

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Diagnóstico y caracterización genética de Paramixovirus de palomas

Paula Perbolianachis Duarte

Orientadora: MSc. Ana Marandino

Co-orientador: MSc. Gonzalo Tomás

Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias.

Julio 2017

Índice

Índice	II
Abreviaturas	IV
Resumen	VI
1 Introducción	1
1.1 Clasificación taxonómica.....	1
1.2 Composición viral del paramixovirus aviar	2
1.3 Ciclo replicativo de APMV-1	6
1.4 Patogenicidad de APMV-1	8
1.5 Dinámica evolutiva de APMV-1	11
1.6 Caracterización genética de APMV-1.....	12
2 Objetivos	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos	14
3 Materiales y Métodos	15
3.1 Muestras	15
3.2 Extracción del genoma viral	15
3.3 Retrotranscripción	16
3.4 Diagnóstico de PPMV-1	16
3.5 Amplificación de la secuencia codificante del gen F	17
3.6 Análisis bioinformáticos.....	18
4 Resultados	20
4.1 Ensayo de diagnóstico de APMV-1	20
4.2 Amplificación del gen F	20
4.3 Secuenciación.....	27
4.4 Análisis filogenéticos	27
4.5 Identidad nucleotídica y aminoacídica.....	31
4.6 Caracterización según el sitio de clivaje de F ₀	34
5 Discusión	35
5.1 Diagnóstico de PPMV-1	35
5.2 Análisis de las cepas de PPMV-1 del genotipo VI.....	36
5.3 Caracterización genética de la cepa PPMV1/Uruguay/2015.....	37

6 Conclusiones	41
7 Perspectivas.....	41
8 Bibliografía	42
Anexo	51

Abreviaturas

µg: microgramos

µL: microlitros

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

APMV-1: paramixovirus aviar tipo 1

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

F: proteína de fusión

FAM: 6-carboxifluoresceína

ICPI: Índice de patogenicidad intracerebral

MEGA: Molecular Evolutionary Genetic Analysis

MgCl₂: cloruro de magnesio

mL: mililitros

mM: milimolar

ND: Enfermedad de Newcastle

nm: nanómetros

nt: nucleótidos

°C: grados Celsius

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

pb: pares de bases

PBS: solución salina amortiguadora por fosfatos

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PPMV-1: Paramixovirus de paloma tipo 1

Resumen

El paramixovirus de paloma tipo 1 (PPMV-1) es una variante antigénica del paramixovirus aviar tipo 1 (APMV-1) que se ha adaptado a las palomas como hospederos. APMV-1 pertenece al género *Avulavirus* de la familia *Paramyxoviridae*. Se trata de un virus envuelto con genoma de ARN simple hebra (15.2 kb), de polaridad negativa, que codifica para seis proteínas estructurales. En la actualidad se utiliza el análisis de la secuencia codificante de la proteína de fusión F para caracterizar genéticamente las cepas de APMV-1. El presente trabajo describe la caracterización genética de un brote de PPMV-1 en palomas *Zenaida auriculata* que presentaron signos clínicos típicos de infección por paramixovirus. El virus se detectó por PCR en tiempo real y se amplificaron secuencias genómicas. Los análisis filogenéticos realizados con la secuencia del gen F mostraron que la cepa PPMV1/Uruguay/2015 pertenece al genotipo VI sub-genotipo VIh junto con una cepa argentina aislada en 1997 y cepas de origen africano. La cepa uruguaya y la argentina formaron un clado distintivo dentro del sub-genotipo VIh y presentaron alta identidad aminoacídica (96%) respecto a la proteína F, por lo que se presume un origen común. La cepa PPMV1/Uruguay/2015 presentó el motivo ¹¹²R-R-Q-K-R↓F¹¹⁷ en el sitio de clivaje del precursor proteico F₀, el cual es característico de los paramixovirus de palomas aislados a partir de la década de 1990. La cepa PPMV1/Uruguay/2015 es la primera en ser identificada en la paloma *Zenaida auriculata*, y su estudio aporta nueva información del estatus sanitario de la avifauna silvestre y de la epidemiología viral.

1 Introducción

1.1 Clasificación taxonómica

El paramixovirus de paloma tipo 1 (PPMV-1) es una variante antigénica y de hospedero del paramixovirus aviar tipo 1 (APMV-1), también denominado virus de la enfermedad de Newcastle. APMV-1 pertenece a la especie *Avian avulavirus 1*, género *Avulavirus*, familia *Paramyxoviridae* del orden *Mononegvirales*. En esta familia se encuentran además los géneros *Aquaparamyxovirus*, *Ferlavirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus*, *Respirovirus* y *Rubulavirus* (Amarasinghe *et al.*, 2017). De esta manera, los paramixovirus definen un grupo diverso de virus envueltos de ARN que causan enfermedades significantes en diversas especies de huéspedes vertebrados, incluyendo humanos (Harrison *et al.*, 2010).

Los paramixovirus procedentes de especies aviares se han clasificado mediante pruebas serológicas y análisis filogenéticos en trece especies, denominadas *Avian avulavirus 1* al *Avian avulavirus 13* (Amarasinghe *et al.*, 2017) (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de las trece especies de paramixovirus aviares descritos hasta el momento. Se detalla el año del primer aislamiento de cada especie, localidad, las especies hospederas y su patogenicidad en los pollos. Tabla tomada y modificada de Gogoi *et al.* (2017); las referencias bibliográficas de cada tipo de paramixovirus aviar descrito se encuentran en el mencionado artículo.

Tipos	Año	Especies	Patogenicidad en pollos	Localización
<i>Avian avulavirus 1</i>	1926	Pollo	No virulento a virulento	Java (Indonesia), Newcastle upon Tyne (Inglaterra)
<i>Avian avulavirus 2</i>	1956	Pollo y pavo	No virulento a virulento	Yucaipa y California (EEUU), Inglaterra y Kenia
<i>Avian avulavirus 3</i>	1967	Pavo y perico	No virulento	Ontario, Wisconsin (EEUU), Inglaterra, Francia y Países Bajos
<i>Avian avulavirus 4</i>	1976	Patos, pollo, ganso	No virulento a virulento	La ruta del Mississippi, Hong Kong, Korea y Sudáfrica
<i>Avian avulavirus 5</i>	1974	Periquito	No virulento a virulento	Japón y Reino Unido
<i>Avian avulavirus 6</i>	1977	Patos, ganso, pavo	No virulento	Hong Kong, Taiwán, Italia y Nueva Zelanda
<i>Avian avulavirus 7</i>	1975	Paloma, pavo, avestruz	Virulento	Tennessee (EEUU)
<i>Avian avulavirus 8</i>	1976	Pato y ganso	No virulento	EEUU y Japón
<i>Avian avulavirus 9</i>	1978	Patos	Virulento	Nueva York (EEUU) e Italia
<i>Avian avulavirus 10</i>	2007	Pingüino penacho amarillo	No virulento	Islas Malvinas
<i>Avian avulavirus 11</i>	2010	Agachadiza común	No virulento	Francia
<i>Avian avulavirus 12</i>	2005	Silbón europeo	No virulento	Italia
<i>Avian avulavirus 13</i>	2000	Gansos	No virulento	Japón y Kazajistán ^a

^a Referencias bibliográficas: Yamamoto *et al.* (2015), Goraichuk *et al.* (2016), Karamendin *et al.* (2016).

1.2 Composición viral del paramixovirus aviar

1.2.1 Envoltura viral

APMV-1 es un virus pleomórfico, mayormente esférico, de entre 200 y 300 nm de diámetro. Se halla rodeado de una bicapa lipídica de origen celular, la cual presenta espículas constituidas por glicoproteínas de superficie virales, denominadas proteína de fusión (F) y hemaglutinina-neuraminidasa (HN) (Figura 1) (Ganar *et al.*, 2014; Gogoi *et al.*, 2017).

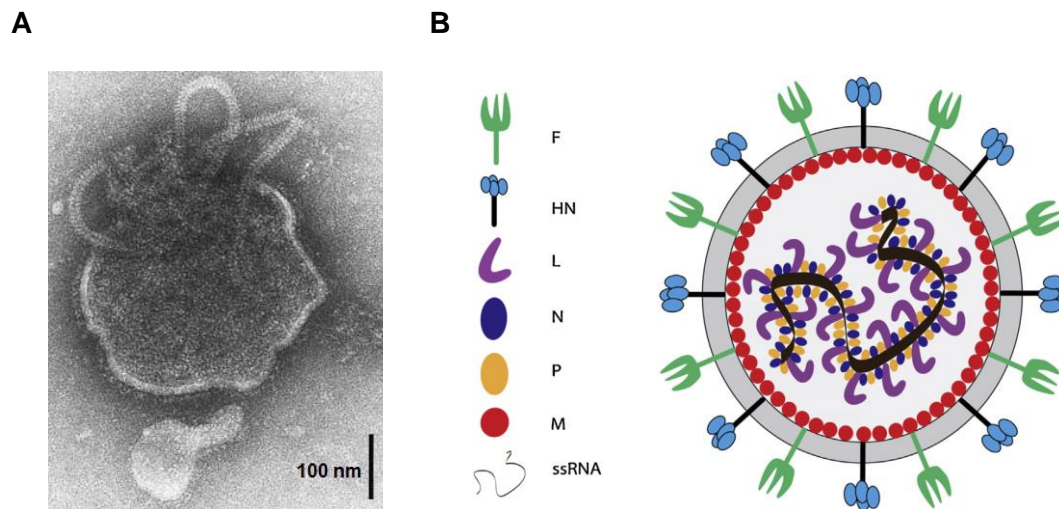


Figura 1. A. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión con contraste negativo de APMV-1 en el que se observa la partícula parcialmente interrumpida y la ribonucleocápside helicoidal. Imagen tomada de Alexander & Senne (2003). **B.** Diagrama esquemático de la estructura de la partícula viral de APMV-1. F: proteína de fusión; HN: hemaglutinina-neuraminidasa; L: ARN polimerasa ARN dependiente; N: nucleoproteína; P: fosfoproteína; M: proteína de la matriz; ssRNA: genoma de ARN simple hebra. Tomada de Ganar *et al.* (2014).

1.2.2 Genoma viral

APMV-1 posee un genoma de ARN simple hebra de polaridad negativa, no segmentado. El genoma posee una secuencia líder de 55 nucleótidos (nt) de longitud en su extremo 3' y una secuencia tráiler de 114 nt en su extremo 5', que flanquean a los genes esenciales (Figura 2) (Lamb & Parks, 2013; Ganar *et al.*, 2014). Las regiones líder y tráiler de APMV-1 son esenciales para la transcripción, replicación y encapsidación de los ARN genómicos recién sintetizados en partículas virales maduras (Gogoi *et al.*, 2017). Cada uno de los genes se encuentra marcado por la presencia de secuencias que señalan su inicio y su fin; y están separados unos de otros por secuencias intergénicas (Lamb & Parks, 2013). El genoma contiene seis genes que codifican para la

proteína de la nucleocápside, la fosfoproteína, la proteína de la matriz, la proteína de fusión, la hemaglutinina-neuraminidasa y la ARN polimerasa ARN dependiente, respectivamente (Figura 2) (Chambers *et al.*, 1986).

Se han descrito al menos tres tamaños para el genoma de APMV-1: 15.186, 15.192 y 15.198 nt. Los genomas de 15.192 nt son generados por una inserción de 6 nt en la región 5' no codificante del gen N, y los de 15.198 nt, por una inserción de 12 nt en la región codificante del gen P (Krishnamurthy & Samal, 1998; Huang *et al.*, 2004; Czegledi *et al.*, 2006).



Figura. 2. Representación esquemática del genoma de APMV-1. Imagen tomada y modificada de Ganar *et al.* (2014).

1.2.3 Proteínas estructurales y no estructurales

La nucleoproteína o proteína de nucleocápside (N) es la primera proteína en traducirse y está formada por 489 aminoácidos (Figura 1). Se trata de una proteína de unión al ARN que se autoensambla sobre el genoma viral y el ARN antigenómico para formar, junto a las proteínas L y P, el complejo ribonucleoproteico (RNP). Este complejo sirve como templado para la síntesis de ARN (Lamb & Parks, 2013).

La fosfoproteína (P) consiste en 395 aminoácidos (Figura 1). Es un componente esencial de la ARN polimerasa viral ARN dependiente (vRNAP) y del complejo de ensamblado de la cadena naciente que encapsida al ARN

durante la replicación (Lamb & Parks, 2013). La proteína P forma un complejo con la proteína N libre para regular el cambio de la transcripción a la replicación (Ganar *et al.*, 2014).

La proteína de la matriz (M) está constituida por 364 aminoácidos y es la proteína más abundante del virión. Se posiciona debajo de la envoltura lipídica e interactúa con las colas citoplasmáticas de las proteínas integrales de membrana, la bicapa lipídica y la nucleocápside (Figura 1) (Lamb & Parks, 2013; Ganar *et al.*, 2014).

La proteína de fusión (F) es una glicoproteína integral de membrana constituida por 553 aminoácidos (Figura 1). F es responsable de mediar el ingreso del virus al fusionar la envoltura viral con la membrana citoplasmática del hospedero. La consecuencia de la reacción de fusión es la liberación de la RNP en el citoplasma. En etapas más avanzadas de la infección, las proteínas F expresadas en las membranas citoplasmáticas de las células infectadas pueden mediar la fusión con células vecinas formando un sincitio. Este efecto citopático puede llevar a la necrosis del tejido *in vivo* y a la dispersión viral (Lamb & Parks, 2013).

La hemaglutinina-neuraminidasa (HN) es una proteína integral de membrana que media la unión con los receptores celulares que contienen ácido siálico. Junto a la glicoproteína F son los determinantes antigénicos del virus (Figura 1) (Lamb & Parks, 2013).

La ARN polimerasa ARN dependiente (L) está compuesta por 2203 aminoácidos (Figura 1). Es una subunidad esencial del complejo de la ARN polimerasa por su rol catalítico en la síntesis del ARN viral. Además, la proteína

L realiza las actividades enzimáticas de incorporación del 5' *cap*, metilación y poliadenilado de los ARNm (Lamb & Parks, 2013).

Como otros paramixovirus, APMV-1 codifica productos génicos adicionales, no estructurales, llamados V y W, que surgen a partir de la traducción de ARN mensajeros alternativos generados por la edición del ARN durante la transcripción del gen P (Steward *et al.*, 1993). La proteína V presenta una actividad antagonista del interferón que es importante para la replicación viral *in vivo* (Park *et al.*, 2003).

