



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

*Estudio de la patogenia del Virus de Influenza Aviar de Baja  
Patogenicidad en aves de corral inmunosuprimidas por la  
infección con el Virus de la Anemia Infecciosa Aviar*

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área  
Química Biológica

**Agustina Rimondi**

Director: Dr. Ariel Julián Pereda

Directora Asistente: Dra. María Isabel Craig

Consejero de Estudios: Dr. Gabriel Rabinovich

Lugar de Trabajo: Laboratorio Aves y Porcinos, Instituto de Virología, INTA Castelar

Buenos Aires, 2014

# INDICE

Resumen	v
Abstract	vii
Abreviaturas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1-17
1.1 Virus de Influenza	1-9
1.1.1 Clasificación	1
1.1.2 Virus de Influenza A	1
1.1.2.1 Morfología y estructura del virión	2
1.1.2.2 Propiedades de la partícula viral	3
1.1.2.3 Genoma y proteínas virales	4
1.1.2.4 Ciclo de replicación viral	6
1.1.2.5 División en subtipos y cepas	8
1.2 Enfermedad de Influenza Aviar	9-13
1.2.1 Generalidades	9
1.2.2 Patogenia	9
1.2.3 Pérdidas económicas asociadas a la enfermedad	10
1.2.4 Riesgo para la Salud Pública	11
1.2.5 Vigilancia	12
1.3 Sanidad animal en la industria avícola	13-17
1.3.1 Generalidades	13
1.3.2 Sanidad animal en la avicultura nacional	13
1.3.3 Inmunosupresión de las aves de corral y sus consecuencias	14
1.3.4 Virus de la Anemia Infecciosa Aviar	14
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVOS	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20-40
4.1 Aislamiento y caracterización molecular de los Virus de Influenza Aviar en la Argentina	20-22
4.1.1 Obtención de muestras de aves silvestres	20
4.1.2 Detección del Virus de Influenza Aviar	21

4.1.2.1 Extracción de ARN viral	21
4.1.2.2 Síntesis de ADN complementario	21
4.1.2.3 PCR en tiempo real	21
4.1.3 Aislamiento del Virus de Influenza Aviar	21
4.1.4 Secuenciación del genoma del Virus de Influenza Aviar	22
4.1.5 Análisis filogenético del Virus de Influenza Aviar	22
4.2 Inmunosupresión subclínica de pollos SPF con variantes autóctonas del Virus de la Anemia Infecciosa Aviar	23-31
4.2.1 Aislamientos de CAV presentes en la población avícola comercial del país	23
4.2.2 Amplificación y secuenciación del genoma de CAV	23
4.2.3 Preparación de los inóculos de CAV	24
4.2.4 Cuantificación de inóculos de CAV por PCR cuantitativa en tiempo real	24
4.2.4.1 Extracción del ADN de los inóculos de CAV	24
4.2.4.2 Reactivos para la qPCR	24
4.2.4.3 Condiciones de ciclado para la qPCR	25
4.2.4.4 Curva estándar en la qPCR	25
4.2.4.5 Análisis de los resultados	26
4.2.5 Inmunosupresión subclínica de pollos SPF con cepas autóctonas de CAV	26
4.2.5.1 Evaluación de la infección con CAV a diferentes tiempos post infección	26
4.2.5.2 Infección experimental con diferentes cepas autóctonas de CAV	27
4.2.5.3 Infección experimental de pollos SPF con las cepas CAV-10 y CAV-18	28
4.2.6 Observación de lesiones macroscópicas por la infección con CAV	28
4.2.7 Determinación del daño histopatológico producido por CAV	29
4.2.8 Citometría de flujo	30
4.2.8.1 Obtención de suspensiones de células de timo y bazo	30
4.2.8.2 Aislamiento de células mononucleares de timo y bazo	30
4.2.8.3 Marcación de células mononucleares con anticuerpos monoclonales	30
4.2.9 Detección de anticuerpos anti-CAV	31
4.3 Estudio de replicación y transmisión de LPAIV de subtipo H6 en pollos SPF inmunocompetentes	31-35
4.3.1 LPAIV de subtipo H6 utilizados	31
4.3.2 Preparación de glóbulos rojos de gallina	32
4.3.3 Ensayo de hemaglutinación (HA)	32
4.3.4 Titulación de LPAIV en huevos SPF	33

4.3.5	Diseño experimental para los estudios de replicación y transmisión	33
4.3.6	Detección de anticuerpos específicos anti-AIV	34
4.3.6.1	ELISA de competición comercial (IDVet	34
4.3.6.2	Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI)	34
4.3.6.2.1	Preparación de los sueros a titular	35
4.3.6.2.2	Titulación de anticuerpos anti-HA mediante HI	35
4.4	Estudio de replicación y transmisión de LPAIV de subtipo H6 en pollos SPF inmunocompetentes o inmunosuprimidos previamente con el Virus de la Anemia Infecciosa Aviar	35-39
4.4.1	Diseño experimental para los estudios de invasión, replicación y transmisión de 557/H6N2	35
4.4.1.1	Inmunosupresión generada por CAV-10	37
4.4.1.2	Estudio de invasión, replicación y transmisión de 557/H6N2 en pollos SPF con diferente estado inmunológico	37
4.4.2	Cuantificación del título de ARN viral	38
4.4.2.1	Curva estándar para la cuantificación de ARN viral por PCR en tiempo real	38
4.4.3	Daño histopatológico producido por la cepa de AIV 557/H6N2	39
4.5	Análisis estadístico	40
4.6	Bienestar animal	40
5.	RESULTADOS	41-90
5.1	Aislamiento y caracterización molecular de los Virus de Influenza Aviar en la Argentina	41-63
5.1.1	Muestras analizadas	41
5.1.2	Detección y aislamiento de Virus de Influenza Aviar en la Argentina	43
5.1.3	Análisis filogenético del Virus de Influenza Aviar	44
5.1.3.1	Genes de proteínas internas	46
5.1.3.2	Genes de proteínas de superficie	52
5.2	Inmunosupresión subclínica de pollos SPF con variantes autóctonas del Virus de la Anemia Infecciosa Aviar	63-76
5.2.1	Determinación del tiempo pos-infección con mayor inmunosupresión	63

5.2.2 Comparación del grado de inmunosupresión generado con diferentes aislamientos de CAV autóctonos en aves de corral SPF experimentalmente infectadas	65
5.2.3 Estudio comparativo de la inmunosupresión generada por la cepa autóctona CAV-10 y CAV-18 en pollos SPF	67
5.3 Estudio de replicación y transmisión de LPAIV de subtipo H6 en pollos SPF inmunocompetentes	67-80
5.4 Estudio de replicación y transmisión de LPAIV de subtipo H6 en pollos SPF inmunocompetentes o inmunosuprimidos previamente con CAV-10	80-90
6. DISCUSIÓN	91-103
7. CONCLUSIONES	104-105
8. BIBLIOGRAFÍA	106-115
9. ANEXO	116

# Estudio de la patogenia del Virus de Influenza Aviar de Baja Patogenicidad en aves de corral inmunosuprimidas por la infección con el Virus de la Anemia Infecciosa Aviar

La Influenza Aviar es considerada una zoonosis con potencial pandémico. El agente etiológico responsable de esta enfermedad es el Virus de Influenza A, cuyo reservorio natural son las aves silvestres acuáticas. En ellas, la infección con el Virus de Influenza Aviar (AIV) generalmente es asintomática, mientras que en las aves de corral la infección con AIV puede producir una variedad de síntomas que se extienden desde presentaciones asintomáticas o suaves a una enfermedad aguda y fatal. En consecuencia, se generan grandes pérdidas económicas asociadas al control y erradicación de este agente en las aves domésticas. Por ello, en la presente tesis nos propusimos estudiar, primero, la presencia del AIV en las aves silvestres acuáticas de la Argentina y, luego, su introducción y difusión en aves de corral con diferente estado inmunológico.

Los resultados obtenidos permitieron evidenciar la circulación de veinte Virus de Influenza Aviar de Baja Patogenicidad (LPAIV) de diversos subtipos en las aves silvestres que habitan en la Argentina. Estos LPAIV aislados presentaron características genéticas particulares en sus genes que los diferencian de los AIV aislados en otras regiones. En particular, se evidenció la existencia de un linaje Sudamericano con evolución independiente para los seis genes que codifican las proteínas internas del Virus de Influenza Aviar.

Debido a que la mayoría de los LPAIV aislados en nuestro país fueron de subtipo H6, se estudió la patogenia de estos virus en las aves de corral. Los resultados demostraron que estos virus de subtipo H6 tienen capacidad de infectar pollos y de transmitirse por contacto, evidenciando el riesgo potencial de introducción de estos virus en las aves de corral.

Por otra parte, se sabe que en la Argentina, como en cualquier país con una producción avícola intensiva, existe una alta incidencia del Virus de Anemia Infecciosa Aviar (CAV) dentro de los planteles de aves domésticas. Actualmente, se carece de conocimiento acerca de la importancia que puede tener el estado de inmunosupresión provocado por este agente en la evolución de la patogenia del AIV. Por ello, en el trabajo de tesis que se presenta a continuación se estudió de patogenia del LPAIV subtipo H6 en pollos inmunosuprimidos experimentalmente por la infección con una cepa de CAV autóctona. Los resultados obtenidos demostraron que el AIV utilizado, aislado de aves silvestres en la Argentina, tiene igual capacidad de infectar pollos y de transmitirse por contacto directo en aves inmunocompetentes e inmunosuprimidas con CAV.

En conjunto, los resultados presentados en esta tesis permiten colaborar con mejores análisis de riesgo para el diseño de estrategias de control y prevención con el objetivo de proteger las aves domésticas de nuestro país. Además, haber aumentado la información acerca de la epidemiología de la Influenza Aviar en la región es de suma importancia para comprender en mayor profundidad las potenciales consecuencias de esta enfermedad, tanto en las aves silvestres como en las aves domésticas. Sumado a esto último, es importante destacar que la Influenza Aviar es una zoonosis, con lo cual el aumento de la información disponible sobre este agente infeccioso es de relevancia para el sistema de Salud Pública nacional.

PALABRAS CLAVES: Influenza Aviar en aves silvestres

Filogenia de cepas de AIV argentinas

Patogenia de AIV subtipo H6 argentinos en pollos

Inmunosupresión

Virus de la Anemia Infecciosa Aviar

Alteración de la timopoyesis en pollos

Depleción de timocitos y esplenocitos

# Pathogenesis of Low Pathogenic Avian Influenza Virus in chicken immunosuppressed by infection with Chicken Anemia Virus

Avian influenza is considered a zoonosis with pandemic potential. The etiologic agent responsible for this disease is influenza A virus, whose natural reservoir are aquatic wild birds. In this species, the infection with Avian Influenza Virus (AIV) is generally asymptomatic, while in poultry AIV infection can cause a variety of symptoms ranging from asymptomatic or mild presentations to an acute and fatal disease. Consequently, there are large economic losses associated with control and eradication of this agent in commercial sheds. Therefore, in this thesis we intended to study the presence of AIV in wild aquatic birds circulating in Argentina and their possible introduction and spread in poultry with different immunologic status.

The results obtained showed the circulation of twenty Low Pathogenic Avian Influenza Virus (LPAIV) from wild birds in Argentina. These viruses were from different subtype and all showed particular genetic characteristics in their genes that differ from AIV isolated in other regions. Particularly, genetic and phylogenetic analyses of their internal gene segments revealed a close relationship with influenza viruses from South America, forming a unique clade and supporting the notion of independent evolution from influenza A viruses in other latitudes.

Due to AIV from H6 subtype were most consistently isolated in Argentina, we investigated the replication and transmission of these Argentine H6 AIV in poultry. The results suggested that these Argentine H6 viruses could replicate and transmit in chickens, demonstrating the potential risk of introduction of these viruses in poultry.

It is known that in Argentina, as in any country with intensive poultry production, there is a high incidence of Chicken Infectious Anemia Virus (CAV) in commercial flocks. Currently, there is a lack of knowledge about the importance of the immunosuppression caused by this agent in the evolution of the pathogenesis of AIV. Therefore, in this thesis we studied the pathogenesis of LPAIV H6 subtype in chickens experimentally immunosuppressed by infection with an Argentinean field CAV strain. The results obtained showed that, under our experimental conditions, Argentinean H6 AIVs have equal ability to infect chickens and be transmitted as a result of direct contact, either in immunocompetent chickens or immunosuppressed chickens with CAV.

Overall, the results presented in this thesis allow cooperate with better risk analysis for the design of prevention and control strategies to protect commercial poultry farms in our country. Also, it



has increased the information about the epidemiology of AIV in South America, critical to understand in greater depth the potential consequences of this disease in both wild birds and domestic poultry. In addition, it is noteworthy that avian influenza is a zoonosis, thereby our results increase the information available on this infectious agent which is relevant to the national public health system.

KEYWORDS: Avian Influenza in wild birds

Phylogeny of Argentinean AIV strains

Pathogenesis of H6 AIV from Argentina in chickens

Immunosuppression

Chicken Infectious Anemia Virus

Alterations in chicken thymopoiesis

Thymocyte and splenocyte depletion

## ABREVIATURAS

ADN = ácido desoxiribonucleico

ADNc = ADN copia

AIV = Virus de Influenza Aviar (*Avian Influenza Virus*)

ARN = ácido ribonucleico

ARNc = ARN complementario

ARNm = ARN mensajero

ARNv = ARN viral

CAV = Virus de Anemia Infecciosa Aviar (*Chicken Anemia Virus*)

CT = ciclo umbral (*Cycle Threshold*)

CsA = Ciclosporina A

DP = Doble Positivas (CD4+CD8 $\alpha$ +)

dpi = días post infección

EID<sub>50</sub> = Dosis Infecciosas 50% en Embrión de pollo

EIV = Virus de Influenza Equina (*Equine Influenza Virus*)

G1 = Puerta 1 (*Gate 1*)

G2 = Puerta 2 (*Gate 2*)

G3 = Puerta 3 (*Gate 3*)

HA = ensayo de hemaglutinación

HE = hematoxilina y eosina

HI = ensayo de inhibición de la hemaglutinación

HP = alta patogenicidad

HPAIV = Virus de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (*High Pathogenic Avian Influenza Virus*)

IA = Influenza Aviar

LP = baja patogenicidad

LPAIV = Virus de Influenza aviar de Baja Patogenicidad (*Low Pathogenic Avian Influenza Virus*)

LTc = linfocitos T citotóxicos

LTh = linfocitos T helper

MP = moderada patogenicidad

NLS = señales de localización nuclear

ORF = marco abierto de lectura

PCR = reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

pi = post infección

qPCR = PCR cuantitativa en tiempo real

R4 = Región 4

R5 = Región 5

RDE = Enzima Destructora de Receptores

RNP = ribonucleoproteico o ribonucleoproteínas

rRT-PCR = RT-PCR en tiempo real

RT = reacción de transcripción reversa (*reverse transcription*)

RT-qPCR = RT-PCR cuantitativa en tiempo real

SPF = libres de patógenos específicos

UHA = Unidades Hemaglutinantes

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Virus de Influenza

### 1.1.1 Clasificación:

El virus de influenza, o virus de la gripe, es miembro de la familia *Orthomyxoviridae*, la cual está dividida en cinco géneros: Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C, Thogotovirus e Isavirus. Estos géneros tienen varias características en común, pero lo que los agrupa dentro de la familia *Orthomyxoviridae* es que tienen un genoma de ARN segmentado, de cadena simple y polaridad negativa, el cual se duplica dentro del núcleo de las células infectadas [1].

La división del virus de Influenza en diferentes géneros o tipos, Influenzavirus A, B, o C se basa en la reactividad cruzada de los sueros a los antígenos virales internos, mientras que las cepas dentro de un mismo género son distinguidas por las características antigénicas de sus glicoproteínas superficiales [1].

### 1.1.2 Virus de Influenza A:

Extensos estudios epidemiológicos han revelado que el virus de influenza A puede infectar un amplio rango de huéspedes, incluyendo diversos tipos de aves, seres humanos, cerdos, caballos, perros, gatos y otros mamíferos [2]. De todas estas especies, las aves silvestres acuáticas son el huésped natural del virus de influenza tipo A, dado que en ellas se han detectado y aislado todos los subtipos virales conocidos hasta el momento [3]. Estas aves pertenecen principalmente al orden Anseriformes (patos, gansos, cisnes) y Charadriiformes (gaviotas, gaviotines, playeritos). Las principales células target de infección por el virus de influenza A son las células epiteliales del tracto digestivo y, en menor medida, las células del tracto respiratorio [4, 5]. Las aves pueden excretar altas concentraciones de virus en las heces [4, 6], y evidencia de esto es que ha sido posible aislar virus de muestras de agua de lagos donde las aves silvestres han anidado o congregado antes de la migración. Algunos estudios realizados en patos salvajes durante los años 1975 y 1999 en Canadá revelaron una tasa de transmisión del 20% en las aves jóvenes [7]. Por lo tanto, las heces y las aguas contaminadas son consideradas una de las principales vías de transmisión del Virus de Influenza Aviar (AIV) entre las aves silvestres.

Por otro lado, el virus de influenza A también ha sido aislado de aves domésticas como gallinas, pavos, patos, gansos, codornices y faisanes [6, 8], y en menor frecuencia de aves paseriformes como los estorninos y periquitos. Actualmente, en Europa y Asia se han aislado virus H5N1 de palomas y halcones [9].

### 1.1.2.1 Morfología y estructura del virión:

El virus de influenza A es una partícula pleomórfica envuelta, cuya membrana lipídica se obtiene a partir de la célula huésped (Figura 1) [1].

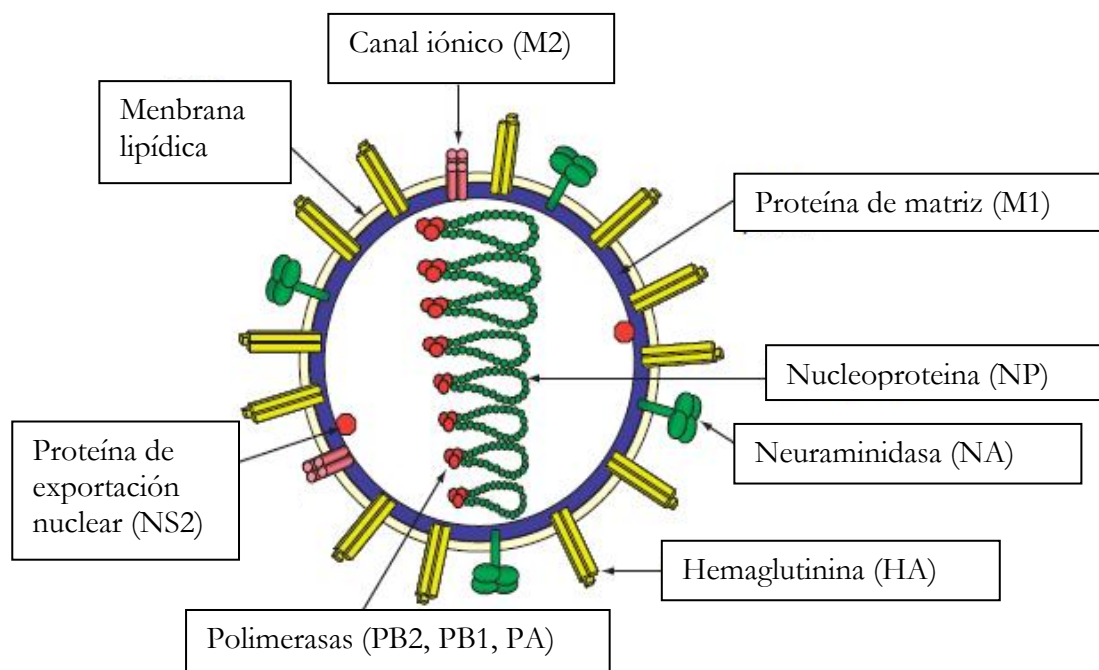


Figura 1. Estructura esquemática del virión de influenza A. Tomado y adaptado de “FieldsVirology, 6ta Edición, 2013).

Las partículas virales esféricas tienen un diámetro aproximado de 100 nm, pero también se han observado partículas filamentosas de más de 300 nm de diámetro en aislamientos de muestras clínicas frescas [10–12]. Las glicoproteínas virales HA y NA se encuentran ancladas en la envoltura lipídica y las mismas pueden observarse, mediante microscopía electrónica, como espículas que se proyectan hacia el exterior de la superficie del virus (Figura 2).

Estas espículas tienen una longitud entre 10 y 14 nm, y mantienen una relación aproximada de cuatro HA por cada NA en membrana [1]. Además de estas dos proteínas de membrana, existe otro componente menor en la envoltura viral denominada proteína M2. Esta proteína conforma el único canal iónico presente en el virus de influenza A.

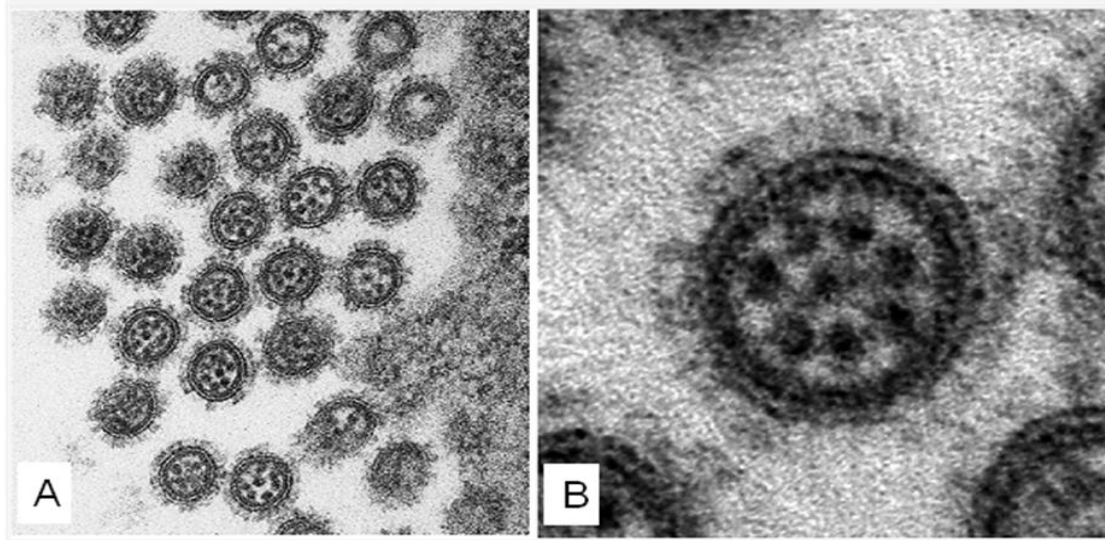


Figura 2. Microscopía electrónica mostrando la estructura interna de partículas del virus influenza. A: Partículas virales liberadas de una célula infectada. B: Magnificación de una sola partícula viral mostrando los ocho segmentos RNP [13].

Por debajo de la envoltura lipídica, se encuentra la proteína más abundante del virión conocida como proteína de matriz M1. La misma se encuentra rodeando el complejo ribonucleoproteico (RNP), el cual está compuesto por ARN viral (ARNv) recubierto por nucleoproteína NP y asociado con el complejo heterotrimérico de polimerasa viral (PB2, PB1 y PA). Esta capa de proteína M1 se puede también visualizar por microscopía electrónica en partículas virales dañadas, revelando la superestructura helicoidal interna del virus [14, 15].

El complejo RNP, que fue separado en gradiente de sacarosa por Duesberg [16], también puede ser visualizado mediante microscopía electrónica utilizando tinción positiva con acetato de uranilo [17]. Más recientemente, se han hecho intentos para visualizar RNPs o segmentos individuales de ARN por microscopía electrónica de secciones delgadas de partículas virales, lo que permitió evidenciar la preferencia de los viriones por empaquetar los ocho segmentos de ARN esenciales para la replicación viral [13, 18].

Por último, también se han encontrado pequeñas cantidades de la proteína nuclear de exportación NS2 en las partículas del virus de influenza A [19].

### 1.1.2.2 Propiedades de la partícula viral:

El virus de influenza, al estar rodeado por una membrana lipídica, es muy sensible a cualquier agente deslipidizante o desnaturizante. Diferencias en el pH, fuerzas iónicas, o composición iónica en el medio que rodea la partícula viral tendrán influencia en la resistencia del virus a agentes físicos y/o químicos. Además, los virus de influenza son relativamente termolábiles, por lo que se inactivan rápidamente a temperaturas mayores a los 50°C. Por ello, cualquier agente que afecta la estabilidad de

las membranas, proteínas o ácidos nucleicos, tales como radiación ionizante, detergentes, disolventes orgánicos, u otros, pueden reducir o hasta incluso destruir completamente la infectividad del virus [1].

Para una adecuada conservación de la partícula viral infectiva se puede utilizar una solución salina equilibrada a pH neutro y bajas temperaturas (-80°C).

### 1.1.2.3 Genoma y proteínas virales:

El genoma del virus de influenza A está compuesto por ocho segmentos de ARN<sub>v</sub> de cadena simple y polaridad negativa, que codifican para las once proteínas virales detalladas en la Tabla 1.

Segmento Genómico	Longitud en nucleótidos	Proteína codificante	Tamaño de la proteína en aa.	Función
1	2341	PB2	759	Subunidad de la polimerasa, reconocimiento del cap mRNA
2	2341	PB1	757	Subunidad de la polimerasa, actividad endonucleasa, elongación de ARN
		PB1-F2 <sup>b</sup>	87	Actividad pro-apoptótica
3	2233	PA	716	Subunidad de la polimerasa, actividad proteasa
4	1778	HA	550	Glicoproteína de superficie, unión al receptor celular, actividad fusogénica, mayor antígeno viral
5	1565	NP	498	Actividad de unión al ARN, requerida para la replicación, regula la importación de ARN viral al núcleo
6	1413	NA	454	Glicoproteína de superficie con actividad neuraminidasa, liberación de viriones
7	1027	M1	252	Proteína de matriz, interactúa con las RNPs virales y las glicoproteínas, regula la exportación de ARN del núcleo, brotación del virus
		M2 <sup>c</sup>	97	Proteína integral de membrana, actividad de canal iónico, ensamblado viral
8	890	NS1	230	Antagonista de interferón, regula la expresión génica de la célula huésped
		NS2 <sup>c</sup>	121	Exportación nuclear de ARN

<sup>a</sup> Virus Influenza/A/PR/8/34

<sup>b</sup> Codificada por un marco abierto de lectura (ORF) alternativo

<sup>c</sup> Traducido a partir de un transcripto que realizó splicing alternativo

Tabla 1. Genes del virus de influenza A<sup>a</sup> y proteínas para las que codifican.

Los tres primeros segmentos, PB2, PB1 y PA respectivamente, codifican cada uno para una subunidad de la polimerasa viral. El segundo segmento también codifica una proteína accesoria, PB1-F2, a partir de un marco abierto de lectura (ORF) alternativo en el segmento PB1. La proteína PB1-F2 es característica de los virus de influenza A, se localiza en mitocondria y tiene actividad pro-apoptótica [20]. Aparentemente, esta proteína es realmente una proteína accesoria, debido a que algunas cepas virales aisladas de seres humanos y animales carecen de este marco abierto de lectura.

El segmento 4 codifica para la proteína hemaglutinina HA. Esta proteína, en su forma madura, es una glicoproteína trimérica integral de membrana tipo I que se encuentra en la envoltura lipídica de los viriones y en la membrana celular de las células infectadas. La HA sufre varias modificaciones post-traduccionales, como glicosilación, palmitoilación, clivaje proteolítico, formación de enlaces disulfuro y cambios conformacionales. El clivaje de la molécula precursora HA0 en las subunidades HA1 y HA2 (que luego son unidas por puente disulfuro) es mediada por proteasas celulares y es esencial para actividad fusogénica de la HA [21–23], la cual permite la unión del virus a la superficie de la célula huésped a través de los receptores de ácido siálico celulares [24]. Esta proteína, al ser la más abundante en la membrana del virus, constituye el principal epítipo neutralizante. A su vez, el nombre “hemaglutinina” hace referencia a la capacidad de esta proteína de aglutinar los glóbulos rojos de la sangre [1].

Otra proteína del virus es la proteína NP, la cual es codificada por el segmento 5. Es una proteína altamente básica cuya función principal es la encapsidación del ARN viral (un monómero de NP se une aproximadamente a 24 nucleótidos de ARN), necesaria para que la polimerasa del virus pueda reconocer cada segmento de ARNv y así formar los complejos RNP. Además, la proteína NP interacciona con la maquinaria de importación nuclear celular, permitiendo transportar a las RNPs virales dentro del núcleo [21, 22].

El segmento 6 codifica para otra glicoproteína de superficie, la proteína neuraminidasa NA, la cual está compuesta por un tetrámero que da origen a una proteína integral de membrana tipo II. La función principal de la NA es la liberación de las partículas virales de la membrana celular, mediante el clivaje de las uniones entre la HA y el ácido siálico celular [23].

El segmento 7 tiene la particularidad de codificar dos proteínas virales, la proteína de matriz M1 y la proteína M2. La M1 se traduce a partir de un transcripto colineal, mientras que la M2 se produce a partir de un ARNm viral que realizó *splicing* alternativo. M1 está asociada a la membrana lipídica del virus y juega un rol esencial durante el brote de los viriones maduros a partir la célula huésped [24]. Además, la proteína M1 regula el movimiento de las RNPs fuera del núcleo [25, 26] e inhibe la síntesis de ARNv en estadios tardíos del ciclo de replicación viral. Por otro lado, la proteína M2 es un tetrámero integral de membrana tipo III con actividad de canal iónico. Este canal de M2 permite la acidificación del core de la partícula viral, permitiendo la disociación de la proteína M1 de las RNPs, lo que se conoce como desnudamiento.

El último de los segmentos de los virus de influenza A, el segmento 8, es el más pequeño de los ARN virales. El mismo codifica la proteína NS1 a partir de un transcripto colineal, y la proteína NS2 a partir de un ARNm producido por *splicing* alternativo. La proteína NS1 se expresa en altas cantidades en las células infectadas. Es una proteína que se une selectivamente al ARN de la célula interfiriendo en el



procesamiento del ARNm celular [27]. Además, se ha probado que tiene actividad antagonista del interferón tipo I, inhibiendo de esta forma la actividad antiviral de la célula huésped [28, 29]. Por otro lado, la proteína NS2 media la exportación nuclear de las nuevas RNPs sintetizadas durante la replicación del virus [30, 31], por lo que su expresión se correlaciona con los estadios tardíos del ciclo de replicación viral.

### 1.1.2.4 Ciclo de replicación viral:

El virus de influenza A tiene un ciclo de replicación (Figura 3) que comprende las siguientes etapas detalladas a continuación:

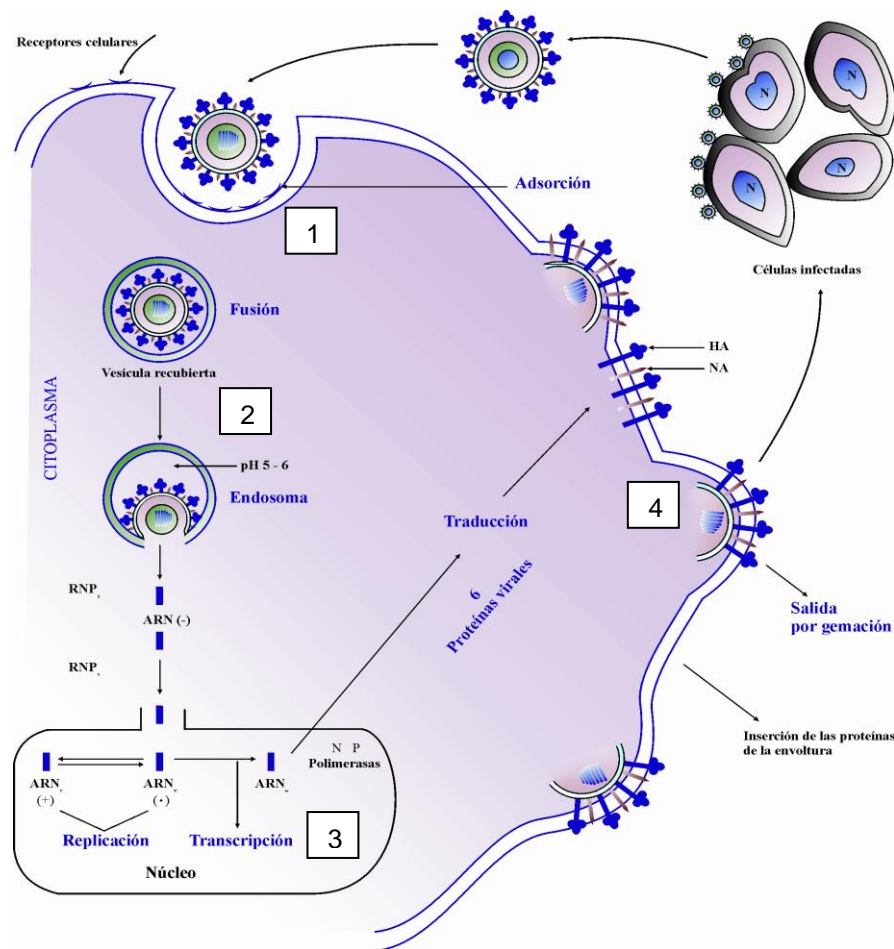


Figura 3: <http://gsdl.bvs.sld.cu/greenstone/collect/preclini/index/assoc/HASH26ea.dir/fig67.2a.png>

1. Adsorción y entrada a la célula huésped: El primer paso para iniciar el ciclo de replicación viral es la adsorción, o unión, del virus a la célula huésped. En el caso de los virus de influenza A, esta unión se produce entre la glicoproteína de superficie viral HA y el ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) de la célula target. Dentro de los virus de influenza A, los virus de influenza humana se unen preferentemente al ácido N-acetilneuramínico que se encuentra unido a la penúltima galactosa mediante un enlace  $\alpha$ 2-6, mientras que los virus de influenza aviar se unen

mayoritariamente al ácido siálico que se une con un azúcar en un enlace  $\alpha$ 2-3 [32, 33]. A pesar de la existencia de cierta especificidad entre los virus de influenza A, hay que considerar que no es absoluta y que tanto las células humanas como las aves pueden tener ácido siálico con ambas uniones. Además, existen estudios que demuestran que los virus de influenza tienen la capacidad de adaptarse a un huésped particular a través de mutaciones en el sitio de unión al receptor celular de la HA [34, 35]. Una vez que el virus de influenza está adsorbido a la membrana celular continúa su entrada a la misma. Tradicionalmente se consideraba que el virus de influenza entraba a la célula por una endocitosis mediada por clatrina [36], pero existe evidencia de que la internalización del virus puede ser por un mecanismo independiente de clatrina y caveolina [37], dependiente de un pH ácido que transporta el virus a endosomas tardíos.

2. Fusión y desnudamiento: Después de la endocitosis, el virus de influenza requiere de un pH ácido para fusionarse con las membranas endosomales. Esta actividad de fusión es inducida por un cambio estructural en la HA, pero para que esto ocurra el precursor HA0 debe primero ser clivado en dos subunidades, HA1 y HA2. Una vez en el medio ambiente ácido del endosoma, la molécula HA clivada experimenta un cambio conformacional que expone el péptido de fusión en el extremo N-terminal de la subunidad HA2, permitiéndole interactuar con la membrana del endosoma. El cambio estructural realizado de algunas moléculas de hemaglutininas abre un poro que libera los contenidos del virión [38].

El desnudamiento efectivo también depende de la presencia de la proteína M2, la cual tiene una actividad de canal iónico [39]. Esta proteína asociada al virus permite el flujo de  $H^+$  desde el endosoma hacia el interior de la partícula viral, los cuales rompen las interacciones proteína-proteína de la proteína M1 resultando en la liberación de RNPs al citoplasma [40]. Esto completa el proceso de desnudamiento.

3. Síntesis de ARN (transcripción y replicación): El proceso de captación de las moléculas RNPs a través de los poros nucleares es un proceso activo, que involucra la interacción de la maquinaria de transporte nucleocitoplasmático de la célula huésped con las señales de localización nucleares (NLS) presentes en todas las proteínas que forman las RNPs [22, 41, 42]. Sin embargo, sólo la señal en la NP ha mostrado ser suficiente y necesaria para la importación del ARNv [21]. Una vez en el núcleo, el ARN viral entrante de polaridad negativa se transcribe primero a ARNm. Estos ARNm son copias incompletas del templado de ARNv y son encapuchados y poliadenilados, a diferencia del ARNv, para su posterior traducción en el citoplasma celular. La amplificación del genoma viral comprende un proceso que involucra la realización de una copia completa del ARNv de polaridad positiva, la cual es referida como ARN complementario (ARNc), que a su

vez será utilizada como templado para producir luego más copias completas de ARNv. Todas estas reacciones son catalizadas por el mismo complejo de polimerasas viral [43].

4. Ensamblado y liberación de viriones: Los virus de influenza generalmente se ensamblan y liberan por la membrana apical de células polarizadas, como lo son las células epiteliales de pulmón e intestino. Las proteínas que se localizan en la membrana apical son la HA, NA y M2, pero la proteína indispensable para el correcto ensamblado de la partícula viral es la proteína M1 [24]. Se considera que la M1 interacciona con las colas citoplasmáticas de las glicoproteínas y las RNPs, formando un puente entre los componentes del core interno y las proteínas de la membrana [44]. Una vez acumulada la proteína M1 en la cara interna de la membrana lipídica, se produce una curvatura de la misma y se inicia el proceso de brotación del virión. Dicho proceso finaliza cuando se logra separar completamente la envoltura viral de la membrana celular. Debido a que la proteína HA ancla el virus a la célula mediante la unión a receptores que contienen ácido siálico en la superficie celular, se requiere de la actividad enzimática de la proteína NA para eliminar el ácido siálico y, de ese modo, liberar finalmente el virus de la célula huésped. También se requiere de la actividad de la NA para eliminar el ácido siálico de los hidratos de carbono presentes en las propias glicoproteínas virales, para así evitar que las partículas de virus se agreguen.

#### 1.1.2.5 División en subtipos y cepas:

Los virus de influenza A se dividen en subtipos según dos proteínas superficiales, la HA y la NA. Estudios en aves silvestres acuáticas han revelado la existencia de 16 subtipos de Hemaglutinina y 9 subtipos de Neuraminidasa en 90 especies de aves silvestres, principalmente del orden Anseriformes [2, 45]. Estudios moleculares recientes han permitido detectar la existencia de H17, H18, N10 y N11 [46, 47]. En teoría, cualquier combinación de subtipo HA y NA sería posible mediante *shift* antigénico o reasociación de segmentos genómicos. La combinatoria de HA y NA posible nos da una idea de la enorme variedad de subtipos que existen para este agente infeccioso.

En los patos predominan los subtipos de HA H3, H4 y H6, y los subtipos de NA N2, N6 y N8, los cuales son menos frecuentes en playeritos y gaviotas. En estas últimas especies frecuentemente se aíslan los subtipos de HA H1, H2, H5, H7, H9, H11 y H13, y los subtipos de NA N6 y N9 [48].

Además, dentro de cada subtipo de influenza existen distintas cepas. Las mismas aparecen y reemplazan a las cepas anteriores por medio del proceso conocido como *drift* o transformación antigénica. Este proceso es el resultado de la acumulación de mutaciones puntuales en las glicoproteínas de superficie, pudiendo incluso reducir considerablemente la reactividad cruzada entre sí. Ejemplos concretos de *drift* antigénico se dan todos los años con la influenza humana. Cuando surge una nueva cepa del virus, la protección de anticuerpos que se pudo haber desarrollado después de la infección o

vacunación contra una cepa anterior puede no proteger contra la nueva cepa. Por lo tanto, es extremadamente necesario que la vacuna contra la influenza sea actualizada anualmente para mantener inmunidad en la población humana frente a las nuevas cepas virales.

## **1.2 Enfermedad de Influenza Aviar**

### **1.2.1 Generalidades:**

En general, la Influenza Aviar (IA) en aves silvestres es asintomática debido a que las mismas suelen infectarse con virus de baja patogenicidad (LP). Sin embargo, en especies de aves de corral tales como pollos, pavos y aves de Guinea entre otras, la infección con AIV puede producir una variedad de síntomas que se extienden desde manifestaciones asintomáticas o leves a una enfermedad aguda y fatal [49]. Los casos extremos se producen por LPAIV de subtipo H5 o H7, que pueden derivar en virus de alta patogenicidad (HPAIV) una vez introducidos en las aves domésticas [50, 51]. Estos HPAIV generan grandes pérdidas económicas, no sólo por la alta mortalidad que produce la enfermedad en los galpones comerciales, sino por los esfuerzos económicos que deben realizar los gobiernos en el control de los brotes e indemnización a los productores [52].

### **1.2.2 Patogenia:**

El proceso de infección comienza por la inhalación o ingestión de viriones de IA. Las enzimas peptidasas extracelulares tipo tripsina presentes en el tracto respiratorio y digestivo realizan el clivaje de la hemaglutinina del virus, permitiendo de esta forma que ocurran múltiples ciclos de replicación viral en los mismos [53]. Esto permite la liberación de grandes cantidades de partículas virales infecciosas que podrán ser excretadas vía oral y/o fecal. En las gallinas, la cavidad nasal es el sitio de mayor replicación inicial.

Los períodos de incubación de las distintas enfermedades causadas por el virus de IA varían desde unas pocas horas en aves inoculadas por vía intravenosa, a 3 días en aves infectadas naturalmente, o hasta 14 días en galpones comerciales [8]. De todos modos, este período de incubación depende de la carga viral, la vía de entrada, la especie infectada y de la habilidad para detectar signos clínicos, los cuales también son bastante variables y dependerán tanto de factores virales como de la especie afectada, la edad, el sexo, las infecciones concurrentes, la inmunidad adquirida y factores ambientales.

En el caso de cepas de alta patogenicidad (HP), los viriones invaden la submucosa, entran a los capilares y replican en las células endoteliales. Esto permite la dispersión del virus por el sistema vascular y linfático, para finalmente infectar y replicar en distintos tipos celulares de órganos viscerales,

cerebro y piel. Alternativamente, estas cepas pueden algunas veces hacer viremia sin previamente realizar la extensa replicación en las células endoteliales vasculares. La presencia de una HA con un sitio de clivaje para enzimas celulares ubicuas tipo furina permitirán una replicación pantrópica y los signos clínicos, o incluso la muerte, se deberá a una insuficiencia de múltiples órganos. Entonces, el daño causado por un virus de IA de alta patogenicidad será el resultado de uno de tres procesos posibles: 1) la replicación directa del virus en las células, tejidos y órganos; 2) los efectos indirectos de la producción de mediadores celulares como las citoquinas en el huésped; y 3) la isquemia por trombosis vascular [1].

En el caso de los virus de baja o moderada patogenicidad (MP) la replicación por lo general se limita a las vías respiratorias y/o intestinales. La enfermedad o muerte que se pueda llegar a producir por una cepa MP es en general por el daño respiratorio que se produce, sobre todo si se acompaña de infecciones bacterianas secundarias. En algunos casos estos virus de MP se propagan sistémicamente, replicando y causando daños en los túbulos renales, en el epitelio acinar del páncreas y en otros órganos con células epiteliales que tienen enzimas de tipo tripsina [1].

### **1.2.3 Pérdidas económicas asociadas a la enfermedad:**

Las pérdidas económicas producidas por IA varían dependiendo de la cepa del virus, de la especie de ave infectada, del número de granjas afectadas, de los métodos de control utilizados, y de la velocidad en implementar estrategias de control y erradicación [8]. En general, la mayoría de los brotes por AIV de alta o baja patogenicidad, junto con las pérdidas económicas asociadas, han ocurrido a partir de epizootias en aves de corral pero sin generar una enfermedad endémica para la industria avícola. Sin embargo, algunos países han tenido influenza aviar de baja patogenicidad en forma endémica en galpones comerciales y, en países como China, la enfermedad también ha sido endémica en aves de traspatio y en mercado de aves vivas.

Generalmente, las mayores pérdidas económicas han ocurrido durante las epizootias de IA de alta patogenicidad en gallinas criadas en granjas comerciales, en zonas de producción intensiva o en grandes mercados de aves vivas. Las pérdidas directas en los brotes incluyen costos de despoblación y eliminación, pérdidas por la alta morbilidad y mortalidad, costos de cuarentena y vigilancia, e indemnizaciones pagadas por la eliminación de aves del mercado. Varios son los ejemplos a lo largo del último centenario [54, 55]. Entre ellos, Estados Unidos durante el año 1924-1925 superó los U\$10 millones en costos directos por limpieza y desinfección de 2.718 mataderos, 8.140 vagones de ferrocarril, 352.525 cooperativas de transporte y 124.997 piezas de diversos equipos [8]. Durante 1983-1984, en el noreste de Estados Unidos hubo un brote de IA de alta patogenicidad H5N2 que involucró más de 17 millones de aves y 449 granjas comerciales, haciendo que el costo para el gobierno fuese superior a los U\$106 millones en erradicación e indemnizaciones, mientras que los consumidores

experimentaron un aumento de U\$s588 millones en el costo de alimento [56]. En Europa y Asia se han dado ejemplos similares, como ser el brote en Italia de IA H7N1 de alta patogenicidad en el año 1999-2000, generando un gasto público de U\$s100 millones en compensación por los 18 millones de aves comerciales de 413 granjas [57].

Los brotes por IA de baja patogenicidad, en cambio, han representado un costo menor para tener la situación bajo control debido a una menor tasa de mortalidad. Sin embargo, los costos económicos asociados a las trabas en la comercialización nacional e internacional de carne aviar conllevan pérdidas económicas indeseadas en los países con una industria avícola intensiva como la de la Argentina.

#### **1.2.4 Riesgo para la Salud Pública:**

Las aves acuáticas silvestres son el reservorio de todos los genes del Virus Influenza [3]. Desde estas especies, el virus de IA tiene la capacidad de transmitirse y adaptarse a un amplio rango de huéspedes con la particularidad de hacerlo con una frecuencia mayor que otros agentes infecciosos [58]. En general, la transmisión a un nuevo huésped suele ocurrir frecuentemente, e incluso con mayor facilidad, entre individuos de la misma especie u ocasionalmente entre especies cercanas [8].

En algunas ocasiones, el virus de IA también ha evidenciado una transmisión interespecie logrando infectar incluso al hombre. Estos eventos suelen ser poco comunes y pueden ocurrir de dos formas:

1. Por transferencia de la partícula viral completa de IA.
2. Por transferencia de genes individuales del virus de influenza aviar al virus de influenza humana.

Pocos son los ejemplos documentados de transmisión del virus completo en comparación con los cientos de millones de infecciones en humanos por virus de influenza adaptados al hombre cada año y durante las pandemias [59].

El epitelio respiratorio de las aves tiene mayoritariamente receptores de ácido siálico con conformación  $\alpha 2-3$ ; en cambio, en el epitelio respiratorio de los humanos predominan las uniones  $\alpha 2-6$ . Los cerdos presentan un epitelio respiratorio mixto, con una mezcla de ácidos siálicos con uniones  $\alpha 2-3$  y  $\alpha 2-6$ . Esto permitiría, en esta especie animal, la coinfección por virus de influenza de aves y mamíferos y, en consecuencia, el desarrollo de nuevas cepas “reasortantes” que tendrían la capacidad de infectar a los humanos y otros mamíferos [60]. Esta podría ser la explicación del mayor número de reportes observados de transferencia de virus de influenza porcina, respecto de influenza aviar, al hombre.

La aparición de genes de IA en los virus de influenza humana han sido eventos raros, y se requiere de grandes períodos de tiempo y de reasociación de segmentos genómicos de más de un virus

de influenza [8]. Sin embargo, durante el siglo XX ocurrieron tres importantes pandemias de Influenza a partir de virus aviares (Tabla 2). La primera ocurrió en el año 1918, a partir de un virus de subtipo H1N1 con todos sus genes de origen aviar. Esta pandemia se conoció como la Gripe Española, cuya mortalidad mundial registrada superó los 20 millones de personas. Recién en el año 1957 se originó la segunda pandemia conocida como Gripe Asiática. La misma fue causada por un virus de subtipo H2N2, producto de la reasociación de un virus de IA H2N2 con el virus de influenza humana H1N1 de 1918. De esta forma, se estableció en la población un nuevo subtipo de influenza humana H2N2, que contenía los segmentos PB1, HA y NA de IA H2N2 y el resto de los genes del virus H1N1. Luego, en el año 1968, ocurrió la tercer pandemia del siglo XX con una mortalidad mundial de 4 millones de personas. Esta se produjo por un virus de subtipo H3N2, donde el virus H2N2 de la pandemia previa reasortó con un virus de IA H3 incorporando su PB1 y HA.

Pandemia	Fecha	Área de origen	Subtipo de Virus de Influenza A	Mortalidad mundial	Tasa de letalidad calculada	Grupo de edad más afectados	Pérdida del PBI
Influenza Española	1918-1919	No definida	H1N1	20-50 millones	2 a 3%	Adultos jóvenes	(-16,9% a 2,4%)
Influenza Asiática	1957-1958	Sur de China	H2N2	1 a 4 millones	≤ 0,2%	Niños	(-3,5% a 0,4%)
Influenza de Hong Kong	1968-1969	Sur de China	H3N2	2 a 4 millones	≤ 0,2%	Todos los grupos etarios	(-0,4% a -1,5%)

Tabla 2. Características de las tres pandemias del siglo XX [9].

Por lo nombrado anteriormente es que la influenza aviar es considerada una zoonosis con potencial pandémico, que podría generar un gran impacto en la salud pública al introducirse nuevas variantes del virus, y sin inmunidad previa, en el hombre.

### 1.2.5 Vigilancia:

En América del Norte, Europa, Este de Asia y Australia, se llevan a cabo desde hace varias décadas programas de vigilancia con el objetivo de explorar la ecología de los virus de IA en las aves silvestres acuáticas y generar datos epidemiológicos para prever la introducción de estos virus en las aves de corral. El objetivo principal de llevar adelante estos esfuerzos es evitar las grandes pérdidas económicas asociadas a la introducción de esta enfermedad en los galpones comerciales, así como también tener un mayor conocimiento y estrategia de control frente a una posible pandemia.

Según la OIE, la situación sanitaria actual de la Argentina con respecto a la enfermedad de Influenza Aviar es de status libre, debido a que el agente viral no ha sido descripto hasta el momento en aves domésticas. Por ello, en la República Argentina la Influenza Aviar es una enfermedad exótica y de

declaración obligatoria. Esta enfermedad junto con la enfermedad de Newcastle se encuentran bajo el Programa de Prevención y Vigilancia permanente que lleva adelante el SENASA en las aves domésticas de todo el país de manera que, de presentarse eventualmente, sean rápidamente detectadas y erradicadas.

El riesgo potencial de entrada y difusión de este agente en los galpones comerciales nacionales puede desestabilizar la actividad económica y comprometer el estatus sanitario de nuestro país. Por ello desde el año 2006, el INTA junto con otras instituciones diseñó un programa de vigilancia a largo plazo en las poblaciones de aves silvestres residentes y migratorias de los humedales de agua dulce y de la costa atlántica argentina, con el objetivo de estudiar la presencia o ausencia de estos virus en aves silvestres y su consecuente riesgo de introducción y difusión en las aves de corral.

### **1.3 Sanidad animal en la industria avícola**

#### **1.3.1 Generalidades:**

El desarrollo de una industria avícola intensiva en los países en desarrollo como la Argentina depende, principalmente, de la capacidad de establecer y potenciar las operaciones comerciales en pequeña y mediana escala, y para garantizar el éxito será imprescindible controlar la salud de las aves de corral. Las pérdidas económicas ocasionadas por las enfermedades aviarias oscilan entre el 10 y el 20 por ciento del valor bruto de la producción en el sector avícola de los países desarrollados, y probablemente son más elevadas en los países en desarrollo. La capacidad de diagnosticar las causas de las enfermedades aviarias y de reconocer rápidamente una enfermedad emergente es esencial, más aún considerando que los patógenos aviares no reconocen las fronteras nacionales [61]. Por consiguiente, con el objetivo de controlar patógenos, los centros de producción deben disponer de líneas avanzadas de defensa en forma de programas de bioseguridad. En los países en desarrollo, las deficiencias en la bioseguridad y en el diagnóstico de enfermedades predisponen a los patógenos emergentes a que puedan convertirse en amenazas endémicas, como ha ocurrido muy recientemente con la influenza aviar H5N1[61].

#### **1.3.2 Sanidad animal en la avicultura nacional:**

En los últimos años, el “Programa de Enfermedades de las Aves y Animales de Granja” del SENASA impulsa la implementación de políticas sanitarias enfocadas, esencialmente, al mejoramiento de la situación sanitaria nacional, en beneficio directo del desarrollo del sector avícola, y de la prevención de enfermedades exóticas como la influenza aviar, y de aquellas erradicadas del país como la enfermedad de Newcastle. Este aspecto, además de evitar las grandes pérdidas económicas que



producen estas enfermedades, contribuye al sostén del mercado externo y a la apertura de nuevos destinos para la producción nacional [62].

Así es como la vigilancia de enfermedades emergentes y re-emergentes se ha convertido en uno de los retos más importantes que tiene actualmente la Sanidad Animal de nuestro país, tanto por su riesgo sanitario intrínseco como por su potencial zoonótico en enfermedades como la Influenza. Una de las estrategias para enfrentar estas situaciones es utilizar protocolos de análisis de riesgo como sistemas de predicción. Para lograr buenos análisis de riesgo es importante, entre otros parámetros, conocer el estado inmunitario de los planteles comerciales.

### **1.3.3 Inmunosupresión de las aves de corral y sus consecuencias:**

La inmunosupresión en las aves de corral es un estado fisiológico que las predispone a contraer diversas enfermedades como producto de la baja, o nula, capacidad de respuesta que el sistema inmune posee en tal estado. Sumado a esto, reduce significativamente la capacidad de las aves de corral jóvenes para responder con eficacia a las inmunizaciones a las cuales son sometidas en los planes vacunales utilizados frecuentemente, predisponiéndolas además a contraer infecciones por otros agentes patógenos específicos. Sin embargo, la inmunosupresión subclínica con frecuencia no resulta observable para los avicultores, por lo que es causa silente habitual de importantes pérdidas económicas. Los agentes patógenos causantes de estas inmunosupresiones subclínicas se califican como “erosivos” para la productividad de los centros de producción [63], debido a que su presencia muchas veces conlleva a realizar esfuerzos en el control de las afecciones secundarias sin resolver la patología de base.

Existen una gran variedad de factores que afectan el sistema inmune de las aves, las micotoxinas, los parásitos y los agentes virales. Dentro de estos últimos encontramos al Virus de la Anemia Infecciosa Aviar, uno de los principales agentes infecciosos inmunosupresores de las aves de corral, que afecta principalmente a los pollos jóvenes y está ampliamente distribuido en todo el mundo [64].

### **1.3.4 Virus de la Anemia Infecciosa Aviar:**

El Virus de la Anemia Infecciosa Aviar (CAV) es responsable de la enfermedad que lleva el mismo nombre y es considerada una enfermedad endémica en todos aquellos países con una industria avícola intensiva. El cuadro clínico asociado a esta enfermedad se encuentra estrechamente relacionado con la edad en la que el ave adquiere la infección. Cuando un pollo recién nacido, proveniente de una madre seronegativa, se infecta antes de las dos semanas de vida, desarrolla anemia, depleción linfóide, hemorragias e inmunosupresión. Sin embargo, después de la segunda semana de vida, la susceptibilidad del ave al desarrollo de la enfermedad comienza a disminuir paulatinamente, presentándose un cuadro

de inmunosupresión subclínico [65]. Esta condición de infección subclínica predispone a los planteles afectados a contraer diferentes enfermedades oportunistas secundarias, lo cual conlleva a realizar esfuerzos en el control de las afecciones secundarias sin resolver la patología de base [66]. Son muchas las descripciones de cuadros de inmunosupresión en aves de corral infectadas con CAV correlacionados con diversas infecciones bacterianas y fúngicas [67, 68]; y con un aumento de la patogenicidad de las infecciones por adenovirus [69] y reovirus [70]. Otros autores observaron que la infección con CAV y el Virus de la Enfermedad de Marek (MDV) producía un aumento de la incidencia y mortandad por este último virus [71], lo cual lleva a pensar en la probabilidad de ocurrencia de situaciones similares frente a infecciones secundarias con el virus de IA.

El agente etiológico que produce esta enfermedad es el Virus de la Anemia Infecciosa Aviar, representante del género *Gyrovirus 1* dentro de la familia *Circoviridae* [72]. Morfológicamente es un virus desnudo, con cápside icosaédrica, que contiene un genoma circular de ADN, cadena simple y polaridad negativa [73]. Su genoma mide aproximadamente 2,3 Kpb y estructuralmente posee una región promotora, seguida de 3 ORF solapados, que codifican para tres proteínas virales. Una es la proteína VP3 (13.6 kDa), proteína no estructural comúnmente llamada apoptina por su capacidad para producir apoptosis en células del timo y médula ósea principalmente [74, 75]. Otra es la proteína VP2 (24.0 kDa), la cual, además de poseer actividad de proteasa [76], tiene un papel importante en el plegado de la proteína VP1 (51.6kDa). Esta última proteína VP1 es la principal proteína de la cápside y contiene los principales epitopes neutralizantes [77].

Según diferentes autores [78, 79], CAV induce una inmunosupresión en pollos caracterizada por una reducción importante, pero transitoria, del valor del hematocrito, de la relación peso timo-peso corporal y de la relación peso bursa-peso corporal entre los 7 y 21 dpi; con una recuperación de estas variables a valores normales a los 28 dpi. Esta linfocitopenia producida en timo, bazo y bursa ha sido observada en infecciones experimentales tanto de pollitos de 1 día de edad (infección clínica) como de pollos de 14 días de edad (infección subclínica) [80]. En la actualidad existe un consenso de que el número absoluto de timocitos decrece durante la linfopenia transitoria, pero aún existe discusión sobre si es la subpoblación de linfocitos T helper (LTh) o la subpoblación de linfocitos T citotóxicos (LTc) la más afectada en bazo durante la fase aguda [78–81].

La presencia del CAV en nuestro país fue reportada por primera vez en 1994 por Buscaglia y col. [82]. En la Argentina, en los últimos años se ha observado un aumento de casos clínicos por agentes oportunistas, ocasionando patologías severas en galpones de pollos parrilleros. Por ello, nuestro grupo de trabajo ha estado estudiando y caracterizando a nivel molecular las diferentes cepas halladas en estos casos de campo.

