitation in tracheal and kidney tissues (by real time RT-PCR); and ii) a score system for ciliostasis evaluation (in tracheal tissue).

On the other hand, in this thesis, we also performed a viral evolution study using as input the nucleotide sequences of some of the viral serial passages (on different biological supports) of IBV strains. The aim was to analyze the nucleotide sequence of the viral genome in search of changes that can be associated with phenotypic modifications (e.g.: attenuation of virulence). The evolution study has shown that the nucleotides (and the encoded amino acids) changes occurred mostly in: ORF1 and S1. Unfortunately, we were unable to detect a pattern of nucleotide that allows us to associate it to changes in virulence or in viral adaptation to a particular host.

In summary, in this thesis we have antigenically characterized the main field strain of IBV (GI-16) affecting the Argentinian poultry industry, determining the lack of relationship with the serotypes included in the commercial vaccines. Additionally, we obtained a vaccine candidate, homologous with the field variant, which accomplishes the safety standards, conferring a more efficient protection than that provided by commercial vaccines.

1. Introducción

1.1 Clasificación taxonómica del agente etiológico

La Bronquitis Infecciosa (BI) es una enfermedad viral altamente contagiosa que afecta a la especie *Gallus gallus domesticus* de todas las categorías productivas generando importantes pérdidas económicas en la industria avícola (Jackwood & de Wit, 2013).

El agente causal es el Virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV) que pertenece a la familia *Coronaviridae* que a su vez está incluida (junto a *Arteriviridae*, *Toronaviridae*, y *Roniviridae*) en el orden *Nidovirales*. Los virus comprendidos en este orden son los de mayor tamaño dentro de la categoría de virus de RNA e infectan a una gran variedad de vertebrados e invertebrados (mamíferos, aves, peces, reptiles, anfibios, artrópodos, moluscos y helmintos). Poseen un genoma de una hebra de RNA con polaridad positiva (+), listo para la traducción; y durante la replicación producen un conjunto de mRNA de largos segmentos subgenómicos (ViralZone, 2012; Walker et al., 2022). Los virus que integran la familia *Coronaviridae* (por ejemplo, el IBV) son virus envueltos que en la imagen de microscopía electrónica (**Figura 1**) se ven como partículas esféricas a pleomórficas, de unos 120 nm de diámetro, con espículas de 20nm que emergen de la superficie en forma radiada dándole un aspecto de corona (de allí el nombre de la familia). En el interior poseen una nucleocápside helicoidal, compuesta por el genoma viral rodeando a las nucleoproteínas (proteína N). Esta familia, a su vez se subdivide en dos subfamilias: *Letovirinae* y *Orthocoronavirinae* (Fan et al., 2019; Walker et al., 2022). La subfamilia *Orthocoronavirinae*, cuyos miembros son más conocidos como Coronavirus, abarca cuatro géneros que infectan a distintas especies: *Aphacoronavirus* (mamíferos), *Betacoronavirus* (mamíferos), *Gammacoronavirus* (aves), y *Deltacoronavirus* (mamíferos y aves) (Walker et al., 2022). IBV es el prototipo viral del género *Gammacoronavirus* (ViralZone, 2022). La **Figura 2** muestra un árbol filogenético donde se ven las relaciones entre los diferentes componentes de la familia *Coronaviridae*.

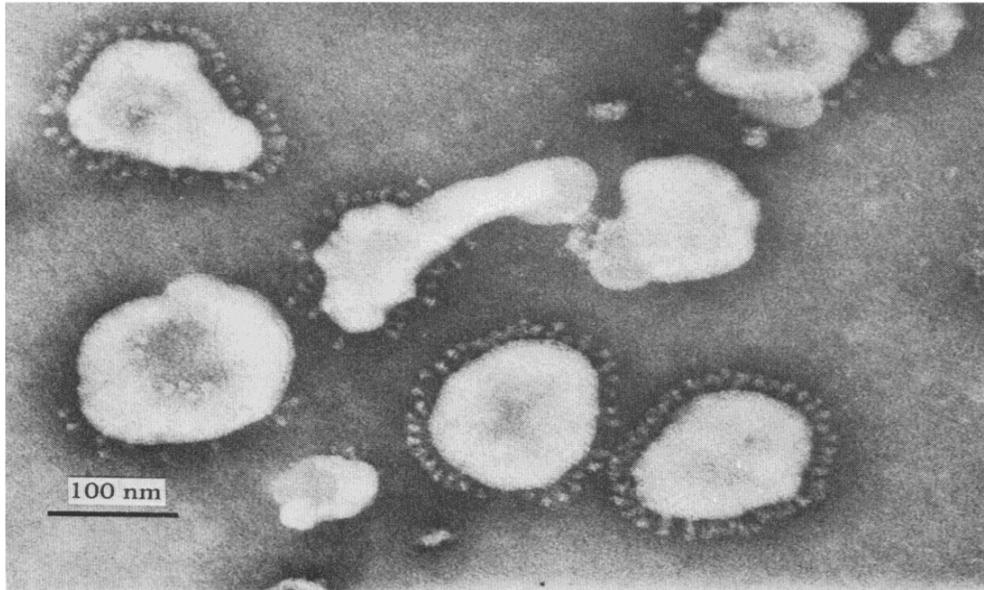


Figure 1. Imagen de microscopía electrónica de IBV. Tomada de "The Polypeptides of Infectious Bronchitis Virus (IBV-41 Strain)," de J. A. Lanser, 1980, *Journal of General Virology*, 46(2), 349-361. doi:<https://doi.org/10.1099/0022-1317-46-2-349>

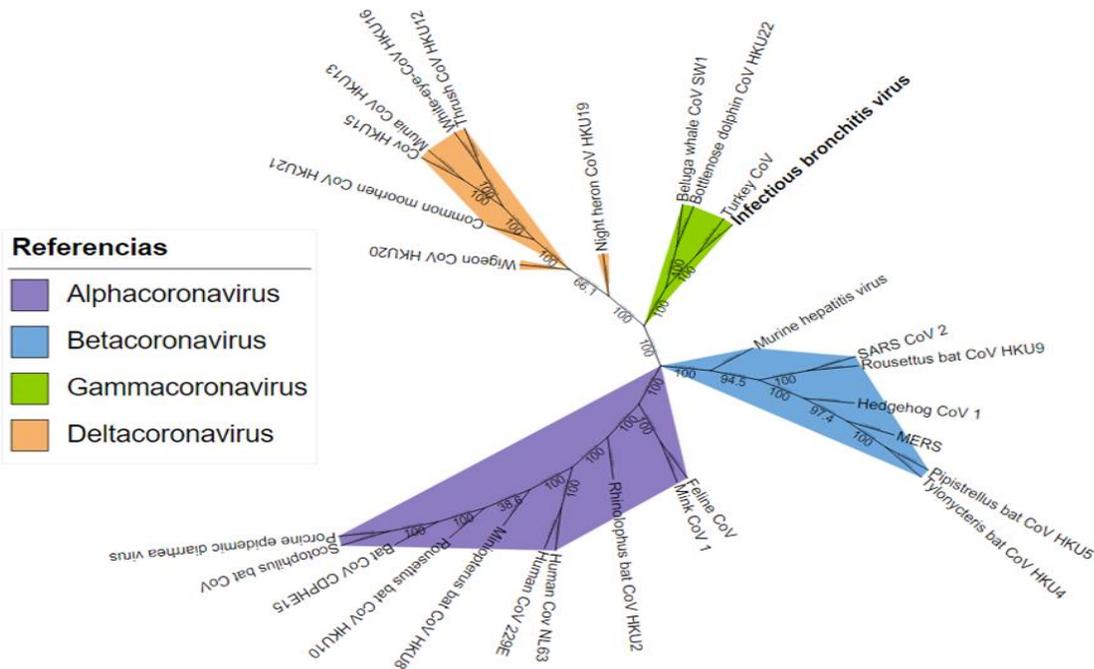


Figura 2. Árbol filogenético basado en la secuencia genómica del ORF1ab viral de 28 coronavirus representando los distintos miembros de la familia Coronaviridae. Incluye el Coronavirus de la Peritonitis Infecciosa Felina (Feline CoV), Coronavirus del visión 1 (Mink CoV 1), Coronavirus del murciélago Rhinolophus HKU2 (Rhinolophus bat CoV HKU2), Coronavirus Humano NL63 (Human CoV NL63), Coronavirus Humano 229E (Human CoV 229E), Coronavirus del murciélago minopterus HKU8 (Minopterus bat CoV HKU8), Coronavirus del murciélago Roussetus HKU10 (Roussetus bat CoV HKU10), Coronavirus del murciélago CDPHE15 (Bat CoV CDPHE15), Coronavirus del murciélago Scotophilus (Scotophilus bat CoV), Coronavirus del Virus de la diarrea epidémica Porcina (Porcine epidemic diarrhea virus), Virus de la hepatitis murina (Murine hepatitis virus), Coronavirus 2 del Síndrome Agudo Respiratorio Severo (SARS CoV 2), Coronavirus del murciélago Roussetus HKU9 (Roussetts CoV HKU9), Coronavirus 1 del Erizo (Hedgehog CoV 1), Virus del Síndrome Respiratorio del Medio Oriente (MERS), Coronavirus del murciélago Pipistrellus HKU5 (Pipistrellus bat CoV HKU5), Coronavirus del murciélago Tylonycteris HKU4 (Tylonycteris bat CoV HKU4), Coronavirus del pavo (Turkey CoV), Coronavirus de la Ballena Beluga SW1 (Beluga whale CoV SW1), Coronavirus del Delfin nariz de botella HKU22 (Bottlenose dolphin CoV HKU22), Virus de la Bronquitis Infecciosa (Infectious bronchitis virus), Coronavirus de la Garza nocturna HKU19 (Night heron CoV HKU19), Coronavirus del Tordo HKU12 (Thrush CoV HKU12) Coronavirus del Ojiblanco HKU16 (White eye CoV HKU16), Coronavirus del Munia HKU13 (Munia CoV HKU13), Coronavirus Porcino HKU15 (CoV HKU15), Coronavirus de la Gallineta común (Common moorhen CoV HKU21), y Coronavirus del Silbon HKU20(Wigeon CoV HKU20). Estas secuencias fueron obtenidas de la base de datos del NIH, GenBank, alineadas con el software ClustalO, visualizadas y editadas con BioEdit, y se analizó la inferencia filogenética por Máxima Verosimilitud con IQtree. Finalmente, la visualización y edición del árbol se llevó a cabo con el software online iTOL - interactive Tree Of Life.

1.2 Genoma viral y proteínas

IBV es un virus de RNA monocatenario de polaridad positiva (ss+RNA) de un largo aproximado de 26 Kb (Brian & Baric, 2005; Cavanagh, 2007). Su genoma se organiza de la siguiente manera: 5' UTR – Gen 1 - S - 3a, b, c - (E) - M - 5a, b - N – UTR 3'. El extremo 5' posee un cap y a continuación una secuencia *leader* que favorece la transcripción de los primeros dos marcos de

lecturas del gen 1, las poliproteínas 1a y 1ab. IBV presenta 4 proteínas estructurales codificadas por los genes S, E, M y N. El genoma viral también codifica varias proteínas accesorias (3 a, b y c; y 5 a, y b), y es seguido por una cola polyA (Fehr & Perlman, 2015). (Figura 3)

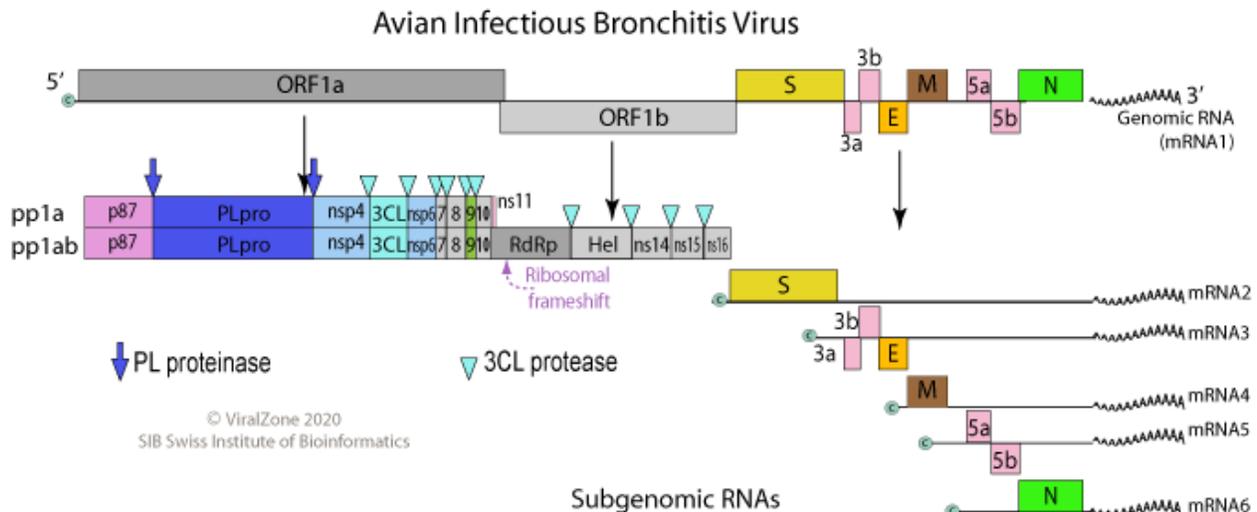


Figura 3. Representación gráfica del genoma IBV. Se esquematiza la síntesis de las poliproteínas 1a y 1ab, que a su vez generan múltiples proteínas no estructurales (nsp) maduras, y los RNA mensajeros subgenómicos, cada uno de los cuales permitirá la traducción del ORF más cercano al extremo 5' (https://viralzone.expasy.org/resources/Gammacoronavirus_genome.png).

El gen 1, conocido como el gen de la replicasa, abarca dos tercios del genoma viral, que producen 15 o 16 proteínas no estructurales (nsp) involucradas en la replicación, entre las que sobresale la polimerasa viral (Ziebuhr et al., 2000). Contiguo del lado 3' del gen 1 aparece el gen de la glicoproteína S. Este gen es el más estudiado del genoma viral debido a la importancia que tiene la proteína S en el tropismo, la entrada a la célula hospedadora, la inducción de anticuerpos neutralizantes y la evasión de la respuesta inmune (Casais et al., 2003; Koch et al., 1990; Liu et al., 2014). Como se mencionará más adelante, el transcrito de S es procesado post-transcripcionalmente para producir las subunidades S1 y S2. La primera de ellas posee 3 regiones hipervariables (HVR) donde se encuentran los mayores determinantes de antigenicidad y tropismo viral (Cavanagh et al., 1988; Moore et al., 1997). Luego de S, continuando en la dirección 5' – 3' en el genoma viral aparecen los marcos de lectura que codifican las proteínas accesorias, 3a y 3b, asociadas a la regulación de la replicación, y evasión de la respuesta inmune (Casais et al., 2005; Hodgson et al., 2006). Luego se encuentra el gen E, que codifica a la proteína estructural más pequeña del virus, la cual está relacionada al ensamblado y el egreso viral (Fischer et al., 1998; Raamsman et al., 2000). Misma función tiene la proteína M, que a su

vez es una de la más abundante del virión (Raamsman et al., 2000; Stern et al., 1982). Las proteínas accesorias 5a y 5b no son necesarias para el proceso replicativo, aunque están relacionadas a la virulencia, particularmente la 5a (Zhao et al., 2019). La proteína 5b, por su parte cumple un rol como antagonista de la respuesta inmune innata, específicamente del interferón (Kint et al., 2016; Laconi et al., 2018). El gen N codifica a la proteína estructural N que cumple un rol fundamental en la formación de la nucleocápside helicoidal que protege al genoma. Esta proteína es además un importante cofactor en la síntesis de RNA, participando en la producción de RNA subgenómico y se ha demostrado que participa en la gemación e interfiere con la respuesta inmune (Siu et al., 2008; Zhou et al., 2008; Zhou et al., 1996). En algunas variantes de IBV, en el extremo 5' del gen N se encuentra una región codificante de la proteína 6b cuya función no se encuentra dilucidada, sin embargo, en otros coronavirus se le asigna un rol en la virulencia (Frieman et al., 2007). En la **Tabla 1** se describe con mayor detalle las proteínas y su correspondiente función.

	Proteína	Función
Proteínas no estructurales	nsp1	No existe en IBV
	nsp 2	Es esencial para la infección y promueve la replicación viral regulando la respuesta inmune innata del hospedador, a través de la inactivación de PKR (proteína kinasa R) (Wang et al., 2009; Yang et al., 2009).
	nsp3	Actúa como una proteasa liberando las proteínas virales no estructurales: nsp2, nsp3, y nsp4, y como deubiquitinasa bloqueando la respuesta inmune del hospedador (Mielech et al., 2014; Ojha et al., 2021; Yu et al., 2017). También regula el ciclo de vida de la célula hospedadora (Shaw et al., 2013), y estudios previos sugieren que juega un rol importante en la replicación viral y en la virulencia (Phillips et al., 2012).
	nsp4	Permite el reordenamiento de membranas, lo que proporciona un sitio para la síntesis y ensamblado viral, e impide el reconocimiento viral por parte del sistema inmune (Doyle et al., 2018).
	nsp5	Es la proteasa más importante de los coronavirus, también llamada 3CLpro (Anand et al., 2003).
	nsp6	Limita la expansión de autofagosomas y omegasomas, haciendo que estos pierdan su función transportando componentes virales a lisosomas para su degradación (Cottam et al., 2011) y, por el contrario, promueve la formación de autofagosomas en el retículo endoplásmico, lo que facilita el proceso de ensamblado viral (Cottam et al. 2014; Miller et al., 2020).
	nsp7	Nsp7, nsp8y nsp12 juegan un rol auxiliar en la síntesis de RNA viral (Subissi, Imbert, et al., 2014; Subissi, Posthuma, et al., 2014; Tan et al., 2018). Nsp7 y nsp16 pueden bloquear la presentación antigénica antagonizando la respuesta inmune innata (Zuo et al., 2021).
	nsp8	En conjunto con nsp7 y nsp12 juegan un rol auxiliar en la síntesis de RNA viral (Subissi, Imbert, et al., 2014; Subissi, Posthuma, et al., 2014; Tan et al., 2018).
	nsp9	Se une al RNA para mejorar la replicación viral (Hu et al., 2017).

	nsp10	Junto con nsp16 colaboran en la formación del cap del mRNA viral para una traducción eficiente y tienen un rol en el escape de la respuesta inmune del hospedador (Rosas-Lemus et al., 2020).
	nsp11	Todavía no se conoce su función.
	nsp12	En conjunto con nsp7 y nsp12 juegan un rol auxiliar en la síntesis de RNA viral (Subissi, Imbert, et al., 2014; Subissi, Posthuma, et al., 2014; Tan et al., 2018).
	nsp13	Actúa como helicasa en el proceso de replicación (Subissi, Imbert, et al., 2014). Posee un dominio de unión a zinc que juega un rol en la replicación y transcripción (Fang et al., 2007), puede interactuar con la DNA polimerasa de la célula hospedadora bloqueando la fase S o G2/M del ciclo celular (Xu et al., 2011). Cumple un rol en la formación del cap del mRNA (Subissi, Imbert, et al., 2014), que es importante como promotor de la traducción, protector de la degradación por exonucleasas celulares y para limitar el reconocimiento del genoma viral por el sistema inmune innato (Fabrega et al., 2004; Fechter et al., 2005).
	nsp14	Posee dominios exoribonucleasa (ExoN) y guanina N7 metiltransferasa (N7-MTase) (Ogando et al., 2020) que le otorga capacidad editora (Hsu et al., 2021; Xu et al., 2010). El dominio N7-MTase está involucrado en la formación del cap viral del mRNA (Subissi, Imbert, et al., 2014).
	nsp15	Cuando se invalida su efecto, las proteínas y expresión viral se reducen en cultivos celulares (Zhao et al., 2020). Inhibe la formación de gránulos citoplasmáticos de estrés (SGs), antagonizando la activación de PKR (Gao et al., 2021) y de la respuesta inmune innata (Cesaro & Michiels, 2021). Los SGs participan en la síntesis de proteína, el <i>shutdown</i> , y el reclutamiento de intermediarios de la transcripción que participan en la respuesta antiviral (Gao et al., 2021; Zhao et al., 2020).
	nsp16	Posee actividad 2'-O-metiltransferasa, relacionada a la formación del cap estructural del mRNA (Subissi, Imbert, et al., 2014). Permite que el mRNA viral tenga la misma estructura que un mRNA eucariota, evadiendo la respuesta inmune del hospedador.
Proteínas accesorias	3a	Una delección de esta proteína perjudica, pero no impide, la replicación en embriones de pollo (S. Liu et al., 2008), y en estudios previos disminuye la patogenicidad viral de la cepa QX (X. Zhao et al., 2019). Al igual que 3b, antagoniza la respuesta inmune del hospedador por retrasar la activación de INF intracelular tipo I, y factores estimulantes de IFN (Kint, Dickhout, et al., 2015; Kint, Fernandez-Gutierrez, et al., 2015).
	3b	Su delección disminuye la patogenicidad de QX en embriones de pollo (Zhao et al., 2019), en mayor medida que 3a. Antagoniza la respuesta inmune del hospedador por retrasar la activación del INF intracelular tipo I, y factores estimulantes de IFN (Kint, Fernandez-Gutierrez et al., 2015).
	5a	Está involucrada en la patogenicidad viral, y virulencia (Zhao et al., 2019).
	5b	Antagoniza la respuesta inmune innata, posiblemente por la interrupción de la síntesis proteica del hospedador (Yang et al., 2009; Wang et al. 2009; Mielech et al., 2014; Ojha et al., 2021; Yu et al., 2017) y actúa como antagonista de IFN (Siu et al., 2008)
Proteínas estructurales	S (Espícula)	Interviene en la adherencia del virus a la célula hospedadora, determina el tropismo (Casais et al., 2003) y facilita su entrada a través de la fusión de la membrana viral y celular. Es la proteína más expuesta y la más inmunogénica (Cavanagh et al., 1984; Ignjatovic & Galli, 1994; Wang et al., 1995).
	E (Envoltura)	Es una proteína pequeña que integra la membrana, que se pentameriza para formar canales iónicos llamados vioporinas. Es esencial para el ensamblaje y la liberación del virus (Satarker & Nampoothiri, 2020).

	M (Membrana)	Tiene un triple dominio transmembrana y facilita el ensamblaje, posee un rol evasor en la respuesta inmune (Neuman et al., 2011).
	N (nucleoproteína)	Se produce en la etapa más temprana de la infección y es la proteína más abundante, envuelve y protege al genoma viral formando un complejo ribonucleoproteico. Asiste en la entrada del virus a la célula y la interacción con componentes celulares (Huang et al., 2004). Tiene diversos roles, entre ellos promover la inflamación, inhibición del INF tipo I (Lu et al., 2011), interferencia del ciclo celular (Surjit et al., 2006; Zeng et al., 2008), y es también una proteína inmunogénica (Tang et al., 2008; Yu et al., 2010).

1.3 Importancia de la proteína S

La proteína S de los coronavirus es una proteína de fusión clase I (Bosch et al., 2003). Como se mencionó anteriormente esta proteína posee dos dominios, S1 y S2, cada una conformada por 500 a 600 aminoácidos, que juegan un rol importante en la infección viral (Cavanagh 1983, Belouzard et al., 2012). S1 posee una amplia variabilidad, hasta el 50% de los aminoácidos difieren en este segmento entre los distintos serotipos virales. La mayor parte de la variabilidad se encuentra localizada en 3 regiones hipervariables (HVR), denominadas: HVRI (posición 38-67), HVRII (posición 97-141) y HVRIII (posición 274-387) (Kuster et al., 1989). Las HVRs codifican aminoácidos críticos para la unión a la célula diana que están incluidos en los dominios de unión al receptor (RBD) (Wickramasinghe et al., 2011; Promkuntod et al., 2014). A su vez, las HVR se encuentran asociadas a la respuesta inmune específica y debido a eso (y a su elevada variabilidad) son las que le otorgan a IBV las diferencias de serotipo (Cavanagh et al., 1992, 1988; Moore et al., 1997; Niesters et al., 1987).

La proteína S además tiene un importante rol en el tropismo (Kuo et al., 2000). Se han llevado a cabo experimentos en donde se crearon cepas recombinantes a partir de la cepa Beaudette, que es capaz de replicar en líneas celulares mamíferas (Bickerton et al, 2018). En dichos experimentos se reemplazó la secuencia codificante de la proteína S de la cepa Beaudette, por el gen S perteneciente a la cepa M41 (no adaptada a crecer en líneas celulares) resultando en la pérdida del tropismo por las células VERO, BHK-21 y CEF (Casais et al., 2003). En estos cambios la subunidad S2, encargada de la fusión de membrana, pareciera tener un rol preponderante, ya que se llevaron a cabo otras experiencias en las cuales el reemplazo de la S1 de la cepa Beaudette por el de la cepa H120 o M41, no logrando impedir la replicación en células vero (Wei et al., 2014, Bickerton et al, 2018). Adicionalmente, cambios en el sitio de clivaje proteolítico en los límites de la S1/S2, están asociados a un cambio en el tropismo (Yang et al., 2015).

Por las razones antes expuestas, está claro que la proteína S posee un importante rol en el tropismo, inmunogenicidad, y patogenicidad de IBV, lo que la hace esencial para la infección viral. Su estudio es clave para la generación de estrategias de control, y su composición genética es fundamental para entender los mecanismos de evolución viral (Valastro et al., 2016).

1.4 Replicación viral

El primer paso de la infección es la unión al receptor celular. Como se mencionó previamente, la subunidad S1 (que se encuentra en la porción N-terminal de la proteína de la espícula) posee los RBDs que se unen al receptor de ácido siálico de la célula susceptible. Inmediatamente después de la adsorción a la superficie de la célula blanco, la porción C-terminal (S2) permite la fusión de la envoltura viral con las membranas celulares (Flint et al., 2015). Así es como la molécula de RNA genómico se libera y es inmediatamente reconocida como RNA mensajero, traducándose en primer término la poliproteína 1a-1ab. Esta poliproteína es posteriormente auto-clivada dando lugar al complejo replicasa, que incluye: i) la RNA polimerasa viral RNA dependiente (RdRp), ii) proteínas no estructurales encargadas de reordenar membranas celulares para formar sitios de síntesis, iii) enzimas involucradas en la generación de caps terminales 5' de los mRNA y iv) una exonucleasa con función editora (Snijder et al., 2016). El complejo replicasa se encarga de la replicación de la hebra positiva de RNA genómico para generar RNA (genómico y subgenómico) de polaridad negativa (anti-genómico) que sirven de templado para la generación de más RNA (genómico y subgenómico) de polaridad positiva (V'kovski, 2021). Esta síntesis se lleva a cabo en complejos replicativos que surgen del secuestro de membranas de la célula hospedadora para formar vesículas de doble membrana. Luego, a partir de los mRNA subgenómicos se sintetizan las proteínas estructurales y accesorias. El ensamblado ocurre con las hebras de RNA de largo genómico de polaridad positiva en el compartimiento intermedio entre el Retículo Endoplásmico y el Golgi (ERGIC), allí se forman las partículas virales que luego brotan en vesículas, resultando en la liberación de viriones infecciosos que dependiendo del nivel pueden destruir o no a la célula hospedadora. Los viriones comienzan a liberarse a las 4-7 horas post infección (Flint et al., 2015).

El modelo más aceptado a partir del cual se producen los mRNA es el de transcripción discontinua, que involucra el RNA genómico, el complejo sintetasa y factores de la célula hospedadora (Sawicki & Sawicki, 1995). La transcripción del RNA anti-genómico comienza a partir del extremo 3' y a medida que la polimerasa avanza se encuentra con alguna de las Secuencias Regulatorias de Transcripción (TRS) que tienen entre 6-9 nucleótidos. A lo largo del genoma viral existen varias TRS que están presente en el final de la secuencia *leader* y en cada

segmento intergénico del RNA genómico. Al alcanzar alguna TRS, la polimerasa puede continuar la síntesis de una cadena más larga o soltarse y cambiar de templado para copiar la secuencia *leader* y concluir la formación de las hebras negativas de RNA subgenómico. A partir de estas hebras negativas se transcriben los mRNA que, aunque tengan estructura policistrónica, son funcionalmente monocistrónicos porque solo se traduce la proteína del extremo 5' (V'kovski et al., 2021).

1.5 Caracterización

La caracterización de las variantes de IBV es de vital importancia ya que conocer el tipo de virus actuante permite implementar la estrategia de prevención más adecuada. La misma se realiza determinando la relación del aislamiento incógnita con variantes virales conocidas, de modo de poder incluir al primero dentro de un sistema de clasificación establecida.

Las variantes de IBV pueden caracterizarse empleando pruebas no funcionales, y funcionales. Las pruebas no funcionales se basan en el estudio del genoma viral, caracterizan a las variantes por genotipo. Mientras que las pruebas funcionales evalúan la función biológica del virus, y permiten la caracterización por serotipo y protectotipo.

- Genotipo

La clasificación por genotipo se lleva a cabo secuenciando el aislamiento de forma parcial o completa y comparándolo con secuencias de referencia. Por lo general, se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) la secuencia codificante de S1 o las HVR (aminoácidos 38–67, 91–141 y 274–387) (Cavanagh et al., 1988; Moore et al., 1997). Esas secuencias se alinean con secuencias de referencia y de acuerdo la cercanía genética con alguna de ellas se establece la pertenencia a un grupo genético o linaje. La clasificación más utilizada en la actualidad es la propuesta por Valastro y colaboradores en la que todas las variantes de IBV identificadas alrededor del mundo se organizaron en 6 genotipos divididos en 32 linajes (Valastro et al., 2016).

- Serotipo

La clasificación serológica o antigénica puede realizarse a través de estudios de virus neutralización cruzada (VNC), donde se emplean virus y antisueros específicos de variantes virales conocidas enfrentado al aislamiento que se desea caracterizar (Jackwood & de Wit, 2020). El ensayo determina la diferencia (o similitud) en la capacidad neutralizante de los anticuerpos específicos enfrentados al virus incógnita comparado con la neutralización del virus homólogo.

Esto se lleva a cabo habitualmente empleando embriones de pollo (EP) libres de patógenos específicos (SPF) o cultivos de células (Dufour-Zavala, 2008; Jackwood & de Wit, 2020; Zhou et al., 2022).

Cavanagh y colaboradores propusieron que existe una correlación entre el genotipo y el serotipo (Cavanagh et al., 2005). Por lo general las secuencias que difieren entre 20-25% y hasta 50% de sus aminoácidos en la S1, son de serotipos distintos. Sin embargo, existen excepciones como en el caso de las cepas Massachusetts y Connecticut o las cepas GA98 y DE072, cuya diferencia de aminoácidos es menor al 11% pero son serotipos distintos (Lee et al., 2001).

- **Protectotipo**

La clasificación por protectotipo compara si la respuesta inmune generada en un hospedador por la inoculación de una cepa o una combinación de cepas es suficiente para evitar las consecuencias de la infección con un virus de serotipo distinto. Este método ha sido utilizado por las compañías elaboradoras de vacunas para fomentar el uso de vacunas contra virus heterólogos (Sjaak de Wit, et al., 2011).

1.6 Transmisión

IBV es altamente contagioso. A pesar de ser un virus envuelto que se inactiva fácilmente con desinfectantes, puede permanecer activo en los galpones durante un tiempo prolongado, sobre todo cuando hay baja temperatura, alta humedad y materia orgánica en el ambiente (Jackwood & de Wit, 2020). La transmisión puede ser por contacto con animales infectados, a través de inhalación de aerosoles o ingestión de partículas virales en excretas o por contacto con fómites. La vía más importante de diseminación del virus es la respiratoria. Se ha demostrado que el pico de diseminación se produce cuando la carga viral en tráquea es alta, a los 3-5 días post-infección (Cavanagh, 2007). Otras vías de diseminación incluyen el tracto digestivo y urinario, vehiculizando al virus en heces y orina. Un fenómeno interesante que presenta este virus es el de la persistencia viral. Se ha observado que en ocasiones los animales infectados pueden dejar de diseminar virus sin que se haya producido el *clearance* viral. Durante ese tiempo de “silencio”, el IBV permanece en el organismo de las aves acantonado en las tonsilas cecales sin que se verifique diseminación viral. Sin embargo, la misma puede reiniciarse si los animales son sometidos a algún tipo de estrés o inmunodepresión (Bhattacharjee et al., 1995; Jones & Ambali, 1987).

1.7 Patogenia

Bronquitis infecciosa puede afectar a animales de todas las categorías productivas y de cualquier edad. La aparición de la enfermedad depende de características de: i) el agente (variante viral, tropismo, virulencia, y patogenicidad), ii) el hospedador (genética, sexo, edad, estado inmunológico) y iii) el ambiente (densidad de aves, niveles de amoníaco, temperatura, polvo, etc.) (Jackwood & de Wit, 2020; Raj & Jones, 1997).

El virus ingresa al organismo por la mucosa nasal o conjuntiva ocular donde comienza la replicación viral, diseminándose luego a las células epiteliales de la glándula de Harder y del tracto respiratorio (Hoerr, 2021). El virus puede detectarse en monocitos en sangre periférica tan pronto como 2 días post-infección y por esta vía puede alcanzar riñones, hígado y bazo (Reddy et al., 2016). Dependiendo del tropismo de la cepa y la replicación viral, el daño tisular puede ser significativo en riñones, oviducto, testículos e incluso se han reportado lesiones en proventrículo e intestino (Yu et al., 2001). La detección de IBV en los tejidos del animal infectado depende de la variante viral involucrada. En general, el virus puede detectarse en tráquea a partir de las 21 horas post-infección (hpi) y luego de 1 día en pulmones, riñones, testículos, ovario, oviducto y tonsilas cecales (Hoerr, 2021). La detección puede extenderse hasta 15 días en riñón y por más de 20 días en tonsilas cecales (Alexander & Gough, 1977; Boroomand et al., 2012; Dolz et al., 2012; Hoerr, 2021). Como se mencionó previamente, IBV puede persistir en tejidos (tonsilas cecales) de las aves por tiempo prolongado, aunque el mecanismo de este fenómeno no ha sido dilucidado aún.

Todas las variantes virales (incluso las vacunales) inician la replicación en el tracto respiratorio y de acuerdo con la virulencia de la cepa pueden generar signos clínicos (conjuntivitis, estornudos, distrés respiratorio) de diferente severidad. También, como consecuencia del daño producido en el epitelio de las mucosas pueden facilitar la colonización de agentes patógenos secundarios tales como: *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Avibacterium paragallinarum*. Estos agentes bacterianos agravan la salud del plantel generando cuadros de aerosaculitis, síndrome de cabeza hinchada, etc. (Jackwood & de Wit, 2020). Asimismo, existen variantes de IBV con tropismo por el parénquima renal (variantes nefropatógenas), que producen diferentes grados de nefropatías. La gravedad de este tipo de lesión está vinculada al linaje y edad (pollos parrilleros jóvenes), sexo (más grave en machos) y dieta (alta concentración de calcio y proteína en el alimento) (Albassam et al., 1986; Glahn et al., 1989). También hay variantes que pueden ocasionar enfermedad reproductiva: en las hembras esto puede manifestarse como síndrome de la falsa ponedora, baja postura y pérdida de la calidad de huevo; y en los machos, con baja

fertilidad. En algunos casos se han reportado lesiones del tracto digestivo (proventriculitis) asociados a IBV, aunque esto se ha puesto en duda al no poder reproducirse las lesiones descritas en infecciones experimentales con la cepa aislada (Wang et al., 1998; Yu et al., 2001).

1.8 Signos clínicos

Los animales pueden presentar signos entre 18- 36 horas después de la infección, la gravedad depende del clima, instalaciones, limpieza, genética del animal, variante viral involucrada, infecciones concurrentes y vacunas recibidas (Raj & Jones, 1997).

Pueden observarse signos respiratorios con duración de 3-14 días, como jadeo, estornudos, tos, rales traqueales y descarga nasal; signos generales como decaimiento, amontonamiento de animales debajo de fuentes de calor, reducción del consumo y de la ganancia de peso, empeorando el índice de conversión (Jackwood & de Wit, 2020). En los cuadros nefropatogénicos, los animales se recuperan del cuadro respiratorio para luego padecer depresión, plumas desordenadas, heces húmedas, incremento de la ingesta de agua y aumento del índice de mortalidad (Jackwood & de Wit, 2020).

En las gallinas ponedoras, la postura puede caer hasta un 70%, luego de lo cual se recupera en 2-3 semanas, aunque nunca logran alcanzar el pico de producción previo (Cavanagh, 2007). Si la infección ocurre durante las primeras dos semanas de vida, puede ocasionar síndrome de la “falsa ponedora”. Este síndrome ocurre cuando el virus replica en el oviducto afectando el desarrollo posterior. Las gallinas crecen y presentan características normales de la madurez sexual, pero son incapaces de producir huevos (da Silva et al., 2021). Además, IBV puede infectar a gallinas ponedoras y reproductoras en producción, afectando la calidad del huevo (alteración de la albumina, presencia de sangre, cascara más fina, sin pigmentación, rugosa o ausente). En los machos adulto puede ocasionar infertilidad (Hoerr, 2021).

1.9 Lesiones

Las lesiones ocasionadas por IBV pueden dividirse en lesiones macroscópicas y microscópicas. Estas lesiones pueden afectar diversos órganos, pero en particular afectan al aparato respiratorio, tejido renal y aparato reproductor.

1.9.1 Lesiones macroscópicas:

Lesiones en cabeza y tracto respiratorio

Las primeras manifestaciones de la enfermedad suele ser conjuntivitis con epifora y edema periorbital, seguido de sinusitis y traqueítis con presencia de exudado seroso, catarral o caseoso

(Terregino et al., 2008). En la necropsia suele verse la mucosa traqueal hiperémica, con presencia de petequias y exudado catarral o caseoso. Estos exudados pueden acumularse en la siringe (que es lo que ocasiona una severa dificultad respiratoria). Los pulmones, en la etapa aguda, suelen presentar congestión e incluso puede haber neumonía catarral o fibrino purulenta, sobre todo si existe coinfección con un patógeno bacteriano, como con *Escherichia coli* u *Ornithobacterium rhinotracheale* (Dwars et al. 2009; Weerts et al. 2021; van Empel et al., 1996). Los sacos aéreos pueden verse edematizados, cubiertos con un fluido seroso de aspecto espumoso que en etapas más avanzadas cambia a catarral o caseoso blanco con tonalidades amarillentas (Butcher et al, 1990).

Lesiones renales

Cuando la variante es nefropatógena los riñones se ven congestivos o pálidos con tonalidades rojizas y grisáceas. Los lóbulos aparecen tumefactos protruyendo desde la fosa retroperitoneal con los túbulos y uréteres distendidos por depósitos de uratos (Jackwood & de Wit, 2020).

Lesiones reproductivas

En gallinas adultas (ponedoras y reproductoras) puede haber peritonitis relacionada a la liberación de las yemas en la cavidad celómica por constricción segmental del oviducto, el cual puede presentar malformación con formación de quistes. Los ovarios también pueden presentar regresión (Crinion & Hofstad, 1972).

1.9.2 Lesiones microscópicas:

Lesiones respiratorias

Las lesiones más importantes se manifiestan en el epitelio mucoso de la tráquea donde se observa pérdida de las cilias, vacuolización del citoplasma, redondeamiento, necrosis y exfoliación de las células infectadas. No es infrecuente la aparición de hiperplasia y/o metaplasia de las células epiteliales. En la *lámina propria* de la mucosa se observa edema con infiltración de linfocitos y heterófilos. En mucosa y submucosa las células linfoides pueden incluso organizarse formando centros germinales (Riddell,1987). Además, las glándulas mucosas suelen estar “ensanchadas” por la excesiva producción de mucus (que se libera al lumen) y al mismo tiempo hay pérdida de células caliciformes. En la superficie de la mucosa se puede observar acumulación de células inflamatorias y epitelio necrótico. El epitelio comienza a regenerarse a las 48 horas post-infección, pero las cilias recién se recuperan a partir de la semana (Jackwood & de Wit, 2020). En pulmón se observa lesiones de neumonía con infiltración de linfocitos y

heterófilos. En sacos aéreos hay diferentes grados de lesiones, desde edema a exudado sero-fibrinoso con descamación de las células epiteliales. A medida que progresa la enfermedad es evidente la presencia de heterófilos y pueden observarse nódulos linfoides, proliferación de fibroblastos y células cuboidales (Kotani et al., 2000).

Lesiones renales

En riñón se observa en forma característica nefritis intersticial linfocítica (con presencia inicial de heterófilos) con degeneración granular, vacuolización y descamación del epitelio tubular. Las lesiones en los túbulos se evidencian en áreas focales de necrosis con intentos de regeneración del epitelio. Durante la recuperación, la población de células inflamatorias cambia de heterófilos y linfocitos a células plasmáticas. En algunos casos los cambios degenerativos pueden persistir y resultar en una atrofia severa de una o todas las divisiones de las nefronas. Los uréteres pueden estar distendidos con uratos (Hoerr, 2021; Jackwood & de Wit, 2020).

1.10 Diagnóstico

Debido a la amplia variedad de enfermedades que producen signos respiratorios (por ejemplo, Enfermedad de Newcastle, Laringotraqueítis Infecciosa, Influenza Aviar de baja patogenicidad, Metapneumovirus o Micoplasmosis) el diagnóstico requiere pruebas de laboratorio, que permitan identificar el agente viral (Aiello & Moses, 2016).

Antiguamente el virus era identificado por aislamiento desde tejidos de animales sospechosos (signos clínicos y lesiones características) en EP. Esta técnica tiene baja sensibilidad analítica, es costosa y muy laboriosa, requiriendo mucho tiempo para concluirla ya que a veces requiere de varios pasajes en ciego por EP hasta que se evidencian las lesiones típicas (encorvamiento, enanismo, engrosamiento de las membranas, deformación de las patas, mortalidad, etc.) en el embrión (Jackwood & de Wit, 2020). Posteriormente se desarrollaron técnicas de detección basadas en la unión del virus a anticuerpos específicos. Un ejemplo de ello fue el empleo de la técnica inmunohistoquímica que identificaba al virus en cortes de tejidos. Esta técnica también era muy laboriosa, pero tenía la ventaja de identificar al virus en los tejidos lesionados (Abdel-Moneim et al., 2009). A finales del siglo XX y principio del siglo XXI se desarrollaron técnicas de detección basadas en la identificación de parte del genoma viral mediante biología molecular (RT-PCR). Actualmente, estas técnicas son empleadas casi exclusivamente para detectar IBV, sumándole en algunos casos el del análisis de secuencia para caracterizar la variante detectada. Por otro lado, en los últimos años, el desarrollo de la tecnología de PCR en tiempo real ha permitido realizar no solo la detección del virus (con la ventaja de procesar simultáneamente un

gran número de muestras) sino también estimar la cantidad de virus en la muestra. Esta es una característica muy útil para ensayos de infecciones experimentales que requieren cuantificar la carga viral (Watzinger et al., 2006; Ma et al., 2020; Mo et al., 2020).

Otras pruebas sirven para identificar la infección (o inmunización) mediante la detección de anticuerpos específicos. Dentro de este grupo de pruebas se encuentran la técnica de virus neutralización (o seroneutralización), el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y la inhibición de la hemaglutinación (de Wit et al., 1997; Marquardt et al., 1981; Mockett & Darbyshire, 1981). Esta última requiere un tratamiento especial del virus, ya que el IBV no aglutina eritrocitos en forma natural, lo cual agrega un paso más de complejidad al procedimiento. La técnica de ELISA en cambio es la más adecuada para evaluaciones de rutina, ya que le suma a la elevada sensibilidad característica de la técnica, mayor facilidad y rapidez para procesar un gran número de muestras (Mockett & Darbyshire, 1981). La desventaja del ELISA es que hasta el momento no hay reportes de desarrollos de este tipo de técnicas que permitan diferenciar anticuerpos de diferentes serotipos. En ese aspecto, la técnica de elección es la prueba de VNC. Las técnicas de detección de anticuerpos séricos pueden ser usadas para el diagnóstico; sin embargo, debe considerarse siempre que las mismas identifican (y eventualmente cuantifican) la respuesta inmune humoral, que puede haber sido promovida tanto por una infección de campo como por una vacunación (Jackwood & de Wit, 2020).

Alternativamente, la prueba de la ciliostasis evalúa el cese de la motilidad ciliar en muestras de tráquea. Debido a que en los primeros días de infección el IBV provoca ciliostasis se asume que evaluar la magnitud de esta sirve para categorizar la infección viral. Es una técnica muy empleada en ensayos de vacunas con desafío viral, dado que en muchas oportunidades no es posible implementar modelos de infección experimental que repliquen signos y lesiones de la infección a campo (de Wit et al., 2013). Además, al estar la ciliostasis relacionada con el aumento del riesgo de infección con otros patógenos, esta prueba es de gran importancia al evaluar la eficiencia de vacunas. Por otro lado, es una prueba extremadamente laboriosa que requiere de técnicos muy entrenados para su implementación, por lo cual solo está reservada a ensayos experimentales (Jordan, 2017).

1.11 Prevención y control de la enfermedad

La prevención y control de BI, al igual que sucede con otras enfermedades virales de las aves, se basa en la combinación de medidas generales de bioseguridad y vacunación (Jackwood & de Wit, 2013).

Las medidas de bioseguridad representan el mayor desafío en las granjas, ya que en muchos casos requieren de cambios de conductas muy arraigadas entre los productores (empresarios y granjeros). En términos muy generales se trata del conjunto de medidas que tienen como objetivo disminuir el riesgo de ingreso de un agente biológico (en este caso el IBV) a un establecimiento productivo. Entre estas medidas se encuentran: limpieza, desinfección y adecuado tiempo de descanso de las instalaciones entre ciclos productivos, descarte de desechos, recambio de cama, establecimiento de sistemas de producción de edad única, etc.

La vacunación, aunque se la suele mencionar como una actividad aparte, es técnicamente un procedimiento de bioseguridad ya que también se la emplea para disminuir el riesgo de entrada de un agente biológico. En el caso de IBV la vacunación debe contemplar las diferencias antigénicas que existen entre las diferentes cepas. Como se mencionó previamente, existen un gran número de variantes antigénicas o serológicas (serotipos). La “protección” cruzada entre variantes de IBV de diferentes serotipos (heterólogas) es baja o inexistente (Cavanagh et al., 1997). Para que la vacunación de un plantel sea eficaz, se debe conocer el serotipo de la variante de campo y vacunar con una cepa del mismo serotipo (homóloga). Debido a la elevada cantidad de serotipos de IBV circulantes, no siempre hay disponibles vacunas comerciales homólogas. Sin embargo, se ha observado que la vacunación con una combinación de cepas de diferentes serotipos incrementa ampliamente el espectro de cobertura de las vacunas individuales, “protegiendo” incluso contra virus de campo heterólogo al de las vacunas (Cook et al., 1999). Esta estrategia se denominó de “protectotipo” y ha sido extensamente empleada en todo el mundo. De todos modos, al no emplearse vacunas homólogas, cierto grado de replicación viral del virus de campo puede darse en los planteles lo cual podría favorecer la aparición de variantes de escape (Toro, 2021; Legnardi et al., 2020).

La eficacia no solo depende de la homología antigénica entre vacuna y virus de campo, también la edad de la vacunación (inmadurez del sistema inmune), presencia de anticuerpos maternos, la dosis empleada, el método e intervalo de aplicación y la inmunidad activa presente al momento de la vacunación pueden afectarla.

Existen diferentes tipos de vacunas disponibles en el mercado:

Vacunas atenuadas: Son las más usadas en la industria avícola, y en todas las categorías productivas. Se elaboran, mediante pasajes seriados en huevos embrionados SPF, hasta que el inóculo pierde atributos de virulencia y deja de provocar síntomas clínicos de la enfermedad (OIE, 2013, Cavanagh 2003). Como desventaja, estos cambios se producen por mutaciones al azar,

que pueden revertir a su forma virulenta (Hanley, 2011). Se administran al día de vida y en ocasiones, cuando el riesgo biológico es elevado, se repite la vacunación a los 14-18 días de edad, mediante métodos de administración masiva (spray de gota gruesa, aerosol, y agua de bebida) (Cavanagh, 2003).

Vacunas inactivadas: Se utilizan en aves de vida larga (ponedoras, padres, abuelos) para prolongar la inmunidad. Se administran al final de la etapa de recría, luego de la aplicación de al menos una dosis de vacuna atenuada. Para la elaboración de este tipo de vacuna, la cepa (llamada semilla) se amplifica en huevos embrionados SPF o cultivo celular y luego se inactiva con un compuesto químico, como el formaldehído, que destruye la capacidad infectiva (Cavanagh, 2003). La eficacia de este tipo de vacunas requiere una masa antigénica elevada y un adyuvante apropiado.

Nuevas alternativas: En los últimos años, con el avance tecnológico, se comenzaron a considerar nuevas plataformas vacunales como la expresión de proteínas que contengan los epítopes inmunodominantes del serotipo regional prevalente. Estos modelos de vacunas evitarían la formación del virión y con ello la infección y replicación en el hospedador. Un ejemplo de ello son los desarrollos que se han intentado con vacunas a subunidades y las vectorizadas, y como alternativa las vacunas a DNA (Kapczynski et al., 2003; Zuo et al., 2021; Eldemery et al., 2017; Jiang et al., 2020; Abozeid et al., 2019; Zegpi et al., 2020). La desventaja de estos tipos de vacunas es que su producción por lo general es costosa, carecen de la potencia de las vacunas atenuadas por lo que requieren más de una aplicación y no generan buenos niveles de respuesta inmune en las mucosas. Por otro lado, solo pueden ser administradas vía parenteral, lo cual no es factible en sistemas de producción industrial (Toro, 2021).

La elección de una estrategia correcta de vacunación implica el aislamiento y caracterización del agente interviniente y en base a ello elaborar el plan de prevención que considere el perfil antigénico de la variante regional. La mejor opción es el uso de una vacuna homóloga. Mientras mayor distancia antigénica exista entre la vacuna y la cepa circulante, menor es el nivel de cobertura. A mayor homología mayor inhibición de la replicación viral, lo que disminuye la diseminación y transmisibilidad del virus. Una vacuna homóloga correctamente aplicada debería generar inmunidad de tipo esterilizante. Por supuesto, que este objetivo muchas veces depende de factores diferentes al de la homología antigénica entre vacuna y virus de campo, como se mencionó previamente.

En otras palabras, el problema para una adecuada vacunación es la elevada variabilidad de IBV, que dificulta la existencia de vacunas para la diversidad de serotipos posibles. Como respuesta

a este inconveniente, una alternativa es vacunar con una combinación de serotipos heterólogos (Cook et al., 1999; Jackwood & de Wit, 2020; Tucciarone et al., 2018). Sin embargo, ante la aparición de una nueva variante lo adecuado es realizar una conveniente caracterización para establecer la identidad antigénica de la cepa problema y luego llevar adelante los estudios de “*vaccine matching*” que permitan establecer la variante (o combinación de variantes) a emplear en su prevención (de Wit et al., 2010).

1.12 Contexto productivo

La avicultura es la actividad pecuaria que más ha crecido en las últimas dos décadas en la República Argentina. En el último año (2022), se produjeron alrededor de 15291 millones de unidades de huevos y se faenaron unos 751 millones de cabezas. Esto último representa una producción anual de 2,335 millones de toneladas de carne aviar, de las cuales 190 mil se destinaron al mercado externo. Con este nivel de producción la República Argentina se posiciona como el octavo productor mundial y el noveno exportador (USDA, 2022). Para tener una dimensión de la importancia de esto, en el año 2016 en Argentina la producción de carne de pollo generó negocios por 3000 millones de dólares, lo que representó cerca del 0,6% del PBI y en 2017 la avicultura proporcionó ingresos por exportación cercanos a los 384 millones de dólares (MOTIVAR, 2017). La actividad avícola no solo produce proteína animal de alta calidad biológica, también genera un número significativo de puestos de trabajo en el ámbito rural. El total de aves de la producción avícola se distribuye del siguiente modo: el 71,3% son animales es carne, el 27% son aves livianas (postura) y el 1,6% reproductoras (CEPA, 2023).

En estos últimos años, debido a ventajas productivas y accesibilidad de precios, el consumo de carne aviar en Argentina alcanzó el valor de 45,71 Kg/persona/año. Esto es, solo 3 kilos por debajo del consumo de carne bovina. Por otro lado, el consumo de huevos viene mostrando una tendencia en alza, llegando en el 2022 a los 314 huevos/persona/año (Ministerio de Agricultura, 2022).

Lo expuesto hasta aquí es evidencia de la importancia estratégica que tiene la avicultura industrial para nuestro país. En este aspecto la eficiencia productiva o productividad es clave para darle continuidad al crecimiento avícola. Dicha eficiencia se basa en tres pilares, la Genética, la Nutrición y la Sanidad.

Si bien los tres pilares son importantes, la sanidad merece nuestra atención, ya que la ausencia de salud de los plantales se traduce en baja performance productiva y consecuentemente en un impacto económico del sector. Existen diversos agentes patógenos que afectan la salud

productiva de las aves. Dentro de los de naturaleza viral el más importante en nuestro país (antes del ingreso de Influenza Aviar) es el Virus de la Bronquitis Infecciosa.

1.13 Historia

Bronquitis Infecciosa fue descrita en 1931 en Estados Unidos, casi 30 años antes de que se reportara la primera enfermedad humana causada por un coronavirus (Schalk, 1931). En esa oportunidad, Schalk y Hawn reportaron “una enfermedad aparentemente nueva” que afectaba a pollos de 2 a 3 semanas de edad y causaba signos respiratorios agudos. En los primeros años la “nueva” entidad fue confundida con Laringotraqueítis Infecciosa debido a cierta similitud entre sus signos, lesiones y a que el agente etiológico era filtrable (Bushnell & Brandly, 1933). Posteriormente, en el año 1936, empleando experimentos de neutralización e inmunidad cruzada, se confirmó que el agente responsable de BI era distinto del de la Laringotraqueítis Infecciosa, denominándose IBV (Beach & Schalm, 1936).

En aquellos años, diversos trabajos científicos sentaron la base de los experimentos que en la actualidad se usan para estudiar Bronquitis. En 1937, Beaudette y Hudson lograron aislar y propagar el virus por inoculación en EP (Beaudette & Hudson, 1937). Fabricant utilizó esta técnica para estudiar las lesiones virales que hoy son consideradas de fundamental importancia para el aislamiento de IBV (Fabricant, 1949). En el año 1942, Van Roeckel y colaboradores contribuyeron a la caracterización serológica empleando huevos embrionados sugiriendo la posibilidad de usar cepas de baja patogenicidad en la inmunización de animales (Cunningham, 1960; Fabricant, 1951; Van Roeckel, 1942). Es así como diseñaron una estrategia para evitar los brotes de la enfermedad mediante una infección controlada. Para ello, emplearon una cepa amplificada en EP, que fue inoculada en una proporción de aves de un plantel, permitiendo que el resto se infectara por diseminación natural, protegiendo a los animales frente a una eventual re-infección (Van Roeckel, 1942). La eficacia de este método como estrategia preventiva llevó a varios productores de los EE. UU. a recurrir a estaciones experimentales en busca de aislamientos de IBV para lograr los mismos resultados. Esta situación se prolongó en los EE. UU. hasta que las vacunas lograron la aprobación federal y estuvieron disponibles en el mercado. Por otra parte, En 1941 Delaplane y Stuart reportaron la posibilidad de atenuar el virus a través de pasajes repetidos en EP. Ellos notaron que mediante este procedimiento se incrementó la patogenicidad para el embrión, pero se redujo en los pollos (Delaplane & Stuart, 1941). De este modo se sentaron los principios de la elaboración de vacunas que tuvo una rápida aceptación y que es, hasta estos días, fundamental para el control de BI a nivel mundial.