1.3 Ciclo replicativo de APMV-1

La infección de los paramixovirus comienza cuando las partículas virales se unen a los receptores de la superficie de la célula diana. Tras la unión, se activa la proteína F desencadenando la fusión de la envoltura del virión con la membrana celular. Este proceso permite el ingreso de la RNP viral al citoplasma celular. La replicación intracelular de los paramixovirus comienza con la transcripción del genoma encapsidado en ARN mensajeros con 5' *cap* y 3' poliadenilados. La vRNAP transcribe los genes de una manera secuencial y polar, comenzando y reiniciando en cada una de las uniones de los genes. Estas uniones consisten en una secuencia de terminación, en la cual ocurre la poliadenilación por la reiteración de la síntesis de adenilatos dirigida por 4-7 uridilatos del molde (seguido de la liberación del ARNm), una región intergénica no transcrita y una región de inicio de un gen que especifica la iniciación del ARNm y el 5' *capping*. La vRNAP ocasionalmente falla en reiniciar el ARNm siguiente a cada unión, lo que conduce a un gradiente transcripcional en el cual los genes más próximos al extremo 3' se transcriben en mayor proporción que

aquellos cercanos al extremo 5' del genoma. Después de la transcripción primaria y traducción, cuando se acumula suficiente cantidad de proteínas N libres, la síntesis de ARN viral se acopla a la encapsidación de la cadena naciente positiva de ARN. Bajo estas condiciones, vRNAP ignora todas las uniones y sitios de edición para producir de manera continua el antigenoma que será utilizada como molde para producir nuevos ARN genómicos. La RNP recién sintetizada se asocia con las proteínas de la matriz en la membrana plasmática, donde se localizan las glicoproteínas F y HN. La liberación de las partículas virales ocurre por brotación (Figura 3) (Lamb & Parks, 2013).

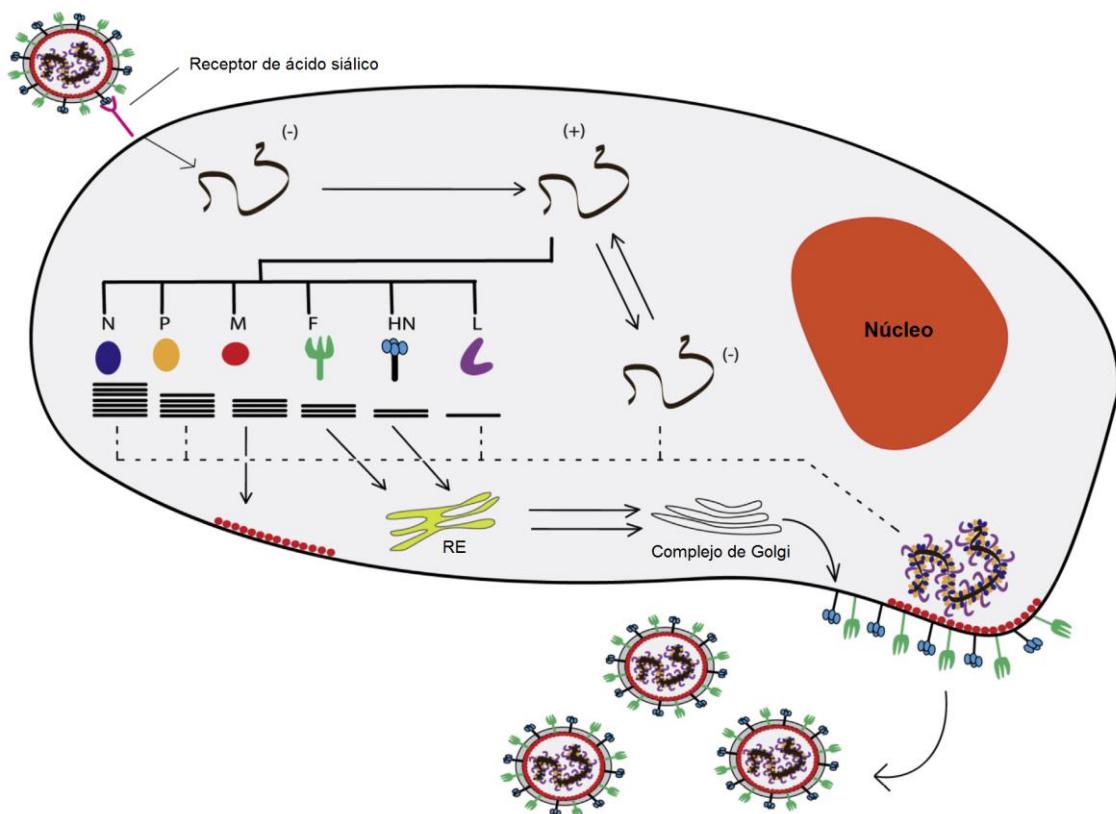


Figura 3. Representación esquemática del ciclo replicativo de APMV-1. Imagen tomada y modificada de Ganar *et al.* (2014).

1.4 Patogenicidad de APMV-1

El paramixovirus aviar tipo 1 (APMV-1) es el agente etiológico de la enfermedad de Newcastle (ND). Esta enfermedad infecciosa puede afectar a una gran variedad de especies aviares. (Alexander, 2000; Aldous *et al.*, 2010). Se reportó primariamente en Java, Indonesia en el año 1926 y en Newcastle upon Tyne, Inglaterra en 1927 (Kranefeld, 1926; Doyle, 1927). Sin embargo, en la literatura hay evidencia de la posible ocurrencia de brotes muy similares a esta enfermedad antes de 1926 (Alexander, 2001).

El APMV-1 ha ocasionado cuatro panzootias principales en diversas especies aviares (Alexander & Senne, 2003). Una de ellas fue causada por el PPMV-1 que se originó en el Medio Oriente a finales de 1970 y se extendió rápidamente a Europa (Kaleta *et al.*, 1985) y otras partes del mundo, en gran parte, como resultado del contacto entre las aves en carreras y espectáculos, y al comercio internacional (Alexander & Senne, 2003). El pico panzoótico de PPMV-1 fue al principio de la década de 1980 y, aunque el número de reportes de la presencia viral es actualmente menor, se continúan detectando a nivel mundial (Aldous *et al.* 2004), incluyendo casos en Argentina y Uruguay (Zanetti *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2012). Se ha descrito en algunos casos la propagación de esta variante a aves de corral (Alexander & Senne, 2003); en Gran Bretaña, por ejemplo, se produjeron 19 brotes como resultado de la contaminación de los alimentos por palomas infectadas (Alexander *et al.*, 1985).

1.4.1 Variación en la virulencia

La severidad de la enfermedad se encuentra influenciada por factores como el tipo de cepa viral, la especie de ave infectada, la edad del hospedero, la

infección simultánea con otros microorganismos, el estrés ambiental y el estado inmune del ave (McFerran & McCracken, 1988).

Basados en estudios de patogenicidad en pollos SPF en condiciones de laboratorio se han descrito cinco patotipos de APMV-1 (Beard & Hanson, 1984): velogénico viscerotrópico, virus responsables de enfermedades caracterizadas por infecciones letales agudas, generalmente con lesiones hemorrágicas en intestinos; velogénico neurotrópico, cepas de APMV-1 que causan alta mortalidad luego de enfermedades respiratorias y neurológicas, usualmente sin lesiones intestinales; mesogénico, cepas que causan signos clínicos que afectan a los sistemas nervioso y respiratorio, de baja mortalidad; lentogénico, de baja virulencia, causante de infecciones leves del sistema respiratorio; y asintomático entérico, causante de infecciones subclínicas del tracto gastrointestinal (Alexander, 2000).

En palomas infectadas con PPMV-1 los signos clínicos incluyen generalmente una serie de trastornos nerviosos como son los trastornos locomotores bilaterales o unilaterales de alas o patas, tortícolis, y diarrea verde. Si se infectan durante el período reproductivo o de muda, se puede observar mayor mortalidad embrionaria o plumas deformes, respectivamente (Alexander *et al.*, 1984; Aldous *et al.*, 2004). Sin embargo, suelen presentar nula o baja virulencia cuando infectan pollos. En ocasiones, el único signo clínico de una infección por PPMV-1 en gallinas ponedoras es un descenso en la producción de huevos, huevos deformes, y cáscaras de huevo blandas (Alexander & Parsons, 1984). El aumento de la patogenicidad en pollos ha sido identificado tras pasajes de PPMV-1 en pollos o huevos embrionados, lo que indica que los virus que circulan actualmente entre las poblaciones de palomas podrían

provocar brotes de ND en pollos solo en determinadas condiciones (Alexander & Parsons, 1984; King, 1996; Kommers *et al.*, 2003).

1.4.2 Base molecular de la patogenicidad

La diferencia en la patogenicidad observada tras la infección de APMV-1 depende, entre otros factores, de la cepa viral. A pesar de que la base molecular de dicha variabilidad no es del todo comprendida, estudios indican que F es el principal determinante individual de la patogenicidad, seguido por la polimerasa L (Paldurai *et al.*, 2014). La proteína F es sintetizada como un precursor proteico F₀ que posteriormente es clivado en las subunidades F₁ y F₂, permaneciendo unidas entre sí de forma covalente por un puente disulfuro, lo cual es necesario para la infectividad de la progenie viral (Nagai *et al.*, 1976). Las cepas virulentas (mesogénicas y velogénicas) presentan dos pares de aminoácidos básicos en los residuos 112-113 y 115-116 en el extremo carboxilo terminal de la proteína F₂ y fenilalanina en la posición 117 en el extremo amino terminal de la proteína F₁ (secuencia consenso ¹¹²R/K-R-Q-R/K-R↓F¹¹⁷). Mientras que las cepas de baja patogenicidad (no virulentas y lentogénicas) presentan únicamente dos aminoácidos básicos en las posiciones 113 y 116, además de un residuo de leucina en posición 117 (secuencia consenso ¹¹²G/E-K/R-Q-G/E-R↓L¹¹⁷) (Glickman *et al.*, 1988; Meulemans *et al.*, 2002; de Leeuw *et al.*, 2005).

La presencia de múltiples aminoácidos básicos en las cepas virulentas de APMV-1 permite la escisión intracelular por proteasas tipo furina presentes en una amplia gama de células y tejidos del huésped, resultando en infecciones sistémicas. En tanto, el procesamiento de las cepas lentogénicas ocurre

extracelularmente por proteasas tipo tripsina que se encuentran en el epitelio respiratorio e intestinal (Nagai *et al.*, 1976; Ogasawara *et al.*, 1992; Fujii *et al.*, 1999; Alexander & Senne, 2003).

Los motivos del sitio de clivaje F₂/F₁ de las cepas de PPMV-1 aisladas en los años 1983-1987, 1991 (Collins *et al.*, 1994) y 1998-1999 fueron estudiadas por Meulemans *et al.* (2002). Los resultados mostraron que la secuencia del sitio de clivaje varió, pasando de ¹¹²G-R-Q-K-R↓F¹¹⁷ en los aislamientos de la década de 1980 a ¹¹²R-R-Q/K/R-K-R↓F¹¹⁷ a partir de la década de 1990, siendo el motivo predominante ¹¹²R-R-Q-K-R↓F¹¹⁷. Si bien estos virus son virulentos para las palomas, muestran valores de ICPI (índice de patogenicidad intracerebral) altamente variables pero bajos en pollos pese a especificar un sitio de escisión polibásico. Por tanto, deben existir otros determinantes, además del sitio de clivaje de la proteína F, para explicar la diferencia en la patogenicidad observada tras infecciones de APMV-1 (Dortmans *et al.*, 2009). Se ha demostrado la importancia de distintas regiones de la proteína F en el modulado de la virulencia de APMV-1 (Heiden *et al.*, 2014b), además de la importancia secundaria de las proteínas M y HN (Paldurai *et al.*, 2014).

La predicción de virulencia basada en la secuencia aminoacídica obtenida *in silico* del sitio de clivaje de la proteína F ha sido incorporada en la definición de notificación de cepas de APMV-1 por la OIE (OIE, 2012).

1.5 Dinámica evolutiva de APMV-1

La mayoría de los cambios genómicos en los virus de ARN no segmentados son debidos a la tasa de error intrínseca de la polimerasa y a la recombinación (Miller *et al.*, 2009b). Sin embargo, se ha establecido que la recombinación en

los virus de ARN monocatenarios negativos, incluyendo al APMV-1, ocurre en baja frecuencia (Chare *et al.*, 2003; Afonso, 2008). Los elevados eventos de recombinación reportados en APMV-1 probablemente son consecuencia del cambio de molde de la polimerasa durante el procedimiento de PCR realizado a partir de muestras de campo que contienen ácido nucleico de diversas cepas, y de la contaminación cruzada de productos de PCR. Lo antedicho genera que la recombinación real sea menor a la previamente determinada (Afonso, 2008; Song *et al.*, 2011).

Las estimaciones bayesianas de la tasa evolutiva para las secuencias del gen F de APMV-1 fueron de 1.35×10^{-3} y 1.78×10^{-3} sustituciones nucleotídicas por sitio por año (Chong *et al.*, 2010; Soñora *et al.*, 2015), concordante con lo establecido por Duffy *et al.* (2008) para los virus de ARN de rápida evolución.

1.6 Caracterización genética de APMV-1

Existe una nomenclatura unificada y un sistema de clasificación para definir los genotipos de APMV-1 mediante el análisis de la secuencia nucleotídica codificante de la proteína F (Diel *et al.*, 2012). Dicho sistema de clasificación busca mantener los genotipos y sub-genotipos previamente descritos (Yu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003; Wehmann *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2004; Czegledi *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007a; Kim *et al.*, 2007b; Miller *et al.*, 2009a; Maminaiina *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010b; Wu *et al.*, 2011) e incorpora criterios genéticos objetivos para la clasificación. Los nuevos criterios se determinaron en base a la topología filogenética y a las distancias evolutivas específicas que reflejan la diversidad de APMV-1. La designación de nuevos genotipos o sub-genotipos se realiza cuando existe un grupo taxonómico distinto en un árbol filogenético

que está integrado por al menos cuatro aislamientos independientes sin relación epidemiológica directa. El valor de *bootstrap* de este nodo tiene que ser mayor a 60 y presentar una distancia evolutiva media de 0.1 para genotipos, y de entre 0.03 y 0.1 para sub-genotipos.