A partir del análisis molecular de la secuencia nucleotídica de la VP1 de veinticinco cepas argentinas de CAV, se observó que la mayoría de los aislamientos argentinos pertenecen al genotipo B, distanciado filogenéticamente de las cepas vacunales (Cux-1, DelRos, Nobilis) comúnmente utilizadas en nuestro país (Figura 4). Además, todos los aislamientos que conforman el grupo argentino poseen residuos aminoacídicos particulares en ciertas posiciones de la VP1, los cuales difieren de los comúnmente presentados por las cepas vacunales y otras cepas de referencia mundial [83].

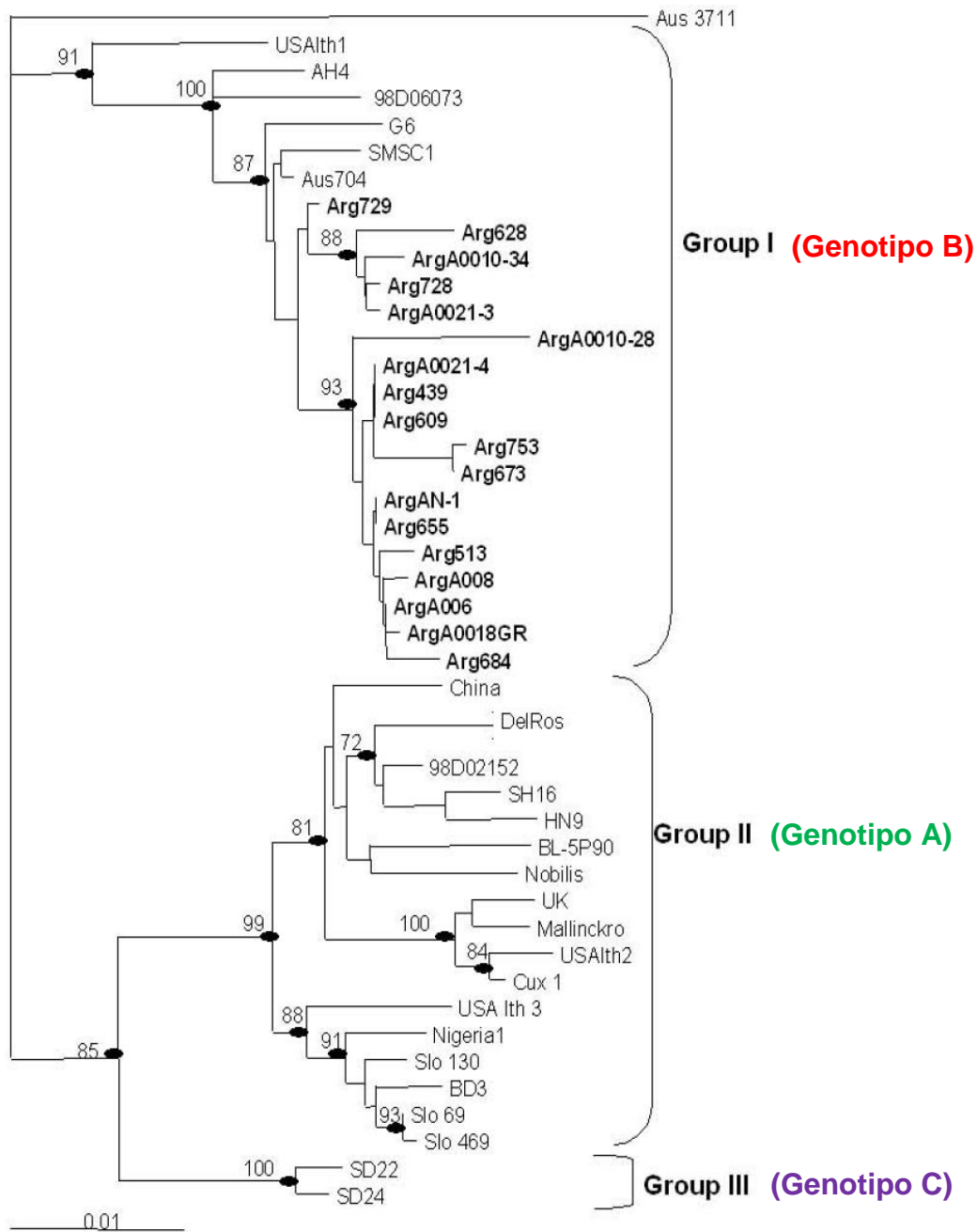


Figura 4. Filograma basado en el método de distancia Neighbor Joining para las secuencias nucleotídicas de la VP1. Los valores de *bootstrap* se indican en aquellos nodos en los cuales el valor supera el 70%. Las cepas de CAV Argentinas están marcadas en negrita. La línea horizontal indica la distancia relativa entre los aislamientos [83].

Aunque se sabe que existe una alta incidencia de CAV dentro de los planteles comerciales de nuestro país, se carece de conocimiento acerca de la importancia que puede tener el estado de inmunosupresión provocado por este agente en la evolución de la patogenia del AIV. Para intentar responder este interrogante y colaborar con mejores análisis de riesgo para el diseño de estrategias de control y prevención para proteger las explotaciones comerciales avícolas de nuestro país, en el presente trabajo de tesis se estudiarán los Virus de Influenza Aviar que circulan en las aves silvestres en la Argentina y la patogenia y transmisibilidad de estos virus en aves de corral inmunocompetentes o inmunosuprimidos experimentalmente con el Virus de la Anemia Infecciosa Aviar.

Aumentar la información acerca de la epidemiología de la Influenza Aviar en la región es de suma importancia para comprender en mayor profundidad las potenciales consecuencias de esta enfermedad tanto en las aves silvestres como en las aves domésticas. Sumado a esto último es importante destacar que la Influenza Aviar es una zoonosis, con lo cual el aumento de la información disponible sobre este agente infeccioso es de relevancia para el sistema de Salud Pública nacional.

## **2. HIPÓTESIS**

Debido a la naturaleza del Virus de Influenza Aviar existen diferentes subtipos de Virus de Influenza Aviar de Baja Patogenicidad circulando en las aves silvestres que anidan o migran en la Argentina. La patogenia y transmisibilidad de estos virus será diferente en aves de corral inmunocompetentes o inmunosuprimidas a través de la infección previa con el Virus de la Anemia Infecciosa Aviar.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 General:**

Estudiar la circulación del Virus de Influenza Aviar en aves silvestres presentes en la Argentina, sus características genéticas y su patogenicidad en aves de corral con diferente estado inmunológico.

#### **3.2 Específicos:**

1. Realizar un análisis filogenético de los Virus de Influenza Aviar aislados en la Argentina con el fin de determinar el patrón evolutivo del AIV en la región.
2. Generar una inmunosupresión subclínica en aves de corral a partir de la infección experimental de las mismas con variantes de CAV presentes en la población avícola comercial del país, determinando las subpoblaciones de linfocitos T afectadas en timo y bazo.
3. Comparar la replicación, invasión y transmisión del LPAIV en aves de corral inmunocompetentes o inmunosuprimidas experimentalmente con el Virus de la Anemia Infecciosa Aviar.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Aislamiento y caracterización molecular de los Virus de Influenza Aviar en la Argentina

#### 4.1.1 Obtención de muestras de aves silvestres:

Las actividades de muestreo fueron realizadas por biólogos y veterinarios capacitados en el área. Las muestras de hisopados cloacales se obtuvieron a partir de aves acuáticas silvestres capturadas a lo largo de la costa atlántica y el litoral argentino o provenientes de coto de caza habilitados [84, 85]. En este último caso, los hisopados cloacales se obtuvieron dentro de las 2-4 horas post mortem.

Los muestreos en el litoral argentino se realizaron a orillas del río Paraná (30 ° 41'S, 60 ° 02'W), uno de los principales sistemas fluviales de América del Sur. Este río se encuentra dentro de una importante ruta migratoria de las aves, que sirve a su vez como hábitat para varias poblaciones de especies de aves acuáticas residentes. La región abarcada incluye cuatro departamentos de la provincia de Entre Ríos (Guaaleguay, Paraná, La Paz y Victoria), un departamento de la provincia de Corrientes (Esquina) y uno de la provincia de Santa Fe (San Javier). Se recogieron muestras de cotos de caza privados establecidos estratégicamente dentro de humedales y abarcando aproximadamente un área de 15.000 hectáreas.

En el caso de las aves silvestres acuáticas capturadas a lo largo del litoral marítimo argentino las mismas se obtuvieron a orillas del mar, desde la provincia de Buenos Aires hasta la provincia de Tierra del Fuego (ciudades de Punta Rasa, Mar Chiquita, Bahía Blanca, Bahía San Blas, Punta Loma, Punta León, Punta Tombo, Bahía Bustamante, Puerto Deseado, Bahía San Julián, Monte León, Cabo Vírgenes y La Turbera entre otras). Esta área cubre aproximadamente 5,000 kilómetros, del paralelo 36 ° S y 55 ° S.

Para la realización del muestreo se utilizó un hisopo de poliéster estéril por ave. Una vez tomada la muestra, cada hisopo fue almacenado dentro de un criotubo de plástico estéril conteniendo 1 ml de solución *buffer* fosfato (PBS) a pH 7.0-7.2 con 50% de glicerol, suplementado con penicilina (10,000 UI/ml), estreptomicina (5 mg/ml), sulfato de gentamicina (1 mg/ml), sulfato de kanamicina (700 mg/ml) y anfotericina B (10 µg/ml) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.). Todos los criotubos se mantuvieron en nitrógeno líquido y se transportaron en hielo seco. Una vez en el laboratorio las muestras se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento para el diagnóstico molecular y el aislamiento del virus.

#### **4.1.2 Detección del Virus de Influenza Aviar:**

Para realizar la detección del AIV se armaron pooles conteniendo 50 µl de cinco hisopados cloacales. Cada uno de los pooles fue procesado como se describe en los puntos 4.1.2.1 a 4.1.2.3. Aquellos pooles positivos fueron abiertos y cada uno de los hisopos que lo componían fue analizado individualmente de la misma forma.

##### **4.1.2.1 Extracción de ARN viral:**

La extracción de ARN viral se realizó con el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), con el fin de obtener un templado óptimo para los estudios posteriores. Todas las muestras fueron procesadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando 140 µl de suspensión de hisopo cloacal en PBS. El ARN resultante se eluyó en un volumen final de 60 µl y se almacenó a -70°C hasta su posterior utilización.

##### **4.1.2.2 Síntesis de ADN complementario:**

El ARN obtenido fue sometido a la reacción de transcripción reversa (RT), mediante la utilización de la enzima High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de forma de obtener el ADN copia (ADNc). Para ello se utilizaron 15 µl de ARN viral en un volumen final de reacción de 30 µl. Las condiciones de temperatura y ciclado utilizadas fueron las especificadas por el fabricante.

##### **4.1.2.3 PCR en tiempo real:**

La detección del AIV se realizó sobre el ADNc obtenido por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Para tal fin, se utilizó la enzima TaqMan PCR Universal Master Mix (Applied Biosystems) y un par de *primers* y sonda dirigidos a amplificar una región del gen de la matriz (M), que detecta cualquier subtipo de virus de influenza tipo A [86]. La reacción de PCR en tiempo real se realizó en un equipo ABI Prism 7500 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

#### **4.1.3 Aislamiento del Virus de Influenza Aviar:**

El aislamiento viral se realizó a partir de cada hisopo que resultó positivo al AIV por RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR). El procedimiento para realizar el aislamiento viral se llevó adelante dentro del laboratorio de bioseguridad del tipo NSB4 OIE que el INTA posee en el Instituto de Virología. Para ello se utilizaron huevos embrionados de pollo de 9-11 días de edad (Rosenbusch, CABA, Argentina) libres de patógenos específicos (SPF). Brevemente, 200 µl del hisopado cloacal fueron inoculados en la cavidad alantoidea de los huevos. Los mismos se incubaron durante 72 horas y luego se cosechó el



líquido alantoideo de acuerdo con los protocolos estandarizados descritos en el Manual de la OMS sobre Influenza Animal Diagnóstico y Vigilancia [87] y de la normativa argentina. El líquido alantoideo cosechado se almacenó a -70°C hasta su posterior utilización para detección del Virus de Influenza Aviar como se detalló anteriormente en el punto 4.1.2.

#### **4.1.4 Secuenciación del genoma del Virus de Influenza Aviar:**

A partir del líquido alantoideo donde se pudo aislar el AIV se realizó la secuenciación de los ocho segmentos genómicos virales. Brevemente, el ARN viral se extrajo del fluido alantoideo utilizando el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit como se mencionó en el punto 4.1.2.1. Luego se realizó una RT seguida por una PCR utilizando *primers* específicos para cada gen del AIV como se describió previamente [88]. Los fragmentos amplificados por RT-PCR se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y se purificaron con el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) según instrucciones del fabricante. Finalmente, la secuenciación se realizó usando el kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 en un analizador de ADN ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **4.1.5 Análisis filogenético del Virus de Influenza Aviar:**

Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas consenso de cada uno de los segmentos genómicos de los virus de influenza aviar fueron ensambladas y editadas utilizando el programa Megalign de Lasergene 8,1 (DNASTAR, Madison, WI, EE.UU.). Los análisis filogenéticos se realizaron con secuencias de genes del AIV disponibles en el banco de datos de *Influenza Research Database*. El programa BioEdit 7 se utilizó para la alineación y el análisis de residuos.

Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó el programa MEGA 6.0. En el mismo se realizó el análisis por el método de distancia Neighbor Joining (NJ) aplicando el modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura 2 parámetros. Para evaluar la confiabilidad de los nodos de los árboles, se realizó la prueba de remuestreo por la técnica de bootstrap (1000 réplicas).

Las secuencias utilizadas para la construcción de todos los arboles filogenéticos se detallan en el ANEXO de la página 116 (Tablas I a XVIII).

## 4.2 Inmunosupresión subclínica de pollos SPF con variantes autóctonas del Virus de la Anemia Infecciosa Aviar

### 4.2.1 Aislamientos de CAV presentes en la población avícola comercial del país:

Los aislamientos argentinos del Virus de la Anemia Infecciosa Aviar, CAV-08, CAV-10, CAV-18 y CAV-135, utilizados en los ensayos fueron obtenidos por el grupo de trabajo a partir de aves domésticas con aumento de mortalidad, dermatitis gangrenosa y atrofia de timo y bolsa de Fabricio en el año 2007 [83].

### 4.2.2 Amplificación y secuenciación del genoma de CAV:

Se diseñó un par de *primers* con el objetivo de amplificar y obtener el genoma completo del CAV de aproximadamente 2300 pares de bases (pb): CAV-NheI Fw y CAV-NheI de RV (Tabla 3). Estos *primers* se utilizaron bajo las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización (5 minutos a 95°C), seguido por 35 ciclos de desnaturalización (30 segundos a 95°C), apareamiento (30 seg 54°C) y extensión (5 min 72°C). Después de una extensión final (10 min a 72°C), las muestras se guardaron a 4 °C hasta su visualización en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

Nombre del <i>primer</i>	Secuencia del <i>primer</i>	Longitud	Posición <sup>a</sup>
CAV-NheIFw	5 -GCTAGCGTCAATGAACCTGA-3	20-mer	1191-1210
CAV-NheIRv	5 -GCTAGCAGGAAGCTCTTTCA-3	19-mer	1178-1196
CAV-Genome Fw	5 -ACGCTAAGATCTGCAACT-3	18-mer	651-668
CAV-Genome Rv	5 -GTAATTCCAGCGATACCAA-3	19-mer	589-607
CAV-VP2 Fw	5 -ATGCACGGGAACGGCGGACAACC-3	23-mer	380-402
CAV-VP3 Rv	5 -TTACAGTCTTATACACCTTCTTGCGGTTTCG-3	30-mer	822-851
CAV-Sec1 Rv	5 -AACGTCACCTTCGCAACGT-3	19-mer	278-296
CAV-Sec4 Fw	5 -AGGGCAACGTTTCAGTTTCTA-3	20-mer	1833-1852

<sup>a</sup> Accession no. en Genbank: M55918

Tabla 3. Secuencia de los *primers* utilizados para obtener el genoma completo de las cepas de CAV Argentinas.

El producto de PCR obtenido se purificó con el kit de purificación QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, y la secuenciación se realizó según lo descrito en el punto 4.1.4. Para ello se utilizaron los dos *primers* de amplificación iniciales, los *primers* internos CAV1, CAV2, CAV-VP1-A fw, CAV-VP1-A rev, CAV VP1-B fw y rev CAV VP1-B previamente descritos [83, 89], y seis nuevos *primers* internos adicionales CAV-Genoma Fw, CAV-Genoma Rv, CAV-VP2 Fw, CAV-VP3 Rv, CAV-Sec1 Rv y CAV-Sec4 Fw, diseñados para completar la secuencia del genoma viral (Tabla 3).

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos consenso para ambos genomas de CAV fueron ensambladas y editadas utilizando el programa Megalign de Lasergene 8,1 (DNASTAR, Madison, WI, EE.UU.). El programa BioEdit 7 se utilizó para la alineación y el análisis de residuos.

### **4.2.3 Preparación de los inóculos de CAV:**

Los inóculos de CAV a ser utilizados en las experiencias *in vivo* se prepararon a partir de las muestras de timo remitidas al laboratorio según protocolos previamente descritos [90]. Brevemente, 1 ml de macerado de timo, previamente clarificado, se trató con igual volumen de cloroformo, se agitó vigorosamente con vortex durante 15 minutos y se centrifugó a 4000g durante 2 minutos. Se dejó reposar la suspensión hasta que se separen las dos fases, y la fase acuosa superior se transfirió a un tubo limpio. Se incubó a 70°C durante 5 minutos y luego se centrifugó a 13000g y 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante recuperado se almacenó a -70°C hasta su utilización en las infecciones experimentales.

### **4.2.4 Cuantificación de inóculos de CAV por PCR cuantitativa en tiempo real:**

Se diseñó una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para determinar el número de copias del genoma de CAV en los inóculos utilizados durante las infecciones experimentales de pollos. Como fluoróforo cuantificador se utilizó SYBR Green.

#### **4.2.4.1 Extracción del ADN de los inóculos de CAV:**

A partir de los inóculos preparados según el punto 4.2.3, se realizó una extracción de ADN utilizando el Mini Kit de DNA QIAamp (Qiagen Inc.Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante.

#### **4.2.4.2 Reactivos para la qPCR:**

Se utilizó una Master Mix Mezcla Real (Biodynamics), un Rox Reference Dye (Invitrogen) y *primers* de Biodynamics (CABA, Argentina). Los mismos amplifican un fragmento de 75 pb situado dentro de la región de solapamiento entre el ORF2 y ORF3 (Tabla 4).

<i>Primer</i>	<i>Secuencia primer</i>	<i>Longitud</i>	<i>Posición<sup>a</sup></i>
CAV-Real Time Fw	5 -AGAGAGATCCGGATIGGTATCG-3	22-mer	576-597
CAV-Real Time Rv	5 -TGGGAGCGCGAGCATT-3	16-mer	636-651

<sup>a</sup> N° de acceso en GenBank M55918

Tabla 4. *Primers* utilizados en la qPCR para cuantificar las copias de ADN de CAV.

Los *primers* fueron diseñados y evaluados utilizando el software Primer Express v1.0. Para las reacciones de PCR se utilizaron 15 pmol de cada *primer* en un volumen final de reacción de 25 µl, y las mismas se llevaron a cabo en un equipo ABI Prism 7500 SDS (Applied Biosystems).

#### 4.2.4.3 Condiciones de ciclado para la qPCR:

Las condiciones del ciclado utilizadas en la qPCR fueron: desnaturalización inicial a 95° C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 15 segundos y apareamientos/extensión a 50° C durante 1 min. Finalmente se adicionó una curva de disociación, la cual nos permitió verificar la amplificación de un producto único por medio de la visualización de un sólo pico de disociación.

#### 4.2.4.4 Curva estándar en la qPCR:

En primer lugar, se amplificó un fragmento de 75 pb del genoma de la cepa vacunal de CAV Cux-1 por PCR, utilizando los *primers* descritos en la Tabla 3. Posteriormente, el fragmento amplificado se purificó y clonó dentro del plásmido vector pGEM T-Easy (Promega Madison, EE.UU.), con el objeto de generar el templado que se utilizaría para las curvas estándar utilizadas en la cuantificación de número de copias de ADN de CAV. Para ello, para cada corrida de qPCR se prepararon diluciones seriadas en base diez con agua destilada del plásmido conteniendo el inserto de 75 pb, para evitar el problema de la degradación del plásmido con el tiempo en las diluciones más altas. Los valores de ciclo umbral o *cycle threshold* (CT) de cada dilución se utilizaron para trazar una curva estándar desde  $10^1$  hasta  $10^6$  números de moléculas de ADN de CAV. El número de copias se determinó utilizando el factor de conversión: 1 ug de un ADN de 1 Kpb = 3,03 pmol [91].

#### 4.2.4.5 Análisis de los resultados:

Los resultados de las corridas de qPCR se analizaron utilizando el software *Sequence Detection Systems* v.1.6.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA). La configuración por defecto del programa se utilizó para definir tanto el valor umbral y los parámetros de referencia para el análisis de los datos crudos. Una curva estándar fue generada en cada corrida de PCR cuantitativa y la misma se utilizó para extrapolar las cantidades en las muestras desconocidas.

#### 4.2.5 Inmunosupresión subclínica de pollos SPF con cepas autóctonas de CAV:

Para todos los experimentos *in vivo* se utilizaron pollos (*Gallus gallus*) de 14 días de edad provenientes de planteles SPF (Rosenbusch, CABA, Argentina). Para ello, los huevos fértiles de esta procedencia fueron incubados hasta su nacimiento en incubadoras de huevos (Yonar, CABA, Argentina).

##### 4.2.5.1 Evaluación de la infección con CAV a diferentes tiempos post infección:

Las aves (n=26) fueron divididas en dos grupos experimentales (CAV y control negativo), de trece aves cada uno, y mantenidas en jaulas para aves durante el trascurso del experimento. Los pollos del grupo CAV fueron inoculados con 0,2 ml conteniendo  $1 \times 10^6$  copias de ADN viral por vía intramuscular, mientras que los pollos del grupo control negativo fueron inoculados, por la misma vía, con 0,2 ml de PBS.

Durante todo el experimento (Figura 5) se controló la aparición de signos clínicos compatibles con una infección con CAV en las aves infectadas: anorexia, debilidad, retraso del crecimiento, cianosis, petequias y equimosis.

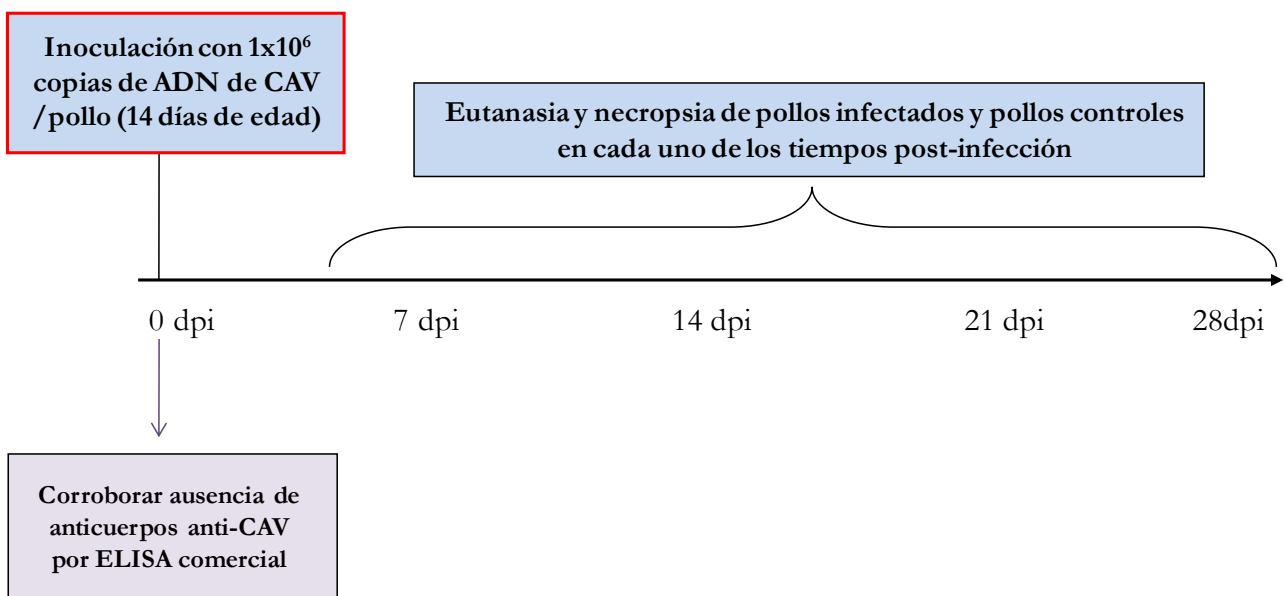


Figura 5. Diseño experimental para la evaluación de la infección con CAV a diferentes tiempos post infección.

A los 7, 14, 21 y 28 días post infección (dpi) se realizó la eutanasia de 3 o 4 animales por grupo. De los mismos se tomaron muestras de sangre para la determinar la presencia de anticuerpos específicos anti-CAV (ver 4.2.9) y se determinó el peso corporal. Luego, se registró el peso del timo de cada animal para observación de lesiones macroscópicas y se separó el primer lóbulo derecho de cada uno para realizar la observación histopatológica correspondiente.

#### 4.2.5.2 Infección experimental con diferentes cepas autóctonas de CAV:

Se seleccionaron cuatro cepas virales (CAV-08, CAV-10, CAV-18 y CAV-135) con idéntica secuencia nucleotídica en la VP2 y VP3, pero con algunos cambios localizados en la región que codifica para la VP1 y en la región no codificante.

Los pollos (n=15) fueron divididos en cinco grupos experimentales de tres aves cada uno y mantenidas dentro de jaulas para aves durante todo el experimento. Los pollos de los grupos 1, 2, 3 y 4 fueron inoculados cada uno con los aislamientos autóctonos CAV-08, CAV-10, CAV-18 y CAV-135 respectivamente. Todas las aves recibieron 0,2 ml de inóculo con  $1 \times 10^6$  copias de ADN de CAV por vía intramuscular. Los pollos del grupo 5 fueron inoculados, por la misma vía con, 0,2 ml de PBS conformando de esta forma el grupo control negativo.

Durante todo el experimento (Figura 6) se controló la aparición de signos clínicos compatibles con la enfermedad, y a los 14 dpi se realizó la eutanasia de los 3 animales de cada grupo. De los mismos se tomaron muestras de sangre para determinar la presencia de anticuerpos específicos y muestras de órganos (timo, bursa y bazo) para observación histopatológica.

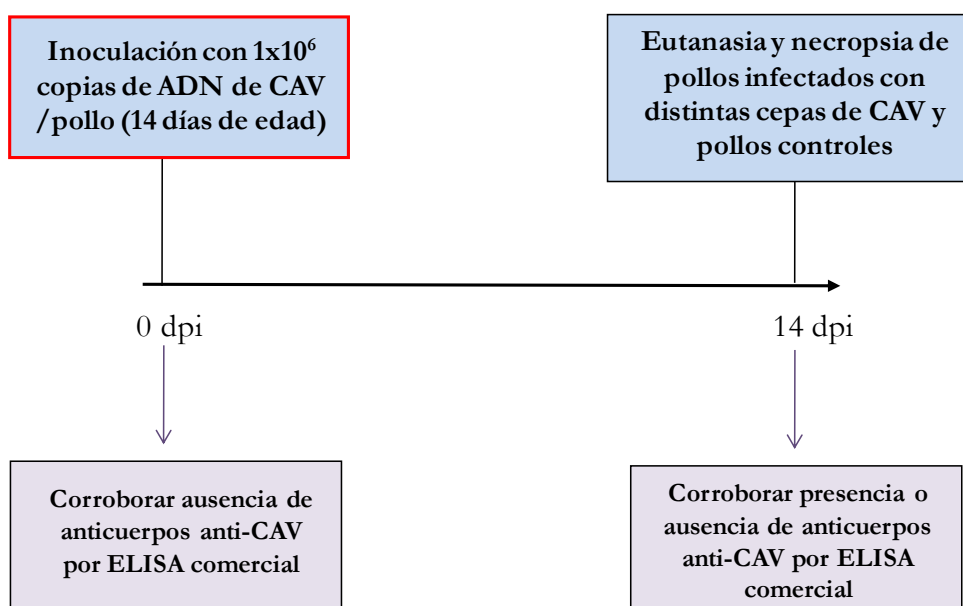


Figura 6. Diseño experimental para determinar cuáles de las cepas de CAV autóctonas producen mayor daño histológico en aves de corral a los 14 dpi.

#### 4.2.5.3 Infección experimental de pollos SPF con las cepas CAV-10 y CAV-18:

Los pollos (n=18) fueron divididos en tres grupos experimentales de seis aves cada uno. Los pollos del grupo 1 y 2 fueron inoculados con los aislamientos autóctonos CAV-10 y CAV-18 respectivamente. Todas las aves recibieron 0,2 ml de inóculo con  $1 \times 10^6$  copias de ADN de CAV por vía intramuscular. Las aves del grupo 3 fueron inoculadas por la misma vía con 0,2 ml de PBS (grupo control negativo). Estos pollos se mantuvieron en jaulas para aves, mientras que los pollos de los grupos 1 y 2 fueron separados en cabinas de asilamiento con filtros HEPA y presión negativa (Allentown, Inc., Modelo CH8ISOL).

Durante todo el experimento se controló la aparición de signos clínicos compatibles con la enfermedad, y a los días 14 dpi se realizó la eutanasia de todos los animales. De los mismos se registró el peso corporal, se tomaron muestras de sangre para la determinar presencia de anticuerpos específicos anti-CAV y muestras de órganos para observación de lesiones macroscópicas (timo, bursa y bazo), histopatológicas (timo y bursa) y estudio de las subpoblaciones de linfocitos T afectadas (timo y bazo) (Figura 7).

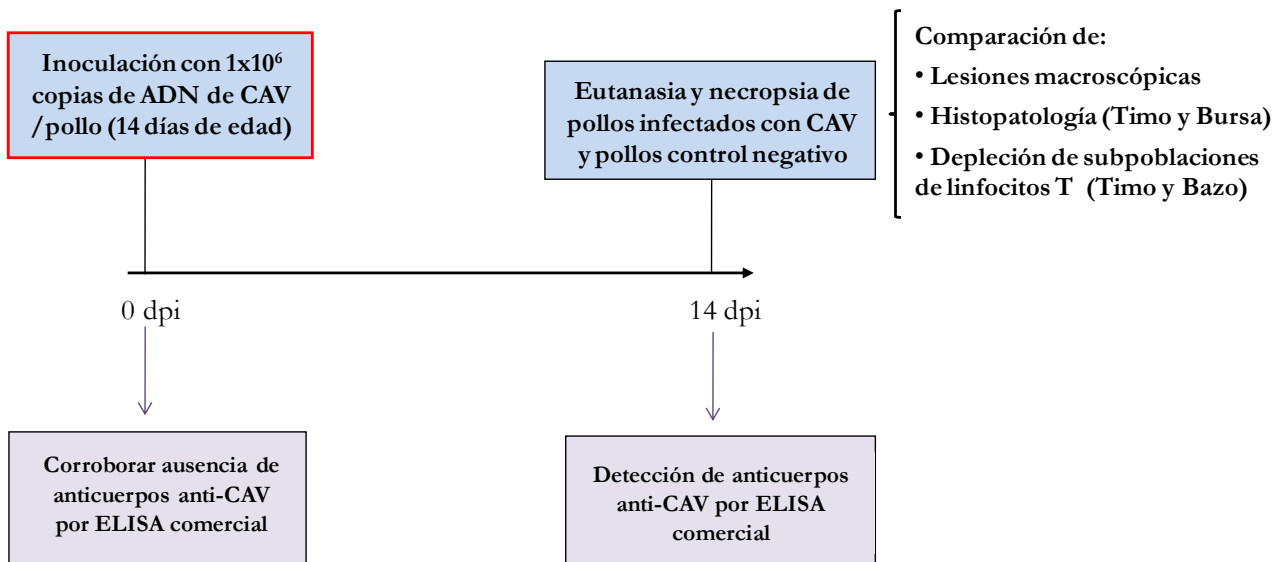


Figura 7. Diseño experimental para comparar la infección de pollos SPF con la cepa CAV-10 y CAV-18 a los 14 dpi.

#### 4.2.6 Observación de lesiones macroscópicas por la infección con CAV:

En el momento de la necropsia de las aves, se determinó el peso corporal, el peso de la bursa, el peso del timo y el peso del bazo de cada animal. A partir de estos valores se determinó la relación peso órgano/peso corporal, tanto en los animales control como en los infectados con CAV.

#### 4.2.7 Determinación del daño histopatológico producido por CAV:

Durante los experimentos realizados se tomaron muestras de diferentes órganos para estudios histopatológicos: la mitad de la bursa, la mitad del bazo y el primer lóbulo craneal derecho del timo de cada animal. Una vez extirpadas las muestras, las mismas se sumergieron en 10% de formalina tamponada neutra para su fijación. Posteriormente, las muestras se deshidrataron y se embebieron en parafina en la forma habitual y se realizaron secciones de 4 µm de grosor. A los cortes se les realizó una tinción con hematoxilina y eosina (HE) para su posterior observación en microscopio óptico.

La cuantificación del daño causado por las diferentes cepas virales de CAV utilizadas en las infecciones experimentales se realizó en base al siguiente score, que se definió utilizando como base el score propuesto por Hoerr [92, 93].

##### Timo:

- Score 1: sin particularidades.
- Score 2: disminución de hasta el 30% de los linfocitos de la corteza.
- Score 3: disminución de entre el 30 y el 50% de los linfocitos en la corteza, hiperplasia de células reticulares.
- Score 4: ausencia de corteza en el 50% o más de los folículos, folículos con necrosis.

##### Bursa:

- Score 1: sin particularidades.
- Score 2: disminución de hasta el 30% de los linfocitos de la corteza de los folículos linfoides, presencia de quistes intraepiteliales, incremento de los repliegues de la mucosa.
- Score 3: disminución entre el 30 y el 70% de los linfocitos de la corteza, irregularidades de la delimitación entre corteza y médula, presencia de quistes intraepiteliales.
- Score 4: disminución de más del 70% de los linfocitos de la corteza, necrosis de los folículos linfoides, fibrosis entre los folículos.

Bazo: Se evaluó la aparición de hiperplasia e histiocitosis perivascular, como el grado de depleción linfoide posible:

- Score 1: sin particularidades.
- Score 2: leve depleción linfoide.
- Score 3: moderada depleción linfoide.
- Score 4: severa depleción linfoide.



## 4.2.8 Citometría de flujo:

### 4.2.8.1 Obtención de suspensiones de células de timo y bazo:

Una vez obtenidos los órganos se realizó la separación del tejido conectivo que los rodea mediante la utilización de pinza y tijera estériles. Posteriormente, cada órgano fue sometido a disrupción mecánica directa a través de colectores de células (Cell Colador, BD) con mallas o *mesh* de 40  $\mu$ micras (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Las células obtenidas fueron recolectadas en tubos cónicos estériles y resuspendidas en 8 ml de RPMI-1640.

### 4.2.8.2 Aislamiento de células mononucleares de timo y bazo:

Las suspensiones celulares obtenidas fueron sembradas en 3 ml de Histopaque (1,077 g/ml, Sigma, St. Louis, MO) dentro de tubos cónicos de 15 ml y centrifugadas a  $400 \times g$  durante 30 min a temperatura ambiente y sin freno en una centrífuga (Eppendorf 5804 R). Posteriormente, se cosecharon las células mononucleares de la interface y se lavaron dos veces con 10 ml de medio RPMI-1640. El número de células viables obtenidas se contó en cámara de Neubauer utilizando el colorante Azul Tripán como método de tinción por exclusión.

### 4.2.8.3 Marcación de células mononucleares con anticuerpos monoclonales:

Las células aisladas se diluyeron en *buffer* de tinción o *staining* (PBS 1  $\times$ , 10% de SFB, 0,1% de azida de sodio) y se transfirieron a una placa de 96 pocillos o *wells* en una concentración de  $1 \times 10^6$  células por *well*. Las mismas se lavaron dos veces con el mismo *buffer staining* por centrifugación a  $250 \times g$  durante 5 min (Eppendorf 5804 R). La marcación se realizó por resuspensión del sedimento o *pellet* celular de cada *well* con 100  $\mu$ l de *buffer staining* incluyendo diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales comerciales o una sola marca para la compensación del citómetro. Las células se incubaron a 4°C durante 30 min y se lavaron nuevamente dos veces con *buffer staining* como se mencionó anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales de aves (Southernbiotech, Birmingham, AL) utilizados fueron previamente titulados con el fin de determinar la concentración de marcación óptima a ser utilizada: CD3-SPRD (clon CT-3), CD4-FITC (clon CT-4), CD8a-PE (clon CT-8), CD8a-FITC (clon CT-8) y CD8 $\beta$ -PE (clon EP-42). Las mezclas o *mix* de anticuerpos utilizados fueron las siguientes:

Mix A: CD3-SPRD, CD4-FITC y CD8a-PE

Mix B: CD3-SPRD, CD8a-FITC y CD8 $\beta$  -PE

Las células fueron adquiridas utilizando un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA) y aquellas con marcación positiva fueron analizadas utilizando el software CellQuest.

El análisis se realizó sobre 20.000 eventos y las poblaciones de células linfoides viables discretas fueron encerradas de acuerdo a las características de tamaño y granulosidad (FSC y SSC). Los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de células linfoides en el timo y el bazo se determinaron por análisis multiparamétrico.

#### **4.2.9 Detección de anticuerpos anti-CAV:**

Las aves utilizadas en los experimentos fueron previamente analizadas serológicamente mediante la técnica de ELISA. La misma se realizó utilizando el Kit comercial de IDEXX FlockChek (Idexx Laboratories, Inc., Westbrook, ME) según instrucciones del fabricante, para confirmar la ausencia de anticuerpos contra CAV.

El suero obtenido al finalizar cada una de las infecciones experimentales también se analizó mediante esta técnica.

### **4.3 Estudio de replicación y transmisión de LPAIV de subtipo H6 en pollos SPF inmunocompetentes**

#### **4.3.1 LPAIV de subtipo H6 utilizados:**

En la Tabla 5 se detallan los siete virus de IA utilizados para los estudios de replicación y transmisión en pollos SPF de 21 días de edad. Cinco de los virus son LPAIV aislados de aves silvestres acuáticas en la Argentina, mientras que otros dos son LPAIV prototipos, uno Euroasiático A/teal/Hong Kong/W312/1997 (H6N1) (W312/H6N1) y otro Norteamericano A/mallard/Alberta/206/1996 (H6N8) (206/H6N8). Todos los LPAIV argentinos mencionados en la Tabla 4 se obtuvieron, aislaron y secuenciaron según los puntos detallados previamente en el apartado 4.1.

<b>Virus</b>	<b>Grupo</b>
A/mallard/Alberta/206/1996 (H6N8)	206/H6N8
A/teal/Hong Kong/W312/1997 (H6N1)	W312/H6N1
A/rosy-billed pochard/Argentina/CIP051-557/2007 (H6N2)	557/H6N2
A/rosy-billed pochard/Argentina/CIP051-925/2008 (H6N2)	925/H6N2
A/rosy-billed pochard/Argentina/CIP051-1977/2010 (H6N2)	1977/H6N2
A/rosy-billed pochard/Argentina/CIP051-575/2007 (H6N8)	575/H6N8
A/rosy-billed pochard/Argentina/CIP051-269/2007 (H6N8)	269/H6N8

Tabla 5. LPAIV utilizados en estudios de replicación y transmisión en aves de corral [85].

#### **4.3.2 Preparación de glóbulos rojos de gallina:**

Se extrajeron 2 ml de sangre de gallina por venopunción alar con una jeringa conteniendo solución Alsever al 50% V/V. La sangre se transfirió a un tubo cónico y se lavó tres veces con PBS mediante centrifugación a 2000 rpm por 10 min (Eppendorf 5804 R). Finalmente, a partir del paquete de globulos rojos obtenido se preparó una solución al 0,5% V/V en PBS para los ensayos de hemaglutinación en placa [9].

#### **4.3.3 Ensayo de hemaglutinación (HA):**

Para realizar el ensayo de HA se colocaron 50 µl de muestra (líquido alantoideo) en un pocillo de una placa de 96 *wells*, se adicionaron 50 µl de glóbulos rojos al 0,5% y se agitó suavemente la placa para homogeneizar. Luego, se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente se determinó la ausencia o presencia de virus de IA en la muestra dependiendo de la formación o no, respectivamente, de un botón de glóbulos rojos en el *well*.

Para calcular las Unidades Hemaglutinantes (UHA) en una muestra, se realizaron diluciones seriadas en base dos de la muestra incógnita en PBS 1X y luego se agregó 50 µl la solución de globulos rojos. La inversa de la mayor dilución que resultó positiva (ausencia de formación de botón de glóbulos rojos) para el virus de influenza, fueron finalmente las UHA de la muestra en estudio [9].

#### **4.3.4 Titulación de LPAIV en huevos SPF:**

Se prepararon diluciones seriadas en base diez del líquido alantoideo cosechado en el punto 4.1.3 con PBS 1X. Luego, 200 µl de cada dilución fueron inoculados en cavidad corioalantoidea de huevos embrionados SPF de 9-11 días de edad por cuadruplicado. A las 72 horas post-inoculación se cosechó el líquido alantoideo de cada huevo y se determinó la presencia o ausencia de virus por HA. Finalmente, el título viral se determinó por la técnica de Reed y Muench utilizando Dosis Infecciosas 50% en Embrión de pollo (EID<sub>50</sub>). Aquel material cosechado con un título superior a 1 x 10<sup>7</sup> EID<sub>50</sub>/ml fue conservado a -70°C para su posterior utilización.

#### **4.3.5 Diseño experimental para los estudios de replicación y transmisión:**

Los pollos utilizados (n=48) fueron divididos en ocho grupos experimentales de 3 aves cada uno, separados en cabinas de aislamiento con filtros HEPA y presión negativa dentro del laboratorio de bioseguridad NSB2+ de la Universidad de Maryland, USA [85].

El primer grupo estuvo conformado por aves SPF sin ninguna infección (control negativo). El resto de los grupos experimentales estuvieron conformados por aves SPF que fueron inoculadas con los siete LPAIV mencionados en la Tabla 4.

A los 21 días de edad, los pollos de los grupos 206/H6N8, W312/H6N1, 557/H6N2, 925/H6N2, 1977/H6N2, 575/H6N8 y 269/H6N8 fueron infectados con 1 ml de inóculo del aislamiento correspondiente de LPAIV, con un título de 1 x 10<sup>6</sup> EID<sub>50</sub> por vía intratraqueal (500 µl), intraocular (250 µl) e intranasal (250 µl). Las aves del grupo control fueron inoculadas con PBS por las mismas vías e igual volumen que los grupos infectados con LPAIV.

A los efectos de estudiar la transmisibilidad de los LPAIV por contacto directo entre aves, al primer dpi se agregaron 3 pollos SPF, sin inoculación o infección, a cada grupo experimental. Esto se realizó posteriormente a la desinfección de la unidad de aislamiento.

Todas las aves fueron monitoreadas diariamente durante el transcurso del experimento (Figura 8) con el fin de registrar la aparición de signos clínicos de la enfermedad (decaimiento en el apetito y/o actividad, alteración en la producción de heces, cianosis de la lengua o las piernas, plumas erizadas y dificultad respiratoria).

A los días 1, 3, 5 y 7 post infección (pi) se recolectaron muestras de hisopados traqueales y cloacales en una solución de PBS suplementado con 50% glicerol, antibióticos y antimicóticos de amplio espectro. Los mismos fueron guardados a -70°C hasta su procesamiento y determinación de título viral por EID<sub>50</sub>/ml en embrión de pollo.

Los pollos infectados fueron re-inoculados a los 14 dpi. A los 28 dpi se tomaron muestras de suero de todos los animales para la detección de anticuerpos específicos anti-AIV, titulación de aquellos sueros positivos y determinación del perfil antigénico (ver 4.3.6).

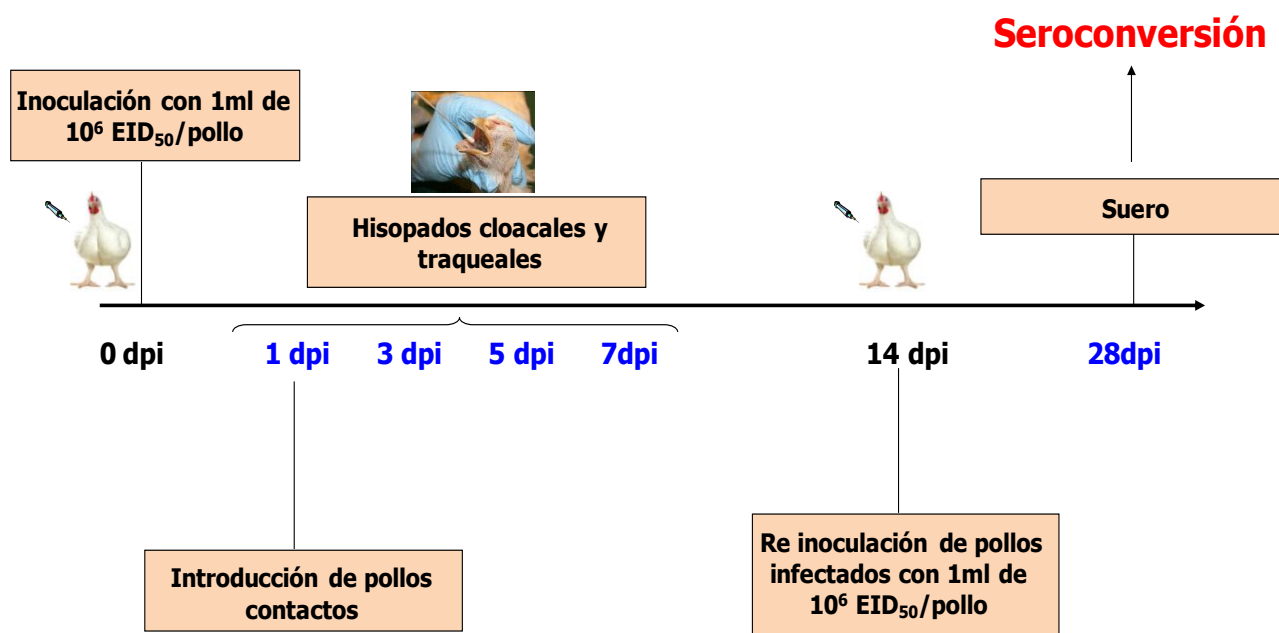


Figura 8. Diseño experimental para los estudios de replicación y transmisión de los LPAIV subtipo H6 en pollos SPF.

### 4.3.6 Detección de anticuerpos específicos anti-AIV:

#### 4.3.6.1 ELISA de competición comercial (IDVet):

Las aves utilizadas durante el experimento fueron previamente analizadas serológicamente mediante la utilización de un Kit de ELISA de competición comercial (ID-VET, Montpellier, Francia) según instrucciones del fabricante, para descartar la presencia de anticuerpos contra AIV que indiquen un contacto previo con el virus. El mismo detecta los anticuerpos anti-NP de los virus de Influenza tipo A.

#### 4.3.6.2 Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI):

Aquellos sueros que, al finalizar el experimento, resultaron positivos al ELISA de competición comercial fueron titulados mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI), siguiendo el protocolo descrito en el Manual de la OMS sobre Influenza Animal Diagnóstico y Vigilancia [87].

Este ensayo permite, una vez titulado el suero contra el virus homólogo, determinar el grado de relación contra los virus heterólogos, obteniendo así el perfil antigénico del suero en estudio.

#### **4.3.6.2.1 Preparación de los sueros a titular:**

Brevemente, se adicionaron tres volúmenes de Enzima Destructora de Receptores o RDE (Accurate Chemical and Scientific Corp., Westbury, NY) a un volumen de suero y se incubó a 37°C durante la noche (ON), con el cuidado de no superar las 16 horas de incubación. Luego, se inactivó el RDE incubando a 56°C durante 30 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron seis volúmenes de PBS, obteniéndose finalmente una dilución 1:10 del suero original.

#### **4.3.6.2.2 Titulación de anticuerpos anti-HA mediante HI:**

Se realizaron diluciones seriadas en base dos de los sueros preparados en el punto 4.3.6.2.1 con PBS 1X. Luego, se transfirieron 25 µl de cada dilución de suero a una placa de 96 *wells*, se agregaron 25 µl de virus conteniendo 8 UHA, se agitó suavemente la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la neutralización viral por el suero. Una vez finalizada la incubación, se añadieron 50 µl de glóbulos rojos al 0,5%, se agitó suavemente la placa y se realizó una segunda incubación a temperatura ambiente por 30 minutos. Finalmente, el título del suero se determinó como la inversa de la mayor dilución del suero que inhibe totalmente la HA.

### **4.4 Estudio de replicación y transmisión de LPAIV de subtipo H6 en pollos SPF inmunocompetentes o inmunosuprimidos previamente con el Virus de la Anemia Infecciosa Aviar**

#### **4.4.1 Diseño experimental para los estudios de invasión, replicación y transmisión de 557/H6N2:**

Para estudiar la invasión, replicación y transmisión del virus 557/H6N2 en pollos SPF inmunocompetentes o inmunosuprimidos experimentalmente con la cepa CAV-10 se utilizaron un total de 46 pollos SPF divididos en tres grupos experimentales:

1. Grupo Control negativo (Figura 9): Pollos SPF (n=22) fueron mantenidos en jaulas para aves y los 14 días de edad recibieron 0,2 ml de PBS por vía intramuscular. A los 28 días de edad fueron nuevamente inoculados con 1 ml de PBS por vía intratraqueal (500 µl), intraocular (250 µl) e intranasal (250 µl).

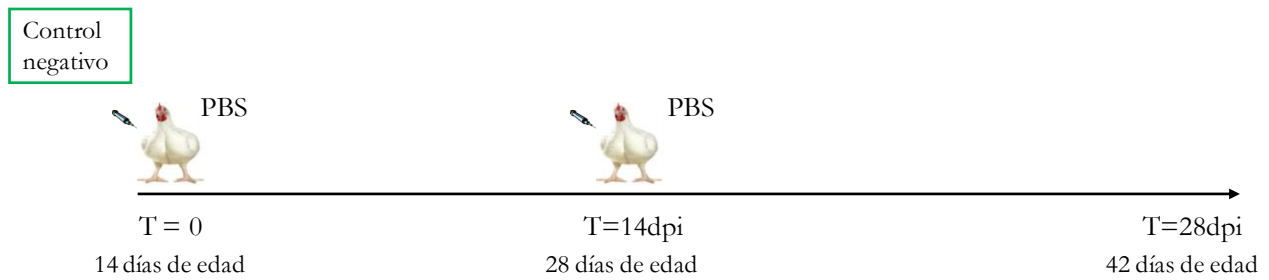


Figura 9. Diseño experimental para el grupo control negativo (1).

2. Grupo Influenza (Figura 10): Pollos SPF (n=8) fueron mantenidos en cabinas de asilamiento con filtros HEPA y presión negativa dentro del laboratorio de bioseguridad del tipo NSB4 OIE. A los 14 días de edad fueron inoculados con 0,2 ml de PBS por vía intramuscular y, a los 28 días de edad, fueron infectados con 1 ml de inóculo de 557/H6N2 con un título de  $1 \times 10^6$  EID<sub>50</sub> por vía intratraqueal (500 µl), intraocular (250 µl) e intranasal (250 µl).



Figura 10. Diseño experimental para el grupo influenza (2).

3. Grupo Coinfección CAV+AIV (Figura 11): Pollos SPF (n=16) fueron mantenidos en cabinas de asilamiento con filtros HEPA y presión negativa dentro del laboratorio de bioseguridad del tipo NSB4 OIE. A los 14 días de edad fueron infectados con 0,2 ml de inóculo conteniendo  $1 \times 10^6$  copias de ADN de CAV-10 por vía intramuscular. A los 28 días de edad (14 dpi) estos pollos fueron nuevamente infectados con 1 ml de inóculo de 557/H6N2 con un título de  $1 \times 10^6$  EID<sub>50</sub> por vía intratraqueal (500 µl), intraocular (250 µl) e intranasal (250 µl).



Figura 11. Diseño experimental para el grupo coinfección (3).

#### 4.4.1.1 Inmunosupresión generada por CAV-10:

A los 14 dpi se realizó la eutanasia y necropsia de 8 pollos de los grupos 1 y 3. Estos animales fueron utilizados para confirmar el estado de inmunosupresión generado por CAV-10 a los 14 dpi. Estos dos grupos fueron designados 1ª y 3ª (Figura 12).

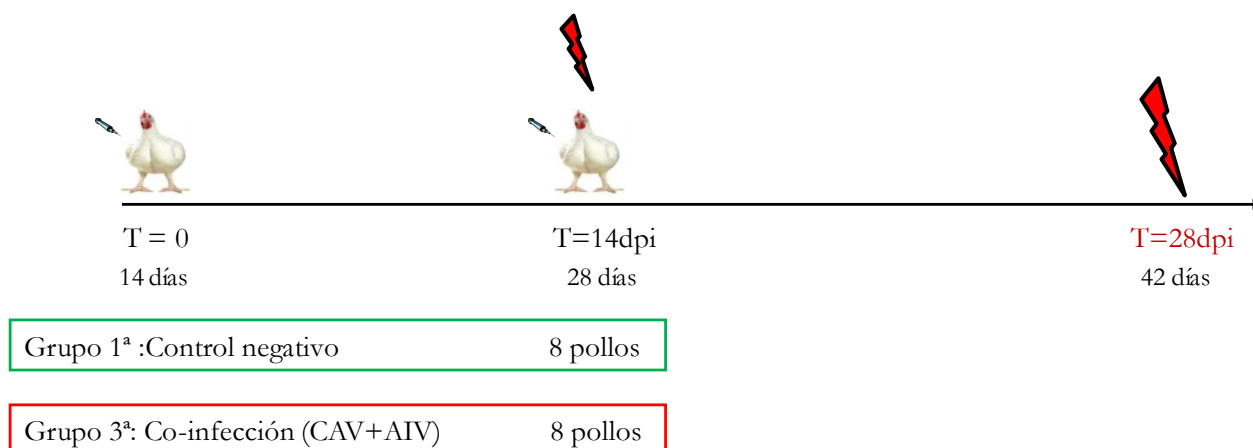


Figura 12. Diseño experimental para los grupos 1ª y 3ª.

#### 4.4.1.2 Estudio de invasión, replicación y transmisión de 557/H6N2 en pollos SPF con diferente estado inmunológico:

Los pollos de los grupos 1, 2 y 3 fueron monitoreados diariamente con el fin de registrar la aparición de signos clínicos compatibles con influenza durante toda la experiencia (decaimiento en el apetito y/o actividad, alteración en la producción de heces, cianosis de la lengua o las piernas, plumas erizadas y dificultad respiratoria).

A los días 1, 3, 5 y 7 pi con el virus 557/H6N2 (días 15, 17, 19 y 21 pi con CAV-10) se recolectaron muestras de hisopados traqueales y cloacales en una solución de PBS suplementado con 50% glicerol, antibióticos y antimicóticos de amplio espectro, a los efectos de estudiar diferencias en la excreción viral. Los mismos fueron guardados a -70°C hasta su procesamiento y cuantificación de título ARN viral (ver punto 4.4.2).

A los efectos de estudiar la transmisibilidad del virus 557/H6N2 por contacto directo entre aves, al primer dpi (15 dpi de CAV) se agregaron 3 pollos SPF del grupo control negativo a ambos grupos descargados con LPAIV (2 y 3). Esto se realizó posteriormente a la desinfección de la unidad de aislamiento y las aves pertenecientes a estos grupos se denominaron Contacto Directo 2 (CD-2) y Contacto Directo 3 (CD-3).



A los 3 dpi con 557/H6N2 (17 dpi con CAV-10) se realizó la eutanasia y necropsia de 4 pollos de cada grupo y se tomaron muestras de distintos órganos: cerebro, cavidad nasal, tráquea, pulmón, intestino, páncreas, riñón, tonsilas cecales y bolsa de Fabricio.

De los 7 animales restantes (4 animales infectados y 3 animales contacto directo) del grupo 2 y 3 se tomaron muestras de suero a los 14 dpi con 557/H6N2 (28 dpi con CAV-10) para la detección y titulación de anticuerpos específicos anti-557/H6N2 (Figura 13).

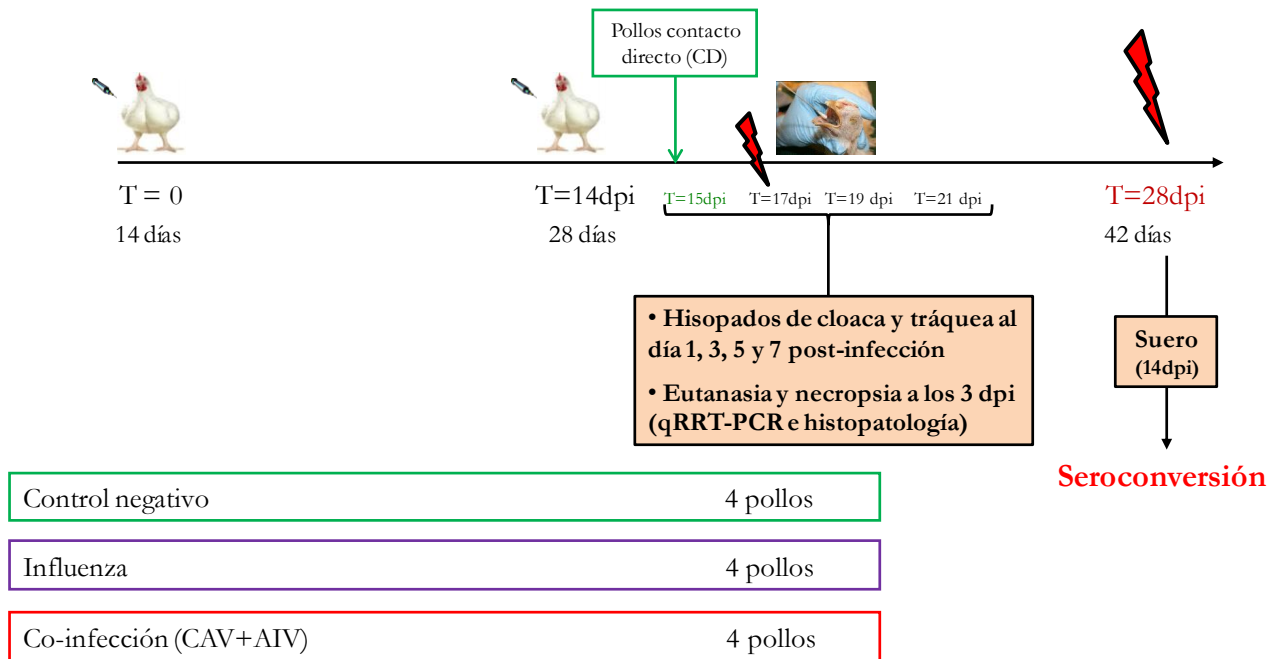


Figura 13. Diseño experimental para los estudios de replicación y transmisión de 557/H6N2 en pollos SPF con diferente estado inmunológico.