Sin embargo, nuevos brotes de BI siguieron apareciendo incluso en animales presuntamente inmunizados. En 1956, Jungherr reportó el aislamiento de una nueva cepa de IBV (que llamó Connecticut), la cual no mostraba relación antigénica en pruebas de neutralización cruzada con las variantes hasta entonces conocidas de la cepa Massachusetts (Jungherr et al., 1957). Durante la década de los '70 y '80, diversos trabajos científicos se dedicaron a encontrar variantes de BI mediante estudios de virus neutralización (Cowen & Hitchner, 1975; Dawson & Gough, 1971; Gelb et al., 1981; Hidalgo et al., 1976; Johnson & Marquardt, 1976; Jones, 1976; Otsuki et al., 1987). Posteriormente, el surgimiento de herramientas moleculares permitió la secuenciación del primer genoma completo de IBV (Boursnell et al., 1987), optimizó el diagnóstico y permitió comparar las cada vez más numerosas variantes virales que se reportan en el mundo.

1.14 Presencia de IBV en sudamérica

El primer reporte de presencia de BI en Sudamérica se debe a Osmane Hipólito, quien detectó anticuerpos contra IBV de serotipo Massachusetts en muestras de pollos comerciales en Brasil en 1957 (Hipólito, 1957; Silva, 2010). Unos años después, en 1965, investigadores de INTA aislaron el virus de una muestra de pollos proveniente de Basavilbaso (provincia de Entre Ríos) y mediante pruebas de virus neutralización determinaron que también se trataba de una variante del serotipo Massachusetts (Polero y Smitzaart, 1965; Colusi & Garbini, 1965). A pesar de la temprana evidencia de circulación viral en Brasil, la BI clínica recién se identificó al intensificarse la producción avícola en 1975 (Silva, 2010). En Chile, se reportó la presencia viral en 1969, pero al igual que lo sucedido en Brasil, el primer aislamiento proveniente de un lote de pollos parrilleros con clara enfermedad respiratoria recién se realizó en 1975 (Hidalgo et al., 1976). En los siguientes años, tanto en Brasil como en Chile, se demostró la presencia de variantes virales de serotipo distinto a Massachusetts (Branden & Da Silva, 1986; Hidalgo et al., 1976). En 1986, cepas de tipo Arkansas fueron reportadas en Brasil (Branden & Da Silva, 1986) y para 1999 se afirmaba que por lo menos 5 tipos antigénicos se encontraban circulando en el territorio sur de aquel país (Di Fabio et al., 2000). En Chile, Cubillos y colaboradores reportaron una variante contra la cual la vacuna tipo Massachusetts no proveía protección adecuada (Cubillos et al., 1991).

El advenimiento de las técnicas moleculares aplicadas a la detección y clasificación de IBV, facilitaron la identificación de diferentes variantes de IBV en muchos países latinoamericanos (Alvarado et al., 2005; Rimondi et al., 2009; Villarreal et al., 2010). En nuestro país, un primer trabajo de caracterización molecular de muestras de casos de BI indicó la presencia de tres

variantes virales de campo (llamadas A, B y C) además de las vacunas Massachusetts y Connecticut (Rimondi et al., 2009). Sin embargo, ese trabajo fue realizado analizando dos de las tres regiones hipervariables del gen S1, lo cual representó un error metodológico, como fuera demostrado posteriormente. Estudios posteriores de caracterización basada en la totalidad del segmento S1 permitieron clasificar a las variantes de tipo A y B dentro del grupo A/SAII (Asia/Sudamérica II) y C dentro del grupo SAI (Sudamérica I) (Marandino et al., 2015). En 2016, Valastro y colaboradores realizaron un extenso trabajo de armonización de la clasificación genética de IBV analizando la secuencia de S1, estableciéndose de ese modo la existencia de 6 genotipos y 32 linajes (Valastro et al., 2016). Basado en el sistema propuesto las variantes SAI y A/SAI quedaron clasificadas como GI-11 y GI-16 respectivamente. Estos dos linajes han estado circulando en planteles sudamericanos por décadas (Marandino et al., 2015). El GI-11 es un linaje exclusivo sudamericano que ha sido reportado en Argentina, Uruguay y Brasil; aunque en los últimos años casi no ha habido detecciones de esta variante en nuestro país. Estudios filogenéticos sugieren que este linaje estuvo presente inclusive antes del primer reporte de BI (finales de la década de 1950) y antes de la introducción de las primeras vacunas, lo cual a su vez posiblemente contribuyó en su evolución y adaptación geográfica (Marandino et al., 2015). Por otro lado, GI-16 es un linaje de distribución intercontinental y su origen geográfico no está dilucidado por completo. Como consecuencia del trabajo de armonización de la clasificación de IBV muchas muestras previamente informadas comenzaron a incluirse dentro del linaje GI-16. Es el caso de las cepas chinas Q1, J2, y T3, reportadas en el año 1996 pero que fueron integradas al linaje GI-16 en 2016 (Valastro et al., 2016). Lo mismo sucedió con las cepas italianas IZO28/86 y 624/I, que fueron reportadas en 1986 y 1993, pero cuya relación genética con Q1 se confirmó recién en 2018 (Laconi et al., 2019). Estudios filogenéticos sugieren que el origen de GI-16 ocurrió en Italia en 1983 y que a finales de 1980 se estableció en Asia, región que se convirtió en el núcleo principal para la diseminación a Medio Oriente, Europa y Sudamérica (Franzo et al., 2018). En Sudamérica, se ha reportado en Argentina, Chile, Uruguay, Colombia y Perú, aunque en la actualidad pareciera tener mayor fuerza y predominancia en Argentina y Chile (Marandino et al., 2015; Marandino et al., 2019; Tataje-Lavanda et al., 2019).

En la Argentina, además de los linajes GI-11 y GI-16, circulan en los planteles avícolas variantes de IBV que están relacionadas a las vacunas autorizadas. Estas vacunas son diferentes cepas de los serotipos Massachusetts y Connecticut (GI-1), que vienen empleándose en el país desde fines de la década de 1960. También cepas del serotipo 793/B (GI-13), las cuales han sido aprobadas para su uso en Argentina en junio de 2013. En la **Figura 4** se muestra una

representación de los linajes presentes en nuestro país y las cepas que trabajaremos en esta tesis.

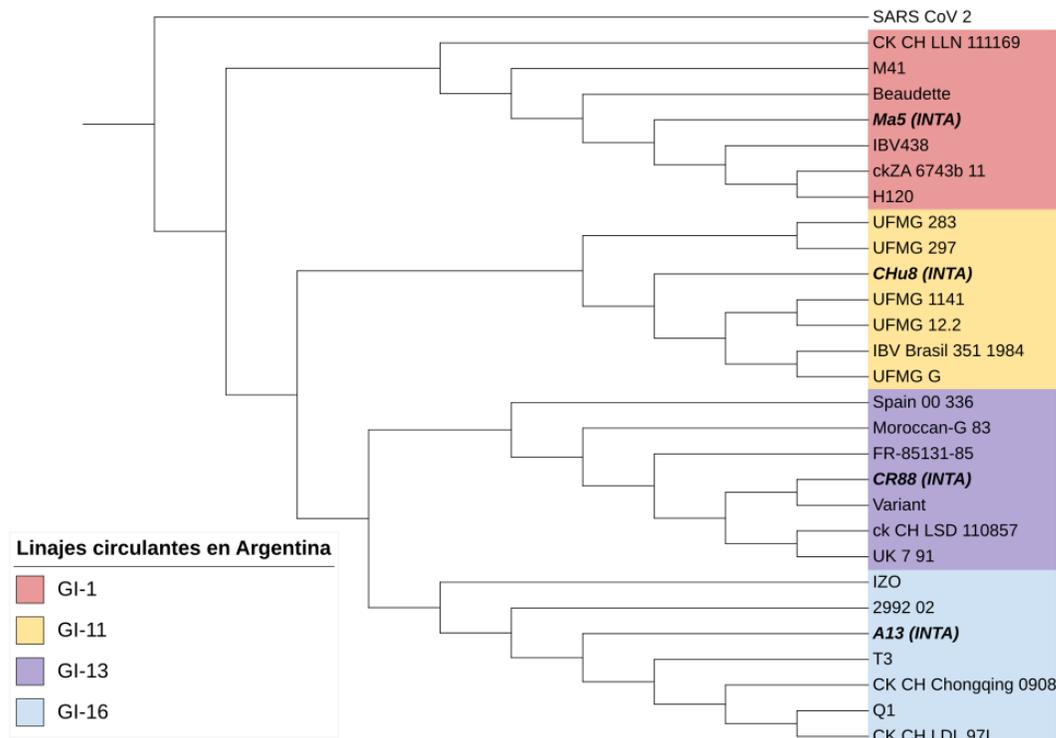


Figura 4. Árbol filogenético representando los linajes presentes en el país. Incluye variantes del linaje GI-1 : Beaudette (M95169), M41 (AY561711), H120 (FJ888351), CK/CH/LLN/111169 (KF411040), ckZA/6743b/11 (KJ200289), IBV438 (KF809793); GI-11 : UFMG/G (JX182775), UFMG/297 (JX182785), UFMG/283 (JX182787), IBV/Brasil/351/1984 (GU393339), UFMG/12.2 (JX182777), UFMG/1141 (JX182783); GI-13 : Moroccan-G/83 (EU914938), FR-85131-85 (AJ618985), UK/7/91 (Z83975), Variant 1 (AF093795), Spain/00/336 (DQ386098), ck/CH/LSD/110857 (JQ739375); GI-16 : IZO 28/86 (KJ941019), CK/CH/LDL/971 (EF030995), T3 (AF227438), Q1 (AF286302), 2992/02 (AY606323), CK/CH/Chongqing/0908 (GU938413), D1466 (M21971), V1397 (M21968); las cepas circulantes en Argentina A13(INTA), CHu8(INTA), Ma5(INTA), y CR88(INTA); y a SARS_CoV_2(NC_045512.2) como outgroup. Las secuencias representantes de los linajes se obtuvieron del trabajo de Valastro y colaboradores para la armonización de la clasificación de variantes de IBV (Valastro et al., 2016), las cepas argentinas se obtuvieron de aislamientos de campo y vacunas comerciales, y la secuencia de SARS_CoV_2 fue tomada del GenBank. La base de datos fue alineada con el software ClustalO, visualizada y editada con BioEdit, y se analizó la inferencia filogenética por Máxima Verosimilitud con IQtree. Finalmente, la visualización y edición del árbol se llevó a cabo con el software online iTOL - interactive Tree Of Life.

1.15 Bronquitis infecciosa en Argentina

En general, los casos de bronquitis infecciosa (BI) en Argentina tienen una tasa de mortalidad del 5% o menos. Sin embargo, en ocasiones se producen brotes que desafían los esquemas de

prevención convencionales. El caso más extremo ocurrió en el año 2013, cuando hubo un brote de BI en granjas de parrilleros en el departamento Uruguay de la provincia de Entre Ríos, con reportes de mortalidad superiores al 20% (hasta 40%). El virus fue identificado por INTA como perteneciente al genotipo A (posteriormente reclasificado como GI-16). Aun cuando se identificaron diferentes factores asociados a estos brotes, se le puso especial énfasis en la ineficacia de la vacuna para proteger contra un virus al que se llamó vulgarmente “variante”. Es importante mencionar que, en nuestro país, hasta el mencionado brote, solo estaban autorizadas las vacunas de los serotipos Massachusetts y Connecticut, aunque en la práctica las empresas avícolas solo vacunaban con Massachusetts al día de edad. En ese contexto, las compañías de vacunas presionaron fuertemente para que se permita la entrada de nuevas vacunas formuladas con un nuevo serotipo de IBV, específicamente el serotipo 793/B (vacunas 4/91, 1/96 y CR/88). Esto representaba un gran riesgo dado que se trataba de vacunas vivas elaboradas con un genotipo inédito en la región, de un virus con un elevado potencial para recombinar. Por otro lado, en ese momento no había un modelo de infección de IBV disponible para llevar a cabo trabajos de protección con desafío (*vaccine matching*) que justifiquen el uso de dicha vacuna viva atenuada. Las nuevas vacunas fueron de todos modos aprobadas para su uso para ser usadas en combinación con el serotipo Massachusetts, suponiendo que tal combinación (protectotipo) podría otorgar una cobertura adecuada contra la variante GI-16. Posteriormente, se demostró que el uso de la combinación de los serotipos Massachusetts con 793/B no ofrecía una mejora sustancial comparado con la combinación Massachusetts con Connecticut (Gerez et al., 2021). Adicionalmente, se llevaron a cabo estudios de caracterización antigénica indican baja relación antigénica entre aislamientos de GI-16 y cepas de los linajes vacunales GI-1 y GI-13 (Marandino et al., 2018; Guzman et al., 2019, Gerez et al., 2021). Estos trabajos sugieren que, dada la baja similitud genética y antigénica entre GI-16 y las vacunas de los linajes GI-1 y GI-16, el desarrollo de una vacuna homóloga a GI-16 debería ser desarrollada. Fundamentalmente, para su uso en pollos parrilleros, ya que las empresas avícolas en Argentina realizan normalmente una única vacunación (al día de vida) con una única variante vacunal (Massachusetts o 793/B).

1.16 Propuesta de tesis

Dada la incompleta información referida a la identidad antigénica entre GI-16 y los linajes vacunales GI-1 y GI-13, en esta tesis nos hemos propuesto avanzar hasta completar la caracterización antigénica. Sumado a ello, llevar a cabo un estudio de evolución viral mediante pasajes en serie de los virus autóctonos del linaje GI-11 y GI-16, tanto en el hospedador natural

INTRODUCCIÓN

(*Gallus gallus domesticus*) como en un soporte biológico alternativo que permita la replicación del virus (embrión de pollo y/o cultivo primario). Se espera que estos pasajes en serie produzcan cambios genéticos que eventualmente se traduzcan en cambios fenotípicos que brinde información para estudios de evolución viral. Además, de la actividad de los pasajes en serie pretendemos obtener variantes adaptadas de mayor virulencia para ser empleados en modelos de infección y de menor virulencia (atenuadas) para el desarrollo de una vacuna viva atenuada elaborada con un aislamiento autóctona perteneciente al linaje GI-16.

2. Hipótesis

La Bronquitis Infecciosa es una enfermedad viral, de presentación aguda y altamente contagiosa, que tiene elevada prevalencia en la Argentina. El agente etiológico es el Virus de la Bronquitis Infecciosa, que tiene como característica principal la elevada variabilidad genética que eventualmente se manifiesta en modificaciones fenotípicas (variabilidad antigénica, aumento o disminución de la virulencia y/o cambio en el tropismo tisular). El control de la enfermedad se realiza mediante la vacunación con cepas homólogas a la responsable del problema sanitario. Vacunas heterólogas confieren baja protección cruzada o ninguna protección. Por ello:

- La caracterización antigénica de las variantes circulantes en la Argentina permitirá determinar la distancia antigénica con las vacunas autorizadas en el país (de serotipo Massachusetts, y 793B), y de esta forma inferir el nivel de protección cruzada.
- Las características biológicas de una cepa de IBV pueden ser manipuladas a través de sucesivos pasajes en serie, de modo que: *i)* los pasajes en serie en embrión de pollo, permitirán obtener un producto de baja virulencia con potencial para ser empleado como vacuna atenuada; *ii)* los pasajes en cultivo primario, permitirán obtener un inóculo capaz de producir lesiones cuantificables, que puedan emplearse como soporte alternativo para virus neutralización (VN); *iii)* los pasajes en hospedador natural, permitirán incrementar la virulencia del aislamiento original para usarlo en infecciones experimentales; *iv)* todas estas modificaciones podrán ser estudiadas a través de cambios moleculares en el genoma viral.
- El desarrollo, puesta a punto e implementación de un modelo de infección experimental servirá para realizar pruebas de eficiencia de vacunas y verificar tanto la pertinencia del uso de los serotipos vacunales en estudio como la conveniencia de incluir nuevos serotipos en el control regional de IBV.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General:

Caracterizar antigénicamente al aislamiento de campo A13 (perteneciente al linaje GI-16) y estudiar si existe algún nivel de respuesta inmune cruzada entre el mismo y los serotipos autorizados para ser empleados como vacunas en Argentina.

Como parte de un estudio integral de las variantes de IBV presentes en la región se propone realizar un estudio de evolución viral mediante el análisis de los cambios genéticos que se observen luego de la adaptación a diferentes soportes biológicos (Embrión de pollo, cultivo celular de riñón de embrión de pollo y hospedador natural) por pasajes en serie.

Mediante esos pasajes en serie generar modificaciones fenotípicas del aislamiento A13 para obtener una cepa atenuada con potencial para ser empleado como vacuna.

3.2 Objetivos específicos:

- 1) Estimar la cercanía antigénica de las variantes de campo de IBV de los linajes GI-11 y GI-16 entre sí y con los serotipos autorizados para ser usados como vacunas en la Argentina (Massachusetts y 793/B). Para ello se deberá:
 - Aislar, amplificar y titular cepas de cada uno de los linajes a evaluar
 - Producir los antisueros específicos de cada una de las variantes de campo y de los serotipos Massachusetts y 793/B.
 - Mediante pruebas de virus neutralización cruzada en embrión de pollo estimar las relaciones antigénicas entre las variantes
 - Desarrollar e implementar un sistema de virus neutralización alternativo al de infección en embrión de pollo (menos costoso y laborioso) para aplicarlo a estudios de virus neutralización cruzada de IBV.
- 2) Realizar pasajes en serie (en hospedador natural, en embrión de pollo y cultivo primario) de las variantes circulantes y a partir de estos pasajes:
 - Llevar a cabo un estudio de evolución viral.
 - Obtener un aislamiento de virulencia elevada para ser empleado en desarrollo de modelos de infección.

OBJETIVOS

- Obtener un aislamiento de virulencia baja o no virulento con potencial para ser empleado como vacuna viva atenuada autóctona.
- 3) Desarrollar, optimizar e implementar un modelo de infección experimental de IBV con una variante del linaje GI-16.
- Establecer las variables cuantificables que mejor caractericen la infección experimental
 - Desarrollar las herramientas para cuantificarlas (escores clínicos, ciliostasis, carga viral, etc.), de modo que permitan ser usadas para evaluar patogenicidad y de ese modo aplicarlas en estudios de eficacia y/o eficiencia de vacunas
 - a. Optimizar sistema de evaluación de ciliostasis
 - b. Desarrollo y puesta a punto de una RT-PCR en tiempo real para cuantificar la carga viral en diferentes tejidos
- 4) Evaluar uno de los pasajes de A13 de baja patogenicidad que tenga potencial para ser empleado como vacuna.
- Realizar pruebas de inocuidad, estabilidad e inmunogenicidad
 - Determinar su capacidad para inhibir la replicación viral ante un desafío viral y compararla con la inducida con vacunas de los serotipos Massachusetts y 793/B en una prueba de eficiencia.

4. Materiales y Métodos

4.1 Caracterización antigénica

Con el propósito de establecer la identidad antigénica entre las cepas de campo y las cepas constituyentes de las vacunas se realizaron diferentes ensayos de VNC empleando EP y cultivo primario de células embrionarias.

4.1.1 Virus neutralización en embrión de pollo

Este ensayo se llevó a cabo en dos fases. En la primera se realizó la comparación antigénica entre A13 y Massachusetts, con los aislamientos A13 pasaje 7 (A13p7) y la cepa Ma5 pasaje 3 (Ma5p3). En la segunda etapa la comparación se realizó entre A13 y 793B, con el aislamiento A13p7 y la cepa CR88 pasaje 3 (CR88p3).

4.1.1.1 Virus

Se utilizaron: i) la cepa A13 (linaje GI-16) que fue originalmente aislada en el año 2013 de una granja localizada en la provincia de Buenos Aires; ii) La cepa Ma5 (serotipo Massachusetts, linaje GI-1), obtenida de la vacuna comercial Nobilis® MA5 (MSD) y iii) la cepa CR88 (serotipo 793B, linaje GI-13), obtenida de la vacuna comercial Gallivac® IB88 (Boehringer Ingelheim).

Estos virus fueron amplificados en EP SPF, provistos por Rosenbusch SA (CABA). Para ello, cada una de las cepas nombradas fue inoculada en EP SPF de 10 días de desarrollo, recolectando el líquido alantoideo a las 72-96 horas post-inoculación (hpi), momento en que se alcanza el mayor título viral. El material recolectado fue alicuotado, titulado y posteriormente almacenado a -70°C hasta su uso.

Para cada muestra se verificó la identidad genética por análisis de secuencia y la ausencia de contaminación (mediante el análisis por PCR y RT-PCR) de los siguientes patógenos: Reovirus Aviar (ARV), Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (IBDV), Adenovirus aviar (FadV), Virus de la Laringotraqueítis Infecciosa (ILTV) y Virus de la Anemia Infecciosa (CIAV).

4.1.1.2 Titulación viral

Las titulaciones se hicieron en EP SPF de 10 días de desarrollo. Para ello se llevaron a cabo 5 diluciones en serie base 10 (de 2×10^{-3} a 2×10^{-7}) del stock viral en PBS con agregado de penicilina (10000 IU/ml), estreptomina (5000 µg/ml), sulfato de gentamicina (1000 µg/ml), anfotericina B (10 µg/ml) y tilosina (0,5 µg/ml). Cada dilución de virus fue inoculada (0,1 ml) en EP (cinco réplicas por dilución) vía saco alantoideo. Los EP se incubaron durante 7 días a 37°C

y 55% de humedad, observándose diariamente descartando aquellos embriones muertos a las 24 hpi. Al cabo de 7 días pi (dpi) los embriones se revisaron para identificar las lesiones características de la infección de IBV y se calculó la Dosis Infecciosa del Embrión 50 (DIE₅₀) por el método de Reed & Muench (1938).

4.1.1.3 Suero hiperinmune

Se usaron sueros comerciales anti-Massachusetts y anti-793/B (Charles Rivers Laboratories, CT, EE. UU.). El suero hiperinmune anti-A13 fue obtenido empleando 6 pollos SPF (Rosenbusch, CABA) de entre 3 y 5 semanas de vida, que recibieron dos inoculaciones separadas por 14 días. La primera se realizó mediante vía intra-traqueal y la segunda vía endovenosa, según fue descrito previamente (Dufour-Zavala, 2008). En ambos casos se inocularon 10⁶ DIE₅₀ de IBV por ave. A los 14 días de la segunda inoculación se procedió a sangrar a los animales para la obtención de los sueros, que fueron almacenados a -20°C.

Todos los sueros fueron evaluados mediante ELISA comercial (IDEXX). La técnica se describe en el apartado 4.5.2.1.

4.1.1.4 Virus neutralización

La comparación antigénica entre A13 y las cepas vacunales se realizó, en primera instancia, mediante ensayos de VNC en EP SPF (Rosenbusch SA, CABA). El procedimiento de VNC se llevó a cabo empleando una concentración fija del virus de referencia enfrentado a diluciones seriadas (base 2) de suero específico homólogo y heterólogo (método β), según se indica en el manual de procedimientos serológicos (Thayer, 1998). En primer término, se comparó la identidad antigénica de A13 (A13p7) con la cepa vacunal Ma5 (Ma5p3) empleando un título viral de 10³ DIE₅₀/ml. En segundo término, se comparó la similitud antigénica entre A13 (A13p2) y la cepa vacunal CR88 (CR88p3) usando un título viral de 10⁴ DIE₅₀/ml. En ambos casos los virus se enfrentaron a diluciones seriadas (base 4) de sueros homólogos y heterólogos (5 réplicas por cada dilución). Las diluciones se realizaron con PBS adicionado de antibiótico y antifúngico (como se explicó anteriormente). Las mezclas de virus con cada dilución de suero fueron incubadas a 37°C por 60 minutos y luego se procedió a la inoculación de EP (de 10 días de desarrollo) vía saco alantoideo con 0,1 ml de inóculo en cada caso. Como controles positivos se inocularon EP con cada virus mezclado con PBS sin suero y como controles negativos los EP se inocularon con PBS. Todas las inoculaciones fueron realizadas por quintuplicado. Los EP se incubaron por 7 días a 37°C con saturación de humedad y fueron observados diariamente. Al cabo de 7 días, los embriones se inspeccionaron para evaluar la presencia de lesiones

características de infección de IBV, descartándose las muertes producidas en las primeras 24 hs (Thayer, 1998). Con el número de embriones infectados en cada dilución se calculó la dosis neutralizante 50 (ND₅₀) que a su vez fue usada para calcular el valor *r*.

4.1.1.5 Cálculo del valor *r*

El valor *r* determina la diferencia antigénica entre 2 virus en una reacción serológica cruzada. Este valor se obtiene aplicando la fórmula (como se muestra abajo) según fue establecida por Archetti & Horsfall (1950).

$$r = \sqrt{(r1 \times r2)}.$$

En donde *r1* es el cociente entre el título neutralizante del suero 1 y el virus 2 (heterólogo) y el suero 1 y el virus 1 (homólogo); y *r2* es el cociente entre el título neutralizante del suero 2 con el virus 1 (heterólogo) y el suero 2 con el virus 2 (homólogo). El valor *r*, es multiplicado por 100 para obtener el valor en porcentaje. Cuando *r* es mayor a 50% se considera alta similitud antigénica, en cambio sí *r* es menor al 50% pero mayor a 25% se considera una relación antigénica débil entre las variantes y cuando es menor a 25% la relación antigénica entre las variantes es baja o inexistente.

$$r1 = \frac{\text{Título VN heteróloga con el virus 2}}{\text{Título VN homologa con el virus 1}}$$

$$r2 = \frac{\text{Título VN heteróloga con el virus 1}}{\text{Título VN homologa con el virus 2}}$$

$$r = \sqrt{r1 \times r2} \times 100$$

4.1.2 Virus neutralización en cultivo celular

4.1.2.1 Virus

Para este ensayo se seleccionaron variantes virales previamente amplificadas en EP SPF, en las cuales se verificó identidad genética de la cepa y ausencia de otros patógenos aviares. Los pasajes de las cepas usadas fueron los siguientes: i) A13 pasajes 2 (A13p2), 10 (A13p10) y (A13p63); ii) Ma5 pasaje 3 (Ma5p3); iii) CR88 pasaje 3 (CR88p3) y iv) CHu8 (aislado en el 2011

de un establecimiento de reproductoras localizadas en la provincia de Entre Ríos) pasaje 10 (Chu8p10).

Para realizar la VNC cada uno de los virus mencionados debieron en primer término ser adaptados a cultivo primario de riñón de embrión de pollo (ChEK). La adaptación se llevó a cabo a través de pasajes en serie en ChEK. Para ello se inocularon las placas de cultivo celular (70 % de confluencia) con la muestra viral correspondiente. En cada pasaje se realizó la inoculación de 3 diluciones en base 10 (10^{-1} a 10^{-3}) de la cosecha del pasaje anterior. Una vez cargados los inóculos en las placas (300 μ l por pocillo) se procedió a incubar (en estufa con 5% de presión parcial de CO_2) las mismas para que se lleve a cabo la adsorción viral, durante 60 minutos a 37°C . Luego, se aspiró el inóculo, se realizó un lavado con PBS atemperado y se añadió medio de mantenimiento (con 2% de Suero Fetal Bovino). El cultivo se observó a diario en busca de efecto citopático (EC). Al séptimo día se realizó la cosecha viral luego de 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento. Los detritos celulares fueron removidos por clarificación (15 minutos de centrifugación a 3000 g a 4°C), la muestra se filtró a través de un filtro Micropore de 0,22 μm (JET BIOFIL, Guangzhou, China) y el sobrenadante se almacenó a -70°C hasta su uso en el siguiente pasaje. Cada 3 pasajes se corroboró la replicación e identidad viral a través de PCR y secuenciación.

4.1.2.2 Preparación de cultivos primario de riñón de embrión de pollo

Para la preparación de cultivos se tomaron entre 5 y 8 embriones de 18 días de desarrollo. Los riñones fueron removidos de las fosas renales de los embriones y colocados en un contenedor (vaso de precipitados) con PBS. Posteriormente, el parénquima renal fue luego disgregado con ayuda de tijeras y el tejido extra-parenquimal fue cuidadosamente separado. El material así procesado fue vertido dentro de un Erlenmeyer conteniendo 30-50 ml de PBS y sometido a agitación suave a temperatura ambiente por 3 minutos. Posteriormente, el material se dejó en reposo hasta decantación del tejido. El siguiente paso fue eliminar el sobrenadante y realizar la disgregación química con 30-50 ml de Tripsina 1:250 (Gibco) al 0,3%. Para ello se realizó el lavado y tratamiento con la enzima durante 15-20 minutos con agitación moderada. La mezcla resultante se filtró a través de gasa estéril, a un tubo de centrifuga de 200 ml conteniendo 30 ml de suero fetal bovino (SFB) provisto por Internegocios SA (Mercedes, Argentina). El material se centrifugó a 1500 rpm, a $10-15^\circ\text{C}$ de temperatura por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se suspendió el sedimento en 20 ml de medio 199 1X Gibco (Thermo Fisher, Waltham, MA, EE. UU.) suplementado con antibióticos [10000 IU/ml penicilina, 10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estreptomina] y SFB 10%. La cantidad de células en suspensión fue determinada con ayuda de un

hemocitómetro y se trabajó con concentraciones de 6×10^5 a 7×10^5 células/ml para la siembra de placas de 96 y 6 pocillos, respectivamente. Las placas de 96 fueron sembradas con 100 μ l/pocillo, mientras que las placas de 6 fueron sembradas con 3 ml/pocillo. La incubación llevó 24 horas aproximadamente, en una estufa a 37°C con una presión parcial de CO₂ de 5 %.

4.1.2.3 Titulación viral

Las variantes seleccionadas para su posterior empleo en el ensayo de VNC fueron los pasajes 11 en ChEK de las cepas Ma5, A13 y Chu8, y el pasaje 12 de la cepa CR88; las mismas fueron designadas como Ma5p3c11, A13p63c11, CHu8p10c11 y CR88p3c12, respectivamente. La titulación se hizo en placas de 96 pocillos sembradas con ChEK. Cuando el cultivo alcanzó una confluencia de 70% se descartó el medio de crecimiento, se lavó la monocapa con PBS estéril y se transfirieron 50 μ l de cada dilución por pocillo (4 réplicas por dilución). Se usaron diluciones seriadas en base 10 (de 10^{-1} a 10^{-6}) de cada virus a titular y como control negativo se usó PBS. El tiempo de adsorción fue de 60 minutos, luego se aspiró el inóculo, se lavó nuevamente la placa con PBS y se agregó 100 μ l de medio de mantenimiento (mismo medio de crecimiento, pero con 2% de SFB) a cada pocillo. Las placas fueron incubadas a 37°C en una estufa de CO₂ al 5% que fueron monitoreadas diariamente para detectar la aparición de efecto citopático (EC). Al cabo de 7 días las placas fueron tratadas con formol al 10% durante 20 minutos para fijar las células. Pasado ese tiempo se eliminó el formol mediante lavado con agua corriente y se realizó el teñido de las células con cristal violeta al 1% en etanol. El colorante se dejó actuar por 5 minutos antes de realizarse un último lavado con agua corriente. Los resultados se observaron frente a un fondo blanco. El título viral fue calculado con el método de punto final de Reed & Muench (1938) como Dosis Infecciosa en Cultivo Tisular 50 por mililitro (TCID₅₀/ml).

4.1.2.4 Evaluación de la dinámica de crecimiento en cultivo primario de riñón de embrión de pollo

Este ensayo se llevó a cabo en placas de 6 pocillos sembradas con ChEK (90% de confluencia). Las mismas fueron inoculadas siguiendo el protocolo descrito en 4.1.2.1. Se usaron las cepas Ma5p3c11, A13p63c11, CHu8p10c11 y CR88p3c12 con un título viral de 2×10^2 TCID₅₀/ml. Una vez inoculadas las células se cosecharon 300 μ l de muestra de virus cada 4 horas hasta las 12 hpi y luego cada 24 horas hasta el día 7 pi. En cada tiempo se cuantificó la carga viral por medio de la técnica de RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR).

4.1.2.5 Virus neutralización

La VN se llevó a cabo en placas de 96 pocillos sembradas con ChEK con una confluencia de 70%. Se usó el método β de virus neutralización, donde una concentración fija de virus es enfrentada a diluciones seriadas de suero (Dufour-Zavala, 2008). Las cepas virales utilizadas fueron A13p63c11, Chu8p10c11, Ma5p3c11 y CR88p3c12. Los sueros fueron los mismos utilizados en la VN en EP (4.1.1.3) con la adición de un suero hiperinmune específico para la cepa CHu8 que se obtuvo con el mismo procedimiento descrito para el suero anti A13.

Previo a su uso, los sueros fueron inactivados por 30 minutos a 56°C y luego se realizaron las diluciones (base 4) en PBS estéril. De esta forma las diluciones de trabajo fueron 1 (suero sin diluir), 1/4, 1/16, 1/64, y 1/256. Cada dilución de suero se mezcló luego, empleando volúmenes iguales, con el virus correspondiente, previamente diluido para tener un título de 2×10^2 TCID₅₀/ml. De este modo las diluciones finales de suero fueron 1/2, 1/8, 1/32, 1/128, y 1/512 (**Figura 5**). Estas mezclas fueron incubadas a 37 °C por 60 minutos y posteriormente se inocularon 50 μ l de cada mezcla por pocillo en placas de 96 (4 réplicas). Como control negativo se utilizaron 50 μ l de PBS estéril (4 réplicas), como control positivo se usó una dilución al medio del inóculo viral en PBS estéril (4 réplicas) y como control de suero se tomó el suero diluido a la mitad en PBS estéril (4 réplicas). El tiempo de adsorción fue de 60 min en estufa a 37°C y 5% de CO₂. Luego, se retiró el inóculo, se lavó la monocapa con PBS estéril y se añadieron 100 μ l de medio de mantenimiento (sin SFB). Las placas se observaron diariamente con microscopio óptico durante los siguientes días. Al cabo de 5 días, se fijaron las placas con formol al 10% durante 20 minutos, acto seguido se lavaron las placas con agua corriente, se adiciono colorante Cristal Violeta (1% en etanol) y se dejó actuar durante 5 minutos. Luego, se realizó nuevamente un lavado con agua corriente y se registró el resultado. Los títulos neutralizantes se calcularon mediante el método de punto final de Reed & Muench (1938) y se expresaron como Dosis Neutralizante 50 por mililitro (ND₅₀/ml) . Posteriormente se calculó el valor r para cada una de las VNC tal cual se detalla en el apartado 4.1.1.5.

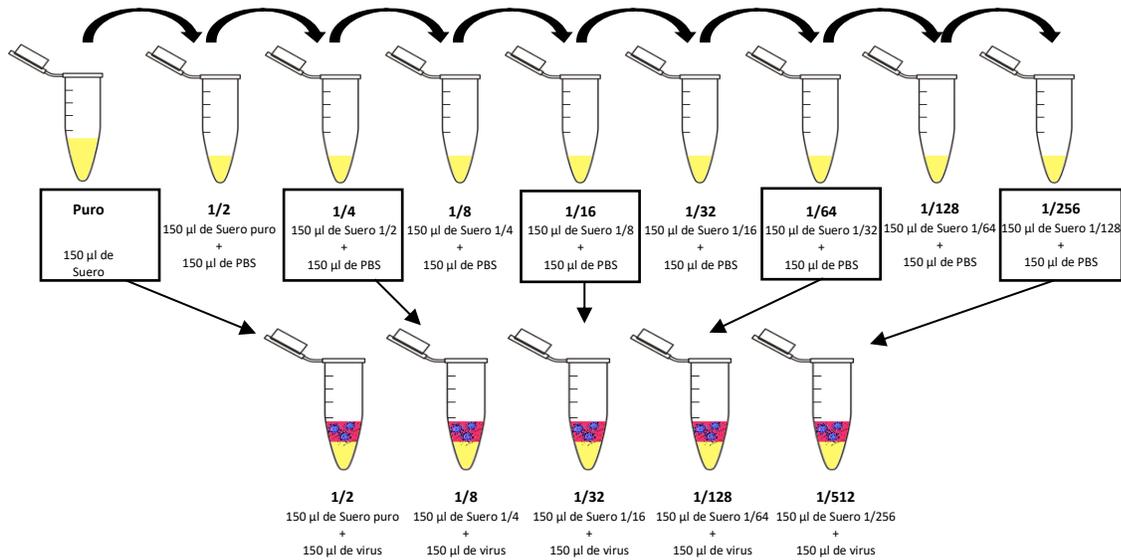


Figura 5. Virus neutralización por el método β . Procedimiento de obtención de las diluciones de suero para su enfrentamiento con el inóculo viral.

4.2. Estudio de evolución viral

4.2.1 Obtención de las secuencias de trabajo

Para el estudio de evolución viral se usaron cepas de IBV que fueron obtenidas por múltiples pasajes en EP, cultivo celular (ChEK) y hospedador natural (pollos SPF).

Las secuencias de los pasajes en EP se obtuvieron a través de la inoculación de 3 EP SPF de 10 días de desarrollo. Luego de tres días de incubación se cosechó el líquido alantoideo que se empleó como inóculo para el siguiente pasaje. Se llevaron a cabo 63 y 50 pasajes con la cepa A13 y CHu8, respectivamente.

Las secuencias de los pasajes en serie en cultivo celular se obtuvieron infectando placas de 6 pocillos con ChEK (70% de confluencia) que luego se cosecharon a los 5 dpi. El material obtenido se empleó como inóculo en el siguiente pasaje. En total se obtuvieron 14, 10, 11, 14 pasajes con las cepas A13, CHu8, Ma5, y CR88. Este procedimiento ha sido descrito con detalle en el apartado 4.1.2.1.

Para evaluar los cambios genéticos ocurridos como consecuencia del pasaje de A13 en hospedador natural se inocularon dos grupos de pollos SPF de 2 a 5 semanas, uno de ellos recibió un tratamiento inmunodepresor. A los 7 dpi, se llevó a cabo la eutanasia y toma de muestra de tejido renal que fue empleado en la obtención del siguiente pasaje. El análisis de las secuencias de los pasajes se hizo con las muestras del pasaje 10 del grupo con tratamiento inmunosupresor (KD10) y los pasajes 10 y 20 del grupo sin tratamiento previo (K10, y K20). El procedimiento se describe con mayor detalle en el apartado 4.3.1.

4.2.2 Análisis de secuencia de S1

Este análisis integra los resultados de dos metodologías de secuenciación: la secuenciación parcial de la S1, y el segmento correspondiente de las secuencias obtenidas a través de la secuenciación del genoma completo.

Las muestras analizadas incluyen los pasajes obtenidos en: i) EP (A13p10, A13p20, A13p30, A13p40, A13p50, A13p63, CHu8p10, CHu8p20, CHu8p30, CHu8p40, CHu8p50), ii) ChEK (A13p63c5, A13p63c10, A13p63c14, CHu8p10c5, CHu8p10c6, CHu8p10c10, Ma5p3c11 y CR88p3c13, CR88p3c14) y iii) hospedador natural (K10, KD10, K20).

4.2.3 Análisis de secuencias del genoma completo

El análisis de secuencia del genoma completo se realizó con muestras de los siguientes pasajes: i) EP (A13p10, A13p20, A13p30, A13p40, A13p50, A13p63, CHu8p10, CHu8p20, CHu8p30, CHu8p40, CHu8p50) y ii) ChEK (A13p63c5, A13p63c14, CHu8p10c5, y CR88p3c10).

4.2.4 Métodos de Secuenciación

4.2.4.1 Secuenciación de S1

El RNA viral fue extraído con el kit comercial High Pure Isolation Kit (Roche, Mannheim, Alemania). La retrotranscripción se realizó con la enzima Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV RT) de Promega (Madison, WI, USA). La amplificación se llevó a cabo con dos pares de primers: IBV-S1-20313-fw e IBV-S1-21076-rev, que amplifican un segmento de 785 pb del extremo 5' de la región S1; y IBV-S1-21001-fw e IBV-S1-22008-rev, que amplifican 1027 pb del extremo 3' de la S1. Los productos fueron purificados con el kit Easy Pure PCR purification kit (Transgen, Beijing, China). Estos ensayos se describen con mayor detalle en 5.1. Luego de la purificación, los productos fueron secuenciados mediante el método Sanger en electroforesis capilar, por un secuenciador Genetic Analyzer 3500xL (Applied Biosystems, Foster City, CA,

USA) con el kit de reacción Big Dye™ Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en la Unidad de Genómica del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) INTA Castelar.

4.2.4.2 Secuenciación del genoma completo por Illumina

La extracción de RNA se realizó utilizando el kit Quick-RNATM MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). La transcripción reversa y la síntesis de doble cadena se hicieron con Máxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y 13 µL del RNA extraído. Para la generación de las bibliotecas fue utilizado Nextera™ DNA Flex Library Preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA) y 1 ng de cDNA doble cadena. Las bibliotecas fueron purificadas con AMPure XP (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) y cuantificadas con Qubit dsDNA HS assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La calidad y longitud de las librerías fueron verificadas con Agilent high-sensitivity DNA kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) usando Fragment Analyzer™ System (Advanced Analytical Technologies, Inc., Heidelberg, Germany, Europa). La secuenciación fue realizada en la plataforma MiniSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) de la Plataforma Genómica de la Facultad de Ciencias, Uruguay.

4.2.5 Ensamblado de las secuencias del genoma completo

Las lecturas generadas por el secuenciador Illumina se analizaron con el servidor Galaxy (<https://usegalaxy.eu/>) (Blankenberg et al., 2010; Giardine et al., 2005; Goecks et al., 2010). Para ello, se cargó al historial las librerías con las lecturas obtenidas con Illumina (R1 y R2). El control de calidad fue evaluado y mejorado mediante **Fastqc** (Blankenberg et al., 2010), y **Trimmomatic** (Bolger et al., 2014). El ensamblaje se llevó a cabo con **Bowtie2** (Langmead & Salzberg, 2012), y genomas de referencias previamente publicados, de los aislamientos de la cepa A13 (AR/13/BA/A13, ON419883.1), CHu8 (AR/01/BA/8Hu8, ON419876.1) y CR88 (MN548285). Los datos se visualizaron con el software **Tablet** (Milne et al., 2012). Las inconsistencias entre el genoma de referencia y las lecturas alineadas se obtuvieron con **bcftools mpileup**, y **bcftools call** (Danecek et al., 2021).

4.2.6 Análisis filogenético

Se elaboró una base de datos con secuencias de referencia de los linajes GI-1, GI-11, GI-13, y GI-16, las variantes obtenidas por pasajes en serie, y una secuencia outgroup (**Tabla 1 anexo**). Se realizó el alineamiento de las secuencias mediante el algoritmo de MAFFT v.7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/closelyrelatedviralgenomes.html>) siguiendo los parámetros asignados por defecto (Katoh & Standley, 2013). Esta misma metodología, se usó

en el análisis de S1 de las secuencias por grupo, que a su vez fueron editadas con ayuda del software BioEdit versión 7.2.5. La inferencia filogenética se hizo por Máxima Verosimilitud con el software IQ-TREE en el servidor del Centro para Bioinformática Integrativa de Viena (CIBIV) (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) (Nguyen et al., 2014). El árbol filogenético se construyó y editó con el software online iTOL - interactive Tree Of Life (<https://itol.embl.de/about.cgi>) (Letunic & Bork, 2007).

4.3. Desarrollo de modelo de infección y obtención de parámetros de cuantificación

4.3.1 Pasajes en serie en hospedador natural forzando el tropismo renal

El aislamiento seleccionado para llevar a cabo los pasajes fue A13p10 (10 pasajes en EP) con un título de 10^7 DIE₅₀/ml.

Los pollos para los pasajes fueron obtenidos de huevos fértiles SPF provistos por el Instituto Rosenbusch SA (CABA, Argentina). Los huevos fueron incubados en una incubadora comercial de la marca Yonar (CABA, Argentina) a 37°C y 55% de humedad. Luego de su nacimiento, los pollitos fueron alojados en un ambiente limpio y aislado, donde se mantuvieron hasta las 2-4 semanas. Las infecciones se llevaron a cabo en aisladores con presión negativa.

El experimento involucró la conformación de dos grupos experimentales (2 pollos por grupo), uno de ellos con un tratamiento inmunosupresor que consistió en la aplicación de dos inyecciones (separadas por 48 hs) de dexametasona (Decadron, Sidus, Bs As, Argentina) a una dosis de 2 mg/kg por vía intramuscular. La primera inyección se llevó a cabo 48 hs previo a la inoculación y la segunda en el momento de la inoculación (Dai et al., 2022). El procedimiento se realizó cuando los pollos tuvieron entre 2 a 5 semanas de edad. El día 0, los animales fueron separados en grupos y alojados en aisladores con presión negativa. Cada pollo fue inoculado con una dosis de A13p10 de 10^5 DIE₅₀/ml. El volumen del inóculo fue de 200 µl (100 µl administrados por vía intratraqueal y 50 µl por cada narina). Durante 7 días, los animales fueron observados diariamente (dos veces por día) en busca de signos clínicos y/o mortalidad. A los 7 dpi se procedió a realizar la eutanasia y toma de muestra.

La muestra tomada fue el lóbulo craneal izquierdo renal. Por cada grupo se obtuvo un pool, que posteriormente fue homogeneizado. Para ello, se disgregó el tejido con ayuda de un mortero, arena estéril y PBS (con antibiótico y antifúngico). La mezcla resultante se centrifugó en tubos de 15 ml a 3000 g durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró utilizando un filtro millipore de 0,22 µm (JET BIOFIL, Guangzhou, China), luego fue chequeado (por RT-PCR) para

confirmar la presencia de IBV en la muestra y posteriormente fue almacenado a -70°C para su uso en la siguiente infección. El experimento se repitió hasta obtener la muestra correspondiente al pasaje número 11 en animales tratados con dexametasona, que se denominó KD11, y la muestra correspondiente al pasaje número 20 en animales sin tratamiento previo, que se identificó como K20. En la **Figura 6** se muestra una representación esquemática del ensayo.

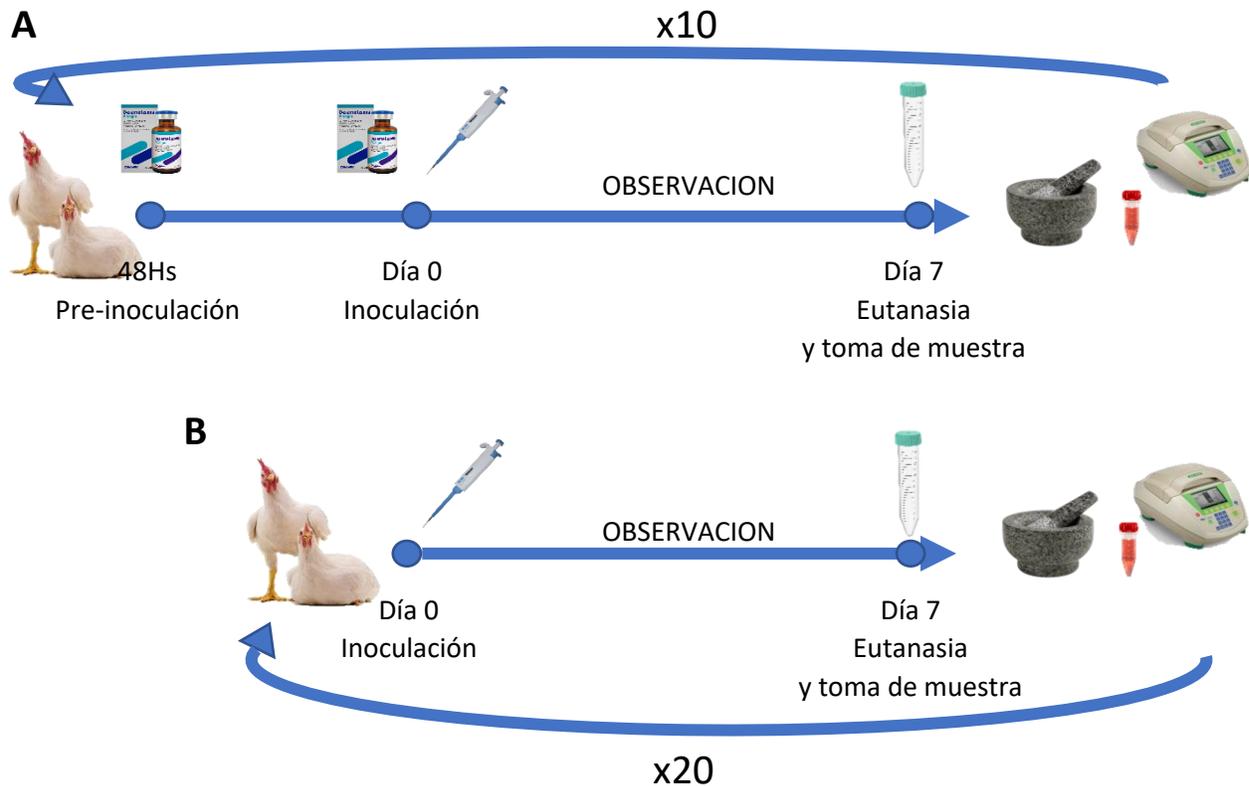


Figura 6. Esquema de los pasajes en serie por hospedador natural. A) Pasajes en animales con tratamiento inmunodepresor (KD). B) Pasajes en animales sin tratamiento previo (K).

4.3.2 Análisis de la patogenicidad de los pasajes K13 y KD11

Con el objetivo de evaluar la patogenicidad de los pasajes en hospedador natural, K13 y KD11, se llevaron a cabo ensayos de infección en pollos SPF de 2 semanas de vida en unidades de aislamiento con aire filtrado que el laboratorio tiene en las instalaciones del CICVyA (INTA Castelar). En total se emplearon 18 animales que se distribuyeron en 3 grupos de 6 animales cada uno. Uno de los grupos se mantuvo como control negativo, mientras que los demás fueron infectados con K13 y KD11. El volumen del inóculo fue de $200\ \mu\text{l}$ y la vía de administración

intratraqueal (100 µl) e intranasal (50 µl en cada narina). Los controles negativos fueron inoculados con PBS.

El experimento duró 21 días, en los cuales se observó a los animales a diario en busca de signos clínicos. Las necropsias y tomas de muestra se realizaron a los 7, 14 y 21 dpi, cuando dos animales de cada grupo fueron eutanasiados. Durante la necropsia, se evaluó la presencia de lesiones macroscópicas y se tomaron muestras de tráquea, riñón y tonsila cecal que fueron usadas en los análisis histopatológicos y en la identificación del genoma viral por RT-PCR. Las muestras para el análisis histopatológico se fijaron en formol al 10%, mientras que las muestras para RT-PCR se homogeneizaron y almacenaron a -70° C. Adicionalmente, se tomaron muestras de sangre para evaluar anticuerpos séricos mediante ELISA. Los protocolos para estas técnicas se describen en el apartado 4.5.

4.3.3 Desarrollo y optimización de la técnica de RT- PCR en tiempo real para cuantificación viral

El desarrollo y optimización de una técnica de RT-PCR en tiempo real que permita la cuantificación del genoma viral en los tejidos (RT-qPCR) requiere la construcción de una curva estándar. Para ello, como primera medida realizamos la preparación de un templado cuantificable que sirva de referencia. Esto es un plásmido en cuya estructura realizamos la inserción de la secuencia de interés a amplificar (un fragmento de la región 5'UTR altamente conservado).

Para ello, se amplificó (como se ha indicado en el apartado 4.1.1.1) el fragmento a insertar desde un aislamiento de campo caracterizado como GI-16. Luego se realizó la purificación de este mediante QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Después, se ligó el fragmento al plásmido pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA), con el siguiente procedimiento: se prepararon mezclas que contenían 5 µl de rapid ligation buffer (2X), 1 µl de pGEM-T Easy Vector (50 ng), 1 µl de T4 DNA ligasa y 2 µl de H₂O. A continuación, se añadió 1 µl del DNA purificado (aproximadamente 5,8 ng) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La concentración del inserto se midió mediante el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA), utilizando H₂O como control negativo.

Paso seguido, se realizó la transformación de bacterias *E. coli* DH5α como se describe en Romero (2019); y un proceso de *screening* mediante *colony-PCR*, que consiste en verificar si los clones transformantes contienen el plásmido más el inserto. Para ello, se preparó una mezcla de volumen final de 25 µl conteniendo 17,85 µl de H₂O, 5 µl de buffer 5X (Promega, Madison, WI,

MATERIALES Y MÉTODOS

USA), 0,6 µl dNTP (100 mM), 0,75 µl primer forward y reverse (5 µM) y 0,05 µl de Go taq polimerasa (5 UI/µl) (Promega, Madison, WI, USA). Se picaron las colonias a evaluar (blancas) y se colocaron en los tubos con las mezclas de PCR. El protocolo de termociclado fue el siguiente: i) 95°C por 8 minutos; ii) 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 45°C y 2 minutos a 72°C; y iii) 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis en gel de agar (1,5%).

Se realizaron repiques y expansiones de las colonias positivas. Para ello, se transfirieron las colonias a tubos de 3 ml con medio LB con ampicilina (Bagó, Bs. As., Argentina) a una concentración de 10000 IU/ml. Posteriormente, los tubos se incubaron a 37°C con agitación durante toda la noche. Una vez finalizada la incubación, se centrifugó la mezcla a 10000 g durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante y conservando el sedimento para su procesamiento posterior.

Finalmente, los plásmidos (con el inserto) así clonados fueron liberados de las bacterias mediante lisis alcalina y purificados empleando un sistema de columnas con el kit de Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA), como se indica en Romero (2019). Para verificar la correcta inserción del fragmento deseado en los plásmidos clonados, se realizó el análisis de la secuencia de ellos mismos.

Una vez obtenidos los clones, se utilizaron dos Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA) distintos para estimar la concentración del plásmido más el inserto en solución. Con esa información se realizó el cálculo del número de copias (por unidad de volumen) usando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de copias} = \frac{\text{Cantidad de DNA (g/}\mu\text{l)} * \text{Número de Avogadro}}{\text{Longitud del DNA (pb)} * \text{Peso molecular promedio de un par de bases}}$$

Dónde:

- Cantidad de DNA (g/µl) = concentración del plásmido más el inserto
- Longitud del DNA (pb) = longitud del plásmido más el inserto
- Peso molecular promedio de un par de bases = 660 g / mol
- Número de Avogadro = 6,022 x 10²³ moléculas/mol

El siguiente paso fue preparar diluciones en base 10 de la solución del clon analizado que fueron luego usados tanto en la puesta a punto de la PCR como en la construcción de la curva estándar. En la puesta a punto se usaron los *primers* denominados IBVdiag, cuyas características se detallan en la **Tabla 2**. Como las temperaturas de *melting* recomendadas para los *primers* (51,78°C y 50,32°C) no coinciden con la temperatura recomendada para el *Annealing*/Extensión del equipo *StepOne™* (60°C), se llevó a cabo una PCR con gradiente para evaluar la eficiencia de la reacción a diferentes temperaturas de hibridación. La PCR se realizó según se indicó en el apartado 4.5.1, pero con gradiente de temperatura de *annealing*. Así, el perfil del ciclado consistió en 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, seguido de 50°C / 55°C / 60°C por 30 segundos, y 75°C por 90 segundos, con una extensión final de 72°C durante 3 minutos. El termociclador usado fue Mycycler BIORAD (Hércules, CA, USA). La amplificación se evaluó por electroforesis en gel de agarosa (1%) con un marcador de 100pb de DNA.