Bajo estos criterios, los virus ND se agrupan actualmente en dos clases. La clase I presenta genomas de 15.198 nt y comprende virus principalmente no virulentos que han sido aislados de aves acuáticas, aves playeras, y ocasionalmente de muestras recogidas en mercados de aves vivas (Kim *et al.*, 2007a; Miller *et al.*, 2010b). Esta clase está formada por un único genotipo (Diel *et al.*, 2012). Los virus de la clase II están presentes tanto en aves silvestres como en aves de corral; la mayoría son virulentos y causan significativas pérdidas económicas a la industria avícola en todo el mundo (Diel *et al.*, 2012). Esta clase está formada por dieciocho genotipos (Diel *et al.*, 2012; Courtney *et al.*, 2013; Snoeck *et al.*, 2013). Los genotipos I-IV y IX son considerados más antiguos, anteriores al año 1960, y presentan genomas de 15.186 nt. Los restantes genotipos son posteriores a 1960, y presentan tamaños genómicos de 15.192 nt (Czegledi *et al.*, 2006; Diel *et al.*, 2012; Maminiaina *et al.*, 2010; Ujvari *et al.*, 2006). Las cepas de PPMV-1 pertenecen al genotipo VI de la clase II, el cual actualmente se encuentra formado por diez sub-genotipos (VIa-VIi y VIk) (Dimitrov *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2017).

2 Objetivos

Objetivo general

- Diagnosticar y caracterizar genéticamente un caso de paramixovirus de palomas de la especie *Zenaida auriculata*.

Objetivos específicos

- Detectar el genoma de PPMV-1 por la técnica de PCR en tiempo real.
- Caracterizar genéticamente las cepas mediante el análisis de secuencia codificante de la proteína F.

3 Materiales y Métodos

3.1 Muestras

Se analizaron un total de 8 ejemplares de palomas de la especie *Zenaida auriculata*, comúnmente llamadas “torcazas”, remitidas al Laboratorio de la Sección Genética Evolutiva por presentar signos clínicos característicos de una infección con el PPMV-1 (desorientación, problemas de equilibrio, dificultad para comer, tortícolis y, en la mayoría de los casos, muerte). La presencia de PPMV-1 fue previamente sugerida por personal veterinario y análisis de laboratorio realizados por nuestro grupo en diez ejemplares de palomas que cohabitaron y presentaron los mismos signos con los analizados en este trabajo.

Se realizó la necropsia de cada ejemplar extrayendo pulmón, riñón, encéfalo y tráquea, los cuales se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. A los efectos de este trabajo se analizaron los órganos pulmón y riñón. Se realizaron tres *pools* de pulmón y tres de riñón, cada uno compuesto por dos o tres muestras. La muestra se denominó PPMV1/Uruguay/2015.

Asimismo se trabajó con la cepa vacunal liofilizada Nobilis ND HITCHNER para la estandarización de procedimientos y para contar con un control positivo.

3.2 Extracción del genoma viral

La extracción de ARN fue realizada utilizando el kit comercial Quick-RNA™ MiniPrep (*Zymo Research*), siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo a), a partir de 200 µL de homogeneizados de tejido en PBS 1x con estreptomicina y penicilina 2x. Para la extracción de ARN de la cepa vacunal

se partió de 0.05 g de la vacuna liofilizada resuspendida en 200 μ L de PBS 1x. El ARN extraído se eluyó en 35 μ L de agua libre de RNAsas.

Se determinó la concentración del ARN con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*).

3.3 Retrotranscripción

Las transcripciones reversas (RT) se realizaron con el kit RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis (*Fermentas Life Sciences*) en un volumen final de reacción de 20 μ L, siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo b). Para las reacciones de RT se utilizaron 10 μ L del ARN extraído y hexanucleótidos al azar.

3.4 Diagnóstico de PPMV-1

Se utilizó la metodología diagnóstica diseñada por Wise *et al.* (2004) para la detección del genoma de PPMV-1. Dicha técnica se basa en un ensayo de PCR en tiempo real que detecta a los APMV-1 utilizando un juego de cebadores (M+4100 y M-4220) y una sonda de hidrólisis (M+4169) que amplifica una región codificante del gen M de 121 pb. La sonda presenta el fluoróforo 6-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5' y dos moléculas bloqueadoras no fluorescentes, ZEN y 3IABkFQ, ubicadas en el interior y en el extremo 3', respectivamente (Tabla 2).

Los ensayos de PCR en tiempo real se realizaron en el equipo ABI 7500 (*Applied Biosystems*) con el software 7500 versión 2.0.3.

3.5 Amplificación de la secuencia codificante del gen F

3.5.1 Diseño de cebadores

Se alinearon 391 secuencias, de genoma completo y parcial, disponibles en la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), con el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) del software MEGA versión 6 (Tamura *et al.*, 2013). Con el alineamiento se diseñaron juegos de cebadores específicos que amplifican la región codificante de la proteína F (1662 pb). También se utilizó para el diseño la herramienta PrimerQuest de IDT (*Integrated DNA Technologies*). El análisis de la temperatura de fusión (*melting*), el porcentaje del contenido GC, así como la evaluación de posibles estructuras secundarias y dimerizaciones de los cebadores, se realizaron con la herramienta OligoAnalyzer 3.1 de la empresa IDT y fueron posteriormente adquiridos en la misma (www.idtdna.com).

3.5.2 Estandarización de ensayos de PCR en tiempo final

Se estandarizó la concentración final de los reactivos empleados en los ensayos de PCR en tiempo final con el ADNc de la cepa vacunal Nobilis ND HITCHNER y/o con el de la cepa PPMV1/Uruguay/2015, dependiendo del caso. La puesta a punto de las condiciones del ciclado de la reacción de PCR se realizó variando la temperatura de hibridación de los cebadores en el termociclador con gradiente de temperatura CG1/96 (*Corbett Research*).

Una vez estandarizadas las reacciones de PCR se prosiguió con la PCR de la cepa vacunal Nobilis ND HITCHNER y de la cepa PPMV1/Uruguay/2015 para su secuenciación.

3.5.3 Visualización de los productos de PCR

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% teñidos con bromuro de etidio (0,4 µg/mL), corridos en un campo eléctrico constante (90 voltios, 110 mA) en buffer TAE 1x durante 30 minutos. Los geles se visualizaron con un transiluminador de UV y se documentaron por medio de fotografía digital.

3.5.4 Purificación de amplicones

Las purificaciones de los amplicones a partir de los productos de PCR se realizaron con el kit comercial DNA Clean & ConcentratorTM-5 (*Zymo Research*), siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo c).

3.5.5 Secuenciación

Los amplicones purificados fueron secuenciados automáticamente en ambas direcciones mediante la técnica de Sanger por MacroGen Korea.

3.6 Análisis bioinformáticos

3.6.1 Ensamblado y edición de secuencias

Las secuencias se ensamblaron y editaron con el programa SeqMan (DNASTAR, Lasergene 7.0).

3.6.2 Análisis filogenéticos

Para realizar los análisis filogenéticos se construyeron dos bases de datos de secuencias nucleotídicas completas del gen F; una con 85 secuencias representantes de los diferentes genotipos de APMV-1 según Wang *et al.* (2017), y otra con todas las secuencias disponibles en el NCBI que conforman

al genotipo VI de APMV-1 (genotipo conformado por las cepas de PPMV-1). Para identificar todas las secuencias pertenecientes al genotipo VI fue necesario analizar filogenéticamente las 1645 secuencias disponibles del gen F de todos los APMV-1.

Los alineamientos se realizaron con el algoritmo MAFFT versión 7.305 (Katoh & Standley, 2013) vía el portal CIPRES (Miller *et al.*, 2010a). Se excluyeron las secuencias que no alinearon adecuadamente o que presentaron codones *stop* en el interior de la secuencia codificante.

El mejor modelo de sustitución de cada alineamiento fue seleccionado según el criterio de información de Akaike y el criterio de información Bayesiano implementando el software jModelTest versión 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012). Estos datos se utilizaron para la inferencia de árboles filogenéticos en los servidores <http://phylogeny.lirmm.fr> (Dereeper *et al.*, 2008) y Phylemon 2 (Sánchez *et al.*, 2011) con el método de máxima verosimilitud. Para las pruebas estadísticas de soporte de las ramas se utilizó el método aLRT (*approximate Likelihood-Ratio Test*). Las filogenias obtenidas se visualizaron y editaron con el programa FigTree versión 1.4.2 (Rambaut, 2014).

3.6.3 Análisis de identidad nucleotídica y aminoacídica

Los cálculos de similitud nucleotídica y aminoacídica se efectuaron con el programa MEGA 6, utilizando el modelo de sustitución *p-distance*.

4 Resultados

4.1 Ensayo de diagnóstico de APMV-1

La metodología diagnóstica de PCR en tiempo real fue estandarizada por el Laboratorio de la Sección Genética Evolutiva (Tablas 3 y 5). Esta metodología se aplicó en los *pooles* de pulmón y de riñón resultando todos positivos para PPMV-1 (Figura 4).

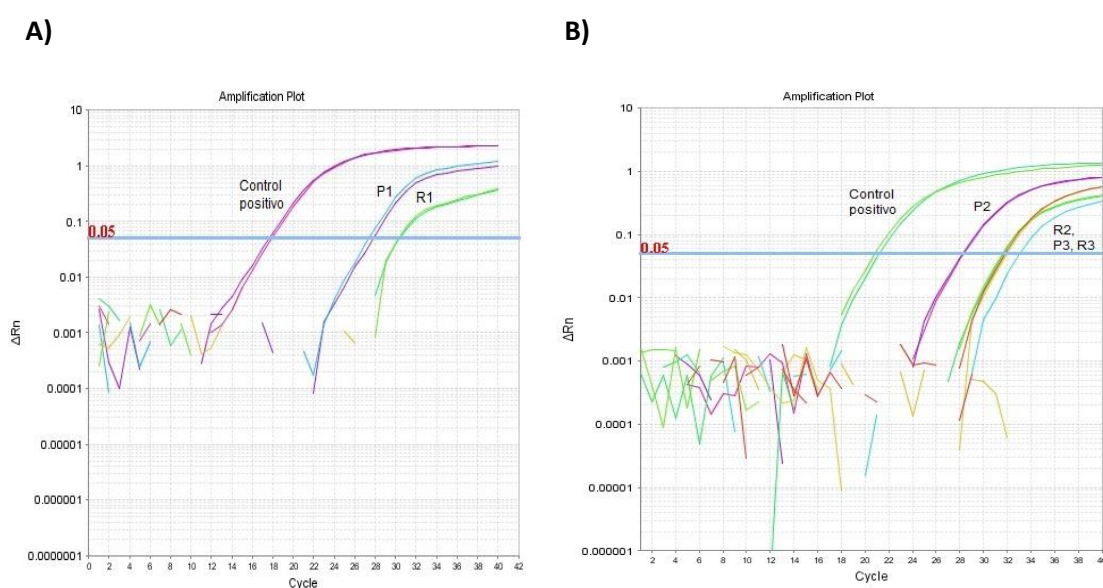


Figura 4. Ensayo diagnóstico de APMV-1 por PCR en tiempo real de la cepa proveniente de las palomas torcazas (PPMV1/Uruguay/2015). Para cada ensayo se muestran las curvas de amplificación. En A) se observa al *pool* 1 de pulmón y de riñón (P1 y R1); y en B) a los *poools* 2 y 3 de pulmón y de riñón (P2, P3, R2 y R3). La cepa vacunal fue utilizada como control positivo.

4.2 Amplificación del gen F

Se diseñaron diferentes juegos de cebadores que amplifican la totalidad del gen F en tres amplicones solapados (Tabla 2).

4.2.1 Amplificación de la región I del gen F

Para la amplificación de la primera región del gen F se utilizaron cebadores descritos previamente en la bibliografía (Collins *et al.*, 1996; Pchelkina *et al.*,

2013), de los cuales uno fue modificado (Tabla 2). Este procedimiento fue estandarizado por el Grupo de Investigación en Genética de Microorganismos de la Sección Genética Evolutiva (Tablas 4 y 5). Se obtuvo el fragmento esperado de 617 pb tanto de la cepa PPMV1/Uruguay/2015 como de la cepa vacunal Nobilis ND HITCHNER (Figura 5).

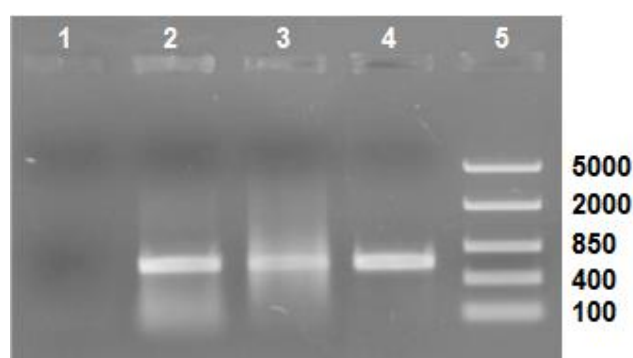


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa del amplicón F1-R1. 1-Blanco; 2- ADNc de muestra de riñón; 3- ADNc de muestra de pulmón; 4- control positivo (cepa vacunal); 5- Marcador de peso molecular (se indica los tamaños en pb a la derecha).

4.2.2 Amplificación de la región II del gen F

Para amplificar la muestra PPMV1/Uruguay/2015 y la cepa vacunal fue necesario diseñar dos juegos de cebadores, denominados F252-R1089 y F3-R2 (Tabla 2). Se estandarizaron las reacciones de PCR para los cebadores diseñados (Tablas 4 y 5). La temperatura óptima de hibridación para el juego F252-R1089 fue de 58°C (Figura 6) y para el juego F3-R2 fue de 55°C (Figura 7). Con las condiciones óptimas se obtuvieron los amplicones esperados tanto de la cepa PPMV1/Uruguay/2015 como de la cepa vacunal.