#### 4.4.2 Cuantificación del título de ARN viral:

Para determinar el título de ARN viral en hisopados traqueales, hisopados cloacales y órganos de pollos infectados con 557/H6N2, se realizó la PCR detallada en el punto 4.1.2 de esta sección. Para la reacción de RT se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EE.UU.) la cantidad de ARN utilizada en cada reacción (100ng/15µl de ARN). Esto permitió comparar el título de ARN viral entre distintas muestras y tratamientos.

##### 4.4.2.1 Curva estándar para la cuantificación de ARN viral por PCR en tiempo real:

La curva estándar utilizada para la cuantificación de ARN viral se estableció con ARN extraído a partir de diluciones del mismo stock viral de 557/H6N2 titulado y utilizado para la infección de pollos en el experimento.

Brevemente, se realizó la extracción de ARN de cada una de las diluciones seriadas en base diez a partir de un stock con título de  $1 \times 10^6$  EID<sub>50</sub> de 557/H6N2. Se realizó la retrotranscripción y el ADNc obtenido se utilizó en cada corrida de PCR en tiempo real. El límite de detección de esta RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) fue de  $10^2$  EID<sub>50</sub>/ml, por lo cual las muestras negativas por RT-qPCR fueron registradas como  $\leq 10^2$  EID<sub>50</sub>/ml.

#### **4.4.3 Daño histopatológico producido por la cepa de AIV 557/H6N2:**

Se tomaron muestras de diferentes órganos para estudios histopatológicos: cerebro, cavidad nasal, tráquea, esófago, pulmón, intestino, páncreas, riñón, tonsilas cecales y bolsa de Fabricio. Una vez extirpadas las muestras, las mismas se sumergieron en 10% de formalina tamponada neutra para su fijación. Posteriormente, las muestras se deshidrataron y se embebieron en parafina en la forma habitual y se realizaron secciones de 4  $\mu$ m de grosor. A los cortes se les realizó una tinción con hematoxilina y eosina (HE) para su posterior observación en microscopio óptico.

El daño histológico observado será considerado según lo expuesto previamente [8], donde las lesiones de IA varían de acuerdo a si la cepa es de baja o alta patogenicidad.

En el caso de los virus de baja patogenicidad, se esperará encontrar exudados catarral, fibrinoso, serofibrinoso, mucopurulento o fibrinopurulento en cavidad nasal y enteritis catarral o fibrinosa en intestino. En el resto de los órganos no se observan lesiones.

En el caso de virus de alta patogenicidad, se deberán observar lesiones de tipo necrótico o hemorrágico con infiltrados linfocitarios en los órganos.

En bursa y timo las lesiones a esperadas serán de atrofia según lo descrito en el punto 4.2.7.

## 4.5 Análisis estadístico

Aquellas variables cuantitativas (relación peso órgano/peso corporal, número de células/gr. órgano, frecuencias relativas y absolutas de las distintas subpoblaciones de timocitos y esplenocitos y título de ARN viral) fueron evaluadas para ver si se ajustaban a una distribución normal, para ello se realizó el test de Shapiro-Wilk. Las variables que no se ajustaron a los supuestos básicos de la estadística paramétrica fueron transformadas (inversa o  $\log_{10}$ ).

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre dos tratamientos se realizó la prueba t-Student. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre tres o más tratamientos se realizó una prueba de ANOVA, y se aplicó el test de Tukey cuando se detectaron diferencias entre los grupos.

En aquellos casos donde no se logró cumplir con los supuestos, las variables se analizaron por el test no paramétrico Kruskal-Wallis y se aplicó el test de Bonferroni-Dunn para las pruebas post-hoc.

En todos los casos los niveles de significación fueron fijados en un 5% y los análisis fueron realizados con el software estadístico PASW Statistic 18 (SPSS, version 15.0, Chicago, IL, U.S.A.).

Las variables cualitativas, como el número de aves positivas al AIV por RT-qPCR, se analizaron mediante la prueba exacta de Fisher. Este tipo de análisis se realizó con el software estadístico STATGRAPHICS Centurion 16.

## 4.6 Bienestar animal

El trabajo con animales de experimentación fue realizado en los boxes para animales o dentro del laboratorio de bioseguridad del tipo NSB4 OIE, que se encuentran en el Instituto de Virología, del CICVyA del INTA Castelar. En todos los casos los mismos se realizaron bajo protocolos aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación del CICVyA-INTA (CICUAE-CICVyA INTA- Resolución 174/09), que se encuentran en concordancia con las normas dispuestas en el Real Decreto Español del año 2005 y la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” del Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences of the National Research Council, 1996.

Aquellos experimentos realizados en los Estados Unidos de América (4.3) se llevaron a cabo dentro de laboratorios de bioseguridad NSB2+ de la Universidad de Maryland, y cumpliendo con los protocolos aprobados por la comisión de cuidado y uso de animales de laboratorio (IACUC) de la Universidad de Maryland, bajo la regulación de bienestar animal (AWA).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Aislamiento y caracterización molecular de los Virus de Influenza Aviar en la Argentina**

#### **5.1.1 Muestras analizadas:**

Durante el período 2006-2012 se tomaron muestras de hisopado cloacales de 4858 aves silvestres acuáticas para realizar el relevamiento de las cepas del AIV que circulan en nuestro país. Las aves muestreadas pertenecieron a los siguientes órdenes: Anseriformes, Charadriiformes, Ciconiiformes, Columbiformes, Falconiformes, Gruiformes, Passeriformes, Pelecaniformes, Procellariiformes, Psittaciformes y Sphenisciformes, entre otros. La cantidad de muestras de hisopado cloacal obtenidas para cada una de las especies muestreadas se detallan en la Tabla 6.

Orden	Nombre común	Nombre científico	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Total periodo 2006 - 2012
Anseriformes	Pato brasileño	<i>Amazonetta brasiliensis</i>	52	53	18	15	5	18	32	193
	Pato gargantilla	<i>Anas bahamensis</i>	0	5	0	2	19	1	0	27
	Pato colorado	<i>Anas cyanoptera</i>	0	0	1	9	0	1	0	11
	Pato barcino	<i>Anas flavirostris</i>	11	5	0	1	2	3	0	22
	Pato maicero	<i>Anas georgica</i>	3	1	0	0	0	6	0	10
	Pato cuchara	<i>Anas platalea</i>	4	1	8	132	2	8	0	155
	Pato overo	<i>Anas sibilatrix</i>	0	0	0	0	1	0	0	1
	Pato capuchino	<i>Anas versicolor</i>	24	9	42	156	11	139	0	381
	Pato de collar	<i>Callonetta leucophrys</i>	23	38	11	29	8	37	0	146
	Chajá	<i>Chauna torquata</i>	0	0	1	0	0	0	0	1
	Siriñ vientre negro	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	0	0	0	0	0	5	20	25
	Siriñ colorado	<i>Dendrocygna bicolor</i>	78	25	43	13	22	104	0	285
	Siriñ pampa	<i>Dendrocygna viduata</i>	30	1	142	26	0	98	73	370
	Pato cabeza negra	<i>Heteronetta atricapilla</i>	0	1	1	5	0	0	0	7
	Pato picazo	<i>Netta peposaca</i>	157	615	122	185	86	100	0	1265
Pato fierro	<i>Nomonyx dominicus</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	
Pato cretudo	<i>Sarkidiornis melanotos</i>	0	1	10	0	0	1	0	12	
Charadriiformes	Playerito rojizo	<i>Calidris canutus</i>	0	0	0	29	0	0	0	29
	Playerito rabadilla blanca	<i>Calidris fuscicollis</i>	0	3	0	7	0	0	0	10
	Chorlito doble collar	<i>Charadrius falklandicus</i>	0	0	0	73	0	0	0	73
	Becasina común	<i>Gallinago paraguaiiae</i>	0	0	1	5	0	0	0	6
	Gaviota cangrejera	<i>Larus atlanticus</i>	73	0	1	0	0	0	0	74
	Gaviota cocinera	<i>Larus dominicanus</i>	114	60	38	6	0	20	0	238
	Falaropo común	<i>Phalaropus tricolor</i>	0	0	1	0	0	0	0	1
	Rayador	<i>Rynchops niger</i>	0	6	0	0	0	0	0	6
	Gaviotín pico amarillo	<i>Sterna eurynatha</i>	2	15	0	0	0	0	0	17
	Gaviotín sudamericano	<i>Sterna hirundinacea</i>	17	40	15	0	0	0	0	72
	Gaviotín golondrina	<i>Sterna hirundo</i>	9	10	42	0	0	0	0	61
	Gaviotín lagunero	<i>Sterna trudeaui</i>	0	0	1	0	0	0	0	1
	Gaviotín real	<i>Thalasseus maximus</i>	7	18	19	0	0	0	0	44
	Gaviotín de sandwich	<i>Thalasseus sandwicensis</i>	0	7	28	0	0	0	0	35
	Pitotoy chico	<i>Tringa flavipes</i>	0	0	1	0	0	0	0	1
Tero común	<i>Vanellus chilensis</i>	0	0	2	0	0	0	0	2	
Ciconiiformes	Garza mora	<i>Ardea cocoi</i>	1	0	0	0	0	0	0	1
	Cuervillo cara pelada	<i>Phimosus infuscatus</i>	1	0	0	0	0	0	0	1
	Cuervillo de cañada	<i>Plegadis chibi</i>	5	0	0	0	0	0	0	5
	Cóndorandino	<i>Vultur gryphus</i>	0	0	0	0	0	0	49	49
Columbiformes	Torcacita	<i>Columbina picui</i>	11	0	0	0	0	0	0	11
	Paloma manchada	<i>Patagioenas maculosa</i>	3	0	0	0	0	0	0	3
Falconiformes	Águila coronada	<i>Harpohaliaetus coronatus</i>	0	0	0	0	0	0	16	16
Gruiformes	Gallareta chica	<i>Fulica leucoptera</i>	13	3	0	0	0	0	0	16
	Gallareta escudete rojo	<i>Fulica rufifrons</i>	1	0	0	0	0	0	0	1
	Gallineta overa	<i>Pardirallus maculatus</i>	0	0	1	0	0	0	0	1
Passeriformes	Hornero	<i>Furnarius rufus</i>	3	0	0	0	0	0	0	3
	Tordo renegrido	<i>Molothrus bonariensis</i>	2	0	0	0	0	0	0	2
	Tacuarita azul	<i>Poliophtila dumicola</i>	2	0	0	0	0	0	0	2
	Pepitero gris	<i>Saltator coerulescens</i>	1	0	0	0	0	0	0	1
	Pijuí frentegris	<i>Synallaxis frontalis</i>	2	0	0	0	0	0	0	2
	Batará mayor	<i>Taraba major</i>	1	0	0	0	0	0	0	1
	Zorzal chalchalero	<i>Turdus amaurochalinus</i>	10	0	0	0	0	0	0	10
	Zorzal colorado	<i>Turdus rufiventris</i>	2	0	0	0	0	0	0	2
	Chingolo	<i>Zonotrichia capensis</i>	1	0	0	0	0	0	0	1
	Pelecaniformes	Cormorán imperial	<i>Phalacrocorax atriceps</i>	0	157	90	0	0	65	0
Cormorán real		<i>Phalacrocorax albiventer</i>	17	0	0	0	0	0	0	17
Biguá		<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	1	0	0	0	0	0	0	1
Comorán cuello negro		<i>Phalacrocorax magellanicus</i>	1	1	54	0	0	0	0	56
Procellariiformes	Petrel gigante común	<i>Macronectes giganteus</i>	0	18	0	0	0	0	0	18
Psittaciformes	Loro hablador	<i>Amazona aestiva</i>	60	0	0	0	0	0	0	60
Sphenisciformes	Pingüino patagónico	<i>Spheniscus magellanicus</i>	91	310	68	0	0	0	210	679
Otros			2	0	3	0	0	0	0	5
<b>Total</b>			<b>836</b>	<b>1403</b>	<b>764</b>	<b>693</b>	<b>156</b>	<b>606</b>	<b>400</b>	<b>4858</b>

Tabla 6. Muestras de hisopados cloacales recolectados de aves silvestres en la Argentina durante el período 2006-2012.

Como se puede observar en la Tabla 7, la mayoría de las muestras obtenidas durante el período analizado pertenecen al orden Anseriformes (59,9%). Los órdenes que continúan con mayor número de muestras obtenidas son Charadriiformes (13,8%) y Sphenisciformes (14%), que corresponden a aves playeras y a aves marinas no voladoras como los pingüinos, respectivamente.

<b>Orden</b>	<b>N° de muestras</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Anseriformes	2912	59,9
Charadriiformes	670	13,8
Ciconiiformes	56	1,2
Columbiformes	14	0,3
Falconiformes	16	0,3
Gruiformes	18	0,4
Passeriformes	24	0,5
Pelecaniformes	386	7,9
Procellariiformes	18	0,4
Psittaciformes	60	1,2
Sphenisciformes	679	14
Others	5	0,1
<b>TOTAL</b>	<b>4858</b>	<b>100</b>

Tabla 7. Número de muestras recolectadas según Orden y porcentaje sobre el total de las muestras obtenidas durante el período 2006-2012.

### **5.1.2 Detección y aislamiento de Virus de Influenza Aviar en la Argentina:**

Los 4858 hisopados cloacales obtenidos se analizaron mediante rRT-PCR para la detección del virus de IA (véase 4.1.2). A partir de los mismos se detectaron 52 muestras positivas, las cuales fueron utilizadas posteriormente en la inoculación de huevos embrionados SPF (véase 4.1.3) con el fin de lograr el aislamiento viral. A partir de las 52 muestras positivas por rRT-PCR se lograron aislar un total de veinte (20) virus de IA (Tabla 8).

Nombre científico	Nombre común	Nº de muestras	Nº de muestras positivas por RRT-PCR	Subtipo (Nº de aislamientos)
<i>Amazona aestiva</i>	Loro hablador	60	1	-
<i>Amazonetta brasiliensis</i>	Pato brasileño	193	4	-
<i>Anas bahamensis</i>	Pato gargantilla	27	1	-
<i>Anas cyanoptera</i>	Pato colorado	11	2	H1N1 (1), H7N9 (1)
<i>Anas flavirostris</i>	Pato barcino	22	1	H4N6 (1)
<i>Anas platalea</i>	Pato cuchara	155	1	-
<i>Anas versicolor</i>	Pato capuchino	381	23	H4N2 (1), H4N6 (1), H4N8 (1), H5N3 (1), H6N2 (1), H7N7 (1), H10N7 (2)
<i>Callonetta leucophrys</i>	Pato de collar	146	1	-
<i>Larus dominicanus</i>	Gaviota cocinera	238	1	H13N9 (1)
<i>Netta peposaca</i>	Pato picazo	1265	16	H6N2 (4), H6N8 (2), H9N2 (1)
<i>Sarkidiornis melanotos</i>	Pato cretudo	12	1	H6N2 (1)
Others		2348	-	-
<b>TOTAL</b>		<b>4858</b>	<b>52</b>	<b>20</b>

Tabla 8. Número de muestras procesadas por rRT-PCR, número de muestras positivas al virus de Influenza tipo A y número de aislamientos obtenidos según la especie durante el período 2006-2012.

Posteriormente, se subtipificaron dichos aislamientos mediante la amplificación por PCR y posterior secuenciación de su HA y NA (véase 4.1.4). El análisis de la secuencia aminoacídica de la HA permitió determinar que todos los aislamientos obtenidos fueron de baja patogenicidad (LPAIV).

### 5.1.3 Análisis filogenético del Virus de Influenza Aviar:

De los veinte (20) aislamientos obtenidos, ocho (8) fueron de subtipo H6, cuatro (4) de subtipo H4, dos (2) de subtipo H10, dos (2) de subtipo H7 y sólo uno (1) de los virus aislados fueron de subtipo H13, H9, H5 y H1. En la Tabla 9 se describe el nombre completo, subtipo, año de aislamiento, orden y huésped de los veinte LPAIV aislados durante el período 2006-2012.

Con el fin de caracterizar molecularmente de forma completa los aislamientos obtenidos y determinar el patrón evolutivo de los mismos, se realizó la secuenciación completa de todos los segmentos genómicos.

Nombre del aislamiento	Abreviatura	Año de aislamiento	Orden	Nombre común del huésped	Publicados	Secuenciados completamente
A/kelp gull/Argentina/CIP051-LDC4/2006 (H13N9)	LDC4/H13N9	2006	Charadriiformes	Gaviota	<i>Pereda et al.2008</i>	Si
A/rosy-billed pochard/Argentina/CIP051-269/2007 (H6N8)	269/H6N8	2007	Anseriformes	Pato picazo	<i>Rimondi et al. 2011</i>	Si
A/rosy-billed pochard/Argentina/CIP051-272/2007 (H6N2)	272/H6N2	2007	Anseriformes	Pato picazo	-	Si
A/rosy-billed pochard/Argentina/CIP051-557/2007 (H6N2)	557/H6N2	2007	Anseriformes	Pato picazo	<i>Rimondi et al. 2011</i>	Si
A/rosy-billed pochard/Argentina/CIP051-559/2007 (H9N2)	559/H9N2	2007	Anseriformes	Pato picazo	<i>Rimondi et al. 2011</i>	Si
A/rosy-billed pochard/Argentina/CIP051-575/2007 (H6N8)	575/H6N8	2007	Anseriformes	Pato picazo	<i>Rimondi et al. 2011</i>	Si
A/rosy-billed pochard/Argentina/CIP051-925/2008 (H6N2)	925/H6N2	2008	Anseriformes	Pato picazo	<i>Xu et al. 2012</i>	Si
A/cinnamon teal/Argentina/CIP051-1588/2009 (H7N9)	1588/H7N9	2009	Anseriformes	Pato colorado	-	Si
A/silver teal/Argentina/CIP051-1737/2009 (H5N3)	1737/H5N3	2009	Anseriformes	Pato capuchino	-	Si
A/rosy-billed pochard/Argentina/CIP051-1977/2010 (H6N2)	1977/H6N2	2010	Anseriformes	Pato picazo	<i>Rimondi et al. 2011</i>	Si
A/silver teal/Argentina/CIP051-25/2011 (H4N8)	25/H4N8	2011	Anseriformes	Pato capuchino	-	Si
A/silver teal/Argentina/CIP051-32/2011 (H4N2)	32/H4N2	2011	Anseriformes	Pato capuchino	-	Si
A/silver teal/Argentina/CIP051-48/2011 (H4N6)	48/H4N6	2011	Anseriformes	Pato capuchino	-	Si
A/knob-billed duck/Argentina/CIP051-49/2011 (H6N2)	49/H6N2	2011	Anseriformes	Ganso	-	Si
A/silver teal/Argentina/CIP051-52/2011 (H6N2)	52/H6N2	2011	Anseriformes	Pato capuchino	-	Si
A/yellow-billed teal/CIP051-91/2011 (H4N6)	91/H4N6	2011	Anseriformes	Pato barcino	-	Si
A/silver teal/Argentina/CIP051-171/2011 (H10N7)	171/H10N7	2011	Anseriformes	Pato capuchino	-	Si
A/silver teal/Argentina/CIP051-175/2011 (H10N7)	175/H10N7	2011	Anseriformes	Pato capuchino	-	Si
A/silver teal/Argentina/CIP051-188/2011 (H7N7)	188/H7N7	2011	Anseriformes	Pato capuchino	-	Si
A/cinnamon teal/Argentina/CIP051-432/2011 (H1N1)	432/H1N1	2011	Anseriformes	Pato colorado	-	Si

Tabla 9. Virus de influenza aviar de baja patogenicidad aislados durante el período 2006-2012.



### 5.1.3.1 Genes de proteínas internas:

El análisis filogenético de los seis genes que codifican las proteínas internas (PB2, PB1, PA, NP, M y NS) de los LPAIV aislados reveló una estrecha relación entre los AIV de América del Sur, formando siempre un *cluster* único (Figura 14 a 19 respectivamente).

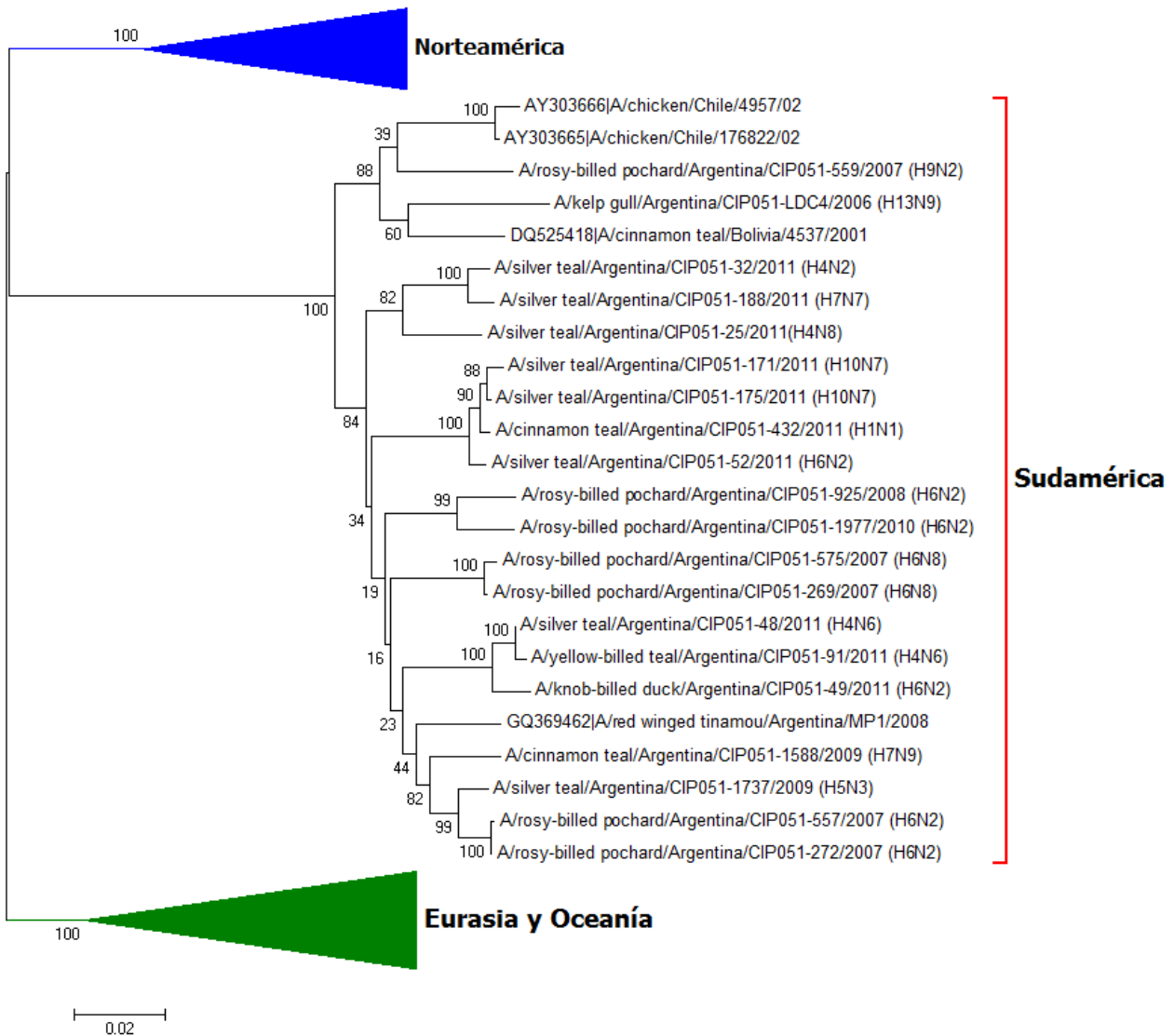


Figura 14. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la proteína interna PB2. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía, en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica y en color rojo se agrupan las secuencias de virus aislados en Sudamérica.

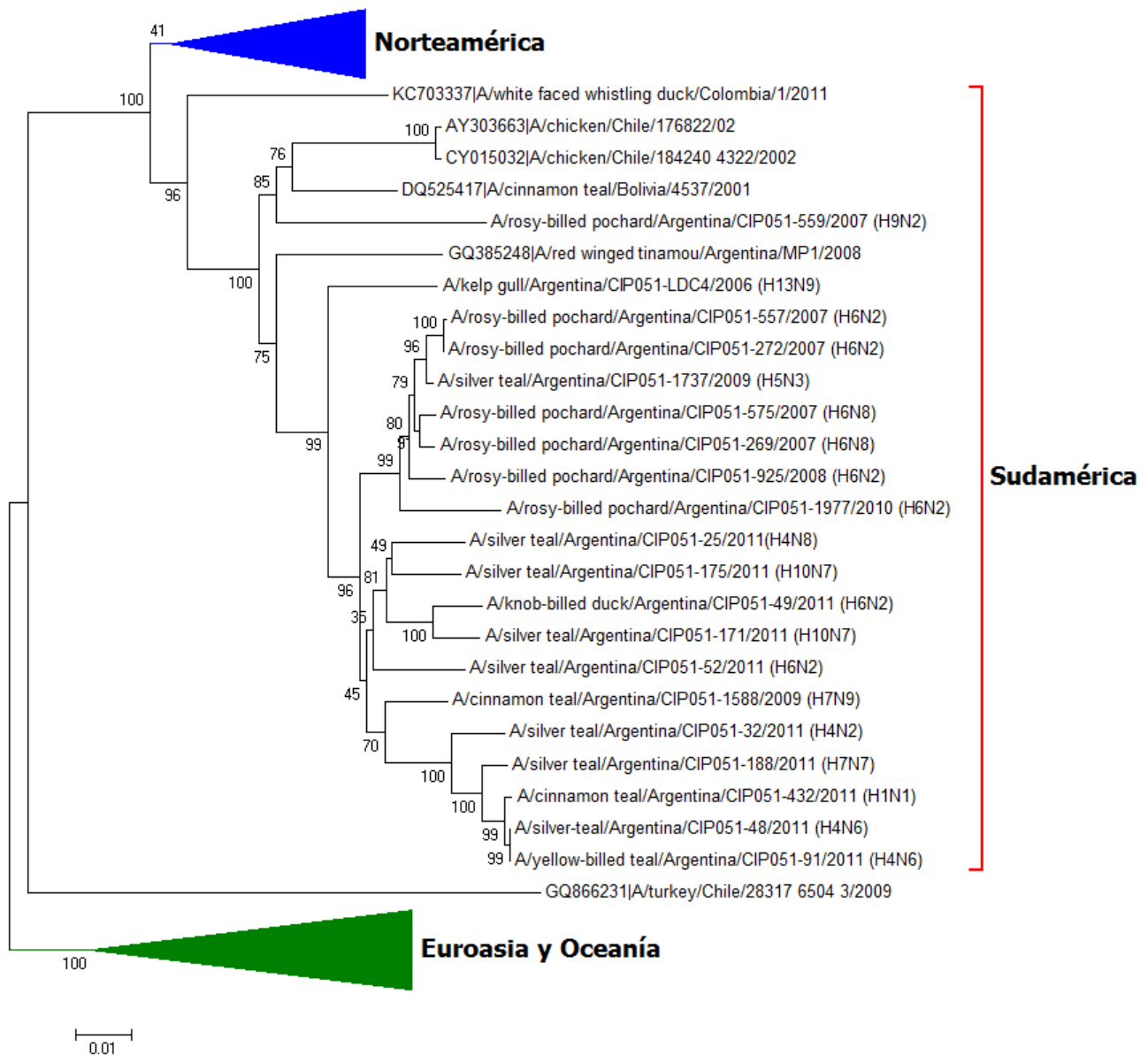


Figura 15. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la proteína interna PB1. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía, en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica y en color rojo se agrupan las secuencias de virus aislados en Sudamérica.

Al realizar el análisis filogenético de las secuencias del gen PA de virus de IA de distintas regiones, también se incluyeron secuencias del gen PA de Virus de Influenza Equina (EIV). Esto permitió observar, por un lado, que el gen PA de los virus aislados de aves silvestres en la Argentina agrupan junto con otros genes de PA de virus aislados en Sudamérica; y por otro, que estos genes de PA Sudamericanos tienen una relación con los genes de PA de los EIV (Figura 16).

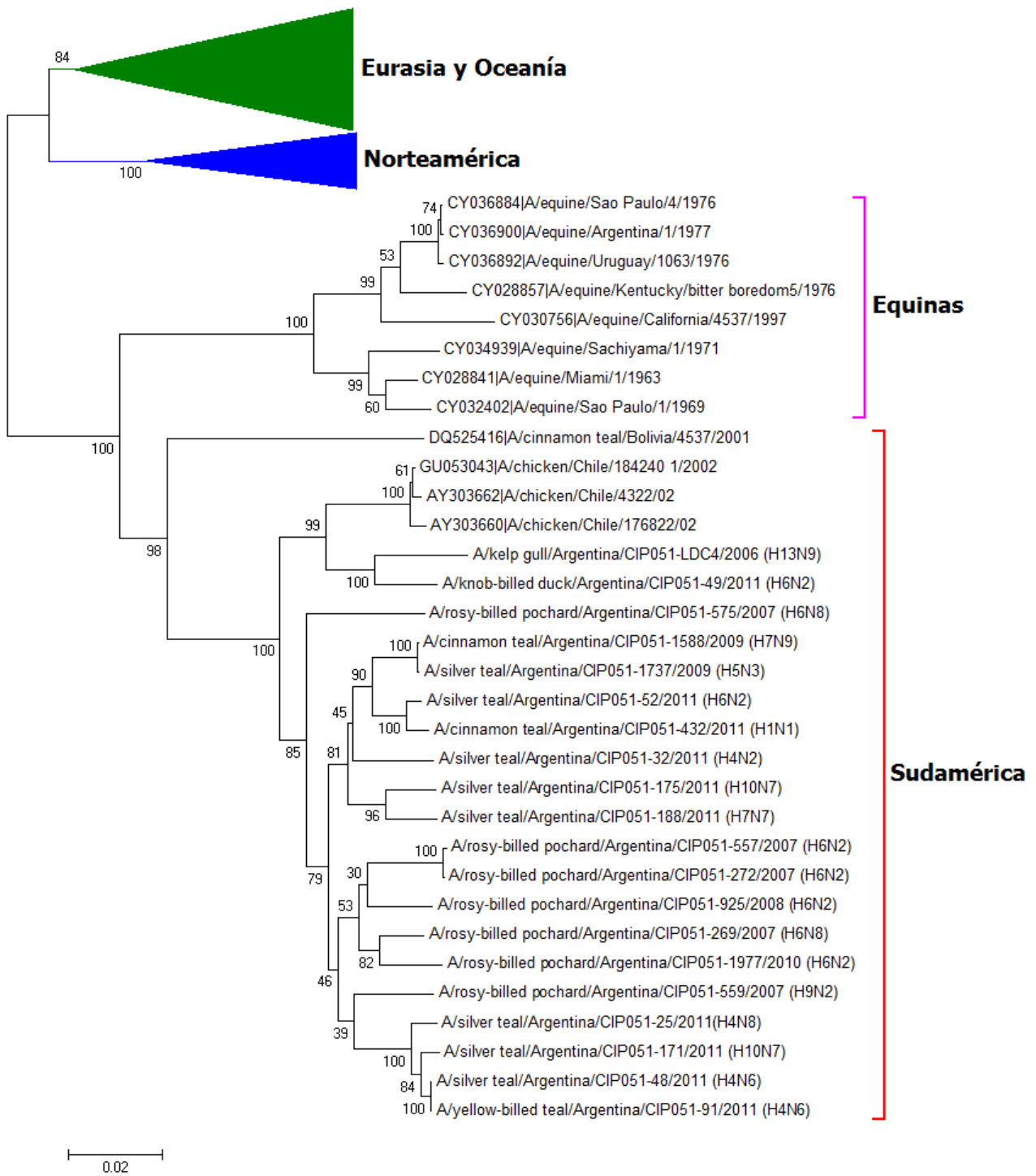


Figura 16. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la proteína interna PA. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía, en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica y en color rojo se agrupan las secuencias de virus aislados en Sudamérica. Aquellas secuencias de PA agrupadas en color rosa perteneces a Virus de Influenza Equina.

El resultado obtenido del análisis filogenético del gen NP de los virus aislados en nuestro país fue similar al obtenido para el gen PA, donde las secuencias de los genes NP de los LPAIV aislados en la Argentina agruparon junto con secuencias de otros virus aislados de aves en Sudamérica y se encuentran relacionadas con los genes NP de EIV (Figura 17).

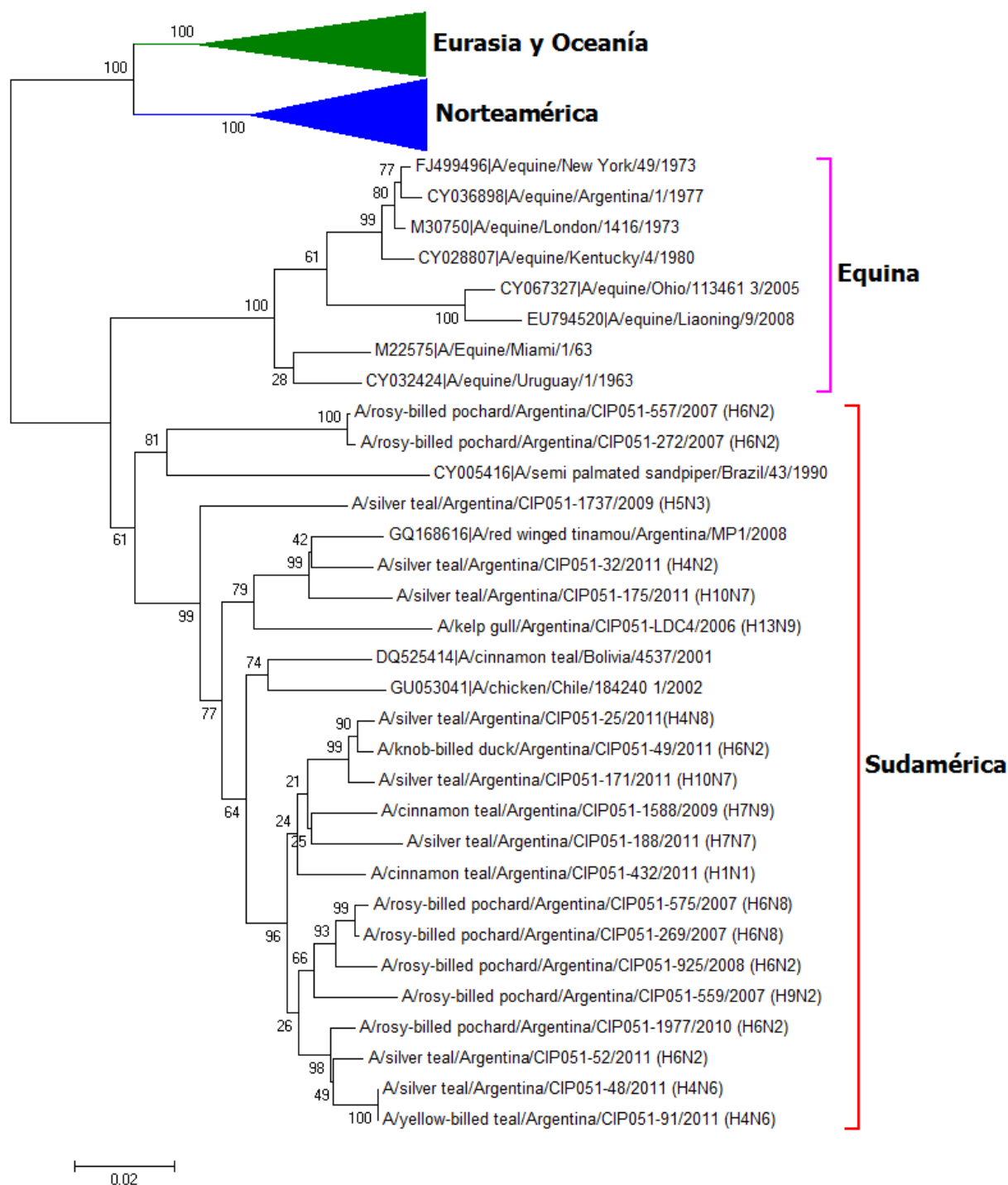


Figura 17. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la proteína interna NP. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía, en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica y en color rojo se agrupan las secuencias de virus aislados en Sudamérica. Aquellas secuencias de NP agrupadas en color rosa perteneces a Virus de Influenza Equina.

El análisis filogenético del gen M de los virus aislados en nuestro país agrupó todas las secuencias con otros genes M de virus aislados en América del Sur (Figura 18).

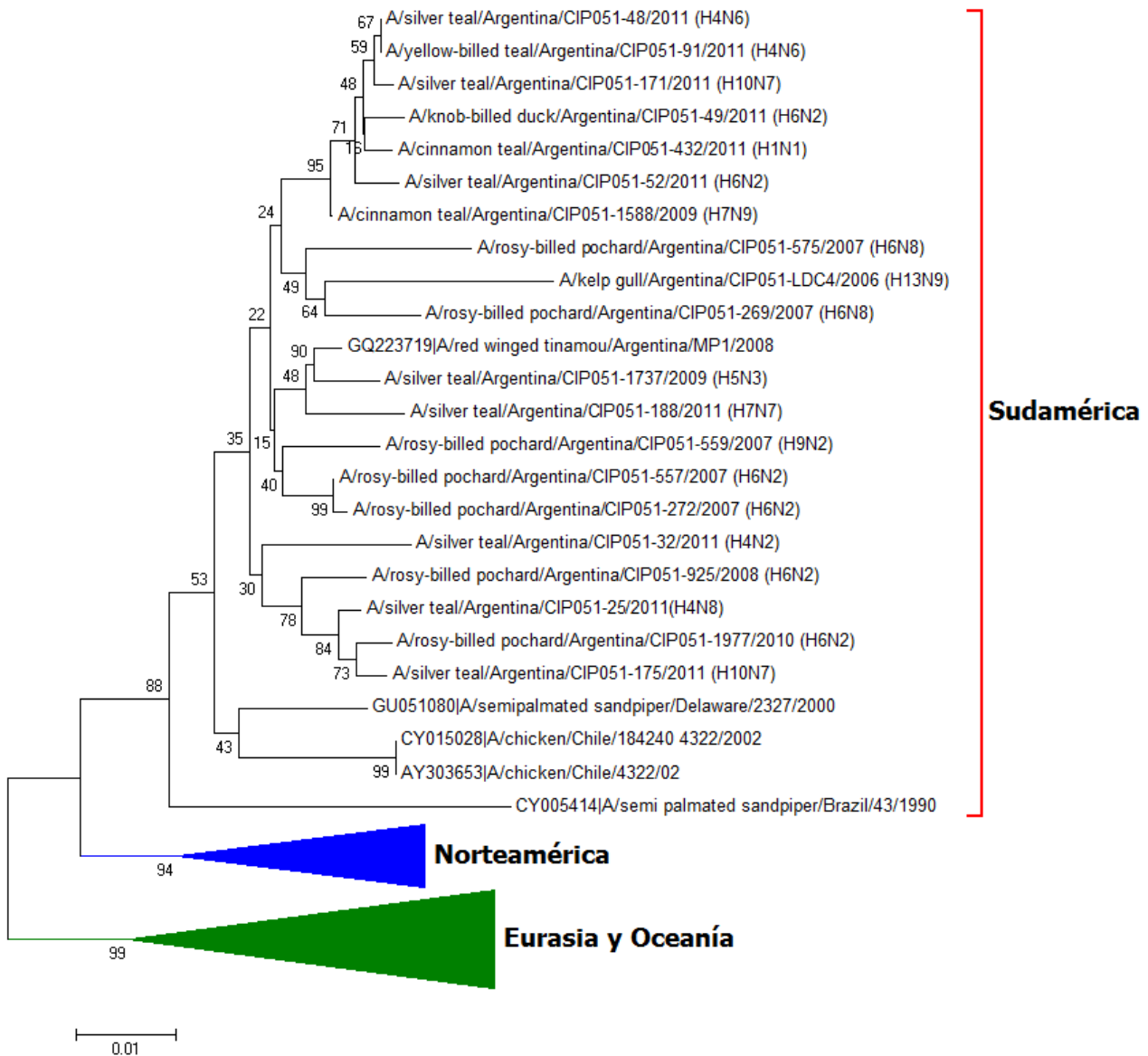


Figura 18. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la proteína interna M. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía, en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica y en color rojo se agrupan las secuencias de virus aislados en Sudamérica.

El análisis filogenético de los genes NS de los LPAIV aislados permitió identificar la circulación de los alelos A y B de este gen en la Argentina (Figura 19). Además, tanto los alelos A como B del gen NS de los virus aislados en nuestro país agruparon junto con otras secuencias de genes NS de virus aislados en Sudamérica.

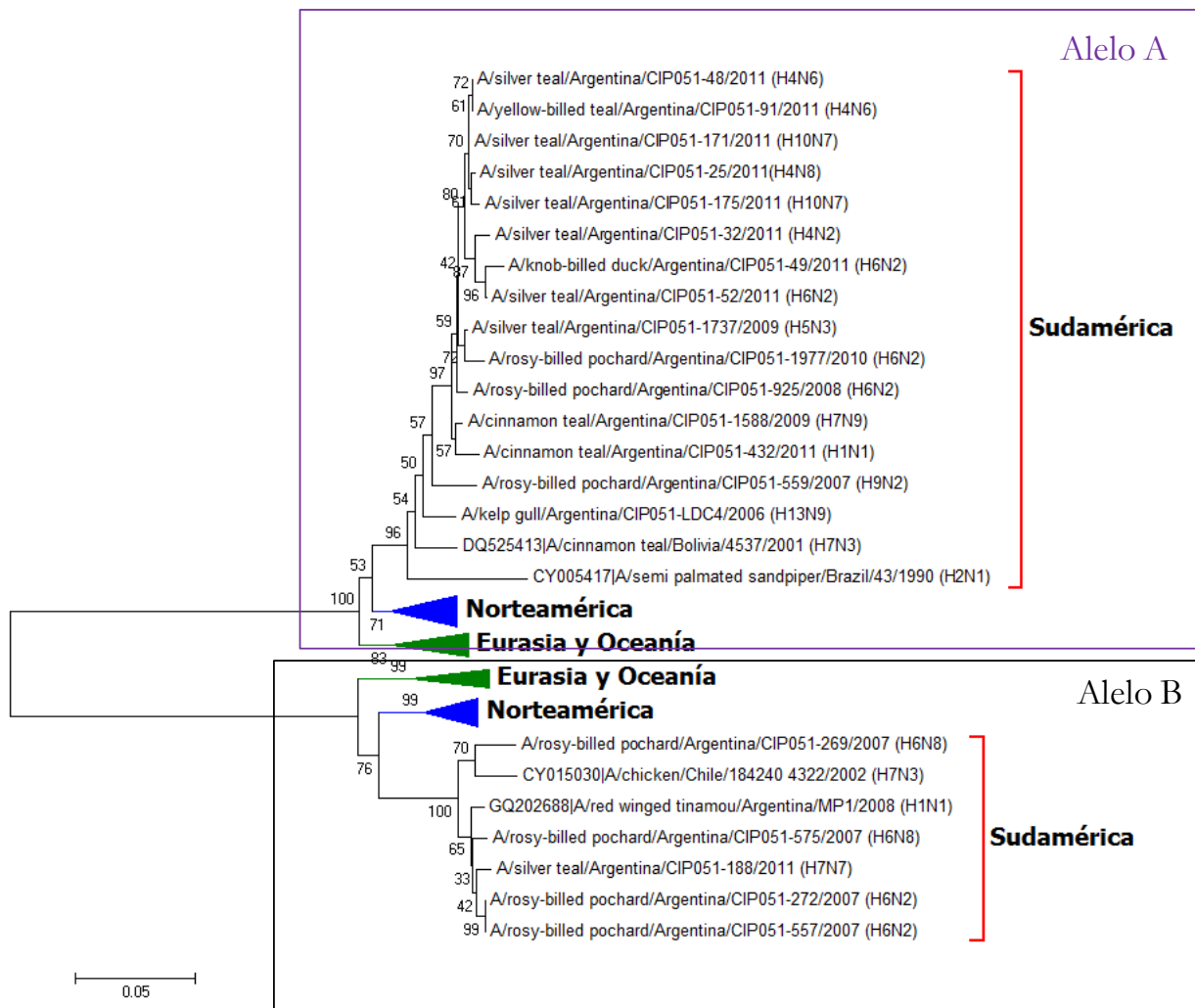


Figura 19. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la proteína interna NS. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía, en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica y en color rojo se agrupan las secuencias de virus aislados en Sudamérica. El cuadrante de color violeta agrupa los alelos A del gen NS y el cuadrante de color negro los alelos B del gen NS.

### 5.1.3.2 Genes de proteínas de superficie:

El análisis filogenético de los genes que codifican las proteínas de superficie, HA y NA, formaron en su mayoría un *cluster* único que se diferencia de los virus de América del Norte y Eurasia (Figura 20 a 34).

Al analizar filogenéticamente el gen H13 del virus LDC4/H13N9 se observó que el mismo agrupa sólo en una rama y que la relación filogenética más cercana es con el virus A/gull/Maryland/704/1977 aislado de gaviotas en Maryland, EE.UU., en 1977 (Figura 20).

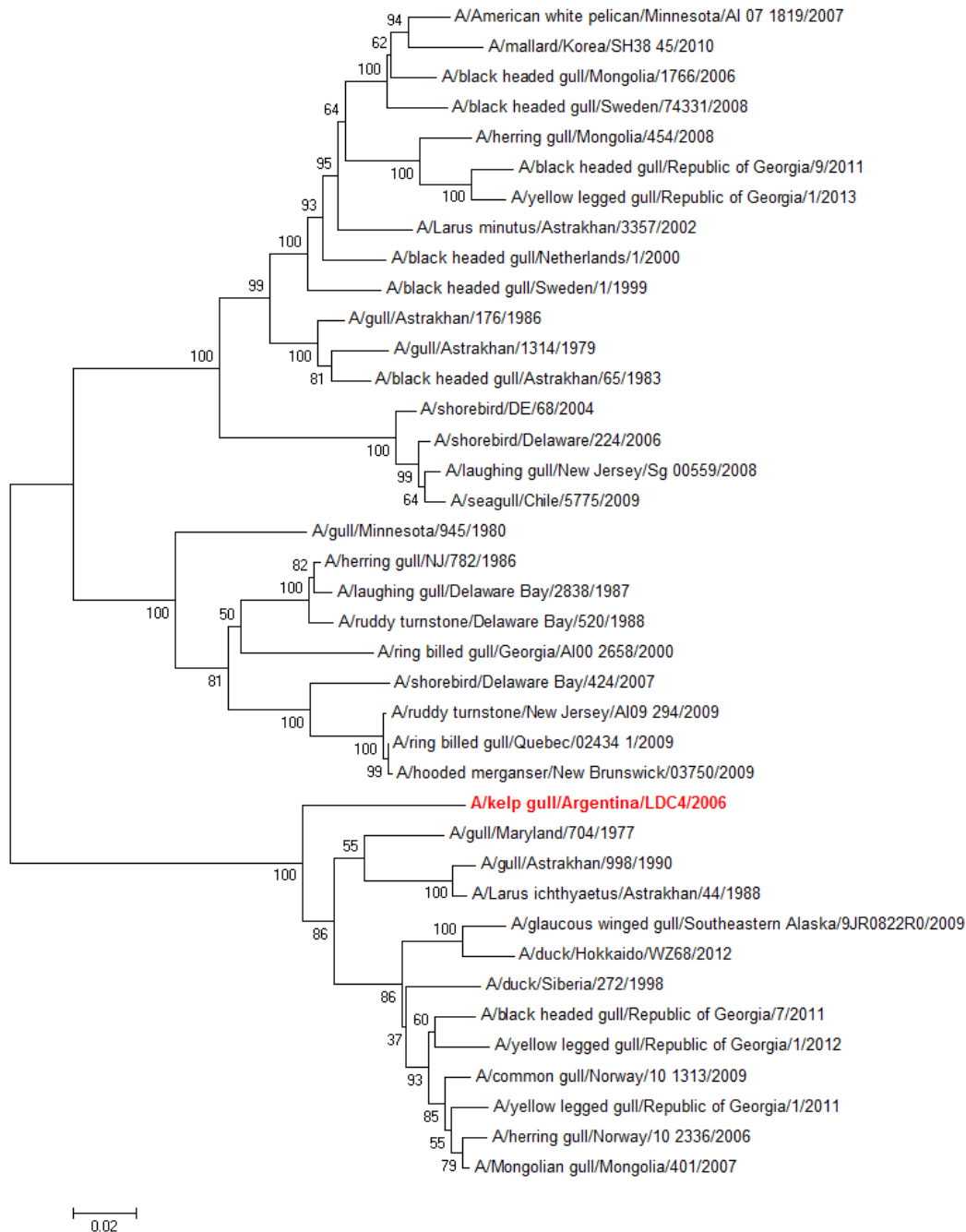


Figura 20. Árbol filogenético realizado a partir de la secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la glicoproteína H13. En color rojo se destaca el gen H13 del virus LDC4/H13N9 aislado de un ave silvestre en Argentina.

Al comparar las secuencias de los genes H10 de los virus 171/H10N7 y 175/H10N7 con las secuencias de genes H10 presentes en las bases de datos, se observó que la homología más cercana fue con el virus A/duck/Manitoba/1953 (H10N7) de EE.UU, con una identidad nucleotídica de sólo 84%. El análisis filogenético de estas secuencias de genes H10 de virus aislados en la Argentina permitió observar que ambas agrupan juntas en una rama separada filogenéticamente de las secuencias de genes H10 de AIV aislados en Norteamérica, Eurasia y Oceanía (Figura 21).

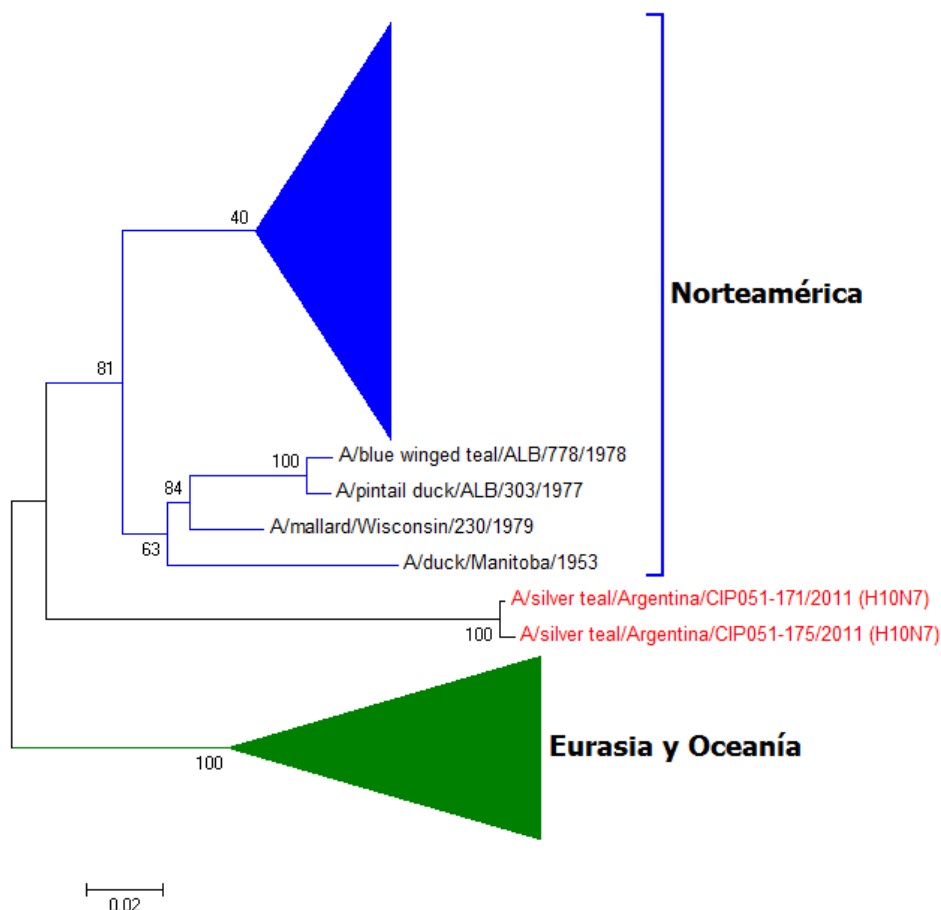


Figura 21. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la glicoproteína H10. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía, en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica y en color rojo se destaca el gen H10 de los virus 171/H10N7 y 175/H10N7 aislados de aves silvestres en Argentina.

El gen H9 del virus 559/H9N2 presentó una identidad nucleotídica del 91% con A/Quail/Arkansas/29209-1/93 (H9N2). Al incluir dicha secuencia en un árbol filogenético donde se discriminan los cuatro clados de genes H9 (H9.1, H9.2, H9.3, H9.4) propuestos recientemente por Liu y col. [94], se observa que el gen de la HA del virus 559/H9N2 pertenece al clado H9.2 junto con 3 virus H9N2 de América del Norte (Figura 22).



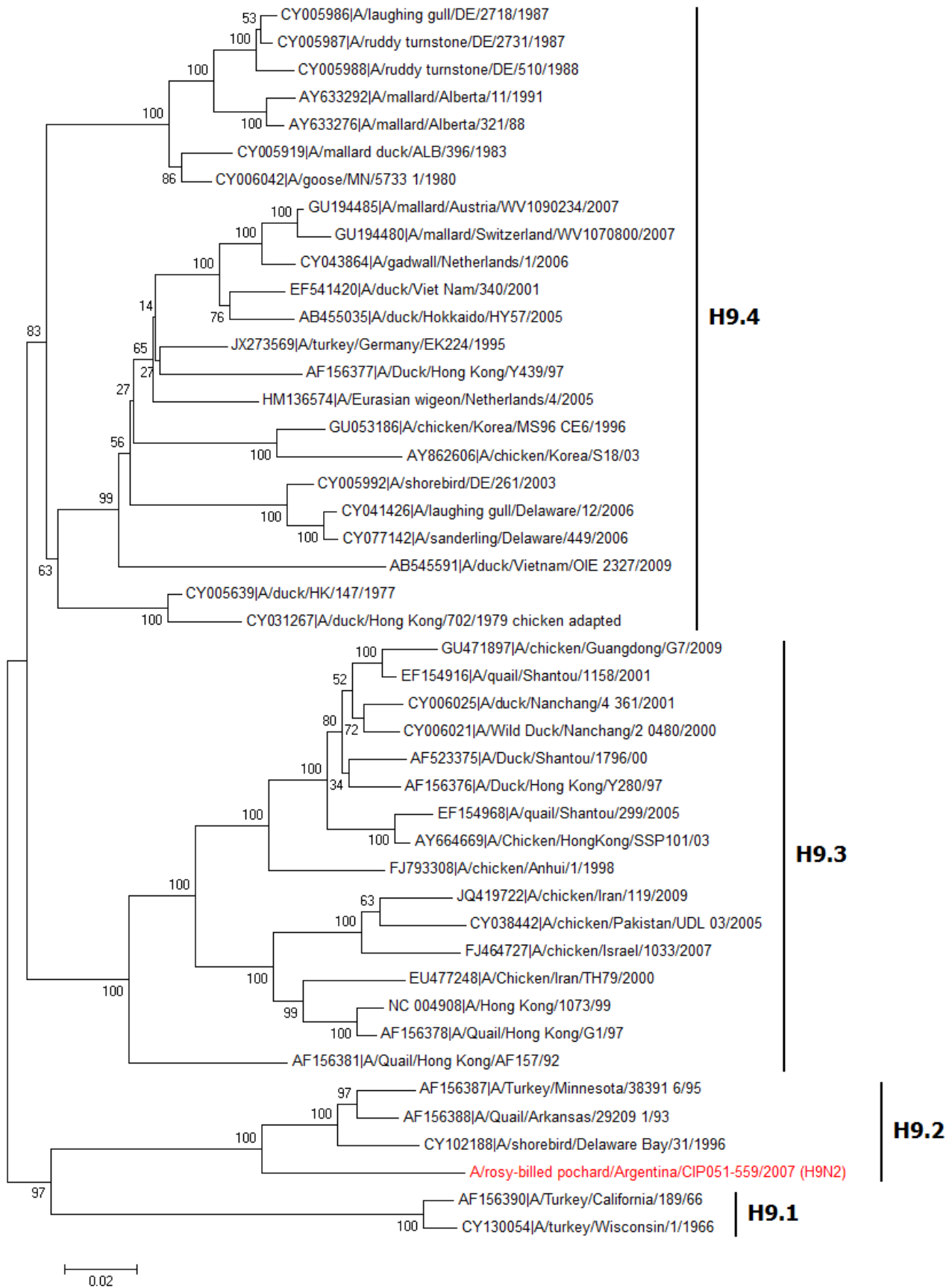


Figura 22. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la glicoproteína H9. En color rojo se destaca el gen H9 del virus 559/H9N2 aislado de ave silvestre en Argentina.

Por otra parte, para los genes H7 de los virus 188/H7N7 y 1588/H7N9 aislados en la Argentina la homología más cercana identificada se observó con el LPAIV Sudamericanos A/cinnamon teal/Bolivia/4537/2001 (H7N3), con una identidad nucleotídica del 94%. El árbol filogenético realizado con estas secuencias nucleotídicas demuestra que todas las secuencias de genes H7 obtenidas de aves en Sudamérica agrupan juntas (Figura 23).