La optimización del ensayo se llevó a cabo en el equipo *Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se utilizó como reactivo, el producto: Mezcla Real para Real-Time (Biodynamics, CABA, Argentina), que incluye Taq DNA Polimerasa, dNTPs, Mg⁺⁺, conservantes, buffer e intercalante fluorescente.

Para determinar la concentración óptima de *primers* se evaluó el rendimiento de la amplificación usando diferentes concentraciones (2,5 µM, 5 µM, 7,5 µM). El ciclado utilizado fue el recomendado para *StepOnePlus™* que incluye 5 minutos a 95°C, para activación de la polimerasa y desnaturalización del DNA seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C de desnaturalización y 60 segundos a 60°C para *Annealing*/Extensión. La mezcla se preparó con: 12,5 µl de mezcla real (Biodynamics, CABA, Argentina), 1 µl de cada concentración de los *primers* (*forward* y *reverse*) y 6,5 µl de H₂O. En cada caso se agregó 4 µl de templado (26000 copias del clon) o de H₂O ultrapurificada (en el caso de los controles negativos). Cada muestra se ensayó por duplicado. Luego, se determinó la temperatura óptima de la hibridación. Se probaron 3 temperaturas distintas: 58, 60, y 62 °C con el mismo equipo y protocolo antes mencionado, modificando la temperatura de *annealing*. Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de protocolo (60 °C y *primers* a 7,5 µM), se utilizaron diluciones del clon para la obtención de una curva estándar. En total se contaron con 9 diluciones, de las que se tomaron 4 µl de cada una y se añadieron a la mezcla, que lleva: 12,5 µl de mezcla real (Biodynamics, CABA, Argentina); 1 µl de primer forward y reverse; y 6,5 µl de H₂O. Para los controles negativos, en lugar de templado, se utilizó 4 µl de H₂O ultrapurificada. Cada ensayo se hizo por triplicado. El perfil de termociclado fue el mismo que se usó en la determinación de la concentración óptima

de los *primers*. La curva estándar, el cálculo de la pendiente y los valores de eficiencia fueron determinados por el mismo equipo *Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.3.4 Determinación de la carga viral de los pasajes K12 a K20

Como criterio para la selección del pasaje a utilizar en el ensayo de modelo de infección, se determinó la carga viral de los pasajes de K12 a K20 y como control negativo se usaron muestras de riñón de animales no infectados. Se utilizó la técnica de RT-qPCR optimizada en 4.3.3.

4.3.5 Ensayo de modelo de infección con el inóculo K16

Para este ensayo se utilizó el pasaje K16, el cual presentó la carga viral más elevada entre los pasajes en hospedador natural. El inóculo fue testado por PCR, para corroborar la ausencia de otros patógenos aviares y se tituló de acuerdo con el protocolo 4.1.1.2.

Se emplearon 28 pollos SPF de tres semanas de edad que se organizaron en dos grupos, uno de 20 y otro de 8 animales. El grupo de 20 animales fue inoculado mediante la aplicación en cada pollo de 200 μ l (100 μ l intratraqueal y 50 μ l en cada narina) de una dosis de 10^4 DIE_{50} /ml de K16. Los 8 animales restantes formaron parte del grupo control negativo y recibieron como inóculo una solución de PBS.

Durante la experiencia los animales se observaron dos veces por día. A los 5, 10, 15 y 20 dpi se procedió a realizar la eutanasia y la necropsia de 5 pollos del grupo inoculado y 2 del grupo control. Las muestras fueron tomadas de acuerdo con el apartado 4.3.2, con la adición de muestras de tráquea que se conservaron en medio 199 1X (Gibco) atemperado para su posterior análisis en la prueba de la ciliostasis según se describe en los apartados 4.5.4 y 4.5.5. El diseño de esta experiencia se esquematiza en la **Figura 7**.

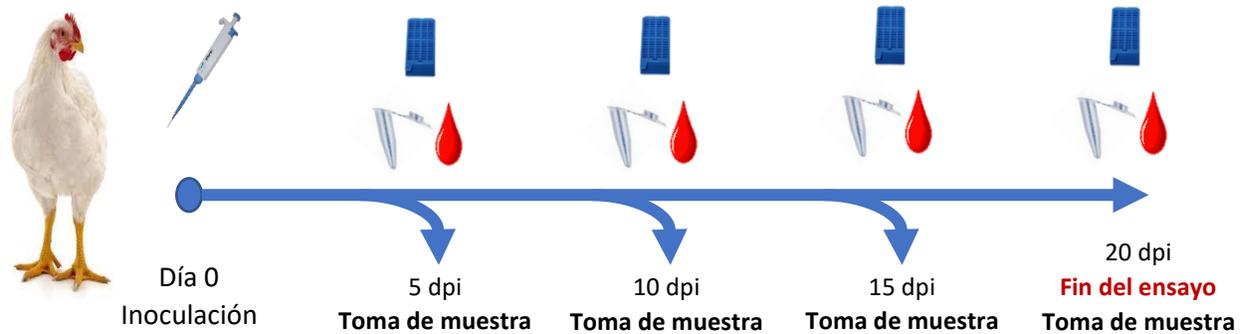


Figura 7. Esquema del ensayo de Modelo de infección. Estrategia utilizada para la infección y colección de muestras. Las muestras fueron analizadas por RT-PCR, ELISA, análisis histopatológico, y prueba de la ciliostasis.

4.4. Evaluación de la cepa A13 como vacuna y su comparación con otras vacunas comerciales

4.4.1 Ensayo de inocuidad

Con el objetivo de evaluar la inocuidad de A13 se inocularon pollitos SPF de 1 día de vida por vía intraocular e intranasal con un volumen de 50 μ l cada uno. Los títulos empleados en este ensayo fueron de $10^{7,375}$ DIE₅₀/ml (pasaje 63) y de $10^{9,624}$ DIE₅₀/ml (pasaje 50).

El diseño del experimento consistió en 2 ensayos, uno para evaluar A13p50, y otro para evaluar A13p63. En ambos casos, se usaron 40 pollitos SPF, que se dividieron en 2 grupos de 20 animales, un grupo recibió el inóculo viral (grupo infectado), mientras que el otro recibió una dosis del mismo volumen de PBS (grupo control negativo). Durante 28 días, los animales fueron observados al menos 2 veces al día en busca de signos clínicos. A los 7, 14, 21 y 28 dpi se tomaron muestras de sangre (para evaluación de anticuerpos) y muestras de tráquea, riñón y tonsila cecal (para detección de virus). El experimento se esquematiza en la **Figura 8**.

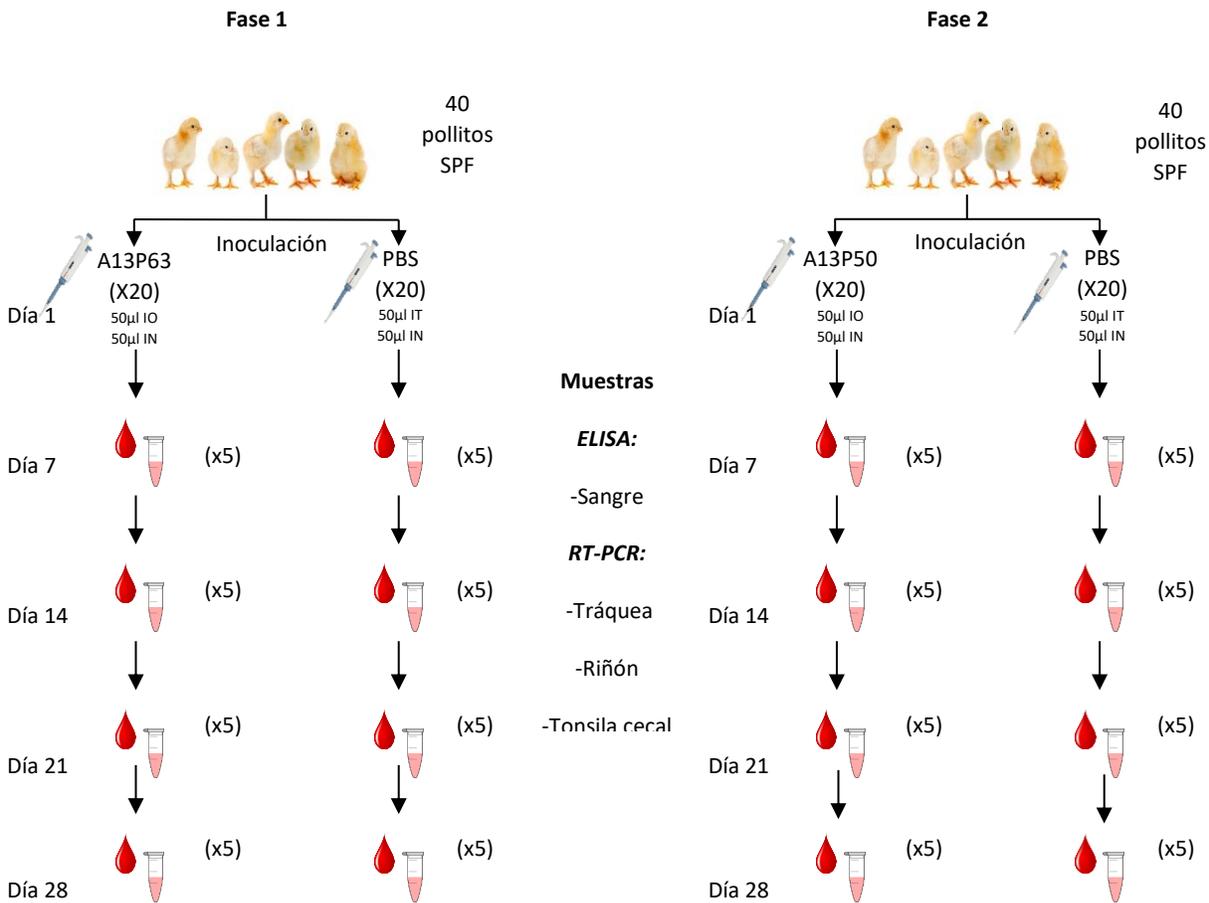


Figura 8. Ensayo de Inmunogenicidad. Estrategia utilizada para la infección y colección de muestras. En cada fecha se tomaron muestras de sangre (para ELISA) y de tráquea, riñón, y tonsila cecal (para RT-PCR)

4.4.2 Ensayo de inmunogenicidad de A13p50

El diseño del experimento inmunogenicidad fue similar al de inocuidad, pero con 10 pollitos SPF de 1 de vida distribuidos en 2 grupos de 5. Los animales de uno de los grupos fueron inoculados con 100 µl de A13p50 a una dosis 10^5 DIE_{50}/ml (50 µl vía intranasal y 50 µl intraocular), mientras que el resto de los animales (grupo control) recibieron igual volumen (por la misma vía) de PBS. Las muestras se tomaron a los 7, 14, 21 y 28 dpi, y consistieron en hisopados traqueales para detección de genoma viral por RT-PCR y sangre para evaluar presencia de anticuerpos por ELISA. Al finalizar el ensayo, también se tomaron muestras de tráquea, riñón y tonsila cecal para detección de genoma viral (por RT-PCR).

4.4.3 Detección de anticuerpos en fluidos traqueobronquiales

Con el objetivo de evaluar la capacidad de la cepa A13p50 para generar inmunidad en las mucosas, se llevó a cabo un ensayo para detectar la presencia de anticuerpos anti-IBV en fluidos traqueobronquiales. Para ello se emplearon 28 pollos SPF de 2 semanas de vida, que se dividieron en dos grupos. El primer grupo (20 pollos) recibió una dosis de A13p50, mientras que el segundo grupo (8 pollos) se inoculó con PBS. El volumen y dosis del inóculo fueron los mismos empleados en 4.4.2. Las evaluaciones se realizaron a los 7, 14, 21 y 28 dpi, momento en que se tomaron 5 animales al azar del grupo inoculado (mas 2 del grupo control) para toma de muestras de sangre y lavados traqueobronquiales para detección de anticuerpos específicos por ELISA.

4.4.3.1 Lavajes traqueobronquiales

Luego de la eutanasia, cada animal fue colocado en decúbito dorsal, se desinfectaron las plumas y piel con alcohol 70%, y con ayuda de instrumental quirúrgico se exteriorizó la tráquea. Se introdujo un catéter de 2,3 mm de diámetro, aproximadamente 0,5 cm dentro de la tráquea y se sujetó con hilo de algodón estéril. Con ayuda de una jeringa, se introdujeron de forma suave 3 ml de PBS estéril, que se aspiraron suavemente mientras se masajeaba el tórax, este procedimiento se repitió 3 veces. El contenido se colectó en tubos tipo *ependorf* de 1,5 ml. La muestra se centrifugó por 7 minutos a 400 g, a 4 °C, y el sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis.

4.4.4 Test de reversión de la virulencia

Para evaluar la estabilidad del candidato a vacunal A13p50, se llevaron a cabo 4 pasajes por contacto natural en hospedador natural, evaluando los cambios en las secuencias de cada aislamiento.

En este ensayo se utilizaron 4 grupos (de 2 pollos SPF por grupo), de 2-3 semanas de vida. El procedimiento fue el siguiente. En el primer tiempo se infectó un grupo de animales con 10^5 DIE_{50}/ml de A13p50 (50 μl intraocular y 50 μl intranasal del lado contrario). Luego de 48 horas se introdujo un segundo grupo que se mantuvo en contacto estrecho con el primer grupo durante 48 horas. Al finalizar este periodo se apartaron los animales del primer grupo para llevar a cabo la eutanasia y toma de muestra, mientras se introdujo un tercer par de animales no infectados. El experimento se repitió hasta obtener el pasaje 4. El esquema se observa en la **Figura 9**. La muestra para amplificación del fragmento genómico a analizar (S1) fue la tráquea, y el procedimiento para su obtención es idéntico al descrito en 4.2.4.1.

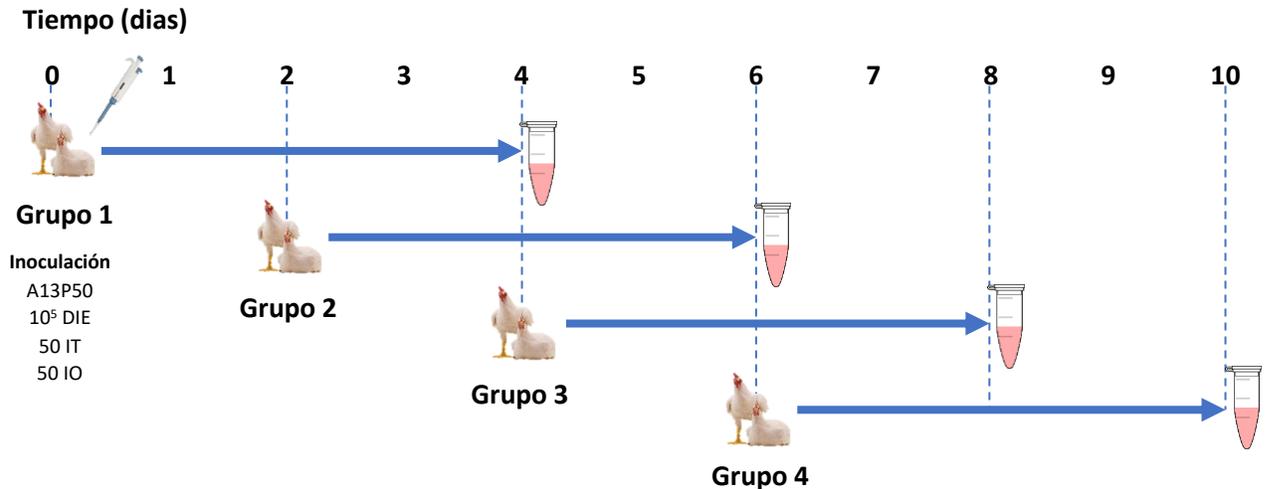


Figura 9. Diseño experimental del test de la reversión de la virulencia. Se observa los tiempos de introducción de cada grupo para la infección por contacto natural y los tiempos en los que se obtuvo la muestra de cada pasaje.

4.4.5 Prueba de ciliostasis provocada por la vacunación con diferentes cepas

Como ensayo preliminar a la prueba de eficiencia de vacunas, se estudió la ciliostasis de las cepas de vacunas comerciales Ma5P, CR88 y el aislamiento atenuado A13p50.

Para ello se tomaron 20 pollos SPF de 2 semanas vida, que se dividieron en 4 grupos: 3 de estos grupos fueron inoculados y el restante permaneció como control negativo. Los animales de los grupos vacunados recibieron 100 µl (50 µl intraocular, y 50 µl intranasal del lado contrario) con una dosis 10⁵ DIE₅₀/ml de los inóculos Ma5p3, CR88p3 y A13p50, mientras que el grupo no vacunado recibió el mismo volumen en PBS estéril.

Los animales se observaron a diario en busca de signos clínicos. A los 5 dpi, se llevó a cabo la eutanasia y toma de muestra de órgano traqueal para evaluar la ciliostasis. Esta prueba se describe en el apartado 4.5.4, incluyendo su análisis estadístico, en el apartado 4.5.5.

4.4.6 Prueba de eficiencia de vacuna

Este ensayo se realizó con el objetivo de evaluar la eficiencia en el control de la infección con una cepa GI-16 de las vacunas comerciales de los serotipos Massachusetts (Ma5p3), y 793B (CR88p3) y el candidato vacunal A13p50.

En total, se utilizaron 80 pollitos SPF, que se dividieron en tres grupos vacunados y un grupo no vacunado. Cada grupo estuvo conformado por 20 pollitos. Los pollitos en los grupos vacunados se inocularon al tercer día de vida. Un grupo fue inoculado con la cepa Ma5 (Massachusetts),

MATERIALES Y MÉTODOS

otro grupo con CR88 (793/B), otro con la cepa A13p50 y al cuarto grupo se le administro PBS. Todos los animales inmunizados recibieron el mismo título viral (10^5 DIE₅₀/ml) y en todos los casos el volumen total del inóculo fue de 100 µl por animal, administrados por vía intraocular (50 µl) e intranasal (50 µl). Cada uno de estos 4 grupos se subdividió a su vez en dos grupos de 10 animales. Uno de esos dos grupos en que se subdividieron recibieron a la tercera semana post vacunación (pv) un inóculo con K16 (grupos desafiados), mientras al otro se le administro PBS estéril (grupos no desafiados). La inoculación se realizó con 200 µl de una dosis de 10^4 DIE₅₀/ml de K16 que se administró del siguiente modo: 100 µl por vía intratraqueal y 50 µl en cada narina. Los animales no desafiados, recibieron PBS (mismo volumen y mismas vías de administración). Luego del desafío todos los grupos fueron observados por lo menos 2 veces diarias. A los 5 y 7 dpi, se llevó a cabo la eutanasia y necropsia de 5 animales de cada grupo. A los 5 dpi se tomaron muestras de tráquea para evaluar la ciliostasis y carga viral (RT-qPCR). A los 7 dpi se tomaron muestras de riñones para evaluar carga viral (RT-qPCR). En ambos tiempos se tomaron muestras de sangre para evaluar la presencia de anticuerpos por ELISA.

Los protocolos para la prueba de la ciliostasis, RT-qPCR y ELISA se describen en los apartados 4.5.2.2, 4.5.4, y 4.3.3. Los resultados de la ciliostasis y carga viral fueron analizados por métodos estadísticos que se detallan en 4.5.5.

El esquema del diseño del experimento se observa en la **Figura 10**.

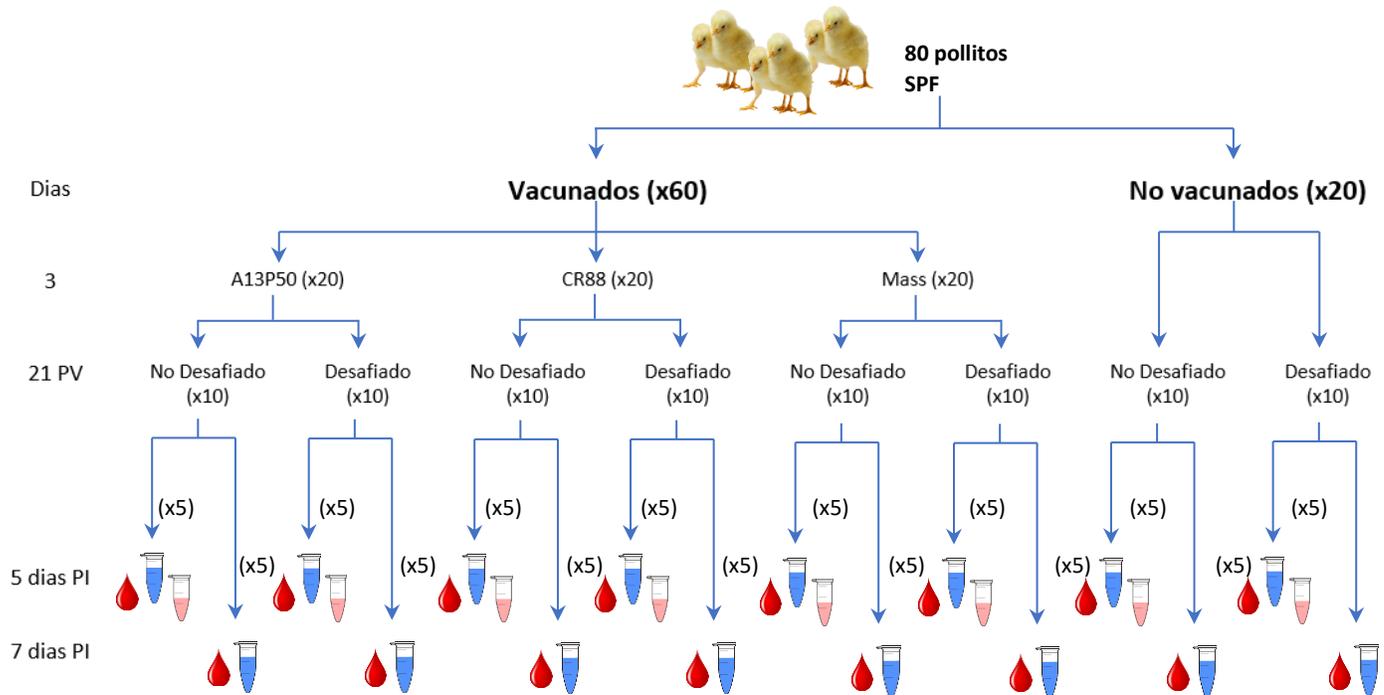


Figura 10. Diseño experimental de la prueba de eficiencia de vacunas. Muestra la estrategia empleada para la infección y la obtención de muestras que fueron evaluadas por RT-qPCR, ELISA y Ciliostasis.

Todos los procedimientos que involucraron animales fueron realizados siguiendo las normas para el cuidado y uso de animales de laboratorios. Los protocolos fueron avalados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Cs. Veterinarias de la UBA y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) de INTA Castelar (exp. N° 14/2018, 18/2018, 31/2018, y 38/2013).

4.5. Técnicas de uso general

4.5.1 RT-PCR

4.5.1.1 Extracción de RNA

El RNA viral fue extraído con el kit comercial *High Pure Isolation Kit* (Roche, Mannheim, Alemania). El procedimiento fue el siguiente:

1. Se mezclaron 100 µl de la muestra (líquido alantoideo/homogenato de tejido) con 400 µl Buffer de lisis.
2. Luego de homogeneizado, se transfirió el volumen de la mezcla (500 µl) a las columnas del kit (revestidas de *sílica gel*), que fueron centrifugadas a 800 rpm, descartándose el líquido recogido.
3. A cada columna se añadió DNasa (180 UI) y se incubó por 15 minutos.
4. Posteriormente se realizaron dos lavados empleando 500 µl de las soluciones de lavado provistos por el kit y centrifugando a 800 rpm por 1 minuto.
5. Se descartó el eluido y se realizó una última centrifugación (en seco), durante 4 minutos, a 14000 rpm para eliminar restos de las soluciones de lavado.
6. Por último, se agregó a cada columna 50 µl de buffer de elución, se incubó por 1 a 3 minutos y finalmente se centrifugó por 1 minuto a 800 rpm. El líquido eluido con el RNA de cada muestra se almacenó a -70 °C hasta su uso.

4.5.1.2 Retrotranscripción

La retrotranscripción fue llevada a cabo con la enzima transcriptasa reversa de *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV RT) provista por Promega (Madison, WI, USA). La mezcla fue preparada con 0,5 µl de *Random Primers* (5µM), 1 µl de dNTPs (10 Mm), 5 µl de Buffer (5x), 12,5 µl de agua, 1 µl de M-MLV RT, y 5 µl del RNA de la muestra. La mezcla así obtenida se incubó por 50 minutos a 37°C, más 5 minutos a 95°C. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.5.1.3 Amplificación

Para la amplificación de la región que codifica a S1, se emplearon 2 juegos de *primers* según se indica en un trabajo previo (Marandino, 2018). Uno de los pares de *primers* (IBV-S1-29313-fw e IBV-S1-21076-rev) amplifica una región de 783 nucleótidos del extremo 5´ de S1; mientras que el otro par (IBV-S1-21001-fw, e IBV-S1-22008-rev) amplifica la región de 1027 nucleótidos del extremo 3´ (**Tabla 2**). La técnica diagnóstica de rutina de BI amplifica un segmento de 275 pb, que se encuentra en la región 5'UTR del genoma de IBV. Los *primers* empleados en este caso son IBV-Diag-126-fw e IBV-Diag-490-rev (**Tabla 2**). La mezcla de la reacción de en ambos casos se prepara con 35,5 µl de H₂O, 5 µl de Buffer (10x), 1 µl de dNTPs, 1,5 µl de cada primer (5µM), y 0,5 µl de enzima *Easy Taq polimerasa* (Transgen, Beijing, China).

El termociclado para la amplificación de S1 consistió en 35 ciclos de 95 °C, 50 °C y 72 °C, por 30, 30 y 90 segundos respectivamente, seguidos de un tiempo de extensión de 72 °C durante 3 minutos. Mientras que, en la técnica llamada diagnóstica, el termociclado consistió en 35 ciclos

de 95 °C, 55 °C y 72 °C, por 30, 30 y 40 segundos respectivamente, seguidos de un tiempo y temperatura de extensión que son los mismos que en el caso anterior. En ambos casos los ensayos fueron llevados a cabo en un termociclador T18 (IVEMA, Lanús, Buenos Aires) y la amplificación se evaluó por electroforesis en gel de agarosa (1%) con un marcador de 100 pb de DNA.

Las características de los *primers* se resumen en la siguiente **Tabla 2**.

Primers	Secuencia	Polaridad	Posición del genoma	Tm (°C)	GC%	Tamaño del amplicón
IBV-S1-20313-fw	ACT-GAA-CAA-AAG-ACA-GAC-TT	+	20313-20332	49,3	35	783
IBV-S1-21076-rev	CCA-TCT-GAA-AAA-TTR-CCA-GT	-	21076-21095	49,5	35	
IBV-S1-21001-fw	TTT-GTY-AAT-GGT-ACT-GYA-CA	+	21001-21020	49,3	30	1027
IBV-S1-22008-rev	CAT-AAC-TAA-CAT-AAG-GGC-AA	-	22008-22027	47,4	35	
IBV-Diag-216-fw	TAC-ATC-CGT-TGC-TTG-GGC-TA	+	216-235	51,78	50	275
IBV-Diag-490-rev	ACC-AGA-ACC-TGT-CAC-CTC	-	490-507	50,32	55,56	

4.5.2 ELISA

En este trabajo se usaron dos sistemas de ELISA para la evaluación de anticuerpos anti-IBV. Uno comercial (*IDEXX IBV Ab Test*, Westbrook, ME, EE. UU.) y el otro desarrollado en el laboratorio de aves del IVIT, CICVyA, INTA.

4.5.2.1 ELISA comercial

Para este kit se siguieron las instrucciones del proveedor. Brevemente, cada una de las muestras de suero (previamente diluidas en una proporción de 1:500) y los controles positivos y negativos (provistos por el kit) fueron dispensados en las placas (tapizadas con el antígeno) por duplicado. Luego la placa se incubó 30 minutos a 18-26°C y posteriormente fue lavada con agua destilada 3-5 veces. A Continuación, se añadieron 100 µl de conjugado en cada pocillo, incubando luego por 30 minutos a 18-26°C. Seguidamente, el conjugado remanente fue eliminado mediante el lavado de la placa para luego agregar 100 µl de Substrato TMB por pocillo. Luego de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente la reacción fue frenada mediante el agregado de 100 µl de Solución de frenado por pocillo. La absorbancia fue detectada por un lector de ELISA,

Multiskan EX (Labsystems, Vantaa, Finlandia) a 650 nm de longitud de onda. El criterio de verificación de los resultados fue que el promedio de los controles negativos fuera menor a 0,15 y la diferencia entre el control positivo y negativo fuera mayor a 0,075. El nivel relativo de anticuerpos de las muestras se calculó con el Coeficiente muestra a positivo (M/P) cuyo valor se obtiene con la siguiente ecuación:

$$M/P = \frac{\text{Valor de la muestra} - \text{Promedio CN}}{\text{Promedio CP} - \text{Promedio de CN}}$$

Un valor de M/P mayor a 0,2 indica un resultado positivo.

4.5.2.2 ELISA indirecto casero

Este ensayo corresponde a un ELISA indirecto. Brevemente, se sensibilizaron placas de 96 wells (Microlon, Greiner) con virus IBV obtenido por infección en huevos embrionados y posterior purificado por gradiente de sacarosa. El producto de la purificación se diluyó y cuantificó en buffer carbonato/bicarbonato pH 9,6, 50 mM, a modo de obtener 300 ng por cada 50 µl de Buffer. Se colocó 50 µl de esta mezcla en cada pocillo, las placas incubaron durante 16 horas a 4 °C y luego se lavaron 3 veces con PBS-Tween (PBST). Posteriormente se bloquearon las mismas con 150 µl/pocillo de PBST más suero equino adulto (SEA) en una proporción de 5 % + 5 % Suero normal de cabra (SNC), durante 1 hora a 37°C. Una vez descartada la solución de bloqueo se colocaron las muestras de suero aviar en una dilución 1/100 en PBST 5 % SEA + 5 % SNC y se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación. Luego de tres lavados con PBST se agregó a la placa un anticuerpo comercial anti-IgG de pollo marcado con peroxidasa (Bethyl) en una dilución 1/10000 en PBST 5 % SEA + 5 % SNC. Las placas se incubaron 1 hora a 37°C con agitación. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBST y el revelado del ensayo se realizó con TMB (tabletas de 1 mg, SIGMA). La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2N luego de 7 minutos. Los valores de densidad óptica (DO) se registraron con un lector automático para microplacas Multiskan EX (Labsystems) utilizando una longitud de onda de 450 nm. El punto de corte de la placa se determinó utilizando un pool de sueros negativos, para lo cual se calculó el promedio de estos y se le sumó dos desvíos estándar.

4.5.3 Análisis histopatológico

Las muestras se procesaron para histopatología siguiendo el procedimiento estándar. Esto es, fueron deshidratadas en soluciones de etanol de graduaciones crecientes y colocadas en xilol para su posterior aclaramiento. La inclusión fue en estufa de cultivo con parafina para análisis, a

temperatura de fusión de 56 °C. Los tacos de parafina fueron cortados en microtomo y las láminas de 5 micrómetros de espesor obtenidas fueron montadas en portaobjetos. Se eliminó la parafina con xilol y luego los cortes de tejidos fueron hidratados por pasajes en soluciones de etanol de concentraciones decrecientes para finalmente ser teñidos con Hematoxilina & Eosina.

4.5.4 Ciliostasis

Para la prueba de ciliostasis, se extrajeron las tráqueas de los animales que se pusieron inmediatamente en medio MEM-D (entre 30 y 35°C). Las tráqueas fueron luego cortadas en secciones de no más de 1 mm de espesor. Se realizaron cortes en 3 segmentos a lo largo de la tráquea (tercio distal, tercio medio y tercio craneal) y la evaluación se hizo en 5 secciones (cortes) por segmento de cada tráquea. Los segmentos fueron examinados al microscopio óptico (400X) y se le asignó un puntaje de acuerdo con el porcentaje de movimiento ciliar observado: *i*) el puntaje fue 0 cuando se observó más de 75% de movimiento, *ii*) 1 cuando el movimiento fue de 50 - 75%, *iii*) 2 cuando el movimiento fue de 25 – 50%, *iv*) 3 cuando el movimiento fue de menos de 25%, y *v*) 4 cuando no se observó movimiento alguno. Los valores de cada uno de los 3 segmentos traqueales fueron promediados para asignar un score de ciliostasis a cada animal.

4.5.5 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos tanto de la prueba de la ciliostasis, como de la carga viral por la técnica de RT-qPCR, se realizaron comparando los resultados de los grupos tratados (a distintos tiempos *pi*) mediante *one-way ANOVA*. Cuando los resultados mostraron diferencias a un nivel de significancias de 5 %, las diferencias entre grupos se evaluaron con el test de comparaciones múltiples de Bonferroni (también con un nivel de significancia de 5 %).

5. Resultados

5.1. Caracterización antigénica

5.1.1 Virus neutralización cruzada en embrión de pollo

5.1.1.1 Identificación, amplificación y titulación de los virus utilizados en la virus neutralización cruzada

Para este análisis se amplificaron muestras virales pertenecientes a las cepas A13, Ma5, y CR88. Los pasajes seleccionados para el ensayo fueron *A13p7*, *Ma5p3*, *A13p2* y *CR88p3*, cuya identidad fue corroborada mediante análisis de secuencia y obtuvieron los siguientes títulos: $10^{5,16}$, $10^{5,75}$, 10^7 , y $10^{6,79}$ DIE_{50}/ml , respectivamente.

Todos los aislamientos presentaron lesiones típicas de BI (enanismo, alteraciones en las patas, membranas engrosadas, hemorragia y mortalidad del embrión) (**Figura 11**). No se encontró evidencia de contaminación con otros patógenos virales de las aves (ARV, IBDV, FAdV, ILTV o CIAV).

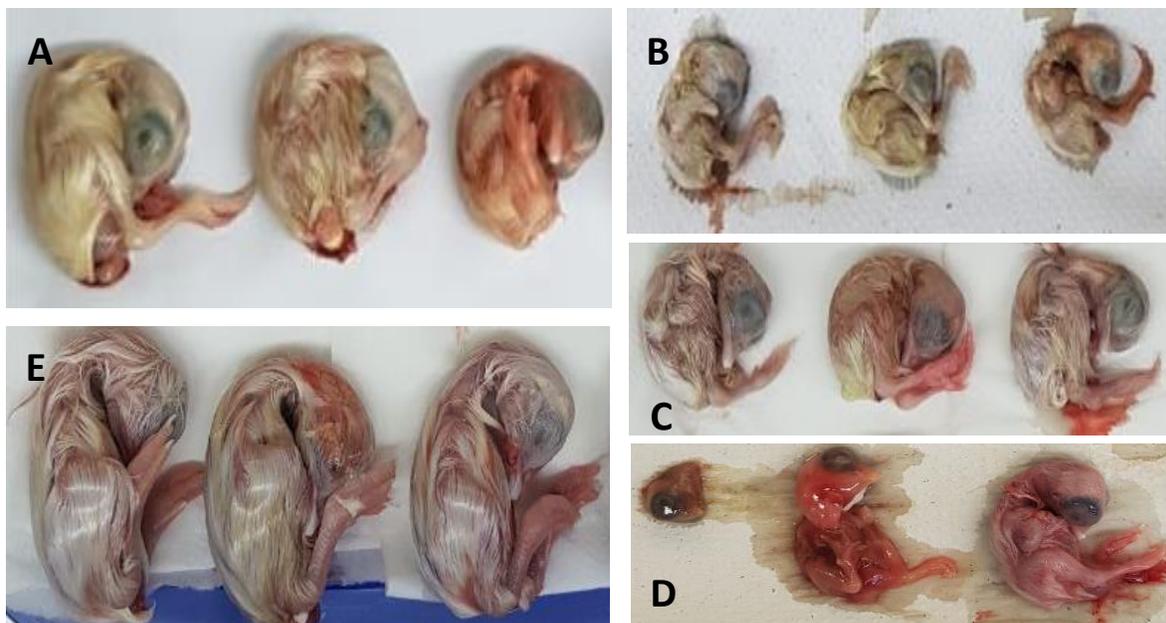


Figura 11. Amplificación en EP. Muestra las lesiones típicas de los embriones en cada una de las cepas usadas en el ensayo. A) Ma5P3 B) A13P7 C) CR88P3 D) A13P2 E) Controles negativos.

5.1.1.3 Evaluación de los sueros de referencia

En primera instancia se chequearon los niveles de anticuerpos específicos de cada suero de referencia. Los sueros A13, CHu8, 793B, y Massachusetts fueron positivos a la prueba de ELISA (IDEXX). Los valores M/P superiores a 0,2, indican que la muestra es positiva (**Tabla 3**).

Tabla 3. Niveles de anticuerpos de los sueros empleados en la VN				
Sueros muestra	Absorbancia (650)	M/P		
793B	0,383	0,493496557		
Mass	2,167	3,223412395		
A13	0,456	0,605202754		
CHu8	0,651	0,903596021		
	Absorbancia (650) 1	Absorbancia (650) 2	Promedio	Validación
Controles negativos	0,06	0,061	0,0605	0,6535
Controles positivos	0,727	0,701	0,714	

Nota: M/P es el cociente entre el valor de la muestra (restado el negativo) sobre el valor del control positivo (restado el negativo). Valores por encima de 0,2 son considerados positivos en este kit. El criterio de verificación es que el promedio de los negativos debe ser < 0,15 (en este caso fue 0,0605) y el valor de validación (diferencia entre positivo y negativo) sea superior a 0,075 (en este caso fue de 0,6535).

5.1.1.3 Virus neutralización

Las relaciones antigénicas entre la cepa de campo A13 y las cepas vacunales Ma5 y CR88 fueron evaluadas mediante VNC en EP SPF. Para ello se enfrentaron sueros homólogos y heterólogos con los virus A13, Ma5 y CR88 y de esa forma se obtuvieron los títulos neutralizantes (ND₅₀). Los títulos de ND₅₀ entre el virus A13 (A13p7) enfrentado a los antisueros A13 (homólogo) y Massachusetts (heterólogo) fueron de 10⁴ y 10^{3,094} ND₅₀/ml, respectivamente (**Tablas 4 y 5**). Los títulos de ND₅₀ del virus Ma5 del serotipo Massachusetts (Ma5p3) enfrentado al antisuero Massachusetts (homólogo) fue de 10^{2,35} y por debajo de 10^{1,3} ND₅₀/ml cuando se enfrentó con el suero A13 (heterólogo) (**Tablas 6 y 7**).

Para evaluar la relación entre A13 y CR88, se obtuvieron títulos neutralizantes de 10^{2,5} y 10^{1,4} ND₅₀/ml en el enfrentamiento de A13p2 frente al suero A13 (homólogo) y 793/B (heterólogo), respectivamente; y de 10^{2,2} y menor a 10^{1,3} ND₅₀/ml en caso de CR88p3 con el suero 793/B (homólogo) y A13 (heterólogo), respectivamente (Tablas 9 a 12).

RESULTADOS

Estos títulos neutralizantes permitieron obtener el valor r para determinar la distancia antigénica según Archetti & Horsfall (1950). El valor de r para la relación entre A13 y 793/B fue de 9,99 % (**Tabla 13**) y para la relación entre A13 y Massachusetts fue de 3,32% (**Tabla 8**). Estos resultados indican una falta de identidad antigénica entre la cepa A13 (GI-16) y los serotipos Massachusetts y 793B. En otras palabras, las cepas A13, Ma5 y CR88 pertenecen a serotipos distintos.

Tabla 4.					
Virus neutralización homóloga: Virus A13p7 Vs. Suero A13					
Dilución de antisueros	No infectados	Infectados	$\Sigma \uparrow$ No infectados	$\Sigma \downarrow$ Infectados	%
1:16	5	0	17	0	100
1:64	5	0	12	0	100
1:256	3	2	7	2	77,7
1:1024	3	2	4	4	50
1:4096	1	4	1	8	0
La ND_{50}/ml es 10^4					

Tabla 5.					
Virus neutralización heteróloga: Virus A13p7 Vs. Suero Ma5					
Dilución de antisueros	No infectados	Infectados	$\Sigma \uparrow$ No infectados	$\Sigma \downarrow$ Infectados	%
1:16	3	1	9	1	90
1:64	3	2	6	3	66,6
1:256	2	3	3	6	33,3
1:1024	1	4	1	10	9,1
1:4096	0	5	0	15	0
La ND_{50}/ml es $10^{3,094}$					

Tabla 6.					
Virus neutralización homóloga: Virus Ma5p3 Vs. Suero Ma5					
Dilución de antisueros	No infectados	Infectados	$\Sigma \uparrow$ No infectados	$\Sigma \downarrow$ Infectados	%
1:8	4	1	7	1	87,5
1:32	1	4	3	5	37,5
1:128	2	3	2	8	20
1:512	0	4	0	12	0
1:2048	0	5	0	17	0
La ND_{50}/ml es $10^{2,35}$					

Tabla 7.					
Virus neutralización heteróloga: Virus Ma5 Vs. Suero A13					
Dilución de antisueros	No infectados	Infectados	$\Sigma \uparrow$ No infectados	$\Sigma \downarrow$ Infectados	%
1:8	0	5	0	5	0
1:32	0	5	0	10	0
1:128	0	5	0	15	0
1:512	0	5	0	20	0

RESULTADOS

1:2048	0	5	0	25	0
La ND ₅₀ /ml es < 10 ^{1,3}					

Tabla 8.
Resultados de las VN cruzadas entre A13 y Ma5 (Títulos en DN₅₀/ml)

Sueros	Virus	
	A13P7	Ma5
A13P7	10 ⁴	<10 ^{1,3}
Ma5	10 ^{3,094}	10 ^{2,35}
Titer Ratio		
r1	$\frac{\text{Virus A13P7 vs Serum Ma5}}{\text{Virus A13P7 vs Serum A13}}$	0,1241
r2	$\frac{\text{Virus Ma5P3 vs Serum A13}}{\text{Virus Ma5P3 vs Serum Ma5}}$	0,0086
$r = \sqrt{r1 \times r2} = \sqrt{0,1241 \times 0,0089} \times 100 = 3,32\%$		

Tabla 9.
Virus neutralización homóloga: Virus A13p2 Vs. Suero A13

Dilución de antisueros	No infectados	Infectados	Σ↑ No infectados	Σ↓ Infectados	%
1:2	5	0	13	0	100
1:8	5	0	8	0	100
1:32	2	3	3	3	50
1:128	1	4	1	7	12,5
1:512	0	5	0	12	0
La ND ₅₀ /ml es 10 ^{2,5}					

Tabla 10.
Virus neutralización heteróloga: Virus A13p2 Vs. Suero 793B

Dilución de antisueros	No infectados	Infectados	Σ↑ No infectados	Σ↓ Infectados	%
1:2	3	2	3	2	60
1:8	0	5	0	7	0
1:32	0	4	0	11	0
1:128	0	2	0	13	0
La ND ₅₀ /ml es 10 ^{1,4}					

Tabla 11.
Virus neutralización homóloga: Virus CR88p3 Vs. Suero 793B

Dilución de antisueros	No infectados	Infectados	Σ↑ No infectados	Σ↓ Infectados	%
1:4	4	0	7	0	100
1:16	2	3	3	3	50
1:64	1	4	1	7	12,5
1:256	0	5	0	12	0

RESULTADOS

1:1024	0	5	0	17	0
La ND ₅₀ /ml es 10 ^{2,2}					

Dilución de antisueros	No infectados	Infectados	Σ↑No infectados	Σ↓ Infectados	%
1:8	0	5	0	5	0%
1:32	0	5	0	10	0%
1:128	0	5	0	15	0%
1:512	0	5	0	20	0%
1:2048	0	5	0	25	0%
La ND ₅₀ /ml es < 10 ^{1,3}					

Sueros	Virus	
	A13P2	CR88P3
A13	10 ^{2,5}	<10 ^{1,3}
793B	10 ^{1,4}	10 ^{2,2}
Titer Ratio		
r1	$\frac{\text{Virus A13P2 vs Serum 4/91}}{\text{Virus A13P2 vs Serum A13}}$	0,07943
r2	$\frac{\text{Virus CR88 vs Serum A13}}{\text{Virus CR88 vs Serum 4/91}}$	0,12589
$r = \sqrt{r1 \times r2} = \sqrt{0,07943 \times 0,12589} \times 100 = 9,99\%$		

5.1.2. Virus neutralización en cultivo celular

Para realizar este ensayo se optó por el riñón de pollo embrionario (ChEK) como cultivo primario de células. Dado que las cepas empleadas estaban previamente adaptadas al crecimiento en EP, para esta prueba se necesitaron pasos previos de adaptación al cultivo primario. Para ello fue necesario realizar algunos pases (ciegos) en ChEK hasta lograr la visualización de efecto citopático (EC). Todos los aislamientos (CHu8p10, Ma5p3, CR88p3, y A13p63) lograron ser adaptados (manifestaron EC), aunque, el número de pasajes necesarios fue diferente para cada cepa empleada. Para CHu8p10 y A13p63, se observó EC, de distinto grado, desde el primer pasaje. Mientras que, para CR88p3 y Ma5p3, a partir del segundo y quinto pasaje, respectivamente (**Tabla anexo 2**). El tiempo requerido para la aparición de EC fue en promedio 3-6 días pi (dpi). En la **Figura 12** se puede ver el EC inducido por cada una de las cepas en los pasajes más avanzados.

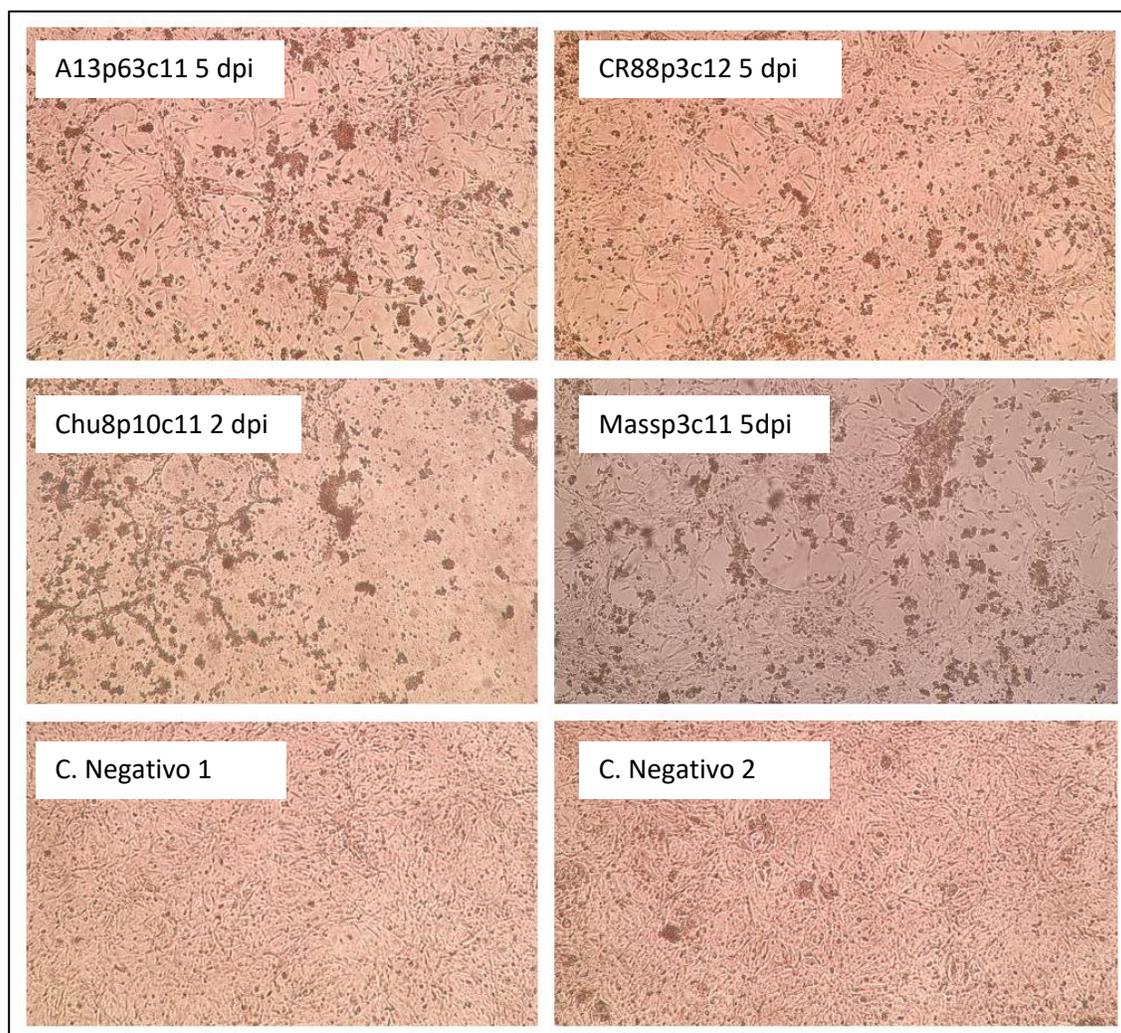


Figura 12. Virus neutralización en cultivo celular. Muestra el tipo de efecto citopático observado al microscopio óptico con las distintas cepas virales. En la etiqueta se muestra la identificación del virus seguida de la letra C que representa el número de pasaje en cultivo celular.

5.1.2.2 Titulación viral

Una vez adaptadas las cepas al cultivo primario se preparó un stock con cada una de ellas que fue titulado. Los títulos virales fueron $1,54 \times 10^2$, $3,3 \times 10^5$, $1,54 \times 10^3$, y $1,54 \times 10^3$ TCID₅₀/ml para A13p63c11, Chu8p10c11, Ma5p3c11, y CR88p3c12, respectivamente.

5.1.2.3 Evaluación de la dinámica de crecimiento en cultivo primario de riñón de embrión de pollo

Para identificar el momento de mayor concentración viral, se llevaron a cabo curvas de crecimiento de los pasajes A13p63c11, CHu8p10c11, Ma5p3c11, y CR88p3c12. Para ello, se realizó la cuantificación del virus en distintos tiempos empleando la técnica de RT-qPCR

desarrollada por nosotros. En la Figura 13 se grafica la dinámica de la replicación viral en ChEK. Los picos de replicación fueron identificados entre el cuarto y quinto dpi, por lo que se determinó que estos eran los mejores tiempos para llevar a cabo la cosecha del stock viral. Los resultados se muestran en la **Figura 13**.

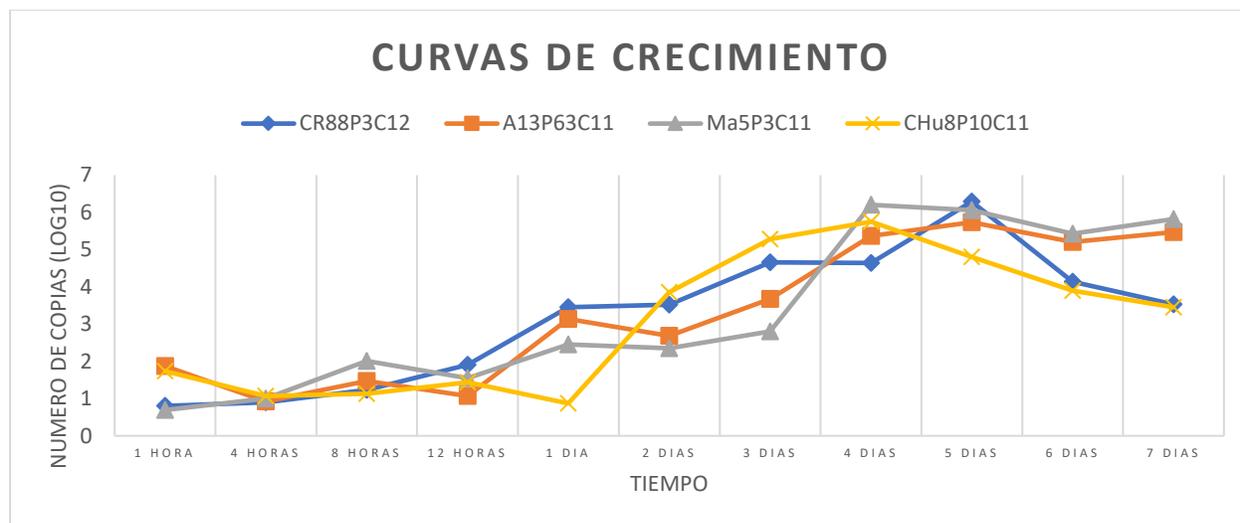


Figura 13. Curva de crecimiento viral de las distintas cepas de IBV. Se observa que el mayor pico de producción se encuentra en el cuarto día para CHu8P10C11, y Ma5P3C11, y el quinto para CR88P3C12 y A13P63C11.