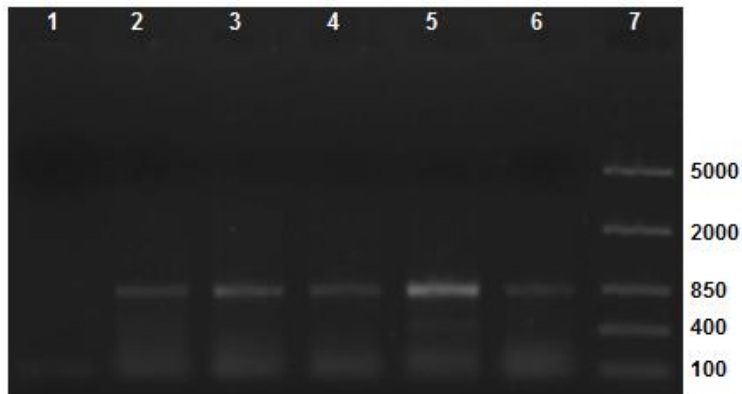


Figura 6. Visualización de productos de PCR con gradiente de temperatura de hibridación con los cebadores F252 y R1089 que amplifican la región media del gen F. Este ensayo fue estandarizado utilizando el ADNc de la muestra. 1- Blanco; 2- 56°C; 3- 58°C; 4- 60°C; 5- 62°C; 6- 64°C; 7- marcador de peso molecular (se indican los tamaños en pb en el extremo derecho).

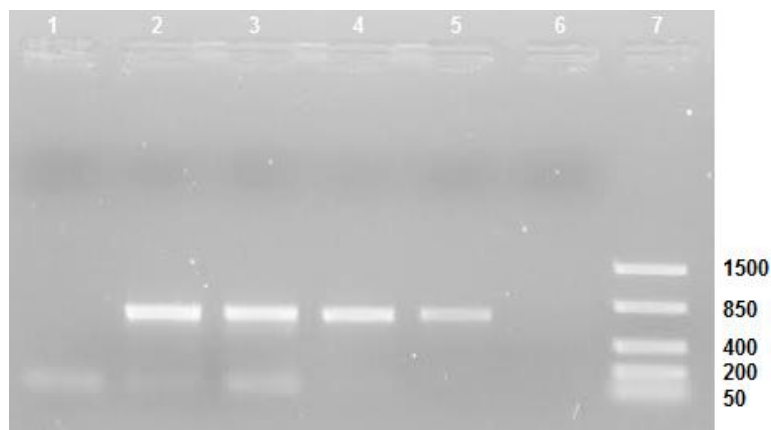


Figura 7. Visualización de productos de PCR con gradiente de temperatura de hibridación del juego de cebadores F3-R2 que amplifican la región media del gen F. Para este ensayo se utilizó ADNc de la cepa vacunal 1- Blanco; 2- 55°C; 3- 57°C; 4- 59°C; 5- 61°C; 6- 63°C; 7- Marcador de peso molecular (se indican los tamaños en pares de bases en el extremo derecho).

4.2.3 Amplificación de la región III del gen F

Se estandarizó correctamente la reacción de PCR para los cebadores F4 y R3 que amplifican la región III (Tablas 4 y 5). La temperatura de hibridación óptima fue de 56°C (Figura 8). Con estas condiciones se obtuvo el amplicón F4-R3 de la cepa PPMV1/Uruguay/2015 y de la cepa vacunal (Figura 9).

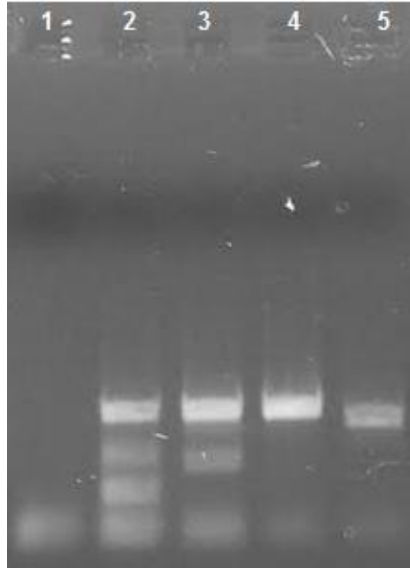


Figura 8. Visualización de productos de PCR con gradiente de temperatura de hibridación utilizando los cebadores F4 y R3 que amplifican la última región del gen F. El ensayo fue estandarizado con ADNc de la cepa vacunal Nobilis ND HITCHNER. 1- Blanco; 2- 50°C; 3- 53°C; 4- 56°C; 5- marcador de 711 pb.

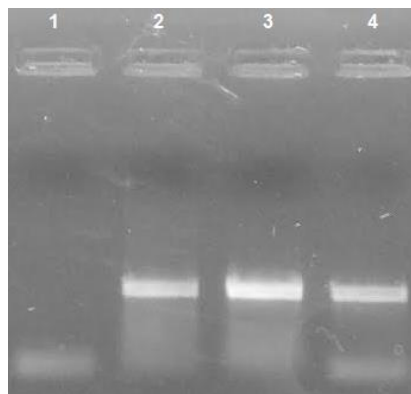


Figura 9. Ensayo de PCR con los cebadores F4-R3. 1- Blanco; 2- ADNc de muestra de pulmón; 3- ADNc de muestra de riñón; 4- control positivo empleando la cepa vacunal Nobilis ND HITCHNER.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores y la sonda utilizados en las reacciones de PCR en tiempo real y final.

Especificidad, gen diana, tamaño del amplicón	Cebador-sonda	Secuencia 5' → 3'
APMV-1	M +4100	AGTGATGTGCTCGGACCTTC
M	M +4169	[FAM]TTCTCTAGC[ZEN]AGTGGGACAGCCTGC[3IABkFQ]
121 pb	M -4220	CCTGAGGAGAGGCATTTGCTA
Región I		
F	F1 ^a	TTAGAAAAACACGGGTAGAA
617 pb	R1 ^b	TTRACAAACTGYTGCATCTT
Región II		
F	F3	CTTAATACAAGCCAAACAAAATG
711 pb	R2	CCTTCAGTCTTTGARTACAT
Región II		
F	F252	CAACAGAACACTGACCACTTTAC
838 pb	R1089	CAGACAGGAATACATACCAGGAG
Región III		
F	F4	AAGAACTYGACACCTCATACTG
801 pb	R3	GACCGTTCTACCCGTGTATT

^a Cebador descrito por Collins *et al.* 1996.

^b Cebador modificado de Pchelkina *et al.*, 2013.

Tabla 3. Concentraciones de los reactivos de la reacción diagnóstica de PCR en tiempo real.

Reactivos	C _o	C _f	V _o (μl)/tubo
H ₂ O			7
MasterMix	2x	1x	10
MgCl ₂	50 nM	1 nM	0,4
Cebador M +4100	10 μM	0,3 μM	0,6
Cebador M -4220	10 μM	0,3 μM	0,6
Sonda M +4169	5 μM	0,1 μM	0,4
ADNc			1

Tabla 4. Concentraciones de los reactivos de las reacciones de PCR en tiempo final.

Reactivos	C _o	C _f	V _o (μL)/tubo
H ₂ O			10,2
Buffer	10x	1x	1,5
MgCl ₂	25 mM	2 mM	1,2
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,3
Taq polimerasa	5 U/μL	0,06 U/μL	0,2
Cebador F ^a	10 μM	0,2 μM	0,3
Cebador R ^b	10 μM	0,2 μM	0,3
ADNc			1

^a Cebador que hibrida al ADNc sentido.

^b Cebador que hibrida al ADNc antisentido.

Tabla 5. Protocolos de las condiciones de ciclado óptimas para las reacciones de PCR en tiempo real y final.

Protocolo	Proceso	Temperatura	Tiempo	Nº Ciclos
1) Diagnóstico PCR en tiempo real				
	Lectura pre-PCR	60°C	1 min	
	Desnaturalización inicial	95°C	10 min	
	Desnaturalización	95°C	15 seg] 40
	Lectura-Hibridación-Extensión	60°C	1 min	
	Lectura post-PCR	60°C	1 min	
2) PCR en tiempo final con cebadores F1-R1				
	Desnaturalización inicial	95°C	5 min	
	Desnaturalización	95°C	30 seg] 40
	Hibridación	55°C	30 seg	
	Extensión	72°C	40 seg	
	Extensión final	72°C	5 min	
3) PCR en tiempo final con cebadores F3-R2				
	Desnaturalización inicial	95°C	5 min	
	Desnaturalización	95°C	30 seg] 35
	Hibridación	55°C	30 seg	
	Extensión	72°C	50 seg	
	Extensión final	72°C	5 min	
3) PCR en tiempo final con cebadores F252-R1089				
	Desnaturalización inicial	95°C	5 min	
	Desnaturalización	95°C	30 seg] 40
	Hibridación	58°C	30 seg	
	Extensión	72°C	1 min	
	Extensión final	72°C	5 min	
4) PCR en tiempo final con cebadores F4-R3				
	Desnaturalización inicial	95°C	5 min	
	Desnaturalización	95°C	30 seg] 40
	Hibridación	56°C	30 seg	
	Extensión	72°C	1 min	
	Extensión final	72°C	5 min	

4.3 Secuenciación

Para la cepa PPMV1/Uruguay/2015 se secuenció en ambas direcciones los amplicones obtenidos con los juegos de cebadores F1-R1, F252-R1089 y F4-R3. En el caso de la vacuna Nobilis se secuenciaron los amplicones generados con los juegos de cebadores F1-R1, F3-R2 y F4-R3.

4.4 Análisis filogenéticos

Se realizaron dos análisis filogenéticos por máxima verosimilitud basados en la secuencia nucleotídica completa del gen F. En el análisis filogenético realizado con cepas representantes de los diferentes genotipos de APMV-1 se observa la formación de las dos clases, la clase I constituida por un único genotipo y la clase II por dieciocho genotipos. La cepa uruguaya PPMV1/Uruguay/2015 se agrupa en la clase II, sub-genotipo VIh del genotipo VI, mientras que la cepa vacunal Nobilis se agrupa con las cepas vacunales B1 y LaSota del genotipo II. (Figura 10).

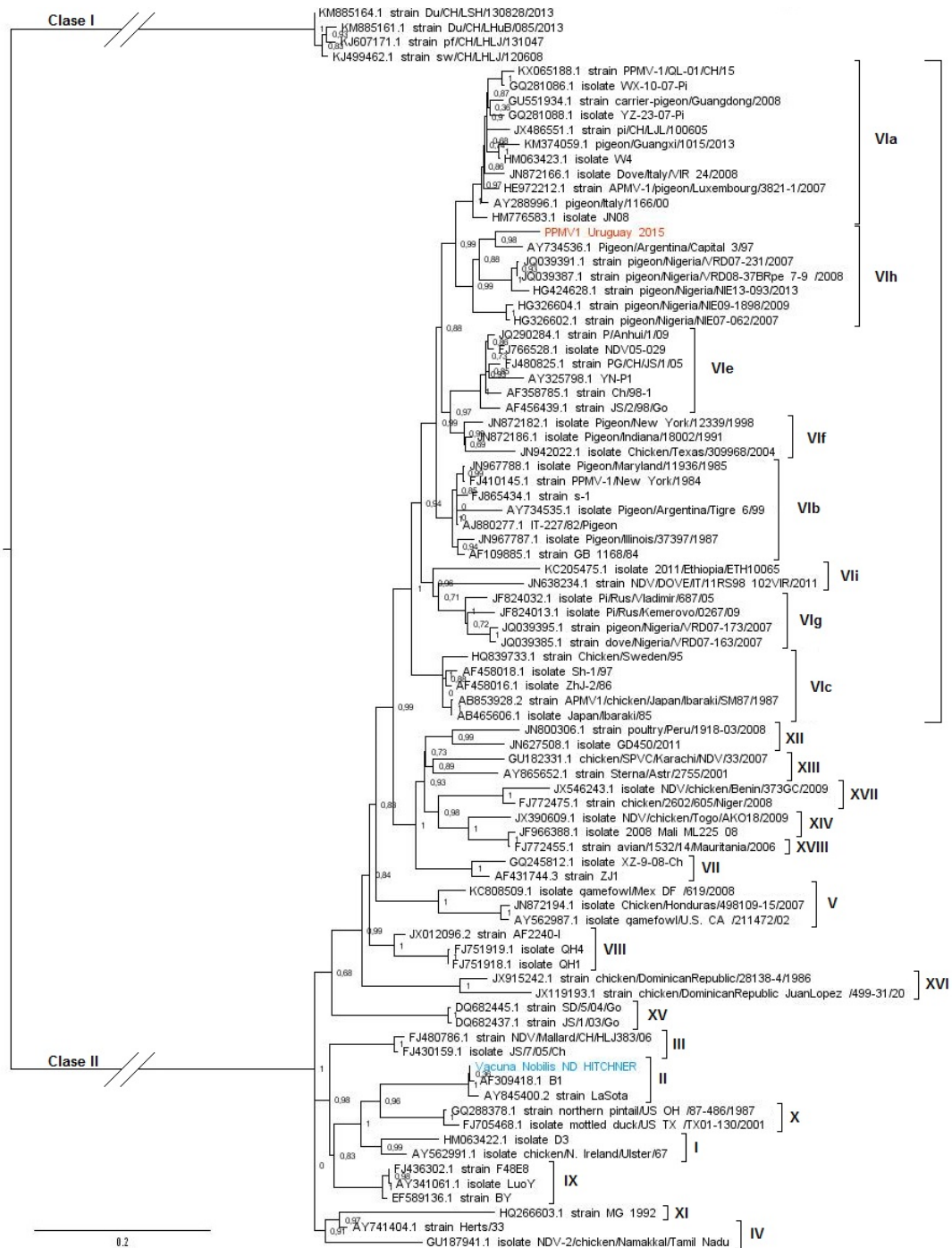


Figura 10. Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en la secuencia nucleotídica completa del gen F de diferentes cepas de APMV-1 de clase I y clase II utilizadas en el trabajo de Wang *et al.* (2017) además de las secuencias obtenidas en esta tesina, indicadas en color rojo y azul. El análisis fue realizado con el modelo evolutivo de sustitución GTR+I+G. La clasificación genotípica y sub-genotípica de las cepas fue realizada acorde a lo representado por Wang *et al.* (2017).

En el análisis filogenético realizado con todas las secuencias disponibles de PPMV-1 (Figura 11) se observan los nueve sub-genotipos previamente descritos y un nuevo sub-genotipo no descrito hasta la fecha, que denominamos VIj, siguiendo la nomenclatura utilizada para la designación de nuevos sub-genotipos. El nuevo sub-genotipo tipificado (VIj) presentó distancias nucleotídicas superiores a 0.03 con respecto a los otros sub-genotipos además de un soporte estadístico de 99.9%. Las 84 cepas que forman este nuevo sub-genotipo, así como las referencias bibliográficas en las cuales se describen, están detalladas en el anexo d. También se observa un clado que podría representar la emergencia del sub-genotipo VII formado por muestras aisladas en Pakistán durante el período 2014-2015; y dos cepas que no pertenecieron a ningún sub-genotipo en particular.