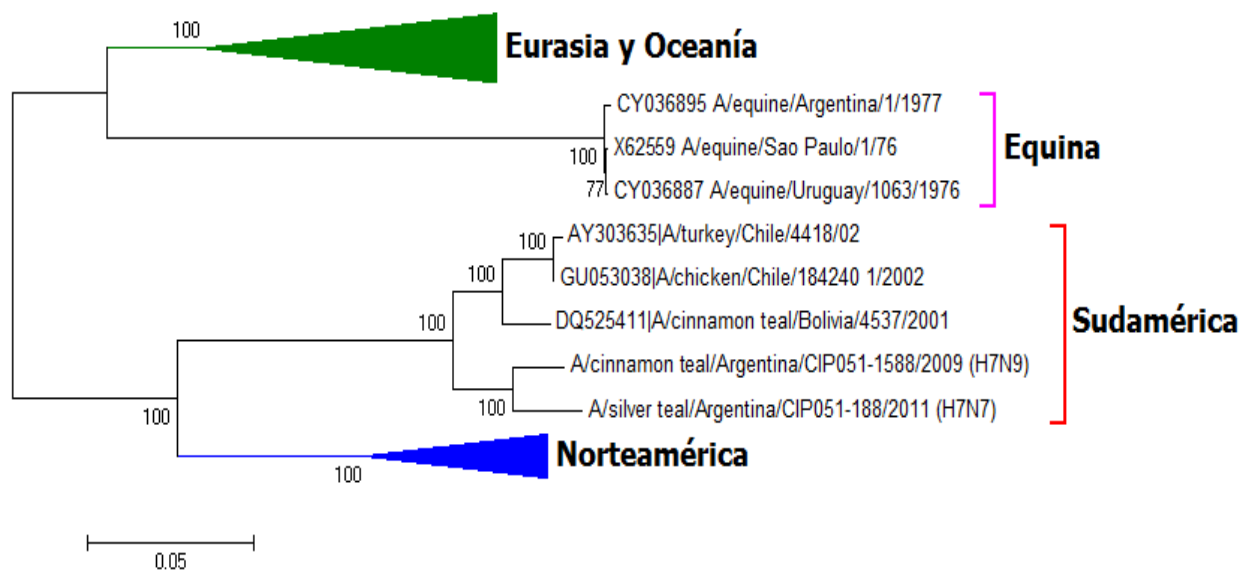
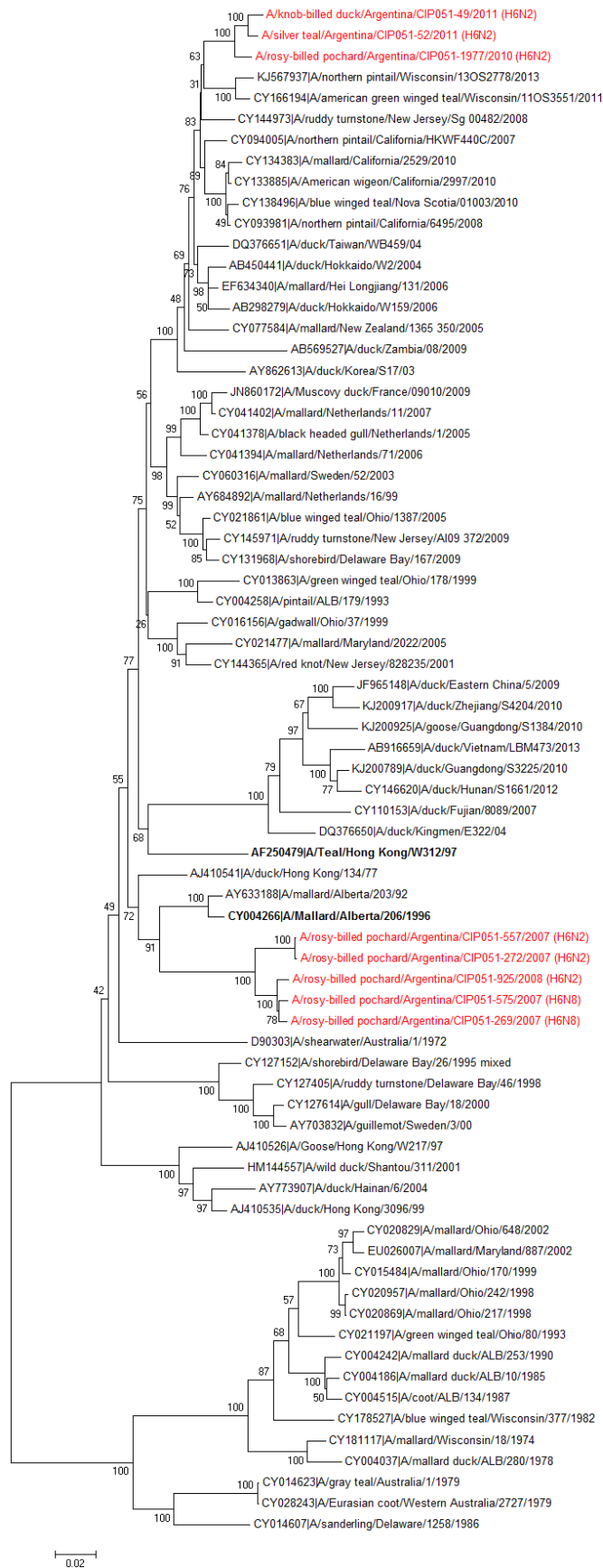


Figura 23. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la glicoproteína H7. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía, en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica y en color rojo se agrupan las secuencias de virus aislados en Sudamérica. Aquellas secuencias de H7 agrupadas en color rosa pertenecen a Virus de Influenza Equina.

Los estudios filogenéticos de los genes H6 de los LPAIV aislados en la Argentina (272/H6N2, 557/H6N2, 925/H6N2, 1977/H6N2, 49/H6N2, 52/H6N2, 269/H6N8 y 575/H6N8) y en otras regiones del mundo dan como resultado un árbol con una topología diferente (Figura 24).

En primer lugar se puede observar la existencia de dos grandes linajes distintos como fue propuesto previamente por otros autores [95]. El linaje A contiene secuencias casi exclusivamente de virus H6 de América del Norte y Oceanía, mientras que el linaje B contiene las secuencias de los genes H6 de los 8 aislamientos argentinos y de virus H6 de Eurasia, América del Norte y Oceanía. Cinco de los ocho aislamientos de Argentina agruparon juntos formando un único clado dentro del linaje B, separado de los genes de HA de AIV aislados de otras regiones. Por el contrario, los otros tres aislamientos 1977/H6N2, 49/H6N2 y 52/H6N2 agruparon junto con virus de América del Norte.



**Linaje B**  
(Norteamérica,  
Eurasia, Oceanía y  
Sudamérica)

**Linaje A**  
(Norteamérica y  
Oceanía)

Figura 24. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la glicoproteína H6. En color violeta se agrupan las secuencias H6 de Linaje A (Norteamérica y Oceanía) y en color verde de las secuencias H6 de Linaje B (Norteamérica, Eurasia, Oceanía y Sudamérica). En color rojo se destacan los genes H6 de los virus 272/H6N2, 557/H6N2, 925/H6N2, 1977/H6N2, 49/H6N2, 52/H6N2, 269/H6N8 y 575/H6N8 aislados de aves silvestres en Argentina.

Al analizar filogenéticamente el gen H5 del virus 1737/H5N3 se observó que el mismo agrupa solo en una rama (Figura 25). La relación filogenética más cercana se observa con el virus A/mallard/Ohio/556/1987(H5N9), aislado de patos en 1987 en Ohio, EE.UU., con una identidad nucleotídica del 91%.

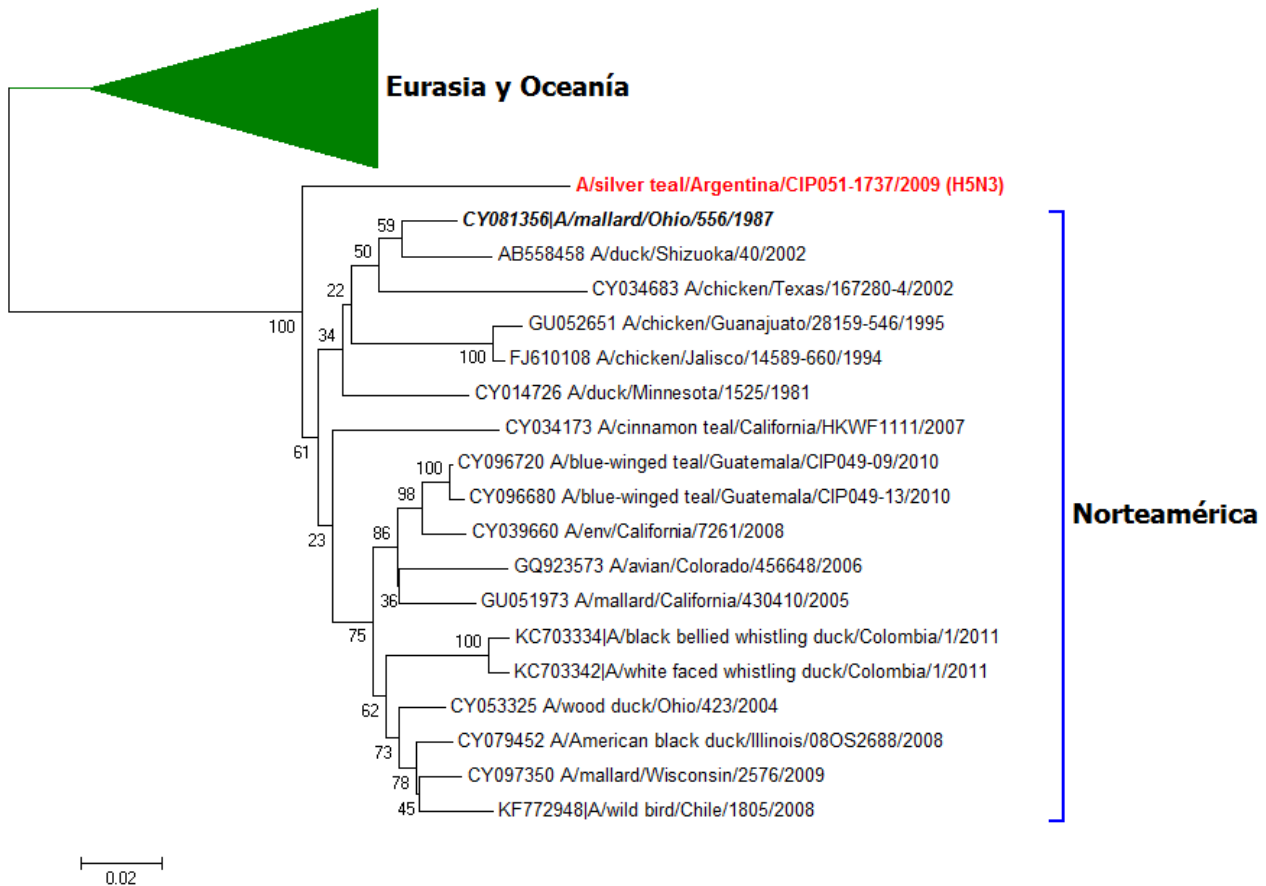


Figura 25. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la glicoproteína H5. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía y en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica. En color rojo se destaca el gen H5 del virus 1737/H5N3 aislado de una ave silvestre en Argentina. En negrita y cursiva se destaca la secuencia de mayor homología a la H5 Argentina.

Por otra parte, el análisis filogenético de las secuencias de genes H4 agrupó los LPAIV de subtipo H4 aislados en la Argentina (32/H4N2, 48/H4N6, 91/H4N6 y 25/H4N8) todos juntos, dentro del grupo de AIV Norteamericanos (Figura 26). La homología más cercana encontrada fue con el virus A/blue-winged Teal/Minnesota/AI09-2977/2009 (H4N8) con una identidad nucleotídica del 99%.

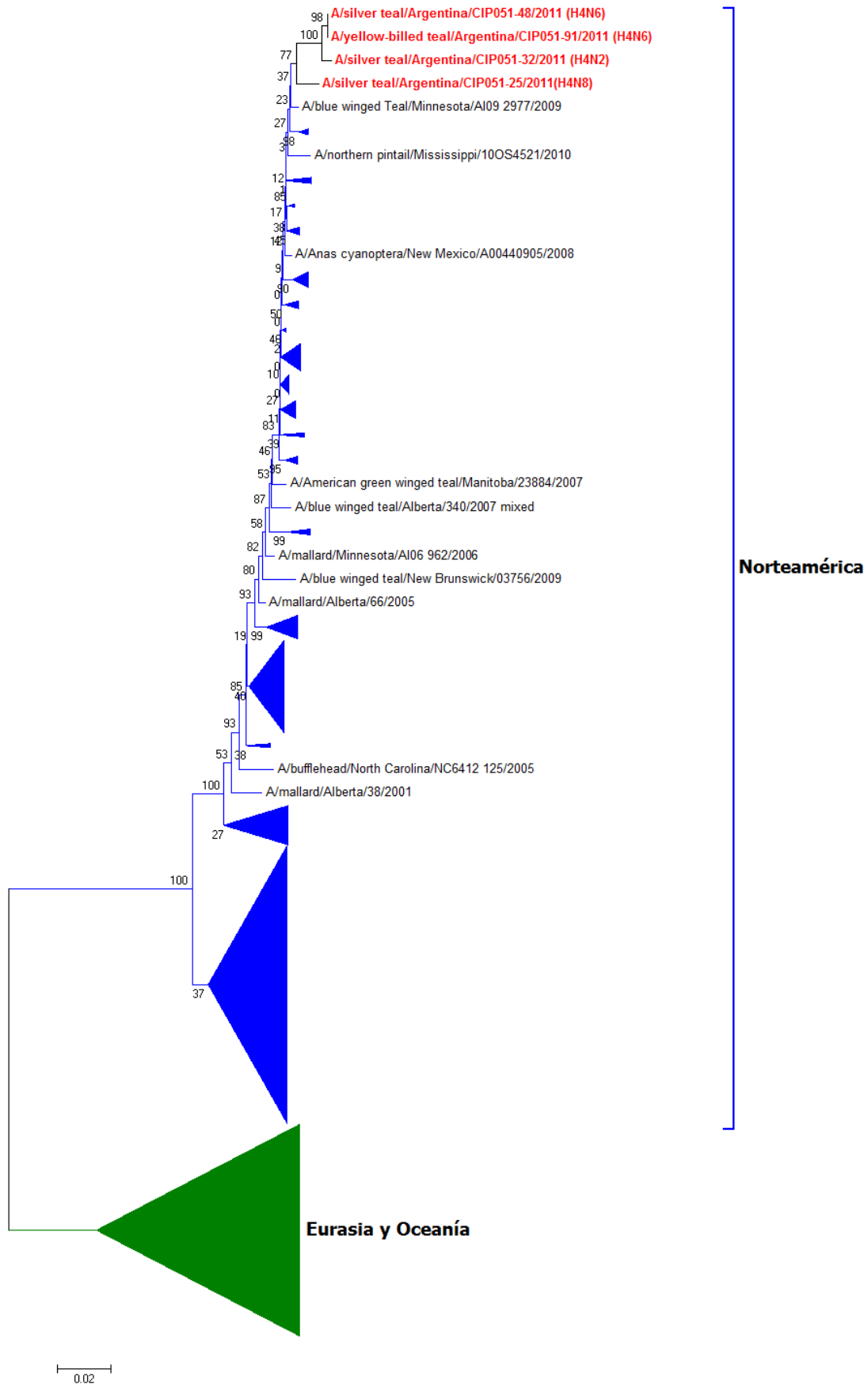


Figura 26. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la glicoproteína H4. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía y en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica. En color rojo se destaca el gen H4 de los virus 32/H4N2, 48/H4N6, 91/H4N6 y 25/H4N8 aislados de aves silvestres en Argentina.

Para el gen H1 del virus 432/H1N1 la homología más cercana identificada fue la H1 del LPAIV Sudamericano A/red-winged tinamou/Argentina/MP1/2008 (H1N1), con una identidad nucleotídica del 97%. El árbol filogenético realizado con secuencias nucleotídicas de genes H1 de diferentes regiones del mundo se observa en la Figura 27.

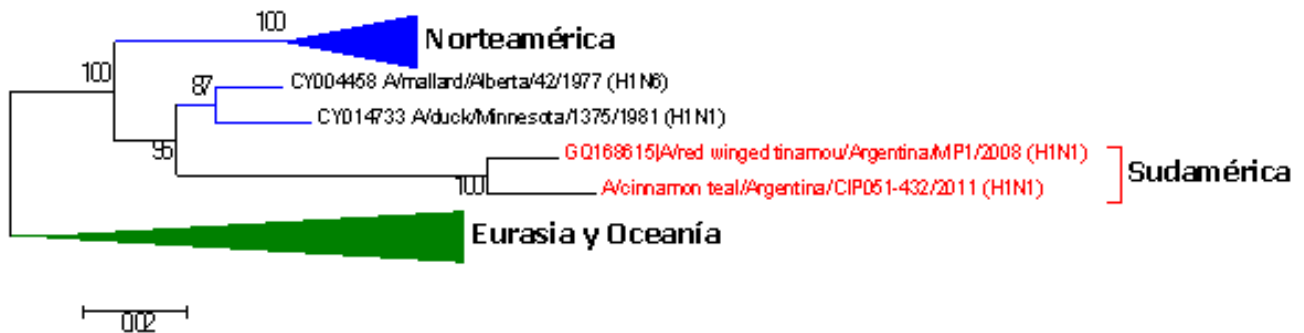


Figura 27. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la glicoproteína H1. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía y en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica. En color rojo se destaca el gen H1 de los virus 432/H1N1 y A/red-winged tinamou/Argentina/MP1/2008 (H1N1) aislado de aves silvestres en Argentina.

Al analizar las secuencias de genes NA de los aislamientos argentinos, los árboles filogenéticos resultantes mostraron una topología similar a los presentados por la mayoría de los árboles con secuencias de genes HA. En general, los genes de NA obtenidos (N9, N8, N7, N6, N3, N2 y N1) se separan del resto de los genes de NA de virus aislados en Norteamérica, Eurasia y Oceanía, dando origen a una rama con evolución independiente (Figuras 28 a 34 respectivamente).

El análisis filogenético con secuencias de genes N9 demostró que los dos genes de NA más relacionados filogenéticamente con los virus LDC4/H13N9 y 1588/H7N9 son de un virus aislado durante un brote de IA en gallinas en Italia y de un virus aislado de un pato silvestre capturado en Holanda (A/chicken/Italy/1998 (H5N9) y A/shoelver/Netherlands/19/1999 (H11N9) respectivamente) [96]. Además, el árbol filogenético agrupó a los dos genes N9 de virus aislados en la Argentina juntos, en un *cluster* diferente de otros virus de subtipo N9 y con un elevado valor de bootstrap, indicando un grupo filogenéticamente distinto de genes N9 (Figura 28).

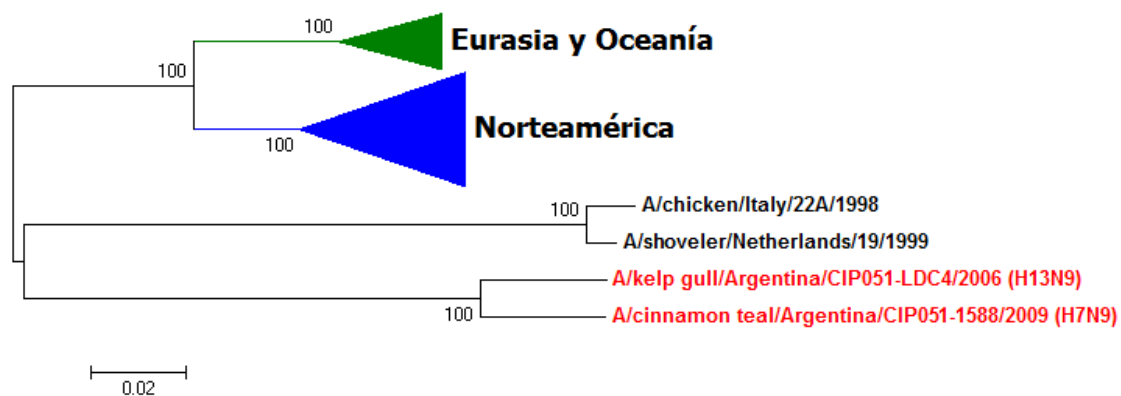


Figura 28. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la glicoproteína N9. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía y en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica. En color rojo se destacan los genes N9 de los virus LDC4/H13N9 y 1588/H7N9 aislados de aves silvestres en Argentina. En negrita se destacan las secuencias de mayor homología a las N9 obtenidas de aves silvestres en Argentina.

Al realizar el análisis filogenético de las secuencias de genes N8 de los aislamientos de Argentina (269/H6N8, 575/H6N8 y 25/H4N8) se observó que los mismos agruparon todos juntos con un buen valor de bootstrap y separados filogenéticamente de virus de subtipo N8 de otras regiones del mundo (Figura 29).

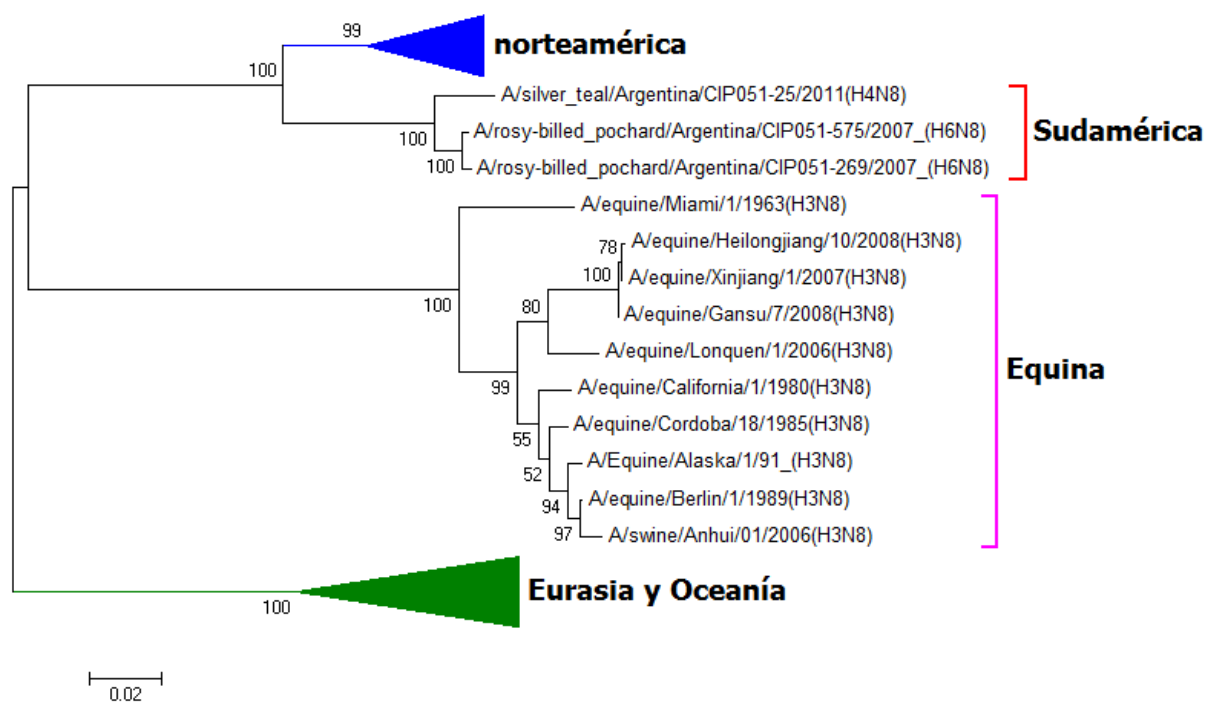


Figura 29. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la glicoproteína N8. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía, en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica y en color rojo se agrupan las secuencias de virus aislados en Sudamérica. Aquellas secuencias de N8 agrupadas en color rosa perteneces a Virus de Influenza Equina.

Resultados similares se obtuvieron a partir del análisis filogenético de las secuencias de genes N7 (Figura 30). Los virus 171/H10N7, 175/H10N7 y 188/H7N7 agruparon en forma conjunta en una rama separada filogenéticamente de virus de subtipo N7 de otras regiones del mundo. La relación filogenética más cercana es con el virus *A/ruddy turnstone/DE/2378/1988* (H7N7) aislado en Norteamérica en el año 1988, con una identidad nucleotídica de solo 83%.

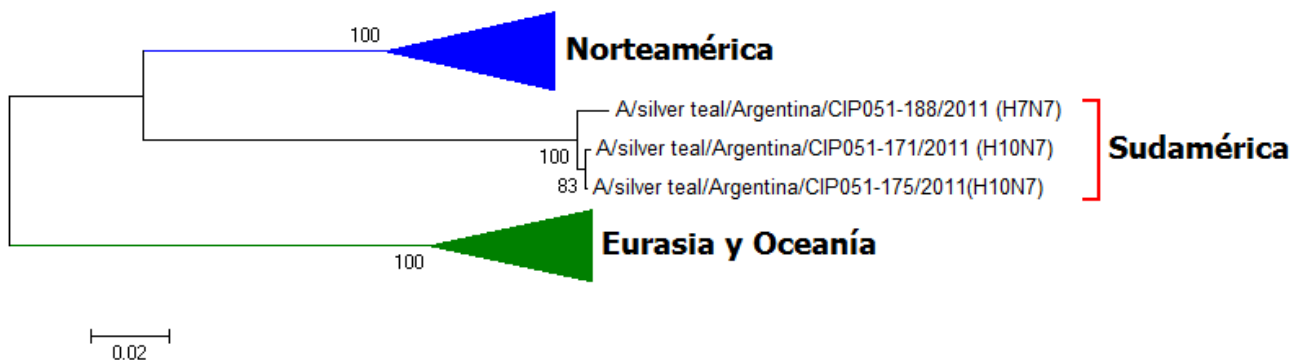


Figura 30. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la proteína interna N7. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía, en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica y en color rojo se agrupan las secuencias de virus aislados en Sudamérica.

Los análisis filogenéticos con secuencias de genes N6 y N3 de virus de IA de diferentes regiones también dieron resultados similares (Figuras 31 y 32).

En el caso de los genes N6 de los virus aislados en la Argentina 48/H4N6 y 91/H4N6, las dos secuencias agruparon juntas en una rama separada de las secuencias de genes N6 de virus de otras regiones del mundo (Figura 31). Además estos genes N6 presentaron una identidad nucleotídica de solo 81% con el virus *A/environment/Maryland/1101/2006* (H4N6) aislado en Norteamérica en el año 2006.

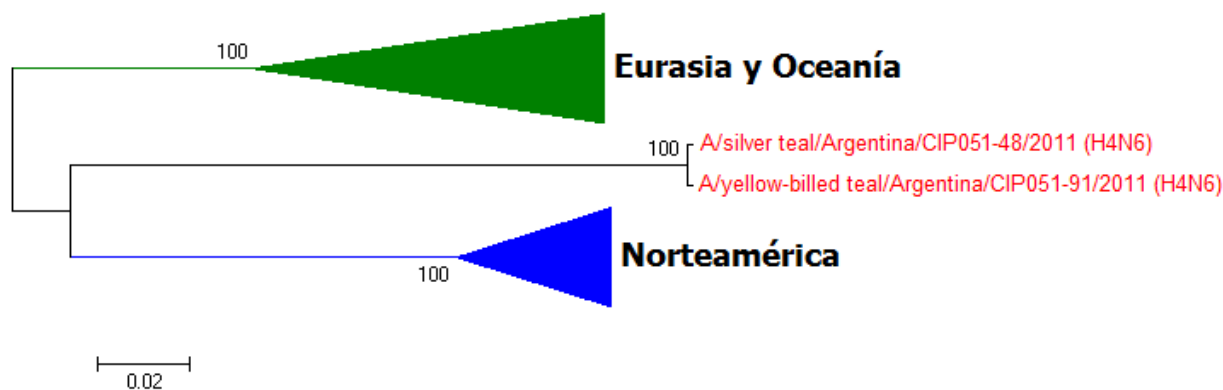


Figura 31. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la glicoproteína N6. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía y en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica. En color rojo se destacan los genes N6 de los virus 48/H4N6 y 91/H4N6 aislados de aves silvestres en Argentina.



La secuencia del gen N3 del virus 1737/H5N3 también agrupó sola en un rama separada de las secuencias de N3 de Norteamérica, Eurasia y Oceanía (Figura 32). Además, se puede observar que el gen N3 del virus 1737/H5N3 presenta la homología más cercana con el virus A/chicken/Chile/176822/2002 (H7N3) aislado de gallinas en Chile en el año 2002, con una identidad nucleotídica del 96%.



Figura 32. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la glicoproteína N3. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía y en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica. En color rojo se destaca el gen N3 del virus 1737/H5N3 aislado de un ave silvestre en Argentina.

Al analizar filogenéticamente las secuencias de genes N2 de los virus 557/H6N2, 925/H6N2, 272/H6N2, 1977/H6N2, 559/H9N2, 32/H4N2, 49/H6N2 y 52/H6N2 se observó nuevamente que todos ellos agruparon juntos, en un *cluster* diferente de los otros virus de subtipo N2 y soportado con un elevado valor de bootstrap, indicando un grupo filogenéticamente distinto de genes N2 en los AIV aislados en nuestro país (Figura 33).

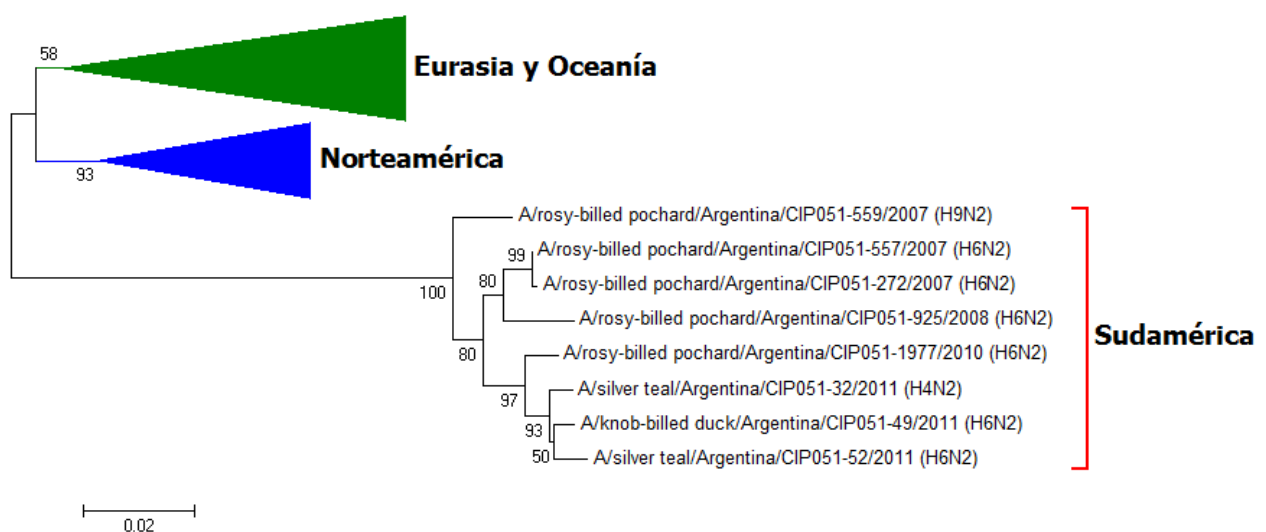


Figura 33. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la proteína interna N2. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía, en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica y en color rojo se agrupan las secuencias de virus aislados en Sudamérica.

En el análisis filogenético de las secuencias de genes N1 se observó que el virus 432/H1N1 se encuentra en una rama separada y con la homología más cercana con el virus A/red-winged tinamou/Argentina/MP1/2008 (H1N1) aislado en Argentina en el año 2008, con una identidad nucleotídica del 97% (Figura 34).

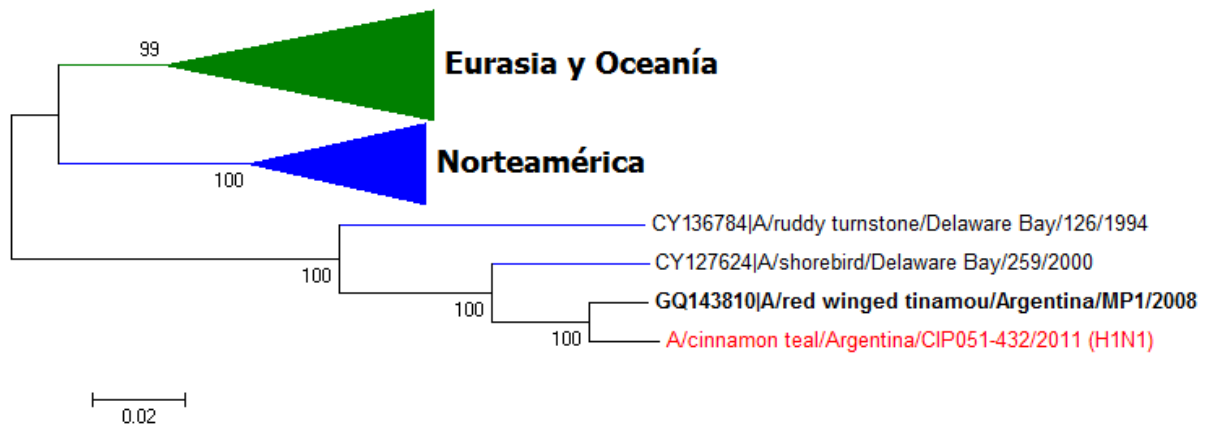


Figura 34. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas del ORF del segmento que codifica para la glicoproteína N1. En color verde se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Eurasia y Oceanía y en color azul se agrupan las secuencias de virus aislados de aves en Norteamérica. En color rojo se destaca el gen N1 del virus 432/H1N1 aislado de un ave silvestre en Argentina.

## 5.2 Inmunosupresión subclínica de pollos SPF con variantes autóctonas del Virus de la Anemia Infecciosa Aviar

### 5.2.1 Determinación del tiempo pos-infección con mayor inmunosupresión:

Con el objeto de determinar en una infección subclínica el tiempo post infección en el cual las gallinas se encuentren inmunosuprimidas, se realizó una infección experimental con CAV en pollos SPF de 14 días de edad (véase 4.2.5.1).

Durante todo el experimento no se detectaron signos clínicos compatibles con la enfermedad pero sí se detectaron anticuerpos anti-CAV (véase 4.2.9) a partir de los 14 dpi (Tabla 10), confirmando de esta forma la infección experimental subclínica en pollos SPF de 14 días de edad.

N° de animales positivos a CAV por ELISA IDEXX

Día post infección	N° de animales positivos a CAV por ELISA IDEXX	
	Controles Negativos	Inoculados con CAV
0 dpi	0/3	0/3
7 dpi	0/3	0/3
14 dpi	0/3	3/3
21 dpi	0/3	3/3
28 dpi	0/4	4/4

Tabla 10. Detección de anticuerpos anti-CAV por ELISA comercial a diferentes tiempos post infección.

Al realizar las necropsias de los animales a los distintos tiempos post infección estudiados, se observó que a los 14 dpi los animales infectados mostraban una reducción importante en el tamaño de los timos con respecto a los timos de los animales controles negativos.

Al calcular la relación peso timo/peso corporal para cada tiempo, se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de esta relación en los animales infectados con CAV sólo a los 14 dpi (Figura 35). Dicha relación fue 2,5 veces menor en los animales infectados con CAV respecto a la observada en los animales control.

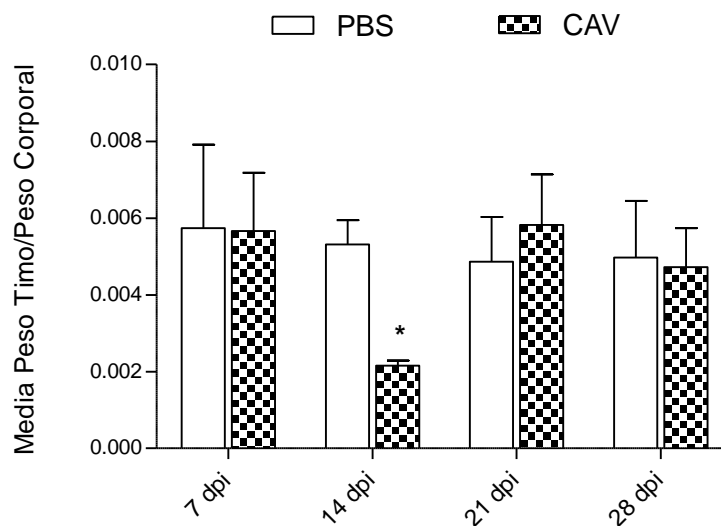


Figura 35. Alteraciones macroscópicas a distintos dpi con la cepa CAV-10 argentina. Alteración de la relación peso timo/peso corporal. Los resultados se expresan como la media (DS) de cada grupo, n = 3. \*  $p < 0,05$  vs. control negativo.

Se realizó un estudio histopatológico de los timos de los animales a los que se les realizó la eutanasia a los 14 dpi, con el fin de determinar la presencia de lesiones compatibles con la infección con CAV. En la Figura 36A se observa la estructura de un timo de un pollo control negativo, sin alteraciones en la estructura medular y cortical de los folículos. En cambio, los timos de los animales infectados con la cepa de CAV argentina evidenciaron un compromiso histopatológico con reducción de la corteza e infiltración de tejido adiposo en los mismos (Figura 36B).

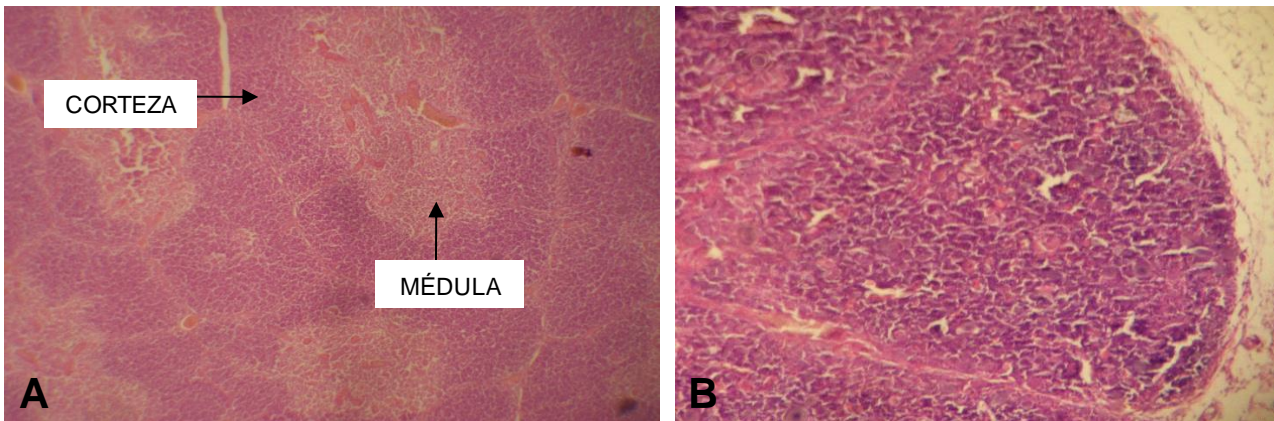


Figura 36. (A) Timo con folículos normales donde se distingue la médula y la corteza en un pollo control negativo, 10X. (B) Folículo sin corteza y reducción del límite entre la corteza y médula en el timo de pollos infectados con CAV-10, 14 dpi, 10X.

Los resultados obtenidos en este experimento permitieron determinar que fue posible realizar una infección experimental subclínica con CAV en pollos SPF de 14 días de edad y que, dentro de los tiempos post infección analizados, sólo a los 14 dpi se observó daño compatible con la infección con CAV en timo.

### **5.2.2 Comparación del grado de inmunosupresión generado con diferentes aislamientos de CAV autóctonos en aves de corral SPF experimentalmente infectadas:**

Con el objeto de seleccionar un aislamiento con el que se realizarían todos los ensayos in vivo posteriores, se decidió hacer una infección experimental con cuatro aislamientos de CAV diferentes para poder determinar cuál de ellos generaba mayor inmunosupresión bajo las mismas condiciones experimentales. Para ello, se infectaron cuatro grupos de 3 aves según lo descrito previamente (véase 4.2.5.2).

Todos los animales infectados con la cepa CAV-08, CAV-10, CAV-18 o CAV-135 seroconvirtieron a los 14 dpi, confirmando la infección por parte de los cuatro virus. Sin embargo, los animales del grupo control negativo permanecieron seronegativos durante todo el experimento.

A los 14 dpi se realizó un estudio histopatológico de los timos, bursas y bazos de los pollos de cada grupo, y se determinó el daño observado utilizando un score preestablecido (véase 4.2.7).

Los animales infectados con CAV-10, CAV-18 y CAV-135 presentaron en timo lesiones características de una infección con el virus de anemia (Figura 26); sin embargo hubo diferencias en cuanto al grado del daño causado (Tabla 11). Los timos de las aves del grupo CAV-10 presentaron mayor compromiso histológico, observándose ausencia de corteza e infiltración de tejido adiposo. Las aves infectadas con CAV-18 mostraron una depleción linfoidea intermedia, mientras que las infectadas con CAV-135 presentaron una depleción leve. Por su parte, los timos de los pollos infectados con CAV-08 no presentaron ninguna alteración, al igual que el grupo control negativo.

<b>Grupo experimental</b>	<b>Score de daño histológico</b>	
	<b>Score Timo (n° de animales)</b>	<b>Score Bursa (n° de animales)</b>
Control negativo	1 (3)	1 (3)
CAV-08	1 (3)	1 (3)
CAV-10	4 (3)	1 (1), 2 (2)
CAV-18	3 (3)	1 (2), 2 (1)
CAV-135	2 (3)	1 (3)

Tabla 11. Score designado por histopatología al timo y bursa luego de 14 dpi con diferentes cepas de CAV autóctonas.

Las bursas presentaron lesiones menos evidentes en todos los casos (Figura 37). Sólo algunos de los animales infectados con CAV-10 y CAV-18 mostraron una disminución leve de linfocitos en la corteza de los folículos con la mucosa replegada (Tabla 11).

Los bazos no presentaron lesiones evidentes en ninguno de los grupos experimentales (score 1), por lo tanto sólo se realizó el conteo de los centros germinales para verificar la homogeneidad del estado inmunológico sistémico entre las aves de los diferentes grupos.

Finalmente, a partir de este experimento se pudo determinar que las cepas CAV-10 y CAV-18 generaban un cuadro de inmunosupresión mayor a los 14 dpi que las cepas CAV-08 y CAV-135, medida según el daño histopatológico producido en timo y bursa.

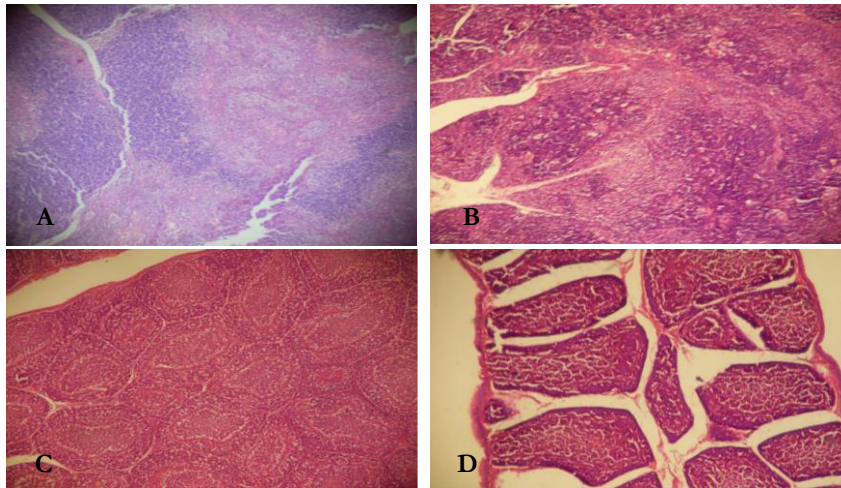


Figura 37. (A) Timo de un pollo control negativo. (B) Timo de un pollo infectado con CAV, 14 dpi. (C) Bursa de un pollo control negativo. (D) Bursa de un pollo infectado con CAV, 14 dpi.

### 5.2.3 Estudio comparativo de la inmunosupresión generada por la cepa autóctona CAV-10 y CAV-18 en pollos SPF:

Con el fin de confirmar el resultado obtenido en el experimento anterior y definir uno de los dos aislamientos para proseguir con los experimentos posteriores, se realizó una infección comparativa entre las dos cepas que presentaron mayor inmunosupresión: CAV-10 y CAV-18 [97].

Previo a realizar la infección de los animales se realizó la secuenciación del genoma completo de ambos inóculos de CAV a utilizar (véase 4.2.2). Los genomas de CAV-10 y CAV-18 (números de acceso en el GenBank KJ872513 y KJ872514 respectivamente) tuvieron una longitud de 2298 nucleótidos y carecían de una región de 21 bases situada dentro de la región no codificante, la cual tiene asociada la función de reguladora de la transcripción del genoma de CAV [98, 99]. Al comparar el genoma de los dos virus se observó que los mismos diferían en sólo 14 nucleótidos, tres en la región no codificante y el resto a lo largo del ORF1. Estas diferencias nucleotídicas entre la VP1 de CAV-10 y CAV-18 resultaron en sólo dos mutaciones a nivel de aminoácidos, generando los cambios Q294H y S370T. Además, ambos virus presentaron una glutamina (Q) de residuos en las posiciones 139 y 144 de VP1, mientras que cepas de referencia como Cux-1 (M55918) presentan una lisina (K) y un ácido aspártico (D) respectivamente (Figura 38).

	10	20	30	40	50	60
KJ872513 CAV-10	MARRARRPRG	RFYAFRRGRW	HHLKRLRRRY	KFRHRRRQRY	RRRAFRKAFH	NPRPGTYSVR
KJ872514 CAV-18	.....	.....	.....	.....	.....	.....
M55918 Cux-1	.....	...S.....	.....	.....	.....	.....
	70	80	90	100	110	120
KJ872513 CAV-10	LPNPQSTMTI	RFQGIIFLTE	GLILPKNSTA	GGYADHLYGA	RVAKISVNLK	EFLASMNLT
KJ872514 CAV-18	.....	.....	.....	.....	.....	.....
M55918 Cux-1	.....	...V.....	.....	...M...	.....	.....
	130	140	150	160	170	180
KJ872513 CAV-10	YVSKIGGPIA	GELIADGS	QAAQNWPCW	LPLDNNVPSA	TPSAWWRWAL	MMMQPTDSCR
KJ872514 CAV-18	.....	.....	.....	.....	.....	.....
M55918 Cux-1	.....	...K...	...D...	.....	.....	.....
	190	200	210	220	230	240
KJ872513 CAV-10	FFNHQKQMTL	QDMGRMFGGW	HLFRHIETRF	QLLATKNEGS	FSPVASLLSQ	GEYLTRRDDV
KJ872514 CAV-18	.....	.....	.....	.....	.....	.....
M55918 Cux-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	250	260	270	280	290	300
KJ872513 CAV-10	KYSSDHQNRW	RKGEQPMTGG	IAYATGKMRP	DEQQYPAMPP	DPPIITTTTP	QGTQVRCMNS
KJ872514 CAV-18	.....	.....	.....	.....	.....	...E.....
M55918 Cux-1	.....	Q..G.....	.....	.....	...A..A	.....
	310	320	330	340	350	360
KJ872513 CAV-10	TQAWWSWDTY	MSFATLTALG	AQWSFPPGQR	SVSRRSFNHH	KARGAGDPKG	QRWHTLVPLG
KJ872514 CAV-18	.....	.....	.....	.....	.....	.....
M55918 Cux-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	370	380	390	400	410	420
KJ872513 CAV-10	TETITDSYMS	APASELDTNF	FTLYVAQGTN	KSQQYKFGTA	TYALKEPVMK	SDAWAVVRVQ
KJ872514 CAV-18	.....	...T.....	.....	.....	.....	.....
M55918 Cux-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	430	440	450			
KJ872513 CAV-10	SVWQLGNRQR	PYPWDVNWAN	STMYWGSQP*			
KJ872514 CAV-18	.....	.....	.....*			
M55918 Cux-1	.....	.....	...T..			

Figura 38. Región hipervariable de la VP1[100] marcada en color gris, desde la posición de aminoácido 139 a la posición 151. En color celeste y rosa se destacan las posiciones 139 y 144 respectivamente. En color verde rojo se destacan las posiciones 294 y 370 respectivamente.

Una vez iniciado el experimento y hasta la finalización del mismo, ninguno de los animales inoculados con CAV o PBS presentaron signos clínicos de enfermedad de anemia infecciosa aviar. Tampoco se observaron diferencias en el peso corporal entre los animales infectados con CAV-10 y CAV-18 frente a los animales del grupo control negativo.

A los 14 dpi, los pollos inoculados con CAV-10 y CAV-18 presentaron anticuerpos anti-CAV, mientras que los animales control negativo se mantuvieron seronegativos a lo largo del experimento.

A nivel macroscópico se observó que los pollos inoculados con CAV-10 o CAV-18 presentaron enrojecimiento y atrofia de los lóbulos tímicos distribuidos a lo largo de ambos lados del cuello (Figura 39b y 39c respectivamente). En contraste, los lóbulos tímicos de los animales del grupo control negativo no se vieron afectados (Figura 28a). Por otra parte, no se observaron lesiones macroscópicas evidentes en el resto de los órganos a los 14 dpi.

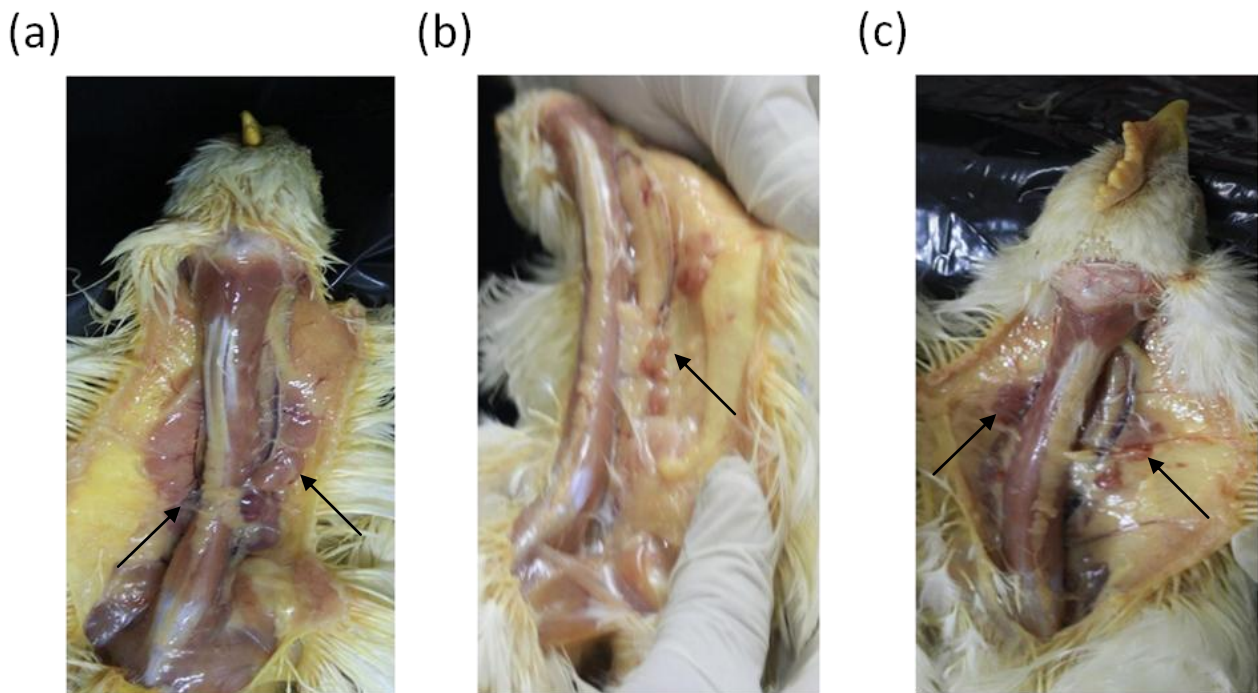


Figura 39. Lesiones macroscópicas en timo de pollos, asociadas con la infección con CAV a los 14 dpi. Las flechas indican los lóbulos tímicos de los pollos. Aquellos animales infectados con CAV-10 (b) y CAV-18 (c) presentan lóbulos más pequeños y enrojecidos que lo de los pollos control negativo (a).



Por otra parte, la media de la relación peso timo/peso corporal se redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) en los pollos de ambos grupos infectados con CAV en comparación con los pollos del grupo control negativo, presentándose una reducción mayor ( $p < 0,05$ ) en los animales inoculados con el virus CAV-10 respecto de los inoculados con CAV-18 (Figura 40a). En cambio, la relación peso bazo/peso corporal y peso bursa/peso corporal de los distintos grupos experimentales no presentaron diferencias significativas al tiempo post infección analizado (Figura 40b y 40c).

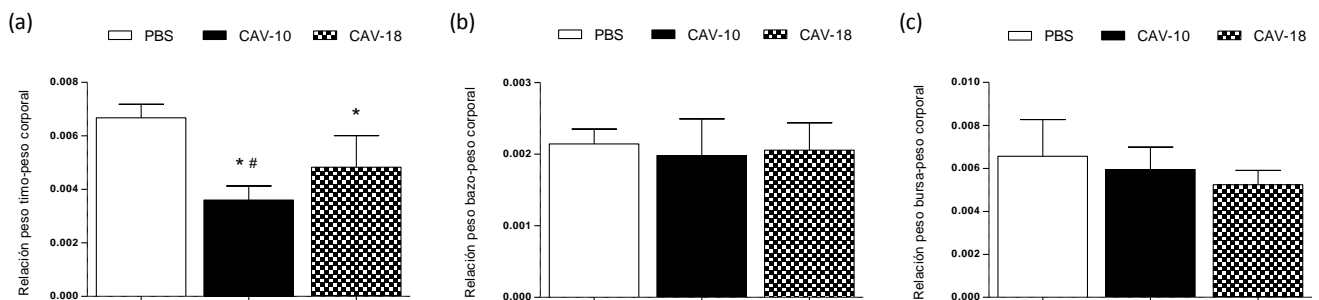


Figura 40. Alteraciones macroscópicas 14 dpi con cepas de CAV argentinas. (a) Alteración de la relación peso timo/peso corporal. (b) Alteración de la relación peso bazo/peso corporal. (c) Alteración de la relación peso bursa/peso corporal. Se compararon las medias de los valores obtenidos de aves infectadas con CAV y aves control negativo. Los resultados se expresan como la media (DS) de cada grupo,  $n = 6$ . \*  $p < 0,05$  vs. control negativo; #  $p < 0,05$  vs CAV-18.

Los linfocitos en timo y bazo, obtenidos a partir de las suspensiones de células mononucleares individuales de estos órganos, se contaron utilizando el método de exclusión de azul tripán. La depleción de los mismos, expresada como la relación entre el número de linfocitos por el peso del órgano, se analizó en cada uno de los animales. Como se muestra en la Figura 30, los timos de los pollos inoculados con las cepas de CAV presentaron una reducción significativa del número de linfocitos respecto del grupo control negativo ( $p < 0,05$ ), mientras que en los bazos el número de esplenocitos se mantuvo sin variaciones entre los distintos grupos experimentales.

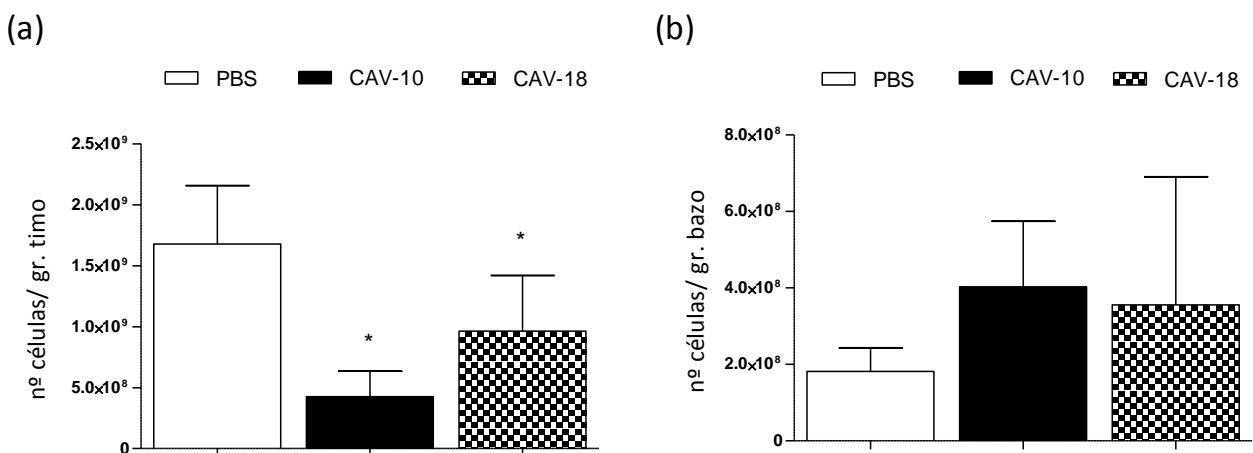


Figura 41. Depleción de linfocitos luego de la infección con cepas de CAV argentinas. La depleción de linfocitos se expresa como la relación nº de células / gr. de timo (a) o de bazo (b) a los 14 dpi, en pollos SPF inoculados con CAV-10, CAV-18 o PBS a las 2 semanas de edad. Los resultados se expresan como la media (DS) de cada grupo,  $n = 6$ . \*  $p < 0,05$  vs. control negativo.

Las lesiones histopatológicas observadas en timo y bursa entre los distintos grupos presentaron diferencias (Figura 42a-42g). Los timos de los pollos infectados con CAV-10 mostraron una severa depleción de linfocitos en la región cortical (Figura 42b), reduciéndose la demarcación entre la médula y la corteza. También se observaron grandes linfoblastos con cariomegalia y vacuolización de las células reticulares (Figura 42g), produciendo un aspecto de cielo estrellado en los mismos. En las bursas de los animales infectados con CAV-10 se observó atrofia con depleción linfoide moderada de los folículos linfoides (Figura 42e), infiltración de macrófagos y células plasmáticas.

Por otra parte, el timo y la bursa de los pollos infectados con la cepa CAV-18 no mostraron alteraciones histopatológicas a los 14 dpi (Figura 42c y 42f respectivamente).