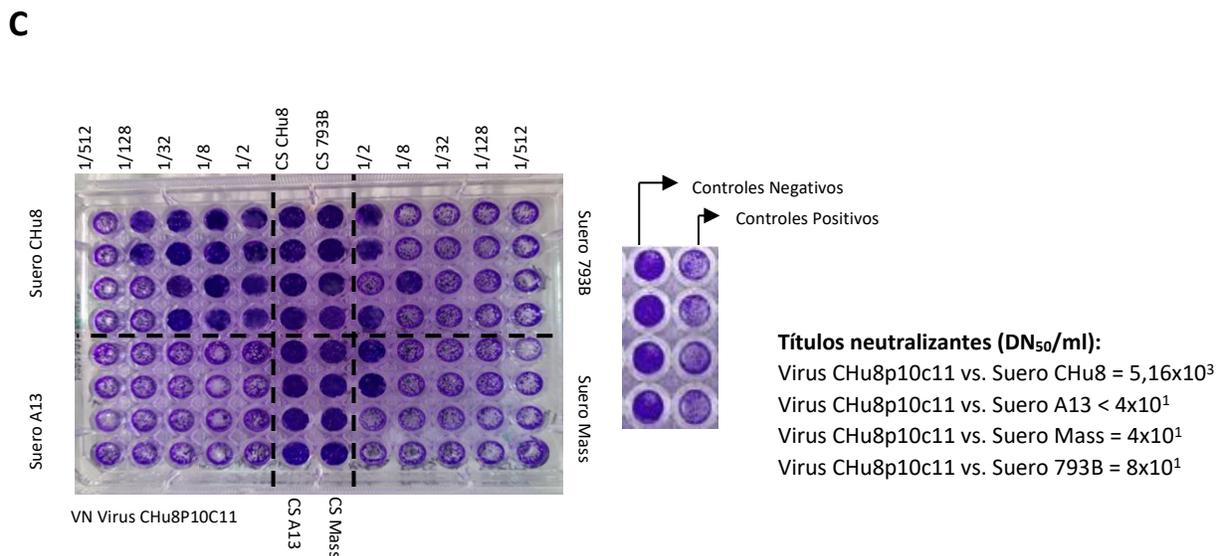
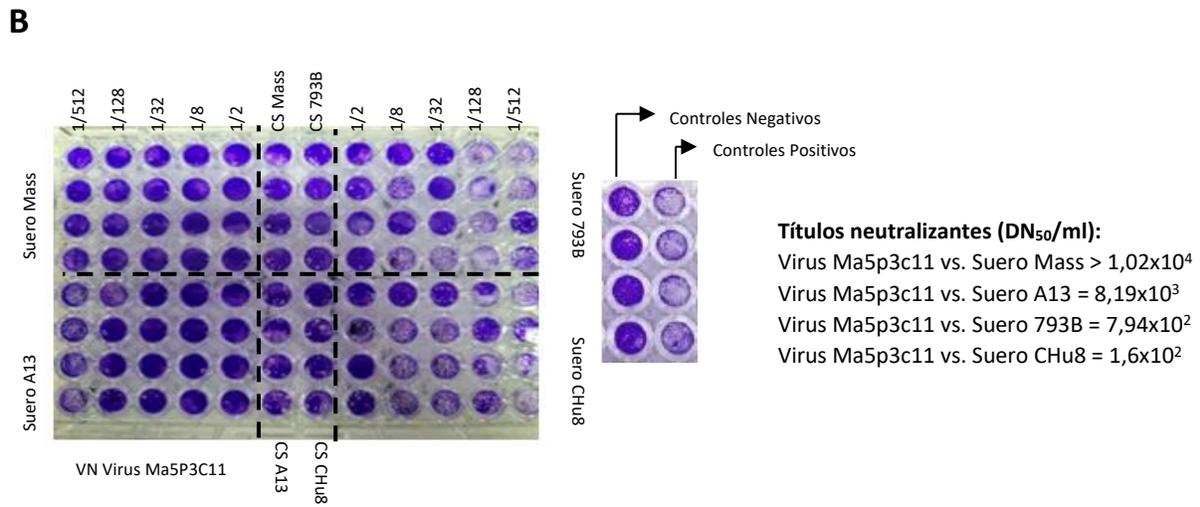
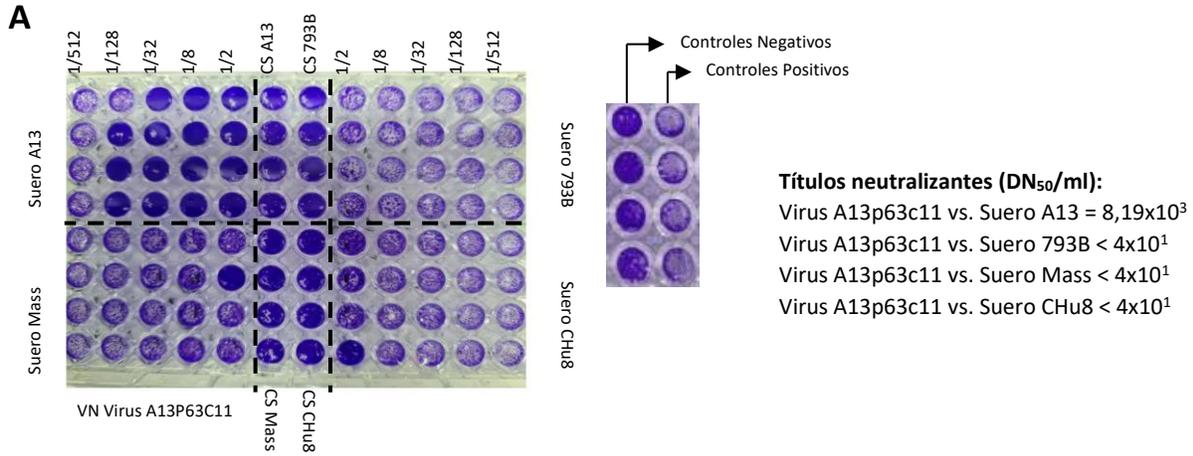
5.1.2.4 Virus neutralización cruzada

Se obtuvieron los títulos neutralizantes para las relaciones entre las cepas A13, CHu8, Ma5, y CR88 mediante VNC en ChEK (**Figura 14**).

En el caso de A13p63c11 el título neutralizante frente el suero homólogo fue de $8,19 \times 10^3$ ND₅₀/ml, mientras que para los sueros heterólogos (793B, Massachusetts, y CHu8) los resultados fueron menores a 4×10^2 ND₅₀/ml. Para la relación entre la cepa Ma5 (Ma5p3c11) y los sueros Massachusetts, A13, 793B y CHu8, los valores fueron de $1,02 \times 10^4$, $8,19 \times 10^3$, $7,94 \times 10^2$, y $1,6 \times 10^2$ ND₅₀/ml, respectivamente. Para la cepa CHu8 (CHu8p10c11) enfrentada a los sueros CHu8, A13, Massachusetts, y 793B, los títulos fueron $5,16 \times 10^3$, menor a 4×10^1 , 4×10^1 , y 8×10^1 ND₅₀/ml. Finalmente, para el virus CR88 (CR88p3c12) enfrentado a los sueros 793B, A13, Massachusetts, y CHu8, los valores encontrados fueron $1,02 \times 10^4$, $2,57 \times 10^2$, menor a 4×10^1 y 8×10^1 ND₅₀/ml, respectivamente.

Los valores *r* estimados para las relaciones A13 y Ma5, A13 y CR88, A13 y CHu8, CHu8 y CR88, CHu8 y Ma5, y CR88 y Ma5, fueron de 6,26%, 1,10%, 0,61%, 1,10%, 1,10%, y 1,74%; lo que indica que ninguna de estas variantes se encuentra relacionada antigénicamente entre sí (**Tabla 14**).

RESULTADOS



RESULTADOS

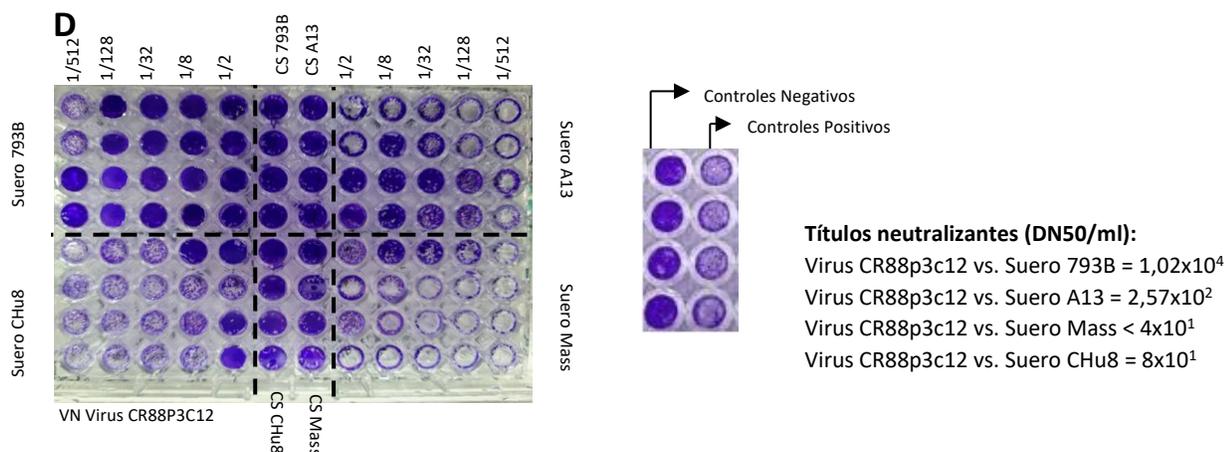


Figura 14 Virus neutralización cruzada en células. Se observa el resultado de los distintos ensayos **A)** Virus de desafío A13p63c11 vs. el suero homólogo (A13) y los sueros heterólogos (Massachusetts, 793B, y CHu8). **B)** Virus de desafío Ma5p3c11 vs suero homólogo (Massachusetts) y los sueros heterólogos (A13, 793B, y CHu8). **C)** Virus de desafío CHu8p10c11 vs suero homólogo (CHu8) y los sueros heterólogos (A13, 793B, y Massachusetts). **D)** Virus de desafío CR88p3c12 vs suero homólogo (793B) y los sueros heterólogos (A13, CHu8, y Massachusetts).

Tabla 14. Resultados VNC en ChEK

VN cruzadas	Virus	Suero	Título Neutralizante (DN50/ml)	r1	r2	r (%)
A13 y Ma5	A13p63c11	A13	$8,19 \times 10^3$	0,004884	0,802941	6,262243
	A13p63c11	Mass	< 4×10^1			
	MapP3c11	A13	$8,19 \times 10^3$			
	Ma5p3c11	Mass	$1,02 \times 10^4$			
A13 y CR88	A13p63c11	A13	$8,19 \times 10^3$	0,004884	0,025196	1,109314
	A13p63c11	793B	< 4×10^1			
	CR88p3c12	A13	$2,57 \times 10^2$			
	CR88p3c12	793B	$1,02 \times 10^4$			
A13 y CHu8	A13p63c11	A13	$8,19 \times 10^3$	0,004884	0,007752	0,615309
	A13p63c11	CHu8	< 4×10^1			
	CHu8p10c11	A13	< 4×10^1			
	CHu8p10c11	CHu8	$5,16 \times 10^3$			
CHu8 y CR88	CHu8p10c11	CHu8	$5,16 \times 10^3$	0,015504	0,007843	1,102719
	CHu8p10c11	793B	8×10^1			
	CR88p3c12	CHu8	8×10^1			
	CR88p3c12	793B	$1,02 \times 10^4$			
CHu8 y Ma5	CHu8p10c11	CHu8	$5,16 \times 10^3$	0,007752	0,015686	1,102719
	CHu8p10c11	Mass	4×10^1			
	Ma5p3c11	CHu8	$1,6 \times 10^2$			
	Ma5p3c11	Mass	$1,02 \times 10^4$			

CR88 y Ma5	CR88p3c12	793B	1,02x10 ⁴	0,003922	0,077843	1,74719
	CR88p3c12	Mass	< 4x10 ¹			
	Ma5p3c11	793B	7,94x10 ²			
	Ma5p3c11	Mass	1,02x10 ⁴			

5.2. Evolución viral

5.2.1 Análisis de las secuencias S1

5.2.1.1 Inferencia filogenética con las secuencias S1

Para inferir las relaciones filogenéticas se conformó una base de datos con las secuencias obtenidas de los pasajes en serie en diferentes sistemas biológicos (EP, ChEK, hospedador natural) junto a secuencias de referencia tomadas del GenBank (**Tabla 1 anexo**).

Todas las cepas obtenidas en este estudio formaron un grupo monofilético con las cepas de referencia del linaje correspondiente. Las variantes de la cepa A13 (A13 wild, A13p10, A13p20, A13p30, A13p40, A13p50, A13p63, A13p63c5, A13p63c10, A13p63c14, K10, K20, y KD10) forman un clado con las cepas de referencia del linaje GI-16 (IZO 28/86, CK/CH/LDL/971, T3, Q12992/02, CK/CH/Chongqing/0908, UY/09/CA/01); las variantes de la cepa CHu8 (CHu8 wild, CHu8p10, CHu8p20, CHu8p30, CHu8p40, CHu8p50, CHu8p10c5, CHu8p10c6, CHu8p10c10) forman un clado con las cepas de referencia del linaje GI-11 (UFMG/G, UFMG/297, UFMG/283, IBV/Brasil/351/1984, UFMG/12.2, UFMG/1141); las variantes de la cepa CR88 (CR88p3, y CR88p3c13, CR88p3c14) forman un clado con las cepas de referencia del linaje GI-13 (Moroccan-G/83, FR-85131-85, UK/7/91, Spain/00/336, ck/CH/LSD/110857, 4/91vaccine, Poland/58/1998); y las variantes de la cepa Ma5 (Ma5p3 y Ma5p3c11) forman un clado con las cepas de referencia del linaje GI-1 (Beaudette, M41, H120, CK/CH/LLN/111169, ckZA/6743b/11, IBV438) (**Figura 15**).

Las cepas del linaje GI-1, comparten entre un 96,9 y 99,79% de similitud en la secuencia de nucleótidos y 94,01 a 99,62% en la secuencia de aminoácidos. Las cepas del linaje GI-11, tienen entre un 92,4 a un 100% de similitud en la secuencia de nucleótidos y un 91,86 a 100% en la secuencia de aminoácidos. Las cepas del linaje GI-13 comparten entre un 86,08 y 99,89% de similitud entre sus secuencias de nucleótidos, y un 85,8 y 99,92 % de similitud en sus secuencias de aminoácidos. Las cepas del linaje GI-16, muestran una similitud de 96,39 y 99,95% entre sus secuencias de nucleótidos y de 95,24 y 99,92% entre las de aminoácidos.

Además, se observó que los grupos de secuencias de la cepa A13 provenientes de un mismo soporte biológico mostraron una mayor cercanía filogenética. Esto es, las secuencias de todas

RESULTADOS

las muestras adaptadas a hospedador natural formaron un *cluster* (K10, KD10, K20) diferente de las adaptadas a ChEK (A13p63c5, A13p63c10, A13p63c14) y diferente de las secuencias de los pasajes en EP (A13p50, A13p60 y A13p63). Esto no ocurre con CHu8, donde la secuencia CHu8p20 muestra mayor distancia filogenética con el resto de las secuencias de los pasajes en EP.

En ningún caso se observó más de 80% de similitud entre secuencias de distinto linaje.

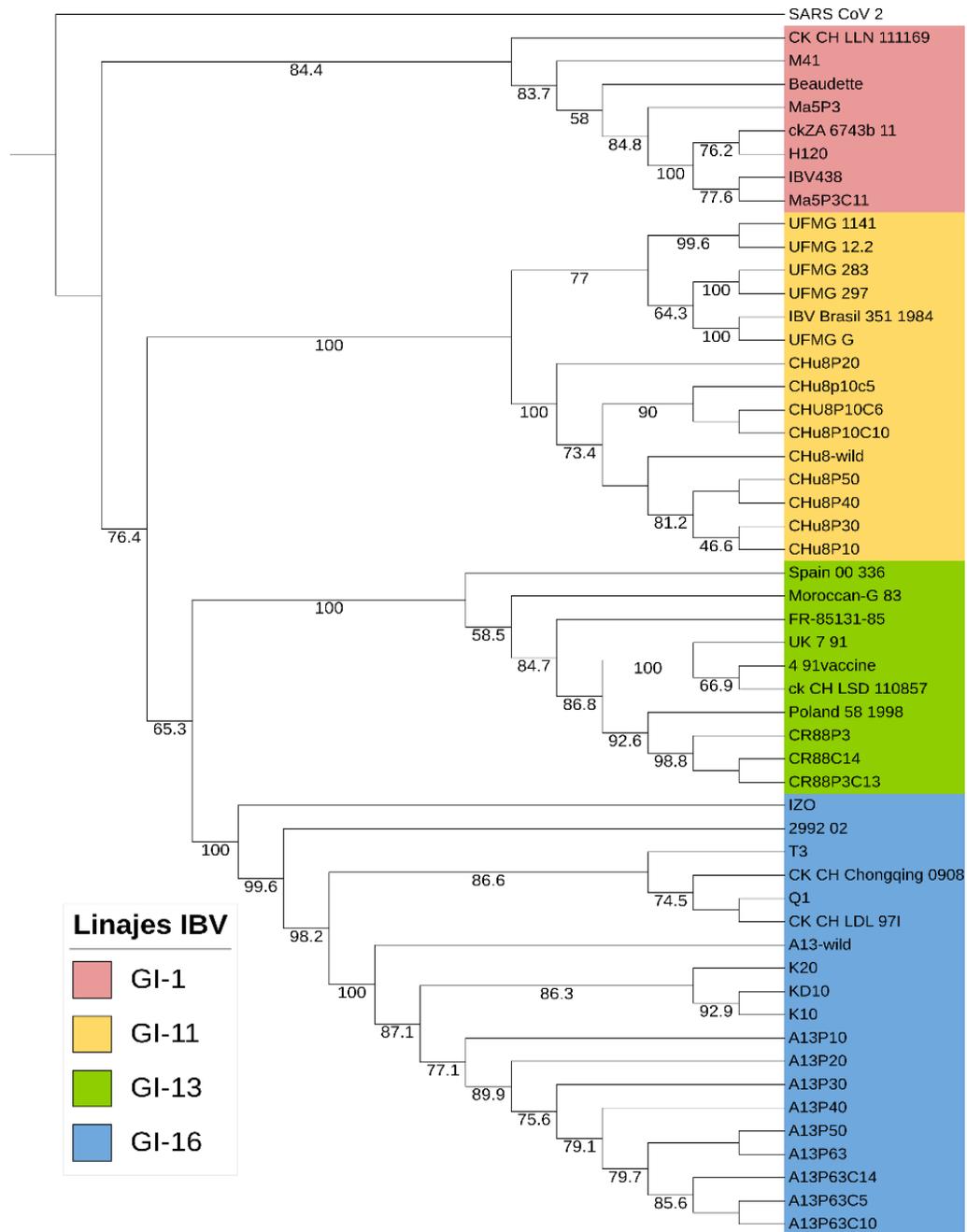


Figura 15. Árbol filogenético de las variantes de IBV empleadas en el ensayo de evolución viral. Se observa la asociación entre las cepas de cada linaje.

5.2.1.2 Análisis de las secuencias S1 de A13

En esta sección analizamos el fragmento S1 de las secuencias de la cepa A13 obtenidas de muestras pertenecientes a 12 pasajes en diferentes soportes biológicos (8 de pasajes en EP, 3 de pasajes en ChEK y 3 de pasajes en hospedador natural).

Las secuencias analizadas incluyen 1616 nucleótidos que codifican los 539 aminoácidos de S1. La similitud entre las secuencias de nucleótidos varió entre 98,64 y 100%, mientras que en la secuencia de aminoácidos el porcentaje de variación estuvo entre 96,85 y 100% (**Tablas anexo 3 y 4**). La variabilidad mencionada corresponde a un total de 38 cambios de nucleótidos (2,35%), 27 de los cuales (5%) fueron no sinónimos, es decir involucraron cambios de aa.

Para el análisis de los cambios de aminoácidos en S1 se consideró (además del sistema biológico en el que se realizaron los pasajes), si esos cambios involucraron la sustitución por una aa de propiedades químicas diferentes y si los mismo se ubicaron en áreas críticas de S1. Las áreas críticas de S1 son aquellas que se encuentran en las regiones hipervariables: i) HVRI (38-67), ii) HVRII (91–141) y iii) HVR III (274–387).

Cuando se analizaron los cambios en base a los pasajes en serie se observó que las secuencias de S1 de A13 obtenidas de los pasajes en EP acumularon 23 cambios no sinónimos en S1. Diez de estos cambios fueron estables ya que no se modificaron en los pasajes siguientes (F16V, A119D, S132F, K160N, R318S, E392Q, V503I, E518V, K534N, H537R). De ellos, 3 se situaron en HVR II y III (A119D, S132F, R318S). Los 13 cambios restantes fueron transitorios, es decir, se observaron en una ocasión y revirtieron en el siguiente pasaje (R95S, N216K, T239L, S243L, T250N, V255D, Q482P, D497N, V504I, E518G, S535N, R536K, R538P). El 74% (17/23) fueron cambios radicales, es decir involucran el reemplazo de un aminoácido por otro con propiedades diferentes. Los cambios se observan en la **Tabla 15**

Tabla 15. Cambios de aminoácidos en S1 de A13 observados a lo largo de los pasajes en serie en EP

Residuos	HVRII										HVRIII											
	16	95	119	132	160	216	239	243	250	255	318	392	482	497	503	504	518	534	535	536	537	538
Wild	F	R	A	S	K	N	T	S	T	V	R	E	Q	D	V	V	E	K	N	R	H	P
A13p10	V	R/S*	A	S	N	N	T	S	T	V	R	Q	Q	D	V	V	E	N	S	R	R	R
A13p20	V	R	A	F	N	N	L	S	T	V	S	Q	Q	D	V	V	E	N	S	R	R	R
A13p30	V	R	A	F	N	N	T	S	T	V	S	Q	Q	D	V	V	E	N	S	R	R	R
A13p40	V	R	D	F	N	K	T	S/L*	N	D	S	Q	Q	D	V	V	E	N	S	R	R	R
A13p50	V	R	D	F	N	N	T	S/L*	T	V	S	Q	P	N	I	I	G	N	N	K	R	P
A13p60	V	R	D	F	N	N	T	S	T	V	S	Q	Q	D	I	V	V	N	S	R	R	R
A13p63	V	R	D	F	N	N	T	S	T	V	S	Q	Q	D	I	V	V	N	S	R	R	R

Nota: *indican diferencias que se observaron en la secuencia S1 como consecuencia del uso de diferentes métodos de secuenciación. Los cambios de color indican diferencias radicales de los aminoácidos (diferencias en los grupos funcionales R): en celeste los neutros apolares, en verde los neutros aromáticos, en rojo, los neutros polares, en naranja los ácidos hidrofílicos, y en púrpura los básicos hidrofílicos.

En el análisis de los pasajes de A13 en ChEK, se encontraron 5 cambios de nucleótidos respecto de la secuencia de A13p63 (que es el aislamiento con el que se iniciaron los pasajes en serie en cultivo de células). De esos 5 cambios, 3 fueron no sinónimos, es decir involucran cambios en la secuencia de aa de S1. Dos de estos cambios fueron estables (L448F, V518E), ninguno de ellos se localizó en las regiones HVR. El cambio restante (S130N) está localizado en HVR II, sin embargo, el mismo se observó en el último pasaje, por lo cual se requieren más pasajes para saber si se trata de un cambio estable. El 67% (2/3) de los cambios fueron radicales, y corresponden a los 2 cambios estables. La información se detalla en la **Tabla 16**.

Residuos	HVR II		
	130	448	518
A13p63	S	L	V
A13p63c5*	S	F	E
A13p63c10	S	F	E
A13p63c14*	N	F	E

Nota: Los cambios de color indican diferencias radicales de los aminoácidos (diferencias en los grupos funcionales R): en celeste los neutros apolares, en verde los neutros aromáticos, en rojo, los neutros polares, en naranja los ácidos hidrofílicos, y en púrpura, los básicos hidrofílicos.

El análisis de la secuencia de S1 de los pasajes en hospedador natural resultó en 7 cambios de nucleótidos, de los cuales 6 fueron no sinónimos, es decir cambios en la secuencia de aa. El análisis de la secuencia de aa deducida de la secuencia de nucleótidos mostró que 3 de los 6 cambios fueron estables (R95S, A100V, N160K). Dos de ellos se localizaron en HVR II (R95S, A100V). El resto de los cambios fueron transitorios (S130R, G131E, N241I), dos de ellos en HVR II (S130R, G131E). A excepción de A100V, el resto de los cambios fueron radicales, esto corresponde a un 83% (5/6). La información se resume en la **Tabla 17**.

Regiones HVR	HVR II					
	95	100	130	131	160	241
A13p10	R	A	S	G	N	N
K10	S	V	R	E	K	I
KD10	S	V	R	E	K	N
K21	S	V	S	G	K	N

Nota: Los cambios de color indican diferencias radicales de los aminoácidos (diferencias en los grupos funcionales R): en celeste los neutros apolares, en verde los neutros aromáticos, en rojo, los neutros polares, en naranja los ácidos hidrofílicos, y en púrpura, los básicos hidrofílicos.

5.2.1.3 Análisis de las secuencias S1 de CHu8

En esta sección analizamos el fragmento S1 de las secuencias de la cepa CHu8 obtenidas de muestras pertenecientes a 9 pasajes en diferentes soportes biológicos (6 de pasajes en EP y 3 de pasajes en ChEK). Los resultados integran los cambios de la amplificación parcial de S1 y de la secuenciación del genoma completo por Illumina.

Las secuencias analizadas corresponden a un área 1625 nucleótidos que codifican 541 aminoácidos de S1. La similitud entre las secuencias de nucleótidos varió entre 99,63 y 100% mientras que en la secuencia de aminoácidos deducida el porcentaje de variación estuvo entre 99,08 y 100% (**Tablas anexo 6 y 7**). La variabilidad mencionada corresponde a un total de 7 cambios de nucleótidos (0,43 %), que se tradujeron en 6 cambios no sinónimos (1,11 %).

Los pasajes en EP acumularon 4 cambios de aminoácidos. Solo uno de ellos fue estable (S117R) y se localizó en la región HVR II. El resto fueron cambios transitorios (P6L, T121K, P251L), uno de ellos en HVR II (T121K). El 50% del total de cambios fueron cambios radicales (2/4). Los resultados se observan en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Cambios de aminoácidos en los pasajes por EP de las secuencias S1 de CHu8				
Regiones HVR		HVR II		
Residuo	6	117	121	251
Wild	P	S	T	P
CHu8p10	P/L*	S	T/K*	L
CHu8p20	P	S	T	P
CHu8p30	P	R	T	L
CHu8p40	P	R	T	P
CHu8p50	L	R	T	P

Nota: *indican diferencias que se observaron en la secuencia S1 obtenida por métodos de secuenciación distintos. Los cambios de color indican diferencias radicales de los aminoácidos (diferencias en los grupos funcionales R): en celeste los neutros apolares, en verde los neutros aromáticos, en rojo, los neutros polares, en naranja los ácidos hidrofílicos, y en púrpura, los básicos hidrofílicos.

Las secuencias de los pasajes de CHu8 en cultivo primario de ChEK fueron comparadas con el CHu8p10 (que es el aislamiento de origen de los pasajes en cultivo primario), encontrándose un total de 5 cambios de nucleótidos (todos no sinónimos). Dos de estos cambios se mantuvieron estables (L251P, A461D), ninguno de ellos se localizó en una región HVR. El resto de los cambios fueron transitorios (P6L, T121K, S315L), y dos se localizaron en las regiones HVR II y III (T121K,

S315L). El 60% de los cambios fueron radicales (3/5). Los resultados se muestran en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Cambios de aminoácidos en los pasajes por ChEK de las secuencias S1 de CHu8

Regiones HVR		HVR II		HVR III	
Residuo	6	121	251	315	461
CHu8p10	P/L*	T/K*	L	S	A
CHu8p10c5*	L	T	P	L	D
CHU8p10c6	L	T	P	S	D
CHu8p10c10	L	T	P	S	D

Nota: *indican diferencias que se observaron en la secuencia S1 obtenida por métodos de secuenciación distintos. Los cambios de color indican diferencias radicales de los aminoácidos (diferencias en los grupos funcionales R): en celeste los neutros apolares, en verde los neutros aromáticos, en rojo, los neutros polares, en naranja los ácidos hidrofílicos, y en púrpura, los básicos hidrofílicos.

5.2.1.4 Análisis de la secuencia S1 de los pasajes en cultivo primario de CR88 y Ma5

Aquí se comparó la secuencia de S1 (1618 nucleótidos /540 aminoácidos) de la cepa CR88p3 (3 pasajes en EP) con la secuencia (mismo fragmento) obtenida luego de 13 pasajes en cultivo primario de ChEK (CR88p3c13). La similitud entre las secuencias de nucleótidos fue de 99,94% (99,81% de aa). La diferencia corresponde a un único cambio de nucleótido, en la posición 113 (C→T), esta mutación genera un cambio de aminoácido (P38L) en la posición 38 dentro de la HVRI.

También se hizo el análisis comparativo de las secuencias de S1 (1609 nts / 537 aa) de Ma5p3 (3 pasajes en EP) y Ma5p3c11 (Ma5p3 luego de 11 pasajes en cultivo de ChEK). La secuencia de nucleótidos presentó una similitud de 97,82% y la de aminoácidos fue de 97,02%. En total se encontraron 35 cambios de nucleótidos, 16 de ellos resultaron no sinónimos y de estos 13 fueron cambios radicales (**Tabla 20**). De los 16 cambios de nucleótidos, 6 se hallaron en las regiones HVR que se distribuyeron del siguiente modo; 2 en la HVRI (N38D, N51D), 3 en la HVRII (R101Y, G118D, F130S) y 1 en la HVRIII (E376G). El 81,25% de los cambios (13/16) son cambios radicales.

Tabla 20. Cambios de aminoácidos en los pasajes por ChEK de las secuencias S1 de Ma5

Regiones HVR	HVR I					HVR II					HVR III					
Residuos	19	38	51	69	73	101	118	130	179	205	246	271	273	376	423	479
Ma5p3	V	N	N	T	D	R	G	F	E	K	I	Y	S	E	C	G
Ma5p3c11	A	D	D	I	G	Y	D	S	A	R	T	N	T	G	Y	S

Nota: Los cambios de color indican diferencias radicales de los aminoácidos (diferencias en los grupos funcionales R): en celeste los neutros apolares, en verde los neutros aromáticos, en rojo, los neutros polares, en naranja los ácidos hidrofílicos, y en purpura, los básicos hidrofílicos.

5.2.2. Análisis de las secuencias del genoma completo

5.2.2.1 Análisis de las secuencias pertenecientes a la cepa A13

Se obtuvieron las secuencias completas (27642 nucleótidos) de 9 aislamientos. Las secuencias se ensamblaron en base al genoma de referencia AR/13/BA/A13 (número de acceso ON419884) del aislamiento de campo original, mostrando entre 99,86 a 99,99% de similitud en las secuencias de nucleótidos (**Tablas del anexo 7 y 8**). Se obtuvieron también secuencias de 9215 aminoácidos que fueron deducidos de los marcos de lectura de la secuencia de nucleótidos. Tomando en cuenta las regiones codificantes, se encontraron en total 46 cambios de nucleótidos (**Tabla del anexo 9**), 37 de los cuales fueron cambios no sinónimos. De ese total, el 46, 33, 9, 9, y 4% se encontraron en los ORF1a, S, 1b, M y N, respectivamente. La comparación de secuencias de aa presentó entre 99,69 a 99,97 de similitud. Una primera observación del análisis indicó que A13 es la única cepa sudamericana perteneciente al linaje GI-16 que no presenta el ORF6b. Del total de cambios de aminoácidos el 46, 32, 11, 5 y 5% se encontraron en los ORF1a, S, 1b, M y N, respectivamente. En el segmento ORF1a se identificaron 21 cambios de nucleótidos, 17 de los cuales fueron no sinónimos. Estos cambios representan el 0,18% y 0,43%, respectivamente, de la secuencia total de nucleótidos y aminoácidos (11824 nt y 3941 aa) en este segmento. Por otro lado, en el ORF S se encontraron 15 cambios de nucleótidos 12 de los cuales fueron no sinónimos, lo que representa el 0,43% y el 1,04% de las secuencias correspondientes del ORF S (3474 nt y 1157 aa). En el caso del ORF1b, se identificaron 4 cambios de nucleótidos, todos no sinónimos. Estos cambios representan el 0,05% y 0,15% de la secuencia total de nucleótidos y aminoácidos del ORF1b (7958 nt y 2652 aa). En el ORF M, se encontraron 4 cambios de nucleótidos (2 de ellos fueron no sinónimos), lo que representa el 0,59% en la secuencia de nucleótidos y 0,88% de la se aminoácidos del ORF M (681 nt y 226 aa). Por último, en el ORF N se hallaron 2 cambios de nucleótidos no sinónimos, lo que representa el 0,16% y 0,48% de la secuencia total de nucleótidos y aminoácidos del ORF N (1230 nt y 409 aa). (**Tabla 21**).

Tabla 21. Exhibe el número de cambios encontrados en las secuencias A13						
O R F	Cambios de nucleótidos			Cambios de aminoácidos		
	N°	Porcentaje del total de cambios (%)	Porcentaje del total del fragmento (%)	N°	Porcentaje del total de cambios (%)	Porcentaje del total del fragmento (%)

RESULTADOS

1a	21	45,65	0,18	17	45,9	0,43
S	15	32,6	0,43	12	32,43	1,04
1b	4	8,69	0,05	4	10,8	0,15
M	4	8,69	0,59	2	5,4	0,88
N	2	4,34	0,16	2	5,4	0,48

Las secuencias pertenecientes a los pasajes en EP acumularon en total 28 cambios no sinónimos (14 en el ORF1a, 1 en el ORF1b, 9 en el ORF S y 4 en el ORF M). Del total de cambios, 8 fueron cambios estables (ORF 1a: P748L, ORF 1b: T1403I, ORF S1: A119D, S132F, R318S, V503I, S2: A1012V, y ORF M: T189I), los restantes 20 revirtieron a lo largo de los pasajes (ORF 1a: D99G, K222R, T852I, V920I, A946V, G1623S, A2012V, D2187G, S2294G, Y2655H, S2899F, T3062I, T3895I; ORF S: R95S, S243L, E518V; ORF M: F29V, V72L, Y73H). El 75% de los cambios fueron cambios radicales. Los cambios en la subunidad S1 coinciden con los cambios antes analizados, adicionalmente se encontraron dos cambios en S2 (S542F, A1012V). Los resultados se muestran en la **Tabla 22**.

RESULTADOS

Tabla 22. Muestra los cambios de aminoácidos del ORF 1a de las secuencias del genoma completo de los pasajes A13 en EP

ORF	1a														1b	S1						S2		M				
Residuo	99	222	748	852	920	946	1623	2013	2187	2294	2655	2899	3062	3895	1403	95	119	132	243	318	503	518	542	1012	29	72	73	189
AR/13/BA/A13	D	K	P	T	V	A	G	A	D	S	Y	S	T	T	T	R	A	S	S	R	V	E	S	A	F	V	Y	T
A13p10	D	K	P	T	I	A	G	V	G	S	Y	S	I	I	T	S	A	S	S	R	V	E	S	A	F	V	H	T
A13p20	D	K	L	T	V	A	G	A	D	S	H	S	T	T	T	R	A	F	S	S	V	E	S	A	F	V	Y	T
A13p30	D	K	L	T	V	A	S	A	D	S	H	S	T	T	I	R	A	F	S	S	V	E	S	V	F	V	Y	I
A13p40	D	K	L	T	V	A	S	A	D	S	Y	S	T	T	I	R	D	F	L	S	V	E	S	V	F	V	Y	I
A13p50	D	R	L	T	V	V	G	A	D	S	Y	S	T	T	I	R	D	F	L	S	I	E	F	V	F	L	Y	I
A13p63	G	K	L	I	V	A	G	A	D	G	Y	F	T	T	I	R	D	F	S	S	I	V	S	V	V	V	Y	I

Nota: Los cambios de color indican diferencias radicales de los aminoácidos (diferencias en los grupos funcionales R): en celeste los neutros apolares, en verde los neutros aromáticos, en rojo, los neutros polares, en naranja los ácidos hidrofílicos, y en purpura, los básicos hidrofílicos.

Las secuencias de los pasajes en ChEK (A13p6c5 y A13p63c14), en comparación con el aislamiento de origen (A13p63) acumularon 14 cambios de nucleótidos, de los cuales 10 fueron cambios no sinónimos (3 en el ORF 1a, 1 en el ORF 1b, 4 en el ORF S, 2 en el ORF N). En total se encontraron 6 cambios estables (ORF 1a: S892F, ORF 1b: S437F, ORF S: L448F, V518E, L582F, ORF N: T303I), y 4 transitorios (ORF 1a: S1829R, H3116Y; ORF S: S130N; ORF N: A118V). El 80% de los cambios involucran una sustitución radical. Los cambios en S1 concuerdan con los cambios antes mencionados, y se detectaron 2 cambios en S2 (V518E, L582F). Los resultados se observan en la **Tabla 23**.

Tabla 23. Muestra los cambios de aminoácidos de las secuencias del genoma completo de los pasajes de A13 en ChEK

ORF	1a			1b	s1		s2		N	
Residuo	892	1829	3116	437	130	448	518	582	118	303
A13p63	S	S	H	S	S	L	V	L	A	T
A13p63c5	F	S	H	F	S	F	E	F	V	I
A13p63c14	F	R	Y	F	N	F	E	F	A	I

Nota: Los cambios de color indican diferencias radicales de los aminoácidos (diferencias en los grupos funcionales R): en celeste los neutros apolares, en verde los neutros aromáticos, en rojo, los neutros polares, en naranja los ácidos hidrofílicos, y en purpura, los básicos hidrofílicos.

5.2.2.2 Análisis de las secuencias pertenecientes la cepa CHu8

Se obtuvieron las secuencias completas (27634 nucleótidos) de 7 pasajes de CHu8 en las cuales se encuentran diferentes marcos de lectura que codifican 9211 aminoácidos. En el ensamblaje se usó como referencia la secuencia AR/01/BA/8Hu8. La similitud fue de 99,92 a 99,99% en las secuencias de nucleótidos y 99,83 a 99,88 en las secuencias de aminoácidos (**Tablas anexo 10 y 11**).

Al analizar las regiones codificantes de los pasajes CHu8, encontramos 30 cambios de nucleótidos, de los cuales 20 fueron cambios no sinónimos (**Tabla anexo 12**). Del total de cambios de nucleótidos el 46,7, 30, 16,7 y 6% se encontraron en los ORF1a, S, 1b y N, respectivamente. Del total de cambios de aminoácidos el 40, 35, 15 y 10% se encontraron en los ORF1a, S, 1b y N, respectivamente.

En el segmento ORF1a se identificaron 14 cambios de nucleótidos que resultaron en 8 cambios de aminoácidos. Estos cambios representan el 0,12% y 0,2%, respectivamente, de la secuencia

RESULTADOS

total de nucleótidos y aminoácidos (11830 nt y 3943 aa) en ese segmento genómico. Por otro lado, en el ORF S se encontraron 9 cambios de nucleótidos, siete de los cuales fueron no sinónimos (7 cambios en la secuencia de aminoácidos), lo que representa el 0,26% y el 0,6% de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente. En el caso del ORF1b, se identificaron 5 cambios de nucleótidos, tres de los cuales fueron no sinónimos. Estos cambios representan el 0,06% y 0,11% de la secuencia total de nucleótidos y aminoácidos del ORF1b (7958 nt y 2652 aa). Por último, en el ORF N se hallaron 2 cambios de nucleótidos que resultaron en 2 cambios de aminoácidos, lo que representa el 0,16% y 0,49% de la secuencia total de nucleótidos y aminoácidos del ORF N (1230 nt y 409 aa) (**Tabla 24**).

Tabla 24. Exhibe el número de cambios encontrados en las secuencias CHu8

ORF	Cambios de nucleótidos			Cambios de aminoácidos		
	N°	Porcentaje del total de cambios (%)	Porcentaje del total del fragmento (%)	N°	Porcentaje del total de cambios (%)	Porcentaje del total del fragmento (%)
1a	14	46,7	0,12	8	40	0,2
S	9	30	0,26	7	35	0,6
1b	5	16,7	0,06	3	15	0,11
N	2	6	0,16	2	10	0,49

Entre las secuencias de los pasajes en EP, se encontraron 25 cambios de nucleótidos, aunque solo 14 fueron no sinónimos. Dos de estos últimos (representan cambios de aminoácidos) fueron observados a partir del pasaje 10 en adelante (ORF1a: S485A, ORF1b: Q1413L). Cuatro fueron cambios estables (ORF 1a: E788D, T852I, ORF S: Q862L, ORF N: G147R) y 8 fueron transitorios (ORF 1a: E945D, T1408I, S3450L, D3840N; ORF1b: L2623V; ORF S: P6L, T121K; ORF N: R50K). El 64% (9/14) de estos cambios fueron cambios radicales. Se encontró un solo cambio en S2 (Q862L). La información se visualiza en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Muestra los cambios de aminoácidos de las secuencias del genoma completo de los pasajes CHu8 en EP

ORF	1a							1b		S1		S2	N	
Residuo	485	788	852	945	1408	3450	3840	1413	2623	6	121	862	50	147
AR/01/BA/8Hu8	S	E	T	E	T	S	D	Q	L	P	T	Q	R	G
CHu8p10	A	E	T	E	T	S	D	L	L	L	K	Q	R	G
CHu8p20	A	E	T	D	I	L	D	L	V	P	T	Q	K	R
CHu8p30	A	E	T	E	T	S	D	L	V	P	T	L	R	R
CHu8p40	A	D	I	E	T	S	D	L	V	P	T	L	R	R

CHu8p50	A	D	I	E	T	S	N	L	L	L	T	L	R	R
<p>Nota: Los cambios de color indican diferencias radicales de los aminoácidos (diferencias en los grupos funcionales R): en celeste los neutros apolares, en verde los neutros aromáticos, en rojo, los neutros polares, en naranja los ácidos hidrofílicos, y en púrpura, los básicos hidrofílicos.</p>														

La secuencia del pasaje 5 en ChEK (CHu8p10c5) fue comparada con el aislamiento de origen (CHu8p10), encontrándose 9 cambios no sinónimos (ORF1a: A485S, T1675N, ORF1b: L155I, L1413Q, ORF S: K121T, S315L, A461D, N647Y, Q829R). Siete de estos cambios involucran sustituciones radicales (77%). Los cambios en el gen que codifica a S1 coinciden con el análisis previo. Sumado a ello, se encontraron 2 cambios en la secuencia de S2 (N647Y, Q829R). La información se detalla en la **Tabla 26**.

Tabla 26. Muestra los cambios de aminoácidos de las secuencias del genoma completo de los pasajes CHu8 en ChEK									
ORF	1a		1b		S1			S2	
Residuos	485	1675	155	1413	121	315	461	647	829
CHu8p10	A	T	L	L	K	S	A	N	Q
CHu8p10c5	S	N	I	Q	T	L	D	Y	R
<p>Nota: Los cambios de color indican diferencias radicales de los aminoácidos (diferencias en los grupos funcionales R): en celeste los neutros apolares, en verde los neutros aromáticos, en rojo, los neutros polares, en naranja los ácidos hidrofílicos, y en púrpura, los básicos hidrofílicos.</p>									

5.2.2.3 Análisis de las secuencias pertenecientes a la cepa CR88

Se obtuvieron las secuencias completas (27648 nucleótidos) de CR88p3 y CR88p3c14. De las secuencias de nucleótidos se dedujo las secuencias de aminoácidos de las regiones codificantes (9217 aminoácidos). Las secuencias se ensamblaron en base al genoma de referencia CR88 (código de acceso: MN548285.2). La similitud entre CR88p3 y CR88p3c14 fue de 99,96 las secuencias de nucleótidos y de 99,92% en la de aminoácidos.

Se encontraron en total 12 cambios de nucleótidos (**Tabla 13 anexo**), 7 de ellos fueron no sinónimos (ORF1ab: E628A, E2010K, T2302M, I4425L, S5984G, ORF S: P38L, ORF N: I51F). Del total de cambios de nucleótidos el 83,3%, 8%, y 8% se encontraron en los ORF1ab, S y N, respectivamente. Del total de cambios de aminoácidos deducidos de las secuencias de nucleótidos, el 71,4%, 14,3% y 14,3% se encontraron en los ORF1ab, S y N, respectivamente. En el ORF1ab se identificaron 10 cambios de nucleótidos que resultaron en 5 cambios de aminoácidos. Estos cambios representan el 0,05% y 0,07%, respectivamente, de la secuencia total de nucleótidos y aminoácidos (19892 nt y 6629 aa) en este segmento. Por otro lado, en el

ORF S se encontró 1 cambio de nucleótido que se tradujo en 1 cambio de aminoácido, lo que representa el 0,03% y el 0,08% de las secuencias correspondientes del ORF S (3468 nt y 1155 aa). En el ORF N se halló 1 cambio de nucleótido que resultó en 1 cambio de aminoácido, lo que representa el 0,08% y 0,24% de la secuencia total de nucleótidos y aminoácidos del ORF N (1213 nt y 409 aa). Cinco de los cambios de aminoácidos involucraron sustituciones radicales. El cambio en el ORF S coincide con el análisis previo de la secuencia S1. (**Tabla 27**)

Tabla 27. Muestra los cambios de aminoácidos de las secuencias del genoma completo de los pasajes de CR88 en ChEK							
ORF	1ab					S	N
Residuo	628	2010	2302	4425	5984	38	51
CR88p3	E	E	T	I	S	P	I
CR88p3c14	A	K	M	L	G	L	F

Nota: Los cambios de color indican diferencias radicales de los aminoácidos (diferencias en los grupos funcionales R): en celeste los neutros apolares, en verde los neutros aromáticos, en rojo, los neutros polares, en naranja los ácidos hidrofílicos, y en púrpura, los básicos hidrofílicos.

5.3. Modelo de infección

5.3.1 Pasajes en serie en hospedador natural forzando el tropismo renal

El ensayo de pasajes en hospedador natural se realizó con el objetivo de forzar el tropismo renal de la cepa A13 e incrementar la virulencia de esta. Para ello se inocularon pollos de 2 a 5 semanas de edad cuyas muestras de riñón (tomadas 7 dpi) se usaron como inóculo del siguiente pasaje. Los pasajes se realizaron en hospedador natural sin tratamiento previo (grupo K) y tratados con dexametasona para comprometer la respuesta inmune de esos animales (grupo KD).

En total se realizaron 11 pasajes KD y 20 pasajes K. Durante los primeros pasajes los animales no mostraron signos de enfermedad, ni se observaron lesiones durante la necropsia. En el cuarto pasaje en el grupo inmunodeprimido (KD4) y en el quinto en los animales sin tratamiento (K5), se comenzaron a observar signos clínicos durante las primeras 72 hpi (epifora, estornudos, disnea y depresión). Estos signos se mantuvieron constantes en los siguientes pasajes. Las necropsias se realizaron a los 7 dpi. A partir del pasaje 5 del grupo KD y del 6 del grupo K se comenzaron a observar lesiones en riñones y tracto respiratorio, aunque las mismas fueron inconstantes (no se observaron en todos los pasajes o en la totalidad de los animales). En riñones se observó palidez y tumefacción con los túbulos renales engrosados, pero sin evidencia de urolitiasis. En el tracto respiratorio se registró exudado catarral en tráquea y opacidad y engrosamiento de las paredes de los sacos aéreos con presencia de exudado seroso. En todos

los casos se tomaron muestras de riñón que fueron procesadas para ser usada como inóculo del siguiente pasaje. Previo a eso fueron evaluadas mediante RT-PCR para verificar que fueran positivas a IBV.

5.3.2 Análisis de la patogenicidad de los pasajes K13 y KD11

Debido a que la evaluación de pasajes por hospedador natural solo permitió examinar síntomas clínicos, lesiones macroscópicas y muestras renales en un período de tiempo limitado de 7 días, se llevó a cabo un experimento preliminar para determinar la patogenicidad de los pasajes KD11 y K13 de manera más exhaustiva. Este estudio contempló la evaluación de muestras semanales hasta 21 días después de la infección, incluyendo tejido de tráquea, tonsila cecal, además del tejido renal, que fueron analizadas mediante RT-PCR e histopatología. También se tomaron muestras de sangre, para la obtención de suero y detección de anticuerpos específicos anti-IBV. De este modo, se logró obtener una comprensión más completa de la patogenicidad de los aislamientos seleccionados.

Para este ensayo se usaron 18 pollos SPF de 14 días de edad que se organizaron en tres grupos (de seis animales cada uno) que fueron alojados en las unidades de aislamiento que el grupo de aves tiene en las instalaciones del CICVyA (INTA Castelar). Uno de los grupos (6 animales) fue inoculado con el pasaje K13, otro grupo (6 animales) fue inoculado con la cepa KD11 y un tercer grupo permaneció como control negativo.

Tanto los animales infectados con K13 como aquellos infectados con KD11 presentaron signos tales como epifora, estornudos y distrés respiratorio leve, anorexia y depresión leve durante las primeras 72 hpi. A los 7, 14 y 21 dpi se realizó la eutanasia de 2 animales por grupo. Se tomaron muestras de tráquea, riñón y tonsila cecal para evaluación de lesiones (los dos primeros) y detección de material genético viral (de los tres tejidos) y también se tomaron muestras de sangre para evaluación de anticuerpos específicos.

En todos los tiempos evaluados se observó en la necropsia opacidad de los sacos aéreos (con más o menos exudado seroso), engrosamiento de la serosa, tumefacción renal leve, con ocasional ensanchamiento de los túbulos renales, y palidez en los riñones. Si bien no se estableció un sistema de escores para cuantificar las lesiones, las mismas fueron más relevantes en las muestras tomadas el día 21 pi (**Figura 16**).

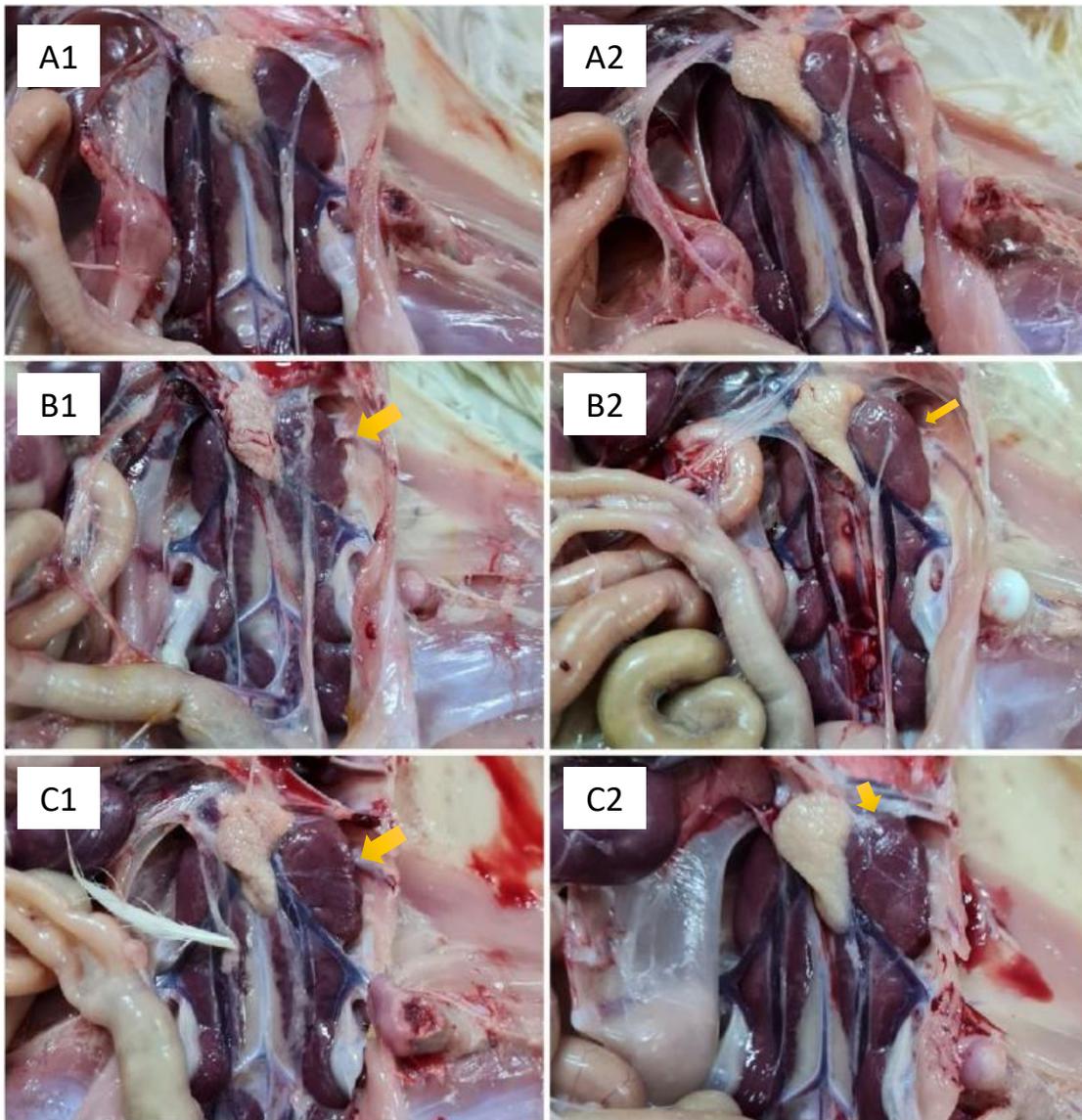


Figura 16. Cambios morfológicos renales 21 dpi.: A) Controles negativos. B) KD11. Se observa riñón pálido con túbulos renales marcados (B1) y riñón pálido (B2). C) K13. riñones pálidos y tumefactos con surcos marcados (C1) y riñón tumefacto protruye de la fosa renal (C2).

En la evaluación histológica, solo se encontraron lesiones microscópicas a los 7 dpi. En ambos grupos, las tráqueas mostraron pérdidas de cilias, sin infiltrado inflamatorio, siendo el proceso más severo en el grupo K13. Respecto a las muestras de riñón, las lesiones solo se observaron en los animales inoculados con K13. Estas lesiones fueron leves y consistieron en unos pocos infiltrados focales de linfocitos en el intersticio. Los resultados se resumen en la **Tabla 28** y se observan en la **Figura 17**.

RESULTADOS

Tabla 28. Resume los resultados del análisis histopatológico de los pasajes KD11 Y K13				
Grupo	Tejido	7 dpi	14 dpi	21 dpi
Control Negativo	Tráqueas	S/P	S/P	S/P
	Riñones	S/P	S/P	S/P
KD11	Tráqueas	Pérdida parcial de cilias sin infiltrado inflamatorio.	S/P	S/P
	Riñones	S/P	S/P	S/P
K13	Tráqueas	Extensa perdida de cilias, sin infiltrado inflamatorio.	S/P	S/P
	Riñones	Foco linfocitario aislado en el intersticio.	S/P	S/P

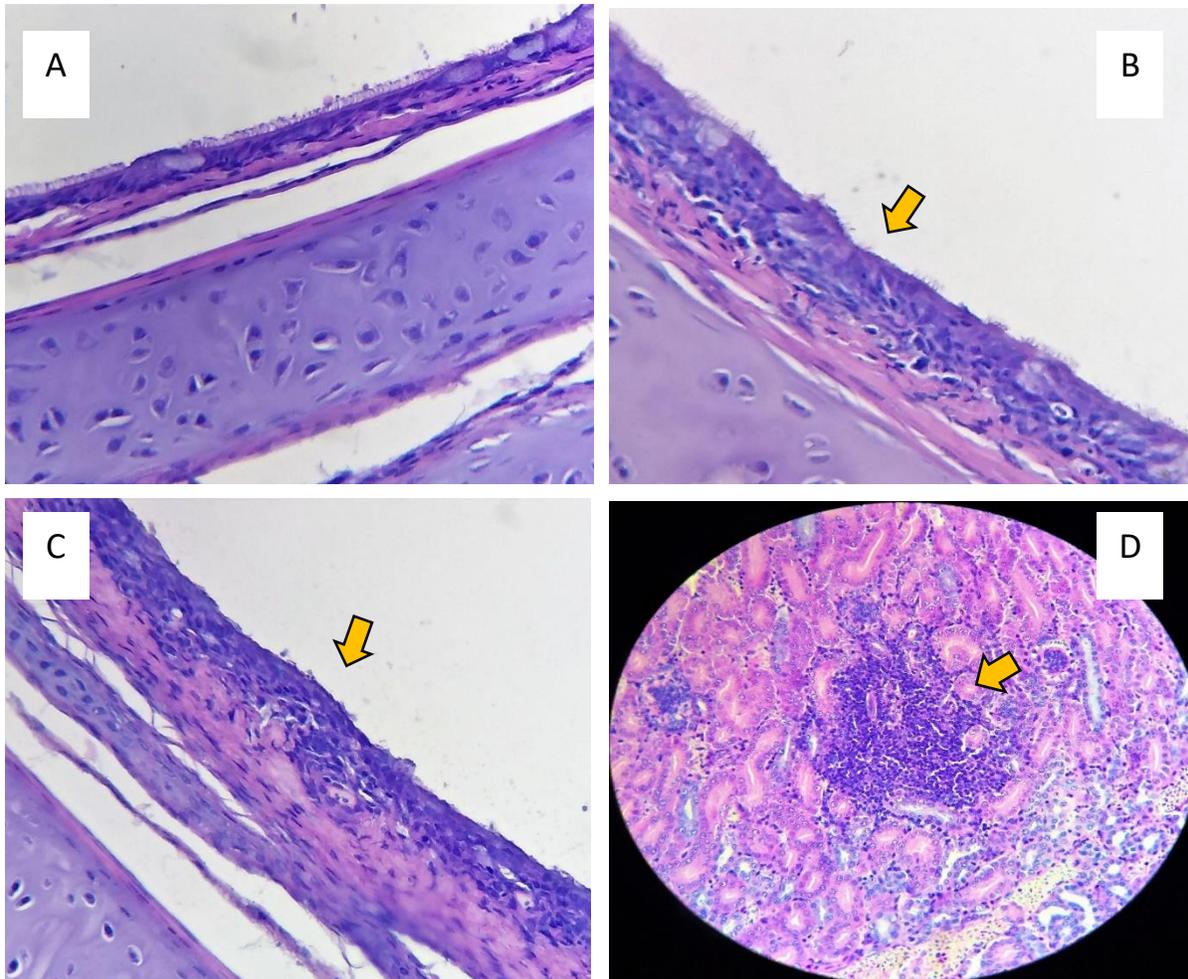


Figura 17. Lesiones microscópicas a los 7dpi. A) Grupo Control Negativo, tráquea (400X). **B)** Grupo KD11, tráquea (400X). La imagen muestra pérdida parcial de cilias. **C)** Grupo K13, tráquea (400X). La imagen muestra pérdida extensa de cilias. **D)** Grupo K 13, riñón (100X). La imagen muestra un foco linfocitario aislado en el intersticio.