La secuencia PPMV1/Uruguay/2015 constituye el sub-genotipo VIh junto con una cepa argentina aislada en 1997 (Pigeon/Argentina/Capital/3/97), nueve cepas nigerianas aisladas en el período 2007-2013 y una cepa proveniente de Kenia colectada en 2012. La cepa uruguaya y la argentina se encuentran agrupadas dentro del sub-genotipo VIh con alto apoyo estadístico (99%).

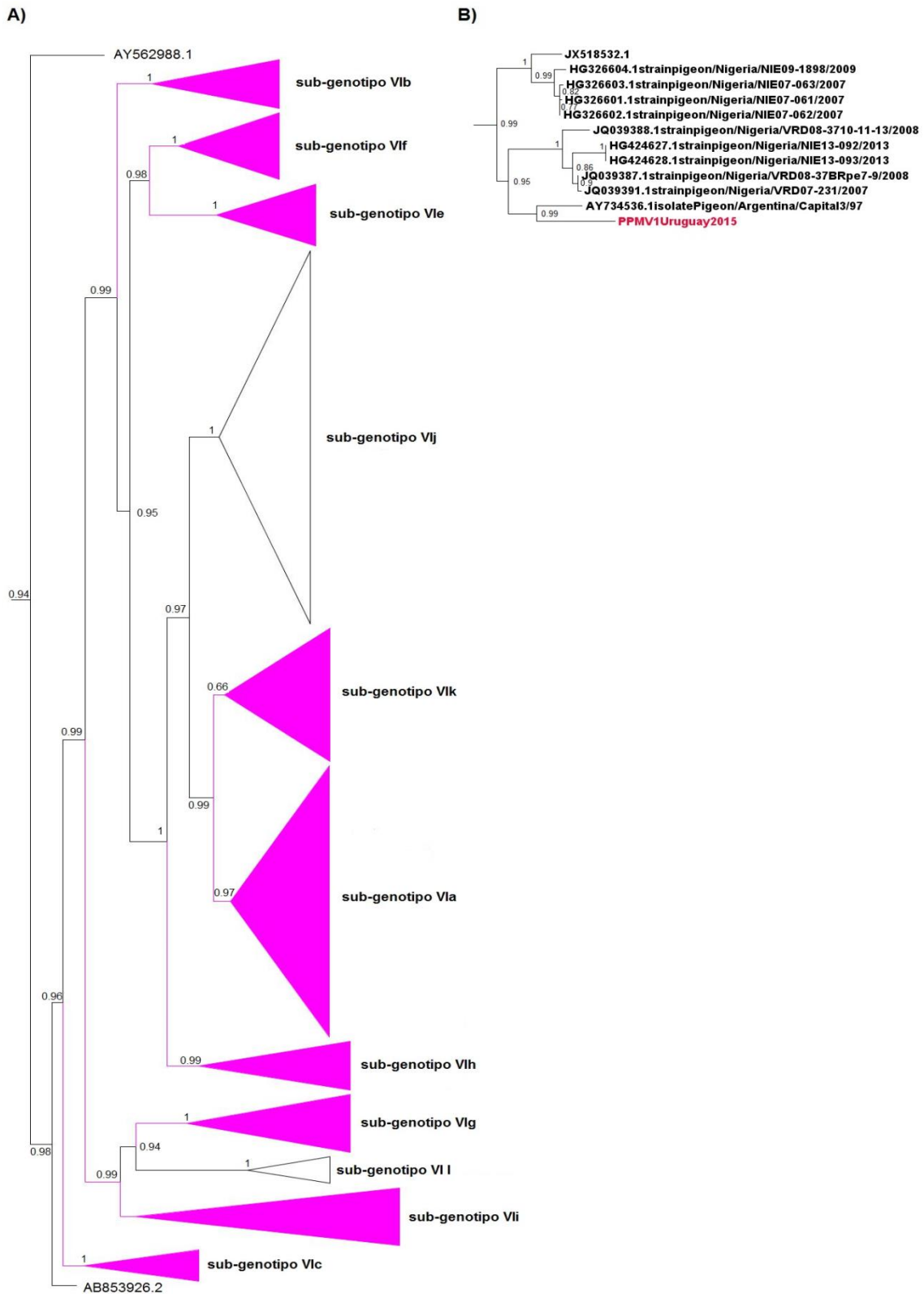


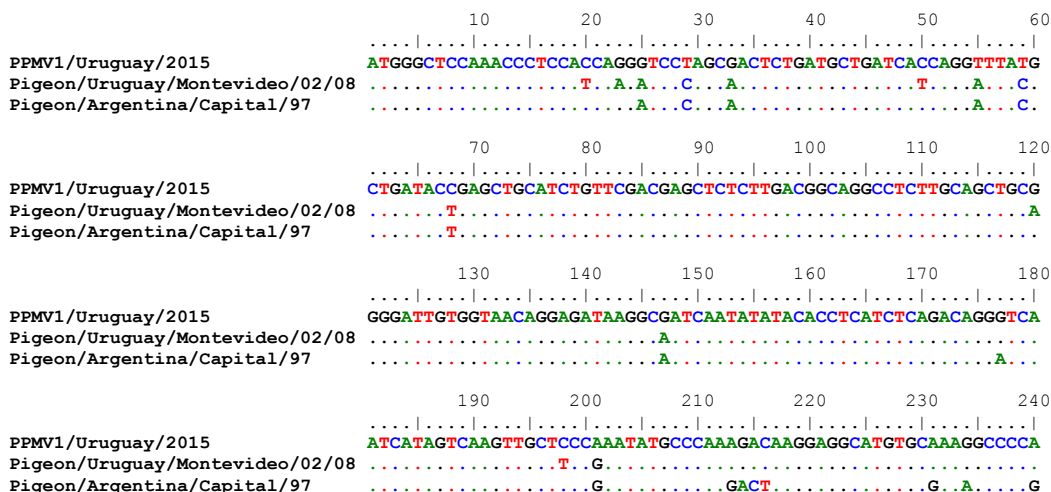
Figura 11. Representación filogenética parcial por máxima verosimilitud basada en la secuencia codificante de la proteína F de las diferentes variantes de APMV-1 disponibles en la base de datos del GenBank, en la que se indica: A) los sub-genotipos del genotipo VI previamente descritos (violeta) como los caracterizados en este trabajo (blanco); B) las cepas que conforman al sub-genotipo VIh. El análisis fue realizado con el modelo evolutivo de sustitución GTR+I+G.

4.5 Identidad nucleotídica y aminoacídica

En las Figuras 12 y 13 se muestran los alineamientos nucleotídicos y aminoacídicos de las cepas PPMV1/Uruguay/2015, Pigeon/Argentina/Capital/3/97, y de la cepa aislada previamente del hospedero *Columba livia* en Uruguay (Pigeon/Uruguay/Montevideo/02/08). De esta última se dispone de una secuencia parcial de 448 nt.

La secuencia completa del gen F de la cepa PPMV1/Uruguay/2015 exhibe un porcentaje de similitud nucleotídica con la cepa argentina de 96%; mientras que su identidad nucleotídica con la cepa uruguaya aislada de *Columba livia* es de 95% para la secuencia parcial.

La identidad aminoacídica de PPMV1/Uruguay/2015 con respecto a estas cepas es de 96 y 94%, respectivamente. Sin embargo, la similitud nucleotídica y aminoacídica entre las cepas argentina y uruguaya previamente descritas es del 97%. Se destaca que, en los primeros 149 aminoácidos de la proteína F, la cepa Pigeon/Argentina/Capital/3/97 presenta, respecto a la cepa PPMV1/Uruguay/2015, siete cambios aminoacídicos de los cuales seis son conservados con la cepa Pigeon/Uruguay/Montevideo/02/08.



```

                250      260      270      280      290      300
PPMV1/Uruguay/2015      TTAGAAGCATACAACAGAACACTGACCACTTTACTCACCCCCCTGGTGACTCCATCCGC
Pigeon/Uruguay/Montevideo/02/08      .....G.....T.....
Pigeon/Argentina/Capital/97      .....

                310      320      330      340      350      360
PPMV1/Uruguay/2015      AGGATACAAGGGTCTGTGCCACATCAGGAGGAAGGAGGCAGAAGCGTTTATAGGTGCC
Pigeon/Uruguay/Montevideo/02/08      .....G.....
Pigeon/Argentina/Capital/97      .....

                370      380      390      400      410      420
PPMV1/Uruguay/2015      ATTATAGGCAGTGTAGCTCTTGGGGTTCGAACGTCAGCACAGATAACAGCAGCCGGCC
Pigeon/Uruguay/Montevideo/02/08      .....G.....G.....
Pigeon/Argentina/Capital/97      .....G.....G.....

                430      440      450      460      470      480
PPMV1/Uruguay/2015      TTAATACAAGCCAAACAAAATGCAGCCAACATCCTCCGACTCAAGGAGAGCATCGCTGCA
Pigeon/Uruguay/Montevideo/02/08      C.....C.....T.....
Pigeon/Argentina/Capital/97      C.....C.....A.....

                490      500      510      520      530      540
PPMV1/Uruguay/2015      ACCAACGAGGCTGTACATGAGGTCACCCACGGATTATCGCACTAGCAGTAGCAGTTGGG
Pigeon/Argentina/Capital/97      .....T.A.....C.....G.....

                550      560      570      580      590      600
PPMV1/Uruguay/2015      AAGATGCAACAGTTTGTCAATGACCAGTTAATAATACGGCCGAGAACTGGACTATAA
Pigeon/Argentina/Capital/97      .....T.....C.....

                610      620      630      640      650      660
PPMV1/Uruguay/2015      AAGTTACACAACAAGTCGGTATAGAACTCAACCTATACCTAACTGAACAGCCACAGCG
Pigeon/Argentina/Capital/97      .....AA.....T.....T.....

                670      680      690      700      710      720
PPMV1/Uruguay/2015      TTCGGCCACAATCACCCTCCCTGCCCCAACTCAGCTGACCATCCAGGCACCTTATAAT
Pigeon/Argentina/Capital/97      .....TCCGTG.CT.ACA.....T.....A.....

                730      740      750      760      770      780
PPMV1/Uruguay/2015      TTAGCTGGCGGCAACATGGATTACTTGTGACTAAGTTAGGCATAGGGAACAATCATCTT
Pigeon/Argentina/Capital/97      .....C.....A.....T.....C.....

                790      800      810      820      830      840
PPMV1/Uruguay/2015      AGCTCATTAATTGGTAGTGGCTTGATCAGGCAACCCATACTGTATGACTCACAGACT
Pigeon/Argentina/Capital/97      .....

                850      860      870      880      890      900
PPMV1/Uruguay/2015      CAACTCTTGGGATCCAGGTTAATTACCCCTCGGTCCGGAACCTTAAATACATGCCCGCC
Pigeon/Argentina/Capital/97      .....A.....T.....

                910      920      930      940      950      960
PPMV1/Uruguay/2015      ACCTACTTGGAGACTTTATCTGTAGCAGCAACAAAGGGTTTGCCTCAGCAGTGTCCCG
Pigeon/Argentina/Capital/97      .....

                970      980      990      1000      1010      1020
PPMV1/Uruguay/2015      AGGGTAGTGACACAAGTCGGCTCTGTGATAGAAGAACTCGACACTTCATCTACTGATAGAG
Pigeon/Argentina/Capital/97      .....A.....T.....

                1030      1040      1050      1060      1070      1080
PPMV1/Uruguay/2015      TCTGATCTAGATTTATATTGTACAAGAAATAGTGACATTCCCCATATCTCCTGGTATGTAT
Pigeon/Argentina/Capital/97      .....G.....

                1090      1100      1110      1120      1130      1140
PPMV1/Uruguay/2015      TCCTGTCTGAGTGGCAATACATCAGCTTGTATGTACTCAAAAACCTGAAGCGCGCTCAAT
Pigeon/Argentina/Capital/97      .....C.....

                1150      1160      1170      1180      1190      1200
PPMV1/Uruguay/2015      ACGCCATACATGGCCCTCAAGGCTCAGTCATTCGCAACTGCAAAATGACCAAGCTCAGG
Pigeon/Argentina/Capital/97      .....G.....T.....A.....C.....

                1210      1220      1230      1240      1250      1260
PPMV1/Uruguay/2015      TGTGCAGACCCCCAGGTATCATTTTCGCAAACTATGGAGAAGCTGTATCTCTGATAGAT
Pigeon/Argentina/Capital/97      .....A.....

```

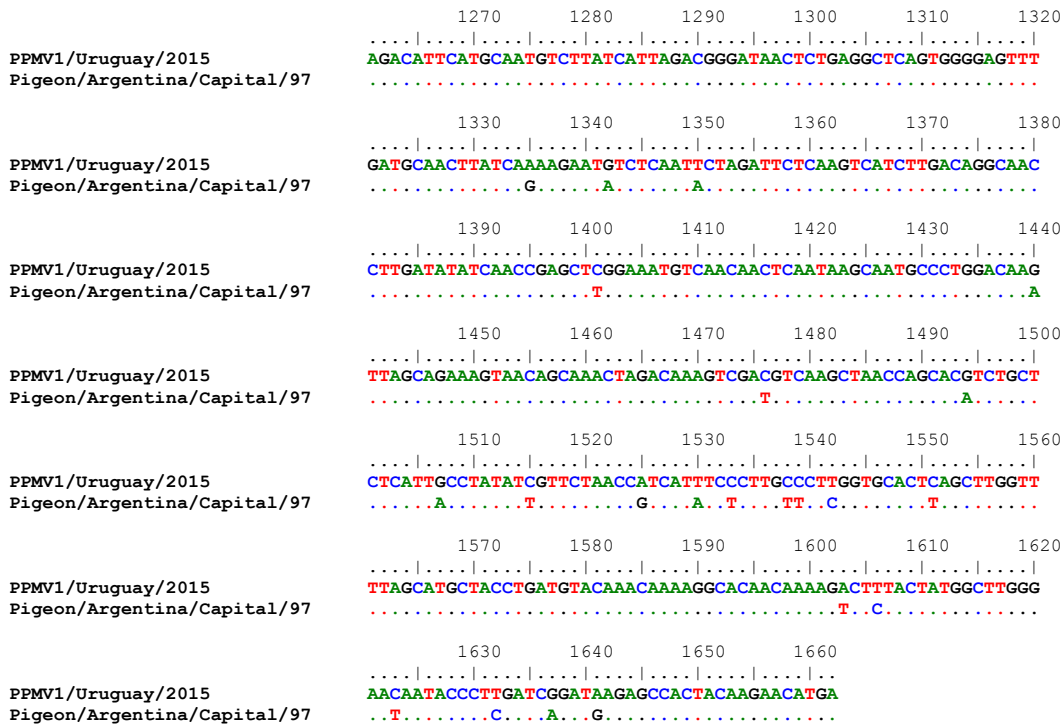


Figura 12. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen F de la muestra PPMV1 Uruguay 2015, la cepa aislada de palomas en Uruguay en el año 2008 y la cepa argentina aislada en Capital en 1997.