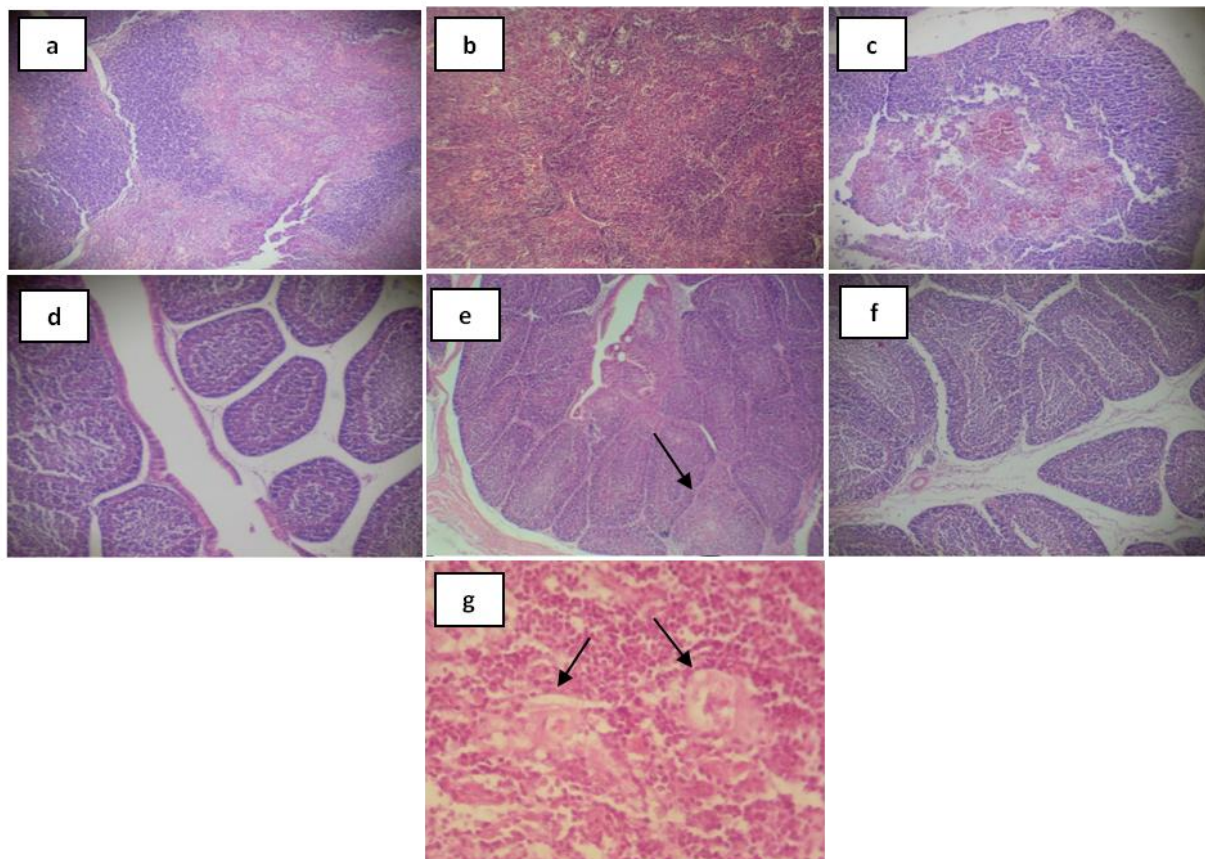


Figura 42. Lesiones histológicas producidas en pollos SPF por la infección con cepas de CAV argentinas. Se estudiaron animales 14 dpi con CAV o inoculación con PBS a las 2 semanas de edad. Las imágenes representan una muestra de tejido representativa de los grupos experimentales, teñidas con HE, 10X (a-f). (a) timo de pollo control negativo; (b) timo de pollo infectado con la cepa CAV-10; (c) timo de pollo infectado con la cepa CAV-18; (d) bursa de Fabricio de pollo control negativo; (e) bursa de Fabricio de pollo infectado con la cepa CAV-10; (f) bursa de Fabricio de pollo infectado con la cepa CAV-18. (g) Linfoblastos agrandados con cariomegalia y vacuolización de las células reticulares (flechas) en los timos de pollos infectados con la cepa CAV-10, 40X.

Con el objeto de analizar la presencia o ausencia de alteraciones en las poblaciones de células T en timo y bazo generada por la infección con CAV, se realizó un estudio de dichas poblaciones por la técnica de citometría de flujo (véase 4.2.8).

TIMO:

Se compararon los porcentajes de diferentes subpoblaciones de linfocitos T en los timos de pollos infectados con CAV frente a los de los timos de las aves control negativo en la región o *Gate 1* (G1), de acuerdo a los parámetros de dispersión por tamaño y granulosidad. Los timocitos en G1 se dividieron luego en aquellos de tamaño pequeño (G2) y grande (G3), con el fin de verificar si se producía una alteración de la timopoyesis por la infección con CAV (Figura 43A).

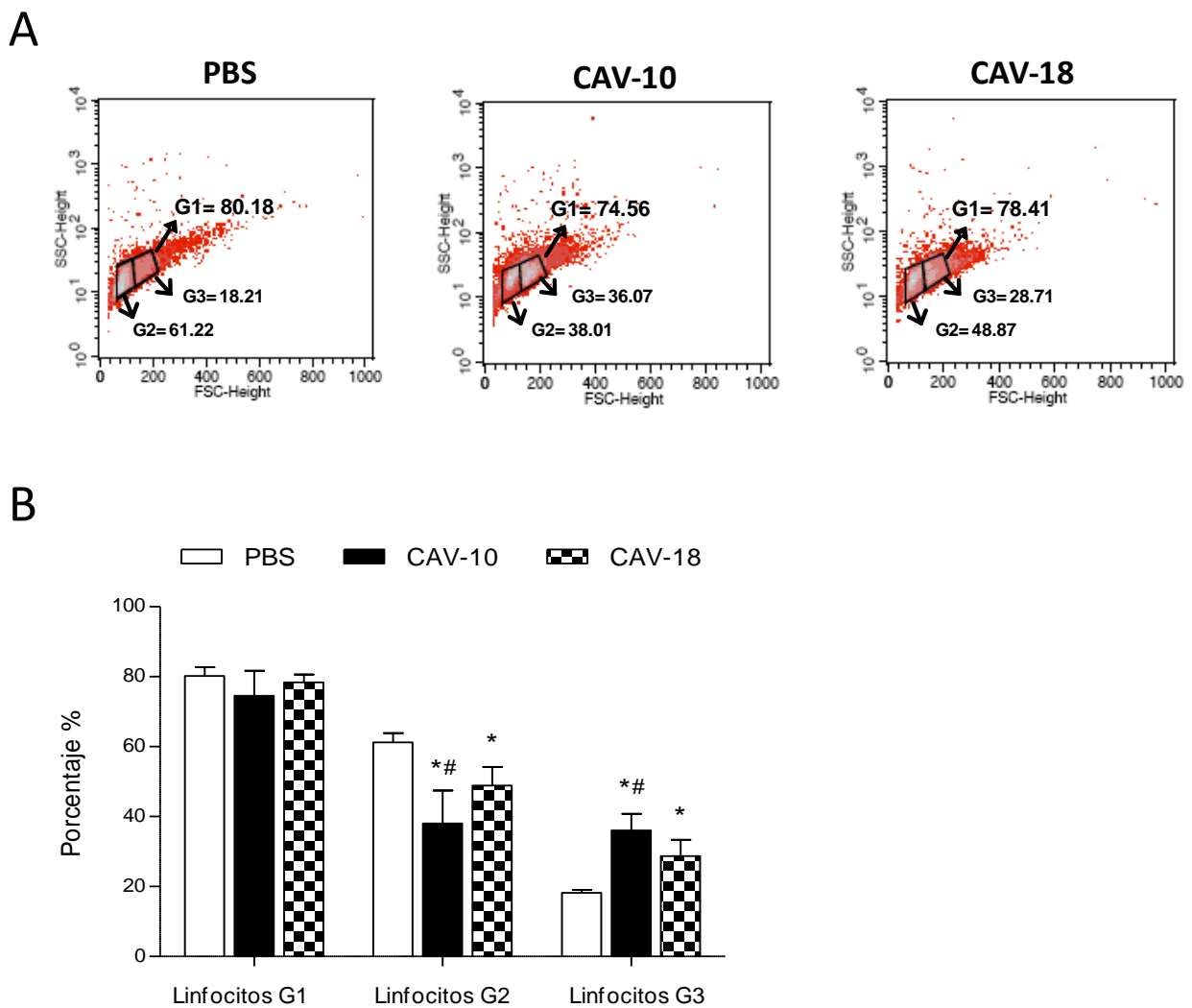


Figura 43. Análisis por citometría de flujo de las subpoblaciones de linfocitos T en el timo de pollos inoculados con CAV-10, CAV-18 o PBS, 14 dpi. (a) El análisis se realizó en G1 de acuerdo a los parámetros de dispersión por tamaño y granulosidad. Los timocitos en G1 se dividieron en pequeños (G2) y grandes (G3). (b) Los resultados se expresan como la media de las frecuencias relativas de linfocitos (DS) en G1, G2 y G3 de cada grupo, n = 6. \*  $p < 0,05$  vs. control negativo; #  $p < 0,05$  vs CAV-18.

La comparación de los porcentajes de linfocitos totales en G1 de cada grupo no mostró diferencias significativas, mientras que los porcentajes de linfocitos pequeños y grandes, en G2 y G3 respectivamente, fueron significativamente diferentes entre los grupos experimentales (Figura 43B). Por un lado, se observó una reducción importante en los porcentajes de linfocitos en G2 en los timos de pollos infectados con CAV ( $p < 0,05$ ), siendo mayor la reducción generada con CAV-10 ( $p < 0,05$ ) respecto de la generada con CAV-18. En contraste, los porcentajes de linfocitos en G3 en los timos de los pollos infectados con CAV fueron mayores respecto de los porcentajes de los timos de pollos control negativo ( $p < 0,05$ ). Más aún, el aumento observado en los pollos infectados con CAV-10 fue superior respecto del aumento observado en las aves infectadas con CAV-18 ( $p < 0,05$ ).

Mediante la realización de un análisis multiparamétrico de las células CD3<sup>+</sup> dentro de la región G1 se observó la presencia de subconjuntos de células CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>. Como se observa en la Figura 44A, en los timos del grupo control negativo el subconjunto predominante fue el de las células dobles positivas (DP) CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>. Estas células DP en G1 se dividieron en dos regiones para su posterior análisis, llamadas R4 y R5, de acuerdo con la expresión en superficie de las moléculas CD4 y CD8 $\alpha$ . En R4 se detectan las células DP con mayor expresión de CD8 $\alpha$  que CD4, y en R5 las células DP con mayor expresión de CD4 que CD8 $\alpha$ .

Las Figuras 44B y 44C muestran células DP de un timo de un ave control negativo en G2 y G3, respectivamente. La mayoría de las DP pequeñas, con un tamaño y granularidad compatible con G2, se encontraban en R4; mientras que las DP grandes de G3 se localizaron tanto en R4 como en R5. En particular, CAV-10 no sólo generó una reducción significativa ( $p < 0,05$ ) en el número total de DP en G1, G2 y G3 como CAV-18 (Figura 44J-44L), sino que además alteró los porcentajes de timocitos DP en R4 y R5 (Figuras 33D-33I). En especial, la cepa CAV-10 produjo una reducción mayor ( $p < 0,05$ ) del porcentaje de DP en R4 respecto a CAV-18 (en G1, G2 y G3), y un aumento significativo particular del porcentaje de DP en R5 (en G1 y G2) que no se observó en los timos de pollos infectados con CAV-18 (Figura 44J-44L).

En las Figuras 33A, 33D y 33G también se observan diferencias entre los porcentajes de timocitos CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> en G1 de pollos infectados con CAV-10, CAV-18 y PBS. Ambos grupos inoculados con CAV aparentan tener aumentados los porcentajes de estas subpoblaciones en timo. Sin embargo, cuando se compara el número absoluto de timocitos CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> entre los distintos grupos experimentales se observa una reducción significativa sólo de los timocitos CD4<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> en los animales infectados con la cepa CAV-10 (Figura 44M).

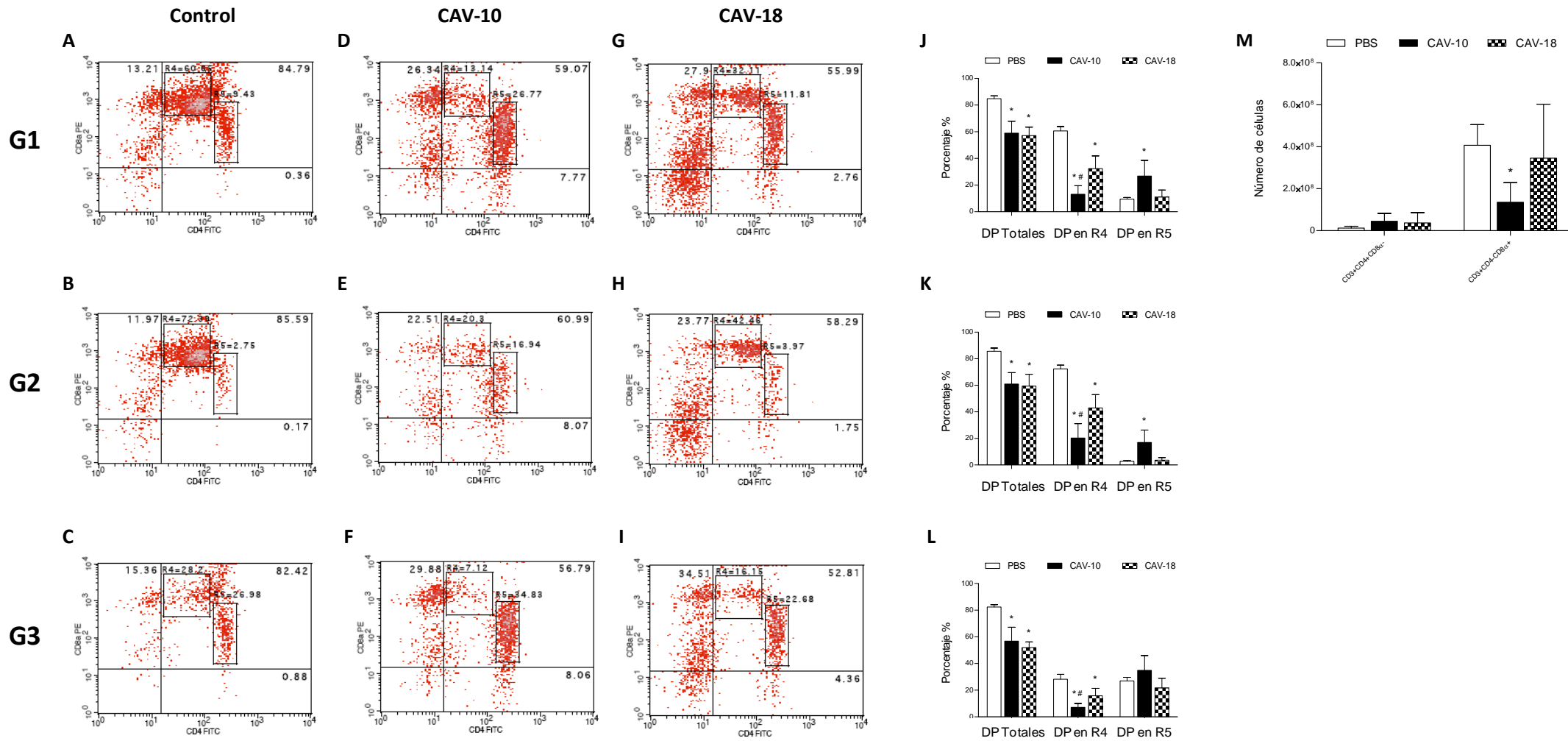


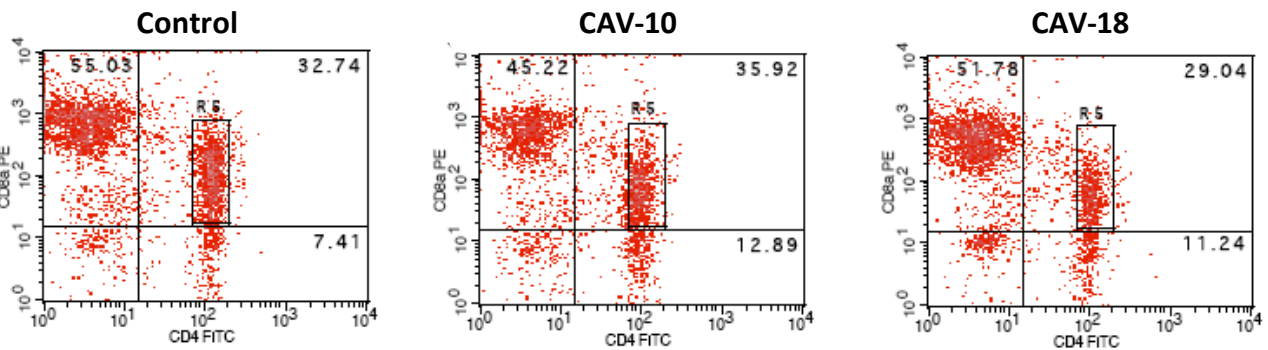
Figura 44. Análisis por citometría de flujo de diferentes subpoblaciones de linfocitos T en el timo de pollos SPF. Se estudiaron animales 14 dpi con CAV-10, CAV-18 o PBS. (A-I) Timocitos CD3+CD4+CD8 $\alpha$ -, CD3+CD4-CD8 $\alpha$ + y CD3+CD4+CD8 $\alpha$ + (DP) de un timo de cada grupo en G1 (A, D, G), G2 (B, E, H) y G3 (C, F, I). R4 y R5 representan timocitos DP con diferente expresión de las moléculas CD4 y CD8 $\alpha$  en superficie. (J-L) Porcentaje relativo de DP totales, DP en R4 y DP en R5 en G1, G2 y G3 de pollos control negativo (□), CAV-10 (■) y CAV-18 (▣). (M) Número absoluto de timocitos CD4+CD8 $\alpha$ - y CD4-CD8 $\alpha$ + en G1 de pollos control negativo (□), CAV-10 (■) y CAV-18 (▣). Las células fueron marcadas con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 $\alpha$  conjugados con SPRD, FITC y PE, respectivamente. Los resultados se expresan como la media (DS) de las frecuencias relativas y del número absoluto de células de cada grupo, n = 6. \*  $p < 0,05$  vs. control negativo; #  $p < 0,05$  vs CAV-18 [97].

## BAZO:

Los porcentajes de linfocitos esplénicos de los diferentes grupos experimentales se analizaron en G1 de acuerdo a los parámetros de dispersión por tamaño y granulosidad.

El análisis reveló la presencia de subconjuntos de células CD3+CD4+CD8 $\alpha$ - (LTh), CD3+CD4-CD8 $\alpha$ + (LTc) y CD3+CD4+CD8 $\alpha$ + (DP maduras). En la Figura 45A se puede observar que las células DP maduras se encuentran mayoritariamente en R5, lo que indica que existe un subconjunto de DP único en el bazo que representa una población esplénica particular. Los porcentajes de estas células DP maduras no fueron alterados luego de 14 dpi con las cepas de CAV argentinas utilizadas (Figura 45B). Resultados similares se obtuvieron para los porcentajes de células del bazo LTh, las cuales tampoco difirieron significativamente entre los grupos experimentales. Sin embargo, el porcentaje de LTc disminuyó sólo en los bazos de pollos infectados con la cepa CAV-10 ( $p < 0,05$ ).

### A



### B

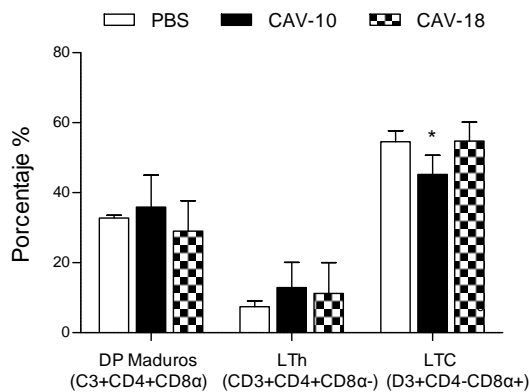


Figura 45. Análisis por citometría de flujo de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T en bazo de pollos SPF 14 dpi con CAV-10, CAV-18 o PBS. (A) El análisis se realizó en G1 de acuerdo a los parámetros de dispersión por tamaño y granulosidad. (B) Porcentaje relativo de splenocitos CD3+CD4+CD8 $\alpha$ - (LTh), CD3+CD4-CD8 $\alpha$ + (LTc) y CD3+CD4+CD8 $\alpha$ + (DP maduros) en pollos controles negativos ( $\square$ ), CAV-10 ( $\blacksquare$ ) y CAV-18 ( $\blacklozenge$ ). Las células fueron marcadas con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 $\alpha$  conjugados con SPRD, FITC y PE, respectivamente. Los resultados se expresan como la media (DS) de las frecuencias relativas de cada grupo, n = 6. \*  $p < 0,05$  vs. control negativo [97].

Para un mejor análisis de la subpoblación de LTc afectada por la infección con CAV, se realizó una segunda tinción de esplenocitos en G1 para poder discriminar entre los dos subconjuntos de LTc, linfocitos citotóxicos CD8 $\alpha\alpha$  o CD8 $\alpha\beta$ . Los porcentajes de células esplénicas CD8 $\alpha\alpha$  no difirieron significativamente entre los grupos experimentales (Figura 46). Por el contrario, el porcentaje de LTc CD8 $\alpha\beta$  se redujo significativamente en los bazos de los pollos inoculados con CAV-10.

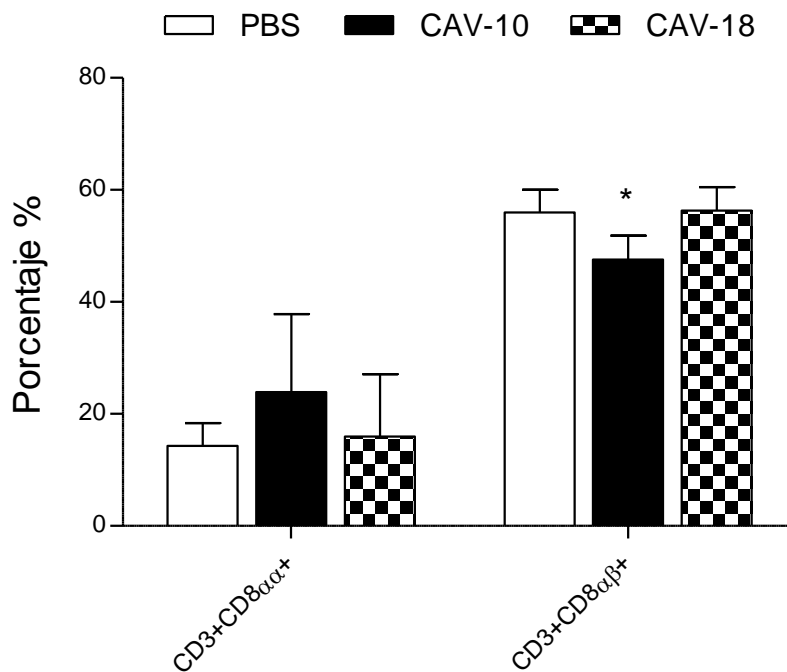


Figura 46. Análisis por citometría de flujo de las subpoblaciones de linfocitos T CD3+CD8 $\alpha\alpha$ + y CD3+CD8 $\alpha\beta$ + en bazo de pollos SPF 14 dpi con CAV-10, CAV-18 o PBS. El análisis se realizó en G1 de acuerdo a los parámetros de dispersión. Los resultados se expresan como la media (DS) de las frecuencias relativas de cada grupo, n = 6. \*  $p < 0,05$  vs. control negativo [97].

Estos resultados permitieron detectar diferencias entre ambos aislamientos en cuanto al grado de inmunosupresión generado en los pollos SPF de 14 días de edad. A partir de dichos resultados se seleccionó al aislamiento CAV-10 para ser utilizado en los ensayos posteriores de coinfección con AIV.

### 5.3 Estudio de replicación y transmisión de LPAIV de subtipo H6 en pollos SPF inmunocompetentes

Debido a la elevada proporción (40%) de virus de IA de subtipo H6 aislados en el período 2006-2012 en nuestro país, se realizó un estudio comparativo de replicación y transmisión en pollos SPF con cinco AIV argentinos de subtipo H6 y dos virus H6 prototipos, uno de América del Norte y otro de Eurasia [85] (véase 4.3).

En primer lugar, se realizó la secuenciación de cada uno de los ocho segmentos genómicos de los virus argentinos a utilizar y se los comparó con secuencias disponibles en GenBank (Tabla 12) [85].

Segmento genómico	Mayor similitud de secuencia nucleotídica <sup>a</sup>				
	557/H6N2	575/H6N8	925/H6N2	269/H6N8	1977/H6N2
PB2	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 96%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 96%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 96%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 96%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 95%
PB1	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 94%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 94%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 94%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 94%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 94%
PA	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 97%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 96%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 97%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 98%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 98%
HA	mal/Alb/96 H6N8 <sup>c</sup> <b>91%</b>	mal/Alb/96 H6N8 <sup>c</sup> <b>91%</b>	mal/Alb/96 H6N8 <sup>c</sup> <b>91%</b>	mal/Alb/96 H6N8 <sup>c</sup> <b>91%</b>	sb/DE/2004 H6N8 <sup>d</sup> <b>97%</b>
NP	blwt/Alb/78 H6N2 <sup>e</sup> 94%	ct/Bolivia/01 H7N3 <sup>f</sup> 96%	ct/Bolivia/01 H7N3 <sup>f</sup> 96%	ct/Bolivia/01 H7N3 <sup>f</sup> 96%	ct/Bolivia/01 H7N3 <sup>f</sup> 96%
NA	mtldk/LA/87 H6N2 <sup>g</sup> <b>88%</b>	blwt/Alb/91 H3N8 <sup>h</sup> <b>92%</b>	mtldk/LA/87 H6N2 <sup>g</sup> <b>88%</b>	blwt/Alb/91 H3N8 <sup>h</sup> <b>92%</b>	mtldk/LA/87 H6N2 <sup>g</sup> <b>88%</b>
M	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 98%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 98%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 98%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 98%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 98%
NS	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 99%	rwf/Arg/08 H1N1 <sup>b</sup> 98%	klpg/Arg/06 H13N9 <sup>i</sup> 96%	ty/Chile/02(H7N3) 97%	klpg/Arg/06 H13N9 <sup>i</sup> 96%

Tabla 12. Virus en GenBank con mayor similitud de secuencia nucleotídica con los AIV H6 argentinos. <sup>a</sup> Expresada como % de identidad de secuencia de nucleótidos. <sup>b</sup> A/red-winged tinamou/Argentina/MP1/2008 (H1N1). <sup>c</sup> A/Mallard/Alberta/206/96 (H6N8). <sup>d</sup> A/Shorebird/Delaware/12/2004 (H6N8). <sup>e</sup> A/blue-winged teal/Alberta/651/1978 (H6N2). <sup>f</sup> A/cinnamon teal/Bolivia/4537/2001 (H7N3). <sup>g</sup> A/mottled duck/LA/32M/1987 (H6N2). <sup>h</sup> A/blue-winged teal/Alberta/120/1991 (H3N8). <sup>i</sup> A/kelp gull/Argentina/LDC4/2006 (H13N9). <sup>j</sup> A/chicken/Chile/184240-1/2002(H7N3).

Por un lado, se observó que los genes internos de los virus H6 argentinos mostraron estar estrechamente relacionados con los AIV de América del Sur, por ejemplo de Argentina, Bolivia y Chile, presentando porcentajes de identidad nucleotídica superiores al 94% en todos los casos.

Por otra parte, al momento de realizar el experimento no había información disponible en cuanto a secuencias de subtipo H6 de virus de IA de América del Sur. Por ello, el pariente más cercano fue A/mallard/Alberta/206/1996 (H6N8) de linaje Norteamericano con sólo el 91% de identidad nucleotídica, a excepción del virus 1977/H6N2 que tuvo una homología del 97% con el virus A/shorebird/DE/12/2004 (H6N8) (Tabla 12). Del mismo modo, debido a la falta de secuencias de N2



y N8 procedentes de América del Sur, sus parientes más cercanos compartieron sólo el 88% y el 92% de identidad de secuencia nucleotídica con los virus de América del Norte A/mottled duck/LA/32M/1987 (H6N2) y A/blue-winged teal/Alberta/120/1991 (H3N8), respectivamente (Tabla 12).

Al comparar las proteínas de los virus aislados de aves silvestres en la Argentina con secuencias aminoacídicas consenso de virus de IA de aves silvestres de otras regiones del mundo, observamos que la identidad de aminoácidos de la mayoría de los genes fue superior al 97% en comparación con las cepas consenso en América del Norte y Eurasia (Tabla 13). Estos resultados sugieren que la homología de secuencia aminoacídica de todos los segmentos genómicos se mantiene conservada entre los AIV que circulan en todo el mundo.

	<b>PB2</b>		<b>PB1</b>		<b>PA</b>		<b>NP</b>		<b>HA</b>		<b>NA</b>		<b>M1</b>		<b>NS1</b>	
Consenso <sup>a</sup>	NA <sup>b</sup>	EA <sup>b</sup>	NA	EA	NA	EA	NA	EA	NA-A <sup>c</sup>	EA	NA	EA	NA	EA	NA	EA
557/H6N2	98.3	98.2	99.2	99.2	97.9	97.9	98.4	98.0	97.5	97.3	94.0	93.6	100	100	98.7	99.6
575/H6N8	98.6	98.4	99.5	99.5	98.2	98.0	98.6	98.4	97.0	96.8	97.4	87.2	100	100	97.8	98.7
925/H6N2	98.4	98.3	99.3	99.3	98	98.2	98.6	98.4	97.0	96.8	93.8	93.4	100	100	97.4	97.4
269/H6N8	98.8	98.7	99.3	99.3	98.0	98.0	98.4	98.2	97.2	97.0	93	87.0	100	100	97.0	97.8
1977/H6N2	98.4	98.3	99.2	99.2	98.2	98.2	98.6	98.4	98.1	97.9	97	92.8	100	100	97.0	97.0

Tabla 13. Homología de secuencia aminoacídica entre los virus H6 argentinos y las secuencias consenso de los AIV de América del Norte y Eurasia. <sup>a</sup> Aminoácido consenso. <sup>b</sup> NA: Linaje Norteamericano, EA: Linaje Eurasiático. <sup>c</sup> NA-A: Linaje Norteamericano, clado A [85].

Por su parte, el análisis de la secuencia de aminoácidos deducida de las HA de estos virus H6 reveló que todos fueron típicos virus de influenza aviar de baja patogenicidad (LPAIV), debido a que los cinco virus H6 argentinos tienen un motivo PQIE<sup>+</sup>TRG en el sitio de clivaje de la HA y conservan aminoácidos en el sitio de unión al receptor típicos de aves (226Q y 228G). Por otro lado, no se encontraron mutaciones asociadas a la adaptación a los mamíferos, como por ejemplo en la PB2 el sitio 627K o 701N, ni tampoco se encontraron mutaciones en la M2 en el sitio 31N, responsables de la resistencia amantadina [85].

Para estudiar la replicación y transmisión de los virus H6 se trabajó con 8 grupos experimentales conformados por los cinco LPAIV H6 argentinos, dos virus H6 prototipos (uno de linaje Norteamericano y otro de linaje Euroasiático) y un grupo control negativo (véase punto 4.3) (Tabla 14).

Virus	Nº pollos inoculados positivos/Nº pollos total (mayor título viral) <sup>a</sup>		Nº contactos directo positivos/Nº contactos directo total (mayor título viral) <sup>a</sup>		Media del título de HI (dilución suero log <sub>2</sub> ) (Nº positivos/Nº total)	
	T <sup>b</sup>	C <sup>b</sup>	T <sup>b</sup>	C <sup>b</sup>	Inoculados	Contactos
206/H6N8	0/6	0/6	0/6	0/6	475 (6/6)	0/6
W312/H6N1	5/6 (3,7) <sup>c</sup>	1/6 (1,7) <sup>d</sup>	0/6	0/6	217 (6/6)	17 (3/6)
557/H6N2	0/6	0/6	0/6	1/6 (3,2) <sup>e</sup>	189 (6/6)	40 (2/6)
575/H6N8	1/6 (1,7) <sup>f</sup>	0/6	0/6	0/6	133 (3/3)	15 (2/6)
925/H6N2	0/6	0/6	0/6	0/6	384 (6/6)	0/6
269/H6N8	0/3	0/3	0/6	0/3	133 (3/3)	0/3
1977/H6N2	0/3	0/3	0/6	0/3	73 (3/3)	0/3

Tabla 14. Replicación, transmisión y seroconversión de los pollos infectados con los AIV H6 argentinos. <sup>a</sup> Mayor título viral expresado en log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>/ml. <sup>b</sup> T: Tráquea; C: Cloaca. <sup>c</sup> Eliminación de virus durante 5 días, pico del título viral al 1dpi. <sup>d</sup> 1.7 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>/ml al 7dpi. <sup>e</sup> 3.2 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>/ml al 5dpi. <sup>f</sup> 1.7 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>/ml al 7dpi [85].

Los cinco virus argentinos mostraron una replicación y transmisión bastante limitada en estas aves. En sólo un hisopado traqueal de los animales inoculados con la cepa 575/H6N8 se detectó la presencia de virus. En contraste, la cepa prototipo W312/H6N1, que se encuentra comúnmente en los mercados de aves vivas de corral en el sudeste de Asia, mostró una replicación del virus consistente en el tracto respiratorio del grupo de pollos infectados (5 de 6 pollos fueron positivos).

Los hisopados cloacales de las aves inoculadas mostraron títulos de virus perceptibles sólo para uno de los pollos inoculados con el virus W312/H6N1. En contraste, la cepa norteamericana prototípica 206/H6N8 no mostró signos de replicación en los pollos inoculados, aunque mostró el mayor índice de seroconversión medido por HI.

Todos los pollos inoculados mostraron seroconversión al finalizar el experimento independientemente del LPAIV utilizado, confirmando una infección efectiva en todos ellos (Tabla 14).

En aquellos pollos donde se estudió transmisión por contacto directo no se detectó virus ni en los hisopados traqueales ni en los cloacales, con excepción de un pollo contacto directo del grupo 557/H6N2. Sin embargo, hubo evidencia de transmisión mediante la detección de seroconversión. Tres de las seis pollos puestos en contacto directo mostraron seroconversión en el grupo W312/H6N1, mientras que 2 de cada 6 mostraron títulos de HI discernibles en los grupos 557/H6N2 y 575/H6N8.

Las propiedades antigénicas de los virus H6 aislados en la Argentina se investigaron mediante el uso de antisueros de pollos, generados a partir de los estudios de replicación mencionados anteriormente. Los antisueros contra el virus W312/H6N1 mostraron títulos altos de HI contra el virus homólogo, pero títulos claramente más bajos frente a los virus argentinos. Del mismo modo, los

antisueros contra las otras cepas H6 argentinas mostraron baja reactividad frente al virus W312/H6N1 (Tabla 15).

Virus	Título HI/Suero contra						
	206/H6N8	W312/H6N1	557/H6N2	575/H6N8	925/H6N2	269/H6N8	1977/H6N2
206/H6N8	<b><i>320</i></b> <sup>a</sup>	480	320	960	480	240	120
W312/H6N1	160	<b><i>3840</i></b>	160	320	160	40	40
557/H6N2	160	320	<b><i>640</i></b>	640	1280	80	160
575/H6N8	240	960	480	<b><i>1280</i></b>	1280	160	160
925/H6N2	160	1280	640	1280	<b><i>1280</i></b>	160	160
269/H6N8	160	640	320	640	960	<b><i>320</i></b>	120
1977/H6N2	120	640	640	320	640	240	<b><i>160</i></b>

Tabla 15. Perfiles antigénicos de los AIV H6 argentinos frente a virus homólogo y heterólogos. <sup>a</sup> Título de HI con virus H6 homólogos en negrita [85].

Además, en la Tabla 15 se puede observar que los virus 557/H6N2, 575/H6N8 y 925/H6N2 aislados en Argentina también mostraron baja reactividad frente la cepa 1977/H6N2 o la cepa prototipo 206/H6N8.

#### 5.4 Estudio de replicación y transmisión de LPAIV de subtipo H6 en pollos SPF inmunocompetentes o inmunosuprimidos previamente con CAV-10

Se utilizó el virus 557/H6N2 para los estudios de patogenicidad en aves inmunocompetentes e inmunosuprimidas experimentalmente con la cepa CAV-10, debido a que con este aislamiento se pudo evidenciar infección, replicación y transmisión en pollos SPF (5.3). Para este experimento, los pollos SPF utilizados se dividieron en 3 grupos experimentales: el grupo 1 ó grupo control negativo, el grupo 2 ó grupo infectado con el LPAIV 557/H6N2 y el grupo 3 ó grupo coinfectado, primero con la cepa CAV-10 y luego con el virus 557/H6N2 (véase 4.4).

Luego de 14 días de iniciado el experimento, se realizó la eutanasia de ocho pollos del grupo 1 y del grupo 3 para confirmar la inmunosupresión producida por CAV-10 (véase 4.4). Se observó una reducción del tamaño del timo de los animales inoculados con CAV-10 respecto al tamaño del timo de las aves control negativo. Esta reducción pudo ser cuantificada individualmente mediante la relación

peso timo/peso corporal de cada uno de los animales, determinándose que la misma fue significativa en los pollos infectados con CAV-10 (Figura 47).

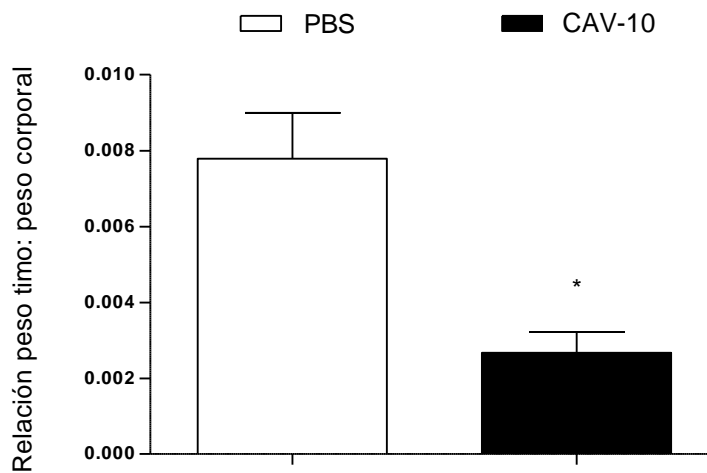


Figura 47. Relación peso timo/peso corporal. Se compararon las medias de los valores obtenidos de aves infectadas con CAV y aves control negativo. Los resultados se expresan como la media (DS) de cada grupo, n = 8. \*  $p < 0,05$  vs. control negativo.

El estudio histopatológico realizado sobre el timo permitió observar que el daño causado en los pollos infectados con CAV-10 produjo una reducción de los linfocitos de la corteza mayor al 70% (score 4) (Figura 48).

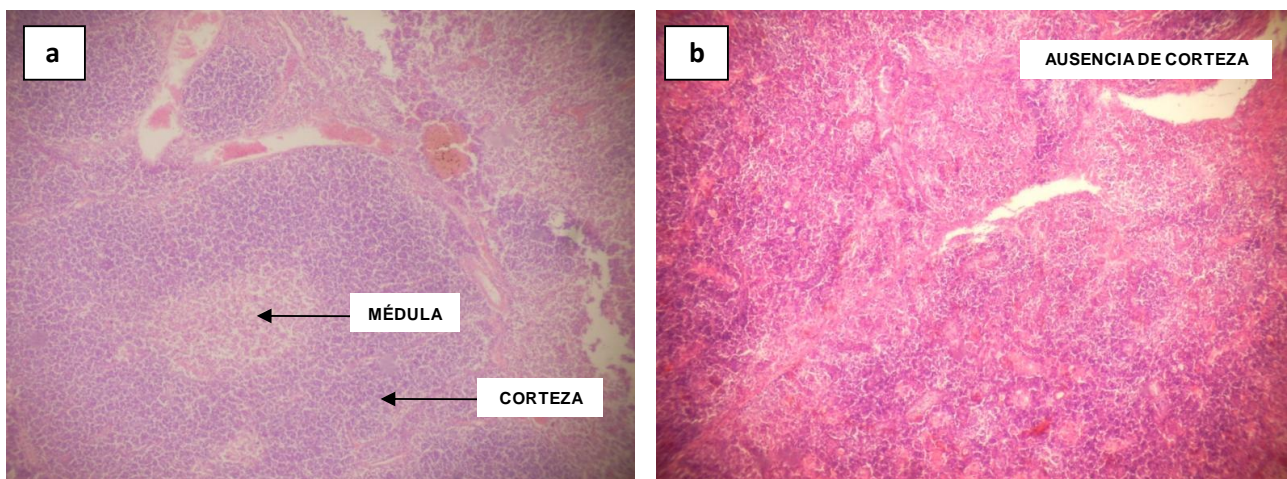


Figura 48. Lesiones histológicas producidas en pollos SPF por la infección con la cepa CAV-10 argentina. Las imágenes representan una muestra de tejido representativa de los grupos experimentales, teñidas con HE. (a) timo de pollo control negativo, 4X; (b) timo de pollo infectado con la cepa CAV-10, 4X.

Posteriormente, se realizaron los estudios de citometría para determinar las subpoblaciones afectadas de timocitos y esplenocitos.

En timo se obtuvieron resultados similares a los observados en el experimento 5.2.3. Nuevamente se observó una reducción significativa ( $p < 0,05$ ) en el número total de linfocitos en los timos de los animales infectados con CAV-10 (Figura 49a), sin alteración en el porcentaje de timocitos en G1 pero con reducción significativa en G2 y aumento significativo en G3 (Figura 49b). Además, los porcentajes de los timocitos DP totales y de DP en R4 se redujeron significativamente en los pollos infectados con CAV-10, mientras que el porcentaje de timocitos DP en R5 aumentó significativamente (Figura 49c).

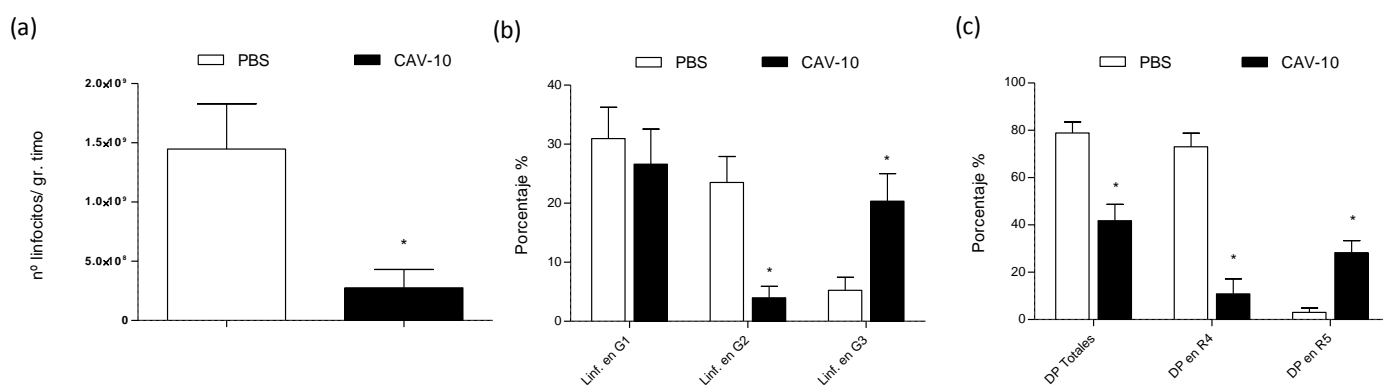


Figura 49. Alteración en timo luego de la infección con CAV-10. (a) La depleción de linfocitos se expresa como la relación n° de células / gr. de timo. (b) El análisis se realizó en G1 de acuerdo a los parámetros de dispersión por tamaño y granulosidad. Los timocitos en G1 se dividieron en pequeños (G2) y grandes (G3). (c) Porcentaje relativo de DP totales, DP en R4 y DP en R5 en G1. Los resultados se expresan como la media (DS) de cada grupo, n = 8. \*  $p < 0,05$  vs. control negativo.

En bazo, en cambio, la reducción del porcentaje de esplenocitos CD3+CD8 $\alpha$ +CD8 $\beta$ + no fue tan evidente como en el ensayo anterior (véase 5.2.3), debido a que sólo cinco de los ocho animales infectados con CAV-10 presentaron una reducción de esta subpoblación y los otros tres no. Por ello, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las subpoblaciones de linfocitos T en bazo (Figura 50).

En conjunto, estos resultados permitieron asegurar que los pollos inoculados con CAV-10 se encontraban inmunosuprimidos a los 14 dpi, con desórdenes en las subpoblaciones de timocitos y timopoyesis alterada pero sin variaciones estadísticamente significativas en las subpoblaciones de linfocitos T en bazo.

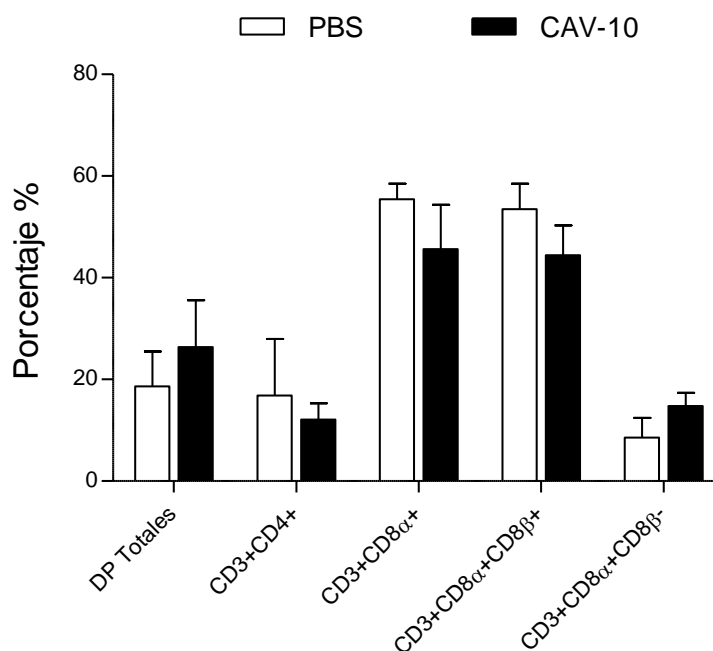


Figura 50. Análisis por citometría de flujo de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T en bazo de pollos SPF 14 dpi con CAV-10 o PBS. El análisis se realizó en G1 de acuerdo a los parámetros de dispersión por tamaño y granulosidad. Porcentaje relativo de splenocitos CD3+CD4+CD8α+ (DP maduros), CD3+CD4+CD8α- (LTh), CD3+CD4-CD8α+ (LTc), CD3+CD8α+CD8β+ (CD8αβ) y CD3+CD8α+CD8β- (CD8αα). Los resultados se expresan como la media (DS) de las frecuencias relativas de cada grupo, n = 8.

A los 14 dpi, las aves restantes del grupo 2 y 3 fueron infectadas con el virus 557/H6N2. En la Tabla 16 se detalla la replicación y excreción de 557/H6N2 en los distintos grupos experimentales, a los diferentes tiempos post infección.

Todos los hisopados traqueales de los pollos infectados con el virus 557/H6N2 fueron positivos al primer día pi, mientras que sólo seis de los ocho animales coinfectados con CAV-10 y 557/H6N2 fueron positivos para el virus en tráquea en ese mismo tiempo post infección.

Por otra parte, los títulos de ARN viral detectados en el grupo 557/H6N2 y en el grupo coinfectado fueron mayores que los valores obtenidos para el grupo control negativo al primer día pi ( $p < 0,05$ ). Por su parte, el grupo coinfectado presentó una media del título de ARN viral significativamente mayor que la media obtenida para el grupo 557/H6N2 ( $p < 0,05$ ).

Grupo	Detección de ARN viral ( $\log_{10}$ EID <sub>50</sub> /ml) <sup>εδ</sup>							
	1 dpi		3 dpi		5 dpi		7 dpi	
	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca	Tráquea	Cloaca
Grupo 1: Control Negativo	0/14 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/14 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/8 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/8 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>
Grupo 2: 557/H6N2	<b>8/8 (2,95)<sup>B</sup></b>	0/8 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	<b>7/8 (3,45)<sup>B</sup></b>	0/8 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	1/4 (2,74) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>
Contacto Directo 2 (CD-2)	-	-	0/3 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	<b>2/3 (<math>\leq 2,56</math>)<sup>B</sup></b>	0/3 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/3 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/3 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/3 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>
Grupo 3: CAV-10 + 557/H6N2	<b>6/8 (3,64)<sup>C</sup></b>	0/8 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	<b>6/8 (3,5)<sup>B</sup></b>	0/8 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 <sup>a</sup> ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>
Contacto Directo 3 (CD-3)	-	-	2/3 ( $\leq 2,96$ ) <sup>AB</sup>	0/3 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/3 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/3 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/3 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/3 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>

<sup>ε</sup> Número de aves positivas al AIV por RT-qPCR/total

<sup>δ</sup> Para poder realizar la estadística, los hispados tranqueales y cloacales en los que no se detectó ARN viral se les otorgó el valor numérico  $10^2$  EID<sub>50</sub>/ml, que representa en menor nivel detectable de ARN viral con la RT-qPCR utilizada

Letras distintas en mayúscula en superíndice indican diferencias significativas en la media del título de ARN viral entre los grupos; Kruskal Wallis,  $p < 0,05$

Tabla 16. Replicación y excreción de 557/H6N2 en tráquea y cloaca de aves con diferente estado inmunológico.

A los 3 dpi se mantuvo la replicación y excreción de virus en tráquea de ambos grupos infectados con 557/H6N2 (2 y 3). Asimismo, se observó que dos de tres animales contacto directos del grupo 3 (CD-3) también presentaron virus en tráquea. Los valores de las medias del título de ARN viral del grupo 2 y 3 fueron significativamente superiores al obtenido para los pollos control negativo ( $p < 0,05$ ) pero sin diferencias significativas entre sí.

A los 5 y 7 dpi no se detectó la presencia de virus de IA en ninguno de los hisopados traqueales de los tres grupos experimentales.

Por otra parte, la excreción de 557/H6N2 por cloaca sólo se observó en dos animales contacto directo del grupo 2 (CD-2) a los 3 dpi. La media del título de ARN viral obtenido en cloaca de estos animales es superior a la obtenida para el resto de los grupos experimentales ( $p < 0,05$ ).

A los 3 dpi con 557/H6N2 se realizó la eutanasia de cuatro pollos de cada grupo experimental con la finalidad de buscar lesiones producidas por la infección con el LPAIV. Se analizó la presencia o ausencia de ARN viral en diferentes órganos y se cuantificó utilizando la RT-qPCR (véase 4.4.2).

Independientemente del estado inmunológico de los animales de los diferentes grupos experimentales, el virus de influenza se detectó en la misma cantidad, en el mismo número de animales y en los mismos órganos (Tabla 17).

El pulmón fue el único órgano en el cual se detectaron diferencias significativas en cuanto al título de ARN viral. Este valor fue mayor ( $p < 0,05$ ) en el grupo 2 respecto del valor de los pollos control negativo. Además, dicho grupo presentó un número mayor de animales (3/4) con ARN viral en pulmón a los 3 dpi respecto de los animales del grupo 1 (0/4) y grupo 3 (1/4).



Grupo	Detección de ARN viral ( $\log_{10}$ EID <sub>50</sub> /ml) <sup>εδ</sup>								
	Cerebro	Cavidad Nasal	Pulmón	Bazo	Páncreas	Duodeno	Riñón	Bursa	Tonsila
Grupo 1: Control Negativo	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>
Grupo 2: 557/H6N2	1/4 ( $\leq 2,53$ ) <sup>A</sup>	1/4 ( $\leq 3,07$ ) <sup>A</sup>	<b>3/4 (<math>\leq 4,18</math>)<sup>B</sup></b>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	1/4 ( $\leq 2,04$ ) <sup>A</sup>	1/4 ( $\leq 2,16$ ) <sup>A</sup>	1/4 ( $\leq 2,03$ ) <sup>A</sup>	1/4 ( $\leq 2,13$ ) <sup>A</sup>
Grupo 3: CAV-10 + 557/H6N2	1/4 ( $\leq 2,3$ ) <sup>A</sup>	1/4 ( $\leq 2,08$ ) <sup>A</sup>	1/4 ( $\leq 3,3$ ) <sup>AB</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	1/4 ( $\leq 2,01$ ) <sup>A</sup>	1/4 ( $\leq 2,91$ ) <sup>A</sup>	0/4 ( $\leq 2$ ) <sup>A</sup>	1/4 ( $\leq 2,56$ ) <sup>A</sup>

<sup>ε</sup> Número de aves positivas al AIV por RT-qPCR/total

<sup>δ</sup> Para poder realizar la estadística, los macerados de órgano en los que no se detectó ARN viral se les otorgó el valor numérico  $10^2$  EID<sub>50</sub>/ml, que representa en menor nivel detectable de ARN viral con la RT-qPCR utilizada

Letras distintas en mayúscula en superíndice indican diferencias significativas en la media del título de ARN viral entre los grupos; Kruskal Wallis,  $P < 0.05$

Tabla 17. Replicación de 557/H6N2 en órganos de aves con diferente estado inmunológico.

Por otra parte, se evaluaron las lesiones histopatológicas producidas en los órganos a los 3 dpi con 557/H6N2. En primer lugar, la infección con este LPAIV no produjo lesión evidente en cerebro, riñón, duodeno ni tonsila cecal en ninguno de los grupos experimentales. Sin embargo, las aves del grupo 557/H6N2 y el grupo coinfectado presentaron lesiones en cavidad nasal (junto con la piel que la rodea), tráquea, esófago, pulmón, páncreas y bursa.

La cavidad nasal de los cuatro pollos del grupo 2 presentó necrosis y un exudado hemorrágico en el epitelio del vestíbulo (Figura 51c). En la luz del epitelio respiratorio se observó exudado fibrinoso con vacuolización de las glándulas mucosas (Figura 51d), evidenciando la degeneración celular producida por la inflamación linfocitaria en esta zona. La piel adyacente a la cavidad nasal de estos animales presentó hiperemia de los vasos sanguíneos en la dermis con infiltrado linfocitario (Figura 51e). Por su parte, los cuatro pollos del grupo 3 presentaron un leve exudado hemorrágico en los cornetes nasales (Figura 51f), mientras que la piel adyacente a la misma se mantuvo sin particularidades (Figura 51g).

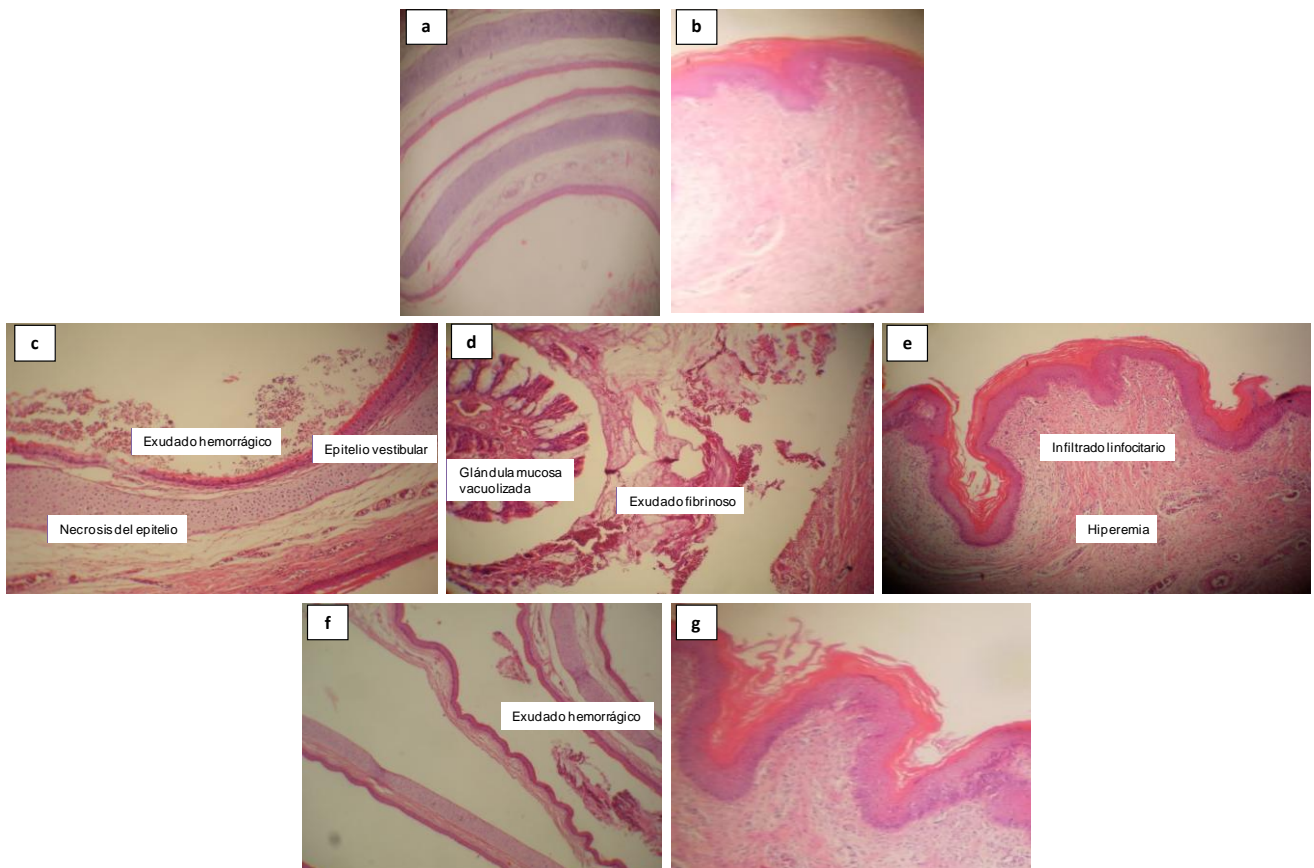


Figura 51. Lesiones histológicas producidas en pollos SPF con diferente estado inmunológico a los 3 dpi con 557/H6N2. Las imágenes representan una muestra de un pollo representativo de cada grupo experimental teñidas con HE. Cavidad nasal y piel de un pollo del grupo 1, 4X (a y b respectivamente); de un pollo del grupo 2, 10X (c-d y e respectivamente); y de un pollo del grupo 3, 10X (f y g respectivamente).

Los epitelios de las tráqueas de los animales del grupo 2 presentaron algunas áreas de necrosis y otras con hiperplasia, además de hiperemia de los vasos sanguíneos en la lámina propia con infiltrado linfocitario (Figura 52b). En cambio, en las tráqueas de las aves del grupo 3 se observaron áreas de metaplasia escamosa (Figura 52c).

