



IDENTIFICACIÓN DE GENOGRUPOS DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE GUMBORO EN GRANJAS AVÍCOLAS EN COLOMBIA

Identification of genogroups of Infectious Bursal Disease Virus in poultry farms at Colombia

Arlen Patricia GOMEZ^{1*}, Magda BELTRAN¹, Diana Marcela ALVAREZ-MIRA¹, Gloria Consuelo RAMIREZ-NIETO¹.

¹Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Bogotá, Colombia.

*For correspondence: apgomezr@unal.edu.co

Received: 27th April 2019, Returned for revision: 14th June 2019, Accepted: 02nd July 2019.

Associate Editor: María Cristina Navas.

Citation/Citar este artículo como: Gomez AP, Beltran M, Alvarez-Mira D, Ramirez-Nieto G. Identificación de genogrupos del virus de la Enfermedad de Gumboro en granjas avícolas en Colombia. Acta biol. Colomb. 2019;24(3):463-473. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v24n3.79369>

RESUMEN

El virus de la enfermedad de Gumboro (IBDV) es un avibirnavirus con genoma dsARN que presenta altas tasas de mutación y recombinación. A pesar del efecto inmunosupresor en aves y la frecuencia con que ocurre la infección por este agente en el país son pocos los estudios que caracterizan los cuadros clínicos y se desconoce cuáles son los genogrupos circulantes. Esta investigación tuvo como objetivo determinar la frecuencia de lesiones histopatológicas en órganos del sistema inmune e identificar los genogrupos del IBDV en aves comerciales de Colombia. Para determinar la frecuencia de presentación de lesiones en órganos del sistema inmune se analizaron 381 casos clínicos de las bases de datos del Laboratorio de Patología Aviar (LPA) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá (periodo 2016-2018). Asimismo, se secuenciaron los productos de RT-PCR del gen que codifica para la proteína viral VP2 provenientes de 35 muestras de bursas de Fabricio. Como resultado se encontró evidencia de lesiones microscópicas compatibles con procesos de inmunodepresión en órganos del sistema inmune (bursa de Fabricio, timo, bazo y médula ósea) en el 25 % (97) de los casos analizados y se identificaron los genogrupos 1, 2 y 4 en la siguiente proporción: genogrupo 1-69 % (virus clásicos), genogrupo 2-25 % (variantes) y genogrupo 4-6 % (identificado en Suramérica). Estos hallazgos demuestran la presencia de lesiones en órganos del sistema inmune y la existencia de los genogrupos 1, 2 y 3 del IBDV circulando en aves comerciales en Colombia. Esta es la primera investigación en el país con este sistema de clasificación que permite evidenciar con mayor precisión los cambios en el genoma del IBDV. Lo anterior señala la necesidad de continuar con este tipo de estudios para tener una mejor comprensión de la infección en campo y orientar el diseño e implementación de estrategias de control.

Palabras clave: Aves de corral, bursa de Fabricio, diagnóstico, inmunosupresión, VP2.

ABSTRACT

Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) is an avibirnavirus with a dsRNA genome, which has a high mutation and recombination rates. Despite the immunosuppressive effect in poultry and the frequency of infections by this agent, few studies in Colombia that characterize the clinical signs and identify the circulating genogroups have been reported. This study aimed to determine the frequency of histopathological lesions in immune organs and to identify IBDV genogroups in poultry from Colombia. In this way, the Laboratorio de Patología Aviar (LPA) databases from the Universidad Nacional de Colombia (period 2016-2018) were analyzed in order to identify the frequency of lesions present in immune organs. 35 samples of the bursa of Fabricius, positive by RT-PCR, were sequenced to the gene that codes for the VP2 protein. 97 (25 %) cases showed microscopic lesions in the immune organs. The genogroups identified and the frequencies were: genogrupo 1-69 % (classical viruses), genogrupo 2-25 % (antigenic variants), and genogrupo 4-6 % (identified in South America). These findings demonstrate the lesions of immune organs and the presence of different genogroups circulating in commercial birds in Colombia. This indicates the need to continue with these studies in order to have a better understanding of the infection in the field and to guide the design and implementation of control strategies.

Keywords: Bursa of Fabricius, diagnosis, immunosuppression, poultry, VP2.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad infecciosa de la bursa (IBD) o enfermedad de Gumboro es una infección viral aguda y altamente contagiosa que afecta aves comerciales jóvenes, en las que el virus infecta los linfocitos B de la bursa de Fabricio y genera lesiones en los órganos linfoides. Pese a los esfuerzos para su control a través de la vacunación, los cuadros de inmunosupresión debido a las lesiones en estos órganos han sido reportados desde años atrás alrededor del mundo, cursando con infecciones secundarias, tratamientos antibióticos recurrentes, bajos rendimientos productivos y fallas en la respuesta inmune a vacunas (Cheville, 1967; Saif, 1991; Lukert y Saif, 1997).

El virus que ocasiona la IBD (IBDV) pertenece a la familia *Birnaviridae*, género *Avibirnavirus* y posee un genoma dsARN que presenta altas tasas de mutación (Dobos *et al.*, 1979), reordenamiento y recombinación genética, lo cual altera la antigenicidad y por ende afecta la eficacia en la protección conferida por el uso de vacunas (Jackwood y Sommer-Wagner, 2011). Existen dos serotipos designados como I y II, de los cuales sólo al I se le han atribuido los cuadros clínicos de la enfermedad en pollos (Cosgrove, 1962; McNulty *et al.*, 1979). El genoma tiene dos segmentos: A y B; el primero codifica la proteína no estructural VP5 y una poliproteína sobre la que actúa la proteasa viral VP4 para generar dos proteínas de la cápside (pVP2 y VP3) (Kibenge *et al.*, 1988; Birghan *et al.*, 2000). La pVP2 se escinde para generar la proteína de cápside madura VP2 con tres dominios (B-base, S-shell y P-proyección) (Coulibaly *et al.*, 2005). El dominio P posee cuatro estructuras de bucle en la superficie del virión (P_{BC} , P_{DE} , P_{HI} y P_{FG}) y es el responsable de inducir la respuesta inmune protectora en las aves al permitir la unión con anticuerpos monoclonales (Schnitzler *et al.*, 1993; Letzel *et al.*, 2007). Asimismo, las mutaciones que generan cambios en la secuencia de aminoácidos en algunos de estos dominios de VP2 pueden modificar la antigenicidad del virus (Bayliss *et al.*, 1990; Snyder *et al.*, 1992; Jackwood *et al.*, 2006); específicamente se ha reportado la alta variabilidad del dominio P (Jackwood y Sommer-Wagner, 2011; Jackwood, 2012), por lo que se le ha dado la denominación de región hipervariable (hvVP2). Estos cambios también han llevado a la clasificación de los aislamientos en dos grupos antigénicos: cepas clásicas (cv) y variantes que ocasiona cuadros subclínicos (sc); sin embargo, diversos estudios han demostrado que existen variaciones antigénicas al interior de los grupos (Lukert *et al.*, 1975; Skeeles *et al.*, 1979; Snyder *et al.*, 1988; Sapats y Ignjatovic, 2000; Liu *et al.*, 2002; Jackwood y Sommer-Wagner, 2011), a las cuales se les pueden atribuir la ineficacia en la protección conferida por las vacunas. De esta forma, la clasificación de los IBDV en los dos grupos antigénicos es insuficiente para evidenciar las diferencias antigénicas entre aislamientos de campo (Jackwood *et al.*, 2018).

Las cepas del IBDV detectadas alrededor del mundo también se han clasificado con base en su patogenicidad o virulencia en muy virulentas (w) (van den Berg *et al.*, 2004). Aunque existen otros esquemas de nomenclatura y clasificación del IBDV como los basados en los nombres de los investigadores que los describieron por primera vez (Winterfield, Lukert, Baxendale), designaciones alfa numéricas (STC, D78, S706, 228E, GLS) y localizaciones geográficas (Del-A, Del-E, MD), es necesario desarrollar metodologías unificadas, rápidas y precisas para caracterizar las propiedades antigénicas de las cepas que circulan en campo y así orientar las estrategias de control de esta enfermedad (Banda *et al.*, 2003).