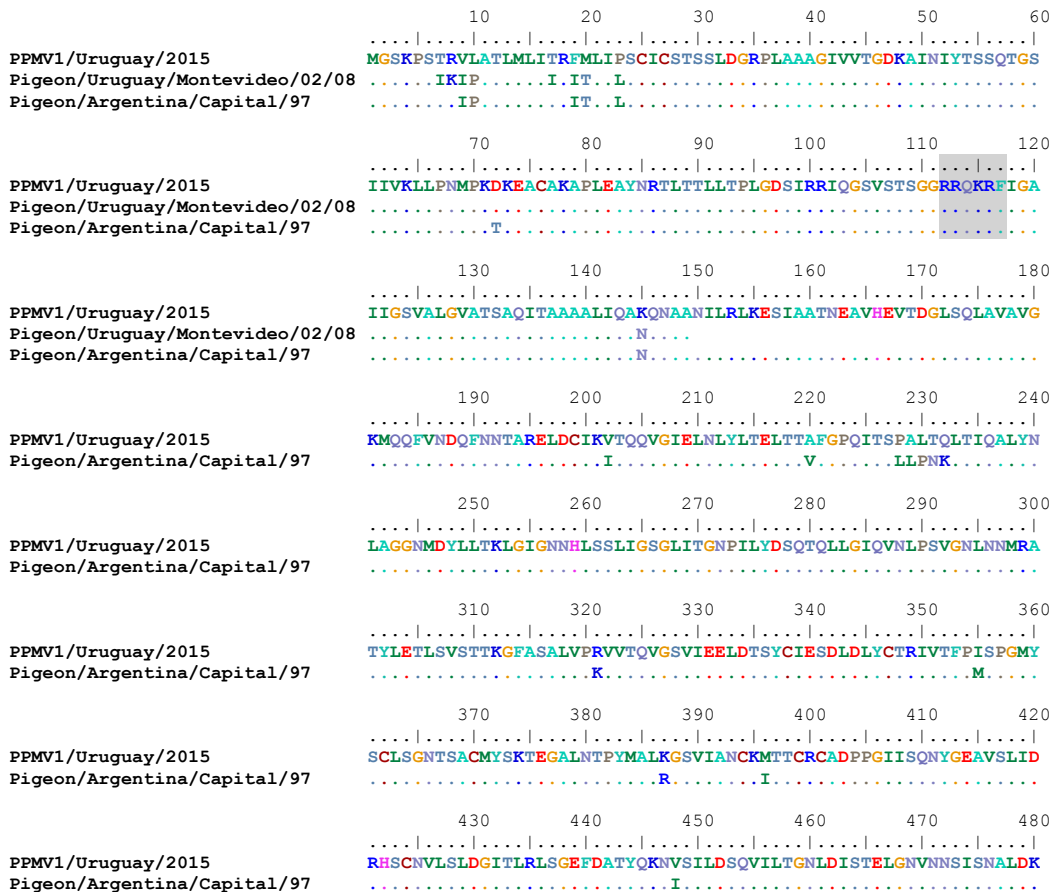




Figura 13. Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida a partir del gen F de la muestra PPMV1 Uruguay 2015, la cepa aislada de palomas en Uruguay en el año 2008 y la cepa argentina aislada en Capital en 1997. Se resalta en gris la secuencia del sitio de clivaje del precursor proteico F₀.

4.6 Caracterización según el sitio de clivaje de F₀

La secuencia aminoacídica correspondiente al sitio de clivaje del precursor proteico F₀ de la cepa PPMV1/Uruguay/2015 presenta el motivo ¹¹²R-R-Q-K-R↓F¹¹⁷, al igual que las cepas Pigeon/Argentina/Capital/3/97 y Pigeon/Uruguay/Montevideo/02/08 (Figura 13), característico de cepas velogénicas y mesogénicas. La cepa vacunal Nobilis exhibe el motivo F₂/F₁¹¹²G-R-Q-G-R↓L¹¹⁷, asociado a cepas de baja patogenicidad.

5 Discusión

5.1 Diagnóstico de PPMV-1

La variante antigénica PPMV-1 originaria del Medio Oriente fue reportada por primera vez en Iraq en el año 1978 a partir de palomas enfermas con encefalomiелitis (Tantawi *et al.*, 1979). Esta variante se propagó progresivamente por todo el mundo, incluyendo a países sudamericanos como Argentina y Uruguay (Zanetti *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2012). En el año 2001 se reportaron en Uruguay palomas con signos clínicos característicos de ND; sin embargo, el PPMV-1 no pudo ser caracterizado en esa oportunidad. La primera caracterización de una cepa uruguaya fue a partir de muestras colectadas de una paloma *Columba livia* con signos clínicos típicos de paramixovirus hallada en una zona urbana de Montevideo en 2008 (Castro *et al.*, 2012). En el mencionado estudio emplearon el ensayo de PCR en tiempo real de Wise *et al.* (2004) para la detección del virus. Esta metodología, basada en la amplificación de una región conservada del gen M, se caracteriza por su rapidez, elevada sensibilidad y especificidad. Basados en estas ventajas, en la presente tesina se utilizó este ensayo de PCR en tiempo real para la detección de PPMV-1 en palomas de la especie *Zenaida auriculata* (paloma torcaza) con sintomatología clínica presuntiva de una infección por este virus. Se analizaron muestras provenientes de pulmón y riñón, teniendo en cuenta que ambos tejidos presentan alta carga viral en etapas iniciales y avanzadas de la infección (Barbezange & Jestin, 2003; Guo *et al.*, 2014).

La cepa de PPMV-1 diagnosticada en este trabajo (PPMV1/Uruguay/2015) es la primera en ser reportada en esta especie de palomas torcazas, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en Sudamérica, especialmente en la

región sur del continente (BirdLife International, 2017). Esta especie es una de las responsables de causar, debido a su superpoblación, grandes daños a la agricultura, en particular a los cultivos de maíz, girasol, trigo y soja (Rodríguez *et al.*, 2011). A su vez, las palomas torcazas están en contacto directo con establecimientos de cría de aves comerciales. Es por ello que destacamos la importancia de comenzar a implementar programas de vigilancia de este patógeno en aves silvestres. Este tipo de estudios se ha realizado en aves acuáticas silvestres en Argentina para monitorear al virus de la Influenza Aviar (AIV) y generar alertas tempranas de la introducción de AIV en aves comerciales (Rimondi *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2012).

5.2 Análisis de las cepas de PPMV-1 del genotipo VI

Para estudiar las relaciones filogenéticas existentes entre la cepa de PPMV-1 detectada en este trabajo y las que se han caracterizado a nivel mundial se realizó una filogenia con todas las secuencias completas del gen F depositadas en la base de datos del NCBI (Figura 11). Los PPMV-1 pertenecen al genotipo VI del APMV-1 y son considerados panzoóticos, pero limitados en el rango de huésped. La mayoría de las cepas que lo conforman han sido aisladas de miembros de la familia *Columbidae* (Dimitrov *et al.*, 2016), aunque se han descrito cepas provenientes de palomas que agrupan genéticamente con otros genotipos (Ren *et al.*, 2016).

El genotipo VI está formado por virus con alta variabilidad genética y actualmente está dividido en diez sub-genotipos (VIa-VIi y VIk) (Dimitrov *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2017), todos ellos identificados en la filogenia realizada a excepción del sub-genotipo VI d. Este sub-genotipo ha sido caracterizado en

base a una región de 389 pb del gen F y comprende aislamientos de aves de corral de Europa de la década de 1990 (Lomniczi *et al.*, 1998). Al carecerse de la secuencia completa del gen F, el sub-genotipo VIId no se halla representado en el sistema de nomenclatura unificado (Dimitrov *et al.*, 2016).

En nuestro análisis filogenético (Figura 11) se observa, además de los nueve sub-genotipos previamente definidos, un nuevo sub-genotipo no descrito hasta la fecha, que denominamos VIj. El sub-genotipo VIj comprende mayormente cepas aisladas de palomas en distintos estados de EEUU entre los años 1998 y 2010, además de cuatro cepas aisladas entre 1996 y 2000 provenientes de Italia, Irlanda y Alemania (anexo d). Estas cepas han sido reportadas en diversos artículos científicos que no utilizan la caracterización genética actual o cuyo objetivo no incluye la genotipificación (Dortmans *et al.*, 2009; Hines *et al.*, 2012; Chong *et al.*, 2013; Chong *et al.*, 2014; Heiden *et al.*, 2014a). Las cepas que conforman a este nuevo sub-genotipo presentan distancias nucleotídicas superiores a 0.03 respecto a los restantes sub-genotipos y han sido obtenidas de más de cuatro aislamientos independientes, conforme a los criterios establecidos para la designación de nuevos sub-genotipos (Diel *et al.*, 2012). Este no es el caso del potencial sub-genotipo VII que se encuentra representado únicamente por siete cepas de Pakistán aisladas en 2014-2015. El mismo se podrá definir como un nuevo sub-genotipo si se detecta de cuatro o más casos independientes sin relación epidemiológica directa.

5.3 Caracterización genética de la cepa PPMV1/Uruguay/2015

En Latinoamérica hay, hasta la fecha, tres secuencias del gen F de PPMV-1 depositadas en la base de datos del GenBank y la nuestra será la cuarta, lo

que parece indicar un esfuerzo de relevamiento reducido en la detección y caracterización de este virus. Una de ellas corresponde a la secuencia parcial del gen F aislada de *Columba livia* en Montevideo en 2008 (Pigeon/Uruguay/Montevideo/02/08) (Castro *et al.*, 2012). Las restantes cepas de PPMV-1 fueron aisladas en Argentina a partir de palomas en los años 1997 y 1999, denominadas Pigeon/Argentina/Capital/3/97 y Pigeon/Argentina/Tigre/6/99, respectivamente (Zanetti *et al.*, 2001; Zanetti *et al.*, 2003).

Las cepas Pigeon/Argentina/Capital/3/97, Pigeon/Uruguay/Montevideo/02/08 y PPMV1/Uruguay/2015 tienen altos niveles de identidad nucleotídica y aminoacídica en la secuencia de F, a pesar de ser aisladas en diferentes países y en años distantes. Esta alta identidad se refleja en el análisis filogenético de la Figura 11, en donde las cepas Pigeon/Argentina/Capital/3/97, y PPMV1/Uruguay/2015 se asocian estrechamente dentro del sub-genotipo VIh. Teniendo en cuenta lo antedicho y la proximidad geográfica de ambos países, las cepas uruguayas y la argentina aislada en 1997 podrían tener un origen común.

El sub-genotipo VIh está también formado por cepas de origen africano aisladas durante los años 2007-2013. Los virus del genotipo VI se han propagado geográficamente a través del comercio, contacto entre palomas de carreras, espectáculos y dispersión de las palomas en libertad (Kaleta *et al.*, 1985; Alexander & Senne, 2003), lo cual podría explicar la detección de este sub-genotipo en zonas geográficas tan lejanas. También se debe considerar que este sub-genotipo puede estar circulando en países en los que no se han

detectado debido a los escasos análisis de este virus en otras partes del mundo.

El análisis de la secuencia aminoacídica de la cepa PPMV1/Uruguay/2015 reveló que posee el motivo del sitio de clivaje del precursor proteico F_0^{112} R-R-Q-K-R↓F¹¹⁷, también presente en las cepas Pigeon/Argentina/Capital/3/97 y Pigeon/Uruguay/Montevideo/02/08. Este motivo se encuentra típicamente en paramixovirus de palomas a partir de 1991 (Meulemans *et al.*, 2002) y está asociado con cepas virulentas en pollos, ya sea mesogénicas o velogénicas, debido a su capacidad de generar infecciones sistémicas. Para confirmar su potencial virulencia en pollos se debe realizar ensayos de patogenicidad *in vivo*, como el ICPI propuesto por la OIE (OIE, 2012). Por el momento no se ha descrito ningún ensayo de patogenicidad *in vivo* en las cepas con las que agrupa genéticamente PPMV1/Uruguay/2015, en particular la cepa argentina aislada en 1997 y la uruguaya en 2008, lo cual impide la predicción de su virulencia en aves de corral de forma independiente al sitio de clivaje F_2/F_1 .

La cepa Pigeon/Argentina/Tigre/6/99, aislada en el año 1999 en Buenos Aires, agrupó genéticamente en el sub-genotipo VIb (Figuras 10 y 11), acorde a lo previamente descrito, y presenta el motivo de sitio de clivaje F_0^{112} G-R-Q-K-R↓F¹¹⁷ de los aislamientos de la década de 1980 (Meulemans *et al.*, 2002). Por tanto, puede considerarse que esta cepa presenta un origen distinto al de las otras cepas sudamericanas caracterizadas de PPMV-1.

En Uruguay la cepa lentogénica vacunal B1 de APMV-1 es la única autorizada oficialmente en nuestro país, debido a la ausencia de reportes de ND en aves de corral desde el año 1984 (Decreto 177/000, 2000). La vacuna Nobilis ND

HITCHNER secuenciada en este trabajo está basada en esta cepa y, según lo esperado, agrupó con el genotipo II en el análisis filogenético. Además presentó el motivo del sitio de clivaje F_0 característico de las cepas de baja patogenicidad ($^{112}G-R-Q-G-R\downarrow L^{117}$). La vacunación contra APMV-1 en Uruguay se rige por el reciente Decreto 177/000, el cual estableció una primera etapa de supresión de la vacunación contra ND de pollos de engorde o parrilleros, además de la prohibición del uso de vacunas que presenten un ICPI mayor a 0.2.