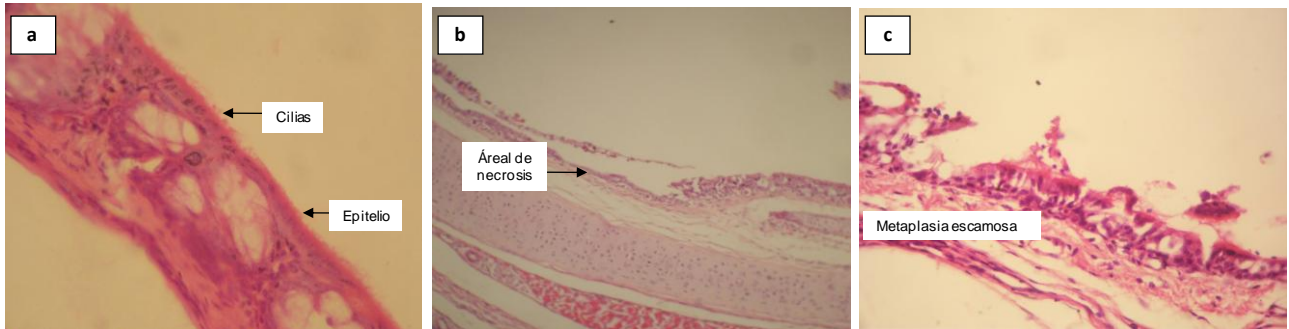


Figura 52. Lesiones histológicas producidas en pollos SPF con diferente estado inmunológico a los 3 dpi con 557/H6N2. Las imágenes representan una muestra de un pollo representativo de cada grupo experimental teñidas con HE. Tráquea de un pollo del grupo 1, 4X (a); de un pollo del grupo 2, 4X (b); y de un pollo del grupo 3, 10X (c).

En la luz del epitelio del esófago de los pollos del grupo 2 y 3 se observó exudado catarral y necrosis de los acinos glandulares (Figuras 53).

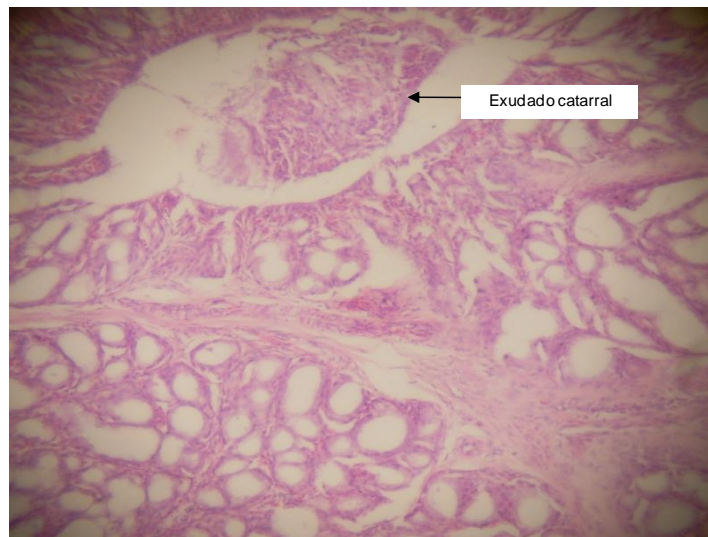


Figura 53. Lesiones histológicas producidas en el esófago de pollos SPF con diferente estado inmunológico a los 3 dpi con 557/H6N2, teñidas con HE, 4X.

En pulmón también se observaron lesiones a los 3 dpi con 557/H6N2. Los parabronquios de los animales del grupo 2 presentaron el epitelio cúbico con áreas de metaplasia escamosa e hiperemia con infiltrado linfocitario severo en el intersticio (Figura 54b). A su vez, en los bronquios secundarios de estos animales se observó una importante hiperemia y en la luz de los mismos un exudado fibrino-

hemorrágico con infiltrado linfocitario (Figura 54c). Por su parte, las aves del grupo 3 presentaron sólo tapones hemorrágicos en pulmón (Figura 54d).

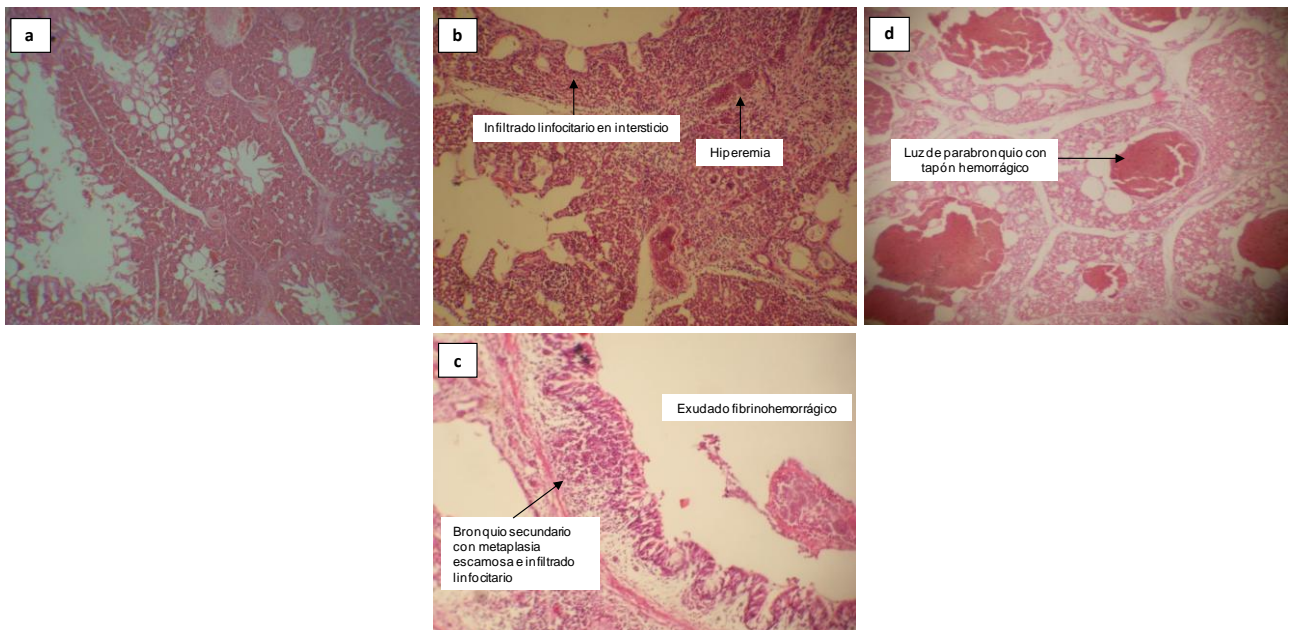


Figura 54. Lesiones histológicas producidas en pollos SPF con diferente estado inmunológico a los 3dpi con 557/H6N2. Las imágenes representan una muestra de un pollo representativo de cada grupo experimental teñidas con HE. Pulmón de un pollo del grupo 1, 4X (a); de un pollo del grupo 2, 10X (b y c); y de un pollo del grupo 3, 4X (d).

Las lesiones en páncreas fueron menos evidentes en el grupo 2, donde un sólo animal presentó una típica pancreatitis intersticial, con focos linfocitarios y de necrosis en el mismo (Figura 55b y 55c). Sin embargo, todas las aves del grupo 3 presentaron este tipo de lesión en páncreas (Figura 55d).

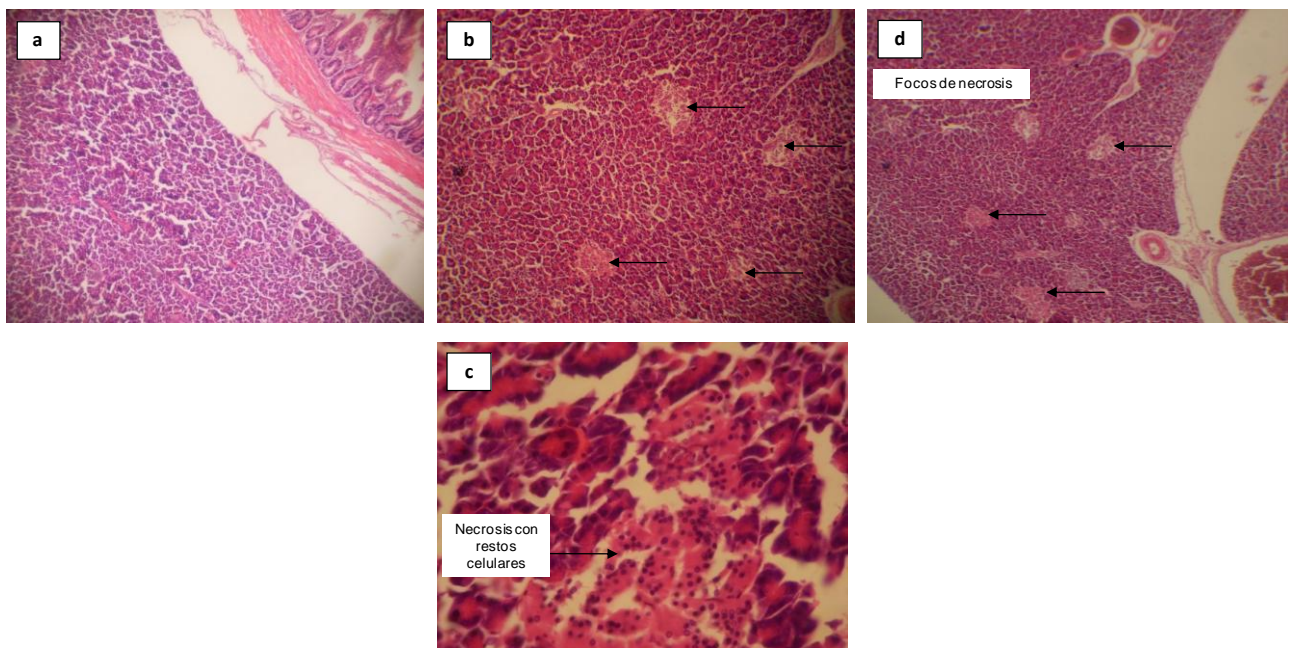


Figura 55. Lesiones histológicas producidas en pollos SPF con diferente estado inmunológico a los 3dpi con 557/H6N2. Las imágenes representan una muestra de un pollo representativo de cada grupo experimental teñidas con HE. Páncreas de un pollo del grupo 1, 4X (a); de un pollo del grupo 2, 10X y 40X (b y c); y de un pollo del grupo 3, 10X (d).

Dos de los cuatro pollos del grupo 2 presentaron bursas normales sin particularidades, mientras que los dos animales restantes presentaron una bursa con disminución de los linfocitos de la corteza e irregularidades de la delimitación entre corteza y médula (score 3). Del mismo modo sólo dos de cuatro aves del grupo 3 presentaron lesiones en la bursa (score 2), las cuales fueron más moderadas que las observadas en el grupo 2 (Figuras 56b).

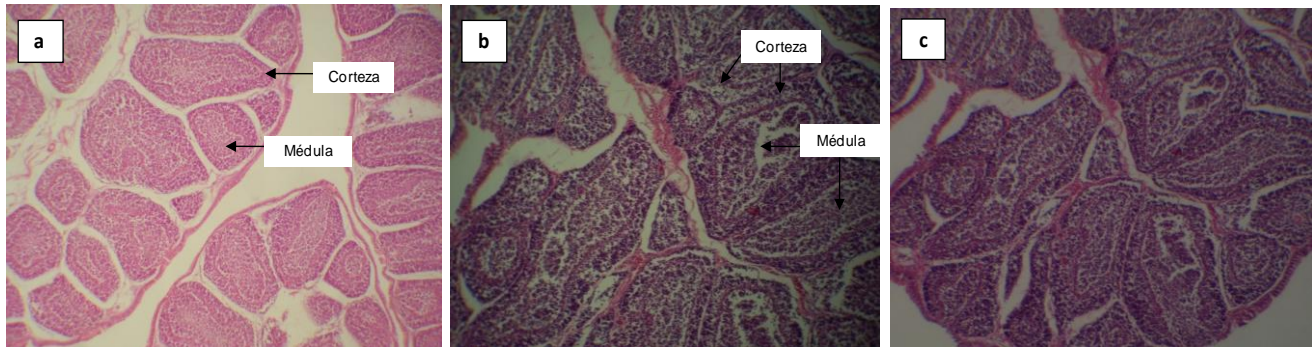


Figura 56. Lesiones histológicas producidas en pollos SPF con diferente estado inmunológico a los 3dpi con 557/H6N2. Las imágenes representan una muestra de un pollo representativo de cada grupo experimental teñidas con HE. Bursa de un pollo del grupo 1, 5X (a); y de un pollo del grupo 2, 10X (b).

Finalmente, se realizó la titulación de los sueros de los animales a los que se les realizó la eutanasia al finalizar el experimento (28 dpi) mediante HI (Tabla 18). Se pudo observar que el título medio de los sueros de los pollos del grupo 3 fue superior al título medio de los pollos del grupo 2 pero sin diferencias significativas. Por otra parte, todos los animales contacto directo se mantuvieron seronegativos a los 13 días post contacto, independientemente del estado inmunológico inicial de los animales infectados.

Virus	Media del título de HI (N° Positivos/N° Totales)	
	Infectados	Contactos Directo
557/H6N2	4/4 (48)	0/3
CAV-10 + 557/H6N2	4/4 (96)	0/3

Tabla 19. Titulación del suero de pollos SPF con diferente estado inmunológico, 14 dpi con 557/H6N2.

## 6. DISCUSIÓN

Los lugares geográficos específicos de muestreo de aves silvestres incluidos en este estudio abarcan gran parte de la orilla del río Paraná y el litoral marítimo argentino [84]. En lo que respecta al muestreo realizado a orillas del río Paraná, éste comprende las provincias de Santa Fe, Entre Ríos y Corrientes. En esta región, particularmente en la provincia de Entre Ríos, se concentra el 70% de la producción avícola de la Argentina, por lo que son áreas consideradas de riesgo potencial para infecciones y brotes por el virus de IA. Por ello, conocer la circulación y las características de los AIV en las aves silvestres que frecuentan esta zona, con una producción avícola intensiva y concentrada, resulta de gran importancia para prevenir la introducción de este agente viral en la población avícola nacional.

Los vastos humedales localizados en estas provincias sirven como reservorios de múltiples poblaciones de especies de aves silvestres acuáticas residentes, en particular de patos (*Netta peposaca*, *Amazonetta brasiliensis*, *Anas versicolor*, entre otros). De octubre a marzo, durante las temporadas australes de primavera y verano, un gran número de *Charadriiformes* migratorias que nidifican en el hemisferio norte utilizan estos humedales como áreas de alimentación o sitios de descanso, interaccionando de esta forma con las poblaciones de aves acuáticas residentes en nuestro país y posibilitando la interacción de los AIV de diferente linaje. Los ecosistemas agrícolas de la Argentina también reciben un número significativo de aves acuáticas migratorias, que nidifican en la Patagonia y arriban a las costas de la provincia de Buenos Aires a fines del verano. La gran extensión del litoral marítimo argentino junto con los extensos humedales de agua dulce de nuestro país que se encuentran interconectados a través de los ríos Paraná y Uruguay, generan una amplia convivencia entre aves residentes y migratorias en las zonas densamente pobladas con aves de corral. Entonces, resulta indispensable contar con medidas de bioseguridad adecuadas, debido a que sin las mismas existe un riesgo de introducción del AIV en los galpones comerciales que podría afectar considerablemente la avicultura de nuestro país.

La implementación de un programa de vigilancia a largo plazo del AIV en las aves silvestres acuáticas de la Argentina permitió, mediante la coordinación de varias instituciones gubernamentales, la obtención de un número importante de muestras con el objetivo de estudiar la presencia del AIV en las aves silvestres en el territorio nacional. A partir del mismo, se obtuvieron un total de veinte LPAIV aislados de aves silvestres en la Argentina. Este estudio permitió, no solo confirmar la circulación del AIV en las aves silvestres de nuestro país, sino también adquirir conocimientos sobre la ecología de este agente en el hemisferio sur. Es importante destacar que, previo a este estudio, la información disponible del AIV en la región era considerablemente escasa con respecto a la información recolectada en el resto

del mundo, donde los programas de vigilancia en aves silvestres, aislamiento y secuenciación de los virus obtenidos son realizados desde hace varias décadas.

En este trabajo de tesis, se reportaron y caracterizaron veinte LPAIV, de diferentes subtipos, aislados de aves silvestres acuáticas en la Argentina: H1N1, H4N2, H4N6 (2), H4N8, H5N3, H6N2 (6), H6N8 (2), H7N7, H7N9, H9N2, H10N7 (2) y H13N9. Como se pudo observar, la mayoría de los aislamientos se obtuvieron de aves de los órdenes *Anseriformes* y *Charadriiformes*, huéspedes naturales del AIV [3].

Los análisis filogenéticos presentados en la presente tesis aportan evidencia suficiente para reafirmar lo propuesto en publicaciones previas del grupo de trabajo, sobre la existencia de un linaje Sudamericano único con probable evolución independiente para todos los segmentos de genes virales que codifican para las proteínas internas [84, 85, 96]. Esta observación se desprende de que estos segmentos están estrechamente relacionados con los AIV aislados previamente en esta región y distanciados filogenéticamente de los AIV provenientes de Norteamérica, Eurasia y Oceanía [84, 85, 96, 101–103]. Dentro de estos genes que codifican para las proteínas internas, fue posible observar la circulación de los alelos A y B del gen NS en los LPAIV aislados. Además, se observó una notable relación entre los genes NP y PA de los AIV aislados en América del Sur y los Virus de Influenza Equina, aportando evidencia suficiente para sostener la hipótesis previamente planteada de la existencia de un posible ancestro en común entre estos virus [85, 104].

Es importante destacar que las secuencias aminoacídicas deducidas de las proteínas virales internas de los AIV aislados en la Argentina tienen una identidad aminoacídica superior al 97% con las secuencias aminoacídicas consenso de virus de IA de aves silvestres de otras regiones del mundo. Estos resultados sugieren que, aunque habría una evolución independiente de los virus de Influenza Aviar en América del Sur, estos comparten una identidad de aminoácidos significativa, coherente con el equilibrio evolutivo de estos virus en el reservorio natural [3].

Por otra parte, los análisis filogenéticos correspondientes a los genes que codifican para las proteínas de superficie HA y NA también evidencian una evolución independiente de los AIV aislados en América del Sur. La mayoría de los genes de glicoproteínas de los AIV aislados en la Argentina agruparon solos o con otras secuencias de genes de AIV obtenidos en América del Sur, y distanciados de las secuencias de virus de otras regiones del mundo.

Los esfuerzos realizados en el pasado, en la vigilancia del AIV en las aves silvestres, han demostrado que la mayoría de los virus de subtipo H13 aislados hasta el momento se han obtenido de diferentes especies de gaviotas [105]. El LPAIV LDC4/H13N9 caracterizado en este estudio fue aislado de una gaviota no migratoria y curiosamente está menos relacionado filogenéticamente con los

virus H13 aislados recientemente en América del Norte o Europa. Su relación más cercana es con un virus H13 aislado de una gaviota en Maryland (EEUU) en el año 1977. Sin embargo, el gen H13 del virus LDC4/H13N9 forma un grupo único con valores de *bootstrap* suficientes para demostrar que estos dos AIV no están directamente ligados. Por lo tanto, se podría sugerir que el gen H13 del AIV aislado en América del Sur podría haber evolucionado de forma independiente de otros virus H13 de otras partes del mundo. De todos modos, sería necesario obtener un mayor número de secuencias de este subtipo para poder analizar en mayor profundidad este fenómeno en la región [84].

Resultados similares se obtuvieron con la secuencia del gen H9 del virus 559/H9N2. El mismo se encuentra separado en una rama dentro del linaje H9.2 que forma con otros 3 virus de IA. Esto indicaría que se ha ido distanciando y puede haber formado un subclado único durante la evolución. Sin embargo, al igual que en el caso anterior, para finalmente corroborar esta tendencia y hacerla aún más evidente serían necesarios más virus de subtipo H9 aislados de América del Sur [96].

Los árboles filogenéticos presentados con secuencias de genes H10 y H5 también sugieren una evolución independiente de estos genes en los LPAIV aislados en la Argentina. Incluso, la baja identidad nucleotídica encontrada con virus aislados en Norteamérica, en el año 1953 y 1987 respectivamente, también aporta evidencia de que estos genes podrían haber ingresado en algún momento en las aves que habitan en la región y luego haber realizado su propia evolución en el hemisferio Sur.

Por otra parte, los resultados presentados sobre el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de los genes HA de subtipo H6 sostienen lo propuesto por Bahl y col. [95] sobre la existencia de dos grandes linajes distintos de genes H6. En particular, algunas secuencias de genes H6 de los AIV aislados en la Argentina formaron un *cluster* con virus únicamente Sudamericanos, mientras que otras tienen más relación con virus Norteamericanos. Por ello, los resultados presentados en esta tesis sugieren la presencia de dos poblaciones de genes H6 independientes en América del Sur y/o la potencialidad para el intercambio de segmentos de genes de superficie entre linajes distintos [85].

El análisis filogenético de los genes H4 se realizó con un número de secuencias considerablemente mayor. Esto se realizó con la finalidad de obtener un árbol evolutivo representativo de todos los genes H4 presentes en la base de datos, debido a que el subtipo H4 es uno de los subtipos de AIV más frecuentemente aislado en patos silvestres. Como se pudo observar, los cuatro AIV aislados en la Argentina agruparon juntos en un único *cluster*, dentro del grupo de AIV Norteamericanos. Además, estos virus mostraron tener una gran identidad nucleotídica con virus aislados recientemente en Norteamérica. En conjunto, estos resultados también aportan evidencia que sostiene lo propuesto en trabajos previamente publicados con parte de los resultados presentados en



esta tesis [85, 96], de que podría haber un intercambio de los genes que codifican para las proteínas de superficie entre virus de distinto linaje y que luego siguen una evolución propia en América del Sur.

Por otra parte, los genes de NA evidencian una evolución mucho más divergente, debido a que el análisis filogenético los agrupa en ramas únicas, completamente separadas de los *clusters* que contienen secuencias del gen NA de linaje Norteamericano y Eurasiático. Estos genes presentaron una identidad nucleotídica relativamente baja con aquellos virus que presentaron mayor homología; sin embargo, para poder proponer conclusiones más robustas son necesarias más secuencias de genes NA de virus de IA aislados en América del Sur.

A principios de 2014, se publicó un trabajo donde se caracterizaron molecularmente 45 AIV aislados de aves silvestres *Anas discors*, las cuales migran todos los años desde Norteamérica hasta el norte de Sudamérica [106]. En el mismo, no se observaron genes de linaje Sudamericano en ninguno de los virus aislados, por lo cual los autores propusieron que el flujo de genes podría estar limitado por barreras geográficas localizadas aún más al sur de donde *Anas discors* realiza las invernadas, como por ejemplo la extensa cuenca del Amazonas que abarca una extensión de 6,2 millones de Km<sup>2</sup> en América del Sur. Por ello, estos autores sugieren que sería necesario realizar vigilancia del AIV en aves silvestres que habitan en las zonas que comprenden el noreste y sudeste del Amazona y en la región donde previamente ha sido detectado el intercambio de genes (este de Perú y oeste de Bolivia [104]).

En concordancia con esto, una publicación posterior de Araujo y col. [107] evidenció la circulación de AIV en aves playeras migratorias del orden *Charadriiformes* (*Arenaria interpres*), las cuales realizan la invernada en el Amazonas brasileiro. El subtipo viral aislado fue H11N9 y los análisis filogenéticos realizados demostraron que ambos genes de HA y NA pertenecían al linaje Norteamericano. A partir de estos resultados, los autores sugieren que esta especie de ave silvestre podría estar colaborando en la circulación de AIV de linaje Norteamericano hacia América del Sur, donde luego podría ocurrir el intercambio de genes entre virus de diferente linaje. Sin embargo, estos autores no han secuenciado los genes internos del virus aislado, lo que sería indispensable para saber si hay posibilidad de que también se produzca el intercambio de genes que codifican para proteínas internas entre virus de linaje Norteamericano y Sudamericano.

Teniendo en cuenta nuestros resultados parecería que los patrones de migración podrían ser los responsables de la evolución independiente de los AIV aislados en territorio nacional. Sin embargo, aunque resulta relativamente sencillo comprender las barreras geográficas significativas que limitarían la mezcla de los virus de linaje Norteamericano y Eurasiático, esas barreras resultan menos obvias entre los virus de América del Norte y América del Sur. Esto se debe a que en el continente americano existen cuatro importantes rutas migratorias, donde las aves silvestres del hemisferio Norte llegan directamente al hemisferio Sur, o realizan una parada en algún punto intermedio donde cohabitan con

aves silvestres que llegan a la Argentina [106]. Sin embargo, existe evidencia de un virus aislado en Bolivia donde uno de sus genes, que codifica para la proteína interna M, agrupó con secuencias de virus Norteamericanos [101, 104]. Por todo lo expuesto, son indispensables más estudios que abarquen más países de América del Sur y mayor número de secuencias, para determinar los límites potenciales entre virus de linaje Norteamericano y Sudamericano y comprender plenamente la ecología de los virus de influenza aviar en el continente americano.

Dentro de los diversos subtipos de AIV aislados en la Argentina, durante el período 2006-2012, el 40% fueron de subtipo H6. Esto evidencia que, en nuestro país, los virus de IA de subtipo H6 se aíslan con mayor frecuencia a partir de aves silvestres, de la misma forma que en el resto del mundo [114, 115]. Es importante mencionar que los AIV H6 han podido cruzar la barrera de especies y han causado brotes en aves de corral en Eurasia, América del Norte y África [116–118], generando grandes gastos económicos para su control y erradicación. Incluso en el sudeste de Asia los AIV H6 han establecido linajes estables que son difíciles de erradicar [119]. A causa de estas evidencias en otras regiones del mundo, y considerando la particularidad genética de los AIV Sudamericanos, la patogenicidad de algunos de los LPAIV H6 aislados en nuestro país fue estudiada en aves de corral. Para ello, se realizó un estudio comparativo de la replicación y transmisión en pollos SPF con cinco AIV argentinos de subtipo H6 y dos virus H6 prototipos, uno de América del Norte y otro de Eurasia [85].

Los resultados obtenidos demostraron que los LPAIV H6 argentinos estudiados tienen capacidad de infectar pollos y de transmitirse por contacto directo, advirtiendo la existencia de un riesgo sanitario potencial frente a la introducción de estos virus en los planteles comerciales. Más allá de estos resultados, no se descarta la posibilidad de que los virus H6 Sudamericanos sigan evolucionando en las aves silvestres, generando cepas más adaptadas a las aves de corral y, en consecuencia, más patogénicas, como ya fue observado con AIV de diferente subtipo en otras regiones del mundo [120, 121]. Por lo tanto, la continua evolución y movimiento de estos virus únicos H6 aislados en Argentina deben ser objeto de estudio continuo en la región.

Por otra parte, los resultados obtenidos con el virus H6 prototipo de Eurasia son similares a los publicados en un estudio previo donde se demostró que el virus W312/H6N1 tiene la capacidad de replicar en pollos pero con una transmisión limitada [122]. Estos resultados son también consistentes con lo observado a partir de la vigilancia a largo plazo del AIV en el sur de China, donde se ha descubierto que los virus tipo W312/H6N1 han establecido un linaje estable en los mercados de aves vivas, especialmente de especies menores como la codorniz, la perdiz chucar y la gallina de Guinea [118]. Es importante mencionar que se encuentra descrito que este virus de IA, aislado

frecuentemente de aves en Asia, posee siete de los ocho genes del HPAIV A/Hong Kong/156/97 (H5N1) [118], con lo cual surge el interrogante de si estos virus H6 tienen la capacidad de cruzar la barrera de especie y transmitirse en mamíferos.

Al estudiar las propiedades antigénicas de los distintos LPAIV H6 utilizados en la presente tesis, se pudo observar que los virus 557/H6N2, 575/H6N8 y 925/H6N2 parecerían comportarse de acuerdo al perfil filogenético observado para el gen H6, donde las cepas 557/H6N2, 575/H6N8 y 925/H6N2 se encuentran más cerca antigénicamente entre sí que con la cepa 1977/H6N2 o la cepa prototipo 206/H6N8.

Entonces, en el presente trabajo de tesis se describe, entre otras cosas, la presencia del virus de IA de subtipo H6N2 y H6N8 aislados de patos silvestres en la Argentina, su patrón evolutivo y su potencial para la infección de aves de corral. Considerando los resultados obtenidos y las evidencias que soportan la idea de que los virus del tipo W312/H6N1 de Asia podrían haber estado involucrados en la génesis del virus de influenza A altamente patogénica H5N1 de 1997 [118], son necesarios aún más estudios para conocer en forma completa la ecología de los AIV de subtipo H6 en América del Sur y para establecer su rango de huéspedes y potencial pandémico.

En nuestro país existe una alta incidencia de CAV dentro de los planteles comerciales [83]; sin embargo, aún se carece de conocimiento acerca de la importancia que puede tener el estado de inmunosupresión provocado por este agente infeccioso en la evolución de la patogenia del AIV. Para intentar responder este interrogante, se decidió estudiar la replicación y transmisión del LPAIV 557/H6N2 aislado en la Argentina en pollos inmunocompetentes e inmunosuprimidos por la infección previa con una cepa autóctona de CAV. Con este objetivo, se estudió la inmunosupresión subclínica generada en pollos SPF por la infección con cepas autóctonas de CAV y se determinaron los parámetros a medir para corroborar este estado inmunológico.

Los estudios realizados permitieron desarrollar una inmunosupresión subclínica en pollos SPF de 14 días de edad, del mismo modo que lo han realizado otros autores con cepas de CAV de referencia [108, 109]. Además, fue posible caracterizar el daño histopatológico e inmunológico producido por dos aislamientos autóctonos de CAV a un determinado tiempo post infección, información que se desconocía previo al trabajo presentado en esta tesis [97].

Para ello, en una primera instancia se evaluaron las lesiones características producidas en el timo como consecuencia de la infección con CAV a diferentes tiempos post infección. Esto permitió determinar, en ausencia de signos clínicos compatible con la enfermedad, los 14 días como el tiempo post infección donde se produce mayor reducción de la relación peso timo/peso corporal dentro de los tiempos analizados. Asimismo, se observaron lesiones histopatológicas en el timo de los animales

infectados como consecuencia de la depleción de timocitos. Estos resultados coincidieron con la inmunosupresión subclínica descrita por varios autores luego de la infección con cepas de CAV de referencia, donde se produce el pico de depleción de linfocitos a los 14 dpi con una recuperación a valores normales a los 28 dpi [78, 79].

Luego, se realizó un experimento comparativo de la infección subclínica producida por las cepas CAV-10 y CAV-18 [97], las cuales mostraron generar mayor daño histopatológico en timo y bursa que otras cepas de CAV evaluadas (CAV-08 y CAV-135).

La secuenciación del genoma completo de CAV-10 y CAV-18 mostró algunas similitudes, como así también algunas diferencias, entre ambos virus.

Con respecto a las similitudes encontradas entre los virus de CAV, se pudo observar que ambas cepas presentaron una delección de 21 nucleótidos en la zona no codificante. Esta región estuvo asociada a una mejor eficiencia de las cepas de CAV que la contenían para replicar en cultivos de células MDCC-MSB1 [110]. Sin embargo, trabajos previos afirman que la contribución de esta región a la atenuación o patogenicidad de CAV en los pollos sigue siendo discutible [111]. Además de la delección, la secuenciación del genoma de CAV-10 y CAV-18 confirmó que ambos virus presentan las mutaciones en la región hipervariable de VP1 que estarían asociadas a una menor replicación, y en consecuencia menor dispersión, de los virus en la línea celular MDCC-MSB1 respecto de la cepa Cux -1 [100]. Sin embargo, estos autores no pudieron demostrar que las diferencias en esta región de la VP1 estuviesen asociadas a diferencias en la patogenia. Meehan y col. [111] han demostrado que esta región no contribuye de manera significativa a la patogenicidad de CAV en comparación con otras regiones del genoma; y que serían las alteraciones en más de una de las tres proteínas de CAV, así como en la región no codificante, las que podrían influir en la patogenicidad de CAV en las aves de corral.

Las diferencias entre CAV-10 y CAV-18 fueron 14 nucleótidos, 3 en la región no codificante y el resto en el ORF1. A pesar de las once diferencias de nucleótidos observadas a lo largo de la VP1, sólo dos sustituciones de aminoácidos deducidos se observaron en el virus CAV-10 respecto del virus CAV-18. Hasta la fecha, no hay estudios que expliquen el rol potencial o la forma en que estas diferencias pueden influir en la patogénesis de CAV en los pollos. Por ello, los resultados presentados en este trabajo de tesis podrían ser un primer enfoque para evaluar estas diferencias de aminoácidos en la VP1 *in vivo*, más aún considerando las pocas variaciones de nucleótidos entre CAV-10 y CAV-18 observada sólo en la región no codificante. Sin embargo, con las condiciones experimentales utilizadas en la presente tesis no podemos garantizar que la dosis administrada en los pollos de cada aislamiento de CAV sea la misma. Por lo tanto, sería necesario realizar más estudios para poder calcular los títulos infectivos *in vitro* de las cepas de campo de CAV utilizadas, para luego poder asociar las diferencias genómicas entre las cepas de CAV argentinas con diferencias en la patogenicidad.

Durante todo el experimento los pollos infectados con CAV-10 o CAV-18 no presentaron signos clínicos de la enfermedad. Sin embargo, ambos grupos inoculados con las cepas autóctonas de CAV experimentaron una reducción significativa de relación peso timo/peso corporal (CAV-10 produjo una reducción significativamente mayor que CAV-18) y a una importante reducción de timocitos a los 14 dpi con respecto al grupo control negativo ( $p < 0,05$ ). Estos resultados confirmaron que ambos aislamientos de campo producen una infección subclínica en aves de 2 semanas de edad.

Además, los pollos infectados con CAV-10 también mostraron lesiones histopatológicas en el timo y la bursa compatibles con la infección subclínica reportada previamente por Haridy y col.[109]. Es importante mencionar que estos autores infectaron animales por vía intramuscular utilizando un aislamiento al que se le realizaron 10 pasajes sucesivos en las células MDCC-MSB1 [112], donde se podrían haber introducido mutaciones en el genoma. Por el contrario, las gallinas infectadas con CAV-18 no presentaron cambios morfológicos evidentes en los órganos evaluados. Esto podría sugerir que la alteración de la funcionalidad no fue muy fuerte o que su curso se produjo en un tiempo muy corto en este grupo experimental y, en consecuencia, los cambios morfológicos no pudieron ser observados en el estudio histopatológico.

Los análisis de los timocitos por citometría de flujo, correspondiente a pollos inoculados con CAV o PBS, sugieren que las cepas de CAV argentinas alteran el proceso normal de maduración de timocitos a los 14 dpi.

La variación más evidente observada fue la reducción de los timocitos DP luego de la inoculación con CAV. Los mismos son células DP inmaduras que no fueron sometidas aún a la selección positiva y negativa, evento esencial durante la ontogenia de los linfocitos T en timo. Resultados similares fueron publicados por Vaziry y col. (21) y Hu y col. (20), quienes evaluaron las lesiones producidas en pollitos de 1 día de edad frente a la infección con la cepa de referencia CIA-1. Además, nuestros resultados demuestran que existen claramente diferentes etapas de maduración de las células DP durante la timopoyesis en el timo, y que algunas de estas etapas podrían estar alteradas luego de la infección con CAV. Se pudo observar que los timocitos DP con mayor expresión de CD8 $\alpha$  disminuyeron significativamente después de la infección con CAV, mientras que los timocitos DP con mayor expresión de CD4 aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ). Estos cambios evidentes en los porcentajes de timocitos DP con diferentes patrones de expresión superficial de las moléculas CD4 y CD8 $\alpha$  aportarían evidencia que sugiere que los virus utilizados en este trabajo podrían estar alterando la timopoyesis. Incluso, en las condiciones experimentales utilizadas en la presente tesis, CAV-10 produce una alteración de la maduración de los timocitos significativamente mayor que la producida por CAV-18 a los 14 dpi.

Por el contrario, la reducción en el número total de linfocitos observada en los timos de los pollos inoculados con CAV, la ausencia de cambios significativos en el número de timocitos CD4+CD8 $\alpha$ - y la ligera disminución de las células CD4-CD8 $\alpha$ + observadas después del análisis por citometría de flujo realizado en las poblaciones de timocitos, añaden evidencia que sugiere que no hay reclutamiento de linfocitos maduros hacia el timo a los 14 dpi con las cepas de CAV utilizadas. Estos resultados están en concordancia con las observaciones publicadas por Vaziry y col. [81], donde se realizó una infección subclínica con una cepa vacunal.

Por último, debido a la falta de consenso en la subpoblaciones de esplenocitos afectadas por la infección con CAV, los porcentajes de las mismas fueron analizadas por citometría de flujo. Se pudo observar que no hubo diferencias en los porcentajes de células DP maduras y de LTh luego de la infección con las cepas de CAV argentinas, similar a los resultados publicados previamente por otros autores con la cepa vacunal CIA-1 [81]. Sin embargo, en nuestra infección experimental, las células T citotóxicas se redujeron significativamente en los bazo de los pollos inoculados con CAV-10. Por otra parte, la marcación de CD3, CD8 $\alpha$  y CD8 $\beta$  permitió discriminar entre los subconjuntos de esplenocitos CD8+ (CD8 $\alpha\alpha$  o CD8 $\alpha\beta$ ) que fueron afectados por la infección con CAV. Si bien nuestros resultados no mostraron diferencias en las células CD8 $\alpha\alpha$ , sí se observó una reducción significativa en el porcentaje de la subpoblación CD8 $\alpha\beta$  sólo en las aves inoculadas con CAV-10. Adair y col. [113] han demostrado la presencia de linfocitos T maduros infectados con CAV en el bazo a los 6 dpi, aunque el número de células infectadas, como una proporción del número total registrado, fue mucho menor que en el timo o la médula ósea. Entonces nuestro resultado, donde se observó una disminución significativa de los linfocitos esplénicos CD8 $\alpha\beta$  a los 14 dpi, podría ser la consecuencia de la gran cantidad de esplenocitos infectados por CAV reportados por Adair y col. en un tiempo post infección anterior. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la cepa CAV-10 afecta las subpoblaciones de linfocitos T esplénicos por una reducción del subconjunto CD8 $\alpha\beta$  y, en consecuencia, esto podría alterar la respuesta inmune del huésped contra otros agentes infecciosos secundarios.

Los resultados obtenidos sugieren que, bajo nuestras condiciones experimentales, habría diferencias en el comportamiento *in vivo* de la cepa CAV-10 respecto de la cepa CAV-18, al menos a los 14 dpi en pollos SPF de 2 semanas de edad. Podríamos concluir que la cepa CAV-10 produce una inmunocupresión subclínica mayor que la cepa CAV-18 y por ello el virus CAV-10 fue elegido para realizar los ensayos posteriores de patogenicidad de LPAIV en pollos SPF con diferente estado inmunológico. De todos modos, deberían hacerse más estudios para determinar, en primer lugar, el título viral de estas cepas de CAV argentinas y luego, para asociar los cambios a nivel nucleotídico y aminoacídico en la VP1 y/o en la región no codificante con la patogenicidad diferencial en pollos SPF.

Según los resultados presentados en el presente trabajo de tesis, los pollos inmunosuprimidos por la infección con CAV-10 presentan mayor replicación del LPAIV 557/H6N2 en tráquea al 1 dpi respecto de los animales inmunocompetentes ( $p < 0,05$ ). Este resultado sugiere que la diferencia en la replicación viral en tráquea a este tiempo post infección podría deberse al diferente estado inmunológico de las aves estudiadas. Sin embargo, en los otros tiempos post infección analizados (3 dpi, 5 dpi y 7 dpi) no hubo diferencias en la replicación viral que puedan atribuirse al estado inmunológico de los animales infectados. Del mismo modo, la invasión, replicación y daño histológico de 557/H6N2 observado en cerebro, cavidad nasal, pulmón, bazo, páncreas, duodeno, riñón, bursa y tonsila cecal fue similar en los grupos con diferente estado inmunológico. Sólo en pulmón de aves inmunocompetentes infectadas con AIV se observó un título de ARN viral significativamente mayor con respecto al grupo control negativo, pero sin diferencias significativas con el grupo de aves inmunosuprimidas con CAV-10. En conjunto, estos resultados sugieren que el estado de inmunosupresión provocado por CAV-10, y en las condiciones experimentales utilizadas en el presente trabajo de tesis, afectaría la replicación del virus 557/H6N2 en tráquea al primer dpi pero no su virulencia.

El ensayo de HI nos permitió observar que todos los animales infectados con 557/H6N2 seroconvirtieron a los 14 dpi y sin diferencias significativas en la media del título de anticuerpos entre los grupos experimentales. Este resultado sugiere que la inmunosupresión generada con CAV-10 no modificaría la producción de anticuerpos neutralizantes de la HA, lo cual se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos, y recién mencionados, de invasión y replicación viral.

Por otra parte, si bien con el ensayo de HI realizado pareciera que no hubo transmisión del virus de influenza hacia los animales contacto directo en ninguno de los grupos experimentales, la replicación viral observada en tráquea y cloaca a los 3 dpi en los animales contacto directo aportaría evidencia de que hubo transmisión. Además, considerando que los animales centinela estuvieron sólo 13 días en contacto directo con las aves infectadas y que el virus 557/H6N2 se transmitió en ensayos previos con diferente diseño experimental [85], no podríamos afirmar que no se produjo transmisión por contacto directo entre las aves. Quizás el analizar serológicamente los animales contacto directo en tiempos post infección posteriores podrían dar evidencia de seroconversión.

En la bibliografía existen diversos trabajos donde se demuestra, ya sea en forma experimental o de casos a campo, que la inmunosupresión generada por la infección con CAV genera un aumento en la patogenia de otros agentes oportunistas secundarios [71, 123–125]. Incluso, esto también ha sido observado con otros circovirus, como el circovirus porcino [126, 127]. De todos modos, no existe al día de hoy bibliografía que evalúe el efecto de la inmunosupresión generada por la infección con CAV en la

patogenia del AIV, aunque algunas cepas virales de IA sí han sido previamente evaluadas en coinfecciones con otros agentes infecciosos inmunosupresores [128, 129].

Desde el año 1996 los LPAIV de subtipo H9N2 han sido endémicos en las granjas avícolas de Corea del Sur, causando una mortalidad leve a moderada (5-30%) con ciertos signos clínicos entre los que se encuentran depresión, edema de la cabeza, cianosis en cresta y patas y caída de la producción de huevos [130]. Sin embargo, estos virus de subtipo H9N2 aislados de pollos domésticos no inducen signos clínicos de enfermedad ni mortalidad cuando son inoculados en pollos SPF [131]. Incluso, actualmente no está claro porque estos LPAIV inducen una mortalidad relativamente elevada en aves comerciales cuando se presume que sólo los HPAIV pueden causar una infección sistémica y la muerte en pollos. Por ello, Kwon y col. [128] han estudiado el rol de la inmunidad mediada por células T en la patogenia del LPAIV A/Chicken/HS/K5/01 (H9N2), utilizando pollos SPF inmunosuprimidos por el tratamiento con Ciclosporina A (CsA), droga inmunosupresora que inducen selectivamente una deficiencia en las células T.

Estos autores detectaron excreción viral en los hisopados de orofaringe y cloaca a todos los tiempos post infección analizados (2, 3, 5 y 7 dpi), tanto en los animales inmunocompetentes como en los inmunosuprimidos con CsA. Si bien el grupo de pollos inmunosuprimidos mostró siempre un título viral mayor que las aves inmunocompetentes, este aumento fue estadísticamente significativo solamente en los hisopados cloacales obtenidos a los 5 dpi. Estos resultados tienen algunas similitudes y otras diferencias con los obtenidos en nuestro trabajo. Por un lado, en la presente tesis también se pudo observar excreción viral tanto en los pollos inmunocompetentes como en los inmunosuprimidos con CAV-10, también con un aumento significativamente mayor en los animales inmunosuprimidos. Entre las diferencias observadas se puede mencionar que la excreción viral se detectó sólo en tráquea y al día 1 y 3 pi, mientras que a los 5 y 7 dpi no se observó excreción viral en ninguno de los grupos experimentales.

En el trabajo publicado por Kwon y col. [128] también se evaluó la invasión y replicación del LPAIV en pollos con diferente estado inmunológico como se hizo en el presente trabajo de tesis. En general en este punto se obtuvieron resultados similares, debido a que ellos tampoco encontraron diferencias significativas ni en la detección viral ni en el título viral obtenido en los diferentes órganos entre los grupos experimentales. Es importante mencionar que estos autores detectaron virus H9N2 en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) sólo en los animales inmunosuprimidos con CsA, demostrando la circulación de altos títulos de carga viral en los pollos inmunocomprometidos. Por otra parte, estos autores también realizaron un estudio histopatológico de todos los órganos muestreados. A pesar de que las lesiones histopatológicas observadas por Kwon y col. [128] estuvieron limitadas a unos pocos pollos, en las aves del grupo inmunosuprimido con CsA se encontró una atrofia



severa en los folículos y fibrosis en la bursa de fabricio, una atrofia difusa en la corteza del timo y una severa necrosis tubular en los riñones. Estos resultados no coinciden con lo observado en nuestra infección experimental, debido a que las lesiones histopatológicas observadas por la infección con 557/H6N2 en animales inmunosuprimidos por la infección con CAV-10 fueron siempre similares, o incluso menos severas, que las obtenidas en los pollos inmunocompetentes o las detalladas por Kwon y col. [128].

En conjunto, los resultados obtenidos por Kwon y col. sugieren que la respuesta inmune mediada por células T en los pollos es importante para realizar el *clearance* viral [128]. Esto podría explicar, en parte, la mayor mortalidad observada en pollos de granjas comerciales frente a la infección con el LPAIV H9N2 que no se observa en infecciones experimentales en pollos SPF [131]. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis no nos permiten proponer las mismas conclusiones, debido a que la inmunosupresión generada por CAV-10 en pollos de 2 semanas de edad no evidencia alteraciones significativas en la patogenia del LPAIV 557/H6N2 con respecto a la producida por este virus en aves inmunocompetentes.

Un factor importante a considerar para comprender las diferencias observadas es que el virus 557/H6N2 utilizado en este trabajo de tesis se aisló de un ave acuática silvestre, huésped natural del AIV. En cambio, el LPAIV A/Chicken/HS/K5/01 (H9N2) utilizado en el trabajo de Kwon y col. [128] se aisló de aves de corral con signología compatible con la infección con influenza. Por lo tanto, este virus H9N2 debe ser un virus mucho más adaptado a la especie *Gallus gallus* que el virus 557/H6N2 y, en consecuencia, su replicación puede verse favorecida en el modelo animal utilizado. Por otro lado, en nuestro diseño experimental se realizó una inmunosupresión subclínica inoculando una cantidad determinada de copias de ADN de CAV en pollos de 2 semanas de edad, mientras que en el trabajo de Kwon y col. [128] la inmunosupresión generada se realizó con 100mg/kg de peso corporal de CsA cada 3 días, con 4 dosis previo al desafío con AIV y 4 dosis posteriores al mismo. Entonces, podríamos pensar que el efecto inmunosupresor de la CsA no es comparable con el efecto producido por una sola infección con CAV-10. Se deberían realizar más estudios para determinar si la inmunosupresión generada en el trabajo de Kwon y col. [128], con una sustancia química, es similar o más aguda que la producida en el presente trabajo de tesis, donde se intentó emular lo que pudiera ocurrir frente a la introducción del AIV en una granja con aves de corral inmunosuprimidas con CAV.

Finalmente, es importante mencionar que en el presente trabajo se eligieron los 14 dpi con CAV como el momento post infección que produjo una mayor inmunosupresión dentro de los tiempos evaluados (7, 14, 21 y 28 dpi). De todos modos, deberían realizarse más estudios para conocer en detalle la cinética de inmunosupresión generada por CAV-10 entre los 8 y 20 dpi, para de esta forma

poder asegurar que se está realizando la coinfección con AIV en el verdadero pico de inmunosupresión del ave. Siguiendo la lógica de esta misma propuesta, se debería también estudiar con mayor certeza cuál sería el momento más indicado para realizar la coinfección con AIV en pollos inmunosuprimidos.

En conclusión, con todos los resultados obtenidos en la presente tesis podemos afirmar que existe circulación de LPAIV de diferentes subtipos en las aves silvestres presentes en la Argentina. Estos virus de IA tienen características genéticas particulares en sus genes que los diferencian de los AIV aislados en otras regiones. En particular, a partir de este trabajo de tesis se evidencia la existencia de un linaje Sudamericano con evolución independiente para los seis genes que codifican para las proteínas internas del Virus de Influenza Aviar. Por otra parte, la mayoría de los AIV aislados fueron de subtipo H6 por lo que se decidió estudiar su patogenicidad en aves de corral. Los resultados demostraron que estos virus de subtipo H6 tienen capacidad de infectar pollos y de transmitirse por contacto directo, evidenciando el riesgo potencial de introducción de estos virus en las aves de corral. Finalmente, para ahondar aún más en las consecuencias que podría tener para la avicultura nacional la introducción de los LPAIV de subtipo H6 en los galpones comerciales, se realizó un estudio de patogenicidad en pollo con diferentes estado inmunológico. Los resultados obtenidos sugieren que el virus utilizado, aislado de aves silvestres en la Argentina, no tendría mayor virulencia en aves de corral inmunosuprimidas con cepas autóctonas de CAV.

## 7. CONCLUSIONES

A partir de las muestras de hisopados cloacales analizados durante el período 2006-2012 fue posible aislar veinte LPAIV de diversos subtipos, confirmando la circulación del Virus de Influenza Aviar en las aves silvestres que habitan en la Argentina.

El análisis filogenético de cada uno de los genes internos de los LPAIV aislados demostró que existe una estrecha relación entre los AIV de América del Sur, formando siempre un *cluster* único con evolución independiente. Estos resultados aportan evidencia suficiente para asegurar la existencia de un linaje Sudamericano en los Virus de Influenza Aviar, distanciado filogenéticamente del linaje Norteamericano y Eurasiático.

Existe circulación de los alelos A y B del gen NS en los AIV Sudamericanos y un ancestro en común entre los genes NP y PA de los AIV Sudamericanos y los respectivos de los Virus de Influenza Equina.

En general, los análisis filogenéticos de los genes de superficie, HA y NA, también formaron un *cluster* único que se diferencia de los virus de América del Norte y Eurasia; sin embargo, algunos genes de HA y NA mostraron estar estrechamente relacionados con virus de América del Norte, evidenciando una posible interacción entre los virus de América del Norte y América del Sur.

Ciertas cepas autóctonas de CAV son capaces de desarrollar una inmunosupresión subclínica en pollos SPF de 2 semanas de edad.

Los estudios en animales sugieren que los LPAIV de subtipo H6 aislados en la Argentina tienen una capacidad limitada para replicar y transmitirse en pollos SPF, y que cambios moleculares adicionales serían necesarios para estos virus puedan replicar y transmitirse eficientemente en aves de corral.

La inmunosupresión subclínica, generada por la infección con una cepa autóctona de CAV en pollos SPF de 2 semanas de edad, permite una excreción mayor del LPAIV de subtipo H6 aislado en la Argentina en tráquea al primer día post infección, pero no modifica la invasión y replicación de los LPAIV de subtipo H6 aislados en nuestro país con respecto a la observada en pollos SPF inmunocompetentes.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Fields virology** [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101601028>]
2. Fouchier RAM, Munster VJ: **Epidemiology of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds.** *Rev Sci Tech* 2009, **28**:49–58.
3. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y: **Evolution and ecology of influenza A viruses.** *Microbiol Rev* 1992, **56**:152–79.
4. Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, Murti KG: **Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks.** *Virology* 1978, **84**:268–78.
5. Webster RG, Hinshaw VS, Bean WJ, Turner B, Shortridge KF: **Influenza viruses from avian and porcine sources and their possible role in the origin of human pandemic strains.** *Dev Biol Stand* , **39**:461–8.
6. Kida H, Yanagawa R, Matsuoka Y: **Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response.** *Infect Immun* 1980, **30**:547–53.
7. Hinshaw VS, Webster RG, Turner B: **The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl.** *Can J Microbiol* 1980, **26**:622–9.
8. *Diseases of Poultry.* John Wiley & Sons; 2013:1408.
9. **2011: OIE - World Organisation for Animal Health.**
10. Bourmakina S V, García-Sastre A: **Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus.** *J Gen Virol* 2003, **84**(Pt 3):517–27.
11. CHU CM, DAWSON IM, ELFORD WJ: **Filamentous forms associated with newly isolated influenza virus.** *Lancet* 1949, **1**:602.
12. Elleman CJ, Barclay WS: **The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus.** *Virology* 2004, **321**:144–53.
13. Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng RH, Kawaoka Y: **Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles.** *Nature* 2006, **439**:490–2.
14. Ruigrok RW, Barge A, Durrer P, Brunner J, Ma K, Whittaker GR: **Membrane interaction of influenza virus M1 protein.** *Virology* 2000, **267**:289–98.
15. Ruigrok RWH, Calder LJ, Wharton SA: **Electron microscopy of the influenza virus submembranal structure.** *Virology* 1989, **173**:311–316.
16. Duesberg PH: **Distinct subunits of the ribonucleoprotein of influenza virus.** *J Mol Biol* 1969, **42**:485–499.

17. Compans RW, Content J, Duesberg PH: **Structure of the Ribonucleoprotein of Influenza Virus.** *J Virol* 1972, **10**:795–800.
18. Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y: **Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions.** *J Virol* 2005, **79**:3766–74.
19. Richardson JC, Akkina RK: **NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells.** *Arch Virol* 1991, **116**:69–80.
20. Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW: **A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death.** *Nat Med* 2001, **7**:1306–12.
21. Cros JF, García-Sastre A, Palese P: **An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein.** *Traffic* 2005, **6**:205–13.
22. O'Neill RE, Jaskunas R, Blobel G, Palese P, Moroianu J: **Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import.** *J Biol Chem* 1995, **270**:22701–4.
23. Luo C, Nobusawa E, Nakajima K: **An analysis of the role of neuraminidase in the receptor-binding activity of influenza B virus: the inhibitory effect of Zanamivir on haemadsorption.** *J Gen Virol* 1999, **80** ( Pt 11):2969–76.
24. Gómez-Puertas P, Albo C, Pérez-Pastrana E, Vivo A, Portela A: **Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding.** *J Virol* 2000, **74**:11538–47.
25. Bui M, Wills EG, Helenius A, Whittaker GR: **Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins.** *J Virol* 2000, **74**:1781–6.
26. Martin K, Helenius A: **Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import.** *Cell* 1991, **67**:117–30.
27. Wang W, Krug RM: **The RNA-binding and effector domains of the viral NS1 protein are conserved to different extents among influenza A and B viruses.** *Virology* 1996, **223**:41–50.
28. Wang X, Li M, Zheng H, Muster T, Palese P, Beg AA, García-Sastre A: **Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon.** *J Virol* 2000, **74**:11566–73.
29. Ludwig S, Wang X, Ehrhardt C, Zheng H, Donelan N, Planz O, Pleschka S, García-Sastre A, Heins G, Wolff T: **The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors.** *J Virol* 2002, **76**:11166–71.
30. O'Neill RE, Talon J, Palese P: **The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins.** *EMBO J* 1998, **17**:288–96.
31. Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y: **Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1.** *EMBO J* 2000, **19**:6751–8.

32. Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC: **Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates.** *Virology* 1994, **205**:17–23.
33. Van Riel D, Munster VJ, de Wit E, Rimmelzwaan GF, Fouchier RAM, Osterhaus ADME, Kuiken T: **Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals.** *Am J Pathol* 2007, **171**:1215–23.
34. Gambaryan AS, Robertson JS, Matrosovich MN: **Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses.** *Virology* 1999, **258**:232–9.
35. Mochalova L, Gambaryan A, Romanova J, Tuzikov A, Chinarev A, Katinger D, Katinger H, Egorov A, Bovin N: **Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken embryonated eggs.** *Virology* 2003, **313**:473–80.
36. Matlin KS, Reggio H, Helenius A, Simons K: **Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line.** *J Cell Biol* 1981, **91**(3 Pt 1):601–13.
37. Sieczkarski SB, Whittaker GR: **Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis.** *J Virol* 2002, **76**:10455–64.
38. Stegmann T, Morselt HW, Scholma J, Wilschut J: **Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching.** *Biochim Biophys Acta* 1987, **904**:165–70.
39. Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA: **Influenza virus M2 protein has ion channel activity.** *Cell* 1992, **69**:517–28.
40. Zhirnov OP, Grigoriev VB: **Disassembly of influenza C viruses, distinct from that of influenza A and B viruses requires neutral-alkaline pH.** *Virology* 1994, **200**:284–91.
41. Jones IM, Reay PA, Philpott KL: **Nuclear location of all three influenza polymerase proteins and a nuclear signal in polymerase PB2.** *EMBO J* 1986, **5**:2371–6.
42. Nieto A, de la Luna S, Bárcena J, Portela A, Ortín J: **Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit.** *J Gen Virol* 1994, **75** ( Pt 1):29–36.
43. Neumann G, Brownlee GG, Fodor E, Kawaoka Y: **Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2004, **283**:121–43.
44. Nayak DP, Hui EK-W, Barman S: **Assembly and budding of influenza virus.** *Virus Res* 2004, **106**:147–65.
45. Morales AC, Hilt D a, Williams SM, Pantin-Jackwood MJ, Suarez DL, Spackman E, Stallknecht DE, Jackwood MW: **Biologic characterization of H4, H6, and H9 type low pathogenicity avian influenza viruses from wild birds in chickens and turkeys.** *Avian Dis* 2009, **53**:552–62.

46. Zhu X, Yu W, McBride R, Li Y, Chen L-M, Donis RO, Tong S, Paulson JC, Wilson I a: **Hemagglutinin homologue from H17N10 bat influenza virus exhibits divergent receptor-binding and pH-dependent fusion activities.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:1458–63.
47. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen L-M, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson I a, Donis RO: **New world bats harbor diverse influenza A viruses.** *PLoS Pathog* 2013, **9**:e1003657.
48. Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenström J, Osterhaus ADME, Fouchier RAM: **Global patterns of influenza a virus in wild birds.** *Science* 2006, **312**:384–8.
49. Alexander DJ: **A review of avian influenza in different bird species.** *Vet Microbiol* 2000, **74**:3–13.
50. Webster RG, Kawaoka Y, Bean WJ: **What is the potential of avirulent influenza viruses to complement a cleavable hemagglutinin and generate virulent strains?** *Virology* 1989, **171**:484–92.
51. Hirst M, Astell CR, Griffith M, Coughlin SM, Moksa M, Zeng T, Smailus DE, Holt RA, Jones S, Marra MA, Petric M, Kraiden M, Lawrence D, Mak A, Chow R, Skowronski DM, Tweed SA, Goh S, Brunham RC, Robinson J, Bowes V, Sojonky K, Byrne SK, Li Y, Kobasa D, Booth T, Paetzl M: **Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia.** *Emerg Infect Dis* 2004, **10**:2192–5.
52. McLeod A, Guerne-Bleich E: **Social, economic and policy issues in the long-term control of HPAI.** In *Dev Biol (Basel). Volume 124*; 2006:171–176.
53. Capua I, Alexander DJ: **Avian influenza infections in birds--a moving target.** *Influenza Other Respi Viruses* 2007, **1**:11–8.
54. Sims LD, Ellis TM, Liu KK, Dyrting K, Wong H, Peiris M, Guan Y, Shortridge KF: **Avian influenza in Hong Kong 1997-2002.** *Avian Dis* 2003, **47**(3 Suppl):832–8.
55. Sims LD: **Lessons learned from Asian H5N1 outbreak control.** *Avian Dis* 2007, **51**(1 Suppl):174–81.
56. **Economics of Avian Influenza: Control vs Noncontrol**  
[<http://www.jstor.org/discover/10.2307/3298775?uid=373328161&uid=3737512&uid=2134&uid=26647&uid=5911656&uid=2&uid=70&uid=3&uid=67&uid=62&sid=21103828594561>]
57. Capua I, Marangon S, Cordioli P, Bonfanti L, Santucci U: **H7N3 avian influenza in Italy.** *Vet Rec* 2002, **151**:743–4.
58. Brown C, Bolin C: **Emerging Diseases of Animals.** 2000.
59. **Handbook of Zoonoses, Second Edition, Section B - CRC Press Book**  
[<http://www.crcpress.com/product/isbn/9780849332067>]
60. Scholtissek C, Naylor E: **Fish farming and influenza pandemics.** *Nature* 1988, **331**:215.