El grupo de animales infectados con el pasaje K13 demostró una mayor cantidad de muestras positivas mediante la técnica de RT-PCR. A los 7 dpi, todas las muestras analizadas resultaron positivas a excepción de una muestra de tonsila cecal. Por el contrario, en el grupo infectado con el pasaje KD11, la mitad de las muestras en los tres órganos analizados resultaron negativas. A los 14 dpi, la mitad de los animales infectados con K13 mostraron resultados positivos en tráquea y riñón, mientras todas las muestras de tonsila cecal fueron positivas. En el grupo inoculado con KD11 solamente una muestra de tonsila cecal resultó positiva a los 14 dpi. A los 21 dpi, el único grupo en el cual todavía fue posible detectar genoma viral fue el inoculado con K13 en una de tonsila cecal, mientras que no se detectó presencia viral en el grupo infectado con KD11. Las muestras del grupo de control negativo fueron negativas en los tres tiempos analizados. (**Tabla 29**).

Tiempo	7 dpi			14 dpi			21 dpi		
Tejido	Tráquea	Riñón	Tonsila cecal	tráquea	Riñón	Tonsila cecal	tráquea	Riñón	Tonsila cecal
KD11	1/2	1/2	1/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2
K13	2/2	2/2	1/2	1/2	1/2	2/2	0/2	0/2	1/2
CN	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

La presencia de anticuerpos específicos contra IBV fue evaluada mediante el uso de un ELISA indirecto. Todos los sueros de los animales inoculados con los pasajes KD11 y K13 fueron positivos al test, a excepción de un animal del pasaje KD11 a los 7 dpi. (**Figura 18**).

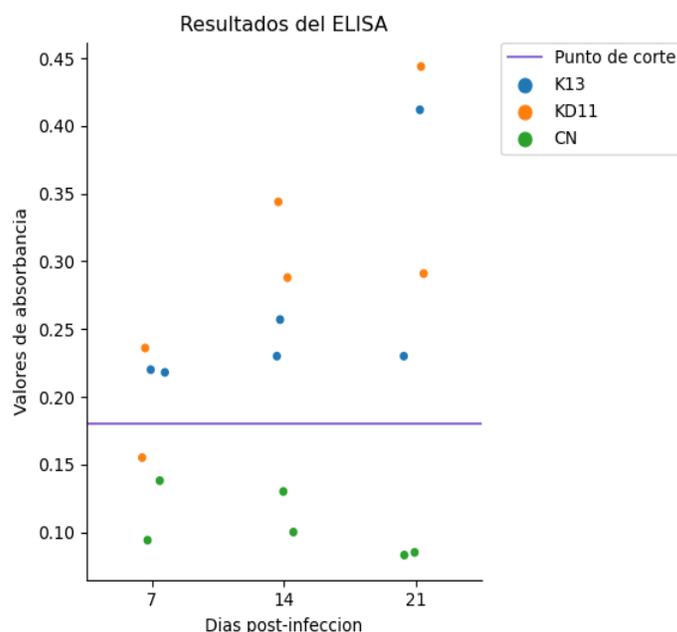


Figura 18. Resultado de ELISA de los pasajes KD11 y K13. Se observa que a partir de los 14 días todas las muestras son positivas a excepción de los Controles Negativo (CN).

Esta prueba se llevó a cabo como ensayo piloto de patogenicidad (empleando KD11 y K13). Los resultados permitieron optimizar los ensayos que se llevarían a cabo al seleccionar el aislamiento para el modelo de infección. Fundamentalmente nos permitió poner a punto las técnicas de ELISA, detección del genoma viral en tejidos y establecer el número de unidades muestrales adecuado para realizar análisis estadísticos.

Se observó que ambos pasajes fueron capaces de generar lesiones (macro y microscópicas) y anticuerpos específicos anti-IBV. Sin embargo, el pasaje K13 demostró una mayor virulencia, presentando lesiones más severas, mayor capacidad de replicación viral y buena inmunogenicidad al generar anticuerpos específicos (detectables por ELISA) desde la primera semana pi.

En base a estos hallazgos, se decidió llevar a cabo un mayor número de pasajes sin el tratamiento con dexametasona, con la hipótesis de que esto consolidaría las lesiones renales para su cuantificación. Además, se propuso cuantificar las lesiones microscópicas mediante el test de la ciliostasis y se optimizó la cuantificación mediante RT-qPCR para la carga viral.

5.3.2. Puesta a punto de la técnica de RT-PCR en tiempo real para cuantificación viral

El primer paso fue preparar un templado adecuado para realizar los pasos de optimización de la prueba y posteriormente la construcción de una curva estándar.

En nuestro laboratorio ya contábamos con un fragmento de DNA (de 275 nucleótidos) correspondiente a la región UTR 5' del genoma viral (posiciones 216 a 490) obtenido de una amplificación de una muestra de campo de IBV. Ese fragmento ya estaba ligado a pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA) de 3016 pb. Con el objetivo de conocer el número de moléculas en solución (para construir la curva estándar) la concentración del plásmido (más inserto) en solución fue determinada empleando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA). El resultado promedio de diferentes determinaciones fue de 93,95 ng/μl. Ese valor fue usado para calcular el número de moléculas en solución (como fue explicado en materiales y métodos). El resultado fue el siguiente

$$\text{Numero de copias} = \frac{9,395 \cdot 10^{-8} \text{ g}/\mu\text{l} * 6,022 \cdot 10^{23} \text{ moléculas/mol}}{3291 * 660 \text{ g/mol}} = 2,6 * 10^{10} \text{ moléculas}/\mu\text{l}$$

Dónde:

- Cantidad de DNA (g) = $9,395 \cdot 10^{-8}$ g/μl
- Longitud del DNA (pb) = 3291 (275pb + 3016pb del plásmido)
- Peso molecular promedio de un par de bases = 660 g/mol
- Número de Avogadro = $6,022 \cdot 10^{23}$ moléculas/mol

Posteriormente se llevaron a cabo las diluciones seriadas en base 10 de los clones hasta obtener 9 diluciones (de 10^{-1} a 10^{-9}), con un número máximo de 260000000 y uno mínimo de 2,6 moléculas/ μ l.

Estas soluciones de clones fueron usadas para optimizar las condiciones del termociclado y para construir la curva estándar. En primera instancia se realizaron una serie de pruebas para optimizar el perfil del termociclado (fundamentalmente la temperatura de hibridación/extensión). Los *primers* seleccionados para el ensayo (IBV-Diag-216-fw, IBV-Diag-490-rev) son los mismos que ya se utilizaban en nuestro laboratorio para el diagnóstico de rutina de IBV empleando una técnica de RT-PCR regular. Dado que esta prueba se realiza con una temperatura de hibridación 5°C menor a la recomendada para el annealing/extensión con los reactivos (*master mix* sistema *Sybr green*) provistos por *Biosystems* para trabajar en el equipo StepOnePlus™ fue necesario realizar las pruebas de eficiencia a 60°C .

De modo que se realizó una RT-PCR preliminar con los *primers* seleccionados ($5\ \mu\text{M}$) con 3 temperaturas distintas usando como templados las diluciones del clon: 10^{-1} (260000000 moléculas/ μ l), 10^{-3} (2600000 moléculas/ μ l), 10^{-5} (26000 moléculas/ μ l), 10^{-7} (260 moléculas/ μ l) y 10^{-9} (2,6 moléculas/ μ l).

Los resultados demostraron que los *primers* evaluados son capaces de amplificar producto con una temperatura de *annealing*/extensión de 60°C . También que esta técnica es sensible para detectar hasta 260 copias/ μ l (correspondiente a la dilución de 10^{-7}). Además, en ninguna de las diluciones del clon que se probaron en esta RT-PCR convencional se observaron amplificaciones espurias (**Figura 19**).

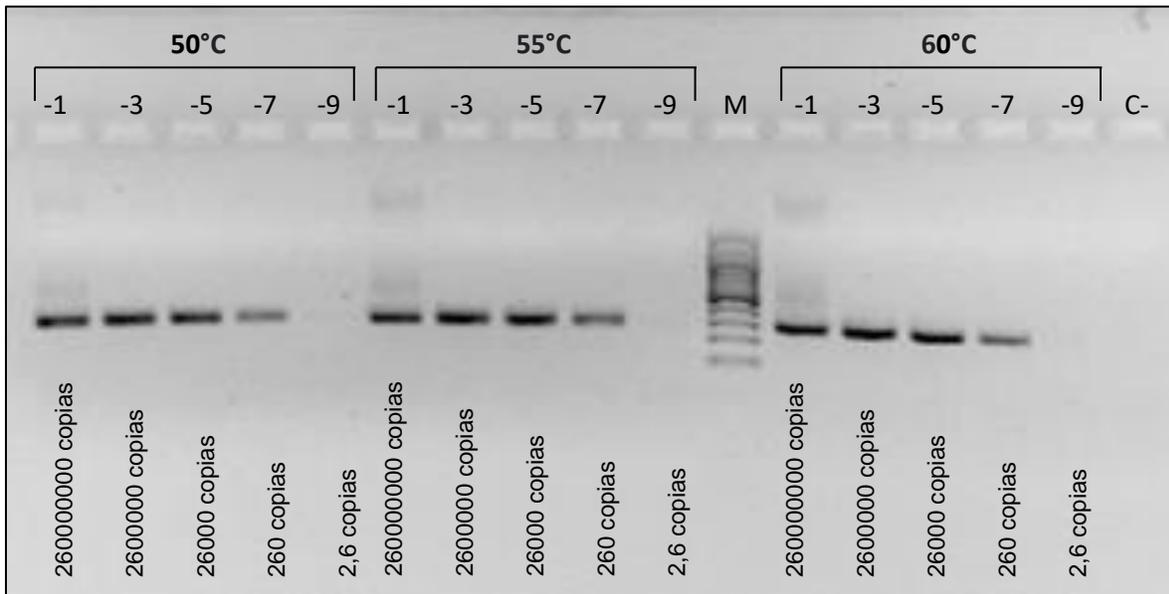


Figura 19. Resultado del ensayo previo de amplificación por PCR convencional. Se observa la amplificación del producto a las 3 temperaturas testeadas, inclusive en la dilución 10^{-7} (260 copias/ μ l de clon), y la ausencia de productos de amplificación inespecíficos.

Posteriormente, se realizaron los ensayos de optimización usando *master mix* sistema *Sybr Green* (Biodynamics, CABA, Argentina) en el equipo *Applied Biosystems StepOne™ Real-time PCR System*.

En el primer ensayo se determinó la concentración óptima de los *primers*. Se probaron tres concentraciones distintas de los mismos (2,5, 5, y 7,5 μ M). Las mejores curvas de amplificación se obtuvieron con las concentraciones de 5 y 7,5 μ M (**Figura 20.A**). En ninguna de las curvas de disociación se encontraron dobles picos, lo que indica que el sistema fue eficiente para amplificar un único producto (sin amplificaciones espurias). El resultado fue similar cuando se usó como templado muestras provenientes de tejidos de animales infectados. La temperatura de *melting* fue estimada en 88,4 (**Figura 20.B**). La concentración elegida de *primers* fue de 7,5 μ M.

Segundo, se probó la temperatura óptima de hibridación. Los mejores resultados se obtuvieron con las temperaturas 60 y 62°C. A 58°C la amplificación comenzó en un ciclo más tardío, y los controles negativos amplificaron después del ciclo 34. (**Figura 21.A**). Además, a esta temperatura se observó, en la Curva de disociación, que los controles negativos poseen dos

picos inespecíficos con una temperatura de *melting* menor a la de las muestras positivas que se estima en 88,5 (Figura 21.B). La temperatura elegida fue de 60°C.

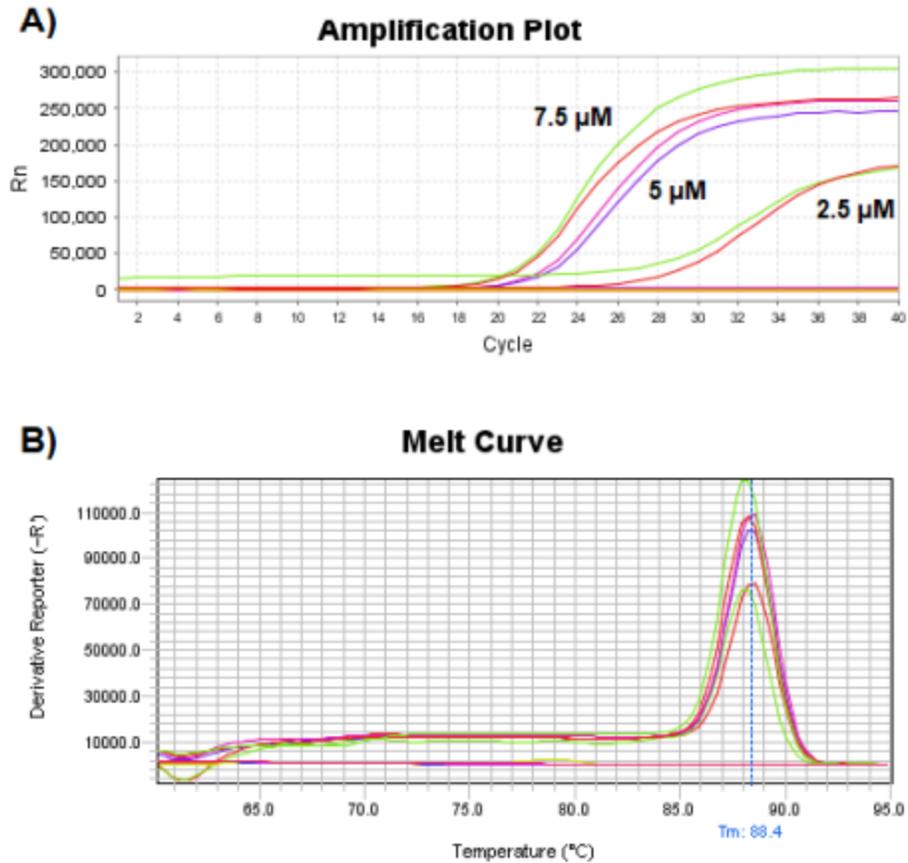


Figura 20. Resultados de la determinación de la concentración óptima de primers. A) Curva de amplificación: Se ve una amplificación en ciclos más tempranos con los primers a 5 y 7,5 μM. B) Curva de melting: No se observa que haya habido producto inespecífico, la Tm es estimada en 88,4 °C.

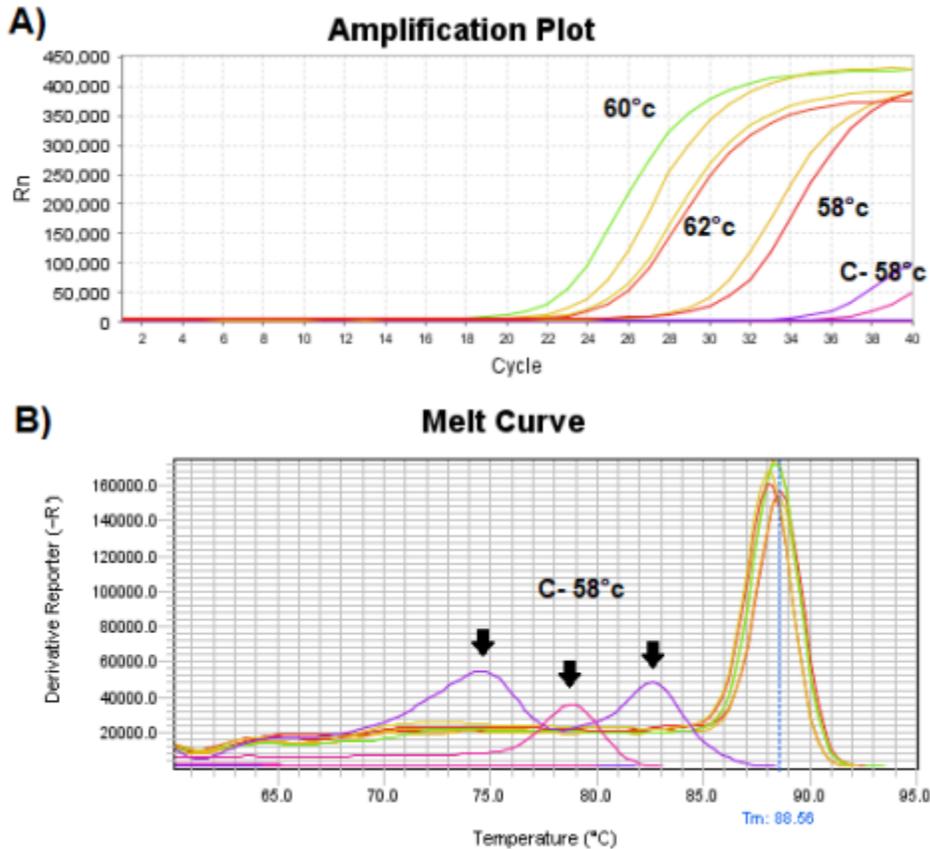


Figura 21. Resultados de la determinación de la temperatura óptima de hibridación. A) Curva de amplificación a diferentes temperaturas, se observa mejores resultados a 60 y 62 °C. **B)** Curva de melting, se señalan picos de producto inespecífico en el control negativo (C-) de la técnica con una temperatura de annealing de 58 °C.

Con los parámetros optimizados se procedió a determinar los valores de C_t (*cycle treshold*) para diferentes concentraciones de plásmidos (clones) con el propósito de establecer una curva estándar. El C_t es el número de ciclos de amplificación necesarios para que la señal de fluorescencia emitida por el amplicón y detectada por el termociclador alcance un umbral específico de detección. Esta medida permite establecer una relación entre la cantidad de templado y la señal de fluorescencia detectada por el equipo de PCR en tiempo real. Esta relación responde a un modelo de regresión lineal para obtener la ecuación de la recta que a su vez permite cuantificar el material genético a partir de los valores de C_t .

En este caso la curva obtenida resultó con una pendiente de -3,685 y una ordenada al origen de 38,885:

$$Y = -3,685 X + 38,885$$

Donde Y, es el valor de C_t de la muestra y X es la cantidad de templado.

A partir de la pendiente, pudo calcularse el valor de Eficiencia de amplificación (E)

$$E = 10^{\frac{1}{-3,685}} - 1 * 100 = 86,797$$

El valor R² fue de 0,992.

Los valores de E y R² obtenidos indican que la RT-qPCR implementada para cuantificar la carga viral amplifica el templado en cada ciclo con una eficiencia mayor al 86 % y que la curva construida en base a la relación Ct y cantidad de templado se ajusta muy bien a la curva ideal (el valor ideal es 1).

Los resultados de observan en la **Figura 22 y 23**.

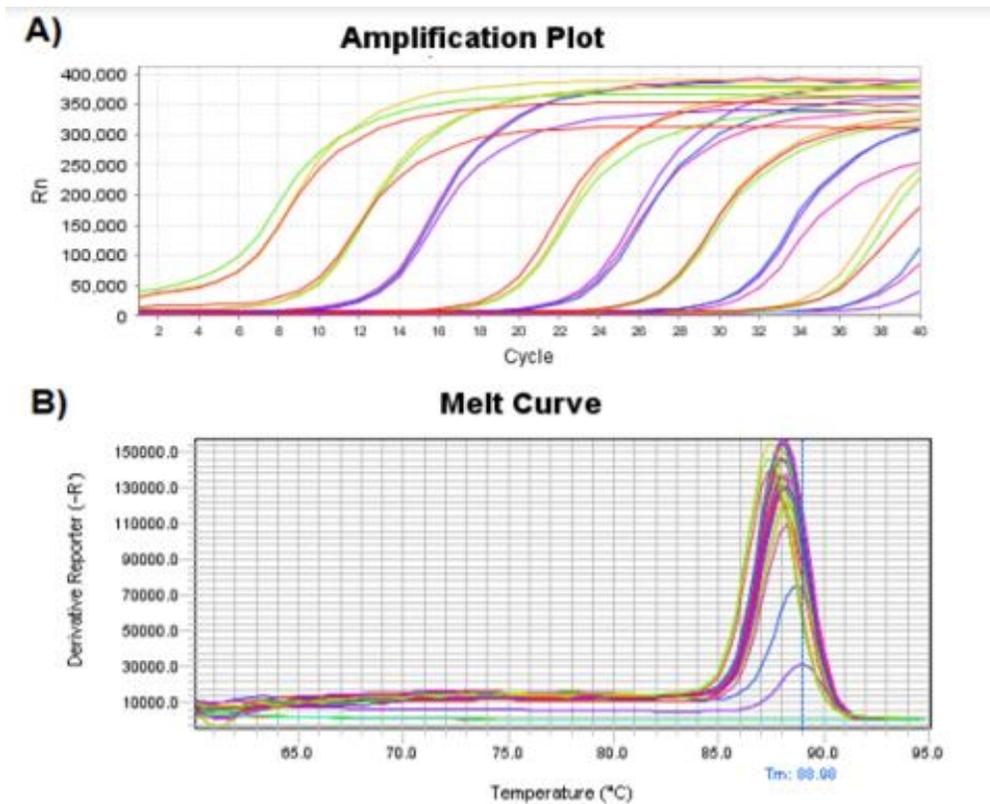


Figura 22. Resultados de la Curva estándar. A) Curva de amplificación: muestra la amplificación de las diluciones del clon de -1 a -9. **B)** Curva de melting: Podemos observar que todas las diluciones produjeron un pico único específico.

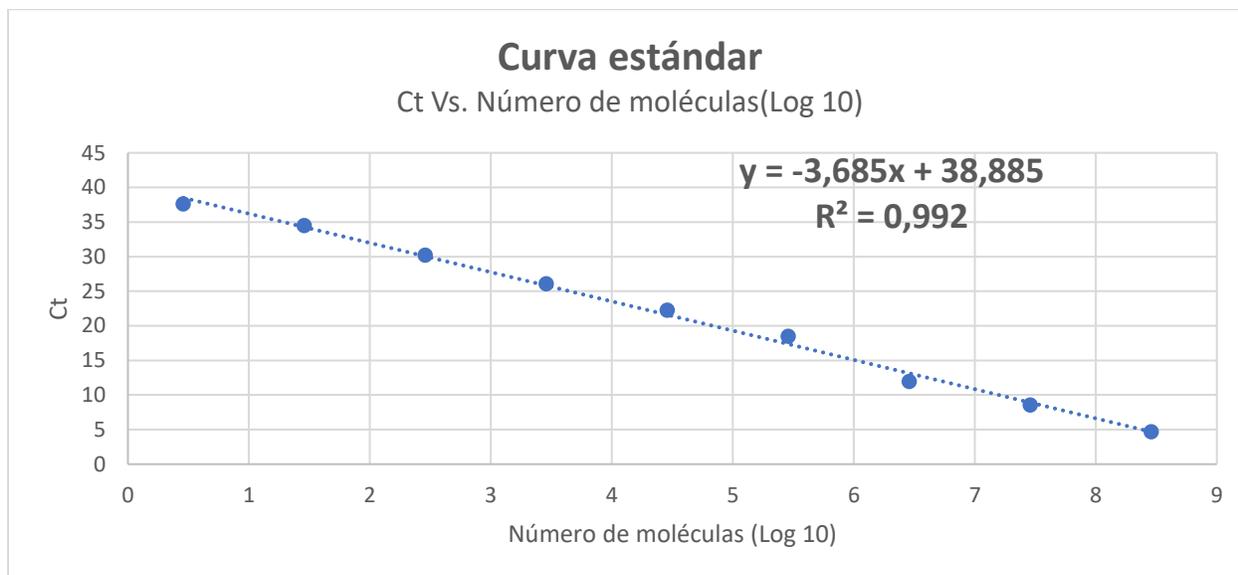


Figura 23. Curva estándar de referencia para la cuantificación de la carga viral de IBV. Se grafican los Ct obtenidos a las diferentes diluciones vs el número de copias de templado (\log_{10}). Línea Azul: Los puntos azules indican los valores de Ct (promedio de dos determinaciones) obtenido para cada dilución (de número de moléculas conocida) de plásmido con el inserto. Línea punteada: curva de regresión lineal. En el gráfico se observa la ecuación lineal y el valor R^2 .

5.3.3 Determinación de la carga viral de los pasajes K12 a K20

Dado que la realización de un mayor número de pasajes en hospedador natural no resultó en un aislamiento capaz de producir lesiones renales macroscópicas cuantificables o que aparecieran consistentemente en ambas unidades muestrales, se decidió seleccionar el aislamiento para el desarrollo del modelo de infección basándose en la carga viral en las muestras renales.

Con ayuda de la qPCR desarrollada en 5.3.2, se determinó la carga viral de cada uno de los pasajes en hospedador natural desde pasaje 12 hasta el 20. El pasaje que tuvo la mayor carga viral fue K16, por lo que se seleccionó para armar el modelo de infección. Los resultados se observan en la **Figura 24**.

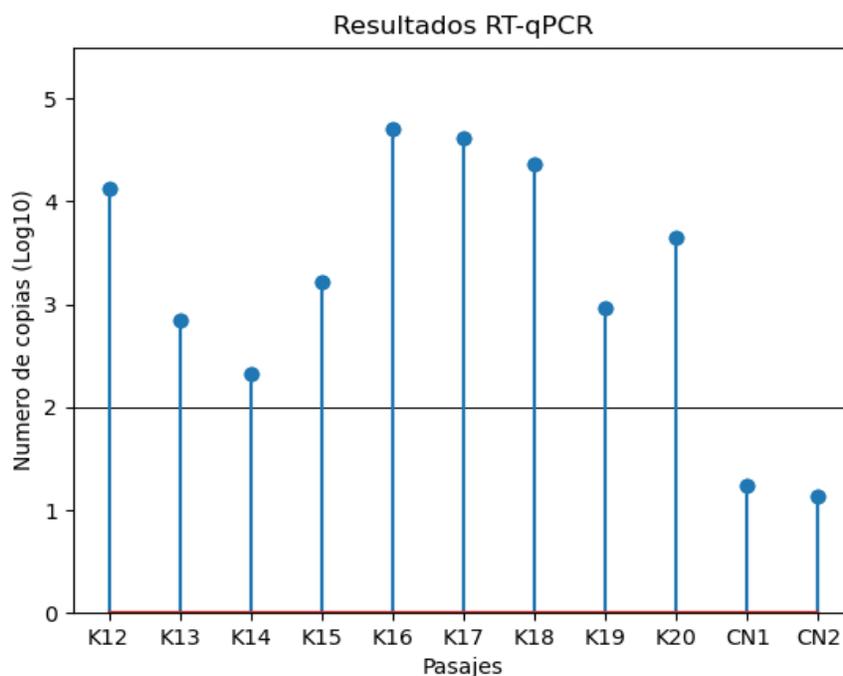


Figura 24. Resultados de la cuantificación de la carga viral de los pasajes por hospedador natural. La carga viral se encuentra expresada en el Log_{10} del número de copias para cada uno de los pasajes desde K12- K20 y controles negativos (CN1 y CN2). K16 presenta el mayor valor de carga. El punto de corte se establece en 10^2 , por encima las muestras son consideradas positivas al ensayo.

5.3.4 Ensayo de modelo de infección con el inóculo K16

Este estudio se llevó a cabo con el propósito de optimizar los parámetros del modelo de infección a emplearse en el ensayo de eficacia de vacunas. En primer lugar, el inóculo K16 fue titulado y se verificó que estuviera libre de otros patógenos aviares.

En el ensayo, se utilizaron un total de 28 pollos, de los cuales 20 fueron inoculados con K16 (con un título viral de 10^4 $\text{DIE}_{50}/\text{ml}$), mientras que los otros 8 animales permanecieron como controles negativos. La inoculación se realizó administrando 200 μl (100 μl vía intratraqueal, 50 μl en el orificio nasal y 50 μl en la conjuntiva ocular). Durante las primeras 72 horas del ensayo, los animales fueron monitoreados dos veces al día. Durante el periodo de observación se registraron epífora, estornudos, secreciones nasales y letargia en los animales del grupo infectado, fundamentalmente entre las 36 y 48 hpi.

RESULTADOS

Posteriormente, a los 5, 10, 15 y 20 dpi se procedió al sacrificio y necropsia de 5 animales del grupo infectado y 2 del control negativo.

Las lesiones más significativas se observaron en los animales inoculados a los 10 y 20 dpi. A los 10 dpi, en 2 de los 5 animales evaluados se registraron lesiones leves en el tracto respiratorio (traqueítis catarral y opacidad de los sacos aéreos) acompañadas de exudado seroso/catarral con aspecto espumoso (Figura 25 A y B).

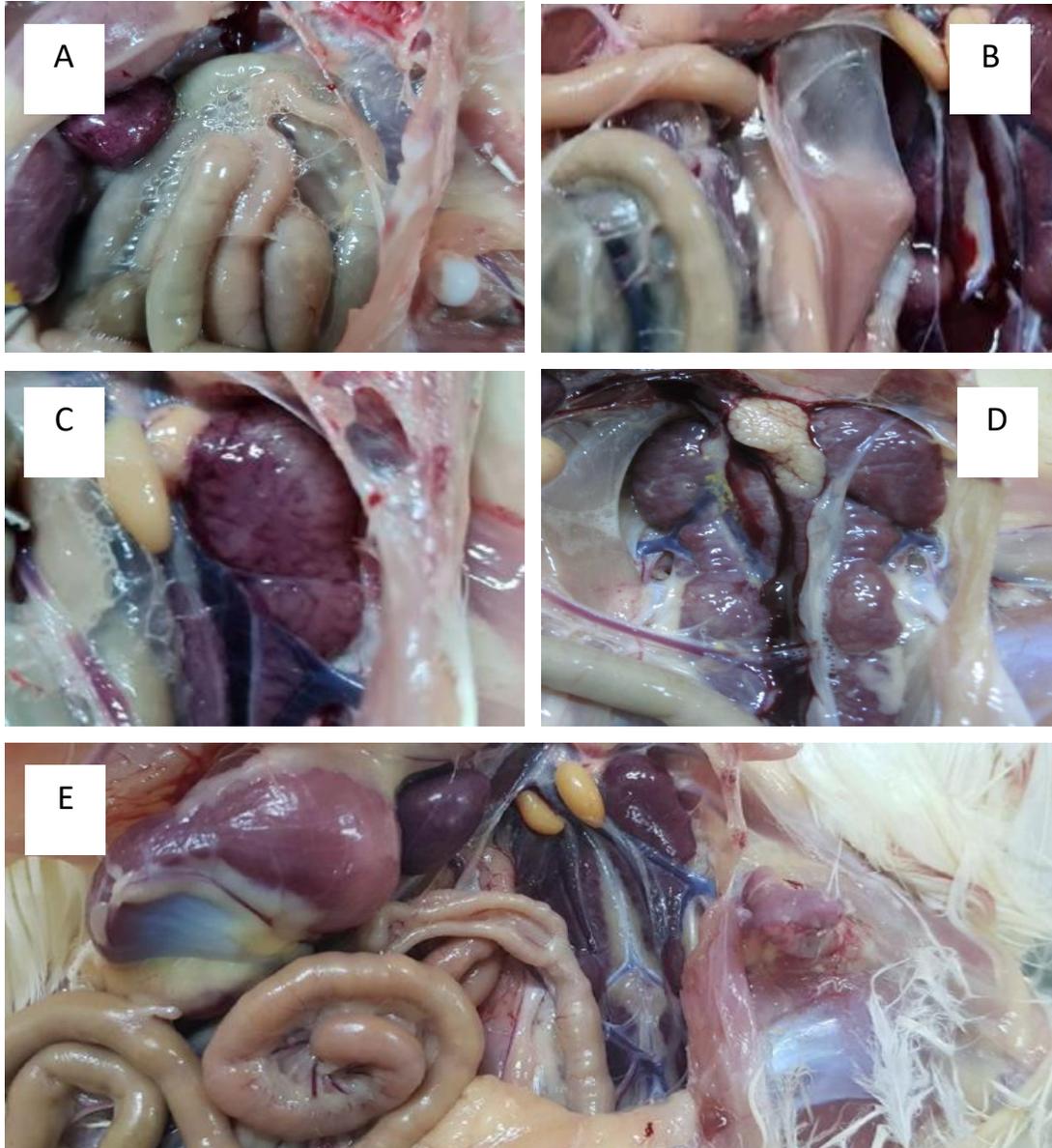


Figura 25. Lesiones de macroscópicas observadas durante la infección con K16. A) Se observan sacos abdominales engrosados con exudado seroso de aspecto espumoso transparente (10 dpi). **B)** Opacidad de los sacos aéreos abdominales (10dpi). **C)** Riñón congestivo con túbulos renales distendidos (20 dpi). **D)** Riñones aumentados de tamaño, pálidos y con surcos marcados (20dpi). **E)** Control Negativo (20dpi).

RESULTADOS

A los 20 dpi, en 2 de 5 animales se registraron lesiones renales (congestión, distensión de los túbulos renales y presencia de litiasis) (**Figura 25 C y D**). No se observaron lesiones en el grupo de control en ninguno de los tiempos evaluados.

En el análisis histopatológico, solo se encontraron lesiones microscópicas características en las tráqueas a los 5 dpi. Dentro del grupo inoculado, se observó pérdida de cilias e infiltrado inflamatorio (mononucleares) moderado en la lámina propia de la mucosa traqueal en 3 tráqueas de un total de 5 (**Figura 26**). Los resultados se presentan en la **Tabla 30**.

Tabla 30. Resumen de las lesiones microscópicas halladas en el análisis histopatológico.					
Grupo	Tejido	5 dpi	10 dpi	15 dpi	20 dpi
Control Negativo	Tráqueas	0/2	0/2	0/2	0/2
	Riñones	0/2	0/2	0/2	0/2
	Tonsilas cecales	0/2	0/2	0/2	0/2
K16	Tráqueas	Pérdida de las cilias en la mucosa respiratoria e infiltrado moderado linfomonohistiocitario en la lámina propia. (3/5)		0/5	0/5
	Riñones	0/5	0/5	0/5	0/5
	Tonsilas cecales	0/5	0/5	0/5	0/5

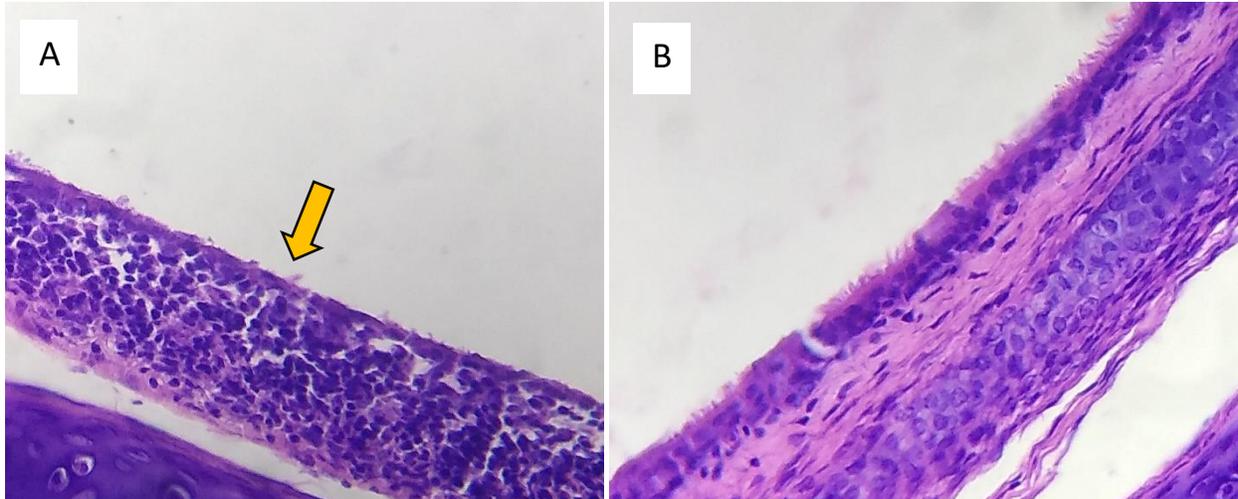


Figura 26. Análisis histopatológico – Modelo de infección con K16. A) Tráquea – Infectado con K16 (5 dpi) La mucosa presenta pérdida de las cilias e infiltrado moderado linfomonohistiocitario en la lámina propia, a 400X. **B)** Tráquea - Control negativo (5dpi). La mucosa presenta las cilias y ausencia de inflamación en la lámina propia, a 400X.

La evaluación de la presencia de IBV en tejidos se realizó mediante detección del genoma viral por RT-PCR. A los 5 dpi se observó que todos los animales (5 de 5) presentaron virus en tráquea, 3 de 5 presentaron virus en riñón y 2 de 5 en tonsilas cecales. A los 10, 15 y 20 dpi el número de tejidos positivos fue disminuyendo progresivamente, con una particularidad, los días 15 y 20 pi no se detectó el virus en tejido renal de ningún animal. La **Figura 27** muestra la dinámica de detección en los tejidos en función del tiempo.

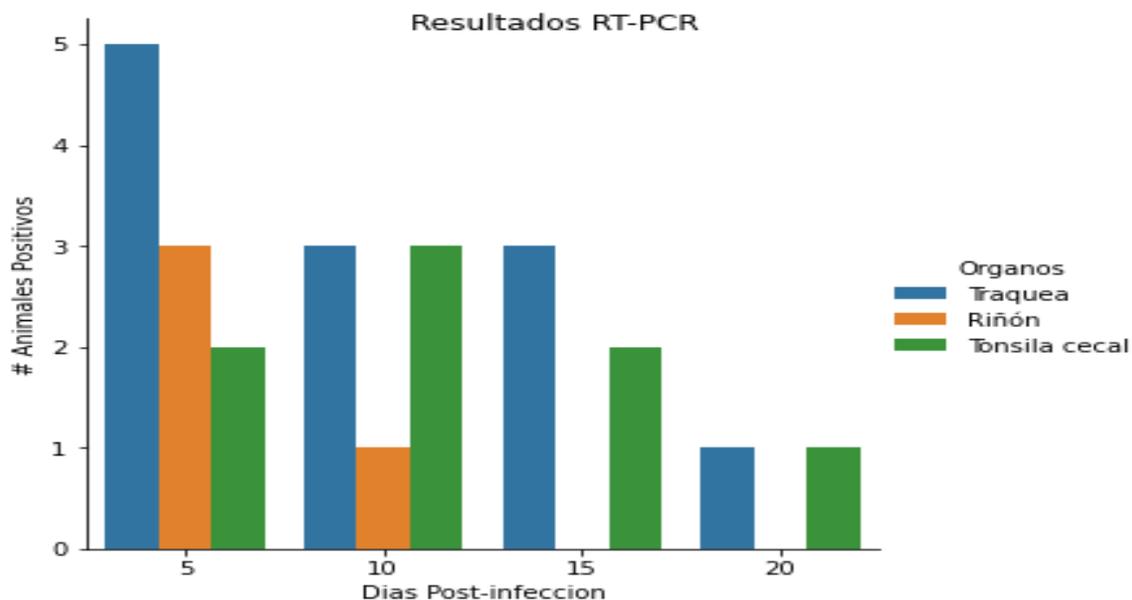


Figura 27. Resultados de la RT-PCR de animales infectados con el pasaje K16. Se observa que a los 5 dpi la totalidad de las muestras de tráquea (5/5), y 3/5 de muestras renales son positivas al ensayo. El número de muestras positivas se reduce en los tiempos 10, 15 y 20 pi. No se detectó presencia viral en tejido renal en los tiempos 15-20 pi.

Los anticuerpos se detectaron en todos los animales a partir del día 10 pi. En el día 5 todos los animales fueron negativos, del mismo modo que los controles negativos (**Figura 28**).

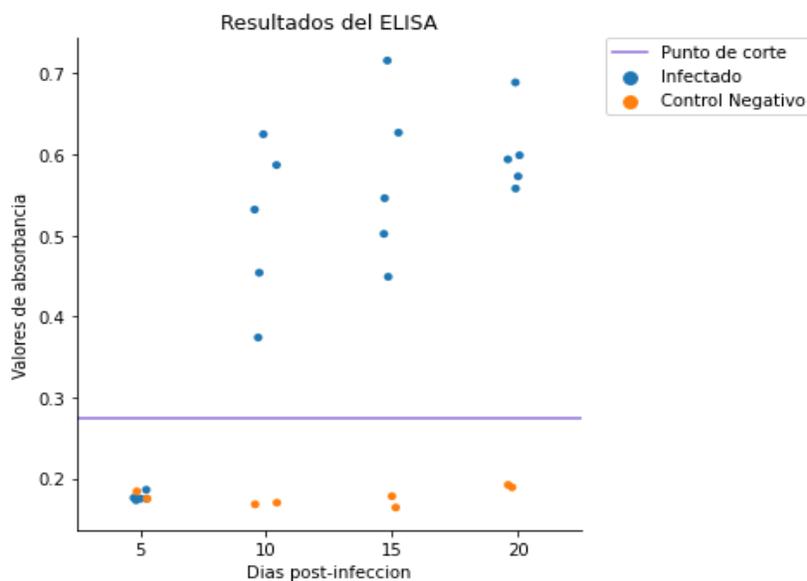


Figura 28. Resultados del ELISA de los animales infectados con el pasaje K16. Se observa que los animales infectados son positivos al ensayo en todos los tiempos, a excepción de a los 5dpi.

También se realizó la prueba de la ciliostasis. A los 5, 10, 15 y 20 dpi. se evaluó la actividad ciliar. El valor promedio de ciliostasis fue significativamente superior ($P < 0,05$) a los 5 dpi (puntaje de $3,6 \pm 0,24$) en comparación con los demás tiempos.

Estos resultados se observan en la **Figura 29** y los scores de ciliostasis y los resultados de Bonferroni se encuentran en las **Tablas 14 y 15 del anexo**.

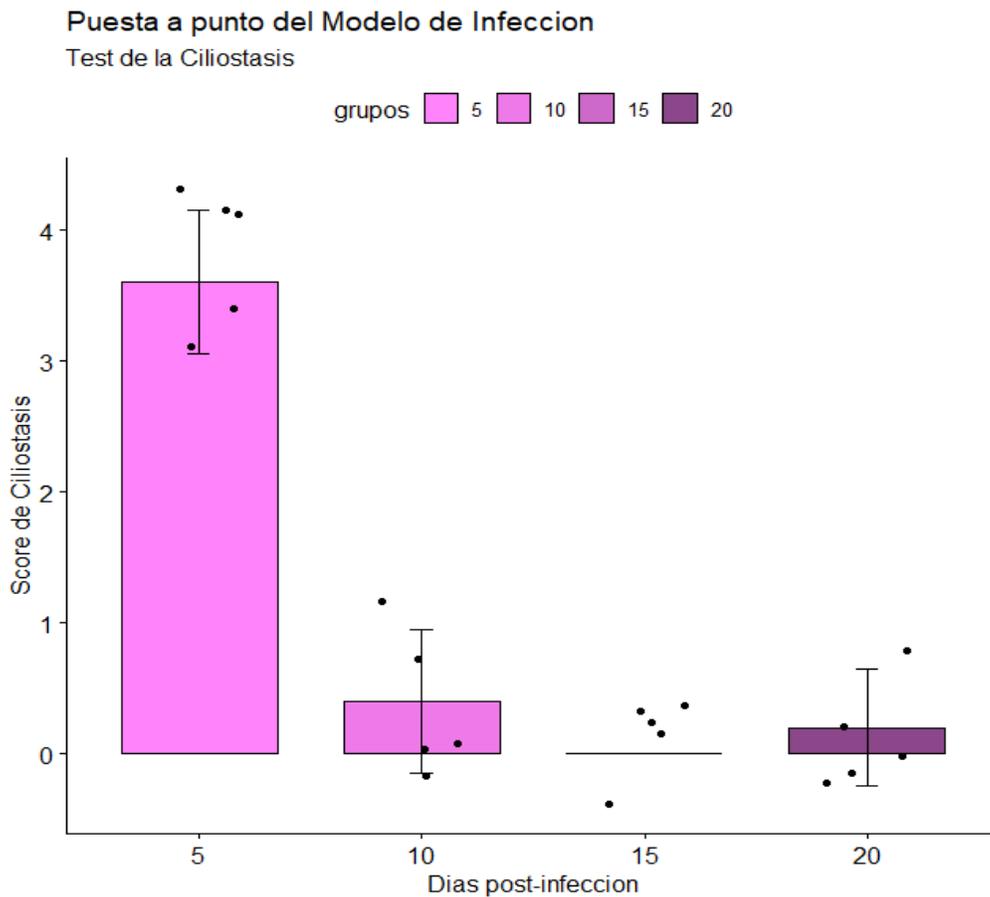


Figura 29. Resultados de la prueba de la ciliostasis. Se observa que el puntaje a los 5 dpi es significativamente mayor que a los 10, 15, y 20 dpi ($P > 0,05$ por el test de comparación múltiple de Bonferroni).

Este ensayo nos permitió establecer con mayor precisión los tiempos óptimos de toma de muestra y además requirió desarrollar y poner a punto una serie de técnicas para dimensionar la acción patógena del virus usado como desafío (ciliostasis, cuantificación de carga viral en diferentes tejidos y determinación de anticuerpos). Ello ha sido clave para poder implementar el modelo en la prueba de eficiencia de vacunas.

5.4. Obtención de una cepa atenuada de GI-16 para ser evaluada como vacuna atenuada

5.4.1 Atenuación

Como candidato vacunal se eligió la cepa A13 (que fue aislada de un caso de campo en el año 2013). Este aislamiento mostró en las primeras infecciones experimentales (dato no publicado) una baja virulencia natural que permitía conjeturar cierta aptitud de la misma como potencial vacuna atenuada. Con el propósito de trabajar la atenuación de la misma se realizaron pasajes en serie en EP SPF. A medida que avanzaron los pasajes la cepa A13 mostro mayor adaptación al embrión que se manifestó por las rapidez y severidad de la aparición de las lesiones características (enanismo, encorvamiento, alteraciones en las patas, membranas engrosadas y pegadas al embrión) (**Figura 30**). Las lesiones se volvieron cada vez más aparentes, incrementando la mortalidad en menor tiempo, razón por la cual, a partir del pasaje 16, las muestras comenzaron a colectarse a los 3 dpi (anteriormente fueron colectadas a los 7 dpi), lo cual redundó en un incremento significativo del título viral cosechado.

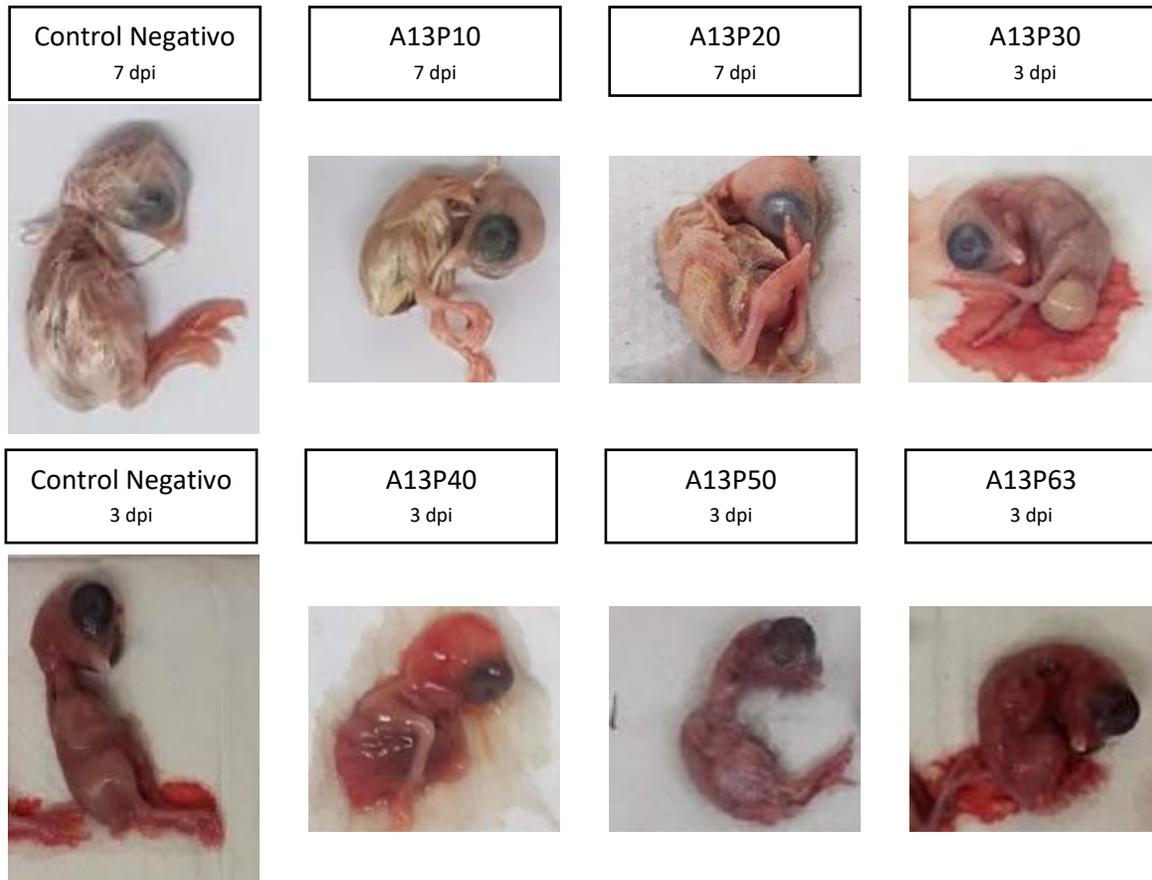


Figura 30. Pasajes seriados en EP de la cepa A13. Se observa las lesiones presentes en los embriones cada 10 pasajes. A partir del pasaje 30, las lesiones se observan inclusive en embriones de 3 dpi.

5.4.2 Titulación

En primera instancia se seleccionaron (en forma arbitraria) dos pasajes de A13 para ser evaluados como candidatos vacunales, los aislamientos A13P50 y A13P63. Los mismos fueron titulados para los ensayos posteriores, presentando títulos de $10^{9,624}$ DIE₅₀/ml (A13p50) y $10^{7,375}$ DIE₅₀/ml (el A13p63). En ambos casos no se detectó la presencia de genoma de otros patógenos aviares (ARV, IBDV, FadV, ILTV, y CAV).

5.4.3 Ensayo de inocuidad

Se evaluó la inocuidad de los aislamientos A13p63 y A13p50. En ambos casos, se infectaron 20 pollos SPF de 1 día de vida con cada inóculo. Las muestras fueron tomadas a los 7, 14, 21, y 28 dpi, y se analizaron los signos clínicos, lesiones, presencia viral por RT-PCR y generación de anticuerpos por ELISA.

RESULTADOS

En ningún caso se observaron manifestaciones clínicas ni lesiones en los pollitos. A excepción de dos muestras de tráquea durante la primera semana, el resto de las determinaciones de RT-PCR de A13p63 fueron negativas. (**Figura 31.A**). Se detectó la presencia de anticuerpos anti-IBV a partir de la primera semana. En las muestras positivas se observó un incremento de los valores de absorbancia en función del tiempo. Sin embargo, en ningún tiempo el 100% de los animales fueron positivos (**Figura 31.B**).

Un escenario distinto se observó en el análisis de las muestras de A13p50. Los resultados de RT-PCR demostraron un 100% de muestras positivas en el grupo inoculado desde los 7 dpi. Además, se observó persistencia en los tres tipos de muestras tomadas (tráquea, riñón y tonsila cecal) hasta los 14 dpi. Inclusive se detectó virus en tonsilas cecales a los 28 dpi (**Figura 32.A**). Los resultados del ELISA demostraron una consistente presencia de anticuerpos anti-IBV desde la primera semana, siendo todos los animales positivos a partir de la tercera semana, tiempo que se determinó como el óptimo para llevar a cabo un desafío (**Figura 32.B**).

Si bien este ensayo tenía como objetivo determinar la presencia de virulencia residual en el pasaje, que pudiera generar enfermedad en los animales “vacunados”, los resultados obtenidos fueron la clave para usar al pasaje 50 de A13 como el candidato vacunal.

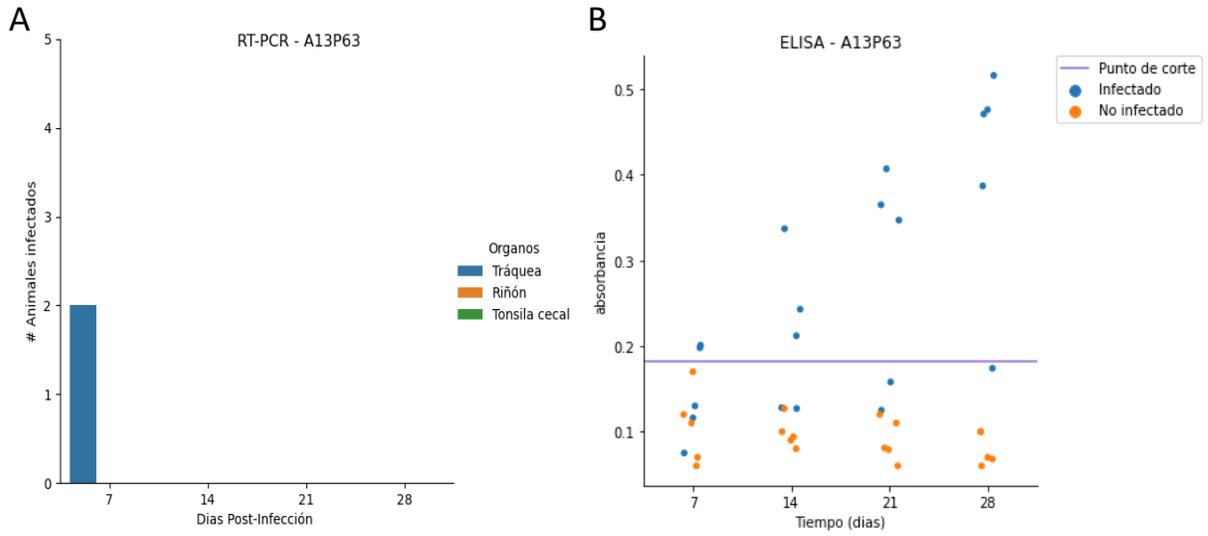


Figura 31. Resultados de la prueba de seguridad con A13p63. A) RT-PCR: Se observa que solo dos animales son positivos en tráquea, durante la primera semana. **B) ELISA:** Se observa animales positivos a partir de la primera semana, la absorbancia crece a medida que transcurre el tiempo, pero nunca se obtiene el 100% de muestras positivas.