Las técnicas moleculares (RT-PCR, RFLP y qRT-PCR) permiten la caracterización más precisa de los cambios en el genoma que se relacionan con modificaciones de la antigenicidad (Ikuta *et al.*, 2001; Jackwood *et al.*, 2001; Fellahi *et al.*, 2016). Como resultado de lo anterior, recientemente Jackwood *et al.*, (2018) propusieron un esquema de clasificación en genogrupos basado en el análisis de la región hvVP2 del IBDV, que intenta brindar más información de los cambios que se han presentado en este virus, buscando una mejor correlación con los cuadros clínicos observados en campo. La organización en genogrupos también parte de la necesidad de clasificar los aislamientos de campo que presentan linajes diferentes a los grupos cv, sc o w (Jackwood y Sommer, 2005; Hon *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2007; Lupini *et al.*, 2016).

En Colombia, la IBD se considera endémica con el reporte de 853 casos en el último boletín epidemiológico del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, 2015), siendo la segunda enfermedad de mayor presentación en aves comerciales; sin embargo, no es considerada de control oficial. A pesar de la frecuencia de las infecciones por este agente en el país y la importancia de realizar un monitoreo continuo de los cambios en las regiones hipervariables del virus para orientar las estrategias de control, son pocos los estudios en Colombia que caracterizan los cuadros clínicos e identifican los genogrupos circulantes. En consecuencia, el diagnóstico molecular se realiza en diversos laboratorios, en los que se utiliza principalmente la clasificación en los dos grupos antigénicos reportados (cepas clásicas y variantes), lo cual no permite realizar apropiadamente el monitoreo de los cambios de las cepas de campo. En cuanto a la información disponible en el país, la investigación más reciente fue en 2012, la cual demostró la existencia de aminoácidos típicos de cepas variantes o clásicas; sin embargo, en una muestra de Colombia del 2001 se evidenció una combinación de aminoácidos no identificada previamente en el mundo, hallazgo cuya importancia se desconoce (Jackwood, 2012). Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue identificar la frecuencia de lesiones en órganos del sistema inmune de aves con diagnóstico presuntivo de IBD y establecer la presencia de los genotipos circulando en el

país. Los resultados obtenidos en este estudio representan un aporte al conocimiento del virus de la IBD y constituyen el primer reporte de los genogrupos del IBDV circulantes en aves comerciales de Colombia, permitiendo además evidenciar la variación que se ha presentado en años recientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de casos e identificación de lesiones histopatológicas

Se analizaron los resultados histopatológicos de 381 casos en las bases de datos del Laboratorio de Patología Aviar (LPA) de la Universidad Nacional de Colombia durante el periodo 2016-2018, para identificar la frecuencia de presentación de lesiones en órganos del sistema inmune (bursa de Fabricio, timo, bazo y médula ósea). Los tejidos evaluados fueron fijados en formol bufferado al 10 % y se realizó un proceso de imbibición en parafina y tinción con hematoxilina-eosina. La escala de las lesiones de depleción y/o necrosis linfoide en bursa y timo se categorizaron de acuerdo con lo descrito por Sharma *et al.*, 1989, con una escala de 0-4 para bursa y de 0-3 para timo. A las lesiones de depleción linfoide en bazo y médula ósea se les asignó una escala de gravedad de 0-3 que corresponde a: 0 = ausencia de lesión, 1 = depleción leve, 2 = depleción moderada y 3 = depleción severa.

Muestras de animales y análisis moleculares

Extracción de ARN viral

Se analizaron 35 bursas de Fabricio de aves de estirpes comerciales (Pollo de engorde $n = 32$, Reproductoras $n = 2$ y Ponedora comercial $n = 1$) provenientes de tres departamentos de Colombia (Antioquia, Cundinamarca y Santander); también se empleó una muestra de una vacuna a base de virus vivo atenuado como control positivo. A partir de los tejidos y la vacuna se realizó la extracción de ARN con el kit comercial High Pure Viral Nucleic Acid kit® (Roche Molecular Systems), de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial en un volumen final de elución de 50 μ L. La concentración y pureza del ARN fueron medidos con un espectrofotómetro de microvolumen (NanoDrop Technologies, Wilmington).

RT-PCR del gen VP2 del IBDV

Se obtuvo cADN a partir de 10 L de ARN extraído (concentración aproximada de 100 ng/ L) con el kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems). El volumen final de reacción fue 20 μ L con 10 μ L de mezcla de reacción que contenía: 50 U de RT, 20 U de inhibidor de ARNasas, 4 mM de dNTP (100 nM) y 2,0 μ L

de random primers (10X). Las reacciones de RT se llevaron a cabo con las siguientes condiciones: 25 °C por 10 minutos y 37 °C por 120 minutos, seguidos por un calentamiento a 85 °C por 5 minutos. El cADN fue empleado para la PCR con los primers VP2 802 F - GTAACAATCACACTGTTCTCAG y VP2 1050 R - GATGTYARTGGCTGGGTTATC, específicos para amplificar un fragmento de 248 pb de la región hvVP2 del IBDV. La PCR se realizó en un volumen final de reacción de 25 μ L con los siguientes reactivos: 0,04 U de Taq Polimerasa, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 mM dNTPs y 0,32 μ M de cada primer. Las temperaturas y tiempos de amplificación fueron: 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 54 °C por 35 segundos y 72 °C por 40 segundos, y una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1,5 % con el colorante EZ-Vision® en un sistema digital de fotodocumentación (Gel Doc® Bio-Rad Laboratories Inc.).

Análisis de secuencia de nucleótidos

Los productos de 248 pb fueron purificados por medio de precipitación en alcohol y secuenciados en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia con el BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, California, EEUU) usando electroforesis de capilares y el secuenciador ABI3730XL (Applied Biosystems). El análisis de las secuencias y la construcción de los árboles filogenéticos se realizó con el software MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, The Pennsylvania State University) (Tamura *et al.*, 2013). Las relaciones filogenéticas fueron inferidas usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) con 1000 réplicas bootstrap. Las distancias evolutivas se calcularon con el método estadístico maximum-likelihood (Tamura *et al.*, 2004) y se muestran en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Los análisis incluyeron 97 secuencias de nucleótidos correspondientes a las 35 muestras de este estudio y 62 secuencias de referencia de la VP2 del IBDV reportadas en el GenBank. El análisis de los cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína VP2 se realizó con la herramienta BLAST® blastx del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

RESULTADOS

Lesiones microscópicas

De 381 casos clínicos recibidos en el LPA para diagnóstico histopatológico en el período 2016 - 2018, en 97 (25 %) se evidenciaron lesiones microscópicas en los órganos inmunes relacionadas con procesos de inmunodepresión y en 30 (8 %) se encontraron lesiones compatibles con la enfermedad de Gumboro. De éstos, 20 corresponden a pollo de engorde con rangos de edad entre 30 y 90 días con el 90 % de presentación

alrededor de los 45 días, nueve corresponden a ponedora comercial con rangos de edad de 2 - 10 semanas con mayor frecuencia de presentación entre la cuarta y sexta semana y una explotación de pollo criollo de seis semanas.