61. **Aves de corral y sanidad animal ::: FAO División de Producción y Sanidad Animal**  
[[http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/poultry/animal\\_health.html](http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/poultry/animal_health.html)]
62. **SENASA - Dirección Nacional de Sanidad Animal**  
[<http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=865&io=3247>]
63. Shane Simon: **Global poultry diseases update – avian influenza overshadowing erosive diseases.** *World Poult* 2004;21: 22–23.
64. Miller MM, Schat KA, Schat KAA: **Chicken Infectious Anemia Virus : An Example of the Ultimate Host – Parasite Relationship Invited Minireview — Chicken Infectious Anemia Virus : An Example of the Ultimate Host – Parasite Relationship.** 2004, **48**:734–745.
65. McNulty MS: **Chicken anaemia agent: a review.** *Avian Pathol* 1991, **20**:187–203.
66. Markowski-Grimsrud CJ, Schat K a: **Infection with chicken anaemia virus impairs the generation of pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes.** *Immunology* 2003, **109**:283–94.
67. Goryo M, Shibata Y, Suwa T, Umemura T, Itakura C: **Outbreak of anemia associated with chicken anemia agent in young chicks.** *Nihon Juigaku Zasshi* 1987, **49**:867–73.
68. Randall CJ, Siller WG, Wallis AS, Kirkpatrick KS: **Multiple infections in young broilers.** *Vet Rec* 1984, **114**:270–1.
69. Toro H, Ramirez AM, Larenas J: **Pathogenicity of chicken anaemia virus (isolate 10343) for young and older chickens.** *Avian Pathol* 1997, **26**:485–99.
70. Engstrom BE, Fossum O, Luthman M: **Blue wing disease of chickens: experimental infection with a Swedish isolate of chicken anaemia agent and an avian reovirus.** *Avian Pathol* 1988, **17**:33–50.
71. Zanella A, Dall’Ara P, Grilli G, Rampin T, Sironi G, Lavazza A, Lombardi G, Massi P, Coaro R, Marchi R, Treccani A: **Interaction between Marek’s disease and chicken infectious anaemia viruses.** *Sel Vet* 1999.
72. Pringle CR: **Virus Taxonomy 1996 — A Bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem.** *Arch Virol* 1996, **141**:2251–2256.
73. Gelderblom H, Kling S, Lurz R, Tischer I, B♦low V: **Morphological characterization of chicken anaemia agent (CAA).** *Arch Virol* 1989, **109**:115–120.
74. Noteborn MH, de Boer GF, van Roozelaar DJ, Karreman C, Kranenburg O, Vos JG, Jeurissen SH, Hoeben RC, Zantema a, Koch G: **Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle.** *J Virol* 1991, **65**:3131–9.
75. Noteborn MH, Verschueren C a, Koch G, Van der Eb a J: **Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anaemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope.** *J Gen Virol* 1998, **79** ( Pt 12):3073–7.



76. Peters MA, Jackson DC, Crabb BS, Browning GF: **Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase.** *J Biol Chem* 2002, **277**:39566–73.
77. Koch G, van Roozelaar DJ, Verschueren C a, van der Eb a J, Noteborn MH: **Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus.** *Vaccine* 1995, **13**:763–70.
78. Cloud SS, Rosenberger JK, Lillehoj HS: **Immune dysfunction following infection with chicken anemia agent and infectious bursal disease virus. II. Alterations of in vitro lymphoproliferation and in vivo immune responses.** *Vet Immunol Immunopathol* 1992, **34**:353–66.
79. Cloud SS, Lillehoj HS, Rosenberger JK: **Immune dysfunction following infection with chicken anemia agent and infectious bursal disease virus. I. Kinetic alterations of avian lymphocyte subpopulations.** *Vet Immunol Immunopathol* 1992, **34**:337–52.
80. Hu LB, Lucio B, Schat K a: **Depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocyte subpopulations by CIA-1, a chicken infectious anemia virus.** *Avian Dis* 1993, **37**:492–500.
81. Vaziry A, Silim A, Bleau C, Frenette D, Lamontagne L: **Chicken infectious anaemia vaccinal strain persists in the spleen and thymus of young chicks and induces thymic lymphoid cell disorders.** *Avian Pathol* 2011, **40**:377–85.
82. Buscaglia C, Crosetti CF, Nervi P: **Identification of chicken infectious anaemia, isolation of the virus and reproduction of the disease in Argentina.** *Avian Pathol* 1994, **23**:297–304.
83. Craig MI, Rimondi a, Delamer M, Sansalone P, König G, Vagnozzi a, Pereda a: **Molecular characterization of chicken infectious anemia virus circulating in Argentina during 2007.** *Avian Dis* 2009, **53**:331–5.
84. Pereda AJ, Uhart M, Perez A a, Zaccagnini ME, La Sala L, Decarre J, Goijman A, Solari L, Suarez R, Craig MI, Vagnozzi A, Rimondi A, König G, Terrera M V, Kaloghlian A, Song H, Sorrell EM, Perez DR: **Avian influenza virus isolated in wild waterfowl in Argentina: evidence of a potentially unique phylogenetic lineage in South America.** *Virology* 2008, **378**:363–70.
85. Rimondi A, Xu K, Craig MI, Shao H, Ferreyra H, Rago MV, Romano M, Uhart M, Sutton T, Ferrero A, Perez DR, Pereda A: **Phylogenetic analysis of H6 influenza viruses isolated from rosy-billed pochards (*Netta peposaca*) in Argentina reveals the presence of different HA gene clusters.** *J Virol* 2011, **85**:13354–62.
86. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL, Air B, Base F, Antonio S: **Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes.** 2002, **40**:3256–3260.
87. **WPRO | WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. .**
88. Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR: **Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses.** *Arch Virol* 2001, **146**:2275–89.

89. Van Santen VL, Li L, Hoerr FJ, Lauerman LH: **Genetic characterization of chicken anemia virus from commercial broiler chickens in Alabama.** *Avian Dis* , **45**:373–88.
90. Davidson I, Loeb E, Lublin A, Perk S, Shkoda I, Schat KA: **Assessment of various criteria to determine the chicken anemia virus pathogenicity in embryonated eggs and in day-old chicks.** 2007, **6**.
91. Technical Reference Promega.  
<http://www.promega.com/~media/files/resources/technical%20references/plasmid%20and%20protein%20quantitation.pdf>: **Plasmid and Protein Quantitation** .
92. Hoerr FJ, A FJH: **Clinical Aspects of Immunosuppression in Poultry Invited Review — Clinical Aspects of Immunosuppression in Poultry.** 2010, **54**:2–15.
93. Hoerr FJ, Acvp D: **Pathology of Multifactorial Diseases in Broiler Chickens.** :1–7.
94. Chen J-M, Sun Y-X, Chen J-W, Liu S, Yu J-M, Shen C-J, Sun X-D, Peng D: **Panorama phylogenetic diversity and distribution of type A influenza viruses based on their six internal gene sequences.** *Virology* 2009, **6**:137.
95. Bahl J, Vijaykrishna D, Holmes EC, Smith GJD, Guan Y: **Gene flow and competitive exclusion of avian influenza A virus in natural reservoir hosts.** *Virology* 2009, **390**:289–97.
96. Xu K, Ferreri L, Rimondi A, Olivera V, Romano M, Ferreyra H, Rago V, Uhart M, Chen H, Sutton T, Pereda A, Perez DR: **Isolation and characterization of an H9N2 influenza virus isolated in Argentina.** *Virus Res* 2012, **168**:41–7.
97. Rimondi A, Pinto S, Olivera V, Dibárbora M, Pérez-Filgueira M, Craig M, Pereda A: **Comparative histopathological and immunological study of two field strains of chicken anemia virus.** *Vet Res* 2014, **45**:102.
98. Phenix K V, Meehan BM, Todd D, McNulty MS: **Transcriptional analysis and genome expression of chicken anaemia virus.** *J Gen Virol* 1994, **75 ( Pt 4)**:905–9.
99. Noteborn MH, Verschueren CA, Zantema A, Koch G, van der Eb AJ: **Identification of the promoter region of chicken anemia virus (CAV) containing a novel enhancer-like element.** *Gene* 1994, **150**:313–8.
100. Renshaw RW, Soiné C, Weinkle T, O’Connell PH, Ohashi K, Watson S, Lucio B, Harrington S, Schat K a: **A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture.** *J Virol* 1996, **70**:8872–8.
101. Spackman E, McCracken KG, Winker K, Swayne DE: **H7N3 avian influenza virus found in a South American wild duck is related to the Chilean 2002 poultry outbreak, contains genes from equine and North American wild bird lineages, and is adapted to domestic turkeys.** *J Virol* 2006, **80**:7760–4.
102. Alvarez P, Mattiello R, Rivaille P, Pereda A, Davis CT, Boado L, D’Ambrosio E, Aguirre S, Espinosa C, La Torre J, Donis R, Mattion N: **First isolation of an H1N1 avian influenza virus from wild terrestrial non-migratory birds in Argentina.** *Virology* 2010, **396**:76–84.

103. Suarez DL, Senne DA, Banks J, Brown IH, Essen SC, Lee C-W, Manvell RJ, Mathieu-Benson C, Moreno V, Pedersen JC, Panigrahy B, Rojas H, Spackman E, Alexander DJ: **Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile.** *Emerg Infect Dis* 2004, **10**:693–9.
104. Spackman E, McCracken KG, Winker K, Swayne DE: **An avian influenza virus from waterfowl in South America contains genes from North American avian and equine lineages.** *Avian Dis* 2007, **51**(1 Suppl):273–4.
105. Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus ADME: **Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls.** *J Virol* 2005, **79**:2814–22.
106. Ramey a M, Walther P, Link P, Poulson RL, Wilcox BR, Newsome G, Spackman E, Brown JD, Stallknecht DE: **Optimizing Surveillance for South American Origin Influenza A Viruses Along the United States Gulf Coast Through Genomic Characterization of Isolates from Blue-winged Teal (*Anas discors*).** *Transbound Emerg Dis* 2014:1–9.
107. De Araujo J, de Azevedo Júnior SM, Gaidet N, Hurtado RF, Walker D, Thomazelli LM, Ometto T, Seixas MMM, Rodrigues R, Galindo DB, da Silva ACS, Rodrigues AMM, Bomfim LL, Mota MA, Larrazábal ME, Branco JO, Serafini P, Neto IS, Franks J, Webby RJ, Webster RG, Durigon EL: **Avian Influenza Virus (H11N9) in Migratory Shorebirds Wintering in the Amazon Region, Brazil.** *PLoS One* 2014, **9**:e110141.
108. Smyth J a, Moffett D a, Connor TJ, McNulty MS: **Chicken anaemia virus inoculated by the oral route causes lymphocyte depletion in the thymus in 3-week-old and 6-week-old chickens.** *Avian Pathol* 2006, **35**:254–9.
109. Haridy M, Sasaki J, Ikezawa M, Okada K, Goryo M: **Pathological and Immunohistochemical Studies of Subclinical Infection of Chicken Anemia Virus in 4-Week-Old Chickens.** *J Vet Med Sci* 2012, **74**:757–764.
110. Todd D, Connor TJ, Calvert VM, Creelan JL, Meehan BM, McNulty MS: **Molecular cloning of an attenuated chicken anaemia virus isolate following repeated cell culture passage.** *Avian Pathol* 1995, **24**:171–87.
111. Meehan BM, Todd D, Creelan JL, Connor TJ, Mcnulty MS, Meehan BM, Todd D, Creelan JL, Connor TJ: **Investigation of the attenuation exhibited by a molecularly cloned chicken anemia virus isolate by utilizing a chimeric virus approach . Investigation of the Attenuation Exhibited by a Molecularly Cloned Chicken Anemia Virus Isolate by Utilizing a Chimeri.** 1997, **71**.
112. Goryo M, Sugimura H, Matsumoto S, Umemura T, Itakura C: **Isolation of an agent inducing chicken anaemia.** *Avian Pathol* 1985, **14**:483–96.
113. Adair BM, McNeilly F, McConnell CD, McNulty MS: **Characterization of surface markers present on cells infected by chicken anemia virus in experimentally infected chickens.** *Avian Dis* 1993, **37**:943–50.
114. Munster VJ, Baas C, Lexmond P, Waldenström J, Wallensten A, Fransson T, Rimmelzwaan GF, Beyer WEP, Schutten M, Olsen B, Osterhaus ADME, Fouchier RAM: **Spatial, temporal, and**

- species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds.** *PLoS Pathog* 2007, **3**:e61.
115. Krauss S, Walker D, Pryor SP, Niles L, Chenghong L, Hinshaw VS, Webster RG: **Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North America.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2004, **4**:177–89.
116. Abolnik C, Bisschop S, Gerdes T, Olivier A, Horner R: **Outbreaks of avian influenza H6N2 viruses in chickens arose by a reassortment of H6N8 and H9N2 ostrich viruses.** *Virus Genes* 2007, **34**:37–45.
117. Brown IH: **Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, and Africa, 2006-2009.** *Avian Dis* 2010, **54**(1 Suppl):187–93.
118. Chin PS, Hoffmann E, Webby R, Webster RG, Guan Y, Peiris M, Shortridge KF: **Molecular evolution of H6 influenza viruses from poultry in Southeastern China: prevalence of H6N1 influenza viruses possessing seven A/Hong Kong/156/97 (H5N1)-like genes in poultry.** *J Virol* 2002, **76**:507–16.
119. Huang K, Bahl J, Fan XH, Vijaykrishna D, Cheung CL, Webby RJ, Webster RG, Chen H, Smith GJD, Peiris JSM, Guan Y: **Establishment of an H6N2 influenza virus lineage in domestic ducks in southern China.** *J Virol* 2010, **84**:6978–86.
120. Hossain MJ, Hickman D, Perez DR: **Evidence of expanded host range and mammalian-associated genetic changes in a duck H9N2 influenza virus following adaptation in quail and chickens.** *PLoS One* 2008, **3**:e3170.
121. Sorrell EM, Perez DR: **Adaptation of influenza A/Mallard/Potsdam/178-4/83 H2N2 virus in Japanese quail leads to infection and transmission in chickens.** *Avian Dis* 2007, **51**(1 Suppl):264–8.
122. Gillim-Ross L, Santos C, Chen Z, Aspelund A, Yang C-F, Ye D, Jin H, Kemble G, Subbarao K: **Avian influenza h6 viruses productively infect and cause illness in mice and ferrets.** *J Virol* 2008, **82**:10854–63.
123. Davidson AI, Kedem M, Borochovit H, Kass N, Ayali G, Perelman B, Smith B, Perk S, Davidson I, Kedem AM, Borochovit BH, Kass CN, Ayali DG, Hamzani DE: **Chicken Infectious Anemia Virus Infection in Israeli Commercial Flocks : Virus Amplification , Clinical Signs , Performance , and Antibody Status Chicken Infectious Anemia Virus Infection in Israeli Commercial Flocks : Virus Amplification , Clinical Signs.** 2004.
124. Haridy M, Goryo M, Sasaki J, Okada K: **Pathological and immunohistochemical study of chickens with co-infection of Marek's disease virus and chicken anaemia virus.** *Avian Pathol* 2009, **38**:469–83.
125. Gallardo R a, van Santen VL, Toro H: **Effects of chicken anaemia virus and infectious bursal disease virus-induced immunodeficiency on infectious bronchitis virus replication and genotypic drift.** *Avian Pathol* 2012, **41**:451–8.
126. Allan GM, Ellis JA: **Porcine circoviruses: a review.** *J Vet Diagn Invest* 2000, **12**:3–14.

127. Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, Foster JC, Ellis JA, Krakowka SJ, Meehan BM, Adair BM: **Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus.** *J Comp Pathol* 1999, **121**:1–11.
128. Kwon J-S, Lee H-J, Lee D-H, Lee Y-J, Mo I-P, Nahm S-S, Kim M-J, Lee J-B, Park S-Y, Choi I-S, Song C-S: **Immune responses and pathogenesis in immunocompromised chickens in response to infection with the H9N2 low pathogenic avian influenza virus.** *Virus Res* 2008, **133**:187–94.
129. Ramirez-Nieto G, Shivaprasad HL, Kim C-H, Lillehoj HS, Song H, Osorio IG, Perez DR: **Adaptation of a mallard H5N2 low pathogenicity influenza virus in chickens with prior history of infection with infectious bursal disease virus.** *Avian Dis* 2010, **54**(1 Suppl):513–21.
130. Lee CW, Song CS, Lee YJ, Mo IP, Garcia M, Suarez DL, Kim SJ: **Sequence analysis of the hemagglutinin gene of H9N2 Korean avian influenza viruses and assessment of the pathogenic potential of isolate MS96.** *Avian Dis* , **44**:527–35.
131. Lee Y-J, Shin J-Y, Song M-S, Lee Y-M, Choi J-G, Lee E-K, Jeong O-M, Sung H-W, Kim J-H, Kwon Y-K, Kwon J-H, Kim C-J, Webby RJ, Webster RG, Choi YK: **Continuing evolution of H9 influenza viruses in Korean poultry.** *Virology* 2007, **359**:313–23.

## 9. ANEXO

### PB2

Linaje	Strain	Número de acceso a Genbank
Norteamérica	A/mallard_duck/ALB/354/1978	CY004790
	A/mallard_duck/Minnesota/19/1979	CY014746
	A/mallard_duck/ALB/106/1979	CY004797
	A/mallard_duck/ALB/742/1981	CY005199
	A/mallard_duck/ALB/506/1983	CY004649
	A/mallard_duck/ALB/40/1984	CY005206
	A/mallard_duck/Alberta/376/1985	CY003886
	A/mallard/Ohio/102/1986	CY018022
	A/mallard/Ohio/298/1987	CY012815
	A/ruddy_turnstone/DE/2368/1988	CY004886
	A/semi_palmated_sandpiper/Brazil/43/1990	CY005420
	A/Mallard/Alberta/206/1996	CY004273
	A/mallard/MD/403/2002	EU026089
	A/mallard/Ohio/686/2002	CY020812
	A/mallard/Maryland/789/2002	CY016618
	A/mallard/Alberta/79/2003	CY003999
	A/shorebird/DE/122/2004	CY005263
	A/mallard/ON/499/2005	FJ031998
	A/mallard/Maryland/1153/2005	CY021308
	A/mallard/Alaska/708/2005	CY017756
	A/wild_bird/Chile/1805/2008	KF772945
	A/northern_pintail/Interior_Alaska/9BM11387R0/2009	CY136101
	A/mallard/Interior_Alaska/9BM8465R0/2009	CY136170
	A/northern_pintail/Interior_Alaska/10BM07469R0/2010	CY141619
	A/mallard/California/1305/2010	CY094772
	A/black_bellied_whistling_duck/Colombia/1/2011	KC703330
	A/American_green_winged_teal/Mississippi/11OS90/2011	CY133648
A/mallard/California/2743/2012	CY157053	
A/mallard/California/1397/2013	CY177254	
A/chicken/Florida/14810_2/2014	KM244105	
Eurasia y Oceanía	A/black_duck/Western_Australia/4954/1983	CY028274
	A/duck/Hokkaido/49/98	AB473937
	A/shoveler/Netherlands/19/1999	CY005858
	A/wild_duck/Shantou/1411/2000	EF597488
	A/duck/Victoria/2001	CY077440
	A/duck/Mongolia/47/2001	AB473548
	A/migratory_duck/Hong_Kong/MP2553/2003	EF597494
	A/duck/Victoria/2853/2003	CY077631
	A/goose/Italy/296426/2003	FJ432785
	A/red_necked_stint/Australia/5/2004	CY029896

A/black_headed_gull/Netherlands/1/2005	CY041385
A/mallard/Sweden/30/2005	CY043831
A/duck/Beijing/61/05	EU492492
A/Bewick's_Swan/Netherlands/1/2005	DQ822187
A/Baikal_teal/Hongze/14/2005	GQ203121
A/ruddy_shelduck/Mongolia/P52/2005	GQ907349
A/mallard/Netherlands/33/2006	CY041417
A/mallard/SanJiang/151/2006	EF592492
A/duck/France/06436/2006	CY046147
A/mallard/Netherlands/14/2007	CY121982
A/duck/Italy/69238/2007	FJ432761
A/mute_swan/Hungary/5973/2007	GQ240810
A/mallard/Altai/1208/2007	CY049761
A/seagull/Chile/5775/2009	KF260737
A/duck/Jiangxi/21669/2009	GU324771
A/duck/Jiangsu/022/2009	CY184316
A/mallard/Sweden/100740/2009	KF772953
A/chicken/Shanghai/A/2010	KJ726731
A/goose/Egypt/M2788E/2011	KF881543
A/duck/Zhejiang/224/2011	JN646693
A/chicken/Egypt/D4905B/2012	KF881449
A/chicken/Bangladesh/16448/2012	KJ643821
A/duck/Taiwan/4360/2013	KJ162745
A/chicken/Egypt/S7404/2013	KF881456
A/duck/Jiangxi/JXA132719/2014	KM234922

Tabla I. Secuencias del gen PB2 utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

## PB1

<b>Linaje</b>	<b>Strain</b>	<b>Número de acceso a Genbank</b>
<b>Norteamérica</b>	A/gull/MD/19/1977	CY005812
	A/mallard_duck/Alberta/299/1977	CY004720
	A/mallard_duck/ALB/742/1981	CY005198
	A/mallard/Ohio/48/1986	CY020723
	A/ruddy_turnstone/DE/2764/1987	CY005223
	A/mallard/Ohio/421/1987	CY021627
	A/red_knot/NJ/325/1989	CY005084
	A/semi_palmated_sandpiper/Brazil/43/1990	CY005419
	A/mallard/Ohio/171/1990	CY012806
	A/mallard/Alberta/11/1991	CY005152
	A/pintail/Alberta/269/2001	CY004952
	A/mallard/Ohio/653/2002	CY020843
	A/shorebird/DE/236/2003	CY005336
	A/mallard/Ohio/1851/2005	CY021187
	A/pintail/Alaska/53/2005	CY013269
	A/mallard/Maryland/182/2006	CY028241
	A/wild_bird/Chile/1805/2008	KF772946
	A/seagull/Chile/5775/2009	KF772954
	A/mallard/Interior_Alaska/10BM09893R0/2010	CY136339
	A/mallard/Mississippi/11OS34/2011	CY133719
	A/mallard/Ohio/11OS2085/2011	CY132523
	A/ruddy_turnstone/Canada/02937/2011	CY149650
	A/mallard/California/2997/2012	CY157252
	A/blue_winged_teal/LA/AI13_1357/2013	KJ413617
	A/chicken/Delaware/10851/2014	KM244098
	A/chicken/Texas/9686_3/2014	KM244090
<b>Eurasia y Oceanía</b>	A/duck/Victoria/1992	CY028650
	A/emu/New_South_Wales/775/1997	CY022715
	A/duck/Victoria/2001	CY077439
	A/duck/Hokkaido/120/2001	AB286654
	A/mallard/Italy/36/2002	EF597451
	A/duck/Italy/4609/2003	CY031034
	A/mallard/Denmark/64650/03	DQ251442
	A/red_necked_stint/Australia/5/2004	CY029895
	A/sharp_tailed_sandpiper/Australia/10/2004	CY029887
	A/migratory_duck/Jiang_Xi/8624/2004	EF597463
	A/migratory_duck/Jiang_Xi/6568/2004	EF597462
	A/mallard/ZhaLong/88/2004	FJ349253
	A/Bewick's_Swan/Netherlands/2/2005	DQ822196
	A/Baikal_teal/Hongze/14/2005	GQ203120
	A/bar_headed_goose/Mongolia/143/2005	GQ907292



A/mallard/Netherlands/1/2006	CY043854
A/mallard/SanJiang/151/2006	EF592493
A/duck/Italy/281904/2006	FJ432776
A/Muscovy_duck/France/070090b/2007	CY046164
A/gadwall/Altai/1326/2007	CY049802
A/garganey/Altai/1216/2007	CY049778
A/duck/Korea/334_15/2008	GQ414819
A/chicken/Egypt/Q1182/2010	FR687282
A/northern_shoveler/Georgia/1/2010	CY121989
A/duck/Jiangxi/16309/2010	KF260499
A/northern_shoveler/Hong_Kong/MPL961/2011	KF260547
A/chicken/Taiwan/683/2012	KJ162586
A/pigeon/Wenzhou/497/2013	KF260670
A/pigeon/Zhejiang/P2/2013	KF042094
A/muscovy_duck/Vietnam/LBM573/2014	AB972721

Tabla II. Secuencias del gen PB1 utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

## PA

Linaje	Strain	Número de acceso a Genbank
	A/gull/MD/19/1977	CY005811
	A/gull/Maryland/704/1977	CY089642
	A/mallard/Wisconsin/538/1979	CY180088
	A/green_winged_teal/ALB/438/1979	CY004611
	A/mallard_duck/ALB/1151/1979	CY004134
	A/mallard/Alberta/699/1981	CY185726
	A/mallard/Wisconsin/1071/1982	CY179256
	A/mallard/Wisconsin/1719/1983	CY179304
	A/chicken/VA/40018/1984	FJ610139
	A/ruddy_turnstone/Delaware_Bay/2589/1987	CY126645
	A/green_winged_teal/Ohio/430/1987	CY011045
	A/semi_palmated_sandpiper/Brazil/43/1990	CY005418
	A/blue_winged_teal/ALB/103/1990	CY004894
	A/mallard/Alberta/194/1992	CY005006
	A/blue_winged_teal/Ohio/96/1993	CY021450
<b>Norteamérica</b>	A/mallard/ALB/196/1996	CY005236
	A/mallard/Ohio/56/1999	CY012829
	A/ruddy_turnstone/Delaware/97/2000	CY005369
	A/black_duck/Maryland/834/2002	CY020770
	A/mallard/Alberta/209/2003	CY004357
	A/mallard/Ohio/1717/2005	CY022722
	A/mallard/Maryland/1135/2005	CY021298
	A/pintail/Alaska/279/2005	CY015505
	A/shorebird/Delaware/22/06	EU030967
	A/ruddy_turnstone/New_Jersey/AI07_72/2007	CY144768
	A/wild_bird/Chile/1805/2008	KF772947
	A/shorebird/Delaware_Bay/309/2008	CY126603
	A/mallard/Arkansas/AI09_5761/2009	CY141022
	A/northern_pintail/Interior_Alaska/10BM09181R0/2010	CY141731
	A/green_winged_teal/California/96/2012	CY134348
	A/blue_winged_teal/Ohio/13OS1831/2013	KJ567968
	A/shearwater/Australia/405/1978	CY005663
	A/mallard/Stralsund/41_4/1981	CY117104
	A/red_necked_stint/Australia/5745/1981	CY005713
	A/mallard/Potsdam/177_4/1983	CY116864
<b>Eurasia y Oceanía</b>	A/Peking_duck/Wagun/1689_6/1985	CY117168
	A/Goose/Guangdong/1/96	NC007359
	A/duck/Hong_Kong/Y439/1997	KF188264
	A/Muscovy_duck/Fujian/CL/1997	JF916712
	A/chicken/New_South_Wales/2/1997	CY022698
	A/duck/Taiwan/WB29/99	DQ376807

A/mallard/Netherlands/12/1999	CY122257
A/quail/Hong_Kong/1721_20/99	AJ410512
A/wild_duck/Shantou/1737/2000	EF597417
A/duck/Mongolia/47/2001	AB268553
A/duck/Hokkaido/120/2001	AB286878
A/duck/Primorie/2633/2001	GQ227607
A/duck/Victoria/5384/2002	CY028256
A/duck/Shiga/8/2004	AB304146
A/migratory_duck/Hong_Kong/MP206/2004	EF597406
A/red_necked_stint/Australia/5/2004	CY029894
A/sharp_tailed_sandpiper/Australia/10/2004	CY029886
A/mallard/Netherlands/26/2005	CY041423
A/migratory_duck/Jiang_Xi/13487/2005	EF597407
A/mallard/Sweden/65/2005	CY041359
A/Bewick's_Swan/Netherlands/2/2005	DQ822197
A/duck/Yangzhou/02/2005	EF061120
A/Baikal_teal/Hongze/14/2005	GQ203119
A/mallard/Hei_Longjiang/131/2006	EF634339
A/duck/France/06436/2006	CY046149
A/gull/Moscow/3100/2006	EU152236
A/mallard/Netherlands/11/2007	CY041407
A/mallard/Sweden/100993/2008	FJ803193
A/seagull/Chile/5775/2009	KF772955
A/duck/Korea/A20/2009	GQ414834
A/mallard/Netherlands/1/2010	CY122313
A/whooper_swan/Mongolia/1/2010	AB569347
A/goose/Egypt/M2788E/2011	KF881545
A/chicken/Guangxi/GXc_1/2011	KF013915
A/goose/Guizhou/829/2012	KF260232
A/pigeon/Wenzhou/397/2013	KF260416
A/muscovy_duck/Vietnam/LBM571/2014	AB972714
A/wild_chicken/Shanghai/C1/2014	KJ726724

Tabla III. Secuencias del gen PA utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

## NP

Linaje	Strain	Número de acceso a Genbank
	A/mallard_duck/New_York/6861/1978	CY014971
	A/mallard_duck/ALB/106/1979	CY004793
	A/pintail_duck/Alberta/121/1979	CY005041
	A/mallard_duck/New_York/194/1982	CY014932
	A/mallard_duck/ALB/630/1984	CY004833
	A/mallard_duck/Tennessee/11457/1985	CY014809
	A/mallard/Ohio/30/1986	CY017696
	A/mallard/Ohio/94/1989	CY016151
	A/mallard_duck/ALB/155/1990	CY004229
	A/mallard/Alberta/194/1992	CY005004
	A/mallard/Ohio/66/1999	CY016958
	A/mallard/MN/107/2000	EU743468
	A/mallard/MD/170/2002	EU026040
	A/mallard/Maryland/887/2002	EU026010
<b>Norteamérica</b>	A/pintail_duck/Alberta/210/2002	CY004549
	A/mallard/Ohio/649/2002	CY020760
	A/blue_winged_teal/Ohio/989/2002	CY020752
	A/mallard/Alberta/154/2003	CY004277
	A/shorebird/DE/122/2004	CY005259
	A/mallard/Maryland/1135/2005	CY021296
	A/ruddy_turnstone/Delaware/778/2006	GU051726
	A/ring_necked_duck/California/HKWF662/2007	CY032925
	A/wild_bird/Chile/1805/2008	KF772949
	A/mallard/California/8028/2008	CY094152
	A/seagull/Chile/5775/2009	KF772957
	A/northern_pintail/Interior_Alaska/9BM7398R0/2009	CY142237
	A/American_black_duck/New_Brunswick/00478/2010	CY138944
	A/blue_winged_teal/Iowa/44555_551/2011	CY166277
	A/American_green_winged_teal/Mississippi/12OS5061/2012	CY186791
	A/duck/Australia/749/1980	CY005687
	A/swan/Hokkaido/51/1996	AB300441
	A/Duck/Hong_Kong/P54/97	AF250474
	A/duck/Hokkaido/49/98	AB473940
	A/duck/Hokkaido/120/2001	AB286876
<b>Eurasia y Oceanía</b>	A/mallard/Denmark/64650/03	DQ251444
	A/goose/Italy/296426/2003	FJ432781
	A/migratory_duck/Hong_Kong/MP2553/2003	EF597355
	A/mallard/New_Zealand/449_75/2004	CY077524
	A/aquatic_bird/Korea/CN_2/2004	EU301306
	A/duck/Shiga/8/2004	AB304148
	A/spotbill_duck/Xuyi/6/2005	GQ169500

A/barnacle_goose/Netherlands/1/2005	CY041389
A/common_teal/Netherlands/1/2005	CY041261
A/duck/Guangdong/0118/2005	EU930013
A/bar_headed_goose/Mongolia/143/2005	GQ907289
A/mallard/Netherlands/31/2006	CY121970
A/mallard/France/061054/2006	CY046143
A/duck/Tasmania/277/2007	CY033164
A/duck/Victoria/512/2007	CY061613
A/mallard/Netherlands/11/2007	CY041405
A/spot_billed_duck/Korea/528/2008	GQ414888
A/duck/Jiangsu/022/2009	GU324775
A/turkey/France/10_040/2010	JQ990780
A/mallard/Sweden/133546/2011	CY183994

Tabla IV. Secuencias del gen NP utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

## M

Linaje	Strain	Número de acceso a Genbank
	A/mallard/Alberta/194/1992(H8N4)	CY005002
	A/duck/NY/13152-13/1994	EU026103
	A/mallard/Alberta/279/1996	CY127398
	A/blue-winged teal/Ohio/31/1999	CY018000
	A/cinnamon teal/Bolivia/4537/2001(H7N3)	DQ525415
	A/ruddy turnstone/DE/241731/01	DQ021749
	A/mallard/Alberta/30/2001(H4N8)	CY004940
	A/mallard/Ohio/667/2002(H4N6)	CY020726
	A/mallard/Ohio/655/2002(H4N6)	CY020774
	A/mallard/Alberta/79/2003(H2N3)	CY003993
	A/mallard/Alberta/254/2003	CY102777
<b>Norteamérica</b>	A/blue-winged teal/Alberta/293/2003(H4N6)	CY004954
	A/mallard/Maryland/1124/2005(H11N9)	CY021470
	A/wild bird/Chile/1805/2008	KF772951
	A/ruddy turnstone/New Jersey/Sg-00521/2008	CY145202
	A/northern pintail/Interior Alaska/9BM8109R0/2009	CY136132
	A/northern pintail/Interior Alaska/9BM8502R0/2009	CY136206
	A/ring billed gull/Quebec/G139/2010	CY138122
	A/white faced whistling duck/Colombia/1/2011	KC703336
	A/thick-billed murre/Canada/1813/2011	CY149621
	A/mallard/California/2762/2012	CY157087
	A/mallard/California/1483/2013(H4N6)	CY177362
	A/chicken/Delaware/10851/2014	KM244103
	A/duck/Hong Kong/d73/1976(H6N1)	CY005598
	A/duck/HK/784/1979	CY005633
	A/duck/Victoria/23/1981(H1N1)	CY077678*
	A/mallard/Gloucestershire/PD374/1985(H10N4)	GQ176127*
	A/duck/Nanchang/1749/1992	U49117
	A/Duck/Hong Kong/Y264/97(H4N8)	AF250492
	A/Aquatic bird/Hong Kong/M603/98(H11N1)	AF250486
	A/common tern/Buryatiya/1901/2000(H4N6)	EU580590
<b>Eurasia y Oceanía</b>	A/duck/Primorie/2633/01(H5N3)	AJ621810
	A/duck/Hokkaido/124/2003	AB428682
	A/goose/Italy/296426/2003(H1N1)	FJ432779
	A/migratory duck/Hong Kong/MP2437/2003(H6N1)	EF597298
	A/mallard/New Zealand/449-94/2004	CY077450*
	A/Eurasian wigeon/Sweden/1/2004(H6N2)	CY041363
	A/sharp-tailed sandpiper/Australia/10/2004(H11N9)	CY029882
	A/Baikal Teal/Hongze/14/2005	EF527273
	A/mallard/New Zealand/1365-350/2005	CY077585
	A/mallard/Sweden/30/2005(H6N1)	CY043825

A/black-headed gull/Netherlands/1/2005(H6N8)	CY041379
A/common teal/Netherlands/1/2005(H8N4)	CY041259
A/duck/Korea/LPM38/2005(H3N6)	EU301261
A/duck/Italy/281904/2006(H1N1)	FJ432771
A/mallard/Hei Longjiang/131/2006(H6N2)	EF634343
A/gull/Moscow/3100/2006(H6N2)	EU152240
A/duck/Victoria/512/2007(H7N6)	CY061611
A/Bewick's swan/Netherlands/5/2007(H9N2)	CY041275
A/mallard/Czech Republic/13258-2/2007	GQ404636
A/mallard/Netherlands/12/2008	CY122301
A/duck/Eastern China/3/2009	JF965226
A/turkey/France/10-040/2010	JQ990782
A/duck/Eastern China/16/2010	JF965237
A/duck/Zhejiang/0611-24/2011	JN716328
A/pigeon/Anhui/08/2013	KJ579957*

Tabla V. Secuencias del gen M utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

## NS

Linaje	Alelo	Strain	Número de acceso a Genbank	
<b>Norteamérica</b>	<b>A</b>	A/turkey/Ontario/7732/1966	U85376	
		A/blue-winged teal/ALB/778/1978(H10N3)	CY005191	
		A/mallard duck/ALB/676/1979	CY004125	
		A/turkey/Minnesota/1138/1980(H7N3)	CY041843	
		A/laughing gull/DE/2718/1987(H9N5)	CY005123	
		A/ruddy turnstone/DE/773/1988	CY004571	
		A/blue-winged teal/ALB/136/1990(H4N3)	CY004900	
		A/environment/Maryland/276/2006(H7N3)	CY053857	
		A/wild bird/Chile/1805/2008(H5N9)	KF772952	
		A/ruddy turnstone/Delaware/Sg-00468/2008	CY144913	
		A/northern pintail/Interior Alaska/10BM05034R0/2010	CY135667	
		A/mallard/California/2956/2012	CY157242	
		A/mottled duck/LA/32M/87	DQ021648	
		A/blue-winged teal/Alberta/141/1992(H1N1)	CY004542	
		A/mallard/Ohio/94/1993(H11N3)	CY021257	
		A/mallard/Ohio/209/1998(H11N9)	CY020953	
		A/mallard/Alberta/47/98(H4N1)	AY633288*	
		<b>B</b>	A/mallard/Maryland/538/2002(H11N9)	GQ257491
			A/mallard/Alberta/79/2003(H2N3)	CY003996
			A/ruddy turnstone/New Jersey/669/2005	GU051099
A/pintail/Alaska/279/2005(H3N8)	CY015504			
A/mallard/Interior Alaska/9BM1869/2009	CY078751			
A/mallard/Ohio/11OS2119/2011	CY132473			
<b>Eurasia y Oceanía</b>	<b>A</b>		A/goose/Hong Kong/17/77 (H6N4)	AJ410597
			A/duck/Hong Kong/702/1979(H9N2)	CY031263
			A/duck/Nanchang/1944/1993	U49493
			A/shoveler/Netherlands/19/1999	CY005855
		A/red-necked stint/Australia/5/2004(H4N8)	CY029893	
		A/mallard/New Zealand/1615-17/2004(H4N6)	CY045363	
		A/mallard/Italy/299/05(H7N7)	EU158146	
		A/duck/Victoria/512/2007(H7N6)	CY061614	
		A/duck/Guangxi/GXd-3/2009	JX297579	
		A/duck/Victoria/D23/1994(H4N2)	CY045251	
		A/swan/Hokkaido/51/1996(H5N3)	AB300235	
		A/environment/Hong Kong/437-6/99(H5N1)	AF216718	
		<b>B</b>	A/Duck/Shantou/2030/00(H9N1)	AF523502
			A/mallard/Jiangxi/12147/2005(H6N2)	HM145024
			A/duck/Tasmania/277/2007(H7N2)	CY033165
A/mallard/Mongolia/1402/2011	KC871447			



## H10

<b>Linaje</b>	<b>Strain</b>	<b>Número de acceso a Genbank</b>
	A/pintail_duck/ALB/303/1977	CY005921
	A/blue_winged_teal/ALB/778/1978	CY005994
	A/mallard/Wisconsin/230/1979	CY180043
	A/mallard/Wisconsin/27/1981	CY178871
	A/mallard/Wisconsin/1350/1983	CY179235
	A/mallard/Wisconsin/2364/1984	CY180043
	A/pintail_duck/ALB/584/1984	CY178871
	A/duck/Wisconsin/2632/1985	CY178879
	A/mallard/Alberta/553/1986	CY005996
	A/green_winged_teal/Louisiana/272GW/1987	CY178318
	A/knot/Delaware_Bay/2561/1987	CY136379
	A/ruddy_turnstone/Delaware_Bay/2764/1987	GU050860
	A/green_winged_teal/LA/169GW/1988	CY136598
	A/mallard/Ohio/99/1989	CY136622
	A/ruddy_turnstone/New_Jersey/146/1990	EU743314
	A/turkey/VA/31409/1991	CY017781
	A/duck/Alaska/712/1991	CY136737
	A/pintail/Alberta/129/1993	GU186501
	A/quail/NJ/25254_22/1995	AB450431
<b>Norteamérica</b>	A/mallard/ALB/5/1995	CY101840
	A/mallard/Alberta/2/1995	GU186493
	A/shorebird/Delaware_Bay/288/1996	CY005997
	A/mallard/ALB/196/1996	CY136864
	A/mallard/Alberta/90/1997	CY136928
	A/quail/California/1022/1999	CY005998
	A/shorebird/Delaware_Bay/180/1999	CY136957
	A/northern_shoveler/TX/56/2000	EU747331
	A/red_knot/Delaware/1269/2000	CY136981
	A/shorebird/Delaware_Bay/267/2000	EU743322
	A/shorebird/Delaware_Bay/211/2000	GU050906
	A/ruddy_turnstone/New_Jersey/AI00_1143/2000	CY137032
	A/mallard/Alberta/208/2000	CY137008
	A/ruddy_turnstone/DE/1529/2001	CY144795
	A/ruddy_turnstone/NJ/823/2001	CY005999
	A/red_knot/DE/1587/2001	EU743362
	A/red_knot/GA/1721/2001	EU743410
	A/mallard/Maryland/190/2001	EU743330
	A/red_knot/NJ/1443/2001	EU743338
	A/mallard/Maryland/182/2001	GQ257455
	A/ruddy_turnstone/NJ/1956/2001	EU743346

A/ruddy_turnstone/Delaware_Bay/31/2001	GQ257455
A/shorebird/Delaware_Bay/43/2001	EU743410
A/shorebird/Delaware_Bay/207/2001	EU743362
A/shorebird/Delaware_Bay/200/2001	CY137257
A/shorebird/Delaware_Bay/192/2001	CY137184
A/shorebird/Delaware_Bay/261/2001	CY137160
A/shorebird/Delaware_Bay/199/2001	CY137136
A/mallard/Maryland/220/2003	CY137209
A/mallard/Alberta/209/2003	CY137152
A/ruddy_turnstone/DE/167/2004	GU053345
A/ruddy_turnstone/NJ/238/2004	CY005922
A/shorebird/Delaware_Bay/10/2004	EU743378
A/ruddy_turnstone/New_Jersey/1148668/2004	EU743402
A/sanderling/New_Jersey/1148674/2004	CY137538
A/mallard/Alberta/104/2004	CY144868
A/mallard/Alberta/57/2004	CY144860
A/mallard/North_Carolina/1321371/2004	CY136516
A/longtail_duck/Maryland/295/2005	CY137554
A/mallard/Minnesota/AI06_1017/2006	CY144876
A/ring_necked_duck/Michigan/588/2006	CY020901
A/mallard/California/K752/2006	CY144884
A/mallard/Interior_Alaska/6MP0758/2006	CY081324
A/northern_pintail/California/44221_656/2006	CY053805
A/northern_shoveler/Washington/44249_700/2006	CY078459
A/northern_shoveler/California/JN587/2006	FJ520086
A/gadwall/California/44287_543/2007	CY076269
A/cinnamon_teal/California/44287_659/2007	CY076808
A/American_coot/California/20181_006/2007	CY076445
A/northern_pintail/California/44291_259/2007	CY076461
A/California_gull/Washington/20371_003/2007	CY076093
A/mallard/Minnesota/Sg_00057/2007	FJ520101
A/blue_winged_teal/Alberta/271/2007	CY076117
A/mallard/Alberta/182/2007	CY064081
A/American_black_duck/New_Brunswick/04395/2007	CY137706
A/blue_winged_teal/Louisiana/Sg_00073/2007	CY137698
A/northern_shoveler/California/HKWF1005/2007	CY129237
A/greater_white_fronted_goose/California/HKWF446C/2007	CY064185
A/northern_shoveler/California/HKWF592C/2007	CY032656
A/mallard/California/AKS478/2007	CY034166
A/shorebird/Delaware_Bay/437/2008	CY039572
A/shorebird/Delaware_Bay/369/2008	CY094261
A/shorebird/Delaware_Bay/379/2008	CY127981
A/ruddy_turnstone/New_Jersey/Sg_00487/2008	CY136534
A/shorebird/Delaware_Bay/586/2008	CY137722
A/ruddy_turnstone/New_Jersey/Sg_00503/2008	CY145429

A/ruddy_turnstone/New_Jersey/Sg_00521/2008	CY137738
A/ruddy_turnstone/New_Jersey/Sg_00548/2008	CY042458
A/mallard/Minnesota/Sg_00630/2008	CY145144
A/northern_shoveler/Minnesota/Sg_00612/2008	CY145655
A/blue_winged_teal/Alberta/405/2008	CY145727
A/blue_winged_teal/Minnesota/Sg_00899/2008	CY094141
A/blue_winged_teal/North_Dakota/Sg_00730/2008	CY140128
A/mallard/Minnesota/Sg_01005/2008	CY145841
A/mallard/Illinois/08OS2710/2008	CY079356
A/northern_shoveler/California/9235/2008	CY093766
A/mallard/California/6957/2008	CY094141
A/northern_shoveler/California/9710/2008	CY093782
A/mallard/California/10126/2008	CY093663
A/green_winged_teal/California/10197/2008	CY093902
A/northern_pintail/Interior_Alaska/9BM11783R0/2009	CY142210
A/northern_pintail/Interior_Alaska/9BM7840R0/2009	CY142530
A/mallard/Interior_Alaska/9BM9335R0/2009	CY142538
A/northern_pintail/Interior_Alaska/9BM11387R0/2009	CY141351
A/American_green_winged_teal/Interior_Alaska/9BM6702R0/2009	CY142314
A/mallard/Interior_Alaska/9BM6888R0/2009	CY136062
A/northern_pintail/Interior_Alaska/9BM9383R0/2009	CY142370
A/northern_shoveler/Mississippi/09OS168/2009	CY079396
A/American_coot/Mississippi/09OS615/2009	CY079404
A/northern_pintail/Interior_Alaska/9BM11564R0/2009	CY142186
A/shorebird/Delaware_Bay/132/2009	CY137950
A/shorebird/Delaware_Bay/342/2009	CY137898
A/shorebird/Delaware_Bay/322/2009	CY137934
A/ruddy_turnstone/Delaware/AI09_879/2009	CY146020
A/ruddy_turnstone/New_Jersey/AI09_474/2009	CY146028
A/herring_gull/New_Jersey/AI09_1262/2009	CY146368
A/mallard/Interior_Alaska/9BM2751R0/2009	CY078723
A/mallard/Interior_Alaska/9BM3205R0/2009	CY130304
A/mallard/Minnesota/AI09_1666/2009	CY146440
A/mallard/Minnesota/AI09_1851/2009	CY146448
A/northern_pintail/Interior_Alaska/9BM4989R0/2009	CY135471
A/American_green_winged_teal/Illinois/2975/2009_mixed_	CY096923
A/American_coot/Illinois/3405/2009	CY097159
A/lesser_scaup/Wisconsin/3964/2009	CY097293
A/lesser_scaup/Illinois/4115/2009	CY097526
A/mallard/Wisconsin/4230/2009	CY097301
A/northern_shoveler/Missouri/196/2009	CY097606
A/northern_shoveler/Arkansas/AI09_6012/2009	CY141041
A/northern_pintail/Interior_Alaska/10BM11380R0/2010	CY142570
A/northern_shoveler/Mississippi/236/2010	CY097143
A/mallard/Mississippi/329/2010	CY097694

A/American_green_winged_teal/Mississippi/404/2010_mixed_	CY097742
A/mallard/Interior_Alaska/10BM01929R0/2010	CY130364
A/mallard/California/1353/2010	CY094765
A/mallard/Nova_Scotia/00375/2010	CY138809
A/American_black_duck/New_Brunswick/00471/2010	CY139412
A/mallard_black_duck_hybrid/New_Brunswick/00904/2010	CY139377
A/mallard/Wisconsin/10OS3881/2010	CY133561
A/long_tailed_duck/Wisconsin/10OS3919/2010	CY133561
A/mallard/Illinois/10OS4078/2010	CY133489
A/northern_shoveler/Missouri/10OS4718/2010	CY133400
A/mallard/Missouri/10MO0391/2010	CY133843
A/American_wigeon/Missouri/10MO0530/2010	CY133859
A/northern_shoveler/California/3628/2011	CY120675
A/mallard/Ohio/11OS2044/2011	CY132173
A/American_green_winged_teal/Wisconsin/11OS3499/2011	CY166186
A/American_wigeon/California/2930/2011	CY134311
A/greater_scaup/Wisconsin/11OS5760/2011	CY166394
A/northern_shoveler/Arkansas/12OS160/2012	CY167151
A/mallard/Arkansas/12OS184/2012	CY167167
A/northern_shoveler/Mississippi/12OS231/2012	CY167184
A/American_green_winged_teal/Mississippi/12OS405/2012	CY166178
A/mallard/Mississippi/12OS443/2012	CY167259
A/mallard/California/2951/2012	CY157222
A/blue_winged_teal/Ohio/12OS2138/2012	CY186863
A/northern_shoveler/Illinois/12OS5294/2012	CY186724
A/northern_shoveler/Missouri/12OS5755/2012	CY186764
A/redhead/Ohio/13OS0507/2013	CY187061
A/American_green_winged_teal/Ohio/13OS1869/2013	KJ568017
<hr/>	
A/chicken/Germany/n/1949	CY014671
A/duck/Manitoba/1953	KF435049
A/quail/Italy/1117/1965	CY014644
A/duck/Hong_Kong/562/1979	AB292781
A/duck/Hong_Kong/938/80	AB271117
A/swan/Shimane/1331/1981	AB289339
A/chicken/Hubei/119/1983	EU559251
A/fowl/Hampshire/PD378/1985	GQ176120
A/mallard/Gloucestershire/PD374/1985	GQ176128
A/duck/Shimane/45/1997	AB296078
A/duck/Hokkaido/18/00	AB274041
A/mallard/Netherlands/02/2000	CY076945
A/avian/Israel/232/2001	JN564724
A/mallard/Sweden/223/2002	CY183580
A/mallard/Sweden/233/2002	CY184608
A/mallard/Sweden/51/2002	HM136575
A/mallard/Sweden/770/2002	CY183613

A/mallard/Sweden/43/2002	KF695200
A/mallard/Sweden/936/2002	CY184624
A/duck/Mongolia/149/03	AB450456
A/mallard/Sweden/7/2003	CY060374
A/mallard/Sweden/3151/2003	CY183645
A/duck/Hokkaido/24/04	AB450453
A/mallard/Sweden/4258/2004	CY183669
A/mallard/Sweden/4401/2004	CY183661
A/mallard/Sweden/6869/2004	CY184648
A/avian/Israel/824/2005	JN564733
A/mallard/Sweden/6039/2005	CY184640
A/mallard/Sweden/5824/2005	CY183685
A/mallard/Netherlands/4/2006	CY077064
A/duck/Tsukuba/574/2006	AB669138
A/mute_swan/Netherlands/1/2006	CY077040
A/northern_shoveler/Hong_Kong/MPC657/2006	KF259196
A/mallard/bavaria/3/2006	FJ183474
A/herring_gull/Netherlands/4/2006	CY077032
A/Duck/Indonesia/Jakarta_Utara1631_29/2006	EU124207
A/mallard/Sweden/51548/2006	CY183758
A/mallard/Sweden/52903/2006	CY183783
A/Eurasian_wigeon/Netherlands/4/2007	CY077048
A/duck/Hokkaido/W87/2007	AB450443
A/mallard/Sweden/64476/2007	CY183799
A/mallard/Sweden/59463/2007	CY183791
A/mallard/Sweden/69777/2007	CY183823
A/northern_shoveler/Hong_Kong/MPE2531/2008	KF259195
A/avian/Israel/543/2008	N564732
A/wild_bird/Korea/L110_2/2008	JN817580
A/common_teal/Hong_Kong/MPK630/2009	F259197
A/mallard/Portugal/79906/2009	Y116608
A/mallard/Sweden/93475/2009	CY183831
A/mallard/Sweden/105536/2009	CY183967
A/mallard/Sweden/105527/2009	CY183959
A/mallard/Republic_of_Georgia/1/2010	CY185449
A/wild_bird/Korea/A01/2011	JN817571
A/mallard/Republic_of_Georgia/12/2011	CY185505
A/goose/Guizhou/829/2012	KF259194
A/duck/Hunan/S11205/2012	CY146564
A/chicken/Jiangsu/RD5/2013	KF006414

Tabla VII. Secuencias del gen H10 utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

## H7

Linaje	Strain	Número de acceso a Genbank
<b>Norteamérica</b>	A/turkey/Minnesota/1/1988	CY014786
	A/chicken/PA/19241/1997	EU742961
	A/Chicken/NY/14714-2/1999	AY240921
	A/chicken/NJ/118878-5/2001	AY240884
	A/American black duck/Maryland/415/2001	GU053263
	A/Northern shoveler/NC/6412-052/2005	GU186474
	A/Guinea fowl/New York/101276-1/2005	CY034830
	A/Guinea fowl/New York/32084/2006	CY034238
	A/American green-winged teal/California/28228/2007	CY076005
	A/Canada goose/BC/3752/2007	EU500844
A/blue-winged teal/Guatemala/CIP049-01/2008	CY067670	
<b>Eurasia y Oceanía</b>	A/turkey/England/1963	CY130150
	A/African starling/England-Q/983/1979	AF202232
	A/chicken/Germany/01/1979	CY107844
	A/duck/Heinersdorf/S495/6/86	U20465
	A/chicken/Italy/1067/1999	GU052938
	A/mallard/Netherlands/12/2000	KF695239
	A/turkey/Germany/R11/2001	CY107856
	A/turkey/Italy/8534/2002	CY095530
	A/Guinea fowl/Italy/266184/02	EU158110
	A/chicken/England/4054/2006	EF467826
A/duck/Denmark/53-147-8/2008	GQ401157	
A/mallard/Netherlands/22/2007	CY043840	

Tabla VIII. Secuencias del gen H7 utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

## H5

<b>Linaje</b>	<b>Strain</b>	<b>Número de acceso a Genbank</b>
<b>Eurasia y Oceanía</b>	A/mallard/Czech Republic/14602-37K/2011(H5N2)	JQ737221
	A/Anas acuta/Slovenia/470/06	AM911100
	A/chicken/Belgium/150VB/1999	FJ750571
	A/chicken/France/03426a/03	AJ632269
	A/chicken/Italy/22A/1998	CY022621
	A/chicken/Italy/312/1997	EF597263
	A/chicken/Krasnodar/01/2006	DQ676834
	A/chicken/Poland/R3248/2007	FM163440
	A/chicken/Romania/2910/05	AM911077
	A/duck/Altai/1285/1991	EU564114
	A/duck/France/02166/2002	AJ632268
	A/duck/France/05054a/2005	AJ971298
	A/duck/France/06436/2006	CY046150
	A/duck/Ireland/113/1983	M18450 4
	A/duck/Italy/775/2004	CY024746
	A/duck/Potsdam/1402-6/1986	CY014642
	A/duck/Potsdam/2216-4/1984	CY006036
	A/duck/Switzerland/V487/2006	EU016354
	A/duck/Tuva/01/2006	DQ861291
	A/garganey/Altai/1213/2007	CY049772
	A/mallard/Bavaria/38/2006	GU046738
	A/mallard/Sweden/21/2002	GU052572
	A/mallard/Sweden/22/02	AY995886
	A/mallard/Sweden/39/02	AY995891
	A/Anhui/1/20005	DQ371928
	A/Bangladesh/3233/2011	CY088769
	A/Cambodia/W0112303/2012	JQ714246
	A/Chicken/Deli Derdang/BBPVI/2005	EU124091
	A/Chicken/Hong Kong/220/97	AF046080
	A/Indonesia/CDC759/2006	CY014543
	A/Mallard duck/Korea/W401/2011	JN202558
	A/Muscovy Duck/Viet Nam/NCVD02/2005	EF566202
	A/Shanghai/1/2006	AB462295
	A/Silky Chicken/Hong Kong/p17/97	AF098546
	A/Viet Nam/1204/2004	EF541404
	A/aquatic bird/Korea/w230/2007	GU361223
	A/aquatic bird/Korea/w96/2005	GU361197
	A/duck broiler/Malaysia/F189/07/04	DQ122147
	A/duck/Hong Kong/698/1979	EF597250
	A/duck/Malaysia/F119-3/97	AF303057
	A/duck/Shizuoka/40/2002	AB558458
	A/duck/Tsukuba/394/2005	AB558460

A/teal/Tottori/150/2002	AB535130
A/duck/Victoria/0305-2/2012	CY111533
A/duck/Victoria/26/1981	CY077685
A/shearwater/Australia/751/1975	CY045255
A/Egypt/1394-NAMRU3/2007	EF535817
A/Egypt/N03450/2009	CY041936
A/chicken/Egypt/10116s/2010	HQ198281
A/chicken/Egypt/1117/2011	JN807817
A/duck/Egypt/10185SS/2010	JN807780
A/spur-winged goose/Nigeria/5388-2/2007	EU544248
A/tern/South Africa/1961	U204601
A/turkey/Ivory Coast/4372-3/2006	CY020701

Tabla IX. Secuencias del gen H5 utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.