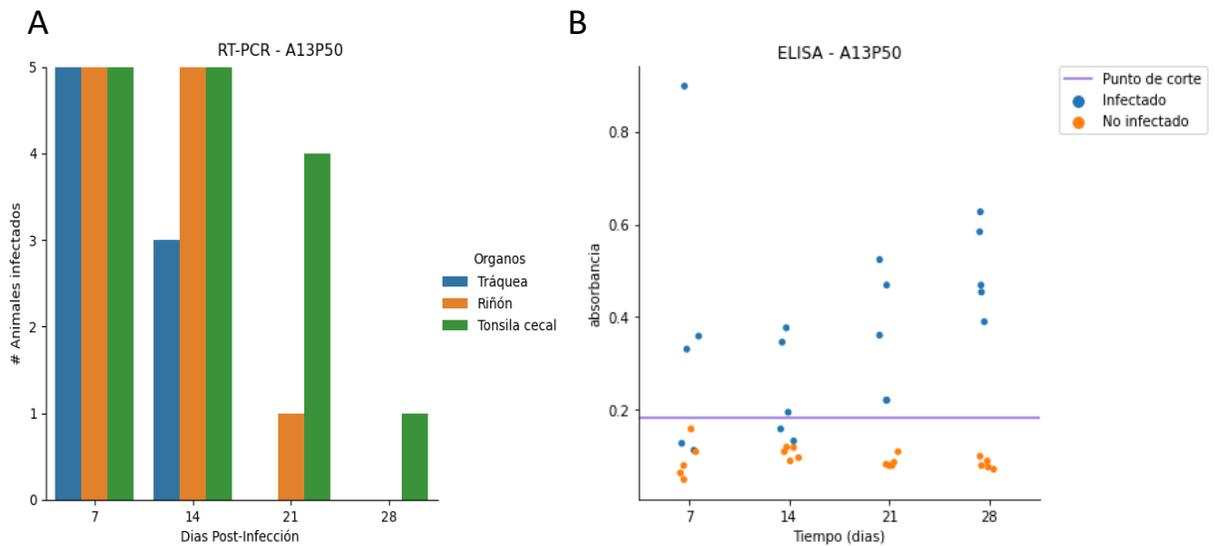


Figura 32. Resultados de la prueba de seguridad con A13P50. A) RT-PCR: Se observa los resultados de animales positivos en todos los tiempos del ensayo. **B) ELISA:** Se observa animales positivos a partir de la primera semana, en la tercera y cuarta semana todos los animales son positivos a la técnica.

5.4.4 Ensayo de inmunogenicidad

En este ensayo se infectaron 5 pollos SPF de 1 día de vida, con A13p50 a una dosis de 10^5 DIE_{50}/ml . Se tomaron muestras de hisopado de tráquea y de sangre, en los tiempos 7, 14, 21, y 28 dpi para análisis con ELISA, y RT-PCR. Adicionalmente, a los 28 dpi se obtuvo muestras de riñones y tonsilas cecales.

Los resultados de la RT-PCR mostraron presencia del virus en hisopados traqueales hasta los 21 dpi (**Figura 33.A**). Todas las muestras tomadas (hisopado traqueal, riñón o tonsila cecal) fueron negativas a los 28 dpi. Los resultados del ELISA indicaron presencia de anticuerpos anti-IBV desde la primera semana, a partir de la tercera semana la totalidad de los infectados fueron positivos al test (**Figura 33.B**). Durante todo el ensayo los controles negativos fueron negativos a ambas técnicas.

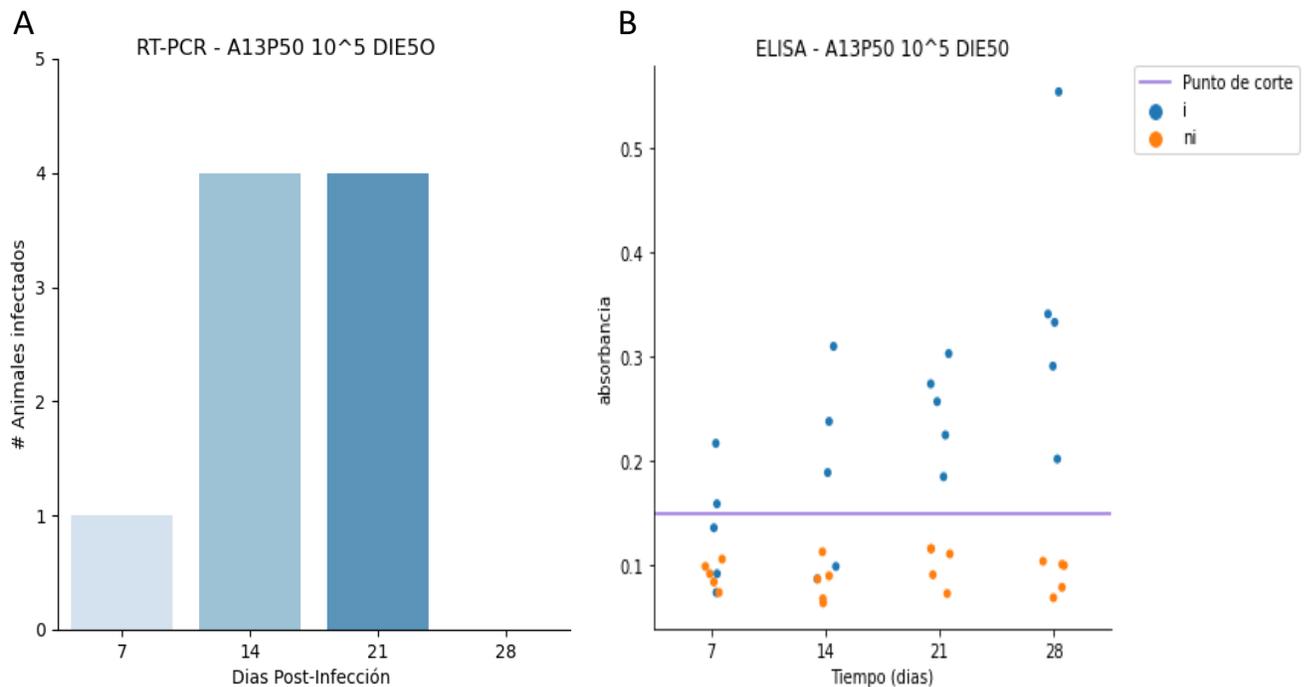


Figura 33. Resultados de la prueba de inmunogenicidad con A13P50 a dosis de 10^5 DIE_{50}/ml . **A)** RT-PCR: Se observa los resultados del hisopado traqueal de los animales en todos los tiempos del ensayo. **B)** ELISA: Se observa animales positivos a partir de la primera semana, en la tercera y cuarta semana todos los animales son positivos a la técnica.

5.4.5 Detección de anticuerpos en lavajes traqueobronquiales

Para obtener información adicional sobre la presencia de anticuerpos en las mucosas, se llevó a cabo la infección de 20 pollos SPF de 2 semanas de vida con A13p50 a una dosis de 10^5 DIE₅₀/ml. Se tomaron muestras de sangre y lavajes traqueobronquiales para ELISA, a los tiempos 7, 14, 21, y 28 dpi.

Los resultados del ELISA fueron similares en ambos tipos de muestras. A partir de los 14 dpi, la totalidad de los animales infectados fueron positivos a la presencia de anticuerpos (**Figura 34**). Sin embargo, las muestras de lavajes traqueobronquiales mostraron menores niveles de absorbancia (**Figura 34.B**).

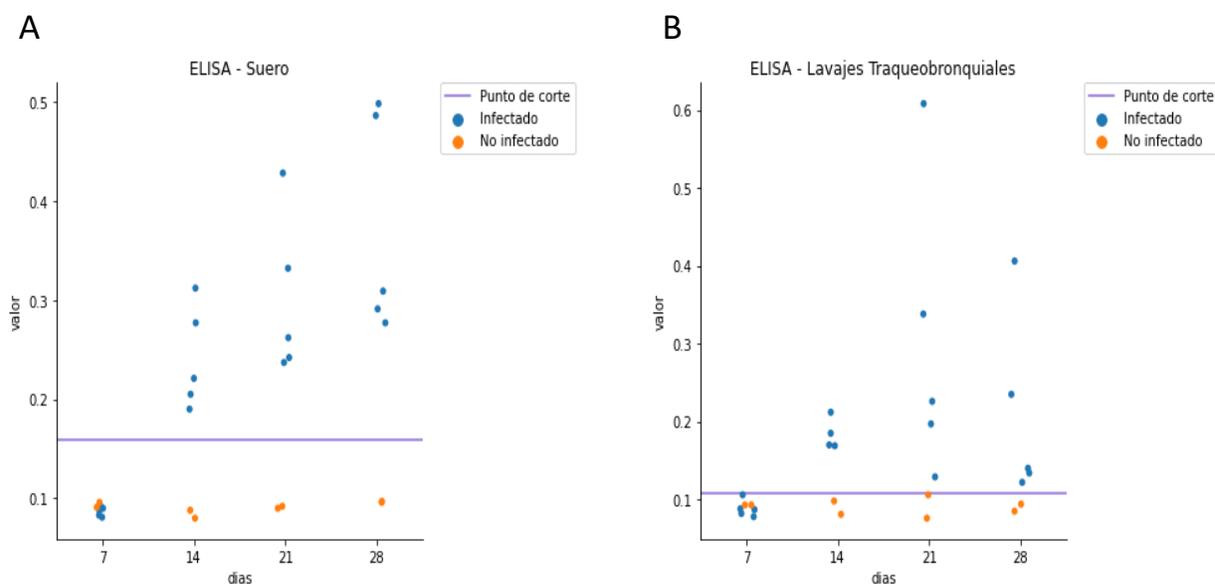


Figura 34. Resultados de las pruebas de ELISA para detección de anticuerpos anti-IBV sérico y los lavajes traqueobronquiales: A) ELISA en muestras de sangre: Se observa presencia de anticuerpos a partir de la segunda semana. B) ELISA en muestras de lavajes traqueobronquiales: Se observa presencia de anticuerpos a partir de la segunda semana, pero con menores valores de absorbancia.

5.4.6 Test de reversión de la virulencia

Se llevaron a cabo 4 pasajes por contacto natural entre pollos SPF de entre 2-3 semanas de vida. Para ello, 2 animales SPF fueron puestos en contacto con 2 animales infectados por 48 horas. El experimento se diseñó para que el momento de contacto coincida con un periodo de alta eliminación viral (48 hpi). Durante el ensayo no se observó ningún signo clínico. A través de RT-PCR se detectó presencia de genoma de IBV en las muestras de tráquea de todos los

animales muestreados. La secuencia S1 de los pasajes 3 y 4 fueron idénticas a la de A13p50, demostrando que se requiere más pasajes en hospedador natural para lograr un cambio.

5.4.7 Prueba de ciliostasis entre vacunas

Con el objetivo de comparar la capacidad producir ciliostasis de A13p50 con otras cepas vacunales, se realizó un estudio utilizando 20 pollos SPF. Los animales se dividieron en 4 grupos de 5 individuos, y se les administró 100 µl de una dosis de 10^5 DIE₅₀/ml de cada una de las vacunas (A13, CR88, Ma5). Como control negativo se usaron animales que recibieron PBS. Cabe destacar que en ningún momento del ensayo se observaron signos clínicos en los animales inoculados.

Los resultados obtenidos mediante la prueba estadística de ANOVA demostraron diferencias significativas entre los grupos (p valor $< 0,05$; $p = 0,000154$). El análisis de comparación múltiple de Bonferroni reveló que los animales vacunados con CR88 presentaron un score de ciliostasis significativamente superior ($1,9 \pm 1,4$) en comparación con los que recibieron A13 ($0,3 \pm 0,67$, $p = 0,00102$) y los controles negativos ($0,2 \pm 0,42$, $p = 0,00047$). Los scores de ciliostasis obtenidos por la vacuna Ma5 fueron comparables a los de la vacuna CR88 ($1,2 \pm 0,63$, $p = 0,44888$). De este modo, el daño al movimiento ciliar generado por la vacuna A13 resultó estadísticamente menor que el generado por las vacunas CR88 y Ma5 (**Figura 35**).

Los puntajes de ciliostasis y de significancia del análisis estadístico (test de comparación múltiple de Bonferroni) se observan en las **Tablas del anexo 16 y 17**.

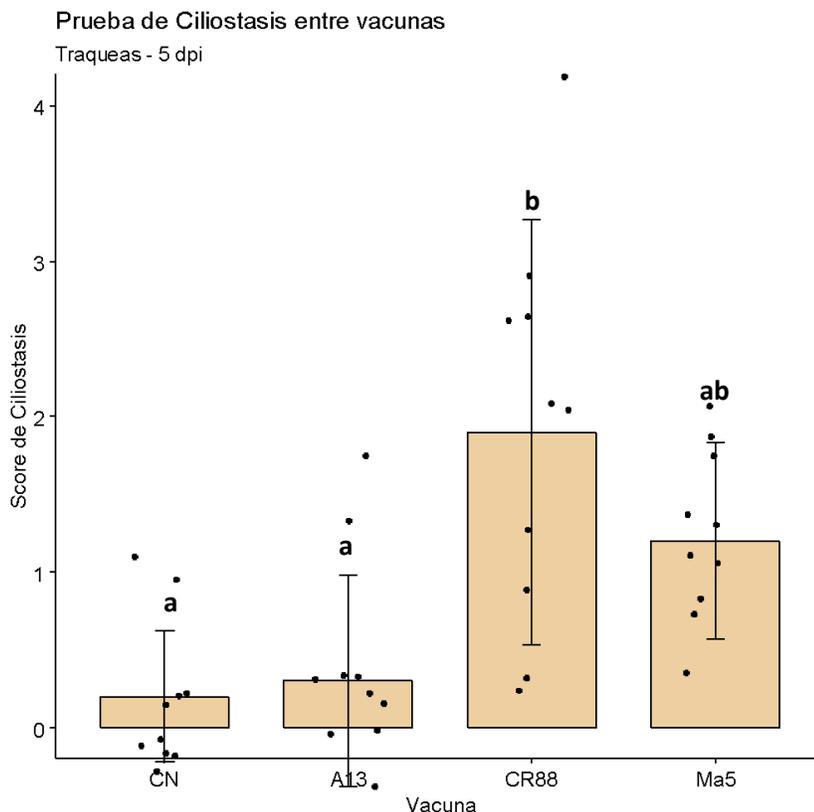


Figura 35. Resultados la prueba de ciliostasis 5 dpi en la prueba de comparación entre vacunas.
Las letras encima de cada barra indican si las diferencias fueron estadísticamente significativas, la misma letra indica un valor $p > 0,05$ entre estos grupos bajo el test de comparación múltiple de Bonferroni.
*CN = grupo control negativo

5.4.8 Prueba de eficiencia de las vacunas ante el desafío

En los ensayos previos se demostró que A13p50 es inocua y puede inducir una buena respuesta inmunogénica inoculada a pollitos de un día de edad, sin evidencia de reversión de la virulencia, lo que sugiere su potencial como vacuna. Con el propósito de complementar el estudio de A13 como candidato vacunal se llevó a cabo un estudio de eficiencia de vacunas. Para ello se vacunaron animales con diferentes cepas de vacunas y se comparó la capacidad de cada cepa para controlar la replicación del virus de desafío.

Además de A13, las vacunas usadas en el ensayo fueron representativas de los serotipos actualmente autorizados en el país: Ma5 para el serotipo Massachusetts y CR88 para el serotipo 793B.

En este ensayo se usaron 80 pollitos SPF divididos al azar en 4 grupos de 20, tres de los grupos fueron vacunados al tercer día de vida y el restante quedó como grupo control. Los grupos

RESULTADOS

vacunados recibieron mismo volumen (100 μ l) y mismo título (10^5 DIE₅₀/ml) de las vacunas A13 (A13p5), Ma5 (Ma5p3) y CR88 (CR88p3). Mientras que el grupo control recibió 100 μ l del medio que se usó para diluir las vacunas (PBS). Los animales fueron observados dos veces al día, luego de la inmunización sin observarse manifestación de signos clínicos en ningún grupo.

A los 21 días de la vacunación, la mitad de los animales de cada grupo (10 animales) fue desafiada con K16 (según se estableció en el modelo de infección). De ese modo se establecieron tres grupos vacunados y desafiados, tres grupos vacunados (control de la vacuna), un grupo control positivo (no vacunado y desafiado) y un grupo control negativo (no vacunado no desafiado). Luego del desafío todos los grupos fueron observados dos veces al día durante 72 horas. Se observaron signos respiratorios leves (estornudos, secreción nasal y conjuntivitis) en los animales del control positivo (no vacunado y desafiado) y en los animales desafiados y vacunados con CR88 y Ma5. Estos signos, indicativos de inflamación del aparato respiratorio superior, son característicos de la infección con IBV. En el resto de los grupos no se observaron particularidades.

A los 5 y 7 dpi se realizaron las necropsias y toma de muestras para evaluación de ciliostasis (solo al día 5 pi), carga viral en tejidos (5 y 7 dpi) y detección de anticuerpos por ELISA (5 y 7 dpi).

En la evaluación de la ciliostasis se observó que el grupo vacunado con A13 presentó el puntaje más bajo entre los grupos desafiados ($0,7 \pm 0,67$). Este valor fue significativamente menor que el puntaje de ciliostasis del grupo control positivo, que fue de $3,5 \pm 0,51$ ($p = 8,5 \times 10^{-16}$); y también fue menor que los puntajes de ciliostasis de los grupos desafiados y vacunados con CR88 ($3,0 \pm 1,24$, $p = 2,8 \times 10^{-9}$) y Ma5 ($1,8 \pm 1,23$, $p = 0,0203$). Por el contrario, el grupo desafiado y vacunado con CR88 presentó el mayor valor de ciliostasis ($3,0 \pm 1,24$). Este valor fue significativamente superior al score del grupo control negativo ($0,16 \pm 0,38$, $p = 2,8 \times 10^{-15}$), y a los de los grupos desafiados y vacunados con Ma5 ($1,8 \pm 1,23$, $p = 0,007$), y A13 como se mencionó con anterioridad. Los valores fueron comparables al control positivo ($3,55 \pm 0,51$, $p = 1$). El score de ciliostasis del grupo desafiado y vacunado con Ma5 ($1,8 \pm 1,23$), además de ser estadísticamente menor al grupo desafiado y vacunado con CR88, también lo fue respecto al control positivo ($3,55 \pm 0,51$, $p = 1,7 \times 10^{-7}$). Sin embargo, este valor fue significativamente mayor al del grupo control negativo ($0,16 \pm 0,38$, $p = 1,8 \times 10^{-6}$) y como se mencionó más arriba, al del grupo desafiado y vacunado con A13 ($0,7 \pm 0,67$, $p = 0,02$). Los scores de los grupos no desafiados no presentaron diferencias significativas con los del control negativo ($p > 0,05$). Para

la evaluación estadística de la ciliostasis se empleó el ANOVA *one way* que mostro falta de homogeneidad y luego para las comparaciones entre grupos se usó el test de comparación múltiple de Bonferroni. Los resultados de la ciliostasis se observan en la **Figura 36** y en las **Tablas 18 y 19 del material anexo**.

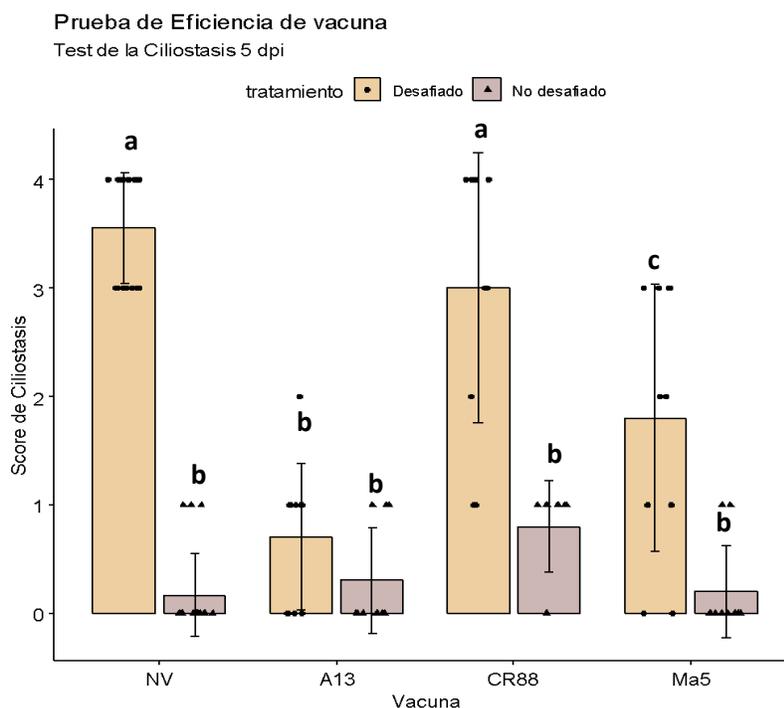


Figura 36. Resultados la prueba de ciliostasis 5 dpi en la prueba de eficiencia de vacunas. Las letras encima de cada barra indican si las diferencias fueron estadísticamente significativas, la misma letra indica un valor $p > 0,05$ entre estos grupos. *NV = grupo no vacunado

Los resultados de este ensayo sugieren que la vacuna A13 es más eficiente en la protección, en este caso entendida como la capacidad de conservar la motilidad ciliar en el epitelio traqueal frente al desafío, que las vacunas CR88 o Ma5. Además, la vacuna Ma5 parece inducir un nivel de protección parcial diferenciable del control positivo.

La carga viral se estimó en tráquea y riñones a los 5 y 7 dpi empleando la prueba de RT-qPCR. El límite de detección de genoma viral (sensibilidad analítica de la técnica) se estableció en 10^2 copias por reacción (2 log₁₀ copias) Los resultados de la cuantificación viral mostraron diferencias significativas tanto en las muestras de tráquea ($p = 4,8 \times 10^{-16}$) como en las de riñones ($p = 2,39 \times 10^{-15}$). Los animales del control negativo y los de los grupos vacunados y no

desafiados fueron considerados negativos ya que en ningún caso alcanzaron el valor impuesto como límite de detección de la prueba.

Entre los animales que fueron vacunados y desafiados, los vacunados con A13 presentaron los menores valores de carga viral en tráquea ($1,25 \log_{10}$ copias $\pm 0,40$) y en riñón ($1,15 \log_{10}$ copias $\pm 0,23$). Estos valores son significativamente menores que los del grupo control positivo ($4,13 \log_{10}$ copias $\pm 0,46$ en tráquea y $3,76 \log_{10}$ copias $\pm 0,63$ en riñón), los del grupo vacunado con Ma5 y desafiado ($3,82 \log_{10}$ copias $\pm 0,47$ en tráquea y $3,81 \log_{10}$ copias $\pm 0,56$ en riñón) y los del grupo vacunado con CR88 y desafiado ($3,32 \log_{10}$ copias $\pm 0,25$ en tráquea y $2,76 \log_{10}$ copias $\pm 0,39$ en riñón). Las comparaciones entre tratamientos (para establecer significancia de las diferencias) se realizaron usando el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Los valores de la cuantificación viral en tráquea del grupo A13 desafiado fue significativamente menor que el control positivo ($p = 7,5 \times 10^{-16}$), Ma5 desafiado ($p = 3,5 \times 10^{-12}$) y CR88 desafiado ($p = 1,8 \times 10^{-9}$). Del mismo modo, la carga viral medida en tejido renal en los animales vacunados con A13 desafiados fue menor que la determinada en control positivo ($p = 4,5 \times 10^{-13}$), Ma5 desafiado ($p = 1,1 \times 10^{-11}$) y CR88 desafiado ($p = 3,3 \times 10^{-6}$). El grupo vacunado con Ma5 y desafiado fue el que presentó mayores valores de carga viral en tráquea ($3,82 \log_{10}$ copias $\pm 0,47$), y en riñón ($3,81 \log_{10}$ copias $\pm 0,56$). Los valores de carga viral no fueron significativamente diferenciables de los valores de los animales vacunados con CR88 y desafiados para las muestras de tráquea ($p = 1$), pero si para las muestras de riñón ($p = 4,2 \times 10^{-3}$). En el caso de los animales vacunados con CR88 y desafiados, la carga viral fue $3,32 \log_{10}$ copias $\pm 0,25$ en tráquea y $2,76 \log_{10}$ copias $\pm 0,39$ en riñón. Estos valores fueron estadísticamente menores a los del control positivo ($p = 7,7 \times 10^{-3}$ para las muestras de tráquea y $p = 1,5 \times 10^{-3}$ para las muestras de riñón), pero a su vez, significativamente superior a la carga viral de los controles negativos ($p = 5,1 \times 10^{-13}$ para las muestras de tráquea y $p = 7,1 \times 10^{-8}$ para las muestras de riñón) y a la del grupo vacunado con A13 y desafiado, como se especificó anteriormente. A pesar de que los animales del control negativo, los vacunados y no desafiados y los vacunados con A13 desafiados fueron negativos, los valores (que estuvieron por debajo del límite de detección de la prueba) fueron estimados y empleados para incluirlos en el análisis estadístico mediante *ANOVA one way* y la prueba de Bonferroni.

Por lo antes expuesto, este ensayo sugiere que el candidato vacunal A13 genera mejor "protección" a que las vacunas comerciales ante un desafío con un virus del linaje GI-16. En este caso, el término "protección" se refiere a que la vacuna logro reducir la replicación viral, lo que se manifiesto en una disminución de la cantidad de material genético viral cuantificado. Los

animales desafiados y vacunados con las vacunas CR88 y Ma5, no presentaron diferencias estadísticas entre sus valores de carga viral en tráquea, pero si lo hicieron en riñón, donde los vacunados con CR88 obtuvieron valores de carga viral significativamente menores al control positivo y a los vacunados con Ma5. Sin embargo, ambos grupos (los vacunados con CR88 y Ma5) fueron positivos a la técnica, por lo que se puede inferir que producen protección insuficiente. Entre las distintas alternativas de vacunación, la vacuna Ma5 fue la que generó menor protección. A diferencia de la vacuna CR88, los valores de carga viral del grupo vacunado con Ma5 y desafiado, no mostraron diferencia estadística con el grupo control positivo ($p = 1$ en tejido traqueal y renal). Todos estos resultados se encuentran ilustrados en la **Figura 37**. Los valores de carga viral y de significancia del análisis estadístico (test de comparaciones múltiples de Bonferroni) se encuentran en las **Tablas del anexo 20-22**.

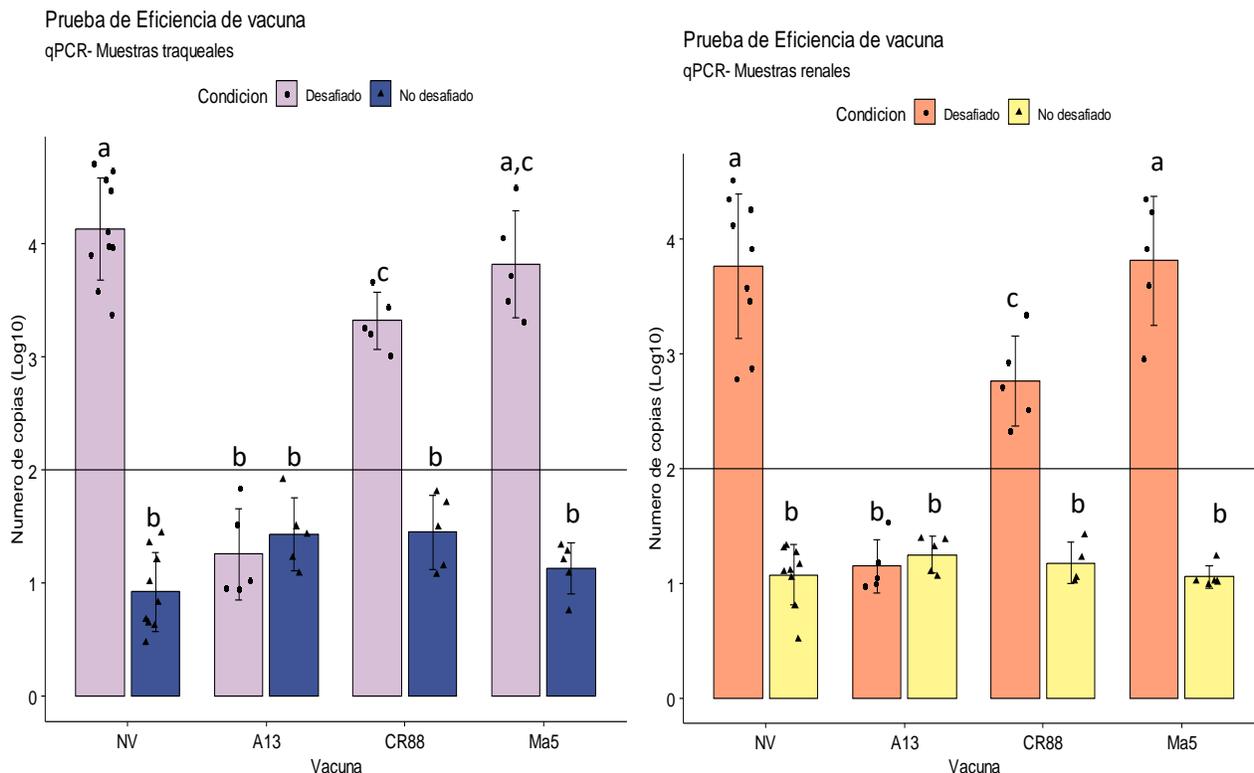


Figura 37. Resultados del análisis por RT-qPCR en la prueba de eficiencia de vacunas. La carga viral esta expresada en Log_{10} del número de copias. Las letras encima de cada barra indican si las diferencias fueron estadísticamente significativas, la misma letra indica un valor $p > 0,05$ entre estos grupos bajo el test de comparación múltiple de Bonferroni. Las líneas horizontales indican el punto de corte establecido. A) Muestras de tráquea tomadas a los 5 dpi. B) Muestras de riñón tomadas a los 7 dpi. *NV = Grupo no vacunado

Por otro lado, los resultados del ELISA demostraron la presencia de anticuerpos anti-IBV en todos los grupos vacunados a los 5 y 7 dpi. La detección de anticuerpos en los animales vacunados y no desafiados fue de fundamental importancia porque demuestra la correcta inmunización. A los 5 dpi, los animales del control positivo (desafiados y no vacunados) fueron negativos a la prueba, observándose anticuerpos recién a los 7 dpi, esto indica una fuerte respuesta inmunológica temprana luego del desafío. En general, se observó mayor absorbancia en los resultados de los animales vacunados y desafiados, lo cual es esperable debido a la exposición previa (vacunación) al virus. Los controles negativos se mantuvieron siempre negativos (**Figura 38**).

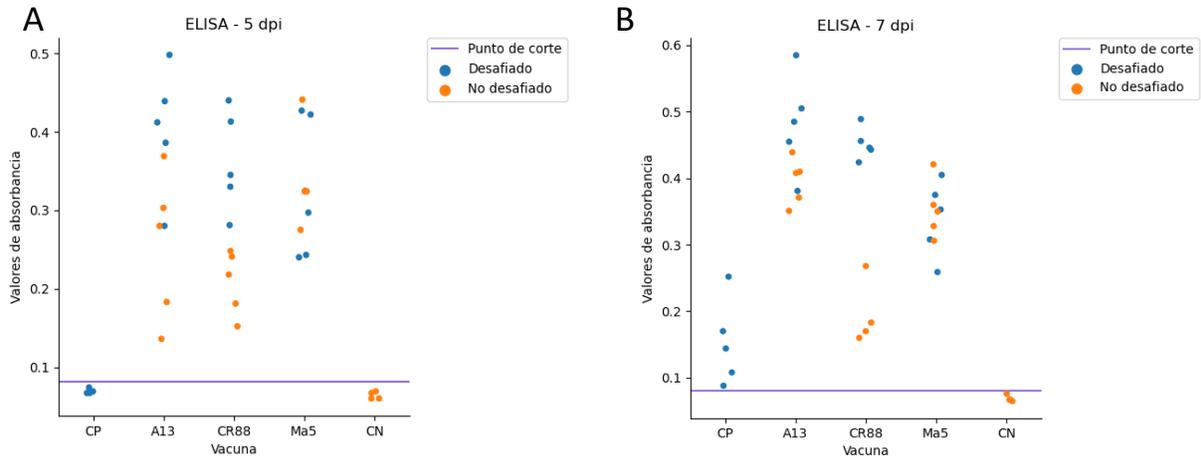


Figura 38. Resultados del test de ELISA de la prueba de eficiencia de vacunas. A) Muestra los resultados a los 5 dpi. B) Muestra los resultados a los 7 dpi. CP = Controles positivos. CN = Controles negativos

6. Discusión

BI es probablemente la enfermedad viral avícola de mayor prevalencia en los planteles argentinos. Una razón de ello es la elevada variabilidad de su genoma que a su vez es la principal causa de la continua emergencia de variantes que escapan a las estrategias de prevención (Hanada et al., 2004; Jordan, 2017). Estudios previos han determinado que en Argentina existen dos variantes de IBV que pertenecen a linajes distintos de los incluidos en las vacunas licenciadas en el país (Marandino et al., 2015; Rimondi et al., 2009). En la actualidad, la caracterización de IBV se realiza mediante el análisis de secuencia de la región del genoma que codifica a S1 debido a que esta región contiene amplia información filogenética (Valastro et al., 2016). S1 expresa la mayoría de los determinantes de inmunogenicidad por lo que juega un rol importante como blanco de anticuerpos neutralizantes (Cavanagh et al., 1988; Jackwood & de Wit, 2020; Jia et al., 1996; Niesters et al., 1987). Variaciones en su secuencia no solo están relacionados a cambios antigénicos sino también a diferencias en virulencia y tropismo (Belouzard et al., 2012; Binns et al., 1986; Cavanagh et al., 1992; Li et al., 2005).

El análisis de secuencia de S1 indica que las variantes argentinas de campo difieren en más del 10% con las secuencias de las vacunas autorizadas en el país (serotipos Massachusetts y 793/B). Una diferencia de tal magnitud suele relacionarse a falta de identidad antigénica (Jackwood & de Wit, 2020). Siendo así, los brotes locales de BI podrían ser consecuencia del escape del virus de desafío a la protección conferida por las vacunas. Sin embargo, esa asociación entre distancia genética y diferencia antigénica no es tan lineal y requiere de una prueba empírica que la valide. Ello ayudaría a establecer si la aparición de los brotes de BI en planteles vacunados es ciertamente debida a diferencias antigénicas entre las cepas de campo y las cepas vacunales o bien a otros motivos (ej.; fallas en el procedimiento de la vacunación, inmunosupresión, etc.).

Caracterización antigénica

Por lo expuesto, en esta tesis se propuso realizar la caracterización antigénica de las variantes regionales, estableciendo su relación con las vacunas comerciales. Una primera caracterización antigénica fue realizada mediante ensayos de VNC en EP. De ese modo, se estableció que la cepa de campo A13 (usada como representante del linaje GI-16) no está relacionada antigénicamente a las vacunas Ma5 (serotipo Massachusetts) y CR88 (serotipo 793/B), caracterizadas como genotipos GI-1 y GI-13 respectivamente por Valastro y colaboradores

(Valastro et al., 2016). De hecho, las distancias antigénicas calculadas como valor r (Archetti & Horsfall, 1950) mostraron porcentajes de similitud antigénica muy bajos entre A13 y Ma5 (3,32 %) y entre A13 y CR88 (9,99 %). Este resultado es relevante ya que indica que la principal cepa de campo en Argentina y las vacunas empleadas para controlarla no solo son genotipos y linajes diferentes, sino que pertenecen a serotipos distintos. En un estudio similar, pero llevado a cabo con aislamientos chilenos, también se determinó una diferencia antigénica entre variantes del linaje GI-16 y los serotipos Massachusetts y 793B, aunque la distancia entre serotipos fue menor a las observadas aquí (Guzmán et al., 2019). En dicho trabajo el valor r calculado entre 2 aislamientos pertenecientes a GI-16 y una vacuna de serotipo Massachusetts (en el trabajo no se indica la cepa) resultó del orden del 41 y 42 %. La similitud antigénica fue ligeramente menor (33 y 34%) cuando se compararon dichos aislamientos con la cepa 4/91 (serotipo 793/B). Si bien, los valores de r mencionados (por debajo de 50%) indican falta de identidad antigénica entre los aislamientos chilenos y las vacunas, los valores reportados son considerablemente mayores que los determinados en este trabajo. Una probable explicación para esta discordancia puede ser que la misma sea debida a pequeñas diferencias en la secuencia de S1 de los aislamientos chilenos y la cepa A13 argentina (de Wit et al., 2017).

Por otro lado, también logramos implementar un sistema de VNC alternativo (más económico y menos laborioso) al uso de EP. El primer paso fue adecuar un modelo de infección en cultivo de células conveniente para los ensayos de VNC. Para hacerlo fue necesario contar tanto con un cultivo de células apropiado como con cepas de los diferentes serotipos adaptadas a ese cultivo. El cultivo de células elegido fue el de riñón de embrión de pollo (ChEK), debido a que reportes previos indicaban que la adaptación al mismo presentaba mayor facilidad y rapidez (Chomiak et al., 1958; Cowen & Hitchner, 1975; Lukert, 1966). Al mismo tiempo se seleccionaron pasajes de las diferentes cepas de referencia de IBV para realizar el proceso de adaptación a ChEK, que consistió fundamentalmente en la realización de pasajes ciegos hasta la aparición de EC. Cada cepa requirió un número variable de pasajes para la adaptación que se verificó por la aparición de EC. Los aislamientos CHu8p10 (10 pasajes previos en EP), y A13p63 (63 pasajes previos en EP) mostraron diferentes grados de EC desde el primer pasaje en ChEK. Mientras que CR88p3 y Ma5p3 (ambos con 3 pasajes previos en EP), mostraron EC a partir del segundo y quinto pasaje, respectivamente.

De este modo, los aislamientos que tenían un mayor número de pasajes en EP (CHu8p10 y A13p63) fueron los que se adaptaron más fácilmente al cultivo primario. Esto probablemente se deba a que el embrión de pollo aporta un ambiente rico en células indiferenciadas con una baja

(o inexistente) respuesta inmune. Este ambiente, prácticamente sin presión de selección, favorece la diversificación de las poblaciones virales inoculadas. incrementando las chances de adaptación posterior al cultivo celular (Estola, 1966; Gillette, 1973; Oade et al., 2019).

En tal sentido resulta interesante que al comparar las secuencias de aminoácidos de S1 de las cepas, antes y después de ser adaptadas a ChEK, se observan cambios que pueden estar asociados al proceso de adaptación. Es así como A13p63 y CHu8p10, que no requirieron más que un pasaje para inducir EC en ChEK, tuvieron en S1 solo 3 y 5 cambios de aminoácidos, respectivamente. Mientras que la cepa Ma5p3, que requirió el mayor número de pasajes para su adaptación, mostró también el mayor número de cambios de aminoácidos en S1 (16 en total). Sin embargo, la adaptación de CR88p3 a ChEK fue atípica, ya que a pesar de tener pocos pasajes en EP (solo 3) requirió no más de dos pasajes ciegos para exhibir EC (con solo 1 cambio de aminoácidos en S1). Una probable explicación a este “comportamiento” atípico podría ser debido a que la cepa CR88 usada en este trabajo fue obtenida directamente de una vacuna comercial, de la que desconocemos su historia de pasajes en EP previo a la comercialización. Entonces no sería inapropiado suponer que la rápida adaptación a ChEK pudo haber sido facilitada a un elevado número de pasajes en EP en la planta elaboradora.

Con todas las cepas de referencia adaptadas a ChEK fue posible llevar a cabo el ensayo de VNC entre todas ellas. Los resultados obtenidos corroboraron lo observado previamente en EP. Esto es, se verificó la falta de identidad antigénica entre A13 y las cepas vacunales Ma5 y CR88, discutido previamente. Pero también se corroboró la diferencia antigénica entre las cepas de campo CHu8 (GI-11) y A13 (GI-16), que fuera reportado en un trabajo anterior (Marandino, 2018).

De este modo, los resultados de la VNC obtenidos en ChEK sirven de confirmación para lo observado en los ensayos en EP. Ambas pruebas han servido para determinar que todas las cepas (de campo y vacunas) presentes en el país no solo pertenecen a linajes genéticos diferentes, sino que también son serotipos distintos. Recíprocamente, la coincidencia de resultados sirve de validación para la técnica en cultivo de tejidos, la cual será empleada en futuros estudios del laboratorio de enfermedades virales de las aves.

La relevancia de este resultado se aprecia mejor a la hora de evaluar la eficacia de los planes de vacunación como se explicará posteriormente.

Está claro que la forma apropiada de prevención de IBV es mediante el uso de una vacuna de un serotipo homólogo al de la cepa de campo (Jackwood & de Wit, 2020; Jordan, 2017). Sin

embargo, debido a la elevada variabilidad de IBV hay un número significativo de variantes genéticas (con diferencias antigénicas) en todo el mundo para las que no siempre se cuenta con vacunas comerciales que sean homólogas (Jackwood, 2012; Jackwood & de Wit, 2020).

Para resolver este obstáculo se ha propuesto que la inmunización de los planteles se realice combinando dos serotipos diferentes, ya que mediante ese procedimiento se logra incrementar significativamente el espectro antigénico de cobertura otorgando “protección” contra un serotipo heterólogo (Cook et al., 1999). De hecho, en nuestro país en el año 2013 se hizo uso de esta estrategia para contener un brote de BI. En esa oportunidad se autorizó el ingreso de vacunas del serotipo 793/B (serotipo inédito en nuestro país) para ser usada en combinación con vacunas de serotipo Massachusetts. Con esta estrategia se logró controlar inicialmente el problema, al menos se logró disminuir la mortalidad provocada por IBV en los primeros años. Sin embargo, con el paso del tiempo la frecuencia de detección de virus de campo perteneciente al linaje GI-16 en casos de Bronquitis Infecciosa ocurridos en planteles vacunados con la combinación Massachusetts + 793/B se ha incrementado en forma notable (dato no publicado de nuestro laboratorio). Ello está vinculado con la indicación de que la estrategia basada en “protectotipos” no es universal y que deberían realizarse pruebas de eficiencia para cada variante heteróloga antes de autorizar cepas no presentes en la región para ser usadas como vacunas (de Wit et al., 2017). Este tipo de ensayos se llevaron a cabo en nuestro país (posteriormente al ingreso de la nueva cepa vacunal), demostrándose que la combinación Massachusetts + 793/B no inhibe la replicación del virus GI-16 usado como desafío (Geréz et al., 2021). En otras palabras, el virus de campo puede replicar en animales vacunados lo que promueve la aparición de variantes de escape (Toro et al., 2012). Sumado a lo anterior, en Argentina desde el año 2013 prácticamente todos los brotes de BI se encuentran asociados a variantes del linaje GI-16 (a pesar del uso de las vacunas combinadas).

Estos hallazgos indican que sería oportuno contar con una vacuna del linaje GI-16, y que lo más pertinente sería obtenerla a partir de una cepa atenuada de un aislamiento de campo de dicho linaje. Para ello seleccionamos la cepa A13 que fue originalmente aislada de un caso de campo en el año 2013 y la sometimos a pasajes en serie en EPs SPF con el propósito de atenuarla.

Adaptación a diferentes soportes biológicos.

El fundamento de este procedimiento es que tal como se ha indicado, las poblaciones de virus altamente variables (como es el caso de IBV) están constituidas por subpoblaciones presentes en diferentes proporciones (Eigen, 1993; Eigen, 1996; Enjuanes et al., 2007; Lai & Cavanagh,

1997; Toro et al., 2012). Esas subpoblaciones se reconocen por diferencias más o menos significativas en la secuencia de nucleótidos que pueden ser portadoras de atributos relacionados a la patogénesis viral (p. ej.: vinculados a tropismo, virulencia y/o antigenicidad). La subpoblación (o subpoblaciones) predominante es la más influyente en el otorgamiento del *fitness* (adaptación) a determinado hospedador (o soporte biológico en el cual el virus replica) (Van Santen & Toro, 2008; Elena et al., 2009; Toro et al., 2012). Por consiguiente, el proceso de adaptación desde un hospedador (o soporte biológico) a otro está vinculado a cambios en la proporción (espectro) en que una subpoblación contribuye a la conformación de la población viral (Domingo & Gomez, 2007). Esto sugiere que es posible manipular (seleccionar) atributos tales como atenuación/virulencia viral (o tropismo) forzando la adaptación del virus a un soporte biológico determinado y esa adaptación puede ser asociada a un cambio genético. Tal procedimiento ha sido muy utilizado en la elaboración de las primeras vacunas, y a pesar del paso del tiempo y el desarrollo y aplicación de tecnologías novedosas en la obtención de vacunas de nueva generación, en la actualidad se encuentra plenamente vigente ya que todas las vacunas atenuadas usadas para el control de BI han sido obtenidas de este modo.

Durante el proceso de atenuación de la cepa A13 se observaron dos eventos que han sido identificados como evidencia de adaptación del virus a EP. Por un lado, se notó ya en los primeros pasajes un incremento en la severidad de las lesiones en los embriones inoculados (hemorragias, malformaciones y mortalidad más temprana), y por el otro, un incremento significativo de los títulos virales. Como ejemplo de esto último los títulos virales de los pasajes A13p63 y A13p50 ($10^{7.375}$ y $10^{9.624}$ DIE₅₀/ml), fueron 3 a 5 logaritmos más elevados que el aislamiento adaptado a hospedador natural ($10^{4.21}$ DIE₅₀/ml).

Los pasajes en EP se extendieron hasta el número 63, momento en que se consideró oportuno realizar las pruebas necesarias para validar la condición de candidato vacunal de la cepa A13 atenuada.

En simultaneo a la técnica de atenuación, se realizaron pasajes en serie de A13 en pollos de 2 a 5 semanas de edad. Este procedimiento fue llevado a cabo con la finalidad de incrementar la patogenicidad de la cepa en hospedador natural y de ese modo contar con un inóculo adecuado para emplearlo como virus de desafío en pruebas de eficiencia de vacunas (Sutton & Subbarao, 2015). Asimismo, estos pasajes nos han permitido tener insumo para estudiar cambios genéticos asociados a la adaptación al hospedador.

Las inoculaciones para estos pasajes se realizaron por vía intratraqueal y las muestras para el siguiente pasaje se obtuvo del tejido renal. El propósito fue el de asegurar la infección introduciendo el inóculo directamente en el tracto respiratorio profundo (como se indica en los protocolos de infección) y para intentar “forzar” el tropismo renal de la cepa (Domingo et al., 2008). Además, se emplearon dos estrategias diferentes, se inocularon animales con y sin un tratamiento previo con dexametasona. El objetivo fue probar si el pasaje en animales inmunodeprimidos (tratamiento con dexametasona) tenía alguna consecuencia en la patogenicidad del inóculo. También para probar si la respuesta inmune puede ser un elemento para considerar como factor de selección de la cepa en el proceso de evolución viral (Novella et al., 2005). Lamentablemente, los pasajes de A13 en animales con y sin tratamiento inmunodepresor no ha mostrado en este trabajo ningún resultado concluyente. Al menos en los primeros 11 pasajes en hospedador natural no se observó que el tratamiento previo con dexametasona proporcione una ventaja replicativa al virus, por lo que se descartó la hipótesis y se continuó hasta obtener 20 pasajes (sin tratamiento previo) para incrementar la patogenicidad de la cepa.

Análisis de secuencia

Con el material obtenido de los pasajes en diferentes soportes biológicos (embriones, cultivo celular y pollos) se llevó a cabo un estudio de evolución viral. Fundamentalmente se analizaron los cambios genéticos asociados a cada uno de los procedimientos de adaptación. Una gran parte de los cambios nucleotídicos (50-75 %), tanto sinónimos como no sinónimos, observados en la región que codifica a S1, resultaron ser transitorios, es decir que revierten en el siguiente pasaje. Esto se debe a que son resultado de la selección de subpoblaciones con mutaciones que resultan en la incorporación de aminoácidos que interaccionan en forma negativa con el resto de los aminoácidos codificados por el genoma o simplemente son cambios “neutros” que no otorgan una verdadera ventaja adaptativa y por tanto pueden dejar de estar presentes en un pasaje posterior (Marandino, 2018). De todos modos, el 20-66 % de los cambios no sinónimos observados fueron estables (una vez que se produjeron estuvieron presentes hasta el final del experimento). Interesantemente algunos de esos cambios fueron detectados en las regiones hipervariables de (HVR) de S1. Estas regiones codifican áreas de S1 que son críticas para la patogénesis viral, ya que allí residen los dominios de unión al receptor (RBD) y los determinantes antigénicos (Belouzard et al., 2012; Li et al., 2005; Cavanagh et. al, 1988; Moore et al., 1997).

En la región HVRI se detectaron cambios relacionados solo con la adaptación al cultivo celular. Se encontró un cambio en la posición P38L en la adaptación de la cepa CR88, mientras que en la cepa Ma5 se encontraron cambios en las posiciones N38D y N51D. El dominio HVRI contiene el RBD que determina la interacción entre el virus y la célula hospedadora (Promkuntod et al., 2014, Rohaim et al., 2020), por lo cual es posible que estos cambios favorezcan el tropismo por ChEK.

Una mayor cantidad de cambios se hallaron en HVRII, estos cambios incluyeron la posición 95 en los pasajes de A13, en EP y en hospedador natural. Esta posición ha sido descrita anteriormente como un determinante de predilección al hospedador (Callison et al., 2001; Cavanagh et al., 2005). Los autores sugieren que una Serina, en esa posición, favorece la replicación en hospedador natural (Cavanagh et al., 2005), esto concuerda con nuestro análisis, en donde la mayoría de los pasajes en EP cuentan con una Arginina (R), mientras que los pasajes en hospedador natural poseen una Serina (S).

Además, en HVRII se encontraron cambios en: i) posición 117, adaptación de CHu8 a EP (S117R), ii) posición 118, adaptación de Ma5 a ChEK, (G118D) y iii) 130, adaptación de A13 a ChEK, (S130N) y a hospedador natural (S130R) y adaptación de Ma5 a ChEK, (F130S). Estas posiciones fueron antes descritas en ensayos de adaptación de una cepa de 3 pasajes en EP a cultivo primario de riñón y células vero (Yamada et.al 2009; Fang et al., 2005). Sin embargo, los cambios contrastan con los encontrados en nuestros pasajes, ya que en estos estudios se reportan Y117H, D118G y F130L. Abdel-Monein et al. (2006) estudiaron las diferencias entre la cepa Egypt/F/03, procedente de un aislamiento nefropatogeno, y la cepa H120 (vacuna). En la posición 130, la cepa H120 contiene una serina, mientras que Egypt/F/03 posee una fenilalanina. En este caso, se observó que los pasajes de adaptación a células en Ma5 presentaban el mismo cambio (F130S). Sin embargo, el trabajo de Gallardo et al. (2016) en la misma posición, después de 15 pasajes de adaptación a embriones de pollo, muestra una sustitución de un aminoácido polar por uno no polar (Q130P). Por lo tanto, este cambio puede estar más relacionado con el tropismo celular que con la atenuación.

Otros cambios estables en HVRII fueron detectados en la cepa A13 en EP (A119D y S132F) y en hospedador natural (A100V). Los cambios en esta región también le deben su importancia, a que la misma (incluyendo a los aminoácidos en la posición 99 a 159) ha sido relacionada a la afinidad por receptores renales (Bouwman et al. 2020).

En HVRIII, se encontraron 3 cambios en: i) posición 315, en la adaptación de CHu8 a ChEK (S315L), ii) posición 318, en la adaptación de A13 en EP (R318S) y iii) posición 376, en la adaptación de Ma5 a ChEK (E376G). De todas ellas, la posición 315 fue descrita anteriormente en un estudio de polimorfismo entre vacunas comerciales atenuadas de la cepa QX (linaje GI-19) (Jung et al., 2022). En aquel trabajo, 2 de las variantes atenuadas presentaron el aminoácido cisteína en 315, mientras que la tercera presentó una serina, del mismo modo que la A13 adaptada a EP de nuestro trabajo.

La gran mayoría de los cambios encontrados en las regiones HVR (13/15) implicaron la sustitución de un aminoácido por otro de propiedades distintas, lo que podría resultar en una alteración estructural en un sitio de alta importancia funcional. Sin embargo, no contamos con evidencia suficiente que nos permita afirmar que ello haya acontecido en algunos de los pasajes estudiados aquí.

Los determinantes antigénicos, son de alta importancia debido a la inmunogenicidad, mientras que los RBD son importantes para la determinación del tropismo. En otras especies de coronavirus se ha demostrado que se requiere pocas sustituciones de aminoácidos en el RBD de la S1 para que exista un cambio en el tropismo (Belouzard et al., 2012; Li et al., 2005). Lo mismo fue descrito por Bickerton y colaboradores en la subunidad S2, donde tan solo 3 cambios de aminoácidos permitieron que IBV se adaptara a cultivo en células VERO (Bickerton et al., 2018). Los residuos que permitieron esos cambios (R688, K690, y L693) no se encuentran relacionados a los cambios encontrados en la adaptación de nuestras cepas a ChEK. Sin embargo, en nuestras secuencias se hallaron otros 2 cambios de aminoácidos en S2 en la cepa A13 (V518E y L582F) y en la cepa CHu8 (N647Y y Q829R). La dilucidación de la importancia de estos cambios en la adaptación al cultivo de células requeriría mayor investigación futura.

El análisis del genoma completo de los pasajes en EP y en ChEK reveló la presencia de cambios de nucleótidos en todo el genoma. Algunos de esos cambios fueron sinónimos (20 y 33,3% para A13 y CHu8, respectivamente), aunque la mayoría resultaron ser no sinónimos (80 y 66,7% para A13 y CHu8, respectivamente). Estos cambios se encontraron fundamentalmente en los marcos de lectura (ORF) de 1a y de S. En el caso de A13, el 46% de los cambios de nucleótidos se localizó en el ORF1a y el 33% en el ORF S; mientras que en CHu8, el 47% se encontró en el ORF1a y el 30% en el ORF S. Estos hallazgos son consistentes con otros estudios de variabilidad viral que también encontraron que la mayoría de los cambios se ubican en estos ORF (Ammayappan et al., 2008; Feng et al., 2015; Marandino, 2018).

El ORF1a es un gen crítico para la infección de IBV, cambios de aminoácidos producidos en este segmento pueden tener importantes implicancias en su virulencia y patogenicidad (Cavanagh, 2007; Zhao et al., 2020). En el análisis de las secuencias de aminoácidos de este trabajo se encontró en este segmento el 45,9% y el 40% de los cambios para A13 y CHu8, respectivamente.

La región codificante de nsp3 del ORF1a ha sido descrito por varios autores como uno de los segmentos donde ocurren los cambios de la atenuación (Ammayappan et al., 2008; Phillips et al., 2012). La proteína nsp3 ha demostrado tener un efecto inmunomodulador que facilita la evasión de la respuesta inmune del hospedador (Peng et al., 2022; Sun et al., 2022), además de jugar un rol crítico en la replicación viral, tener un rol en la interacción proteína-proteína y ser un sitio blanco potencial para el desarrollo de drogas antivirales (Peng et al., 2022; Philips et al., 2012; Neuman et al., 2008). Philips y colaboradores estudiaron los cambios de aminoácidos de nsp3 entre cepas patógenas y atenuadas de 3 tipos distintos de IBV y encontraron que el 34,75 a 43,66% de los cambios se situaban en la secuencia codificante de esta proteína (Phillips et al., 2012). En este trabajo, el 24 y 25% de los cambios de aminoácidos se situaron en esta posición para A13 y CHu8 respectivamente. La mayoría de estos cambios corresponden a las cepas adaptadas a embrión de pollo (atenuadas), donde se encontraron 7 cambios en este segmento en A13 (P748L, T852I, V290I, A946V, G1623S, D2187G) y 4 en CHu8 (E788D, T852I, E945D, T1408I). Las cepas adaptadas a cultivo celular solo mostraron 2 cambios en A13 (S892F, S1829R) y 1 en CHu8 (T1675). Los cambios en este segmento genómico sugieren atenuación, sin embargo, es importante recalcar que la mayoría de estos cambios fueron inestables, a excepción de P748L en A13 y E788D, T852I en CHu8, por lo que no es posible afirmarlo con certeza.

Además, se encontraron cambios de aminoácidos en menor proporción en el ORF1b (10,8% en A13 y 15% en CHu8), en M (5,4% en A13) y en N (5,4% en A13 y 10% en CHu8). Si bien estos genes no han sido relacionados a la atenuación, se conoce que la proteína N es un inductor mayor de inmunogenicidad, pudiendo influenciar la respuesta inmune humoral y celular del hospedador (Cavanagh, 2007; de Wit et al., 2011).

El hallazgo más importante de este análisis está relacionado a la ausencia del ORF6 en el genoma de A13. Esta condición (la falta de ORF6b) parece ser una característica de otras cepas de GI-16 regionales (Marandino et al., 2017). Si bien se desconoce la función específica de este gen en IBV, se sabe que su homólogo en SARS-II posee una acción bloqueando la respuesta antiviral, al impedir la expresión de genes activados por STAT1 en respuesta a la señal de interferón (Frieman et al., 2007).

A pesar de los cambios nucleotídicos registrados en las secuencias de nucleótidos de los pasajes en diferentes hospedadores, no hemos logrado en esta tesis asociar esos cambios a modificaciones en el fenotipo viral (virulencia o tropismo). Probablemente, lograr ese tipo de conocimiento requerirán un mayor trabajo de investigación empleando fundamentalmente técnicas de genética reversa y pruebas *in vivo* más extensas.

Modelo de infección

Con la cepa A13 adaptada a hospedador natural (pasaje K16), se realizó la puesta a punto del modelo de infección, estableciendo no solo las variables a evaluar sino también los tiempos de toma de muestra más convenientes para caracterizar la infección.

Con el objetivo de seleccionar el inóculo para implementar el modelo de infección, en primera instancia se llevó a cabo un estudio preliminar de patogenicidad en animales con el aislamiento KD11 (11 pasajes en hospedador natural con tratamiento inmunodepresor) y K13 (13 pasajes en hospedador natural sin tratamiento previo). En ambos casos se observaron signos clínicos leves (estornudos y depresión) y en las necropsias, lesiones ocasionales en tracto respiratorio y renal. El tratamiento inmunodepresor no representó una ventaja para la virulencia del inóculo y al ser las lesiones renales leves y ocasionales, se planteó seguir con los pasajes sin tratamiento inmunodepresor previo para obtener un aislamiento más adaptado al riñón.

Desafortunadamente, alcanzamos el pasaje 20 en hospedador natural sin que la cepa exhiba el grado de patogenicidad necesario para provocar signos clínicos y lesiones macroscópicas que no dejen dudas respecto a la infección y de ese modo emplearlos para estimar grado de “protección” en un ensayo de eficiencia de vacunas. Esta dificultad en obtener un inóculo que genere signos clínicos y lesiones cuya severidad permitan ser de alguna forma cuantificadas (mediante un sistema de scores) no es una situación infrecuente en IBV (de Wit et al., 2014). No obstante, si se observó que las lesiones microscópicas en tráquea (sobre todo la ciliostasis) fueron consistentes en todos los animales infectados. Sumado a ello, la detección molecular del virus en tráquea y riñón representan variables cuantificables confiables para categorizar el desafío viral (Jackwood et al., 2015). Por tal motivo se trabajó en la normalización de un test de evaluación de la ciliostasis y en el desarrollo de un sistema de cuantificación viral mediante el uso de una técnica de RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR). El desarrollo y puesta a punto de la RT-qPCR requirió en primera instancia de la selección de *primers* adecuados y posteriormente la prueba de los mismos para determinar concentración de uso y temperatura de hibridación

óptimas. El resultado fue una técnica muy sensible (límite de detección de 10^2 moléculas), sin reactividad en muestras negativas (específica) y cuya evaluación de la curva estándar fue cercana al ideal (un índice R2 de 0,992 y una eficiencia de 86%).

Esta técnica fue determinante para la elección del inóculo a emplear en el modelo de infección. Ello se debió a que al no haber obtenido (luego de 20 pasajes en hospedador natural) un inóculo que fuera capaz de generar manifestaciones clínicas (o lesiones macroscópicas) consistentes e inequívocas de infección se hizo uso de la cuantificación viral como elemento de valoración. De ese modo, se eligió el pasaje con la carga viral más elevada post-infección. El pasaje elegido fue el K16.

El ensayo de optimización del modelo de infección se realizó con pollos SPF que fueron inoculados (vía intra-traqueal) a los 21 días de edad. Cada 5 días, a partir del día 5 hasta el 20 pi se realizó la eutanasia y necropsia de 5 animales y se tomaron muestras para evaluación de: i) ciliostasis; ii) lesiones microscópicas (tráquea y riñón); iii) detección de material genético de IBV (tráquea, riñón y tonsila cecal) y iv) anticuerpos séricos. Entre las 24 y 72 hpi se observó en este nuevo ensayo (usando K16) la aparición de signos clínicos (estornudos y depresión del sensorio) leves y transitorios que no pudieron ser cuantificados en el grupo inoculado. En la necropsia se observaron lesiones en algunos animales, fundamentalmente en tracto respiratorio (engrosamiento con presencia de exudado en los sacos aéreos) y renal (tumefacción y “palidez” de los riñones) entre los días 10 y 20 pi. Tampoco hubo consistencia en estos hallazgos, algo que ya se había observado (con un número menor de animales y en un periodo de evaluación más reducido) en los pasajes en serie. De modo que el uso de las lesiones como una variable de evaluación de la infección fue descartado ya que ello requeriría incrementar el número de animales y además se debería elaborar (y probar) un sistema cuantificable. En oposición, tanto la evaluación de la ciliostasis como la detección de material genético viral mostraron ser robustas, observándose el pico de ciliostasis (menor movimiento ciliar) coincidiendo con el pico de detección viral en tráquea al día 5 pi. Esto concuerda con trabajos previos que indican la presencia de IBV en tráquea a partir de las 21 hpi y la ausencia de movimiento ciliar hasta los 7-8 dpi (Hoerr, 2021; Jackwood & de Wit, 2020). Por otro lado, la detección de material genético en riñón solo fue observada en los días 5 y 10 pi, ya que en las muestras tomadas los días 15 y 20 pi fueron negativas. De todos modos, en los ensayos de pasajes por hospedador natural, se observó un 100% de las muestras positivas a los 7 dpi, por lo que se seleccionó este tiempo (intermedio entre 5 y 10 dpi) para evaluar la presencia de material genético viral en riñón en los ensayos de eficiencia. La respuesta de anticuerpos (medido mediante el ELISA) indicó que todos

los animales inoculados fueron positivos ya desde el día 10 pi. Este ensayo de infección resultó clave, ya que nos permitió no solo establecer las variables adecuadas a evaluar sino también identificar los tiempos óptimos para tomar las muestras.

Así, se estableció que la cuantificación de la carga viral se realice a los 5 y 7 dpi, en tráquea y riñón respectivamente; y que la prueba de ciliostasis sea a los 5 dpi. Ambas determinaciones tienen un valor extra ya que suelen ser requeridas en los ensayos de eficacia solicitados para la autorización de vacunas en diferentes países (C.F.R, 2021; Pharmacopoeia, 2013).

A los fines de este trabajo, la puesta a punto del modelo de infección fue el requisito para poder evaluar la eficiencia como vacuna del aislamiento atenuado de la cepa A13 (GI-16), comparándolo con las vacunas autorizadas.

Prueba de A13 como vacuna

El siguiente paso fue evaluar a la cepa A13 como candidato vacunal. Se evaluó la inocuidad, la inmunogenicidad, la seguridad y por último la capacidad de protección ante un desafío viral. Esto último comparado con otras vacunas (prueba de eficiencia).

Para evaluar la inocuidad se inocularon pollitos SPF de 1 día de vida. En primer término, se probó el pasaje 63 de A13 (A13p63). Se utilizó la dosis más elevada posible ($10^{7.375}$ DIE₅₀/ml) con el objeto de generar las condiciones más favorables para el desarrollo de reacciones post-vacunales (a mayor título de virus inoculado, mayor reacción post-vacunal). Se evaluó también la presencia de virus en tráquea, riñón y tonsilas cecales a los 7, 14, 21 y 28 dpi, observándose muy baja replicación viral del inóculo ya que solo a los 7 dpi, 2 animales de 5 evidenciaron la presencia del virus en la tráquea (el resto de los tejidos evaluados en el resto de los tiempos muestreados resultaron negativos). Por otro lado, la evaluación de anticuerpos mostro pobre inmunogenicidad de este pasaje ya que en ninguno de los tiempos evaluados se logró el 100 % de animales positivos por el ELISA. Esta baja replicación viral y baja inmunogenicidad puede ser debida a un excesivo proceso de atenuación y excluyen a A13p63 como candidato vacunal. Hallazgos similares han sido reportados con diferentes aislamientos de IBV que, como consecuencia de un número desmedido de pasajes en EP, disminuyeron la capacidad replicativa, la inmunogenicidad y el grado de protección (Feng et al., 2015; Geilhausen et al., 1973; Liu et al., 2009).

Por ello, se descartó el pasaje 63 y se decidió evaluar un pasaje más bajo de A13 como candidato vacunal. El elegido fue el pasaje 50 de A13. En la prueba de inocuidad (al igual que lo realizado con A13p63) se inocularon pollitos de un día con una dosis elevada ($10^{9.624}$ DIE₅₀/ml) sin que se hayan observado signos clínicos ni lesiones de ningún tipo en los animales durante el periodo de evaluación (hasta el día 28 pi). Sin embargo, a diferencia de A13p63, el pasaje 50 de A13 fue capaz de replicar en los distintos tejidos, y generar anticuerpos detectables, convirtiéndose en el pasaje de A13 seleccionado para las siguientes pruebas.

Para probar la inmunogenicidad de la cepa se inocularon pollos de 1 día de edad con una dosis de 10^4 DIE₅₀/pollo (10^5 DIE₅₀/ml). En ese ensayo se tomaron muestras de sangre y tráquea a los 7, 14, 21 y 28 dpi. La detección de virus en tejido traqueal se extendió hasta el día 21 pi (cuando 4 de 5 pollos fueron positivos). A los 28 dpi las tráqueas de todos los pollos resultaron negativas a IBV (por RT-PCR). Por otro lado, la prueba de ELISA reveló una óptima respuesta inmune humoral ya que desde los 7 dpi hubo pollos (2 de 5) positivos por ELISA, y desde los 21 dpi todos los pollos evaluados mostraron buenos niveles de anticuerpos en sangre. De este modo, A13p50 resultó ser un inóculo que puede ser administrado a pollos de 1 día de edad, replica en los tejidos de los animales sin generar daño (inocuo) pero generando una buena respuesta inmune humoral (inmunogénico).

Dado el rol de la inmunidad de las mucosas en la prevención de BI, se diseñó un experimento para detectar inmunoglobulinas en tracto respiratorio (Lamm, 1997; Cook et al., Otsuki, 1992; Thompson et al., 1997). Con ese fin adaptamos una técnica de lavaje traqueobronquial (LTB) para emplearla en pollos y luego detectar en dicho lavado la presencia de inmunoglobulinas mediante ELISA. El experimento consistió en la inoculación de pollos SPF de 2 semanas de vida con 10^5 DIE₅₀/ml del candidato vacunal A13p50. Los LTBs y las muestras de sangre se tomaron los días 7, 14, 21, y 28 pi. Los resultados del ELISA mostraron cierta correlación (no estadística) entre las muestras de suero y los LTBs. A partir de los 14 dpi todos los animales presentaron anticuerpos anti-IBV, aunque los ELISAs de las muestras LTBs presentaron una absorbancia menor. De todos modos, logramos mediante este procedimiento confirmar que A13p50 no solo induce la producción de anticuerpos en sangre, sino también en la mucosa del tracto respiratorio.

Asimismo, se probó la estabilidad del inóculo con un ensayo de infección por contacto natural para evaluar potenciales eventos de reversión de la virulencia. Una característica de las vacunas atenuadas por pasajes en serie es que la atenuación se produce por cambios en la secuencia nucleotídica del genoma en determinantes de virulencia (que no son del todo conocidos). Esos

cambios pueden revertir más o menos rápidamente cuando se llevan a cabo pasajes (*back passages*) en el hospedador natural (Hanley, 2011; Yadav et al., 2014). Para evaluar la estabilidad de A13p50 se realizaron 4 pasajes en pollos (infección por contacto natural). En cada pasaje se evaluó la aparición de signos clínicos y también se detectó, amplificó y analizó la región de S1. El análisis se hizo comparando la secuencia de S1 de estos aislamientos con la secuencia del pasaje A13p50. No hubo manifestaciones clínicas que pudieran indicar incremento de la patogenicidad de la cepa ni se encontraron diferencias en la secuencia de nucleótidos, lo que sugiere que el inóculo es estable.

Por otro lado, también se evaluó el grado de ciliostasis generado por las vacunas CR88, y Ma5, y el candidato vacunal A13. Los resultados indicaron que a diferencia de A13 y Ma5, la vacuna CR88 genera un grado significativamente superior de ciliostasis que el control negativo ($p = 0,00047$). Además, el grupo de animales inoculados con la cepa Ma5 presentó valores de ciliostasis comparables con CR88 ($p = 0,44$). Esto demuestra que las cepas vacunales Ma5, y por sobre todo CR88 conservan cierta virulencia residual, a pesar de estar atenuadas. Esto es importante, ya que la reducción o falta de la actividad ciliar provoca mayor susceptibilidad a la infección con patógenos secundarios (Jackwood & de Wit, 2020; Jackwood et al., 2015). No obstante, hay trabajos que sugieren que la inflamación que se desarrolla en el tejido traqueal luego de la vacunación con IBV es inevitable e inclusive que la misma puede ser beneficiosa para el desarrollo de la respuesta inmune local (Jackwood et al., 2003). Esto representa un dilema ya que no puede haber inflamación en la mucosa y submucosa traqueal, que favorece la respuesta inmune, sin ciliostasis, la cual aumenta la susceptibilidad a la invasión de patógenos oportunistas. De todos modos, la evidencia aportada por este trabajo indica que A13p50 induce una mínima ciliostasis (menor que la generada por las cepas Ma5 y CR88), pero con una respuesta inmune (determinada por la presencia de anticuerpos específicos) similar a la medida en los animales inmunizados con las otras cepas.

Prueba de eficiencia

Por último, se llevó a cabo la prueba de eficiencia de vacunas con desafío. En la misma se comparó la capacidad de los animales inoculados con vacunas de IBV de diferentes serotipos de responder al desafío viral. Para ello se usaron 80 pollitos SPF que fueron organizados en 4 grupos. Al tercer día de edad uno de los grupos recibió la vacuna CR88, otro grupo la Ma5 y un tercer grupo fue inoculado con A13p50. La dosis administrada fue similar para todos los tratamientos (10^5 DIE₅₀/pollo). Un cuarto grupo recibió PBS por la misma vía que los vacunados.

La mitad de los animales en cada uno de los grupos fue desafiada en la tercera semana de vida, siguiendo el protocolo del modelo de infección descrito en el previamente (materiales y métodos). De ese modo se conformaron tres grupos de animales vacunados y desafiados y un grupo como control positivo (no vacunado y desafiado). La otra mitad de cada grupo fue separada de los desafiados para conformar los grupos de control de animales vacunados (sin desafiar) y control negativo.

La prueba de ELISA indicó que todos los animales vacunados presentaron adecuados niveles de anticuerpos lo cual fue considerado como evidencia de la correcta inmunización.

En la evaluación clínica, se registraron en los primeros 3 días post-desafío la aparición de signos respiratorios leves (estornudos) en los animales del grupo control positivo (como se presuponía). Es interesante mencionar que también se observaron manifestaciones clínicas (signos respiratorios leves) en algunos animales de los grupos desafiados y vacunados con CR88 y Ma5. Lamentablemente, como se mencionó previamente las características de las presentaciones clínicas no fueron las adecuadas para poder cuantificarlas (y de ese modo poder realizar una comparación entre tratamientos). De modo que la evaluación clínica se realizó fundamentalmente como un elemento extra de valoración de la infección de los controles positivos.

En este sentido, las pruebas más importantes con relación a la comparación de tratamientos fueron la ciliostasis y la cuantificación viral.

En la evaluación de los resultados de la prueba de ciliostasis se observó un nivel creciente de los valores nominales, comenzando con el control negativo ($0,16 \pm 0,38$), seguido del grupo A13p50 ($0,7 \pm 0,67$), seguido de Ma5 ($1,8 \pm 1,22$), seguido de CR88 ($3,0 \pm 1,25$) seguido del control positivo ($3,5 \pm 0,51$). El análisis estadístico indica que existen diferencias significativas entre los grupos vacunados con A13, Ma5 y CR88 ($p < 0,05$). Sin observarse diferencias significativas entre CR88 y el control positivo ($p > 0,05$) (**Figura 36**).

Los resultados de la cuantificación viral son coincidentes con la ciliostasis. La cuantificación viral en tráquea mostró una mayor carga viral ($p < 0,05$) en los animales vacunados con Ma5 y con CR88 comparado con los que recibieron A13p50. De la misma forma, la carga viral en riñón fue significativamente mayor en los animales desafiados y vacunados con Ma5 y CR88 que en los vacunados con A13p50. Esto indica que la inmunización con A13p50 se traduce en una mayor eficiencia en la inhibición de la replicación viral del virus de desafío en tráquea y en riñón (**Fig. 37 A y B**).

Estos resultados sugieren que el candidato vacunal A13p50 es capaz de impedir la replicación viral y de proteger el epitelio respiratorio frente al desafío homólogo. Más aún, confirman la sospecha de que las vacunas Ma5 y CR88, además de pertenecer a un genotipo y serotipo distinto, pertenecen a un protectotipo distinto, y son incapaces de proporcionar una protección completa frente al desafío heterólogo con el inóculo K16 (GI-16).

En el pasado, la introducción de las vacunas del serotipo 793B (al que pertenece CR88) generó un amplio debate en la comunidad científica, por la falta de ensayos de caracterización serológica y pruebas de protección que justificaran la entrada de estas variantes de genotipo foráneo. Las vacunas fueron introducidas como parte de estrategia preventiva que se basa en el uso de dos serotipos heterólogos para incrementar el espectro de prevención frente a la infección con cualquier serotipo viral (Cook et al., 1999). Sin embargo, al momento de la autorización se desconocía la eficiencia de vacunación y se subestimaron las potenciales consecuencias a futuro en relación con el potencial evolutivo del virus introducido (Toro et al., 2012).

Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio demostraron que la vacunación doble combinando cepas heterólogas, logran reducir la carga viral y la ciliostasis ante el desafío con GI-16; sin embargo, no producen inmunidad de tipo esterilizante. Eso significa que, si bien la vacunación (doble) combinando serotipos puede conferir una respuesta inmune capaz de mitigar las consecuencias de la infección con un virus heterólogo, la replicación viral no es eliminada y ello representa un potencial problema debido a la capacidad del IBV de evolucionar (Geréz et al., 2021).

Una de las posibles consecuencias de aplicar vacunaciones “imperfectas” es contribuir a la selección de variantes de escape capaces de replicar y persistir en el ambiente (Jackwood & Lee, 2017). La producción intensiva, que abarca alta densidad animal, sumada al manejo deficiente, facilita la transmisión en el lote y favorece los pasajes continuos de adaptación al hospedador natural de forma natural. Un ejemplo de esto ha sido reportado en un estudio donde se evaluaron las tasas de mutaciones y polimorfismos de variantes de la cepa californiana de IBV aisladas en una región donde se vacuna con Massachusetts y Connecticut. De acuerdo con ese estudio el rango de mutaciones de la cepa californiana es 10 veces mayor que el de las variantes derivadas de la vacuna (McKinley et al., 2011). Este aumento de la tasa de mutaciones de la variante de campo en una población vacunada con cepas heterólogas genera un ambiente favorable a la aparición de variantes de escape, lo cual provoca mayores problemas en la salud productiva de las aves. Por otro lado, no solo las mutaciones puntuales contribuyen a la aparición

de variantes de escape, otro evento que contribuye a la aparición de las mismas es el fenómeno de recombinación, que ocurre por la co-circulación en los planteles avícolas de múltiples cepas de IBV (vacunales y de campo). La recombinación es un evento que empieza a ser reportado con mayor frecuencia al disponerse de mayores y mejores herramientas de secuenciación (Marandino et al., 2022). Hasta el momento, en Argentina no se han reportado recombinantes de las cepas locales con cepas vacunales, aunque a nivel global existen varios ejemplos (Ganapathy & Forrester, 2015; Hosseini et al., 2015; Naguib et al., 2016; Ovchinnikova et al., 2011; Rohaim et al., 2020; T. Zhang et al., 2015). Quizás el más pertinente sea el hallazgo en Chile de variantes recombinantes de una variante de campo (linaje GI-16) con vacuna serotipo 793/B (linaje GI-13) reportado en 2019 (Guzmán, 2019). Las vacunas de serotipo 793/B fueron introducidas en Chile en el año 2009, sin reportes previos de variantes del mismo linaje. En nuestro país, el ejemplo más importante de recombinación es el encontrado entre variantes de los linajes GI-11 y GI-16, exitosamente adaptado y distribuido en el territorio (Marandino et al., 2017).

Todas estas razones fundamentan la necesidad de implementar un programa de prevención adaptado a las necesidades locales. En Argentina, la realidad indica que la mayoría de los brotes se producen por variantes del linaje GI-16, por lo tanto, lo más adecuado para reducir la circulación viral es la aplicación de una vacuna homóloga.

Los experimentos realizados en esta tesis indican que la cepa A13 (p50) presenta un adecuado grado de atenuación sin afectar la inmunogenicidad y no se detectaron evidencias de reversión en ensayos de pasajes por contacto natural. Además, en el ensayo de eficiencia los animales vacunados con A13 presentaron mayor inhibición de la replicación viral y un menor grado de ciliostasis con niveles comparables de anticuerpos séricos que los animales vacunados con cepas de los serotipos Massachusetts y 793/B.

Basado en estos resultados, entendemos que la cepa A13 (p50) cumple con los requisitos para ser considerada como candidata a vacuna en el control de las variantes de IBV pertenecientes al linaje GI-16.

7. Conclusiones

En esta tesis se alcanzaron los siguientes logros

- La VN en EP permitió establecer que la cepa de campo A13 pertenece a un serotipo distinto al de las vacunas comerciales Ma5 (serotipo Massachusetts) y CR88 (serotipo 793B).
- Luego de una serie de pasajes las cepas A13, CHu8, Ma5 y CR88 fueron adaptadas exitosamente a cultivo primario de riñón de embrión de pollo (produciendo en todos los casos efecto citopático), lo que permitió su empleo como sistema alternativo para llevar a cabo ensayos de virus neutralización.
- Con este sistema, se completó la caracterización antigénica de todas las variantes de IBV presentes en el país, determinándose que las cepas A13 y CHu8 (pertenecientes a los linajes GI-16 y GI-11, respectivamente) difieren antigénicamente entre sí y con los serotipos vacunales Massachusetts (GI-I) y 793/B (linaje GI-13).
- A través del proceso de pasajes en serie en diferentes sistemas biológicos se han registrado una serie de cambios en la secuencia de nucleótidos (eventualmente de aminoácidos) en diferentes regiones del genoma de IBV, pero concentrados fundamentalmente en las regiones codificantes del gen 1a y gen S, que podrían estar relacionadas al proceso de adaptación al hospedador.
- Se determinó que el tratamiento inmunodepresor en pollos no fue determinante para incrementar la patogenicidad de la cepa A13 en el proceso de adaptación mediante pasajes en serie en hospedador natural (al menos en los primeros 11 pasajes).
- Se logró implementar un modelo de infección experimental con la cepa K16 (16 pasajes en serie en hospedador natural). Esta cepa resultó capaz de replicar en tráquea y riñón en niveles cuantificables. Para ello:
 - Se desarrolló, optimizó e implementó una prueba de RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) para la cuantificación de la carga viral en diferentes tejidos.
 - Se optimizó e implementó un sistema de evaluación de ciliostasis.
- Se alcanzó la atenuación de la cepa A13 mediante pasajes en serie en embrión de pollo
- Mediante pruebas de seguridad de la cepa A13 (pasaje 50), se logró establecer que:
 - A13 es un inóculo atenuado, inocuo e inmunógeno, aun en dosis elevadas (10^9 DIE₅₀/ml)

CONCLUSIONES

- A una dosis de 10^5 DIE₅₀/ml conserva su inmunogenicidad, siendo capaz de producir respuesta inmune humoral sistémica y local (tracto respiratorio).
 - Es un inóculo estable, la virulencia no revierte luego de 4 pasajes en hospedador natural, no se observan cambios en la secuencia genómica de S1, ni manifestaciones clínicas.
 - Induce ciliostasis mínima, a diferencia de las cepas vacunales Ma5 y en particular CR88, que conservan virulencia residual.
- Se implementó un ensayo de eficiencia de vacunas administradas a pollitos de 3 días de edad con desafío posterior (con K16). Las inmunizaciones se realizaron con las cepas A13 (GI-16), Ma5 (serotipo Massachusetts) y CR88 (serotipo 793/B), observándose lo siguiente:
 - La cepa A13 (p50) induce una respuesta inmune que inhibe la replicación viral del virus de desafío (homólogo), sin evidencia de ciliostasis.
 - Las cepas vacunales Ma5 y CR88 no impiden la replicación viral o ciliostasis frente a la infección con K16 (heterólogo).
 - La respuesta inmune conferida por Ma5 es la más pobre en cuanto a la replicación viral en tejidos y la de CR88 en cuanto a ciliostasis.

8. Bibliografía

- Abdel-Moneim AS, El-Kady MF, Ladman BS, Gelb J Jr. S1 gene sequence analysis of a nephropathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. *Virology*. 2006 Sep 20;3:78. doi: 10.1186/1743-422X-3-78. PMID: 16987422; PMCID: PMC1592083.
- Abdel-Moneim, A. S., Zlotowski, P., Veits, J., Keil, G. M., & Teifke, J. P. (2009). Immunohistochemistry for detection of avian infectious bronchitis virus strain M41 in the proventriculus and nervous system of experimentally infected chicken embryos. *Virology journal*, 6, 15. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-15>
- Abozeid, H.H., Paldurai, A., Varghese, B.P., Khattar, S.K., Afifi, M.A., Zouelfakkar, S., EL-Deeb, A.H., El-kady, M.F., & Samal, S.K. (2019). Development of a recombinant Newcastle disease virus-vectored vaccine for infectious bronchitis virus variant strains circulating in Egypt. *Veterinary Research*, 50.
- Aiello, S. E.; Moses, M. A. (2016). *The Merck veterinary manual*. 11th ed. / Kenilworth, NJ ; [USA], Merck & Co.
- Albassam, M. A., Winterfield, R. W., & Thacker, H. L. (1986). Comparison of the nephropathogenicity of four strains of infectious bronchitis virus. *Avian Dis*, 30(3), 468-476.
- Alexander, D. J., & Gough, R. E. (1977). Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. *Res Vet Sci*, 23(3), 344-347.
- Alvarado, I. R., Villegas, P., Mossos, N., & Jackwood, M. W. (2005). Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Colombia during 2003. *Avian Dis*, 49(4), 494-499. doi:10.1637/7202-050304r.1
- Ammayappan, A., Upadhyay, C., Gelb, J., Jr., & Vakharia, V. N. (2008). Complete genomic sequence analysis of infectious bronchitis virus Ark DPI strain and its evolution by recombination. *Virology*, 5, 157. doi:10.1186/1743-422x-5-157
- Archetti, I., & Horsfall, F. L., Jr. (1950). Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J Exp Med*, 92(5), 441-462. doi:10.1084/jem.92.5.441
- Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhvani, P., Mesters, J. R., & Hilgenfeld, R. (2003). Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science*, 300(5626), 1763-1767. doi:10.1126/science.1085658

- Beach, J. R., & Schalm, O. W. (1936). A Filterable Virus, Distinct from that of Laryngotracheitis, the Cause of a respiratory disease of Chicks¹. *Poultry Science*, 15(3), 199-206. doi:<https://doi.org/10.3382/ps.0150199>
- Beaudette, E. R., & Hudson, C. B. (1937). First cultivation of infectious bronchitis virus in chick embryos. *J Am Vet Med Assoc*, 78, 413-422.
- Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N., & Whittaker, G. R. (2012). Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, 4(6), 1011-1033. doi:10.3390/v4061011
- Bhattacharjee, P. S., Carter, S. D., Savage, C. E., & Jones, R. C. (1995). Re-excretion of infectious bronchitis virus in chickens induced by cyclosporin. *Avian Pathol*, 24(3), 435-441. doi:10.1080/03079459508419083
- Bickerton, E., Maier, H. J., Stevenson-Leggett, P., Armesto, M., & Britton, P. (2018). The S2 Subunit of Infectious Bronchitis Virus Beaudette Is a Determinant of Cellular Tropism. *J Virol*, 92(19). doi:10.1128/jvi.01044-18
- Binns, M. M., Bournsnel, M. E., Tomley, F. M., & Brown, D. K. (1986). Comparison of the spike precursor sequences of coronavirus IBV strains M41 and 6/82 with that of IBV Beaudette. *J Gen Virol*, 67 (Pt 12), 2825-2831. doi:10.1099/0022-1317-67-12-2825
- Blankenberg, D., Gordon, A., Von Kuster, G., Coraor, N., Taylor, J., & Nekrutenko, A. (2010). Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics*, 26(14), 1783-1785. doi:10.1093/bioinformatics/btq281
- Blankenberg, D., Von Kuster, G., Coraor, N., Ananda, G., Lazarus, R., Mangan, M., Nekrutenko, A., & Taylor, J. (2010). Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 19, Unit-19.10.21. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1910s89>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Boroomand, Z., Asasi, K., & Mohammadi, A. (2012). Pathogenesis and tissue distribution of avian infectious bronchitis virus isolate IRFIBV32 (793/B serotype) in experimentally infected broiler chickens. *ScientificWorldJournal*, 2012, 402537. doi:10.1100/2012/402537
- Bournsnel, M. E. G., Brown, T. D. K., Foulds, I. J., Green, P. F., Tomley, F. M., & Binns, M. M. (1987). Completion of the Sequence of the Genome of the Coronavirus Avian Infectious Bronchitis Virus. *Journal of General Virology*, 68(1), 57-77. doi:<https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-1-57>

- Bouwman, K. M., Parsons, L. M., Berends, A. J., de Vries, R. P., Cipollo, J. F., & Verheije, M. H. (2020). Three Amino Acid Changes in Avian Coronavirus Spike Protein Allow Binding to Kidney Tissue. *Journal of virology*, 94(2), e01363-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01363-19>
- Branden, R. C., & Da Silva, E. N. (1986). Ocurrencia de “nuevos” serotipos de bronquitis infecciosa en Brasil. In P. Villegas (Ed.), *Proceedings of VI Seminario Internacional de Patología aviar*.
- Brian, D. A., & Baric, R. S. (2005). Coronavirus genome structure and replication. *Curr Top Microbiol Immunol*, 287, 1-30. doi:10.1007/3-540-26765-4_1
- Bushnell, L. D., & Brandly, C. A. (1933). Laryngotracheitis in Chicks*. *Poultry Science*, 12(1), 55-60. doi:<https://doi.org/10.3382/ps.0120055>
- Butcher GD, Winterfield RW, Shapiro DP. Pathogenesis of H13 nephropathogenic infectious bronchitis virus. *Avian Dis*. 34:916–921; 1990.
- C.F.R. (2021). Live Virus Vaccines , 113 C.F.R. § 327 (2021). Retrieved from <https://www.ecfr.gov/current/title-9/chapter-I/subchapter-E/part-113/subject-group-ECFR835899a69c3a8d4/section-113.327>
- Callison, S. A., Jackwood, M. W., & Hilt, D. A. (2001). Molecular Characterization of Infectious Bronchitis Virus Isolates Foreign to the United States and Comparison with United States Isolates. *Avian Diseases*, 45(2), 492-499. doi:10.2307/1592994
- Casais, R., Davies, M., Cavanagh, D., & Britton, P. (2005). Gene 5 of the avian coronavirus infectious bronchitis virus is not essential for replication. *J Virol*, 79(13), 8065-8078. doi:10.1128/jvi.79.13.8065-8078.2005
- Casais, R., Dove, B., Cavanagh, D., & Britton, P. (2003). Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *J Virol*, 77(16), 9084-9089. doi:10.1128/jvi.77.16.9084-9089.2003
- Cavanagh, D. (2003). Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol*, 32(6), 567-582. doi:10.1080/03079450310001621198
- Cavanagh, D. (2007). Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res*, 38(2), 281-297. doi:10.1051/vetres:2006055
- Cavanagh, D., Darbyshire, J. H., Davis, P., & Peters, R. W. (1984). Induction of humoral neutralising and haemagglutination-inhibiting antibody by the spike protein of avian

- infectious bronchitis virus. *Avian Pathology*, 13(3), 573-583. doi:10.1080/03079458408418556
- Cavanagh, D., Davis, P. J., & Mockett, A. P. (1988). Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. *Virus Res*, 11(2), 141-150. doi:10.1016/0168-1702(88)90039-1
- Cavanagh, D., Davis, P. J., Cook, J. K., Li, D., Kant, A., & Koch, G. (1992). Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol*, 21(1), 33-43. doi:10.1080/0307945920841881
- Cavanagh, D., Elus, M. M., & Cook, J. K. (1997). Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A*, 26(1), 63-74. <https://doi.org/10.1080/03079459708419194>
- Cavanagh D. (2003). Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A*, 32(6), 567-582. <https://doi.org/10.1080/03079450310001621198>
- Cavanagh, D., Picault, J. P., Gough, R., Hess, M., Mawditt, K., & Britton, P. (2005). Variation in the spike protein of the 793/B type of infectious bronchitis virus, in the field and during alternate passage in chickens and embryonated eggs. *Avian Pathol*, 34(1), 20-25. doi:10.1080/03079450400025414
- CEPA (2020). Estadísticas y normativa. Avicultura Argentina. Recuperado 3 de mayo del 2023 de <https://aviculturaargentina.com.ar/estadisticas-normativas/>
- Cesaro, T., & Michiels, T. (2021). Inhibition of PKR by Viruses. *Front Microbiol*, 12, 757238. doi:10.3389/fmicb.2021.757238
- Chomiak, T. W., Luginbuhl, R. E., & Jungherr, E. L. (1958). The Propagation and Cytopathogenic Effect of an Egg-Adapted Strain of Infectious Bronchitis Virus in Tissue Culture. *Avian Diseases*, 2(4), 456-465. doi:<https://doi.org/10.2307/1587486>
- Colusi, A. D., & Garbini, J. (1965). Primera comprobación de Bronquitis Infecciosa aviar en la República Argentina. 1) Aislamiento del virus causal. *Rev. Med. Ve*, 1965. 46: p. 77-84.
- Cook, J. K., Orbell, S. J., Woods, M. A., & Huggins, M. B. (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol*, 28(5), 477-485. doi:10.1080/03079459994506

- Cook, K. A., Otsuki, K., Martins, N. R., Ellis, M. M., & Huggins, M. B. (1992). The secretory antibody response of inbred lines of chicken to avian infectious bronchitis virus infection. *Avian Pathol*, 21(4), 681-692. doi:10.1080/03079459208418890
- Cottam, E. M., Maier, H. J., Manifava, M., Vaux, L. C., Chandra-Schoenfelder, P., Gerner, W., . . . Wileman, T. (2011). Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegasome intermediate. *Autophagy*, 7(11), 1335-1347. doi:10.4161/auto.7.11.16642
- Cottam, E. M., Whelband, M. C., & Wileman, T. (2014). Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion. *Autophagy*, 10(8), 1426-1441. doi:10.4161/auto.29309
- Cowen, B. S., & Hitchner, S. B. (1975). Characterization of a new infectious bronchitis virus isolate. III. Cell-culture adaptation of Clark 333. *Avian Dis*, 19(1), 6-11.
- Cowen, B. S., & Hitchner, S. B. (1975). Serotyping of avian infectious bronchitis viruses by the virus-neutralization test. *Avian Dis*, 19(3), 583-595.
- Crinion, R. A., & Hofstad, M. S. (1972). Pathogenicity of two embryo-passage levels of avian infectious bronchitis virus for the oviduct of young chickens of various ages. *Avian diseases*, 16(5), 967-973.
- Cubillos, A., Ulloa, J., Cubillos, V., & Cook, J. K. (1991). Characterization of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. *Avian Pathol*, 20(1), 85-99. doi:10.1080/03079459108418744
- Cunningham, C. H. (1960). *A Laboratory Guide in Virology*: Burgess Publishing Company.
- Dai, J., Wang, H., Liao, Y., Tan, L., Sun, Y., Song, C., Liu, W., Ding, C., Luo, T., & Qiu, X. (2022). Non-Targeted Metabolomic Analysis of Chicken Kidneys in Response to Coronavirus IBV Infection Under Stress Induced by Dexamethasone. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 945865. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.945865>
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., . . . Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*, 10(2). doi:10.1093/gigascience/giab008
- Dawson, P. S., & Gough, R. E. (1971). Antigenic variation in strains of avian infectious bronchitis virus. *Arch Gesamte Virusforsch*, 34(1), 32-39. doi:10.1007/bf01250243
- da Silva, A. P., Giroux, C., Sellers, H. S., Mendoza-Reilly, A., Stoute, S., & Gallardo, R. A. (2021). Characterization of an Infectious Bronchitis Virus Isolated from Commercial Layers Suffering from False Layer Syndrome. *Avian diseases*, 65(3), 373-380. <https://doi.org/10.1637/aviandiseases-D-21-00037>

- de Wit, D. R. Mekkes, B. Kouwenhoven & J. H. M. Verheijden (1997) Sensitivity and specificity of serological tests for infectious bronchitis virus antibodies in broilers, *Avian Pathology*, 26:1, 105-118, DOI: 10.1080/03079459708419198
- de Wit, J. J., Swart, W. A., & Fabri, T. H. (2010). Efficacy of infectious bronchitis virus vaccinations in the field: association between the alpha-IBV IgM response, protection, and vaccine application parameters. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.*, 39(2), 123–131. <https://doi.org/10.1080/03079451003604639>
- de Wit, J. J., Cook, J. K., & van der Heijden, H. M. (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation, and control measures. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.*, 40(3), 223–235. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.566260>
- de Wit, G. J. Boelm, T. J. W. M. van Gerwe & W. A. J. M. Swart (2013) The required sample size in vaccination-challenge experiments with infectious bronchitis virus, a meta-analysis, *Avian Pathology*, 42:1, 9-16, DOI: 10.1080/03079457.2012.751485
- de Wit, J. J., & Cook, J. K. (2014). Factors influencing the outcome of infectious bronchitis vaccination and challenge experiments. *Avian Pathol*, 43(6), 485-497. doi:10.1080/03079457.2014.974504
- 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 Pathol*, 46(6), 666-675. doi:10.1080/03079457.2017.1346782
- Delaplane, J. P., & Stuart, H. O. (1941). *The Modification of Infectious Bronchitis Virus of Chickens as the Result of Propagation in Embryonated Chicken Eggs*: Agricultural Experiment Station of the Rhode Island State College.
- Di Fabio, J., Rossini, L. I., Orbell, S. J., Paul, G., Huggins, M. B., Malo, A., Silva, B. G., & Cook, J. K. (2000). Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. *Avian diseases*, 44(3), 582–589.
- Dolz, R., Vergara-Alert, J., Pérez, M., Pujols, J., & Majó, N. (2012). New insights on infectious bronchitis virus pathogenesis: characterization of Italy 02 serotype in chicks and adult hens. *Vet Microbiol*, 156(3-4), 256-264. doi:10.1016/j.vetmic.2011.11.001
- Domingo, E., & Gomez, J. (2007). Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus research*, 127(2), 131–150. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.02.001>
- Domingo E, Escarmis C, Menendez-Arias L, Perales C, Herrerra M, Novella I, Holland J (2008). Chapter4: “Viral quasispecies: Dynamics Interaction, and Pathogenesis”. In: *Origin and Evolution of Viruses*. 2 ed. Academic press; p 87-118.

- Doyle, N., Neuman, B. W., Simpson, J., Hawes, P. C., Mantell, J., Verkade, P., Alrashedi, H., & Maier, H. J. (2018). Infectious Bronchitis Virus Nonstructural Protein 4 Alone Induces Membrane Pairing. *Viruses*, 10(9), 477. <https://doi.org/10.3390/v10090477>
- Dufour-Zavala, L. (2008). *A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens*: American Association of Avian Pathologists.
- Dwars, R. M., Matthijs, M. G., Daemen, A. J., van Eck, J. H., Vervelde, L., & Landman, W. J. (2009). Progression of lesions in the respiratory tract of broilers after single infection with *Escherichia coli* compared to superinfection with *E. coli* after infection with infectious bronchitis virus. *Veterinary immunology and immunopathology*, 127(1-2), 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.09.019>
- Eigen, M. (1993). Viral quasispecies. *Sci Am*, 269(1), 42-49. doi:10.1038/scientificamerican0793-42
- Eigen, M. (1996). On the nature of virus quasispecies. *Trends Microbiol*, 4(6), 216-218. doi:10.1016/0966-842x(96)20011-3
- Eldemery, F., Joiner, K. S., Toro, H., & Van Santen, V. L. (2017). Protection against infectious bronchitis virus by spike ectodomain subunit vaccine. *Vaccine*, 35(43), 5864-5871. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.013>
- Elena, S. F., Agudelo-Romero, P., & Lalić, J. (2009). The evolution of viruses in multi-host fitness landscapes. *Open Virol J*, 3, 1-6. doi:10.2174/1874357900903010001
- Enjuanes, L., Sola, I., Zuñiga, S., Moreno, J., & Thiel, V. (2007). *Coronaviruses: Molecular and Cellular Biology*.
- Estola, T. (1966). Studies on the infectious bronchitis virus of chickens isolated in Finland, with reference to the serological survey of its occurrence.
- Fabrega, C., Hausmann, S., Shen, V., Shuman, S., & Lima, C. D. (2004). Structure and mechanism of mRNA cap (guanine-N7) methyltransferase. *Mol Cell*, 13(1), 77-89. doi:10.1016/s1097-2765(03)00522-7
- Fabricant, J. (1949). *Studies on the Diagnosis of Newcastle Disease and Infectious Bronchitis of Fowls*. Cornell University.
- Fabricant, J. (1951). Studies on the diagnosis of Newcastle disease and infectious bronchitis. IV. The use of the serum neutralization test in the diagnosis of infectious bronchitis. *Cornell Vet*, 41(1), 68-80.
- Fan, Y., Zhao, K., Shi, Z. L., & Zhou, P. (2019). Bat Coronaviruses in China. *Viruses*, 11(3). doi:10.3390/v11030210

- Fang, S., Chen, B., Tay, F. P., Ng, B. S., & Liu, D. X. (2007). An arginine-to-proline mutation in a domain with undefined functions within the helicase protein (Nsp13) is lethal to the coronavirus infectious bronchitis virus in cultured cells. *Virology*, 358(1), 136-147. doi:10.1016/j.virol.2006.08.020
- Fechter, P., & Brownlee, G. G. (2005). Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins. *J Gen Virol*, 86(Pt 5), 1239-1249. doi:10.1099/vir.0.80755-0
- Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol*, 1282, 1-23. doi:10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Feng, K., Xue, Y., Wang, J., Chen, W., Chen, F., Bi, Y., & Xie, Q. (2015). Development and efficacy of a novel live-attenuated QX-like nephropathogenic infectious bronchitis virus vaccine in China. *Vaccine*, 33(9), 1113-1120. doi:10.1016/j.vaccine.2015.01.036
- Frieman, M., Yount, B., Heise, M., Kopecky-Bromberg, S. A., Palese, P., & Baric, R. S. (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane. *J Virol*, 81(18), 9812-9824. doi:10.1128/jvi.01012-07
- Fischer, F., Stegen, C. F., Masters, P. S., & Samsonoff, W. A. (1998). Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus assembly. *J Virol*, 72(10), 7885-7894. doi:10.1128/jvi.72.10.7885-7894.1998
- Flint, S. J., Racaniello, V. R., Rall, G. F., Enquist, L. W., & Skalka, A. M. (2015). *Principles of Virology*: ASM Press.
- Franzo, G., Cecchinato, M., Tosi, G., Fiorentini, L., Faccin, F., Tucciarone, C. M., Trogu, T., Barbieri, I., Massi, P., & Moreno, A. (2018). GI-16 lineage (624/I or Q1), there and back again: The history of one of the major threats for poultry farming of our era. *PloS one*, 13(12), e0203513. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203513>
- Gallardo, R. A., Aleuy, O. A., Pitesky, M., Senties-Cué, G., Abdelnabi, A., Woolcock, P. R., Hauck, R., & Toro, H. (2016). Variability Assessment of California Infectious Bronchitis Virus Variants. *Avian diseases*, 60(2), 424-429. <https://doi.org/10.1637/11294-100615-Reg>
- Gao, B., Gong, X., Fang, S., Weng, W., Wang, H., Chu, H., Sun, Y., Meng, C., Tan, L., Song, C., Qiu, X., Liu, W., Forlenza, M., Ding, C., & Liao, Y. (2021). Inhibition of anti-viral stress granule formation by coronavirus endoribonuclease nsp15 ensures efficient virus replication. *PLoS pathogens*, 17(2), e1008690. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008690>

- Ganapathy, K., Ball, C., & Forrester, A. (2015). Genotypes of infectious bronchitis viruses circulating in the Middle East between 2009 and 2014. *Virus Res*, *210*, 198-204. doi:10.1016/j.virusres.2015.07.019
- García, A. N., M (1969). Diagnóstico preliminar de bronquitis infecciosa en Chile. *Rev. Soc. Med. Vet. Chile*, *19*, 27-33.
- Geilhausen, H. E., Ligon, F. B., & Lukert, P. D. (1973). The pathogenesis of virulent and avirulent avian infectious bronchitis virus. *Arch Gesamte Virusforsch*, *40*(3), 285-290. doi:10.1007/bf01242547
- Gelb, J., Jr., Perkins, B. E., Rosenberger, J. K., & Allen, P. H. (1981). Serologic and cross-protection studies with several infectious bronchitis virus isolates from Delmarva-reared broiler chickens. *Avian Dis*, *25*(3), 655-666.
- Gerez, R., Marandino, A., Tomas, G., Olivera, V., Pinto, S., Craig, M. I., Techera, C., Perez, R., & Vagnozzi, A. (2021). Evaluation of the Efficiency of Commercial Vaccines Against Infectious Bronchitis Virus (IBV) Belonging to the GI-16 Lineage Isolated in an Argentinean Outbreak. *Avian diseases*, *65*(3), 456–462. <https://doi.org/10.1637/0005-2086-65.3.456>
- Giardine, B., Riemer, C., Hardison, R. C., Burhans, R., Elnitski, L., Shah, P., Zhang, Y., Blankenberg, D., Albert, I., Taylor, J., Miller, W., Kent, W. J., & Nekrutenko, A. (2005). Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome research*, *15*(10), 1451–1455. <https://doi.org/10.1101/gr.4086505>
- Gillette, K. G. (1973). Plaque Formation by Infectious Bronchitis Virus in Chicken Embryo Kidney Cell Cultures. *Avian Diseases*, *17*(2), 369-378. doi:10.2307/1589221
- Glahn, R. P., Wideman, R. F., Jr., & Cowen, B. S. (1989). The order of exposure to high dietary calcium and gray strain infectious bronchitis virus alters renal function and the incidence of urolithiasis. *Poult Sci*, *68*(9), 1193-1204. doi:10.3382/ps.0681193
- Goecks, J., Nekrutenko, A., & Taylor, J. (2010). Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol*, *11*(8), R86. doi:10.1186/gb-2010-11-8-r86
- Gu, H., Chen, Q., Yang, G., He, L., Fan, H., Deng, Y. Q., Wang, Y., Teng, Y., Zhao, Z., Cui, Y., Li, Y., Li, X. F., Li, J., Zhang, N. N., Yang, X., Chen, S., Guo, Y., Zhao, G., Wang, X., Luo, D. Y., ... Zhou, Y. (2020). Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy. *Science (New York, N.Y.)*, *369*(6511), 1603–1607.
- Guzmán, M. (2019). *Evaluación de la introducción de una Vacuna Viva Atenuada Sobre las Cepas de Campo del Virus Bronquitis Infecciosa (IBV) en Planteles de Producción Avícola (PhD. Thesis)*. Universidad de Chile,

- Guzmán, M., Sáenz, L., & Hidalgo, H. (2019). Molecular and Antigenic Characterization of GI-13 and GI-16 Avian Infectious Bronchitis Virus Isolated in Chile from 2009 to 2017 Regarding 4/91 Vaccine Introduction. *Animals (Basel)*, *9*(9). doi:10.3390/ani9090656
- Hanada, K., Suzuki, Y., & Gojobori, T. (2004). A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. *Mol Biol Evol*, *21*(6), 1074-1080. doi:10.1093/molbev/msh109
- Hanley, K. A. (2011). The double-edged sword: How evolution can make or break a live-attenuated virus vaccine. *Evolution (N Y)*, *4*(4), 635-643. doi:10.1007/s12052-011-0365-y
- Hidalgo, H., Gallardo, R., & Rosende, S. (1976). Isolation of Infectious Bronchitis Virus from Broiler Chickens in Chile. *Avian Diseases*, *20*(3), 601-603. doi:10.2307/1589395
- Hidalgo, H., Gallardo, R., & Toro, H. (1986). Antigenic and pathogenic properties of 3 isolates of infectious bronchitis virus recovered from inoculated birds. *Zentralbl Veterinarmed B*, *33*(1), 26-35.
- Hipólito, O., Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. *Arq. Esc. Superior Vet. UREMG* 1957; 10: 131-150. (1957).
- Hodgson, T., Britton, P., & Cavanagh, D. (2006). Neither the RNA nor the proteins of open reading frames 3a and 3b of the coronavirus infectious bronchitis virus are essential for replication. *J Virol*, *80*(1), 296-305. doi:10.1128/jvi.80.1.296-305.2006
- Hoerr, F. J. (2021). The Pathology of Infectious Bronchitis. *Avian Dis*, *65*(4), 600-611. doi:10.1637/aviandiseases-D-21-00096
- Hosseini, H., Fard, M. H., Charkhkar, S., & Morshed, R. (2015). Epidemiology of Avian Infectious Bronchitis Virus Genotypes in Iran (2010-2014). *Avian Dis*, *59*(3), 431-435. doi:10.1637/11091-041515-ResNote.1
- Hsu, J. C., Laurent-Rolle, M., Pawlak, J. B., Wilen, C. B., & Cresswell, P. (2021). Translational shutdown and evasion of the innate immune response by SARS-CoV-2 NSP14 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *118*(24). doi:10.1073/pnas.2101161118
- Hu, T., Chen, C., Li, H., Dou, Y., Zhou, M., Lu, D., Zong, Q., Li, Y., Yang, C., Zhong, Z., Singh, N., Hu, H., Zhang, R., Yang, H., & Su, D. (2017). Structural basis for dimerization and RNA binding of avian infectious bronchitis virus nsp9. *Protein science : a publication of the Protein Society*, *26*(5), 1037–1048. <https://doi.org/10.1002/pro.3150>
- Huang, Q., Yu, L., Petros, A. M., Gunasekera, A., Liu, Z., Xu, N., Hajduk, P., Mack, J., Fesik, S. W., & Olejniczak, E. T. (2004). Structure of the N-terminal RNA-binding domain of the SARS CoV nucleocapsid protein. *Biochemistry*, *43*(20), 6059–6063. <https://doi.org/10.1021/bi036155b>

- Ignjatovic, J., & Galli, L. (1994). The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. *Arch Virol*, *138*(1-2), 117-134. doi:10.1007/bf01310043
- Jackwood, M. W., Hilt, D. A., & Brown, T. P. (2003). Attenuation, safety, and efficacy of an infectious bronchitis virus GA98 serotype vaccine. *Avian Dis*, *47*(3), 627-632. doi:10.1637/6094
- Jackwood M, de Witt S. (2013). Infectious Bronchitis. In: Swayne D, Glisson J, McDougald L, Nolan L, Suarez D, Nair V, editors. *Diseases of Poultry*. 13 ed. Ames: Wiley-Balckwell; p 139-59.
- Jackwood, M. W., Jordan, B. J., Roh, H. J., Hilt, D. A., & Williams, S. M. (2015). Evaluating Protection Against Infectious Bronchitis Virus by Clinical Signs, Ciliostasis, Challenge Virus Detection, and Histopathology. *Avian Dis*, *59*(3), 368-374. doi:10.1637/11026-012415-Reg.1
- Jackwood, M. W., & Lee, D. H. (2017). Different evolutionary trajectories of vaccine-controlled and non-controlled avian infectious bronchitis viruses in commercial poultry. *PLoS One*, *12*(5), e0176709. doi:10.1371/journal.pone.0176709
- Jackwood, M. W., & de Wit, S. (2020). Infectious Bronchitis. In *Diseases of Poultry* (pp. 167-188).
- Jia, W., Wang, X., Parrish, C. R., & Naqi, S. A. (1996). Analysis of the serotype-specific epitopes of avian infectious bronchitis virus strains Ark99 and Mass41. *J Virol*, *70*(10), 7255-7259. doi:10.1128/jvi.70.10.7255-7259.1996
- Jiang, Y., Cheng, X., Zhao, X., Yu, Y., Gao, M., & Zhou, S. (2020). Recombinant infectious bronchitis coronavirus H120 with the spike protein S1 gene of the nephropathogenic IBYZ strain remains attenuated but induces protective immunity. *Vaccine*, *38*(15), 3157-3168. doi:10.1016/j.vaccine.2020.01.001
- Johnson, R. B., & Marquardt, W. W. (1976). New strains of infectious bronchitis virus isolated in Maine. *Avian Dis*, *20*(1), 173-178.
- Jones, R. C. (1976). The isolation and some biological properties of a variant avian infectious bronchitis virus. *Vet Rec*, *98*(14), 278-279. doi:10.1136/vr.98.14.278
- Jones, R. C., & Ambali, A. G. (1987). Re-excretion of an enterotropic infectious bronchitis virus by hens at point of lay after experimental infection at day old. *Vet Rec*, *120*(26), 617-618. doi:10.1136/vr.120.26.617
- Jordan, B. (2017). Vaccination against infectious bronchitis virus: A continuous challenge. *Vet Microbiol*, *206*, 137-143. doi:10.1016/j.vetmic.2017.01.002

- Jungherr, E., Chomiak, T., & Luginbuhl, R. (1957). Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. *Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus*.
- Kapczynski, D. R., Hilt, D. A., Shapiro, D., Sellers, H. S., & Jackwood, M. W. (2003). Protection of chickens from infectious bronchitis by in ovo and intramuscular vaccination with a DNA vaccine expressing the S1 glycoprotein. *Avian Dis*, 47(2), 272-285. doi:10.1637/0005-2086(2003)047[0272:Pocfib]2.0.Co;2
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*, 30(4), 772-780. doi:10.1093/molbev/mst010
- Kint, J., Dickhout, A., Kutter, J., Maier, H. J., Britton, P., Koumans, J., Pijlman, G. P., Fros, J. J., Wiegertjes, G. F., & Forlenza, M. (2015). Infectious Bronchitis Coronavirus Inhibits STAT1 Signaling and Requires Accessory Proteins for Resistance to Type I Interferon Activity. *Journal of virology*, 89(23), 12047–12057. <https://doi.org/10.1128/JVI.01057-15>
- Kint, J., Fernandez-Gutierrez, M., Maier, H. J., Britton, P., Langereis, M. A., Koumans, J., Wiegertjes, G. F., & Forlenza, M. (2015). Activation of the chicken type I interferon response by infectious bronchitis coronavirus. *Journal of virology*, 89(2), 1156–1167. <https://doi.org/10.1128/JVI.02671-14>
- Kint, J., Langereis, M. A., Maier, H. J., Britton, P., van Kuppeveld, F. J., Koumans, J., Wiegertjes, G. F., & Forlenza, M. (2016). Infectious Bronchitis Coronavirus Limits Interferon Production by Inducing a Host Shutoff That Requires Accessory Protein 5b. *Journal of virology*, 90(16), 7519–7528. <https://doi.org/10.1128/JVI.00627-16>
- Koch, G., Hartog, L., Kant, A., & van Roozelaar, D. J. (1990). Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. *J Gen Virol*, 71 (Pt 9), 1929-1935. doi:10.1099/0022-1317-71-9-1929.
- Kotani, T., Shiraishi, Y., Tsukamoto, Y., Kuwamura, M., Yamate, J., Sakuma, S., & Gohda, M. (2000). Epithelial cell kinetics in the inflammatory process of chicken trachea infected with infectious bronchitis virus. *The Journal of veterinary medical science*, 62(2), 129–134. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.129>
- Laconi, A., Listorti, V., Franzo, G., Cecchinato, M., Naylor, C., Lupini, C., & Catelli, E. (2019). Molecular characterization of whole genome sequence of infectious bronchitis virus 6241 genotype confirms the close relationship with Q1 genotype. *Transbound Emerg Dis*, 66(1), 207-216. doi:10.1111/tbed.13000
- Laconi, A., van Beurden, S. J., Berends, A. J., Krämer-Kühl, A., Jansen, C. A., Spekrijse, D., Chénard, G., Philipp, H. C., Mundt, E., Rottier, P. J. M., & Hélène Verheije, M. (2018).

- Deletion of accessory genes 3a, 3b, 5a or 5b from avian coronavirus infectious bronchitis virus induces an attenuated phenotype both in vitro and in vivo. *The Journal of general virology*, 99(10), 1381–1390. Advance online publication. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001130>
- Lai, M. M., & Cavanagh, D. (1997). The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res*, 48, 1-100. doi:10.1016/s0065-3527(08)60286-9
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357-359. doi:10.1038/nmeth.1923
- Lamm, M. E. (1997). Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol*, 51, 311-340. doi:10.1146/annurev.micro.51.1.311
- Lee, C. W., Hilt, D. A., & Jackwood, M. W. (2001). Identification and analysis of the Georgia 98 serotype, a new serotype of infectious bronchitis virus. *Avian Dis*, 45(1), 164-172.
- Legnardi, M., Tucciarone, C. M., Franzo, G., & Cecchinato, M. (2020). Infectious Bronchitis Virus Evolution, Diagnosis and Control. *Veterinary sciences*, 7(2), 79. <https://doi.org/10.3390/vetsci7020079>
- Letunic, I., & Bork, P. (2007). Interactive Tree of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, 23(1), 127-128. doi:10.1093/bioinformatics/btl529
- Liu, L. (2014). Fields Virology, 6th Edition. *Clinical Infectious Diseases*, 59(4), 613-613. doi:10.1093/cid/ciu346
- Liu, S., Zhang, Q., Chen, J., Han, Z., Shao, Y., Kong, X., & Tong, G. (2008). Identification of the avian infectious bronchitis coronaviruses with mutations in gene 3. *Gene*, 412(1-2), 12-25. doi:10.1016/j.gene.2008.01.004
- Li, W., Zhang, C., Sui, J., Kuhn, J. H., Moore, M. J., Luo, S., Wong, S. K., Huang, I. C., Xu, K., Vasilieva, N., Murakami, A., He, Y., Marasco, W. A., Guan, Y., Choe, H., & Farzan, M. (2005). Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *The EMBO journal*, 24(8), 1634–1643. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600640>
- Liu, S., Zhang, X., Gong, L., Yan, B., Li, C., Han, Z., Shao, Y., Li, H., & Kong, X. (2009). Altered pathogenicity, immunogenicity, tissue tropism and 3'-7kb region sequence of an avian infectious bronchitis coronavirus strain after serial passage in embryos. *Vaccine*, 27(34), 4630–4640. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.05.072>
- Lu, X., Pan, J., Tao, J., & Guo, D. (2011). SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN- β response by targeting initial step of IFN- β induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism. *Virus Genes*, 42(1), 37-45. doi:10.1007/s11262-010-0544-x

- Lukert, P. D. (1966). Immunofluorescence of avian infectious bronchitis virus in primary chicken embryo kidney, liver, lung, and fibroblast cell cultures. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 19(3), 265-272. doi:10.1007/BF01241849
- Ma, H., Bell, K. N., & Loker, R. N. (2020). qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, 20, 152–168. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007>
- Marandino, A. (2018). *Caracterización genética y antigénica de las cepas del virus de la bronquitis infecciosa aviar circulantes en la industria avícola regional*. (Doctor en Ciencias Biológicas). Universidad de la República., Uruguay. Retrieved from <https://hdl.handle.net/20.500.12008/23269>
- Marandino, A., Pereda, A., Tomás, G., Hernández, M., Iraola, G., Craig, M. I., . . . Pérez, R. (2015). Phylodynamic analysis of avian infectious bronchitis virus in South America. *J Gen Virol*, 96(Pt 6), 1340-1346. doi:10.1099/vir.0.000077
- Marandino, A., Vagnozzi, A., Craig, M. I., Tomás, G., Techera, C., Panzera, Y., . . . Pérez, R. (2019). Genetic and antigenic heterogeneity of infectious bronchitis virus in South America: implications for control programmes. *Avian Pathol*, 48(3), 270-277. doi:10.1080/03079457.2019.1583315
- Marandino, A., Tomás, G., Panzera, Y., Greif, G., Parodi-Talice, A., Hernández, M., . . . Pérez, R. (2017). Whole-genome characterization of Uruguayan strains of avian infectious bronchitis virus reveals extensive recombination between the two major South American lineages. *Infect Genet Evol*, 54, 245-250. doi:10.1016/j.meegid.2017.07.009
- Marandino, A., Vagnozzi, A., Tomás, G., Techera, C., Gerez, R., Hernández, M., . . . Pérez, R. (2022). Origin of New Lineages by Recombination and Mutation in Avian Infectious Bronchitis Virus from South America. *Viruses*, 14(10). doi:10.3390/v14102095
- Mardani, K., Noormohammadi, A. H., Ignjatovic, J., & Browning, G. F. (2010). Naturally occurring recombination between distant strains of infectious bronchitis virus. *Arch Virol*, 155(10), 1581-1586. doi:10.1007/s00705-010-0731-z
- Marquardt, W. W., Snyder, D. B., & Schlotthober, B. A. (1981). Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian diseases*, 25(3), 713–722.
- McKinley, E. T., Jackwood, M. W., Hilt, D. A., Kissinger, J. C., Robertson, J. S., Lemke, C., & Paterson, A. H. (2011). Attenuated live vaccine usage affects accurate measures of virus

- diversity and mutation rates in avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virus Res*, 158(1-2), 225-234. doi:10.1016/j.virusres.2011.04.006
- Mielech, A. M., Chen, Y., Mesecar, A. D., & Baker, S. C. (2014). Nidovirus papain-like proteases: multifunctional enzymes with protease, deubiquitinating and deISGylating activities. *Virus Res*, 194, 184-190. doi:10.1016/j.virusres.2014.01.025
- Miller, K., McGrath, M. E., Hu, Z., Ariannejad, S., Weston, S., Frieman, M., & Jackson, W. T. (2020). Coronavirus interactions with the cellular autophagy machinery. *Autophagy*, 16(12), 2131-2139. doi:10.1080/15548627.2020.1817280
- Milne, I., Stephen, G., Bayer, M., Cock, P. J., Pritchard, L., Cardle, L., Shaw, P. D., & Marshall, D. (2012). Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Briefings in bioinformatics*, 14(2), 193–202. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs012>
- Ministerio de Agricultura, G. y. P. A. (2022). Carne Aviar, Informacion Estadística. Retrieved from <https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/aves/estadistica/carne/index.php>
- Mo, J., Angelichio, M., Gow, L., Leathers, V., & Jackwood, M. W. (2020). Validation of specific quantitative real-time RT-PCR assay panel for Infectious Bronchitis using synthetic DNA standards and clinical specimens. *Journal of virological methods*, 276, 113773. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113773>
- Mockett, A. P., & Darbyshire, J. H. (1981). Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/03079458108418453>
- Moore, K. M., Jackwood, M. W., & Hilt, D. A. (1997). Identification of amino acids involved in a serotype and neutralization specific epitope within the s1 subunit of avian infectious bronchitis virus. *Arch Virol*, 142(11), 2249-2256. doi:10.1007/s007050050239
- MOTIVAR, revista (2017). Producción Avícola en Argentina. <https://motivar.com.ar/2017/06/produccion-avicola-en-argentina/>
- Naguib, M. M., Höper, D., Arafa, A. S., Setta, A. M., Abed, M., Monne, I., Beer, M., & Harder, T. C. (2016). Full genome sequence analysis of a newly emerged QX-like infectious bronchitis virus from Sudan reveals distinct spots of recombination. *Infection, genetics, and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 46, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.01>
- Naqi, S., Gay, K., Patalla, P., Mondal, S., & Liu, R. (2003). Establishment of persistent avian infectious bronchitis virus infection in antibody-free and antibody-positive chickens. *Avian Dis*, 47(3), 594-601. doi:10.1637/6087

- Neuman, B. W., Joseph, J. S., Saikatendu, K. S., Serrano, P., Chatterjee, A., Johnson, M. A., Liao, L., Klaus, J. P., Yates, J. R., 3rd, Wüthrich, K., Stevens, R. C., Buchmeier, M. J., & Kuhn, P. (2008). Proteomics analysis unravels the functional repertoire of coronavirus nonstructural protein 3. *Journal of virology*, 82(11), 5279–5294.
- Neuman, B. W., Kiss, G., Kunding, A. H., Bhella, D., Baksh, M. F., Connelly, S., Droese, B., Klaus, J. P., Makino, S., Sawicki, S. G., Siddell, S. G., Stamou, D. G., Wilson, I. A., Kuhn, P., & Buchmeier, M. J. (2011). A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of structural biology*, 174(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.11.021>
- Niesters, H. G., Bleumink-Pluym, N. M., Osterhaus, A. D., Horzinek, M. C., & van der Zeijst, B. A. (1987). Epitopes on the peplomer protein of infectious bronchitis virus strain M41 as defined by monoclonal antibodies. *Virology*, 161(2), 511-519. doi:10.1016/0042-6822(87)90145-0
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2014). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268-274. doi:10.1093/molbev/msu300
- Novella, I. S., Gilbertson, D. L., Borrego, B., Domingo, E., & Holland, J. J. (2005). Adaptability costs in immune escape variants of vesicular stomatitis virus. *Virus research*, 107(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.06.007>
- Oade, M. S., Keep, S., Freimanis, G. L., Orton, R. J., Britton, P., Hammond, J. A., & Bickerton, E. (2019). Attenuation of Infectious Bronchitis Virus in Eggs Results in Different Patterns of Genomic Variation across Multiple Replicates. *J Virol*, 93(14). doi:10.1128/jvi.00492-19
- Ogando, N. S., Zevenhoven-Dobbe, J. C., van der Meer, Y., Bredenbeek, P. J., Posthuma, C. C., & Snijder, E. J. (2020). The Enzymatic Activity of the nsp14 Exoribonuclease Is Critical for Replication of MERS-CoV and SARS-CoV-2. *J Virol*, 94(23). doi:10.1128/jvi.01246-20
- OIE. 2013. Chapter 2.3.2. Avian Infectious Bronchitis. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2013. In OIE terrestrial manual 2013, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf (2013).
- Ojha, N. K., Liu, J., Yu, T., Fang, C., Zhou, J., & Liao, M. (2021). Interplay of the ubiquitin proteasome system and the innate immune response is essential for the replication of infectious bronchitis virus. *Arch Virol*, 166(8), 2173-2185. doi:10.1007/s00705-021-05073-3
- Otsuki, K., Sakagami, Y., & Tsubokura, M. (1987). Serological relationship among ten strains of avian infectious bronchitis virus. *Acta Virol*, 31(2), 138-145.

- Ovchinnikova, E. V., Bochkov, Y. A., Shcherbakova, L. O., Nikonova, Z. B., Zinyakov, N. G., Elatkin, N. P., Mudrak, N. S., Borisov, A. V., & Drygin, V. V. (2011). Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates from Russia and neighbouring countries: identification of intertypic recombination in the S1 gene. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.*, 40(5), 507–514. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.605782>
- Peng S, Wang Y, Zhang Y, Song X, Zou Y, Li L, Zhao X, Yin Z. Current Knowledge on Infectious Bronchitis Virus Non-structural Proteins: The Bearer for Achieving Immune Evasion Function. *Front Vet Sci.* 2022 Apr 8;9:820625. doi: 10.3389/fvets.2022.820625. PMID: 35464391; PMCID: PMC9024134.
- Pharmacopoeia, E. (2013). *Council of Europe, European Pharmacopoeia* (8th ed. Vol. 1)
- Phillips, J. E., Jackwood, M. W., McKinley, E. T., Thor, S. W., Hilt, D. A., Acevedol, N. D., Williams, S. M., Kissinger, J. C., Paterson, A. H., Robertson, J. S., & Lemke, C. (2012). Changes in nonstructural protein 3 are associated with attenuation in avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virus genes*, 44(1), 63–74. <https://doi.org/10.1007/s11262-011-0668-7>
- Raamsman, M. J., Locker, J. K., de Hooge, A., de Vries, A. A., Griffiths, G., Vennema, H., & Rottier, P. J. (2000). Characterization of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 small membrane protein E. *J Virol*, 74(5), 2333-2342. doi:10.1128/jvi.74.5.2333-2342.2000
- Raj, G. D., & Jones, R. C. (1997). Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathol*, 26(4), 677-706. doi:10.1080/03079459708419246
- Reddy, V. R., Trus, I., Desmarets, L. M., Li, Y., Theuns, S., & Nauwynck, H. J. (2016). Productive replication of nephropathogenic infectious bronchitis virus in peripheral blood monocytic cells, a strategy for viral dissemination and kidney infection in chickens. *Vet Res*, 47(1), 70. doi:10.1186/s13567-016-0354-9
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493-497. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
- Riddell, C. 1987. *Avian Histopathology*. American Association of Avian Pathology, Kennett Square, PA, USA.
- Rimondi, A., Craig, M. I., Vagnozzi, A., König, G., Delamer, M., & Pereda, A. (2009). Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001-2008). *Avian Pathol*, 38(2), 149-153. doi:10.1080/03079450902737821
- Romero, G. (2019). Estudio comparativo de la patogenia entre el linaje sudamericano y la cepa clásica del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa. (Licenciatura en Biotecnología). Universidad Nacional de San Martín., Argentina.

- Rohaim, M. A., El Naggar, R. F., Abdelsabour, M. A., Mohamed, M. H. A., El-Sabagh, I. M., & Munir, M. (2020). Evolutionary Analysis of Infectious Bronchitis Virus Reveals Marked Genetic Diversity and Recombination Events. *Genes*, *11*(6), 605. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4425/11/6/605>
- Rosas-Lemus, M., Minasov, G., Shuvalova, L., Inniss, N. L., Kiryukhina, O., Wiersum, G., Kim, Y., Jedrzejczak, R., Maltseva, N. I., Endres, M., Jaroszewski, L., Godzik, A., Joachimiak, A., & Satchell, K. J. F. (2020). The crystal structure of nsp10-nsp16 heterodimer from SARS-CoV-2 in complex with S-adenosylmethionine. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2020.04.17.047498. <https://doi.org/10.1101/2020.04.17.047498>
- Satarker, S., & Nampoothiri, M. (2020). Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *Arch Med Res*, *51*(6), 482-491. doi:10.1016/j.arcmed.2020.05.012
- Sawicki, S. G., & Sawicki, D. L. (1995). Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv Exp Med Biol*, *380*, 499-506. doi:10.1007/978-1-4615-1899-0_79
- Schalk, A. F. (1931). An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, *78*, 413-423.
- Shaw, N., Ouyang, S., & Liu, Z. J. (2013). Binding of bacterial secondary messenger molecule c di-GMP is a STING operation. *Protein Cell*, *4*(2), 117-129. doi:10.1007/s13238-012-2071-0
- Silva, E. A. A. d. (2010). Infectious bronchitis in Brazilian chickens: current data and observations of field service personnel. *Brazilian Journal of Poultry Science*, *12*, 197-203.
- Siu, Y. L., Teoh, K. T., Lo, J., Chan, C. M., Kien, F., Escriou, N., Tsao, S. W., Nicholls, J. M., Altmeyer, R., Peiris, J. S., Bruzzone, R., & Nal, B. (2008). The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles. *Journal of virology*, *82*(22), 11318–11330. <https://doi.org/10.1128/JVI.01052-08>
- Snijder, E. J., Decroly, E., & Ziebuhr, J. (2016). The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. *Adv Virus Res*, *96*, 59-126. doi:10.1016/bs.aivir.2016.08.008
- Sjaak de Wit, J. J., Cook, J. K., & van der Heijden, H. M. (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation, and control measures. *Avian Pathol*, *40*(3), 223-235. doi:10.1080/03079457.2011.566260
- Smitsaart, T. E., Polero de Muslera, B., & Kasar, K. (1965). Verification of AE in Argentina. *Rev. Invest. Agropecuar. Ser. 4, Patol. Anim* *2*:53-62.

- Stern, D. F., Burgess, L., & Sefton, B. M. (1982). Structural analysis of virion proteins of the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol*, *42*(1), 208-219. doi:10.1128/jvi.42.1.208-219.1982
- Subissi, L., Imbert, I., Ferron, F., Collet, A., Coutard, B., Decroly, E., & Canard, B. (2014). SARS-CoV ORF1b-encoded nonstructural proteins 12-16: replicative enzymes as antiviral targets. *Antiviral Res*, *101*, 122-130. doi:10.1016/j.antiviral.2013.11.006
- Subissi, L., Posthuma, C. C., Collet, A., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Gorbalenya, A. E., Decroly, E., Snijder, E. J., Canard, B., & Imbert, I. (2014). One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(37), E3900–E3909. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323705111>
- Sun, X., Quan, L., Chen, R., & Liu, D. (2022). Direct Interaction of Coronavirus Nonstructural Protein 3 with Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Modulates Type I Interferon Response during Coronavirus Infection. *International journal of molecular sciences*, *23*(19), 11692. <https://doi.org/10.3390/ijms231911692>
- Surjit, M., Liu, B., Chow, V. T., & Lal, S. K. (2006). The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome-coronavirus inhibits the activity of cyclin-cyclin-dependent kinase complex and blocks S phase progression in mammalian cells. *J Biol Chem*, *281*(16), 10669-10681. doi:10.1074/jbc.M509233200
- Sutton, T. C., & Subbarao, K. (2015). Development of animal models against emerging coronaviruses: From SARS to MERS coronavirus. *Virology*, *479-480*, 247-258. doi:10.1016/j.virol.2015.02.030
- Tan, Y. W., Fung, T. S., Shen, H., Huang, M., & Liu, D. X. (2018). Coronavirus infectious bronchitis virus non-structural proteins 8 and 12 form stable complex independent of the non-translated regions of viral RNA and other viral proteins. *Virology*, *513*, 75-84. doi:10.1016/j.virol.2017.10.004
- Tang, M., Wang, H., Zhou, S., & Tian, G. (2008). Enhancement of the immunogenicity of an infectious bronchitis virus DNA vaccine by a bicistronic plasmid encoding nucleocapsid protein and interleukin 2. *J Virol Methods*, *149*(1), 42-48. doi:10.1016/j.jviromet.2008.01.017
- Tataje-Lavanda, L., Izquierdo-Lara, R., Ormeño-Vásquez, P., Huamán-Gutiérrez, K., Zimic-Peralta, M., & Fernández-Díaz, M. (2019). Near-Complete Genome Sequence of Infectious Bronchitis Virus Strain VFAR-047 (GI-16 Lineage), Isolated in Peru. *Microbiol Resour Announc*, *8*(5). doi:10.1128/mra.01555-18

- Terregino C, Toffan A, Serena Beato M, De Nardi R, Vascellari M, Meini A, Ortali G, Mancin M, Capua I. (2008). Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathol.* 37:487–493.
- Thayer, S. (1998). Serologic procedures. *Isolation and identification of avian pathogens.*
- Thompson, G., Mohammed, H., Bauman, B., & Naqi, S. (1997). Systemic and local antibody responses to infectious bronchitis virus in chickens inoculated with infectious bursal disease virus and control chickens. *Avian Dis*, 41(3), 519-527.
- Toro, H., Pennington, D., Gallardo, R. A., Van Santen, V. L., van Ginkel, F. W., Zhang, J., & Joiner, K. S. (2012). Infectious bronchitis virus subpopulations in vaccinated chickens after challenge. *Avian Dis*, 56(3), 501-508. doi:10.1637/9982-110811-Reg.1
- Toro, H. (2021). Global Control of Infectious Bronchitis Requires Replacing Live Attenuated Vaccines by Alternative Technologies. *Avian Dis*, 65(4), 637-642. doi:10.1637/aviandiseases-D-21-00105
- Tucciarone, C. M., Franzo, G., Berto, G., Drigo, M., Ramon, G., Koutoulis, K. C., Catelli, E., & Cecchinato, M. (2018). Evaluation of 793/B-like and Mass-like vaccine strain kinetics in experimental and field conditions by real-time RT-PCR quantification. *Poultry science*, 97(1), 303–312. <https://doi.org/10.3382/ps/pex292>
- USDA (2022). *Livestock and Poultry: World Markets and Trade*. Retrieved from https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 155-170. doi:10.1038/s41579-020-00468-6
- Valastro, V., Holmes, E. C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M. W., Cattoli, G., & Monne, I. (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infect Genet Evol*, 39, 349-364. doi:10.1016/j.meegid.2016.02.015
- van Empel, P., van den Bosch, H., Goovaerts, D., & Storm, P. (1996). Experimental infection in turkeys and chickens with *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Avian diseases*, 40(4), 858–864.
- Van Roeckel, H., Bullis K. L., Flint O. S., and Clarke M. K. (1942). Poultry disease control service. Massachusetts Agricultural Experiment Station, MA. Annual Report. Bulletin 388:99-103.
- Van Santen, V. L., & Toro, H. (2008). Rapid selection in chickens of subpopulations within ArkDPI-derived infectious bronchitis virus vaccines. *Avian Pathol*, 37(3), 293-306. doi:10.1080/03079450802043783

- Villarreal, L. Y., Sandri, T. L., Souza, S. P., Richtzenhain, L. J., de Wit, J. J., & Brandao, P. E. (2010). Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. *Avian Dis*, *54*(2), 894-898. doi:10.1637/9218-121709-Reg.1
- ViralZone (Producer). (2022, August 7, 2022). Gammacoronavirus. Retrieved from https://viralzone.expasy.org/767?outline=all_by_species
- Walker, P. J., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adriaenssens, E. M., Alfenas-Zerbini, P., Dempsey, D. M., Dutilh, B. E., García, M. L., Curtis Hendrickson, R., Junglen, S., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Lambert, A. J., Łobocka, M., Oksanen, H. M., Orton, R. J., Robertson, D. L., Rubino, L., Sabanadzovic, S., ... Zerbini, F. M. (2022). Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). *Archives of virology*, *167*(11), 2429–2440. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05516-5>
- Wang, L., Parr, R. L., King, D. J., & Collisson, E. W. (1995). A highly conserved epitope on the spike protein of infectious bronchitis virus. *Arch Virol*, *140*(12), 2201-2213. doi:10.1007/bf01323240
- Wang, Y., Wang, Y., Zhang, Z., Fan, G., Jiang, Y., Liu, X., Wang, S. (1998). Isolation and identification of glandular stomach-pathogenic type infectious bronchitis virus in Beijing area. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, *28*(10), 21-22. Retrieved from <https://eurekamaq.com/research/003/185/003185159.php>
- Wang, X., Liao, Y., Yap, P. L., Png, K. J., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2009). Inhibition of protein kinase R activation and upregulation of GADD34 expression play a synergistic role in facilitating coronavirus replication by maintaining de novo protein synthesis in virus-infected cells. *J Virol*, *83*(23), 12462-12472. doi:10.1128/jvi.01546-09
- Watzinger, F., Ebner, K., & Lion, T. (2006). Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular aspects of medicine*, *27*(2-3), 254–298. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.001>
- Weerts, E. A. W. S., Matthijs, M. G. R., Bonhof, J., van Haarlem, D. A., Dwars, R. M., Gröne, A., Verheije, M. H., & Jansen, C. A. (2021). The contribution of the immune response to enhanced colibacillosis upon preceding viral respiratory infection in broiler chicken in a dual infection model. *Veterinary immunology and immunopathology*, *238*, 110276. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110276>
- Xu, L., Khadijah, S., Fang, S., Wang, L., Tay, F. P., & Liu, D. X. (2010). The cellular RNA helicase DDX1 interacts with coronavirus nonstructural protein 14 and enhances viral replication. *J Virol*, *84*(17), 8571-8583. doi:10.1128/jvi.00392-10

- Xu, L. H., Huang, M., Fang, S. G., & Liu, D. X. (2011). Coronavirus infection induces DNA replication stress partly through interaction of its nonstructural protein 13 with the p125 subunit of DNA polymerase δ . *J Biol Chem*, 286(45), 39546-39559. doi:10.1074/jbc.M111.242206
- Yadav, D. K., Yadav, N., & Khurana, S. M. P. (2014). Chapter 26 - Vaccines: Present Status and Applications. In A. S. Verma & A. Singh (Eds.), *Animal Biotechnology* (pp. 491-508). San Diego: Academic Press.
- Yang, A., Wei, L., Zhao, W., Xu, Y., & Rao, Z. (2009). Expression, crystallization, and preliminary X-ray diffraction analysis of the N-terminal domain of nsp2 from avian infectious bronchitis virus. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 65(Pt 8), 788-790. doi:10.1107/s1744309109024749
- 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 Dis*, 45(2), 416-424.
- Yu, D., Han, Z., Xu, J., Shao, Y., Li, H., Kong, X., & Liu, S. (2010). A novel B-cell epitope of avian infectious bronchitis virus N protein. *Viral Immunol*, 23(2), 189-199. doi:10.1089/vim.2009.0094
- Yu, L., Zhang, X., Wu, T., Wang, Y., Meng, J., Liu, Q., Niu, X., & Wu, Y. (2017). The papain-like protease of avian infectious bronchitis virus has deubiquitinating activity. *Archives of virology*, 162(7), 1943–1950. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3328-y>
- Zegpi, R. A., He, L., Yu, Q., Joiner, K. S., Van Santen, V. L., & Toro, H. (2020). Limited Protection Conferred by Recombinant Newcastle Disease Virus Expressing Infectious Bronchitis Spike Protein. *Avian diseases*, 64(1), 53–59. <https://doi.org/10.1637/0005-2086-64.1.53>
- Zeng, Y., Ye, L., Zhu, S., Zheng, H., Zhao, P., Cai, W., Su, L., She, Y., & Wu, Z. (2008). The nucleocapsid protein of SARS-associated coronavirus inhibits B23 phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications*, 369(2), 287–291. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.096>
- Zhang, J. (2000). Rates of conservative and radical nonsynonymous nucleotide substitutions in mammalian nuclear genes. *J Mol Evol*, 50(1), 56-68. doi:10.1007/s002399910007
- Zhang, T., Han, Z., Xu, Q., Wang, Q., Gao, M., Wu, W., Shao, Y., Li, H., Kong, X., & Liu, S. (2015). Serotype shift of a 793/B genotype infectious bronchitis coronavirus by natural recombination. *Infection, genetics, and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 32, 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.034>

- Zhao, J., Sun, L., Zhao, Y., Feng, D., Cheng, J., & Zhang, G. (2020). Coronavirus Endoribonuclease Ensures Efficient Viral Replication and Prevents Protein Kinase R Activation. *J Virol*, *95*(7). doi:10.1128/jvi.02103-20
- Zhao, J., Zhang, K., Cheng, J., Jia, W., Zhao, Y., & Zhang, G. (2020). Replicase 1a gene plays a critical role in pathogenesis of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology*, *550*, 1-7. doi:10.1016/j.virol.2020.08.009
- Zhao, X., Jiang, Y., Cheng, X., Yu, Y., Gao, M., & Zhou, S. (2019). Pathogenicity of a QX-like strain of infectious bronchitis virus and effects of accessory proteins 3a and 3b in chickens. *Vet Microbiol*, *239*, 108464. doi:10.1016/j.vetmic.2019.108464
- Zhao, Y., Cheng, J., Yan, S., Jia, W., Zhang, K., & Zhang, G. (2019). S gene and 5a accessory gene are responsible for the attenuation of virulent infectious bronchitis coronavirus. *Virology*, *533*, 12-20. doi:10.1016/j.virol.2019.04.014
- Zhou, B., Liu, J., Wang, Q., Liu, X., Li, X., Li, P., Ma, Q., & Cao, C. (2008). The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus inhibits cell cytokinesis and proliferation by interacting with translation elongation factor 1alpha. *Journal of virology*, *82*(14), 6962–6971. <https://doi.org/10.1128/JVI.00133-08>
- Zhou, M., Williams, A. K., Chung, S. I., Wang, L., & Collisson, E. W. (1996). The infectious bronchitis virus nucleocapsid protein binds RNA sequences in the 3' terminus of the genome. *Virology*, *217*(1), 191-199. doi:10.1006/viro.1996.0106
- Zhou, S., Jiang, Y., & Tang, M. (2022). Microneutralization Test of Avian Infectious Bronchitis Virus Using Vero Cells. In L. Wang (Ed.), *Animal Coronaviruses* (pp. 235-245). New York, NY: Springer US.
- Ziebuhr, J., Snijder, E. J., & Gorbalenya, A. E. (2000). Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J Gen Virol*, *81*(Pt 4), 853-879. doi:10.1099/0022-1317-81-4-853
- Zuo, J., Cao, Y., Wang, Z., Shah, A. U., Wang, W., Dai, C., Chen, M., Lin, J., & Yang, Q. (2021). The mechanism of antigen-presentation of avian bone marrow dendritic cells suppressed by infectious bronchitis virus. *Genomics*, *113*(4), 1719–1732. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.04.027>
- Zuo, L., Yan, W., Song, Z., Li, H., Xie, X., Gu, K., Ma, P., Tian, Y., Zhou, C., Zhao, Y., Yang, X., & Wang, H. (2021). Design and Characterization of a DNA Vaccine Based on Spike with Consensus Nucleotide Sequence against Infectious Bronchitis Virus. *Vaccines*, *9*(1), 50. <https://doi.org/10.3390/vaccines9010050>

9. Anexo

Tabla 1. Secuencias empleadas en la obtención del árbol filogenético			
Linaje	Cepa	País de origen	Número de acceso
GI-1	Beaudette	USA	M95169*
	M41	USA	AY561711*
	H120	The Netherlands	FJ888351*
	CK/CH/LLN/111169	China	KF411040*
	ckZA/6743b/11	South Africa	KJ200289*
	IBV438	India	KF809793*
	Ma5p3	Argentina	-
	Ma5p3c11	Argentina	-
GI-11	UFMG/G	Brazil	JX182775*
	UFMG/297	Brazil	JX182785*
	UFMG/283	Brazil	JX182787*
	IBV/Brasil/351/1984	Brazil	GU393339*
	UFMG/12.2	Brazil	JX182777*
	UFMG/1141	Brazil	JX182783*
	CHu8_wild	Argentina	-
	CHu8p10	Argentina	-
	CHu8p20	Argentina	-
	CHu8p30	Argentina	-
	CHu8p40	Argentina	-
	CHu8p50	Argentina	-
	CHu8p10c5	Argentina	-
	CHu8p10c6	Argentina	-
CHu8p10c10	Argentina	-	
GI-13	Moroccan-G/83	Morocco	EU914938*
	FR-85131-85	France	AJ618985*
	UK/7/91	United Kingdom	Z83975*
	Poland/58/1998	Poland	KT886449
	Spain/00/336	Spain	DQ386098*
	4/91 vaccine	China	KF377577
	CR88p3	Argentina	-
	CR88p3c13	Argentina	-
	CR88p3c14	Argentina	-
GI-16	ck/CH/LSD/110857	China	JQ739375*
	IZO 28/86	Italy	KJ941019*
	CK/CH/LDL/971	China	EF030995*
	T3	China	AF227438*
	Q1	China	AF286302*
	2992/02	Taiwan	AY606323*
	CK/CH/Chongqing/0908	China	GU938413*
	A13_wild	Argentina	-
	A13p10	Argentina	-
	A13p20	Argentina	-
	A13p30	Argentina	-
	A13p40	Argentina	-
	A13p50	Argentina	-
	A13p63c5	Argentina	-
	A13p63c10	Argentina	-
	A13p63c14	Argentina	-
	KD10	Argentina	-

	K10	Argentina	-
	K20	Argentina	-
	SARS-CoV_2	China	OQ449439.1**
Nota: *Secuencias de Referencia (Valastro et al., 2016)			
** Secuencia outgroup			

Tabla 2. Resume el efecto citopático a lo largo de los pasajes celulares con las diferentes cepas.

N° Pasaje	Diluciones	A13p63	CR88p3	Ma5p3	Chu8p10
0	1/10	++	-	-	++++
	1/100	-	-	-	+++
	1/1000	-	-	-	+++
1	1/10	++	-	-	++++
	1/100	++	-	-	+++
	1/1000	+	-	-	+++
2	1/10	+++	+	-	++++
	1/100	++	-	-	+++
	1/1000	++	-	-	+++
3	1/10	+++	+	-	++++
	1/100	++	-	-	+++
	1/1000	++	-	-	+++
4	1/10	+++	++	-	++++
	1/100	++	+	-	+++
	1/1000	++	-	-	+++
5	1/10	+++	+	++	++++
	1/100	+++	+	+	+++
	1/1000	+++	-	-	+++
6	1/10	+++	++	++	++++
	1/100	+++	+	++	+++
	1/1000	++	-	+	+++
7	1/10	+++	+	+++	++++
	1/100	+++	-	++	+++
	1/1000	+++	-	++	+++
8	1/10	+++	++	+++	++++
	1/100	+++	+	+++	+++
	1/1000	+++	-	+++	+++
9	1/10	+++	++	+++	++++
	1/100	+++	-	+++	+++
	1/1000	+++	-	+++	+++
10	1/10	+++	++	+++	++++
	1/100	+++	-	+++	+++
	1/1000	+++	-	+++	+++
11	1/10	+++	+++	+++	++++
	1/100	+++	++	+++	+++
	1/1000	+++	-	+++	+++
12	1/10		+++		
	1/100		++		
	1/1000		+		

Nota: El número de cruces representa la magnitud del efecto citopático observado:

- ++++ = Desprendimiento de toda la monocapa
- +++ = Áreas de desprendimiento a lo largo de toda la monocapa
- ++ = Áreas localizadas con desprendimiento o sincicios
- += Al menos un área de desprendimiento o sincicio
- = Sin Efecto Citopático

Tabla 3. Porcentaje de similitud entre nucleótidos de las secuencias S1 de A13

Secuencias	wild	A13p10	A13p20	A13p30	A13p40	A13p50	A13p60	A13p63	K10	KD10	K21	A13p63c5	A13p63c10	A13p63c14
wild	100	99,57	99,13	99,38	99,13	99,01	99,13	99,13	99,13	99,38	99,5	99,2	99,2	99,07
A13p10	99,57	100	99,57	99,81	99,57	99,2	99,57	99,57	99,44	99,69	99,81	99,63	99,63	99,5
A13p20	99,13	99,57	100	99,63	99,38	99,01	99,38	99,38	99,07	99,26	99,38	99,44	99,44	99,32
A13p30	99,38	99,81	99,63	100	99,75	99,38	99,75	99,75	99,26	99,5	99,63	99,81	99,81	99,69
A13p40	99,13	99,57	99,38	99,75	100	99,26	99,63	99,63	99,01	99,26	99,38	99,69	99,69	99,57
A13p50	99,01	99,2	99,01	99,38	99,26	100	99,44	99,44	98,64	98,89	99,01	99,44	99,44	99,32
A13p60	99,13	99,57	99,38	99,75	99,63	99,44	100	100	99,01	99,26	99,38	99,81	99,81	99,69
A13p63	99,13	99,57	99,38	99,75	99,63	99,44	100	100	99,01	99,26	99,38	99,81	99,81	99,69
K10	99,13	99,44	99,07	99,26	99,01	98,64	99,01	99,01	100	99,75	99,63	99,07	99,07	98,95
KD10	99,38	99,69	99,26	99,5	99,26	98,89	99,26	99,26	99,75	100	99,88	99,32	99,32	99,2
K21	99,5	99,81	99,38	99,63	99,38	99,01	99,38	99,38	99,63	99,88	100	99,44	99,44	99,32
A13p63c5	99,2	99,63	99,44	99,81	99,69	99,44	99,81	99,81	99,07	99,32	99,44	100	100	99,88
S1A13p63c10	99,2	99,63	99,44	99,81	99,69	99,44	99,81	99,81	99,07	99,32	99,44	100	100	99,88
A13p63c14	99,07	99,5	99,32	99,69	99,57	99,32	99,69	99,69	98,95	99,2	99,32	99,88	99,88	100

Tabla 4. Porcentaje de similitud entre aminoácidos de las secuencias S1 de A13

Secuencias	wild	A13p10	A13p20	A13p30	A13p40	A13p50	A13p60	A13p63	K10	KD10	K21	A13p63c5	S1A13p63c10	A13p63c14
wild	100	98,52	97,96	98,14	97,4	97,22	97,59	97,59	97,77	97,96	98,33	97,59	97,59	97,4
A13p10	98,52	100	99,44	99,63	98,89	97,96	99,07	99,07	98,89	99,07	99,44	99,07	99,07	98,89
A13p20	97,96	99,44	100	99,81	99,07	98,14	99,26	99,26	98,33	98,52	98,89	99,26	99,26	99,07
A13p30	98,14	99,63	99,81	100	99,26	98,33	99,44	99,44	98,52	98,7	99,07	99,44	99,44	99,26
A13p40	97,4	98,89	99,07	99,26	100	97,96	99,07	99,07	97,77	97,96	98,33	99,07	99,07	98,89
A13p50	97,22	97,96	98,14	98,33	97,96	100	98,7	98,7	96,85	97,03	97,4	98,52	98,52	98,33
A13p60	97,59	99,07	99,26	99,44	99,07	98,7	100	100	97,96	98,14	98,52	99,63	99,63	99,44
A13p63	97,59	99,07	99,26	99,44	99,07	98,7	100	100	97,96	98,14	98,52	99,63	99,63	99,44
K10	97,77	98,89	98,33	98,52	97,77	96,85	97,96	97,96	100	99,81	99,44	97,96	97,96	97,96
KD10	97,96	99,07	98,52	98,7	97,96	97,03	98,14	98,14	99,81	100	99,63	98,14	98,14	98,14
K21	98,33	99,44	98,89	99,07	98,33	97,4	98,52	98,52	99,44	99,63	100	98,52	98,52	98,33
A13p63c5	97,59	99,07	99,26	99,44	99,07	98,52	99,63	99,63	97,96	98,14	98,52	100	100	99,81
S1A13p63c10	97,59	99,07	99,26	99,44	99,07	98,52	99,63	99,63	97,96	98,14	98,52	100	100	99,81
A13p63c14	97,4	98,89	99,07	99,26	98,89	98,33	99,44	99,44	97,96	98,14	98,33	99,81	99,81	100

Tabla 5. Porcentaje de similitud entre nucleótidos de las secuencias S1 de CHu8

Secuencias	Wild	CHu8p10	CHu8p20	CHu8p30	CHu8p40	CHu8p50	CHu8p10c5	CHU8p10c6	CHu8p10c10
Wild	100	99,94	99,88	99,88	99,94	99,88	99,75	99,88	99,88
CHu8p10	99,94	100	99,82	99,94	99,88	99,82	99,69	99,82	99,82
CHu8p20	99,88	99,82	100	99,75	99,82	99,75	99,63	99,75	99,75
CHu8p30	99,88	99,94	99,75	100	99,94	99,88	99,69	99,75	99,75
CHu8p40	99,94	99,88	99,82	99,94	100	99,94	99,75	99,82	99,82
CHu8p50	99,88	99,82	99,75	99,88	99,94	100	99,82	99,88	99,88
CHu8p10c5	99,75	99,69	99,63	99,69	99,75	99,82	100	99,88	99,88
CHU8p10c6	99,88	99,82	99,75	99,75	99,82	99,88	99,88	100	100
CHu8p10c10	99,88	99,82	99,75	99,75	99,82	99,88	99,88	100	100

Tabla 6. Porcentaje de similitud entre aminoácidos de las secuencias S1 de CHu8

Secuencias	Wild	CHu8p10	CHu8p20	CHu8p30	CHu8p40	CHu8p50	CHu8p10c5	CHU8p10c6	CHu8p10c10
Wild	100	99,82	100	99,63	99,82	99,63	99,26	99,63	99,63
CHu8p10	99,82	100	99,82	99,82	99,63	99,45	99,08	99,45	99,45
CHu8p20	100	99,82	100	99,63	99,82	99,63	99,26	99,63	99,63
CHu8p30	99,63	99,82	99,63	100	99,82	99,63	99,08	99,26	99,26
CHu8p40	99,82	99,63	99,82	99,82	100	99,82	99,26	99,45	99,45
CHu8p50	99,63	99,45	99,63	99,63	99,82	100	99,45	99,63	99,63
CHu8p10c5	99,26	99,08	99,26	99,08	99,26	99,45	100	99,63	99,63
CHU8p10c6	99,63	99,45	99,63	99,26	99,45	99,63	99,63	100	100
CHu8p10c10	99,63	99,45	99,63	99,26	99,45	99,63	99,63	100	100

Tabla 7. Porcentaje de similitud entre nucleótidos de las secuencias del genoma completo de las variantes A13

Secuencias	AR/13/BA/A13	A13p10	A13p20	A13p30	A13p40	A13p50	A13p63	A13p63c5	A13p63c14
AR/13/BA/A13	100	99,94	99,94	99,93	99,92	99,9	99,9	99,87	99,86
A13p10	99,94	100	99,95	99,93	99,93	99,91	99,9	99,88	99,87
A13p20	99,94	99,95	100	99,98	99,96	99,95	99,94	99,92	99,91
A13p30	99,93	99,93	99,98	100	99,99	99,96	99,96	99,93	99,92
A13p40	99,92	99,93	99,96	99,99	100	99,98	99,96	99,94	99,93
A13p50	99,9	99,91	99,95	99,96	99,98	100	99,96	99,93	99,92
A13p63	99,9	99,9	99,94	99,96	99,96	99,96	100	99,96	99,95
A13p63c5	99,87	99,88	99,92	99,93	99,94	99,93	99,96	100	99,98
A13p63c14	99,86	99,87	99,91	99,92	99,93	99,92	99,95	99,98	100

Tabla 8. Porcentaje de similitud entre aminoácidos de las secuencias del genoma completo de las variantes A13

Secuencias	AR/13/BA/A13	A13p10	A13p20	A13p30	A13p40	A13p50	A13p63	A13p63c5	A13p63c14
AR/13/BA/A13	100	99,92	99,96	99,91	99,9	99,85	99,84	99,79	99,76
A13p10	99,92	100	99,88	99,83	99,82	99,78	99,76	99,71	99,69
A13p20	99,96	99,88	100	99,96	99,92	99,88	99,87	99,81	99,79
A13p30	99,91	99,83	99,96	100	99,97	99,9	99,89	99,83	99,81
A13p40	99,9	99,82	99,92	99,97	100	99,93	99,9	99,84	99,82
A13p50	99,85	99,78	99,88	99,9	99,93	100	99,88	99,82	99,8
A13p63	99,84	99,76	99,87	99,89	99,9	99,88	100	99,92	99,9
A13p63c5	99,79	99,71	99,81	99,83	99,84	99,82	99,92	100	99,96
A13p63c14	99,76	99,69	99,79	99,81	99,82	99,8	99,9	99,96	100

Tabla 9. Cambios en las secuencias de nucleótidos A13

POS	ORF	AR/13/BA/A1 3	A13P1 0	A13P2 0	A13P3 0	A13P4 0	A13P5 0	A13P6 3	A13P63C 5	A13P63C1 4
296	ORF1a	A	A	A	A	A	A	G	G	G
665		A	A	A	A	A	G	A	A	A
1503		C	C	T	C	C	C	C	C	C
1899		C	C	T	T	T	T	T	T	T
2243		C	C	T	T	T	T	T	T	T
2555		C	C	C	C	C	C	T	T	T
2675		C	C	C	C	C	C	C	T	T
2758		G	A	G	G	G	G	G	G	G
2837		C	C	C	C	C	T	C	C	C
4867		G	G	G	A	A	G	G	G	G
5229		T	T	T	T	C	C	C	C	C
5487		T	T	T	T	T	T	T	T	G
6038		C	T	C	C	C	C	C	C	C
6560		A	G	A	A	A	A	A	A	A
6594		T	T	G	G	G	G	G	G	G
6880		A	A	A	A	A	A	G	G	G
7963		T	T	C	C	T	T	T	T	T
8696		C	C	C	C	C	C	T	T	T
9185		C	T	C	C	C	C	C	C	C
9346		C	C	C	C	C	C	C	C	T
1168 4	C	T	C	C	C	C	C	C	C	
1310	ORF1b	C	C	C	C	C	C	C	T	T
2544		A	A	A	A	A	A	A	G	G
4208		C	C	C	T	T	T	T	T	T

4770		C	C	C	C	C	C	C	T	T
225	Proteína S	T	T	T	T	T	T	T	T	C
285		G	T	G	G	G	G	G	G	G
356		C	C	C	C	A	A	A	A	A
389		G	G	G	G	G	G	G	G	A
395		C	C	T	T	T	T	T	T	T
645		C	C	C	T	T	T	T	T	T
693		C	C	C	C	C	C	T	C	C
728		C	C	C	C	T	T	C	C	C
952		C	C	A	A	A	A	A	A	A
1342		C	C	C	C	C	C	C	T	T
1507		G	G	G	G	G	A	A	A	A
1553		A	A	A	A	A	A	T	A	A
1625		C	C	C	C	C	T	C	C	C
1744		C	C	C	C	C	C	C	T	T
3035		C	C	C	T	T	T	T	T	T
85		Proteína M	T	T	T	T	T	T	G	G
214	G		G	G	G	G	T	G	G	G
217	T		C	T	T	T	T	T	T	T
566	C		C	C	T	T	T	T	T	T
353	Proteína N	C	C	C	C	C	C	C	T	C
908		C	C	C	C	C	C	C	T	T

Tabla 10. Porcentaje de similitud entre nucleótidos de las secuencias del genoma completo de las variantes CHu8

<i>Secuencias</i>	AR/01/BA/8Hu8	CHu8p10	CHu8p20	CHu8p30	CHu8p40	CHu8p50	CHu8p10c5
<i>AR/01/BA/8Hu8</i>	100	99,96	99,94	99,95	99,94	99,94	99,95
<i>CHu8p10</i>	99,96	100	99,95	99,96	99,94	99,96	99,96
<i>CHu8p20</i>	99,94	99,95	100	99,96	99,94	99,93	99,92
<i>CHu8p30</i>	99,95	99,96	99,96	100	99,99	99,97	99,94
<i>CHu8p40</i>	99,94	99,94	99,94	99,99	100	99,97	99,92
<i>CHu8p50</i>	99,94	99,96	99,93	99,97	99,97	100	99,94
<i>CHu8p10c5</i>	99,95	99,96	99,92	99,94	99,92	99,94	100

Tabla 11. Porcentaje de similitud entre aminoácidos de las secuencias del genoma completo de las variantes CHu8

<i>Secuencias</i>	AR/01/BA/8Hu8	CHu8p10	CHu8p20	CHu8p30	CHu8p40	CHu8p50	CHu8p10c5
<i>AR/01/BA/8Hu8</i>	100	99,96	99,91	99,93	99,91	99,9	99,92
<i>CHu8p10</i>	99,96	100	99,91	99,93	99,91	99,92	99,9
<i>CHu8p20</i>	99,91	99,91	100	99,93	99,91	99,88	99,83
<i>CHu8p30</i>	99,93	99,93	99,93	100	99,98	99,94	99,86

CHu8p40	99,91	99,91	99,91	99,98	100	99,97	99,83
CHu8p50	99,9	99,92	99,88	99,94	99,97	100	99,84
CHu8p10c5	99,92	99,9	99,83	99,86	99,83	99,84	100

Tabla 12. Cambios en las secuencias de nucleótidos CHu8

POS	ORF	AR/01/BA/8Hu8	CHu8P10	CHu8P20	CHu8P30	CHu8P40	CHu8P50	CHu8P10C5
1176	ORF1a	C	T	C	C	C	C	C
1453		T	G	G	G	G	G	T
1911		C	C	C	C	C	C	T
2364		A	A	A	A	C	C	A
2555		C	C	C	C	T	T	C
2835		A	A	C	A	A	A	A
3888		A	A	G	A	A	A	A
4223		C	C	T	C	C	C	C
5024		C	C	C	C	C	C	A
5583		C	C	C	C	T	C	C
9522		C	C	C	T	T	T	T
10349		C	C	T	C	C	C	C
11076		A	A	A	G	G	A	A
11518		G	G	G	G	G	A	G
463		ORF1b	C	C	C	C	C	C
2481	G		G	T	G	G	G	G
4238	A		T	T	T	T	T	A
7867	T		T	G	G	G	T	T
7926	C		T	C	C	C	T	T
17	Proteína S	C	T	C	C	C	T	T
362		C	A	C	C	C	C	C
944		C	C	C	C	C	C	T
1382		C	C	C	C	C	C	A
1939		A	A	A	A	A	A	T
2088		T	T	T	C	C	C	T
2486		A	A	A	A	A	A	G
2585		A	A	A	T	T	T	A
3481		G	G	G	T	T	T	G
85		ORF3b	C	C	C	C	C	T
267	Proteína E	C	C	T	C	C	C	C
149	Proteína N	G	G	A	G	G	G	G
439		G	G	C	C	C	C	G

Tabla 13. Cambios en las secuencias de nucleótidos CR88

POS	ORF	CR88P3	CR88C14
774	ORF1ab	C	A
1883		A	C
4230		C	T
6028		G	A
6905		C	T
12419		T	A
12467		C	T
13275		A	T
14069		T	C
17952		A	G
113		Proteína S	C
151	Proteína N	A	T

Tabla 14. Score de ciliostasis – Modelo de infección

Días post-infección	Puntaje promedio	Desvío estándar
5	3,6	0,5477226
10	0,4	0,5477226
15	0	0
20	0,2	0,4472136

Tabla 15. Resultados de la prueba de Bonferroni para los scores de ciliostasis - Modelo de infección

Días post-infección	5	10	15
10	2,90E-08	-	-
15	5,20E-09	1	-
20	1,20E-08	1	1

Nota: Los resultados en rojo exhiben diferencias estadísticas significativas.

Tabla 16. Prueba de ciliostasis entre vacunas

Grupos	Puntajes de ciliostasis promedio	Desvío estándar
A13	0,3	0,6749486
CN	0,2	0,421637
CR88	1,9	1,3703203
Ma5	1,2	0,6324555

Tabla 17. Resultados de la prueba de Bonferroni para la prueba de ciliostasis entre vacunas

	A13	CN	CR88
CN	1	-	-
CR88	0,00102	0,00047	-
Ma5	0,14322	0,07655	0,44888

Nota: Los resultados en rojo exhiben diferencias estadísticas significativas.

Tabla 18. Puntaje de ciliostasis - Prueba de eficiencia de vacunas

Grupos	Estado	Promedio	Desvío estándar
A13	No desafiado	0,3	0,4830459
A13	Desafiado	0,7	0,6749486
CN	No desafiado	0,1666667	0,3834825
CP	Desafiado	3,55	0,5104178
CR88	No desafiado	0,8	0,421637
CR88	Desafiado	3	1,2472191
Ma5	No desafiado	0,2	0,421637
Ma5	Desafiado	1,8	1,2292726

Tabla 19. Resultados de la prueba de Bonferroni para las muestras de ciliostasis - Prueba de eficiencia de vacunas

	A13	A13D	CN	CP	CR88	CR88D	Ma5
A13D	1	-	-	-	-	-	-
CN	1	1	-	-	-	-	-
CP	2,00E-16	8,50E-16	2,00E-16	-	-	-	-
CR88	1	1	0,6907	4,90E-15	-	-	-
CR88D	6,80E-12	2,80E-09	2,80E-15	1	1,20E-08	-	-
Ma5	1	1	1	2,00E-16	1	1,50E-12	-
Ma5D	0,0002	0,0203	1,80E-06	1,70E-07	0,0493	0,0069	5,40E-05

Nota: Los resultados en rojo exhiben diferencias estadísticas significativas.
La letra D en cada grupo indica que es el grupo desafiado.

Tabla 20. Carga viral - Prueba de eficiencia de vacunación

Grupos	Tejido	Estado	Promedio	Desvío estándar
CN	Tráquea	No desafiado	0,9162704	0,3519235
CP	Tráquea	Desafiado	4,1336361	0,4570422
A13	Tráquea	No desafiado	1,4273124	0,3187202
A13	Tráquea	Desafiado	1,2554318	0,4041862
CR88	Tráquea	No desafiado	1,445408	0,3268292
CR88	Tráquea	Desafiado	3,3200992	0,2521787
Ma5	Tráquea	No desafiado	1,127638	0,2288493
Ma5	Tráquea	Desafiado	3,8181418	0,4713786
A13	Riñón	No desafiado	1,246736	0,1594662
A13	Riñón	Desafiado	1,148	0,2316881
CN	Riñón	No desafiado	1,070365	0,264187
CP	Riñón	Desafiado	3,762436	0,6318019
CR88	Riñón	No desafiado	1,176965	0,1857054
CR88	Riñón	Desafiado	2,76299	0,3916044
Ma5	Riñón	No desafiado	1,053843	0,1021415
Ma5	Riñón	Desafiado	3,811932	0,5606182

Nota: El valor promedio por grupo se encuentra expresado en número de copias (Log₁₀)

Tabla 21. Resultados de la prueba de Bonferroni para las muestras de tráquea de la prueba de eficiencia de vacuna

	CN	CP	A13	A13D	CR88	CR88D	Ma5
CP	2,00E-16	-	-	-	-	-	-
A13	0,5157	6,00E-15	-	-	-	-	-
A13D	1	7,50E-16	1	-	-	-	-
CR88	0,4172	7,50E-15	1	1	-	-	-
CR88D	5,10E-13	7,70E-03	1,70E-08	1,80E-09	2,20E-08	-	-
Ma5	1	2,00E-16	1	1	1	3,40E-10	-
Ma5D	1,10E-15	1	2,80E-11	3,50E-12	3,50E-11	1	7,70E-13

Nota: Los resultados en rojo exhiben diferencias estadísticas significativas.
La letra D en cada grupo indica que es el grupo desafiado.

	A13	A13D	CN	CP	CR88	CR88D	Ma5
A13D	1	-	-	-	-	-	-
CN	1	1	-	-	-	-	-
CP	1,50E-12	4,50E-13	8,30E-16	-	-	-	-
CR88	1	1	1	6,00E-12	-	-	-
CR88D	1,20E-05	3,30E-06	7,10E-08	1,50E-03	1,50E-05	-	-
Ma5	1	1	1	1,50E-13	1	9,90E-07	-
Ma5D	3,40E-11	1,10E-11	1,00E-13	1	8,40E-11	4,20E-03	4,00E-12

Nota: Los resultados en rojo exhiben diferencias estadísticas significativas.
La letra D en cada grupo indica que es el grupo desafiado.