6 Conclusiones

- Se identificó PPMV-1 por primera vez en palomas de la especie *Zenaida auriculata*.
- Se realizó la caracterización genética de la cepa PPMV1/Uruguay/2015 por la obtención de la secuencia completa del gen F.
- El análisis de la secuencia nucleotídica de la cepa uruguaya reveló que la misma agrupa en el genotipo VI sub-genotipo VIh junto con una cepa argentina aislada de palomas en el año 1997.
- La cepa aislada presentó el motivo $^{112}\text{R-R-Q-K-R}\downarrow\text{F}^{117}$ en el sitio de clivaje del precursor proteico F_0 , característico de los paramixovirus de palomas.
- Se describió un nuevo sub-genotipo del genotipo VI, sub-genotipo VIj.

7 Perspectivas

- Secuenciar el genoma completo de la cepa PPMV1/Uruguay/2015.
- Realizar estudios de cuasiespecies con la cepa PPMV1/Uruguay/2015.
- Realizar estudios de compartimentarización en los distintos tejidos.
- Continuar trabajando en el sistema de clasificación de este virus para aportar al entendimiento de su evolución y dispersión.

8 Bibliografía

- Afonso, C. (2008). Not so fast on recombination analysis of Newcastle disease virus. *Journal of virology*, 82(18), 9303-9303.
- Aldous E., Fuller C., Mynn J., Alexander D. (2004). A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (PPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons. *Avian Pathology*, 33(2), 258-269.
- Aldous E., Mynn J., Irvine R., Alexander D., Brown I. (2010) A molecular epidemiological investigation of avian paramyxovirus type 1 viruses isolated from game birds of the order Galliformes. *Avian Pathology*, 39(6), 519-524.
- Alexander D. (2000). Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 19(2), 443–462.
- Alexander D., Senne, D. (2003). Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infection. 12th ed. In: Shaif Y., Barnes H., Glisson J., *et al.* (eds) *Disease of Poultry*. Blackwell, Oxford, UK, 75–100.
- Alexander, D. (2001). Newcastle disease. *British Poultry Science*, 42(1), 5-22.
- Alexander, D., Parsons, G. (1984). Avian paramyxovirus type 1 infections of racing pigeons: 2 pathogenicity experiments in pigeons and chickens. *Veterinary Record*, 114(19), 466-469.
- Alexander, D., Wilson, G., Russell, P., Lister, S., Parsons, G. (1985). Newcastle disease outbreaks in fowl in Great Britain during 1984. *The Veterinary Record*, 117(17), 429-434.
- Alexander, D., Wilson, G., Thain, J., Lister, S. (1984). Avian Paramyxovirus type 1 infection of racing pigeons: 3. Epizootiological considerations. *Veterinary Record*, 115(9), 213-216.
- Amarasinghe, G., Bào Y., Basler, C. *et al.* (2017). Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2017. doi: 10.1007/s00705-017-3311-7.
- Barbezange, C., Jestin, V. (2003). Monitoring of pigeon paramyxovirus type-1 in organs of pigeons naturally infected with Salmonella Typhimurium. *Avian pathology*, 32(3), 277-283.
- Beard C., Hanson R. (1984). Newcastle disease. 8th ed. In: Hofstad M., Barnes H., Calnek B., Reid W., Yoder H. (eds) *Diseases of Poultry*. Iowa State University Press, Ames, 452-470.

- BirdLife International (2017). Species factsheet: *Zenaida auriculata*. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 26/04/2017.
- Castro, E., Zanetti, F., Arbiza, J. (2012). Genetic Characterization of a Pigeon Paramyxovirus Type 1 Isolated from *Columba livia* in Uruguay. *Avian diseases*, 56(1), 243-248.
- Chambers, P., Millar, N., Bingham, R., Emmerson, P. (1986). Molecular cloning of cDNA to Newcastle disease virus, and nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding the hemagglutinin-neuraminidase and the large protein. *Journal of General Virology*, 67(Pt. 3), 475–486.
- Chare, E., Gould, E., Holmes, E. (2003). Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative-sense RNA viruses. *Journal of General Virology*, 84(10), 2691-2703.
- Chong, Y., Kim, O., Poss, M. (2014). Lineage diversification of pigeon paramyxovirus effect re-emergence potential in chickens. *Virology*, 462-463C, 309-317.
- Chong, Y., Lam, T., Kim, O., Lu, H., Dunn, P., Poss, M. (2013). Successful establishment and global dispersal of genotype VI avian paramyxovirus serotype 1 after cross species transmission. *Infection, Genetics And Evolution*, 17, 260-268.
- Chong, Y., Padhi, A., Hudson, P., Poss, M. (2010). The effect of vaccination on the evolution and population dynamics of avian paramyxovirus-1. *PLoS Pathog*, 6(4), e1000872.
- Collins, M., Strong, I., Alexander, D. (1994). Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses". *Archive Virology*, 134, 403-11.
- Collins, M., Strong, I., Alexander, D. (1996). Pathogenicity and phylogenetic evaluation of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses" based on the nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Archives of Virology*, 141(3-4), 635-647.
- Courtney, S., Susta, L., Gomez, D., Hines, N., Pedersen, J., Brown, C., Miller, P., Afonso, C. (2013). Highly divergent virulent isolates of Newcastle disease virus from the Dominican Republic are members of a new genotype that may have evolved unnoticed for over 2 decades. *Journal of clinical microbiology*, 51(2), 508-517.
- Czegledi A., Ujvari D., Somogyi E., Wehmann E., Werner O., Lomniczi B. (2006). Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1

- (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Research*, 120(1), 36–48.
- Darriba, D., Taboada, G., Doallo, R., Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8), 772-772.
- de Leeuw, O., Koch, G., Hartog, L., Ravenshorst, N., Peeters, B. (2005). Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin–neuraminidase protein. *Journal of General Virology*, 86(6), 1759-1769.
- Decreto 177/000 (2000). Enfermedades exóticas. Producción avícola <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/177-2000>.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J., Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research*, 36, W465-W469.
- Diel, D., Da Silva, L., Liu, H., Wang, Z., Miller, P., Afonso, C. (2012). Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1770-1779.
- Dimitrov, K., Ramey, A., Qiu, X., Bahl, J., Afonso, C. (2016). Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). *Infection, Genetics and Evolution*, 39, 22-34.
- Dortmans, J., Koch, G., Rottier, P., Peeters, B. (2009). Virulence of pigeon paramyxovirus type 1 does not always correlate with the cleavability of its fusion protein. *Journal of General Virology*, 90(11), 2746-2750.
- Doyle, T. (1927). A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 40, 144–169.
- Duffy, S., Shackelton, L., Holmes, E. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics*, 9(4), 267-276.
- Edgar, R. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.
- Fujii, Y., Sakaguchi, T., Kiyotani, K., Yoshida, T. (1999). Comparison of Substrate Specificities against the Fusion Glycoprotein of Virulent Newcastle Disease Virus between a Chick Embryo Fibroblast Processing

Protease and Mammalian Subtilisin-Like Proteases. *Microbiology and Immunology*, 43(2), 133-140.

Ganar, K., Das, M., Sinha, S., Kumar, S. (2014). Newcastle disease virus: current status and our understanding. *Virus research*, 184C, 71-81.

Glickman, R., Syddall, R., Iorio, R., Sheehan, J., Bratt, M. (1988). Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *Journal of Virology*, 62(1), 354-356.

Gogoi, P., Ganar, K., Kumar, S. (2017), Avian Paramyxovirus: A Brief Review. *Transboundary and Emerging Diseases*. 64(1), 53–67.

Goraichuk, I., Sharma, P., Stegnyy, B., Muzyka, D., Pantin-Jackwood, M., Gerilovych, A., Solodianskin, O., Bolotin, V., Miller, P., Dimitrov, K., Afonso, C. (2016). Complete genome sequence of an avian paramyxovirus representative of putative new serotype 13. *Genome announcements*, 4(4), e00729-16. doi: 10.1128/genomeA.00729-16.

Guo, H., Liu, X., Xu, Y., Han, Z., Shao, Y., Kong, X., Liu, S. (2014). A comparative study of pigeons and chickens experimentally infected with PPMV-1 to determine antigenic relationships between PPMV-1 and NDV strains. *Veterinary microbiology*, 168(1), 88-97.

Harrison, M., Sakaguchi, T., Schmitt, A. (2010). Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(9), 1416-1429.

Heiden, S., Grund, C., Höper, D., Mettenleiter, T., Römer-Oberdörfer, A. (2014a). Pigeon paramyxovirus type 1 variants with polybasic F protein cleavage site but strikingly different pathogenicity. *Virus genes*, 49(3), 502-506.

Heiden, S., Grund, C., Röder, A., Granzow, H., Kühnel, D., Mettenleiter, T., Römer-Oberdörfer, A. (2014b). Different regions of the Newcastle disease virus fusion protein modulate pathogenicity. *PloS one*, 9(12), e113344.

Hines, N., Killian, M., Pedersen, J., Reising, M., Mosos, N., Mathieu-Benson, C., Miller, C. (2012). An rRT-PCR assay to detect the matrix gene of a broad range of avian paramyxovirus serotype-1 strains. *Avian diseases*, 56(2), 387-395.

Huang, Y., Wan, H., Liu, H., Wu, Y., Liu, X. (2004). Genomic sequence of an isolate of Newcastle disease virus isolated from an outbreak in geese: a novel six nucleotide insertion in the non-coding region of the nucleoprotein gene. *Archives of virology*, 149(7), 1445-1457.

- Kaleta, E., Alexander, D., Russell, P. (1985). The first isolation of the avian pmv-1 virus responsible for the current panzootic in pigeons? *Avian Pathology*, 14, 553-557.
- Karamendin, K., Kydyrmanov, A., Seidalina, A., Asanova, S., Sayatov, M., Kasymbekov, E., Khan, E., Daulbayeva, K., Harrison, S., Carr, I., Goodman, S., Zhumatov, K. (2016). Complete genome sequence of a novel avian paramyxovirus (APMV-13) isolated from a wild bird in Kazakhstan. *Genome announcements*, 4(3), e00167-16. doi: 10.1128/genomeA.00167-16.
- Katoh K., Standley D. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780.
- Kim, L., King, D., Curry, P., Suarez, D., Swayne, D., Stallknecht, D., Slemons, R., Pedersen, J., Senne, D., Winker, K., Afonso, C. (2007a). Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. *Journal of virology*, 81(22), 12641-12653.
- Kim, L., King, D., Suarez, D., Wong, C., Afonso, C. (2007b). Characterization of class I Newcastle disease virus isolates from Hong Kong live bird markets and detection using real-time reverse transcription-PCR. *Journal of clinical microbiology*, 45(4), 1310-1314.
- King, D. (1996). Avian paramyxovirus type 1 from pigeons: isolate characterization and pathogenicity after chicken or embryo passage of selected isolates. *Avian Diseases*, 40(3), 707–714.
- Kommers, G., King, D., Seal, B., Brown, C. (2003). Pathogenesis of chicken-passaged Newcastle disease viruses isolated from chickens and wild and exotic birds. *Avian Diseases*, 47(2), 319–329.
- Kraneveld, F. (1926). A poultry disease in the Dutch East Indies. *Ned Indisch Bi Diergeneeskd*, 38, 448-450.
- Krishnamurthy, S., Samal, S. (1998). Nucleotide sequences of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic regions of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of the entire genome sequence. *Journal of General Virology*, 79(10), 2419-2424.
- Lamb, R., Parks, G. (2013). Paramyxoviridae. In Knipe, M., Howley, P. (ed.), *Fields virology*, vol. 1, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 957-995.
- Liu, X., Wan, H., Ni, X., Wu, Y., Liu, W. (2003). Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from

- outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001. *Archives of virology*, 148(7), 1387-1403.
- Lomniczi, B., Wehmann, E., Herczeg, J., Ballagi-Pordany, A., Kaleta, E., Werner, O., Meulemans, G., Jorgensen, P., Manté, A., Gielkens, A., Capua, I., Damoser, J. (1998). Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Archives of virology*, 143(1), 49-64.
- Maminaiaina, O., Gil, P., Briand, F., Albina, E., Keita, D., Andriamanivo, H., Chevalier, V., Lancelot, R., Martinez, D., Rakotondravao, R., Rajaonarison, J., Koko, M., Andriantsimahavandy, A., Jestin, V., Servan de Almeida, R. (2010). Newcastle disease virus in Madagascar: identification of an original genotype possibly deriving from a died out ancestor of genotype IV. *PLoS One*, 5(11), e13987.
- McFerran, J., McCracken, R. (1988). Newcastle disease. In Alexander D. (ed.). *Newcastle Disease*. Kluwer Academic Publishers: Boston, MA, 161-183.
- Meulemans, G., van den Berg, T., Decaesstecker M., Boschmans, M. (2002). Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. *Avian Pathology*, 31(5), 515–519.
- Miller, M., Pfeiffer, W., Schwartz, T. (2010a). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, New Orleans, 1-8.
- Miller, P. J., Estevez, C., Yu, Q., Suarez, D. L., & King, D. J. (2009a). Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. *Avian diseases*, 53(1), 39-49.
- Miller, P., Decanini, E., Afonso, C. (2010b). Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infection, genetics and evolution*, 10(1), 26-35.
- Miller, P., Kim, L., Ip, H., Afonso, C. (2009b). Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus. *Virology*, 391(1), 64-72.
- Nagai Y., Klenk H., Rott R. (1976). Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology*, 72(2), 494-508.
- Ogasawara, T., Gotoh, B., Suzuki, H., Asaka, J., Shimokata, K., Rott, R., Nagai, Y. (1992). Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. *The EMBO journal*, 11(2), 467-472.

- OIE. (2012). Newcastle disease. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, World Organisation for Animal Health, Paris, France.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14_NE_WCASTLE_DIS.pdf.
- Paldurai A., Kim S., Nayak B., Xiao S., Shive H., *et al.* (2014). Evaluation of the contributions of the individual viral genes to Newcastle disease virus virulence and pathogenesis. *Journal of Virology*, 88(15), 579–96.
- Park, M., Garcia-Sastre, A., Cros, J., Basler, C., Palese, P. (2003). Newcastle disease virus V protein is a determinant of host range restriction. *Journal of Virology*, 77(17), 9522–9532.
- Pchelkina, I., Manin, T., Kolosov, S., Starov, S., Andriyasov, A., Chvala, I., Drygin, V., Yu, Q., Miller, P., Suarez, D. (2013). Characteristics of pigeon paramyxovirus serotype-1 isolates (PPMV-1) from the Russian Federation from 2001 to 2009. *Avian diseases*, 57(1), 2-7.
- Rambaut, A. (2014). FigTree 1.4.2 software. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- Ren, S., Xie, X., Wang, Y., Tong, L., Gao, X., Jia, Y., Wang, H., Fan, M., Zhang, S., Xiao, S., Wang, X., Yang, Z. (2016). Molecular characterization of a Class I Newcastle disease virus strain isolated from a pigeon in China. *Avian Pathology*, 45(4), 408-417.
- Rimondi, A., Xu, K., Craig, M., Shao, H., Ferreyra, H., Rago, M., Romano, M., Uhart, M., Sutton, T., Ferrero, A., Perez, D., Pereda, A. (2011). Phylogenetic analysis of H6 influenza viruses isolated from rosy-billed pochards (*Netta peposaca*) in Argentina reveals the presence of different HA gene clusters. *Journal of virology*, 85(24), 13354-13362.
- Rodríguez, E., Tiscornia, E., Olivera, L. (2011). Disminución del daño por aves en pequeños predios. Serie FPTA N° 29. Ed. INIA, Montevideo. 64pp.
- Sánchez, R., Serra, F., Tárraga, J., Medina, I., Carbonell, J., Pulido, L., de María, A., Capella-Gutiérrez, S., Huerta-Cepas, J., Gabaldón, T., Dopazo, J., Dopazo, H. (2011). Phylemon 2.0: a suite of web-tools for molecular evolution, phylogenetics, phylogenomics and hypotheses testing. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl 2), W470-W474.
- Snoeck, C., Owoade, A., Couacy-Hymann, E., Alkali, B., Okwen, M., Adeyanju, A., Komoyo, G., Nakouné, E., Le Faou, A., Muller, C. (2013). High genetic diversity of Newcastle disease virus in poultry in West and Central Africa: cocirculation of genotype XIV and newly defined genotypes XVII and XVIII. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7), 2250-2260.

- Song, Q., Cao, Y., Li, Q., Gu, M., Zhong, L., Hu, S., Wan, H., Liu, X. (2011). Artificial recombination may influence the evolutionary analysis of Newcastle disease virus. *Journal of virology*, 85(19), 10409-10414.
- Soñora, M., Moreno, P., Echeverría, N., Fischer, S., Comas, V., Fajardo, A., Cristina, J. (2015). An evolutionary insight into Newcastle disease viruses isolated in Antarctica. *Archives of virology*, 160(8), 1893-1900.
- Steward M., Vipond I., Millar N., Emmerson P. (1993). RNA editing in Newcastle disease virus. *Journal of General Virology*, 74(12), 2539–2547.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Tantawi, H., Al Falluji, M., Al Sheikhly, F. (1979). Viral encephalomyelitis of pigeons: identification and characterization of the virus. *Avian Diseases*, 23, 785-793.
- Tsai, H., Chang, K., Tseng, C., Frost, K., Manvell, R., Alexander, D. (2004). Antigenic and genotypical characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan between 1969 and 1996. *Veterinary microbiology*, 104(1), 19-30.
- Ujvari, D., Wehmann, E., Herczeg, J., Lomniczi, B. (2006). Identification and subgrouping of pigeon type Newcastle disease virus strains by restriction enzyme cleavage site analysis. *Journal of Virological Methods*, 131(2), 115-21.
- Wang, X., Ren, S., Wang, X., Wang, C., Fan, M., Jia, Y., Gao, X., Liu, H, Xiao, S., Yang, Z. (2017). Genomic characterization of a wild-bird-origin pigeon paramyxovirus type 1 (PPMV-1) first isolated in the northwest region of China. *Archives of Virology*, 162(3), 749-761.
- Wehmann, E., Czeglédi, A., Werner, O., Kaleta, E., Lomniczi, B. (2003). Occurrence of genotypes IV, V, VI and VIIa in Newcastle disease outbreaks in Germany between 1939 and 1995. *Avian Pathology*, 32(2), 157-163.
- Wise, M., Suarez, D., Seal, B., Pedersen, J., Senne, D., King, D., Kapczynski, D., Spackman, E., (2004). Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 329–338.
- Wu, S., Wang, W., Yao, C., Wang, X., Hu, S., Cao, J., Wu, Y., Liu, W., Liu, X., (2011). Genetic diversity of Newcastle disease viruses isolated from domestic poultry species in Eastern China during 2005–2008. *Archives of virology*, 156(2), 253-261.

- Xu, K., Ferreri, L., Rimondi, A., Olivera, V., Romano, M., Ferreyra, H., Rago, V., Uhart, M., Chen, H., Sutton, T., Pereda, A., Perez, D. (2012). Isolation and characterization of an H9N2 influenza virus isolated in Argentina. *Virus research*, 168(1), 41-47.
- Xue, C., Xu, X., Yin, R., Qian, J., Sun, Y., Wang, C., Ding, C., Yu, S., Hu, S., Liu, X., Cong, Y., Ding, Z. (2017). Identification and pathotypical analysis of a novel Vlk sub-genotype Newcastle disease virus obtained from pigeon in China. *Virus Research*, 238, 1-7. doi:10.1016/j.virusres.2017.05.011.
- Yamamoto, E., Ito, H., Tomioka, Y., Ito, T. (2015). Characterization of novel avian paramyxovirus strain APMV/Shimane67 isolated from migratory wild geese in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(9), 1079-1085.
- Yu, L., Wang, Z., Jiang, Y., Chang, L., Kwang, J. (2001). Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan. *Journal of clinical microbiology*, 39(10), 3512-3519.
- Zanetti, F., Mattiello, R., Garbino, C., Kaloghlian, A., Terrera, M., Boviez, J., Palma, E., Carrillo, E., Berinstein, A. (2001). Biological and molecular characterization of a pigeon paramyxovirus type-1 isolate found in Argentina. *Avian diseases*, 45(3), 567-571.
- Zanetti, F., Rodríguez, M., King, D., Capua, I., Carrillo, E., Seal, B., Berinstein, A. (2003). Matrix protein gene sequence analysis of avian paramyxovirus 1 isolates obtained from pigeons. *Virus genes*, 26(2), 199-206.

Anexo

a) Extracción de ARN con el kit Quick-RNA™ MiniPrep (Zymo Research)

- Tomar 200 µL a partir de homogeneizados de tejido en PBS 1x con estreptomicina y penicilina 2x de dos o tres muestras de cada tejido para formar los *pools* y adicionarle 600 µL de buffer de lisis. Para la vacuna, tomar 200 µL vacuna liofilizada resuspendida en PBS 1x y adicionarle 600 µL de buffer de lisis.
- Centrifugar la suspensión a 3.000 g durante 3 minutos para eliminar restos de tejido.
- Transferir el sobrenadante a una columna amarilla en un tubo colector y centrifugar a 12.000 g por 1 minuto para eliminar la mayor parte del ADN genómico. Guardar el filtrado para la purificación de ARN.
- Añadir un volumen de etanol (95-100%) a la muestra en el buffer de lisis.
- Transferir la mezcla a una columna verde en un tubo colector y centrifugar a 12.000 g por 30 segundos.
- Agregar a la columna 400 µL de buffer de lavado y centrifugar a 12.000 g por 30 segundos.
- Por cada muestra, preparar una mezcla con 5 µL de ADNasal y 75 µL de buffer de digestión de ADN.
- Adicionar directamente a la columna 80 µL de la mezcla e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos. Centrifugar a 12.000 g por 30 segundos.
- Agregar a la columna 400 µL de buffer de pre-lavado y centrifugar a 12.000 g por 30 segundos.
- Agregar a la columna 700 µL de buffer de lavado y centrifugar a 12.000 g por 30 segundos.
- Agregar a la columna 400 µL de buffer de lavado y centrifugar a 12.000 g por 2 minutos para asegurar la remoción completa del buffer de lavado.
- Colocar la columna en un nuevo tubo de 1,5 mL y adicionar 35 µL de agua libre de ARNasas y centrifugar a 12.000 g por 30 segundos.
- Almacenar el ARN a -20°C.

b) Retrotranscripción

- Agregar a un tubo de 0,2 mL, siempre en hielo:
 - 10 μ L del ARN extraído.
 - 1 μ L de hexámeros al azar.
 - 1 μ L de H₂O ultra pura.
- Mezclar e incubar la muestra 5 minutos a 95°C (desnaturalización). Pasar inmediatamente a hielo.
- Agregar al tubo 8 μ L de una mezcla que contenga:
 - 4 μ L Buffer de reacción 5x.
 - 2,5 μ L dNTPs (10 mM).
 - 0,5 μ L del inhibidor de robonucleasas Ribolock (20 u/ μ L).
 - 1 μ L retrotranscriptasa RevertAid™ Minus M-MuIV (200 u/ μ L).
- Incubar 10 minutos a 25°C.
- Incubar 1 hora a 42°C.
- Detener la reacción incubando 10 minutos a 70°C.

c) Purificación de producto de PCR

- Adicionar 5 volúmenes de buffer de unión al ADN por cada volumen de muestra de ADN.
- Transferir la mezcla a una columna Zymo-Spin en un tubo colector.
- Centrifugar a máxima velocidad (≥ 10000 g) por 30 segundos. Descartar el filtrado.
- Adicionar 200 μ L de buffer de lavado de ADN a la columna y centrifugar por 30 segundos. Repetir éste paso.
- Transferir la columna a un nuevo tubo de 1.5 ml.
- Adicionar 23 μ L de buffer de elución directamente en la columna, incubar por 1 minuto y centrifugar para eluir el ADN.

d) Descripción de las cepas que pertenecen al sub-genotipo Vlj.

Número de acceso GenBank	Nombre de la cepa	Referencia bibliográfica
GQ429292.1	AV324/96	Dortmans <i>et al.</i> , 2009
GQ429293.1	Dove/Italy/2736/00	Dortmans <i>et al.</i> , 2009
JN872160.1	Pigeon/Minnesota/511296/07	Hines <i>et al.</i> , 2012
JN872167.1	Dove/FL/455682-2/2006	Hines <i>et al.</i> , 2012
JN872170.1	Pigeon/Texas/5254-12/2010	Hines <i>et al.</i> , 2012
JN872172.1	Raptor/Minnesota/18575-4/2009	Hines <i>et al.</i> , 2012
JN872174.1	New Jersey/9564/2010	Hines <i>et al.</i> , 2012
JN872175.1	Pigeon/Minnesota/723/2009	Hines <i>et al.</i> , 2012
JN872176.1	Pheasant/Massachusetts/359425/2005	Hines <i>et al.</i> , 2012
JN872177.1	Chicken/Massachusetts/344783-3/2004	Hines <i>et al.</i> , 2012
JN872178.1	Turkey/Louisiana/331309/2004	Hines <i>et al.</i> , 2012
JN872179.1	Pigeon/Nevada/241851/2003	Hines <i>et al.</i> , 2012
JN872183.1	Pigeon/Maryland/2075/1998	Hines <i>et al.</i> , 2012
JN941996.1	Pigeon/Pennsylvania/2062/2008	
JN941999.1	Pigeon/Minnesota/77/2008	
JN942000.1	Dove/Florida/1287/2008	
JN942100.1	Chukar/New Jersey/32429-5/2000	Hines <i>et al.</i> , 2012
JX901304.1	APMV1/USA/0301/2003	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901305.1	APMV1/USA/0302/2003	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901313.1	APMV1/Pigeon/USA/0102/2001	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901314.1	APMV1/Dove/USA/0103/2001	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901315.1	APMV1/Pigeon/USA/0106/2001	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901317.1	APMV1/Pigeon/USA/0201/2002	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901319.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0501/2005	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901320.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0502/2005	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901321.1	APMV1/Chicken/PA/USA/0503/2005	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901323.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0601/2006	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901324.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0602/2006	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901325.1	APMV1/Pigeon/NY/USA/0603/2006	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901326.1	APMV1/Pigeon/NJ/USA/0604/2006	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901327.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0605/2006	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901328.1	APMV1/Pigeon/NJ/USA/0607/2006	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901329.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0701/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901330.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0702/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901332.1	APMV1/Pigeon/MO/USA/0703/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901333.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0704/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901334.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0705/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901335.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0706/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901336.1	APMV1/Pigeon/NC/USA/0707/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901337.1	APMV1/Pigeon/CT/USA/0708/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901338.1	APMV1/Pigeon/OH/USA/0709/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901339.1	APMV1/Pigeon/NJ/USA/0710/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901340.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0711/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901342.1	APMV1/Pigeon/MN/USA/0713/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901344.1	APMV1/Pigeon/ME/USA/0714/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013

JX901346.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0716/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901347.1	APMV1/Pigeon/NY/USA/0717/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901348.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0718/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901349.1	APMV1/Pigeon/MD/USA/0719/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901350.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0720/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901351.1	APMV1/Pigeon/NJ/USA/0721/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901352.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0723/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901353.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0724/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901354.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0725/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901355.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0726/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901356.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0727/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901357.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0728/2007	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901358.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0801/2008	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901359.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0802/2008	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901360.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0803/2008	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901361.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0804/2008	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901362.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0805/2008	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901363.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0806/2008	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901364.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0807/2008	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901365.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0808/2008	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901366.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0809/2008	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901367.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0810/2008	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901368.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0811/2008	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901369.1	APMV1/Pigeon/NJ/USA/0812/2008	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901372.1	APMV1/Broiler/PA/USA/0901/2009	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901373.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0902/2009	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901374.1	PMV1/Pigeon/OH/USA/0903/2009	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901375.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0904/2009	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901376.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0905/2009	Chong <i>et al.</i> , 2013
JX901377.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0906/2009	Chong <i>et al.</i> , 2013
KC013032.1	APMV1/Pigeon/USA/0106/2001	Chong <i>et al.</i> , 2014
KC013033.1	APMV1/Pigeon/NJ/USA/0607/2006	Chong <i>et al.</i> , 2014
KC013034.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0704/2007	Chong <i>et al.</i> , 2014
KC013035.1	APMV1/Pigeon/NY/USA/0717/2007	Chong <i>et al.</i> , 2014
KC013036.1	APMV1/Pigeon/MD/USA/0719/2007	Chong <i>et al.</i> , 2014
KC013037.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0805/2008	Chong <i>et al.</i> , 2014
KC013038.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0810/2008	Chong <i>et al.</i> , 2014
KC013039.1	APMV1/Pigeon/PA/USA/0725/2007	Chong <i>et al.</i> , 2014
KJ736742.1	R75/98	Heiden <i>et al.</i> , 2014a