Las lesiones encontradas en la bursa fueron: depleción linfoide (100 %) con un escala promedio de 3,4 (63 % grado 4 y 37 % grado 3), atrofia (77 %), repliegue epitelial (70 %), presencia de quistes epiteliales (56 %), quistes foliculares (50 %), infiltración de células inflamatorias intra o interfolicular (73 %) distribuidos en macrófagos y linfoplasmocitaria (37 %), heterófilos (20 %) y mixta (17 %), edema (23 %), linfocitosis (23 %), fibroplasia interfolicular (20 %), hiperplasia del epitelio folicular (17 %), presencia de granulomas foliculares (10 %) y hemorragia (7 %) (Fig. 1). En el 67% de los casos se analizó bazo, en el 60% timo y en el 26 % médula ósea con grados de depleción linfoide promedio de 2,6, 2,3 y 1,5 respectivamente. Las lesiones evidenciadas en timo fueron: depleción linfoide (100 %) medular y cortical (75 %), cortical (15 %), infiltración de células inflamatorias (100 %), linfocitosis (30 %), edema (27 %) y congestión (22 %). Las lesiones en bazo fueron: depleción linfoide en áreas T y B (100 %), hiperplasia reticuloendotelial (16 %) y linfocitosis (13 %). Por último en la médula ósea se observó hipoplasia o depleción de la línea mieloide en la totalidad de los casos.

Se encontraron lesiones en otros órganos relacionadas con infecciones concomitantes, manifestando los siguientes porcentajes de presentación: infecciones bacterianas en sistema músculo esquelético como tendinitis y osteomielitis (47 %), bronquitis y neumonía de origen bacteriano (30 %),

enteritis por *Coccidia* spp (27 %), hepatitis y/o miocarditis de origen bacteriano (24 %), traqueítis no granulocíticas de origen viral con o sin encefalitis compatibles con infecciones por el virus de la bronquitis infecciosa y/o Enfermedad de Newcastle (23 %), dermatitis de origen bacteriano y viral (10 %) y presencia de *Cryptosporidium* spp en epitelio bursal (10 %).

Distribución de genogrupos

En este estudio se analizaron 35 secuencias obtenidas a partir de muestras de bursas provenientes de unidades productivas de pollos de engorde (32), reproductoras (2) y ponedoras comerciales (1). Las granjas de pollo de engorde estaban ubicadas en dos departamentos: Cundinamarca (número de detecciones = 19) y Santander (n = 8), con un rango de edad de las aves a partir de las cuales se obtuvo la muestra entre 19 y 30 días. La procedencia no fue reportada en cinco de las muestras analizadas. Las dos detecciones de reproductoras con edades de 3 y 5 semanas se realizaron en Cundinamarca y la única muestra de ponedora comercial de 5 semanas de edad se ubicó en Antioquia (Fig. 2 y 3).

Después de la secuenciación, el análisis de la alineación de la región hVVP2 y el establecimiento de las relaciones filogenéticas se encontró que las 35 secuencias de este estudio se ubicaron en tres de los siete genogrupos reportados a nivel mundial (Michel y Jackwood, 2017). En el genogrupo 1 se clasificaron 24 secuencias (69,4 %), nueve en el genogrupo 2 (25 %) y dos en el genogrupo 4 (5,6 %). De las secuencias detectadas en lotes de pollos de engorde (n = 32), 23 se ubicaron en el genogrupo 1 (72 %), siete en el genogrupo 2 (22 %) y dos en el genogrupo 4 (6 %).

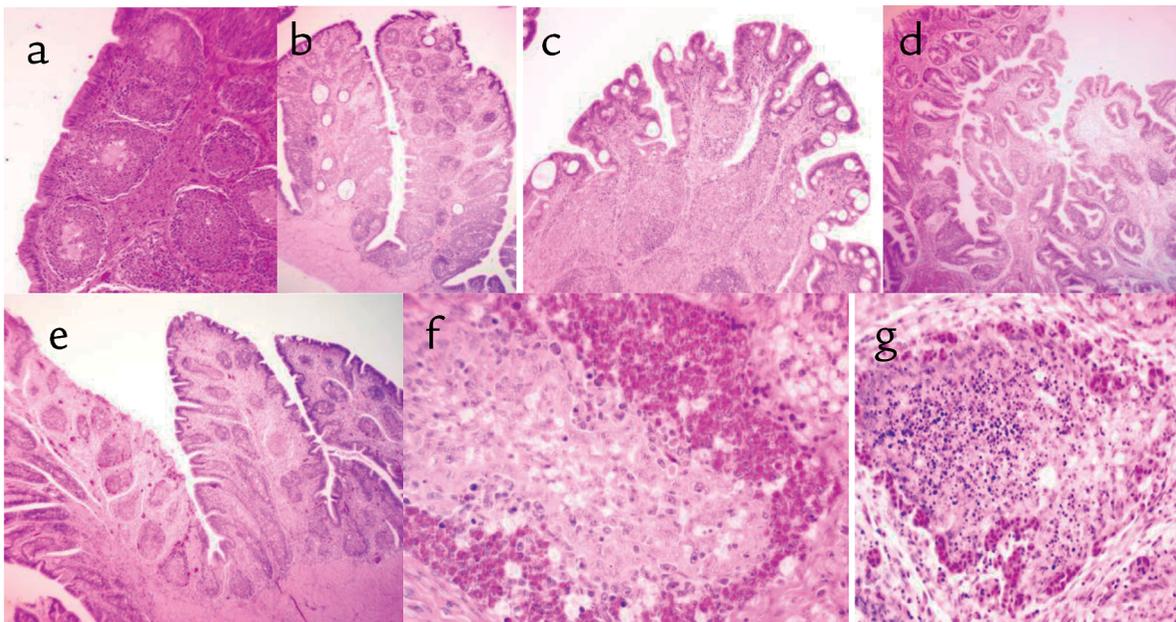


Figura 1. Lesiones histológicas en bursa de Fabricio compatibles con Enfermedad de Gumboro. HyE. a-d: diversos grados de depleción linfoide y atrofia; a: depleción linfoide centros germinales; b: quistes foliculares; c: quistes epiteliales; d: atrofia y repliegue epitelial; e: atrofia, inflamación y fibrosis interfolicular; f: detalle de infiltración por heterófilos a nivel folicular; g: linfocitosis y depleción linfoide marcada. b, d y e: 4x; a y c: 10x; f y g: 40x.

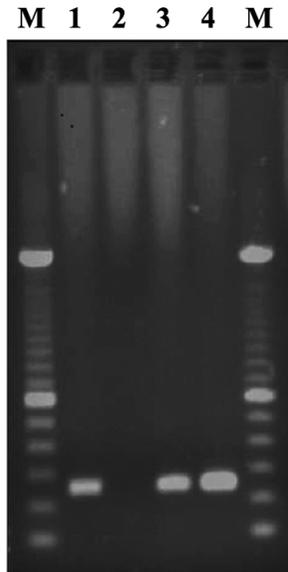


Figura 2. Imagen representativa del gel de electroforesis de RT-PCR positivas al gen VP2 del Virus de la Enfermedad de Gumboro (IBDV). M: marcador de peso molecular 100 pb; 1: control positivo que corresponde a una vacuna viva contra IBDV; 2: control negativo de reacción; 3 y 4: muestras de bursas positivas al gen VP2 del IBDV (tamaño del producto 235 pb).

Las dos secuencias obtenidas de muestras de reproductoras se ubicaron en los genogrupos 1 (secuencia identificada – ID como 1703) y 2 (ID 1601) y la muestra de ponedora comercial (ID 1810) en el genogrupo 1 (Fig. 4).

Las secuencias que se ubicaron en el genogrupo 1 presentaron mayor similitud genética (98,7 %) con la cepa de referencia Faragher 52/70 (AY321953.1), seguida de la cepa Cu-1wt (AF362747.1) (97,5 %). El menor porcentaje de similitud fue con la cepa Lukert (AY918948.1) (93,3 %) y D78 (AF499929.1) (93,4 %) (Tabla 1). Dos secuencias (ID 1701 de pollo de engorde y 1703 de reproductoras) evidenciaron mayor similitud con cepas vacunales (Fig. 4). Asimismo, el porcentaje de identidad entre ellas fue 97,5 %.

Las nueve secuencias del genogrupo 2 presentaron alta similitud genética (99 – 100 %) con cepas detectadas previamente en el país (DQ916183.1 y DQ916184.1) (Fig. 4). Sin embargo, al comparar las secuencias de aminoácidos se evidenció un cambio en la posición 254 de asparagina a serina (N254S) en seis de las nueve muestras. El porcentaje de identidad entre las nueve secuencias del estudio y cuatro cepas variantes de referencia fue 96,4 % (Tabla 1).

Las dos muestras que se ubicaron en el genogrupo 4 tuvieron una alta similitud genética (99 %) con la cepa

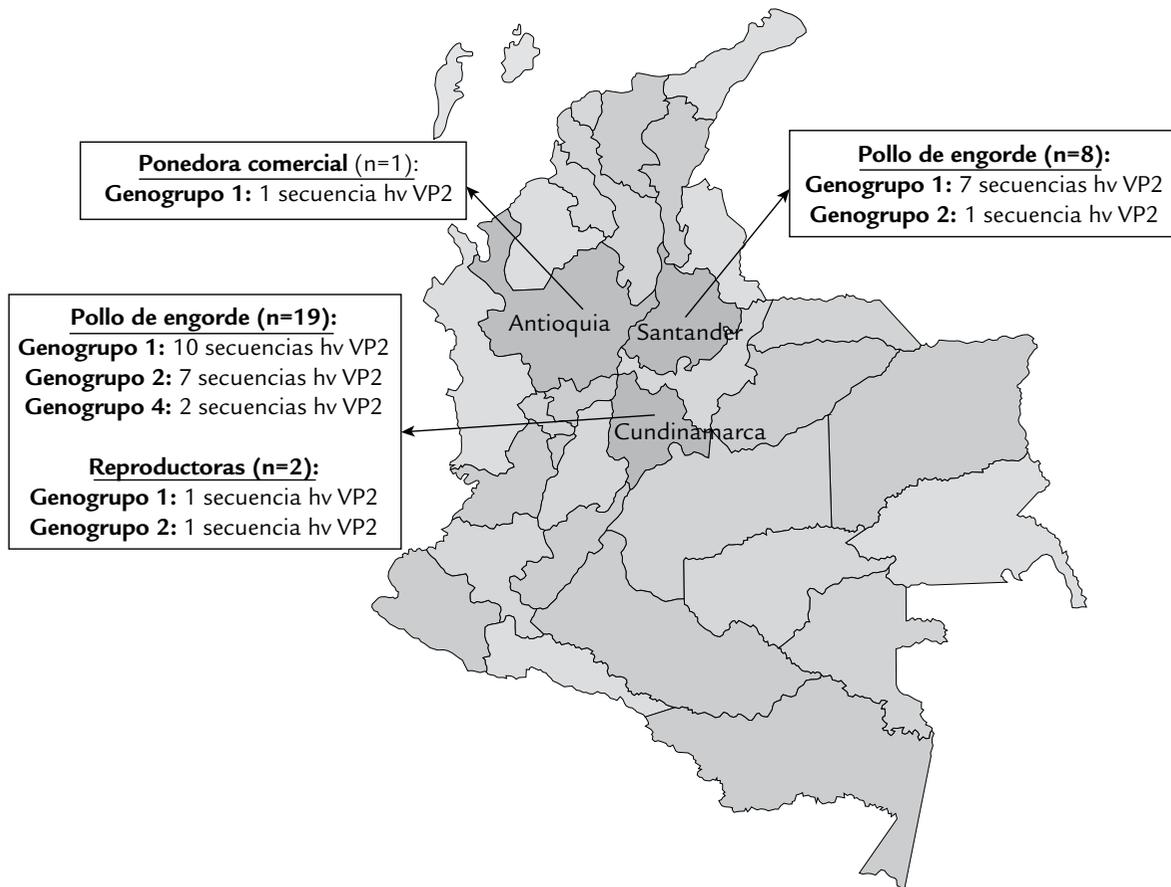


Figura 3. Distribución de genogrupos basados en el análisis de la hvVP2 del IBDV por tipo de unidad productiva (Pollo de engorde, Reproductora y Ponedora Comercial) y por Departamento. En cinco secuencias de pollos de engorde no se reportó la procedencia o la ubicación de las granjas.

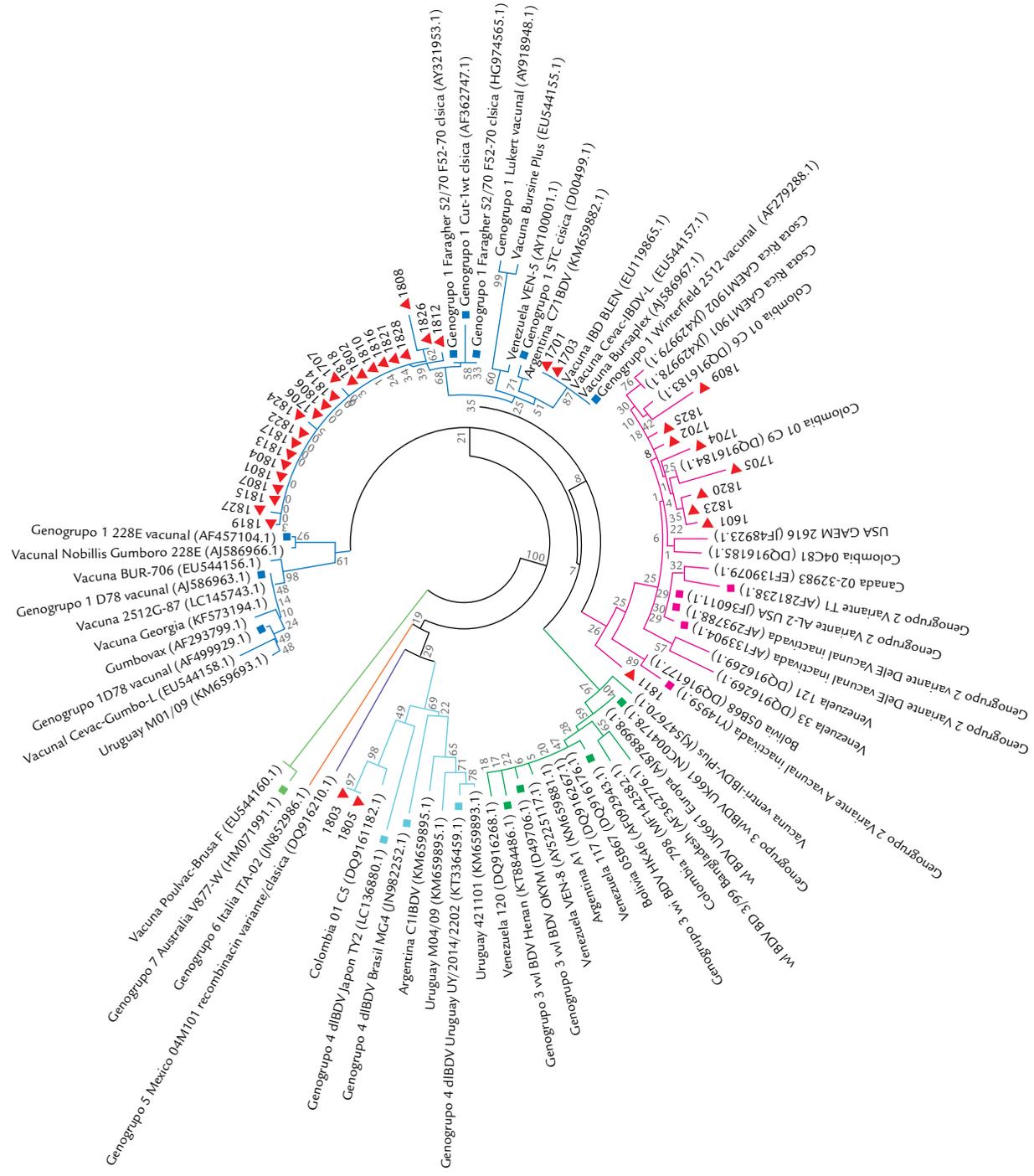


Figura 4. Distribución de las secuencias de la hvP2 de 32 detecciones del IBDV en granjas de pollos de engorde de Colombia. Las relaciones filogenéticas se infirieron utilizando el método de Neighbor-joining. Se muestra el árbol óptimo después del análisis de 1000 réplicas de bootstrap con la suma de la longitud de las ramas = 1,14404678. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método estadístico Maximum Composite Likelihood y están dadas en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Los análisis evolutivos se realizaron con el software MEGA 6.0. El color de las ramas representa el genogroup (azul: genogroup 1, rosa: 2, verde: 3, azul claro: 4, violeta: 5, naranja: 6 y verde claro: 7). Los cuadros de colores (*) corresponden a las cepas de referencia disponibles en GenBank de cada genogroup y los triángulos rojos (▲) a las secuencias del estudio.

Tabla 1. Porcentajes de identidad genética entre secuencias de la proteína viral VP2 y cepas de referencia de los genogrupos 1, 2 y 4 del virus de la enfermedad de Gumboro (IBDV).

Genogrupo 1																															
	1701	1703	1706	1707	1801	1804	1806	1807	1808	1810	1812	1813	1814	1815	1816	1817	1818	1819	1821	1822	1824	1826	1827	1828	R1	R2	R3	R4	R5	R6	
1701		98,6	96,6	95,0	96,2	96,6	96,2	96,2	95,0	96,5	95,4	96,6	96,2	96,1	96,6	96,6	96,4	96,6	96,6	96,2	95,4	95,7	96,2	96,2	95,4	94,2	96,6	93,4	95,4	97,0	
1703	98,6		96,0	94,4	95,6	96,0	95,6	95,6	94,4	95,9	95,2	96,0	96,0	95,9	96,0	96,0	95,8	96,0	96,0	95,6	94,8	95,0	95,6	95,6	95,6	94,4	96,0	93,6	94,8	97,6	
1706	96,6	96,0		98,4	99,6	100,0	99,2	99,6	98,4	100,0	98,8	100,0	99,6	99,6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,6	98,8	99,6	98,8	99,6	94,1	92,9	98,4	92,9	97,2	95,2	
1707	95,0	94,4	98,4		98,8	98,4	98,8	98,8	96,8	98,8	97,2	98,4	98,0	98,4	98,8	98,4	99,2	98,8	98,8	98,8	97,6	98,2	98,0	98,0	94,0	92,8	98,4	92,8	97,2	95,2	
1801	96,2	95,6	99,6	98,8		99,6	99,6	100,0	98,0	100,0	98,4	99,6	99,2	99,6	100,0	99,6	100,0	100,0	100,0	100,0	98,8	99,1	98,4	99,2	94,4	93,3	98,8	93,3	97,6	95,6	
1804	96,6	96,0	100,0	98,4	99,6		99,6	99,6	98,4	100,0	98,8	100,0	99,6	99,6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,6	98,8	99,5	99,6	99,6	94,8	93,6	99,2	93,6	98,0	96,0	
1806	96,2	95,6	99,2	98,8	99,6	99,6		99,6	98,0	100,0	98,4	99,6	99,2	99,6	100,0	99,6	100,0	100,0	100,0	100,0	98,8	99,1	98,8	98,8	94,8	93,6	99,2	93,6	98,0	96,0	
1807	96,2	95,6	99,6	98,8	100,0	99,6	99,6		98,0	100,0	98,4	99,6	99,2	99,6	100,0	99,6	100,0	100,0	100,0	100,0	98,8	99,1	98,4	99,2	94,4	93,3	98,8	93,3	97,6	95,6	
1808	95,0	94,4	98,4	96,8	98,0	98,4	98,0	98,0		98,4	97,2	98,4	98,0	98,0	98,4	98,4	98,3	98,4	98,4	98,0	97,2	98,6	98,0	98,0	94,0	92,8	97,6	92,4	96,4	94,4	
1810	96,5	95,9	100,0	98,8	100,0	100,0	100,0	100,0	98,4		98,8	100,0	99,6	99,6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,2	99,5	99,6	99,6	95,1	93,9	99,6	93,9	98,4	96,3	
1812	95,4	95,2	98,8	97,2	98,4	98,8	98,4	98,4	97,2	98,8		98,8	99,2	99,2	98,8	98,8	98,7	98,8	98,8	98,4	97,6	98,2	98,0	98,4	94,4	93,2	98,0	92,4	96,8	94,8	
1813	96,6	96,0	100,0	98,4	99,6	100,0	99,6	99,6	98,4	100,0	98,8		99,6	99,6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,6	98,8	99,6	99,2	99,6	94,8	93,6	99,2	93,6	98,0	96,0	
1814	96,2	96,0	99,6	98,0	99,2	99,6	99,2	99,2	98,0	99,6	99,2	99,6		100,0	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,2	98,4	99,1	98,8	99,2	94,4	93,2	98,8	93,2	97,6	95,6	
1815	96,1	95,9	99,6	98,4	99,6	99,6	99,6	99,6	98,0	99,6	99,2	99,6	100,0		99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	98,8	99,1	98,8	99,2	94,7	93,5	99,2	93,5	98,0	95,9	
1816	96,6	96,0	100,0	98,8	100,0	100,0	100,0	100,0	98,4	100,0	98,8	100,0	99,6	99,6		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	98,8	99,5	99,6	99,6	95,1	93,9	99,6	93,9	98,4	96,4	
1817	96,6	96,0	100,0	98,4	99,6	100,0	99,6	99,6	98,4	100,0	98,8	100,0	99,6	99,6	100,0		100,0	100,0	100,0	99,6	98,8	99,5	99,6	99,6	94,8	93,6	99,2	93,6	98,0	96,0	
1818	96,4	95,8	100,0	99,2	100,0	100,0	100,0	100,0	98,3	100,0	98,7	100,0	99,6	99,6	100,0	100,0		100,0	100,0	100,0	99,2	99,5	99,6	99,6	94,9	93,6	99,6	93,6	98,3	96,2	
1819	96,6	96,0	100,0	98,8	100,0	100,0	100,0	100,0	98,4	100,0	98,8	100,0	99,6	99,6	100,0	100,0	100,0		100,0	100,0	98,8	99,5	99,2	99,6	95,2	94,0	99,6	94,0	98,4	96,4	
1821	96,6	96,0	100,0	98,8	100,0	100,0	100,0	100,0	98,4	100,0	98,8	100,0	99,6	99,6	100,0	100,0	100,0	100,0		100,0	98,8	99,5	99,2	99,6	95,2	94,0	99,6	94,0	98,4	96,4	
1822	96,2	95,6	99,6	98,8	100,0	99,6	100,0	100,0	98,0	100,0	98,4	99,6	99,2	99,6	100,0	99,6	100,0	100,0	100,0		98,8	99,1	98,8	99,2	95,2	94,0	99,6	94,0	98,4	96,4	
1824	95,4	94,8	98,8	97,6	98,8	98,8	98,8	98,8	97,2	99,2	97,6	98,8	98,4	98,8	98,8	98,8	99,2	98,8	98,8	98,8		98,2	98,0	98,4	94,0	92,7	98,4	92,7	97,2	95,2	
1826	95,7	95,0	99,6	98,2	99,1	99,5	99,1	99,1	98,6	99,5	98,2	99,6	99,1	99,1	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,1	98,2		99,1	99,6	94,6	93,2	98,6	92,3	97,3	95,0	
1827	96,2	95,6	98,8	98,0	98,4	99,6	98,8	98,4	98,0	99,6	98,0	99,2	98,8	98,8	99,6	99,6	99,6	99,2	99,2	98,8	98,0	99,1		97,7	94,4	93,3	98,8	93,3	97,6	95,6	
1828	96,2	95,6	99,6	98,0	99,2	99,6	98,8	99,2	98,0	99,6	98,4	99,6	99,2	99,2	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,2	98,4	99,6	97,7		93,7	92,5	98,0	92,5	96,8	94,9	
R1	95,4	95,6	94,1	94,0	94,4	94,8	94,4	94,0	94,0	95,1	94,4	94,8	94,4	94,7	95,1	94,8	94,9	95,2	95,2	95,2	94,0	94,6	94,4	93,7		95,6	95,6	93,3	94,4	96,4	
R2	94,2	94,4	92,9	92,8	93,3	93,6	93,6	93,3	92,8	93,9	93,2	93,6	93,2	93,5	93,9	93,6	93,6	94,0	94,0	94,0	92,7	93,2	93,3	92,5	95,6		94,4	92,1	93,3	95,2	
R3	96,6	96,0	98,4	98,4	98,8	99,2	99,2	98,8	97,6	99,6	98,0	99,2	98,8	99,2	99,6	99,2	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	98,4	98,6	98,8	98,0	95,6	94,4		94,4	98,8	96,8
R4	93,4	93,6	92,9	92,8	93,3	93,6	93,6	93,3	92,4	93,9	92,4	93,6	93,2	93,5	93,9	93,6	93,6	94,0	94,0	94,0	92,7	92,3	93,3	92,5	93,3	92,1	94,4		93,3	94,4	
R5	95,4	94,8	97,2	97,2	97,6	98,0	98,0	97,6	96,4	98,4	96,8	98,0	97,6	98,0	98,4	98,0	98,3	98,4	98,4	98,4	97,2	97,3	97,6	96,8	94,4	93,3	98,8	93,3		95,6	
R6	97,0	97,6	95,2	95,2	95,6	96,0	96,0	95,6	94,4	96,3	94,8	96,0	95,6	95,9	96,4	96,0	96,2	96,4	96,4	96,4	95,2	95,0	95,6	94,9	96,4	95,2	96,8	94,4	95,6		

La primera fila y la primera columna corresponden a las muestras (identificadas con números) y a las cepas de referencia (identificadas con R). R1: 228E (AF457104.1); R2: D78 AF499929.1); R3: Faragher 52/70 (AY321953.1); R4: Lukert (AY918948.1); R5: Cu-1wt (AF362747.1) y R6: STC (D00499.1). Los porcentajes fueron calculados con el software Geneious Prime®.

Colombia01_C5 (DQ916182) del mismo genogrupo. Las secuencias de aminoácidos tuvieron el perfil representativo del genogrupo (272T, 289P, 290I y 296F). En las dos secuencias de aminoácidos de este estudio se encontró un cambio en la posición 280 de histidina a asparagina (H280N) al compararlas con las cepas de referencia de este

genogrupo. El porcentaje de identidad entre ellas y cepas de referencia fue 93,4 % (Tabla 1).

DISCUSIÓN

La IBD es una enfermedad inmunosupresora importante en las aves de producción, siendo considerada uno de los

Genogrupo 2													
	1601	1702	1704	1705	1809	1811	1820	1823	1825	R1	R2	R3	R4
1601		98,4	94,5	97,2	97,1	97,2	98,8	99,6	98,8	97,6	94,4	97,2	96,8
1702	98,4		94,5	96,8	97,5	96,8	98,4	98,8	98,8	97,6	94,4	97,2	96,0
1704	94,5	94,5		94,1	93,5	93,4	94,5	94,9	94,9	94,1	91,0	93,8	93,4
1705	97,2	96,8	94,1		95,4	96,6	97,6	98,0	97,2	96,4	93,2	96,0	96,4
1809	97,1	97,5	93,5	95,4		95,4	97,1	97,5	97,5	96,2	93,3	95,8	94,6
1811	97,2	96,8	93,4	96,6	95,4		97,6	98,0	97,2	96,4	93,6	96,0	95,6
1820	98,8	98,4	94,5	97,6	97,1	97,6		99,6	98,8	97,2	94,8	96,8	96,4
1823	99,6	98,8	94,9	98,0	97,5	98,0	99,6		99,2	98,0	94,4	97,6	97,2
1825	98,8	98,8	94,9	97,2	97,5	97,2	98,8	99,2		98,0	94,4	97,6	96,4
R1	97,6	97,6	94,1	96,4	96,2	96,4	97,2	98,0	98,0		96,0	99,6	98,4
R2	94,4	94,4	91,0	93,2	93,3	93,6	94,8	94,4	94,4	96,0		95,6	95,2
R3	97,2	97,2	93,8	96,0	95,8	96,0	96,8	97,6	97,6	99,6	95,6		98,0
R4	96,8	96,0	93,4	96,4	94,6	95,6	96,4	97,2	96,4	98,4	95,2	98,0	

R1: Variante AL-2 USA (JF736011.1); R2: Variante A (Y14959.1); R3 Variante DeLe (AF133904.1) y R4: Variante T1 (AF281238.1).

Genogrupo 4						
	1803	1805	R1	R2	R3	R4
1803		100,0	94,0	91,6	93,2	97,6
1805	100,0		94,0	91,6	93,2	97,6
R1	94,0	94,0		91,7	92,1	94,1
R2	91,6	91,6	91,7		90,9	92,1
R3	93,2	93,2	92,1	90,9		93,7
R4	97,6	97,6	94,1	92,1	93,7	

R1: Uruguay UY/2014/2202 (KT336459.1); R2: Brasil MG4 (JN982252.1); R3: Japon TY2 (LC136880.1) y R4: Colombia 01_C5 (DQ916182.1).

problemas más significativos para la industria avícola por las pérdidas económicas que ocasiona al tener impactos directos (mortalidad y bajos rendimientos productivos) e indirectos (infecciones secundarias y fallas en la vacunación) (van den Berg *et al.*, 2004). Mediante el análisis de los hallazgos histopatológicos de esta investigación se logró establecer que corresponden en su mayoría a lesiones depléticas y atróficas que son difíciles de interpretar sin la ayuda de otras pruebas diagnósticas y de datos de anamnesis completos. La mayoría de los casos son de unidades avícolas comerciales que cuentan con diversos planes vacunales que incluyen una o hasta tres dosis de vacunas vivas atenuadas intermedias o intermedias plus que pueden ocasionar lesión en el tejido. De todos los casos analizados, únicamente el 20 % correspondían a aves sin vacunación o que utilizaban una vacuna recombinante, lo que permitiría inferir que probablemente las lesiones evidenciadas fueron ocasionadas

por un virus de campo. De allí la importancia de un soporte de diagnóstico con otras pruebas que permitan esclarecer los IBDV circulantes. Asimismo, en el presente estudio fueron evidentes las lesiones ocasionadas por infecciones concomitantes, similar a lo reportado en presencia de cepas variantes (Lukert y Saif, 1997). Lo anterior sumado a la necesidad de evaluar y orientar las estrategias de prevención y control de la enfermedad, justifica la realización de investigaciones que busquen la caracterización de las cepas circulantes en campo, teniendo en cuenta la capacidad de cambios por mutación, recombinación y reordenamiento en los genes del IBDV que codifican dominios específicos de las proteínas inmunodominantes.

A través del análisis de la región hvVP2 realizado en este estudio, se lograron clasificar en genogrupos 35 detecciones moleculares provenientes de aves comerciales de granjas en Colombia. La contribución de esta proteína a las propiedades antigénicas del IBDV ha sido demostrada, debido a que es la única reconocida por anticuerpos neutralizantes y es la responsable de la unión a la célula huésped (Brandt *et al.*, 2001; Letzel *et al.*, 2007). La VP2 es una proteína de 441 aminoácidos que se ubica en la superficie del virus con tres dominios; el dominio P, comprendido entre los aminoácidos 206 a 350, es el que presenta la mayor variación debido a la presión de selección (Bayliss *et al.*, 1990). Los primers empleados en esta investigación amplifican una secuencia que codifica parte de esta región (aa 225 a 307), en la que se han reportado variaciones e incluso se recomienda su análisis para el seguimiento de cambios característicos del virus de diferentes zonas geográficas (Michel y Jackwood, 2017). Sin embargo, la proteína VP2 no es la única responsable de los fenotipos como el vv (Boot *et al.*, 2000).

Diversos estudios sugieren adicionalmente reordenamientos del segmento B (Hon *et al.*, 2006; Le Nouen *et al.*, 2006), por lo que se debería incluir el análisis de secuencias más grandes de los dos segmentos del virus para evidenciar la evolución en términos de mutaciones, recombinaciones o reordenamientos del material genético asociados con cambios antigénicos y por lo tanto, con la presentación de los cuadros clínicos en campo.

En este estudio se lograron clasificar las 35 detecciones en los genogrupos 1, 2 y 4, siendo la primera investigación en el país con este sistema propuesto por Michel y Jackwood en el 2017. La clasificación en genogrupos permite una mayor discriminación entre secuencias similares, al generar grupos politéticos que comparten una serie de características, de las cuales ninguna es esencial para pertenecer al grupo (van Regenmortel *et al.*, 1997). Otra de las ventajas de la clasificación en genogrupos es que permite la identificación precisa del fenotipo *w*, debido a que con la nomenclatura convencional (*c*, *sc* y *w*), algunas cepas clasificadas en el patotipo *w*IBDV no presentan los aminoácidos típicos (A222, I242, I256, I294 y S299) y los cambios en el genoma corresponden a reordenamientos del segmento B que no lo tienen las verdaderas cepas muy virulentas (Escaffre *et al.*, 2013).

El empleo de este sistema en la presente investigación permitió ubicar dos secuencias en el genogrupo 4, que por sus características genotípicas no se logran clasificar por el sistema convencional empleado en los laboratorios de diagnóstico. Los cambios en el genoma de las cepas del genogrupo 4 se atribuyen al *drift* antigénico, los cuales generan variaciones antigénicas (Tomás *et al.*, 2019). Estas variaciones se podrían reflejar en la baja efectividad de las vacunas disponibles para el control de la enfermedad (Jackwood y Sommer-Wagner, 2011); sin embargo, lo anterior no ha sido demostrado. El perfil de aminoácidos de las dos secuencias identificadas en el genogrupo 4 de esta investigación es similar al reportado en Suramérica (Hernández *et al.*, 2015), los cuales pertenecen a un linaje independiente de IBDV (*d*IBDV por distinto o distintivo) relacionado con cepas históricas de Europa y restringido a algunas áreas geográficas (Jackwood *et al.*, 2018). Estos linajes independientes también han sido reportados con cepas italianas, las cuales se clasifican en el genogrupo 6 (Lupini *et al.*, 2016). Adicionalmente, en las dos secuencias de este estudio se detectó el cambio H280N, el cual no ha sido reportado previamente en la literatura, por lo que se recomienda realizar el seguimiento para conocer las implicaciones que puede tener en la antigenicidad y la patogenicidad en campo, aún más considerando que fue el genogrupo con el menor porcentaje de identidad entre secuencias y cepas de referencia.

Las secuencias del genogrupo 1 evidenciaron los aminoácidos típicos de cepas clásicas en la región *h*VP2, siendo el grupo con el mayor porcentaje de identidad genética entre las mismas secuencias y con cepas de referencia al

compararlo con los porcentajes de los otros dos genogrupos identificados en este estudio. A diferencia del genogrupo 4, este grupo politético se encuentra distribuido alrededor del mundo y corresponde a cepas predominantemente clásicas (Jackwood *et al.*, 2018).

Las secuencias del genogrupo 2 también evidenciaron el patrón de aminoácidos típicos de cepas variantes previamente reportado (Michel y Jackwood, 2017); sin embargo, el porcentaje de identidad entre secuencias y cepas de referencia fue menor al evidenciado en el genogrupo 1. Particularmente, en seis secuencias se detectó el cambio N254S con relación a cepas aisladas de Colombia y reportadas por Jackwood y Sommer-Wagner en el 2007. Este cambio adicional fue también evidenciado en cepas de Colombia y México en un estudio previo (Jackwood, 2012), por lo que se considera que hace parte del perfil de aminoácidos en el dominio P_{DE} de algunas cepas variantes y posiblemente se genera por uno o más eventos de recombinación (Jackwood, 2012). Los eventos de recombinación en el segmento A del genoma han involucrado cepas de vacunas atenuadas de IBDV (Hon *et al.*, 2008), variantes y *w*IBDV (He *et al.*, 2009). Nuevamente se reitera la necesidad de corroborar la importancia de estos cambios en la antigenicidad de los IBDV mediante estudios inmunológicos, incluyendo ensayos de vacunación/desafío, lo cual implica el desarrollo de protocolos con estándares internacionales (Jackwood, 2012).

A pesar de la necesidad de realizar pruebas *in vivo* para determinar la antigenicidad y la patogenicidad de las cepas de IBDV que circulan en campo, se debe considerar la complejidad que existe en el montaje y las diferencias que se pueden presentar en los resultados de estos ensayos en los distintos laboratorios (Jackwood *et al.*, 2018). De esta forma, los análisis de secuencias de nucleótidos y la clasificación en genogrupos se proponen como una opción de diagnóstico y seguimiento de los cambios evolutivos del IBDV, al generar datos consistentes que pueden ser divulgados en documentos científicos y bases de datos internacionales, haciendo posible la comparación entre secuencias de este virus dentro del país y entre países. Asimismo, se debe buscar la estandarización de la secuencia a analizar, generando un sistema internacional de clasificación aceptado y comparable a nivel internacional (Jackwood *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

Estos hallazgos demuestran las lesiones histopatológicas de órganos inmunes en aves comerciales, producto de la presencia de virus o factores inmunosupresores, lo cual aumenta la susceptibilidad a infecciones con patógenos oportunistas y afecta las respuestas a vacunas y tratamientos. A pesar de los esfuerzos en vacunación, por los cambios del virus se vuelve difícil su control. Los resultados de esta investigación demuestran la variación entre los genogrupos,

justificando la necesidad de implementar modelos de clasificación específicos en los laboratorios de diagnóstico veterinario en el país. Esto generará una mejor comprensión de los cuadros clínicos en campo, que a su vez orientará el diseño y la implementación de estrategias de control de esta enfermedad en la industria avícola nacional e internacional.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a Catalina Torres por el apoyo en el Laboratorio de Patología Aviar de la Universidad Nacional de Colombia, Andrés Pinzón del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia y Javier Andrés Jaimes-Olaya de Cornell University por la asesoría en los análisis bioinformáticos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

REFERENCIAS

- Banda A, Villegas P, El-Attrache J. Molecular characterization of infectious bursal disease virus from commercial poultry in the United States and Latin America. *Avian Dis.* 2003;47(1):87-95. Doi: [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2003\)047\[0087:MCOIBD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2003)047[0087:MCOIBD]2.0.CO;2)
- Bayliss CD, Spies U, Shaw K, Peters RW, Papageorgiou A, Müller H, *et al.* A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J Gen Virol.* 1990;71:1303-1312. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-6-1303>
- Birghan C, Mundt E, Gorbalenya AE. A non-canonical Lon proteinase lacking the ATPase domain employs the Ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *EMBO J.* 2000;19(1):114-123. Doi: <https://doi.org/10.1093/emboj/19.1.114>
- Boot HJ, ter Huurne AA, Hoekman AJ, Peeters BP, Gielkens AL. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *J Virol.* 2000;74(15):6701-6711. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.74.15.6701-6711.2000>
- Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert RA, Vakharia VN. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J Virol.* 2001;75(24):11974-11982. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.24.11974-11982.2001>
- Cheville NF. Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen, and thymus of the chicken. *Am J Pathol.* 1967;51(4):527-551.
- Cosgrove A. An Apparently New Disease of Chickens: Avian Nephrosis. *Avian Dis.* 1962;6(3):385-389. Doi: <https://doi.org/10.2307/1587909>
- Coulibaly F, Chevalier C, Gutsche I, Pous J, Navaza J, Bressanelli S, *et al.* The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell.* 2005;120(6):761-772. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.009>
- Dobos P, Hill BJ, Hallett R, Kells DT, Becht H, Teninges D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol.* 1979;32(2):593-605.
- Escaffre O, Le Nouen C, Amelot M, Ambroggio X, Ogden KM, Guionie O, *et al.* Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J Virol.* 2013;87(5):2767-2780. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.02360-12>
- Fellahi S, El Harrak M, Kuhn JH, Sebbar G, Bouaiti EA, Khataby K, *et al.* Comparison of SYBR green I real-time RT-PCR with conventional agarose gel-based RT-PCR for the diagnosis of infectious bronchitis virus infection in chickens in Morocco. *BMC Res Notes.* 2016;9:231. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2037-z>
- He C-Q, Ma L-Y, Wang D, Li G-R, Ding N-Z. Homologous recombination is apparent in infectious bursal disease virus. *Virology.* 2009;384(1):51-58. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.009>
- Hernández M, Tomas G, Marandino A, Iraola G, Maya L, Mattion N, *et al.* Genetic characterization of South American infectious bursal disease virus reveals the existence of a distinct worldwide-spread genetic lineage. *Avian Pathol.* 2015;44(3):212-221. Doi: <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1025696>
- Hon C-C, Lam T-Y, Drummond A, Rambaut A, Lee Y-F, Yip C-W, *et al.* Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent infectious bursal disease virus and reassortment of its genome segment B. *J Virol.* 2006;80(17):8503-8509. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00585-06>
- Hon C-C, Lam TT-Y, Yip C-W, Wong RT-Y, Shi M, Jiang J, *et al.* Phylogenetic evidence for homologous recombination within the family Birnaviridae. *J Gen Virol.* 2008;89(Pt 12):3156-3164. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/004101-0>
- ICA. Boletín epidemiológico anual, Sanidad animal. Colombia: Editorial Produmedios; 2015. 45 p.
- Ikuta N, El-Attrache J, Villegas P, Garcia EM, Lunge VR, Fonseca AS, *et al.* Molecular characterization of Brazilian infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 2001;45(2):297-306.
- Jackwood D, Sommer S, Knoblich H. Amino Acid comparison of infectious bursal disease viruses placed in the same or different molecular groups by RT-PCR-RFLP. *Avian Dis.* 2001;45(2):330-339. Doi: <https://doi.org/10.2307/1592972>
- Jackwood DJ, Sommer SE. Molecular studies on suspect very virulent infectious bursal disease virus genomic RNA samples. *Avian Dis.* 2005;49(2):246-251. Doi: <https://doi.org/10.1637/7294-102604R>
- Jackwood DJ, Cookson KC, Sommer-Wagner SE, Le Galludec H, de Wit JJ. Molecular characteristics of infectious bursal disease viruses from asymptomatic broiler flocks in Europe. *Avian Dis.* 2006;50(4):532-536. Doi: <https://doi.org/10.1637/7528-032006R1.1>

- Jackwood DJ, Sommer-Wagner S. Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virology*. 2007;365(2):369-375. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.046>
- Jackwood D, Sommer-Wagner S. Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease Birmavirus (IBDV). *Virology*. 2011;409(1):33-37. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.09.030>
- Jackwood D. Molecular epidemiologic evidence of homologous recombination in infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*. 2012;56(3):574-577. Doi: <https://doi.org/10.1637/10053-010912-ResNote.1>
- Jackwood DJ, Schat KA, Michel LO, de Wit S. A proposed nomenclature for infectious bursal disease virus isolates. *Avian Pathol*. 2018;47(6):576-584. Doi: <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1506092>
- Kibenge FS, Dhillon AS, Russell RG. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*. 1988;69 (Pt 8):1757-1775. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-8-1757>
- Le Nouen C, Rivallan G, Toquin D, Darlu P, Morin Y, Beven V, *et al*. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 1):209-216. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.81184-0>
- Letzel T, Coulibaly F, Rey FA, Delmas B, Jagt E, van Loon AAMW, *et al*. Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease Virus. *J Virol*. 2007;81(23):12827 LP-12835. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01501-07>
- Liu J, Zhou J, Kwang J. Antigenic and molecular characterization of recent infectious bursal disease virus isolates in China. *Virus Genes*. 2002;24(2):135-147. Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1014568532292>
- Lukert PD, Leonard J, Davis RB. Infectious bursal disease virus: antigen production and immunity. *Am J Vet Res*. 1975;36(4 Pt 2):539-540.
- Lukert PD, Saif YM. Infectious Bursal Disease. En: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDonald LR, Saif YM, editores. *Diseases of Poultry*. Tenth. United States: Iowa State University Press, Ames/Mosby-Wolfe, London; 1997. p. 721-738.
- Lupini C, Giovanardi D, Pesente P, Bonci M, Felice V, Rossi G, *et al*. A molecular epidemiology study based on VP2 gene sequences reveals that a new genotype of infectious bursal disease virus is dominantly prevalent in Italy. *Avian Pathol*. 2016;45(4):458-464. Doi: <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1165792>
- McNulty MS, Allan GM, McFerran JB. Isolation of infectious bursal disease virus from Turkey. *Avian Pathol*. 1979;8(3):205-212. Doi: <https://doi.org/10.1080/03079457908418346>
- Michel LO, Jackwood DJ. Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Arch Virol*. 2017;162(12):3661-3670. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3500-4>
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987;4(4):406-425. Doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sapats SI, Ignjatovic J. Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia. *Arch Virol*. 2000;145(4):773-785.
- Schnitzler D, Bernstein F, Müller H, Becht H. The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*. 1993;74:1563-1571. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-8-1563>
- Sharma JM, Dohms JE, Metz AL. Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of specific - Pathogen-free chickens. *Avian Dis*. 1989;33(1):112-124.
- Skeeles JK, Lukert PD, De Buyscher E V, Fletcher OJ, Brown J. Infectious bursal disease viral infections. I. Complement and virus-neutralizing antibody response following infection of susceptible chickens. *Avian Dis*. 1979;23(1):95-106.
- Snyder DB, Lana DP, Cho BR, Marquardt WW. Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. *Avian Dis*. 1988;32(3):527-534. Doi: <https://doi.org/10.2307/1590923>
- Snyder DB, Vakharia VN, Savage PK. Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. *Arch Virol*. 1992;127(1-4):89-101.
- Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(30):11030-11035. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30(12):2725-2729. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tomás G, Marandino A, Courtillon C, Amelot M, Keita A, Pikula A, *et al*. Antigenicity, pathogenicity and immunosuppressive effect caused by a South American isolate of infectious bursal disease virus belonging to the “distinct” genetic lineage. *Avian Pathol*. 2019;48(3):245-254. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1572867>
- van den Berg TP, Morales D, Eterradosi N, Rivallan G, Toquin D, Raue R, *et al*. Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. *Avian Pathol*. 2004;33(5):470-476. Doi: <https://doi.org/10.1080/03079450400003650>
- van Regenmortel MHV, Bishop DHL, Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Calisher CH. Guidelines to the demarcation of virus species. *Arch Virol*. 1997;142(7):1505-1518.
- Yamaguchi T, Kasanga CJ, Terasaki K, Maw MT, Ohya K, Fukushi H. Nucleotide sequence analysis of VP2 hypervariable domain of infectious bursal disease virus detected in Japan from 1993 to 2004. *J Vet Med Sci*. 2007;69(7):733-738. Doi: <https://doi.org/10.1292/jvms.69.733>