## H4

Linaje	Strain	Número de acceso a Genbank
	A/mallard/Wisconsin/14/1974	CY181241
	A/duck/Minnesota/110/1974	CY180468
	A/blue-winged teal/Wisconsin/278/1975	CY179755
	A/duck/Minnesota/24/1975	CY180476
	A/duck/Minnesota/A/1975	CY180492
	A/chicken/Alabama/1/1975	M25288
	A/duck/Minnesota/23/1975	CY177536
	A/duck/Minnesota/44/1975	CY180500
	A/mallard/Wisconsin/356/1976	CY180556
	A/duck/Alberta/28/1976	M25287
	A/mallard/Wisconsin/473/1976	CY180428
	A/blue-winged teal/Wisconsin/345/1976	CY180412
	A/green-winged teal/Wisconsin/404/1976	CY179019
	A/snipe/Wisconsin/330/1976	CY178986
	A/blue-winged teal/Wisconsin/778/1976	CY180436
	A/mallard/Wisconsin/607/1977	CY179331
	A/blue-winged teal/Wisconsin/330/1977	CY179219
	A/mallard/Wisconsin/394/1977	CY179323
	A/mallard/Alberta/209/1977	AB829333
	A/mallard duck/ALB/291/1977(H4N1)	CY005968
Norteamérica	A/mallard/Alberta/300/1977	CY005948
	A/pintail duck/ALB/220/1977(H4N8)	CY005952
	A/mallard duck/ALB/161/1977(H4N6)	CY005951
	A/blue-winged teal/Wisconsin/63/1978	CY181289
	A/blue-winged teal/Wisconsin/175/1978	CY181144
	A/duck/Wisconsin/1177/1978	CY177589
	A/mallard/Wisconsin/145/1978	CY181305
	A/mallard duck/ALB/354/1978(H4N2)	CY005953
	A/mallard/Alberta/223/1979(H4N2)	AB292406
	A/green-winged teal/Wisconsin/118/1979	CY180596
	A/blue-winged teal/Wisconsin/440/1979	CY180444
	A/mallard/Wisconsin/637/1979	CY180452
	A/blue-winged teal/ALB/580/1979(H4N2)	CY005955
	A/pintail duck/ALB/599/1979(H4N2)	CY005956
	A/turkey/Minnesota/833/1980(H4N2)	CY014751
	A/blue-winged teal/New York/370ac/1979(H4N2)	CY014922
	A/mallard/Wisconsin/120/1980	CY180852
	A/turkey/Minnesota/833/1980	M25290
	A/domestic duck/Minnesota/1086/1980(H4N8)	CY014723
	A/mallard/Wisconsin/477/1981	CY180300
	A/mallard/Wisconsin/333/1981	CY178398
	A/blue-winged teal/Saskatchewan/11/1982	CY181077

A/mallard/Wisconsin/830/1982	CY177798
A/mallard/Wisconsin/920/1982	CY177886
A/mallard/Saskatchewan/117/1982	CY178551
A/blue-winged teal/Wisconsin/281/1982	CY178575
A/mallard/Wisconsin/902/1982	CY178791
A/pintail duck/New York/155/1982(H4N3)	CY014937
A/mallard duck/New York/194/1982(H4N8)	CY014929
A/mallard/Wisconsin/1676/1983	CY179291
A/blue-winged teal/Wisconsin/402/1983(H4N6)	CY178799
A/mallard/Wisconsin/1683/1983	CY181361
A/mallard/Wisconsin/1621/1983	CY179339
A/blue-winged teal/Wisconsin/376/1983	CY177894
A/mallard duck/ALB/581/1983	CY005957
A/blue-winged teal/Wisconsin/393/1984	CY178607
A/mallard/Wisconsin/2304/1984	CY178046
A/mallard/Wisconsin/2191/1984	CY177998
A/mallard/Wisconsin/2134/1984	CY177982
A/mallard/Wisconsin/364/1984	CY180340
A/mallard duck/ALB/630/1984(H4N2)	CY005959
A/duck/Wisconsin/2731/1985	CY178438
A/ruddy turnstone/NJ/47/1985(H4N6)	M25289
A/blue-winged teal/ALB/562/1985(H4N6)	CY004847
A/pintail duck/ALB/623/1985(H4N6)	CY005961
A/blue-winged teal/Louisiana/3B/1986	CY139713
A/blue-winged teal/Alberta/427/1986(H4N6)	CY101571
A/mallard/Alberta/575/1986	CY101579
A/mallard duck/New York/180/1986(H4N9)	CY014857
A/mallard/Ohio/83/1986(H4N6)	CY015467
A/mallard/Ohio/338/1986(H4N8)	CY013248
A/green-winged teal/Ohio/344/1986	CY015459
A/mallard/Ohio/298/1987	CY012808
A/mallard/Ohio/275/1987(H4N2)	CY011056
A/ruddy turnstone/Delaware/2368/1988	CY101523
A/mallard/Ohio/324/1988(H4N6)	CY017701
A/mallard/Ohio/129/1989(H4N6)	CY020981
A/mallard/Ohio/97/1989	CY012816
A/mallard/Ohio/178/1990(H4N6)	CY021213
A/blue-winged teal/ALB/103/1990(H4N5)	CY005963
A/blue-winged teal/ALB/136/1990(H4N3)	CY005964
A/blue-winged teal/Alberta/121/1990(H4N6)	CY101643
A/mallard/Alberta/12/1991(H4N6)	CY101667
A/mallard/Alberta/18/1991(H4N6)	CY101675
A/mallard/Alberta/196/1992(mixed)	CY101788
A/blue-winged teal/ALB/293/1994(H4N6)	CY005965
A/mallard/ALB/49/1995(H4N6)	CY004911

A/mallard/Alberta/43/1995	CY102164
A/pintail/Alberta/275/1996	CY102204
A/mallard/Alberta/296/1996	CY102212
A/mallard/Alberta/267/1996	CY136944
A/mallard/Minnesota/182772/1998	CY139761
A/mallard/MN/327/1999(H4N8)	FJ517314
A/mallard/MN/323/1999(H4N8)	EU871892
A/mallard/MN/269/1999(H4N6)	EU871884
A/mallard/Alberta/235/1999	CY102625
A/mallard/Alberta/30/2001(H4N8)	CY004939
A/mallard/Alberta/38/2001	CY101306
A/pintail/Alberta/269/2001(H4N6)	CY005966
A/mallard/Ohio/686/2002(H4N2)	CY020805
A/mallard/Ohio/655/2002(H4N6)	CY020773
A/mallard/Ohio/667/2002(H4N6)	CY020725
A/black duck/Maryland/834/2002(H4N8)	CY020765
A/blue-winged teal/Ohio/989/2002	CY020749*
A/duck/Victoria/2853/2003(H4N8)	CY077624
A/mallard/Alberta/237/2003	CY102768
A/mallard/Alberta/254/2003(H4N6)	CY014562
A/mallard/Alberta/233/2003	CY102760
A/blue-winged teal/Alberta/293/2003(H4N6)	CY005967
A/mallard/Alberta/251/2004	CY102808
A/blue-winged teal/Barbados/21/04(H4N3)	DQ236166
A/green-winged teal/Ohio/1324/2005	CY021237
A/mallard/Maryland/1241/2005(H4N6)	CY021333
A/green-winged teal/Ohio/1292/2005	CY021349
A/turkey/CA/358533/2005(H4N8)	EU880820
A/mallard/Alberta/66/2005	CY102951
A/redhead/Alberta/11817/2005(H4N6)	CY047544
A/pintail/Alaska/99/2005	CY096756
A/mallard/California/GL30/2005(H4N6)	CY045335
A/green-winged teal/California/K218/2005(H4N6)	CY045351
A/common scoter/Maryland/299/2005	CY096774*
A/white-winged scoter/Maryland/301/2005(H4N6)	CY021893
A/bufflehead/North Carolina/NC6412-125/2005	CY144659
A/mallard/Minnesota/AI06-1135/2006(H4N6)	CY139961
A/mallard/Ohio/1501/2006	CY089574
A/mallard/Minnesota/AI06-962/2006(H4N8)	CY139969
A/blue-winged teal/Ohio/1850/2006	CY089507
A/mallard/Maryland/965/2006	CY089565
A/pekin duck/California/P30/2006(H4N2)	CY053821
A/mallard/Washington/44242-144/2006	CY076189
A/mallard/Washington/44242-271/2006	CY076205
A/mallard/Interior Alaska/6MP0891/2006	CY078595

A/mallard/Quebec/11106/2006(H4N6)	CY047624
A/mallard/Quebec/11182/2006(H4N6)	CY047640
A/mallard/Interior Alaska/6MP1096R2/2006(H4N6)	CY080271*
A/mallard/Alaska/44243-071/2006(H4N6)	HM193568
A/mallard/Alberta/190/2006(mixed)	CY103024
A/mallard/Alberta/297/2006	CY103170
A/American black duck/New Brunswick/19347/2006(H4N6)	CY045303
A/American black duck/New Brunswick/19389/2006(H4N8)	CY095426
A/green-winged teal/California/JN1114/2006(H4N6)	CY076848*
A/least sandpiper/South Central Alaska/2/2007(H4N8)	CY035783
A/avian/Southcentral Alaska/7KW0388R1/2007	CY079685
A/blue-winged teal/Minnesota/Sg-00042/2007	CY063969
A/blue-winged teal/Minnesota/Sg-00043/2007	CY063977
A/mallard/Minnesota/Sg-00045/2007	CY063993
A/mallard/Minnesota/Sg-00053/2007	CY064057
A/ring-necked duck/Minnesota/Sg-00067/2007	CY064161
A/blue-winged teal/Minnesota/Sg-00034/2007	CY063905
A/blue-winged teal/Minnesota/Sg-00036/2007	CY063921
A/blue-winged teal/Minnesota/Sg-00040/2007	CY063953
A/northern pintail/Interior Alaska/1/2007(H4N6)	CY036651
A/American black duck/Prince Edward Island/02684/2007	CY128934
A/American green-winged teal/Manitoba/23884/2007(H4N6)	CY047680
A/American black duck/Prince Edward Island/02697/2007	CY128836
A/mallard/Alberta/160/2007(H4N6)	CY103324
A/mallard/Alberta/145/2007(H4N6)	CY103306
A/mallard/Manitoba/23912/2007(H4N7)	CY047688
A/American black duck/Nova Scotia/02317/2007	CY125654
A/mallard/Nova Scotia/02335/2007	CY128910
A/blue-winged teal/Alberta/346/2007(H4N3)	CY103394
A/mallard/Nova Scotia/02446/2007	CY128812
A/mallard/Alberta/330/2007	CY103376
A/blue-winged teal/Alberta/340/2007(mixed)	CY103385
A/mallard/Washington/44338-018/2007	CY076541
A/northern shoveler/Interior Alaska/1/2007(H4N6)	CY039834
A/duck/Interior Alaska/7MP1550/2007	CY080191
A/duck/Interior Alaska/7MP1570/2007	CY078979
A/Anas discors/New Mexico/A00327695/2007	KF534792
A/northern pintail/Interior Alaska/7MP1644/2007	CY077364
A/green-winged teal/Interior Alaska/7MP1672R1/2007	CY079035
A/mallard/Interior Alaska/1/2007(H4N5)	CY039842
A/northern shoveler/Alaska/7MP0954/2007	CY044016
A/mallard/Alaska/7MP1028/2007	CY043968
A/mallard/Interior Alaska/7MP0512/2007	CY077262
A/northern pintail/Interior Alaska/2/2007(H4N8)	CY038370
A/mallard/Interior Alaska/7MP1050R1/2007	CY045423

A/northern shoveler/Oregon/44336-179/2007(H4N6)	CY076469
A/northern shoveler/Alaska/7MP1113/2007	CY043952
A/Anas discors/New Mexico/A00369794/2007	KF537367
A/blue-winged teal/Texas/Sg-00206/2007	CY078329
A/blue-winged teal/Texas/Sg-00188/2007	CY078305
A/blue-winged teal/Texas/Sg-00158/2007	CY078281
A/northern pintail/Interior Alaska/7MP1067R1/2007	CY077404
A/blue-winged teal/Texas/Sg-00081/2007	CY064241
A/blue-winged teal/Texas/Sg-00077/2007	CY064209
A/blue-winged teal/Texas/Sg-00076/2007	CY064201
A/American black duck/New Brunswick/02730/2007	CY129158
A/green-winged teal/New Brunswick/02630/2007	CY125397
A/mallard/Minnesota/Sg-00133/2007(H4N6)	CY041895
A/Anas cyanoptera/New Mexico/A00440905/2008	KF557768
A/red knot/New Jersey/Sg-00479/2008	CY144957
A/ruddy turnstone/New Jersey/Sg-00507/2008	CY145112
A/shorebird/Delaware Bay/296/2008	CY126590
A/shorebird/Delaware Bay/312/2008(H4N6)	CY127937
A/shorebird/Delaware Bay/446/2008(H4N6)	CY127991
A/ruddy turnstone/New Jersey/Sg-00506/2008	CY145104
A/ruddy turnstone/Delaware/Sg-00473/2008	CY145509
A/ruddy turnstone/New Jersey/Sg-00550/2008	CY145404
A/ruddy turnstone/Delaware/Sg-00541/2008	CY145337
A/ruddy turnstone/Delaware/Sg-00539/2008	CY145329
A/ruddy turnstone/New Jersey/Sg-00542/2008	CY145345
A/ruddy turnstone/New Jersey/Sg-00552/2008	CY145412
A/mallard/Minnesota/Sg-00616/2008	CY140269
A/mallard/Minnesota/Sg-00624/2008(H4N8)	CY042643
A/mallard/Minnesota/Sg-00697/2008	CY140334
A/mallard/Minnesota/Sg-00767/2008	CY140172
A/blue-winged teal/North Dakota/Sg-00706/2008	CY140112
A/green-winged teal/Minnesota/Sg-00820/2008	CY140374
A/northern pintail/North Dakota/Sg-00749/2008	CY140152
A/blue-winged teal/North Dakota/Sg-00750/2008	CY140164
A/blue-winged teal/Minnesota/Sg-01026/2008	CY140527
A/mallard/Minnesota/Sg-01039/2008	CY140575
A/northern pintail/Interior Alaska/8BM3608/2008	CY079661
A/mallard/Interior Alaska/8BM3627R1/2008	CY079195
A/mallard/New Jersey/Sg-00943/2008	CY145817
A/mallard/New Jersey/Sg-00966/2008	CY145825
A/mallard/New Jersey/Sg-00941/2008	CY145799
A/mallard/New Jersey/Sg-00965/2008	CY145485
A/mallard/New Jersey/Sg-00939/2008	CY145791
A/mallard/New Jersey/Sg-00760/2008	CY145735
A/mallard/New Jersey/Sg-00942/2008	CY145807

A/northern pintail/Interior Alaska/8BM3658/2008	CY079139
A/northern shoveler/Interior Alaska/8BM3684/2008(mixed)	CY079147
A/northern pintail/Interior Alaska/8BM3723/2008	CY079669
A/Anas platyrhynchos/New Mexico/A00443608/2008	CY122409
A/mallard/California/7766/2008	CY039739
A/mallard/Wisconsin/08OS2261/2008	CY079324
A/Anas carolinensis/Arizona/A00480494/2008	JN673246*
A/mallard/Wisconsin/08OS2254/2008(mixed)	CY079566
A/mallard/Illinois/08OS2315/2008	CY079444
A/American wigeon/Louisiana/Sg-01031/2008	CY140535
A/northern pintail/Louisiana/Sg-01033/2008	CY140551
A/northern shoveler/Illinois/08OS3331/2008	CY079508
A/mallard/California/6772/2008	CY094133
A/northern shoveler/California/9228/2008	CY094317
A/northern shoveler/California/9267/2008	CY094325
A/mallard/California/9573/2008	CY094229
A/mallard/California/11095/2008	CY094245
A/northern shoveler/California/10024/2008	CY094341
A/northern pintail/Interior Alaska/9BM7799R0/2009	CY136263
A/northern pintail/Interior Alaska/9BM12153R0/2009	CY136287
A/mallard/Interior Alaska/9BM8470R0/2009(mixed)	CY136296
A/mallard/Interior Alaska/9BM1869/2009	CY078747
A/mallard/Interior Alaska/9BM1807/2009(H4N6)	CY078739
A/mallard/Interior Alaska/9BM1958/2009	CY078771
A/mallard/Interior Alaska/9BM1968/2009	CY079823
A/mallard/Interior Alaska/9BM2239/2009	CY079870*
A/mallard/Interior Alaska/9BM2398R0/2009	CY130209
A/mallard/Interior Alaska/9BM2606R0/2009	CY130272
A/mallard/California/5495/2009	CY094637
A/northern pintail/Interior Alaska/9BM4347R0/2009	CY135367
A/mallard/California/5192/2009	CY094669
A/mallard/California/5205/2009	CY094677
A/mallard/California/5271/2009	CY094605
A/American green-winged teal/Interior Alaska/9BM5277R0/2009(H4N6)	CY135551
A/mallard/Ohio/2031/2009(H4N9)	CY097654
A/blue-winged Teal/Minnesota/AI09-2389/2009	CY140695
A/northern pintail/Interior Alaska/9BM7620R0/2009	CY142922
A/northern pintail/Interior Alaska/9BM7496R0/2009	CY142914
A/northern pintail/Interior Alaska/9BM8415R2/2009	CY142978
A/northern pintail/Interior Alaska/9BM7972R0/2009	CY143388
A/northern pintail/Interior Alaska/9BM8119R0/2009	CY142962
A/mallard/Interior Alaska/9BM9984R0/2009	CY143452
A/northern pintail/Interior Alaska/9BM10835R0/2009	CY143074
A/northern pintail/Interior Alaska/9BM10749R0/2009	CY143050
A/mallard/Wisconsin/1538/2009	CY097285

A/blue-winged teal/Prince Edward Island/03910/2009(H4N9)	CY125573
A/mallard/Ohio/1695/2009	CY097662
A/northern shoveler/Interior Alaska/9BM12314R0/2009	CY143162
A/northern shoveler/Interior Alaska/9BM12519R0/2009	CY143226
A/blue-winged Teal/North Dakota/AI09-3131/2009	CY140796
A/blue-winged teal/Louisiana/AI09-4180/2009	CY140927
A/blue-winged Teal/Minnesota/AI09-3786/2009	CY140876
A/blue-winged Teal/Minnesota/AI09-2977/2009	CY140761
A/mallard/Minnesota/AI09-3047/2009	CY140769
A/American black duck/New Brunswick/03551/2009	CY128500
A/blue-winged Teal/North Dakota/AI09-3881/2009	CY140903
A/blue-winged teal/New Brunswick/03756/2009(H4N2)	CY125581
A/mallard/New Jersey/AI09-6426/2009	CY146521
A/northern shoveler/Wisconsin/2508/2009	CY097430
A/mallard/Wisconsin/2530/2009	CY097446
A/mallard/Wisconsin/2719/2009	CY097478
A/blue-winged teal/Wisconsin/2741/2009	CY097026
A/blue-winged teal/Wisconsin/3061/2009	CY097219
A/blue-winged teal/Wisconsin/2665/2009	CY097470
A/blue-winged teal/Wisconsin/2753/2009	CY097042
A/bufflehead/Illinois/4016/2009	CY096970
A/mallard/Illinois/4124/2009	CY097542
A/mallard/Arkansas/AI09-5944/2009(H4N8)	CY141033
A/northern shoveler/Interior Alaska/10BM02593R0/2010	CY130429
A/mallard/Interior Alaska/10BM02644R0/2010	CY130437
A/ring-necked duck/Interior Alaska/10BM05617R0/2010	CY135779
A/mallard/Interior Alaska/10BM06456R0/2010	CY135907
A/American green-winged teal/Interior Alaska/10BM06728R0/2010(H4N6)	CY136043
A/mallard/California/1289/2010(H4N6)	CY094781
A/American green-winged teal/Interior Alaska/10BM07000R0/2010(H4N6)	CY136019
A/northern pintail/Interior Alaska/10BM07242R0/2010(H4N6)	CY143468
A/mallard/Ohio/10OS1319/2010(H4N6)	CY132133
A/mallard/Interior Alaska/10BM07971R0/2010	CY143532
A/northern pintail/Interior Alaska/10BM08514R0/2010(H4N6)	CY143620
A/northern pintail/Interior Alaska/10BM08540R0/2010(H4N6)	CY143628
A/northern pintail/Interior Alaska/10BM08612R0/2010	CY143644
A/mallard/Interior Alaska/10BM08828R0/2010	CY143660
A/northern pintail/Interior Alaska/10BM08903R0/2010	CY143676
A/red-necked grebe/Minnesota/AI10-2528/2010	CY141105
A/northern pintail/Interior Alaska/10BM10556R0/2010	CY143844
A/mallard/California/1523/2010	CY120579
A/American black duck/New Brunswick/00473/2010	CY138053
A/American black duck/New Brunswick/00472/2010	CY138914
A/northern pintail/Interior Alaska/10BM12146R0/2010(H4N6)	CY144103

A/mallard/Interior Alaska/10BM12308R0/2010(H4N6)	CY144015
A/mallard/Michigan/10OS1491/2010(H4N6)	CY132117
A/mallard/Interior Alaska/10CH00021R0/2010(H4N6)	CY143756
A/blue-winged teal/Illinois/10OS1561/2010	CY132901
A/American green-winged teal/Illinois/10OS1551/2010	CY132893
A/American green-winged teal/Illinois/10OS1598/2010	CY132917
A/American black duck/New Brunswick/00878/2010	CY139344
A/mallard/New Brunswick/00854/2010	CY139319
A/blue-winged teal/Missouri/10MO030/2010	CY133769
A/blue-winged teal/Missouri/10MO0407/2010	CY133851
A/blue-winged teal/Nova Scotia/00296/2010	CY138006
A/blue-winged teal/Nova Scotia/01009/2010	CY138512
A/mallard/Wisconsin/10OS2659/2010	CY133069
A/mallard/Wisconsin/10OS3067/2010	CY133258
A/mallard/Wisconsin/10OS2918/2010	CY133217
A/mallard/Iowa/10OS2692/2010	CY133440
A/mallard/Wisconsin/10OS3868/2010	CY132768
A/northern pintail/Mississippi/10OS4521/2010	CY132759
A/northern shoveler/California/4020/2011	CY134303
A/mallard/California/2584V/2011(H4N9)	CY134231
A/mallard/California/2589P/2011(H4N1)	CY134239
A/mallard/California/2533V/2011(H4N6)	CY133973
A/mallard/California/2563P/2011(H4N6)	CY134117
A/mallard/Ohio/11OS2047/2011(H4N8)	CY132420
A/mallard/Ohio/11OS2083/2011(H4N8)	CY132393
A/mallard/Ohio/11OS2095/2011	CY132549
A/blue-winged teal/Canada/3231/2011	CY149652
A/blue-winged teal/Missouri/11OS2585/2011	CY166955
A/American green-winged teal/Missouri/11OS2630/2011	CY166144
A/blue-winged teal/Canada/3237/2011	CY149668
A/northern pintail/Wisconsin/11OS3295/2011	CY166485
A/mallard/Wisconsin/11OS3407/2011	CY166589
A/northern pintail/Wisconsin/11OS3416/2011	CY166613
A/northern shoveler/Illinois/11OS4707/2011	CY167020
A/mallard/Wisconsin/11OS4204/2011	CY166410
A/mallard/Wisconsin/11OS3481/2011	CY166427
A/mallard/Wisconsin/11OS3491/2011	CY166452
A/American green-winged teal/Wisconsin/11OS3592/2011	CY166680
A/mallard/Illinois/11OS4311/2011	CY166378
A/bufflehead/Maine/287/2011	CY149580
A/bufflehead/California/3118/2011	CY134335
A/American green-winged teal/Mississippi/11OS5903/2011	CY166832
A/mallard/Ohio/12OS1418/2012	CY186496
A/mallard/California/3474/2012	CY157494
A/mallard/California/3471/2012	CY157486



A/mallard/California/3460/2012	CY157478
A/blue-winged teal/Missouri/12OS2519/2012	CY186756
A/blue-winged teal/Missouri/12OS2402/2012	CY186453
A/blue-winged teal/Ohio/12OS2244/2012	CY186895
A/blue-winged teal/Ohio/12OS2293/2012	CY186927
A/blue-winged teal/Ohio/12OS3128/2012	CY186951
A/American green-winged teal/Wisconsin/12OS4281/2012	CY187184
A/blue-winged teal/Illinois/12OS4763/2012	CY186638
A/mallard/Ohio/12OS5547/2012	CY187045
A/mallard/Illinois/12OS4808/2012	CY186716
A/mallard/California/1497/2013(H4N6)	CY177409
A/mallard/California/940V/2013(H4N6)	CY177101
A/blue-winged teal/Ohio/13OS1759/2013	KJ527630
A/American green-winged teal/Ohio/13OS1429/2013(H4N6)	KJ527638
A/blue-winged teal/Ohio/13OS1783/2013	KJ568025
A/blue-winged teal/Iowa/13OS2359/2013	KJ568129
A/blue-winged teal/Iowa/13OS2357/2013	KJ568105
A/American green-winged teal/Ohio/13OS2050/2013(H4N6)	KJ567881
A/blue-winged teal/Iowa/13OS2338/2013	KJ567921
A/blue-winged teal/Iowa/13OS2349/2013	KJ568153
<hr/>	
A/duck/Hong Kong/24/1976(H4N2)	CY006030
A/duck/New Zealand/31/1976	M25286
A/budgerigar/Hokkaido/1/1977	M25285
A/duck/Hong Kong/229/1977(H4N3)	AB292408
A/grey teal/Australia/2/1979	M25284
A/gray teal/Western Australia/1855/1979(H4N6)	CY031156
A/duck/Hong Kong/24/1976(H4N2)	CY006030
A/duck/New Zealand/31/1976	M25286
A/budgerigar/Hokkaido/1/1977	M25285
A/duck/Hong Kong/229/1977(H4N3)	AB292408
A/grey teal/Australia/2/1979	M25284
A/gray teal/Western Australia/1855/1979(H4N6)	CY031156
A/duck/Hong Kong/951/1980(H4N1)	AB292404
A/duck/Victoria/3/1980	CY094919
A/red-necked stint/Western Australia/4094/1984(H4N8)	CY035890
A/duck/Western Australia/8108/1984	CY092161
A/duck/Western Australia/8346/1987	CY092177
A/duck/Victoria/D23/1994(H4N2)	CY045247
A/duck/Siberia/701/1996(H4N6)	AB292662
A/duck/Taiwan/wb1/1998(H4N2)	GU066542
A/duck/Taiwan/wb14/1998(H4N6)	GU066545
A/duck/Taiwan/wb51/1999(H4N6)	GU066553
A/duck/Taiwan/wb7/1999(H4N6)	GU066543
A/mallard/Netherlands/1/1999(H4N6)	CY060241
A/duck/Taiwan/wb25/1999(H4N6)	GU066547
A/Duck/Nanchang/4-165/2000(H4N6)	CY006017

**Eurasia y  
Oceania**

A/shoveler/Buryatiya/1898/2001	GU052367
A/duck/Siberia/378/2001(H4N6)	AB295609
A/duck/Victoria/2001	CY077433
A/duck/Taiwan/wb131/2001(H4N8)	GU066554
A/mallard/Netherlands/12/2001(H4N2)	CY060220
A/duck/Mongolia/583/02(H4N7)	AB289333
A/mallard/Netherlands/1/2002(H4N6)	CY060234
A/mallard/Sweden/46/2002	CY060288
A/mallard/Sweden/906/2002	CY164256
A/mallard/Sweden/1195/2002	CY164272
A/duck/Taiwan/wb281/2002(H4N6)	GU066556
A/mallard/Sweden/1705/2002	CY164320
A/mallard/Sweden/1883/2003	CY164336
A/mallard/Sweden/2120/2003	CY164352
A/mallard/Sweden/7582/2003	CY164536
A/red-necked stint/Australia/4/2004	CY039255
A/duck/Shiga/8/2004(H4N6)	AB304147
A/mallard/New Zealand/449-66/2004	CY077505
A/mallard/Sweden/4508/2004	CY164416
A/mallard/Sweden/4514/2004	CY164424
A/mallard/ZhaLong/88/2004(H4N6)	FJ349247
A/mallard/Netherlands/2/2005(H4N2)	CY041250
A/mallard/Sweden/65/2005(H4N3)	CY041354
A/mallard/Sweden/7925/2005(H4N6)	CY164544
A/mallard/Sweden/3715/2004	CY164408
A/mallard/Yan chen/2005(H4N6)	EU880342
A/mallard/Sweden/5640/2005	CY164432
A/mallard/Sweden/5734/2005	CY164464
A/mallard/Sweden/5811/2005	CY164504
A/mallard/Sweden/5803/2005	CY164496
A/duck/Shimane/13/2006(H4N3)	AB669135
A/common eider/Netherlands2/2006(H4N8)	CY076913
A/common pochard/Aktau/1455/2006(H4N6)	FJ434370
A/duck/Taiwan/wb917/2006(H4N6)	GU066563
A/black-headed gull/Netherlands/1/2006	CY076992
A/wild bird/Korea/GS26/2006	JX454729
A/mallard/Sweden/50041/2006(H4N6)	CY164552
A/mallard/Sweden/50108/2006	CY164560
A/rufous-necked stint/Japan/6KS0242/2006(H4N8)	CY089485
A/mallard/Sweden/50709/2006(H4N5)	CY164568
A/mallard/Sweden/51198/2006(H4N6)	CY164576
A/mallard/Sweden/51284/2006	CY164584
A/mallard/Sweden/52062/2006	CY164830
A/mallard/Sweden/52299/2006	CY164899
A/mallard/Sweden/52249/2006(H4N6)	CY164883
A/mallard/Sweden/52405/2006	CY164155

A/mallard/Sweden/52371/2006	CY164931
A/mallard/PT/35910-2/2006(H4N6)	HM849017
A/duck/Taiwan/wb1162/2006(H4N6)	GU066541
A/duck/Taiwan/wb1104/2006(H4N6)	GU066565
A/mallard/Netherlands/7/2007	CY076921
A/duck/Mongolia/274/2007(H4N3)	AB450446
A/wild bird/Korea/YJ117/2007	JX454761
A/mallard/Czech Republic/12652/2007(H4N6)	HQ244423
A/mallard/Sweden/59896/2007	CY165058
A/duck/PoyangLake/FB13/2007(H4N6)	FJ439566
A/mallard/Sweden/60043/2007	CY165074
A/mallard/Sweden/68504/2007	CY165098
A/mallard/Sweden/69673/2007	CY165268
A/duck/Korea/DY104/2007	JX454713
A/duck/Jiangxi/22041/2008	KF258950
A/duck/Guangxi/912/2008(H4N2)	CY076892
A/mallard/Sweden/75279/2008	CY165284
A/teal/Chany/769/2008	CY100067
A/goose/Zambia/07/2008(H4N6)	AB569519*
A/wild duck/Korea/SH5-60/2008	JX454753
A/wild duck/Korea/SH5-26/2008(H4N6)	JX454745*
A/avian/Japan/8KI0185/2008(H4N6)	CY079219
A/duck/Moscow/3558/2008	GU991378
A/mallard/Sweden/79372/2008	CY165393
A/mallard/Sweden/79978/2008	CY165458
A/mallard/Sweden/80299/2008	CY165643
A/mallard/Sweden/80348/2008	CY165651
A/duck/Hunan/8-19/2009	HQ285886
A/mallard/Sweden/93211/2009	CY165686
A/eurasian wigeon/Mongolia/340V/2009	KF501075
A/mallard/Sweden/99967/2009	CY165702
A/wild duck/Korea/CSM20-5/2009	JX454698
A/mallard/Sweden/100881/2009	CY165718
A/duck/Taiwan/DC88/2009	KC784987
A/mallard/Sweden/101431/2009	CY165774
A/mallard/Sweden/101632/2009	CY165830
A/duck/India/WB-NIV10736/2009	JX310059
A/chicken/India/WB-NIV101006/2009	JX310061
A/chicken/India/WB-NIV101018/2009	JX310062
A/wild duck/Korea/CSM4-28/2010	JX454690
A/ruddy shelduck/Mongolia/1682/2010	KF501082
A/ruddy shelduck/Mongolia/1626/2010	KF501060
A/mallard/Czech Republic/13579-84K/2010(H4N6)	JF789618
A/duck/Nanjing/1102/2010(H4N8)	KC683703
A/mallard/Sweden/124418/2010	CY166088
A/Khaki Campbell duck/Karachi/NARC-23963/2010	JN714468

A/duck/Jiangsu/1-15/2011	KC282879
A/mallard/Mongolia/1402/2011	KF501062
A/common teal/Mongolia/1920/2011	KF501091
A/common shelduck/Mongolia/2026/2011	KF501087
A/chicken/Pakistan/NARC-28842/2011(H4N6)	KF113545
A/common teal/Mongolia/2299/2011	KF501092
A/duck/Taiwan/DV2359/2011	KJ645713
A/garganey/Republic of Georgia/1/2011	CY185481
A/duck/Thailand/CU-11840T/2011	KJ161945
A/duck/Hunan/S11547/2012	CY146580
A/duck/Hunan/S11313/2012	CY146572
A/duck/Hunan/S11090/2012	CY146548
A/duck/Mongolia/OIE-241/2012	AB780473
A/duck/Guangxi/125D17/2012(H4N2)	KJ881013

Tabla X. Secuencias del gen H4 utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

# H1

Linaje	Strain	Número de acceso a Genbank
<b>Norteamérica</b>	A/mallard/Alberta/42/1977	CY004458
	A/duck/Minnesota/1375/1981	CY014733
	A/duck/NJ/7717-70/1995	EU026110
	A/Turkey/MO/24093/99	AY038014
	A/blue winged teal/TX/34/2002	FJ357037
	A/mallard/Maryland/170/2002	EU026037
	A/mallard/Maryland/42/2003	FJ357128
	A/mallard/Alberta/11393/2005	CY095276
	A/northern shoveler/California/K168/2005	CY053797
	A/mallard/Alberta/76/2006	CY077150
	A/mallard/Interior Alaska/7MP0747/2007	CY078955
	A/Steller's eider/Alaska/44354-321/2007	JF323752
	A/mallard/Minnesota/Sg-00579/2008	CY042636
	A/blue-winged teal/Wisconsin/2509/2009	CY097438
	A/American green-winged teal/Illinois/3054/2009	CY097195
	A/ring_billed_gull/Quebec/G066/2010	CY138105
	A/American_green_winged_teal/Wisconsin/10OS2847/2010	CY133085
	A/green_winged_teal/California/2940/2011	CY134319
	A/lesser_scaup/Wisconsin/12OS4408/2012	CY187069
	A/mallard/Ohio/13OS1966/2013	KJ567953
<b>Eurasia y Oceanía</b>	A/duck/NZL/160/1976	CY005735
	A/duck/Bavaria/1/1977	AF091313
	A/duck/Victoria/23/1981	CY077677
	A/turkey/Netherlands/543301/1999	HE802061
	A/mallard/Sweden/3/2002	CY060268
	A/mallard/Sweden/57/2003	CY060329
	A/duck/Hebei/843/2005	FJ536843
	A/duck/Italy/281904/2006	FJ432770
	A/duck/Korea/U11/2007	HQ014832
	A/Anas crecca/Spain/1404/2007	FN386465
	A/Bewick's swan/Netherlands/1/2007	CY076976
	A/Egyptian goose/South Africa/AI1448/2007	GQ404705
	A/pintail/Akita/1353/2008	AB546167
	A/mallard/Korea/KNU YP09/2009	HQ897965
	A/duck/Hokkaido/327/2009	AB560965
	A/duck/Nanjing/20/2010	HQ336721
	A/duck/Zhejiang/0611-15/2011	JN716320

Tabla XI. Secuencias del gen H1 utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

## N9

<b>Linaje</b>	<b>Strain</b>	<b>Número de acceso a Genbank</b>
<b>Norteamérica</b>	A/mallard duck/ALB/294/1977	
	A/gull/Maryland/19/1977	
	A/redhead duck/ALB/357/1983	
	A/mallard/Wisconsin/2289/1984	
	A/ruddy turnstone/NJ/60/1985	
	A/laughing gull/NJ/72/1985	
	A/mallard duck/Tennessee/11457/1985	
	A/black duck/Ohio/239/1986	
	A/green-winged teal/Ohio/340/1987	
	A/mallard/Ohio/265/1987	
	A/ruddy turnstone/DE/637/1988	
	A/turkey/Minnesota/1/1988	
	A/mallard/Ohio/173/1990	
	A/blue-winged teal/Ohio/96/1993	
	A/pintail/Alberta/22/97	
	A/duck/Washington/663/1997	
	A/blue-winged teal/ALB/16/1997	
	A/mallard/Ohio/209/1998	
	A/black duck/Ohio/161/1999	
	A/pintail/Alberta/84/2000	
	A/mallard/Alberta/31/2001	
	A/shorebird/DE/236/2003	
	A/mallard/Alberta/245/2003	
	A/shorebird/DE/68/2004	
	A/mallard/Maryland/1124/2005	
	A/mallard/Missouri/MO32/2005	
	A/american black duck/Ohio/1823/2005	
	A/environment/Maryland/566/2006	
	A/ruddy_turnstone/Ilha_de_Canelas/A08/2008	
	>KF772950 A/wild_bird/Chile/1805/2008	
	>KF772958 A/seagull/Chile/5775/2009	
	A/blue_winged_teal/Prince_Edward_Island/03910/2009	
	A/ruddy_turnstone/New_Jersey/AI09_1144/2009	
A/mallard/New_Brunswick/00879/2010		
A/northern_shoveler/Mississippi/11OS5812/2011		
A/mallard/Wisconsin/13OS2800/2013		
<b>Eurasia y Oceanía</b>	A/duck/Siberia/700/1996	
	A/pintail/Shimane/324/98	
	A/Duck/Nanchang/2-0486/2000	
	A/swan/Shimane/190/2001	
	A/duck/Hokkaido/W245/2004	

A/sharp-tailed sandpiper/Australia/6/2004  
A/shorebird/Korea/S8/2006  
A/mallard/Netherlands/42/2006  
A/mallard/Sweden/52903/2006  
A/duck/Hunan/1590/2007  
A/northern\_shoveler/Hong\_Kong/MPE2531/2008  
A/Anas\_crecca/Spain/1460/2008  
A/mallard/Czech\_Republic/15902\_18K/2009  
A/duck/Jiangxi/3286/2009  
A/mallard/Czech\_Republic/13438\_29K/2010  
A/northern\_shoveler/Hong\_Kong/MPL133/2010  
A/duck/Jiangxi/22597/2012  
A/duck/Nha\_Trang/15/2013

Tabla XII. Secuencias del gen N9 utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

## N8

<b>Linaje</b>	<b>Strain</b>	<b>Número de acceso a Genbank</b>
<b>Norteamérica</b>	A/pintail duck/ALB/220/1977(H4N8)	
	A/turkey/Minnesota/501/1978(H6N8)	
	A/pintail duck/ALB/121/1979(H7N8)	
	A/green-winged teal/ALB/438/1979(H3N8)	
	A/wood duck/New York/60/1982(H6N8)	
	A/mallard duck/New York/194/1982(H4N8)	
	A/blue-winged teal/ALB/569/1985(H3N8)	
	A/green-winged teal/Ohio/466/1987(H3N8)	
	A/herring gull/DE/677/1988(H2N8)	
	A/laughing gull/NJ/276/1989(H6N8)	
	A/mallard/Ohio/64/1989(H6N8)	
	A/blue-winged teal/Alberta/120/1991(H3N8)	
	A/mallard/Alberta/76/1994(H6N8)	
	A/mallard/ALB/206/1996(H6N8)	
	A/black duck/Maryland/834/2002(H4N8)	
	A/duck/NY/191255-59/2002(H5N8)	
	A/mallard/Ohio/654/2002(H3N8)	
A/mallard/Maryland/2022/2005(H6N8)		
A/pintail/Alaska/49/2005(H3N8)		
A/longtail duck/Maryland/291/2005(H3N8)		
<b>Eurasia y Oceania</b>	A/duck/Ukraine/1/1963(H3N8)	
	A/quail/Italy/1117/1965(H10N8)	
	A/shearwater/Australia/2/1972 (H10N8)	
	A/cockatoo/England/1972(H4N8)	
	A/duck/Chabarovsk/1610/1972(H3N8)	
	A/duck/Hong Kong/438/1977(H4N8)	
	A/Duck/Hokkaido/8/1980 (H3N8)	
	A/red-necked stint/Western Australia/4923/1983 (H3N8)	
	A/black-headed gull/Netherlands/1/2000(H13N8)	
	A/duck/Siberia/100/2001(H3N8)	
	A/duck/Victoria/5384/2002 (H4N8)	
	A/wild bird feces/Korea/ES1-9/2003(H10N8)	
	A/duck/Norway/1/2003(H3N8)	
	A/red-necked stint/Australia/3/2004 (H4N8)	
	A/duck/Beijing/40/2004(H3N8)	
	A/duck/Eastern China/90/2004(H3N8)	
	A/duck/Eastern China/18/2005(H3N8)	
A/black-headed gull/Netherlands/1/2005(H6N8)		
A/Anas platyrhynchos/Spain/0454/2006(H3N8)		
A/mallard/Finland/12072/2006(H3N8)		
A/mallard/Netherlands/33/2006(H7N8)		



A/duck/Spain/539/2006(H6N8)  
A/gadwall/Altai/1328/2007(H3N8)  
A/turnstone/Netherlands/1/2007(H3N8)

Tabla XIII. Secuencias del gen N8 utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

## N7

Linaje	Strain	Número de acceso a Genbank
	A/redhead duck/ALB/767/1984	CY005215
	A/herring gull/Delaware Bay/433/1986	CY117455
	A/laughing gull/New Jersey/798/1986	CY101384
	A/duck/Alaska/702/1991	AB450436
	A/shorebird/Delaware_Bay/285/1994	CY185823
	A/mallard/Alberta/2/1995	CY136866
	A/shorebird/Delaware_Bay/31/1996	CY102190
	A/ruddy turnstone/Delaware Bay/261/1999	CY102534
	A/mallard/Maryland/209/2001	GQ257465
	A/mallard/Alberta/150/2002	CY137468
	A/ruddy_turnstone/New_Jersey/AI03_128/2003	CY144541
	A/ruddy_turnstone/NJ/350/2004	EU743404
<b>Norteamérica</b>	A/mallard/PT/14683/2006	HM849014
	A/ring_necked_duck/Michigan/588/2006	CY081326
	A/cinnamon teal/California/HKWF1111C/2007	CY094439
	A/common murre/Oregon/20361-001/2007	CY076103
	A/American wigeon/California/HKWF450/2007	CY032910
	A/northern shoveler/California/HKWF1021/2007	CY033326
	A/American green-winged teal/Illinois/08OS2713/2008	CY079470
	A/mallard/California/9704/2008	CY093665
	A/mallard/Mississippi/329/2010	CY097696
	A/American_green_winged_teal/Wisconsin/11OS3499/2011	CY166188
	A/northern_shoveler/Arkansas/12OS112/2012	CY167128
	A/American_green_winged_teal/Ohio/13OS2070/2013	KJ568379
	A/chicken/Delaware/10851/2014	KM244102
	A/chicken/Victoria/1/1985	CY025071
	A/duck/Shimane/45/1997	AB296079
	A/duck/Taiwan/4201/99	AB450450
	A/duck/Mongolia/583/02	AB289334
	A/mallard/Sweden/109/2002	CY122033
	A/mallard/Sweden/111/2002	CY122041
	A/chicken/Netherlands/03010132/03	EF015553
	A/mallard/Denmark/64650/03	AY531030
<b>Eurasia y Oceanía</b>	A/mallard/Denmark/64650/2003	AY531030
	A/Anas crecca/Germany/Wv177/05	AM933237
	A/Anas_crecca/Germany/Wv177/05	AM933237
	A/Anser_anser/Germany/R752/06	AM933236
	A/mallard/Sweden/59463/2007	CY183793
	A/duck/Hokkaido/W90/2007	AB450445
	A/mallard/Korea/GH170/2007	FJ750866
	A/mallard/Manitoba/23912/2007	CY047690
	A/mute swan/Hungary/5973/2007	GQ240815

A/duck/Chiba/13/2008	AB472061
A/mallard/Sweden/100993/2008	FJ803196
A/wild_duck/Jiangxi/19831/2009	KF259624
A/mallard/Republic_of_Georgia/1/2010	CY185419
A/common_teal/Hong_Kong/MPL634/2011	KF259637
A/goose/Guizhou/829/2012	KF259619
A/black_headed_gull/Republic_of_Georgia/7/2012	CY185651
A/duck/Zhejiang/465/2013	KF357789

Tabla XIV. Secuencias del gen N7 utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

## N6

Linaje	Strain	Número de acceso a Genbank
	A/duck/Minnesota/110/1974	CY180470
	A/blue_winged_teal/Wisconsin/123/1978	CY181259
	A/mallard_duck/ALB/676/1979	CY004123
	A/green_winged_teal/Wisconsin/121/1980	CY180862
	A/blue-winged teal/MN/993/1980	CY005883
	A/blue_winged_teal/ALB/266/1982	CY004164
	A/mallard/Wisconsin/1944/1983	CY178505
	A/mallard/Pennsylvania/9001/1984	CY117335
	A/mallard/Ohio/83/1986	CY015469
	A/mallard/Ohio/156/1990	CY017711
	A/blue-winged teal/ALB/293/1994	CY004905
	A/mallard/ALB/49/1995	CY004913
	A/mallard/Minnesota/192/1999	FJ517306
	A/mallard/Minnesota/313/2000	GU051241
<b>Norteamérica</b>	A/mallard/Alberta/35/2001	CY102682
	A/blue-winged teal/Alberta/293/2003	CY004955
	A/Northern shoveler/NC/6412-052/2005	GU186476
	A/blue-winged teal/Ohio/1714/2005	CY081318
	A/American black duck/New Brunswick/19347/2006	CY045305
	A/American wigeon/Minnesota/Sg-00231/2007	CY042250
	A/Steller's eider/Alaska/44354-138/2007	JF323782
	A/blue-winged teal/North Dakota/Sg-00753/2008	CY054516
	A/ruddy turnstone/New Jersey/Sg-00506/2008	CY038142
	A/blue-winged teal/Wisconsin/2753/2009	CY097044
	A/mallard/California/1297/2010	CY120685
	A/mallard/California/2590V/2011	CY134257
	A/blue_winged_teal/Guatemala/CIP049H106_62/2011	KJ195670
	A/mallard/Ohio/12OS2351/2012	CY186816
	A/mallard/California/1324V/2013	CY177119
	A/duck/Czechoslovakia/1956	AB295612
	A/duck/England/1/1956	AB288846
	A/thick_billed_murre/Alaska/222/1976	CY179621
	A/gull/Maryland/704/1977	CY089639
	A/duck/Hong Kong/147/1977	CY005641
<b>Eurasia y Oceanía</b>	A/duck/Potsdam/2216_4/1984	CY005774
	A/Larus argentatus/Astrakhan/458/1985	EU580570
	A/red_knot/Delaware/541/1988	CY101484
	A/herring_gull/New_Jersey/159/1990	CY101621
	A/shorebird/Delaware/224/1997	CY015148
	A/wild_duck/Taiwan/WB2/1998	GU396878
	A/duck/Siberia/272/1998	AB284990

A/pochard/Buryatiya/1903/2000	U052376
A/wild_duck/Taiwan/WB28/2000	GU396879
A/duck/Nanchang/4-165/2000	CY005488
A/duck/Siberia/378/2001	AB295610
A/environment/Korea/CSM3/2002	JN087014
A/mallard/Germany/Wv1806-09k/03	AM933235
A/duck/Korea/LPM38/2005	EU301292
A/mallard/Norway/10_1334/2006	FM179763
A/common pochard/Aktau/1455/2006	FJ434372
A/duck/Fujian/3796/2006	CY109532
A/Mongolian gull/Mongolia/405/2007	GQ907320
A/mallard/Altai/1208/2007	CY049766
A/duck/Fujian/145/2007	CY110652
A/avian/Japan/8KI0185/2008	CY079221
A/glaucous-winged gull/Southcentral Alaska/9JR0769R0/2009	CY070876
A/duck/Eastern China/7/2009	JF965325
A/duck/Mongolia/OIE-7438/2011	AB701295
A/black_headed_gull/Republic_of_Georgia/1/2012	CY185327
A/duck/Zhejiang/D1_3/2013	KJ439878
A/muscovy_duck/Vietnam/LBM687/2014	LC000590

Tabla XV. Secuencias del gen N6 utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

### N3

Linaje	Strain	Número de acceso a Genbank
Norteamérica	A/blue-winged teal/ALB/295/1977	CY005017
	A/blue-winged teal/Alberta/604/1978	CY120779
	A/chicken/New York/28263/1989	CY014911
	A/blue-winged teal/ALB/136/1990	CY004898
	A/mallard duck/ALB/191/1990	CY004236
	A/chicken/NY/12273-11/1999	HQ541712
	A/cinnamon_teal/Bolivia/4537/2001	DQ525412
	A/blue winged teal/TX/34/2002	FJ357039
	A/blue-winged teal/Barbados/21/04	DQ236167
	A/cinnamon teal/California/44287-659/2007	CY076463
	A/American black duck/NB/2538/2007	EU500854
	A/American coot/Mississippi/09OS615/2009	CY079406
	A/American green-winged teal/Illinois/2479/2009	CY097205
	A/northern_shoveler/Arkansas/12OS160/2012	CY167153
	A/American_green_winged_teal/Mississippi/12OS311/2012	CY167194
A/northern_shoveler/Illinois/12OS4951/2012	CY186750	
A/blue_winged_teal/Iowa/13OS2316/2013	KJ568347	
Eurasia y Oceanía	A/tern/South Africa/1961	GU052824
	A/turkey/England/1963	CY015067
	A/duck/Germany/1215/1973	AY207522
	A/pintail/Primorie/625/76	AY207518
	A/duck/Hong_Kong/22A/1976	AB292411
	A/duck/Hong Kong/229/1977	AB292409
	A/duck/Rugen/79-6/1981	CY117109
	A/Peking duck/Heinersdorf/648-4/1986	CY117181
	A/mallard/Ireland/PV46B/1993	AB303078
	A/bantam/Nanchang/9-366/2000	CY005447
	A/mallard/Netherlands/12/2000	GU053032
	A/chicken/Chakwal/NARC-35/2001	FJ577520
	A/northern_pintail/Sweden/1/2003	CY122109
	A/mallard/Sweden/1883/2003	CY164338
	A/duck/Eastern_China/395/2003	EU429704
	A/duck/Italy/775/2004	CY024748
	A/mallard/Sweden/51/2005	CY122173
	A/bar headed goose/Mongolia/143/2005	GQ907288
	A/duck/France/05054a/2005	AM040151
	A/wild_duck/Jiangxi/10179/2005	KF259613
	A/spot-billed duck/Korea/KNU SYG06/2006	JF800146
	A/Perdix perdix/Germany/R44/06	AM933234
	A/aquatic_bird/Korea/w209/2007	GU361345
A/common teal/Netherlands/2/2008	CY122286	
A/duck/Hokkaido/327/2009	AB560966	

A/northern shoveler/Georgia/1/2010	CY121985
A/duck/Nanjing/20/2010	HQ336722
A/mallard/Netherlands/29/2010	CY122294
A/black_headed_gull/Republic_of_Georgia/5/2011	CY185319
A/duck/Zhejiang/5/2011	JX051231

Tabla XVI. Secuencias del gen N3 utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

## N2

<b>Linaje</b>	<b>Strain</b>	<b>Número de acceso a Genbank</b>
<b>Norteamérica</b>	A/mallard_duck/ALB/250/1978	CY004001
	A/duck/Pennsylvania/10218/1984	AB295604
	A/mallard_duck/ALB/10/1985	CY004188
	A/mallard_duck/ALB/294/1987	CY004525
	A/chicken/Connecticut/13657/1990	CY116909
	A/pheasant/MD/4457/1993	EU743115
	A/chicken/New_Jersey/13839_17/1995	CY117053
	A/shorebird/Delaware_Bay/91/1996	CY127383
	A/guineafowl/New_York/13820_3/97	AY254139
	A/mallard/Minnesota/371/1998	FJ517302
	A/green_winged_teal/Ohio/81/1999	CY017847
	A/mallard/Maryland/302/2001	GU053469
	A/mallard/Ohio/666/2002	CY020783
	A/duck/NY/191255_79/02	AY300944
	A/Japanese_quail/CA/K0401010/2004	EU182267
	A/blue_winged_teal/Ohio/1387/2005	CY021863
	A/quail/New_York/89641/2005	CY034392
	A/mallard/BC/373/2005	DQ985168
	A/muscovy_duck/New_York/23165_13/2005	CY033227
	A/ruddy_turnstone/New_Jersey/AI06_539/2006	CY144701
	A/waterfowl/Colorado/476466_3/2007	GQ923383
	A/mallard/Minnesota/Sg_00949/2008	CY140485
	A/mallard/New_Jersey/AI09_5405/2009	CY146507
	A/green_winged_teal/California/6588/2009	CY157512
	A/northern_pintail/Wisconsin/11OS3295/2011	CY166487
	<b>Eurasia y Oceanía</b>	A/duck/Hokkaido/5/1977
A/duck/Nanchang/1749/1992		Y005532
A/duck/Victoria/D23/1994		CY045249
A/chicken/Korea/25232_96006/1996		KF188388
A/chicken/Italy/330/1997		GU052405
A/pheasant/Ireland/PV18/97		AF508581
A/duck/Hokkaido/49/98		AB251944
A/white_fronted_goose/Netherlands/22/1999		CY121961
A/Pekin_duck/France/43/00		AJ574902
A/duck/Mongolia/54/2001		AB298276
A/duck/Shantou/1706/2002		HM144624
A/duck/Eastern_China/262/2002		EU429743
A/duck/Italy/4609/2003		CY031030
A/mallard/New_Zealand/449_68/2004		CY077515
A/duck/Denmark/65047/2004		DQ251448
A/duck/Hainan/4/2004		AY706954
A/duck/Shantou/6847/2004		HM144655



A/mallard/Netherlands/26/2005	CY041420
A/duck/Guangxi/51/2005	EU086236
A/mallard/Netherlands/71/2006	CY041396
A/mallard/Hei_Longjiang/131/2006	EF634342
A/duck/Tasmania/277/2007	CY033163
A/aquatic_bird/Korea/w191/2007	GU361246
A/avian/Israel/314/2008	FJ464618
A/mallard/Sweden/79316/2008	CY165337
A/common_gull/Norway/10_1313/2009	HE802717
A/ruddy_shelduck/Mongolia/590C2/2009	KF667701
A/mallard/Sweden/100633/2009	JX566230
A/mallard/Finland/13977/2010	F183635
A/mallard/Jiangxi/1_19/2010	CY098256
A/white_faced_whistling_duck/Colombia/1/2011	KC703339
A/black_bellied_whistling_duck/Colombia/1/2011	KC703331
A/duck/Jiangsu/1_15/2011	KC282881
A/great_black_backed_gull/Iceland/1110/2011	CY149350
A/turkey/Italy/12vir6607_9/2012	JX826513
A/duck/Hokkaido/WZ68/2012	AB812745

Tabla XVII. Secuencias del gen N2 utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

# N1

Linaje	Strain	Número de acceso a Genbank
Norteamérica	A/blue-winged teal/ALB/452/1983(H3N1)	CY004636
	A/Black Duck/Ohio/194/1986	CY017767
	A/blue-winged teal/Alberta/141/1992	CY014568
	A/Pekin robin/California/30412/1994	GU052924
	A/duck/NY/15024_21/1996	EF607904
	A/shorebird/Delaware_Bay/138/1997	CY117527
	A/mallard/Alberta/47/98	AY633286
	A/green_winged_teal/Ohio/72/1999	CY017719
	A/mallard/Minnesota/550/2000	GU050745
	A/blue-winged teal/Texas/82/2001	GU050759
	A/ruddy_turnstone/Delaware/413/2002	GU050773
	A/laughing_gull/Delaware_Bay/5/2003	CY102722
	A/mallard/Alberta/192/2004	CY102786
	A/mallard/Manitoba/458/2005	EF426681
	A/ruddy_turnstone/Delaware/291/2006	CY047021
	A/shorebird/Delaware/554/2007	CY077176
	A/Steller's eider/Alaska/44354-187/2007	JF323779
	A/American wigeon/California/8670/2008	CY093840
	A/Steller's eider/Alaska/44422-107/2008	JF323777
	A/American green-winged teal/Wisconsin/2743/2009	CY097504
	A/blue-winged teal/Wisconsin/2649/2009	CY097464
	A/American_wigeon/Missouri/10OS4752/2010	CY133426
	A/American_black_duck/Wisconsin/11OS3191/2011	CY166899
	A/northern_shoveler/Arkansas/12OS158/2012	CY167145
	A/blue_winged_teal/Ohio/13OS2037/2013	KJ567947
	A/semi_palmated_sandpiper/Brazil/43/1990	CY005415
	Eurasia y Oceanía	A/African starling/England/983/79
A/softbill/South Africa/142/92		AY207538
A/Goose/Guangdong/1/96		AF144304
A/Teal/Hong_Kong/W312/97		AF250481
A/pheasant/Hong_Kong/SH39/99		AJ410557
A/greylag_goose/Netherlands/4/1999		CY060200
A/chicken/Italy/1067/1999		AJ416627
A/guinea_fowl/Italy/1766/2000		KF493429
A/Quail/Nanchang/12_340/2000		AY180836
A/mallard/France/2526/2001		AJ697874
A/duck/Mongolia/47/2001		AB302788
A/Chicken/Hong Kong/317.5/2001		GU052083
A/Mallard/France/D-691/02		AJ697877
A/Ck/Indonesia/PA/2003		AY651433
A/Ck/Thailand/73/2004		AY651438
A/Ck/Viet Nam/38/2004		AY651453

A/Bar-headed Goose/Qinghai/65/05	DQ095662
A/Chicken/Yunnan/493/05	DQ095665
A/Cygnus olor/Astrakhan/Ast05-2-10/2005	DQ440579
A/Ardea cinerea/Slovenia/185/06	AM911091
A/chicken/Afghanistan/1573-65/2006	CY020631
A/Cygnus olor/Italy/742/2006	DQ533581
A/Anas crecca/Spain/1404/2007	FN386474
A/Japanese white-eye/Hong Kong/737/2007	CY036079
A/Peking duck/Germany/R1959/2007	FM165532
A/chicken/Egypt/0836/2008	CY041292
A/Muscovy duck/France/09010/2009	JN860174
A/bar-headed goose/Mongolia/X54/2009	AB523367
A/chicken/England/1415-51184/2010	JQ609665
A/black_headed_gull/Republic_of_Georgia/2/2011	CY185523
A/European_teal/Novosibirsk/203/2011	KF462363
A/duck/Hokkaido/W26/2012	AB780370
A/duck/Cambodia/46W2M4/2013	KF001428
A/muscovy_duck/Vietnam/LBM636/2014	AB979497

Tabla XVIII. Secuencias del gen N1 utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos.