

FERNANDA MIQUELITTO FIGUEIRA DA SILVA

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
MOLECULAR DE *Infectious bursal disease virus* (IBDV)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2011**

FERNANDA MIQUELITTO FIGUEIRA DA SILVA

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
MOLECULAR DE *Infectious bursal disease virus* (IBDV)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 25 de novembro de 2011

Prof^ª. Juliana Lopes Rangel Fietto
(Coorientadora)

Prof. Luiz Orlando de Oliveira

Prof. Maurício Resende

Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins

Prof^ª. Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Deus pela graça da vida e presença em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade.

À FAPEMIG e CNPq pelo apoio financiamento.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de doutorado.

À minha querida orientadora Márcia Rogéria, pelo carinho, amizade, preocupação, conselhos e pela confiança.

Aos Profs. Abelardo Silva Júnior e Juliana Fietto pela coorientação e colaboração.

Às pesquisadoras, Maria Judite Bittencourt e Isabela Cristina Simoni do Instituto Biológico, e Iara Maria Trevisol da Embrapa Suínos e Aves, por gentilmente cederem parte das amostras utilizadas neste trabalho.

Aos Profs. Juliana Fietto, Maurício Resende, Nelson Rodrigo da Silva Martins e Luiz Orlando de Oliveira por aceitarem participar da banca.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Eduardo, secretário da pós-graduação em Bioquímica Agrícola, pela disponibilidade e colaboração.

Ao Sr. Valdir pela força e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo e “coorientador” Pedro Marcus pela amizade, ensinamentos e disponibilidade.

Às Flores e grandes amigas, Ethel, Luciana, Josi e Mari, pela torcida e por todo carinho dedicado a mim.

Aos amigos do laboratório pela boa convivência, amizade e apoio.

Aos amigos Rose e Jairo pela amizade sincera e companheirismo.

Ao meu marido Marcelo pelo amor, paciência, apoio e carinho.

Aos meus pais Marcos e Cátia, e às minhas irmãs Renata e Juliana, pelo amor e força, por estarmos sempre juntos nos momentos mais importantes e por poder sempre contar com vocês!

À minha querida sobrinha Maria Fernanda por sempre alegrar minha vida.

Enfim a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a execução deste trabalho,

MUITO OBRIGADA!

ÍNDICE

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. <i>Infectious bursal disease virus</i> (IBDV).....	1
1.2. Epidemiologia e transmissão.....	2
1.3. Patogenia do IBDV.....	4
1.4. Diagnóstico.....	5
1.5. Controle.....	6
1.6. Diversidade genética.....	7
1.7. Referências bibliográficas.....	8
2. ARTIGOS.....	17
2.1. Artigo I: Proposta de modelo de classificação de <i>Infectious bursal disease virus</i> (IBDV) com base em evidências moleculares.....	17
2.2. Artigo II: Tracking the epidemiology of <i>Infectious bursal disease virus</i> (IBDV): an evolutionary approach.....	55
3. CONCLUSÕES GERAIS.....	84

RESUMO

SILVA, Fernanda Miquelitto Figueira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2011. **Análise da diversidade genética e evolução molecular de *Infectious bursal disease virus* (IBDV)**. Orientadora: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Coorientadores: Juliana Lopes Rangel Fietto e Abelardo Silva Júnior.

O *Infectious bursal disease virus* (IBDV) é considerado um dos patógenos mais importantes da indústria avícola. Considerando as diferenças nos níveis de virulência entre os isolados de IBDV, este trabalho propõe uma definição de genotipagem não arbitrária e uma nomenclatura unificada para os isolados virais de IBDV. Nesta abordagem, 96 sequências completas da VP2 e 561 sequências correspondentes a região hipervariável da VP2 (hvVP2) disponíveis no GenBank foram analisadas e agrupadas por quatro diferentes métodos (UPGMA, *Neighbor-joining*, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana). O valor limite de 0,032 foi selecionado para agrupar os isolados de IBDV em três genótipos: IBDV-1, IBDV-2 e IBDV-3. Além disso, um quarto genótipo contendo sequências de hvVP2 não agrupadas foi definido como IBDV-4. Logo, foi possível estabelecer uma definição de genótipos para o IBDV e fornecer critérios claros para a classificação do IBDV abaixo do nível de gênero. As sequências da hvVP2 são marcadores filogenéticos confiáveis para a genotipagem do IBDV, uma vez que foram capazes de reconstruir a mesma árvore das sequências completas da VP2. Neste trabalho, a epidemiologia dos isolados brasileiros do IBDV foi também analisada em um contexto evolutivo. Inicialmente, as forças seletivas que atuaram durante a diversificação dos isolados virais do IBDV foram testadas. Em seguida, hipóteses filogenéticas foram calculadas por Inferência Bayesiana e abordagens filogeográficas foram utilizadas para a predição da dispersão do IBDV. Seis sequências completas da VP1 (RNA polimerase dependente de RNA) e 26 sequências completas da VP2 (proteína capsial externa) foram produzidas nesse estudo. Os resultados demonstraram que a seleção negativa é a principal força evolutiva que afeta a diversidade de nucleotídeos e as taxas de evolução do IBDV. A partir da análise filogeográfica da VP2 foi possível sugerir que os isolados de IBDV foram introduzidos no Brasil, por pelo menos, três eventos de introdução viral.

ABSTRACT

SILVA, Fernanda Miquelitto Figueira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2011. **Analysis of genetic diversity and molecular evolution of *Infectious bursal disease virus* (IBDV)**. Adviser: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-advisers: Juliana Lopes Rangel Fietto and Abelardo Silva Júnior.

Infectious bursal disease virus (IBDV) is considered one of the most important pathogens for chickens of the poultry industry. Considering the differences in levels of virulence among isolates of IBDV, this paper proposes a non-arbitrary genotyping definition and a unified nomenclature for the viral isolates of IBDV. In this approach, the sets of 96 VP2 and 561 hvVP2 sequences available in GenBank are analyzed and clustered by four different methods (UPGMA, Neighbor-joining, Maximum Likelihood and Bayesian inference). A threshold value of 0.032 of pairwise distance was selected to group the IBDV isolates in three genotypes: IBDV-1, IBDV-2, and IBDV-3. In addition, the fourth group containing unclassified hvVP2 sequences was defined as genotype IBDV-4. The present work contributes to the establishment of a genotype definition for IBDV and provides clear criteria for IBDV classification below the genus level. The hvVP2 sequences are a reliable phylogenetic marker for IBDV genotypes since it were able to reconstruct the same tree as the whole VP2 sequences. In this work, an evolutionary epidemiology of viral isolates of IBDV was assessed. First, the selective forces that operated during the diversification of IBDV were tested. Then, Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) coalescent analyses and phylogeographical approaches were selected to predict IBDV dispersion. Six VP1 (RNA-dependent RNA polymerase) complete sequences and 26 VP2 (outer capsid protein) complete sequences were produced in this study. The results showed that negative selection is the main evolutionary force that affects nucleotide diversity and rates of evolution of IBDV. In addition, phylogeographic analysis of VP2 suggests that IBDV isolates were introduced in Brazil by at least three events of viral introduction.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. *Infectious bursal disease virus (IBDV)*

O *Infectious bursal disease virus* (IBDV) pertence à família *Birnaviridae* e ao gênero *Avibirnavirus* (Dobos et al., 1979). O vírus tem tropismo por pré-linfócitos B em divisão na bursa de Fabricius, causando depleção linfóide, que leva a um quadro de imunodepressão das aves afetadas (van den Berg, 2000).

O IBDV é um vírus não envelopado, com capsídeo de simetria icosaédrica (T=13), medindo cerca de 60 nm de diâmetro (Bottcher et al., 1997). O genoma do vírus consiste de dois segmentos (A e B) de RNA fita dupla (Nagarajan e Kibenge, 1997). O segmento A (3,3 kb) possui duas janelas de leitura aberta (ORFs) (Figura1). A ORF1 codifica a poliproteína VP243 (109 kD) constituída pela proteína precursora da VP2 (pVP2), pela proteína capsidial interna VP3 (32 kD) e pela protease viral VP4 (28 kD), envolvida no processamento da poliproteína (Azad et al., 1985). A pVP2 (48kD) é processada para gerar a proteína capsidial externa VP2 (37 kD), capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes no hospedeiro (Fahey et al., 1989).

A ORF2 codifica a proteína não estrutural VP5 (17 kD), constituída por 145 aminoácidos. Essa proteína é expressa em células infectadas pelo virion, porém, não é requerida durante a replicação viral (Mundt et al., 1997), e pode estar envolvida na virulência e liberação viral (Lombardo et al., 2000; Muller et al., 2003). Recentes estudos demonstraram que a VP5 é capaz de interagir com a subunidade regulatória de PI3K (*phosphatidylinositol 3 kinase*), envolvida na via de sinalização PI3K/Akt, o que leva a supressão prematura da apoptose e ao aumento do crescimento viral após a infecção (Wei et al., 2011).

O segmento B do genoma (2,9 kb), codifica uma proteína de 90 kD, conhecida como VP1 (Azad et al., 1985). A VP1, constituída por 878 aminoácidos, é uma RNA polimerase dependente de RNA responsável pela replicação e transcrição viral (Morgan et al., 1988; Spies et al., 1987). Ela encontra-se presente no virion em pequenas quantidades, na forma livre ou ligada à extremidade 5' do RNA viral (VPg), e desempenha um importante papel na encapsidação da partícula viral (van den Berg, 2000).

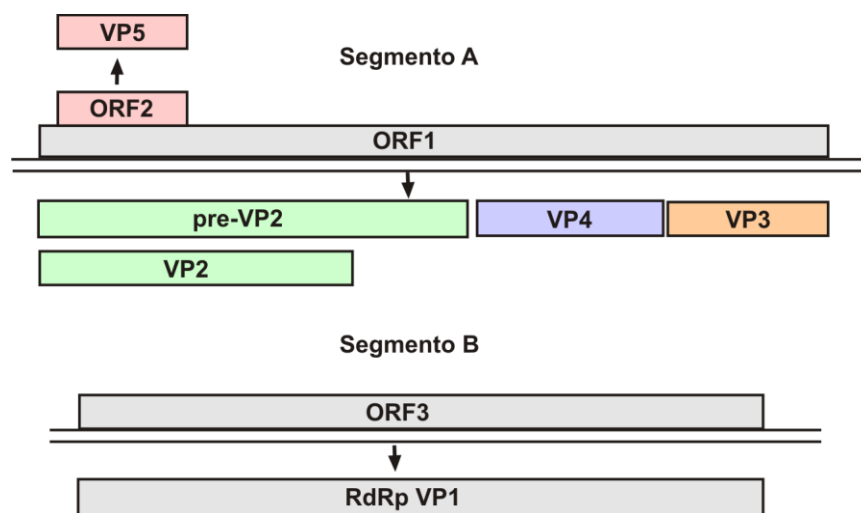


Figura 1. Esquema representativo da organização do genoma do IBDV.

O IBDV é diferenciado em dois sorotipos (Jackwood et al., 1985). O sorotipo 1 é constituído por linhagens patogênicas, enquanto o sorotipo 2 não causa doença, nem proteção contra as linhagens do sorotipo 1 em galinhas (van den Berg, 2000). O sorotipo 1 possui distribuição geográfica cosmopolita sendo, portanto, presente na maioria dos plantéis comerciais. O sorotipo 2 é normalmente encontrado em perus, mas eventualmente pode infectar patos e galinhas (Jackwood et al., 1982; McNulty e Saif, 1988). Esse sorotipo também foi isolado no pinguim do pé preto (*Spheniscus demersus*), o que indica a presença de outros possíveis hospedeiros naturais do IBDV (Jackwood et al., 2005).

As linhagens pertencentes ao sorotipo 1 são ainda classificadas em linhagens clássicas (cvIBDV), atenuadas (atIBDV), variantes antigênicas (avIBDV) ou altamente virulentas (vvIBDV). Dentro das linhagens clássicas encontra-se a grande maioria das amostras vacinais utilizadas na avicultura (Saif, 1999).

1.2. Epidemiologia e transmissão

A doença infecciosa da bursa (*Infectious bursal disease*, IBD), também conhecida como doença de Gumboro, foi inicialmente descrita em 1962, por Cosgrove, na cidade de Gumboro nos Estados Unidos (Cosgrove, 1962). A partir de 1967, a doença era facilmente controlada por vacinação, pois os isolados de IBDV possuíam baixa virulência e causavam uma baixa mortalidade específica. Contudo, em meados

dos anos 80, algumas variantes virais (hoje conhecidas como avIBDV) começaram a ser identificadas nos EUA (Saif, 1984; Jackwood e Saif, 1987). Ao mesmo tempo, linhagens de alta virulência (vvIBDV) capazes de causar 100% de mortalidade nas aves susceptíveis, surgiram na Europa (Chettle et al., 1989). Além disso, essas linhagens eram capazes de provocar doença clínica e morte até mesmo em animais vacinados ou com altos títulos de anticorpos maternos (Box, 1989).

A partir do primeiro surto, descrito na Europa em 1987, as linhagens de vvIBDV espalharam-se rapidamente, levando à surtos em diversos países da Ásia (Phong et al., 2003; Razmyar e Peighambari, 2008; Sun et al., 2003), África (Zierenberg et al., 2001), América do Norte e América Latina (Di Fabio et al., 1999; Dias et al., 2004; Hernandez et al., 2006; Ikuta et al., 2001; Paula et al., 2004; Remorini et al., 2006; Stoute et al., 2009).

No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez por Nakano et al. (1972) e o primeiro isolamento viral foi relatado em 1978 (Saukas, 1998). Até meados da década de 90, a doença era predominantemente subclínica, sendo observados hipertrofia da bursa e problemas secundários decorrentes da imunodepressão. Os primeiros casos de alta mortalidade de aves com IBD foram observados em meados de 1997 (Di Fabio et al., 1999), sendo causados por um vírus semelhante a uma linhagem de vvIBDV descrita na Europa em 1989 (Ikuta et al., 2001).

A transmissão do vírus ocorre de forma horizontal por meio das fezes, levando a contaminação pelas vias aéreas, digestiva e ocular. A doença apresenta uma alta morbidade, porém a taxa de mortalidade é dependente do *status* imunitário das aves, das práticas de manejo e das condições ambientais presentes em cada área geográfica (Sharma et al., 2000).

Um dos fatores predisponentes para a ocorrência de surtos nas granjas é a condição ambiental das aves. Quando o ambiente está muito contaminado, densamente povoado e seco, pode ocorrer a formação de poeiras infecciosas e, conseqüentemente, facilitar a entrada do vírus por via conjuntival ou respiratória (Mor et al., 2010).

O IBDV é bastante resistente e sobrevive a 60°C por 60 minutos e em valores de pH entre 3 e 9 (Benton et al., 1967; Mandeville et al., 2000). Compostos iodados possuem ação contra o vírus, o que não ocorre com derivados de fenol e compostos quaternários da amônia, que exigem uma maior concentração do desinfetante e um maior tempo de ação. A alta resistência do vírus aos diferentes compostos acarreta uma longa sobrevivência deste nas instalações, mesmo quando rigorosas medidas de limpeza

e desinfecção são aplicadas. O IBDV persiste no ambiente onde as aves infectadas foram alojadas por mais de 122 dias (Benton et al., 1967).

A presença do IBDV nas aves após o abate tem levado alguns pesquisadores a estudar o risco associado à introdução de linhagens virais em mercadorias a serem exportadas. Jackwood et al. (2007) comprovaram que a quantidade de radiação gama aprovada pela *U.S Food and Drug Administration* (FDA) não é eficiente para reduzir a introdução do IBDV pelas aves comercializadas como produtos alimentícios.

1.3. Patogenia do IBDV

A doença infecciosa da bursa é caracterizada por um severo efeito imunossupressor em aves jovens de 3 a 6 semanas de idade (van den Berg, 2000). Ambos os tipos de infecção, clínica ou subclínica, podem causar imunossupressão, o que leva ao comprometimento das respostas imune celular e humoral. Esse efeito imunossupressor induz o aumento da incidência de infecções secundárias, a baixa taxa de conversão alimentar, a redução da resposta protetora às vacinas e o aumento da taxa de condenação de carcaças (Sharma et al., 2000).

Em condições naturais, a via oral é o modo mais comum de infecção pelo IBDV. A partir do intestino, o vírus é transportado a outros tecidos por células fagocíticas, provavelmente macrófagos residentes. Após horas de infecção, células contendo vírus aparecem na bursa e o vírus rapidamente se espalha através dos folículos bursais. Altos títulos virais não são detectados somente na bursa de Fabricius, mas também no timo, baço e medula óssea (Tsukamoto et al., 1995). A replicação viral leva a uma extensiva destruição das células linfóides (Muller et al., 1979). Esse processo de destruição celular pode ser acentuado pela apoptose de células vizinhas livres de vírus (Sharma et al., 2000).

Os sinais clínicos associados à doença aguda incluem anorexia, depressão, penas eriçadas, diarreia aquosa, desidratação, prostração e morte (Berg e Meulemans, 1991; Lukert e Saif, 1997). As lesões incluem atrofia da bursa, desidratação e manchas escuras na musculatura peitoral. Frequentemente, hemorragias podem ocorrer na bursa e nos músculos da coxa e peitoral. Já a doença subclínica, forma mais importante da infecção, manifesta-se com baixa mortalidade e severa imunodepressão (Sharma et al., 2000).

As linhagens clássicas e as altamente virulentas podem promover de 30-60% e 60-100% de mortalidade, respectivamente (Cao et al., 1998). Ambas causam inflamação

hemorrágica na bursa, enquanto que algumas linhagens variantes podem gerar uma atrofia desse órgão, sem provocar uma resposta inflamatória, indicando assim, diferenças no processo apoptótico celular e na patogênese da doença (Liu e Vakharia, 2006). As aves que sobrevivem à fase aguda da doença eliminam o vírus e se recuperam da doença clínica (Sharma et al., 2000).

1.4. Diagnóstico

O quadro clínico pode ser usado para se realizar um diagnóstico preliminar da infecção pelo IBDV. Para um diagnóstico definitivo é necessário ensaios sorológicos (Islam et al., 2001a), ensaios moleculares (Lin et al., 1993; Wu et al., 2007) ou exame *post mortem* (Tsukamoto et al., 1992).

No exame *post mortem*, a bursa de Fabricius, principal órgão usado no diagnóstico, apresenta-se edemaciada, às vezes, hemorrágica e dentro de 7 a 10 dias torna-se atrofica (Tsukamoto et al., 1992). As alterações histopatológicas observadas na bursa de Fabricius, combinadas com a demonstração de antígenos virais por imunohistoquímica, confirmam a infecção pelo IBDV. O IBDV pode ser isolado através da inoculação em ovos embrionados de galinha e os antígenos virais podem ser identificados por meio de ensaios sorológicos, como, precipitação em ágar-gel, imunofluorescência ou ensaio imunoenzimático (ELISA) (Islam et al., 2001a).

Métodos moleculares podem identificar e caracterizar diferentes variantes de IB DVs, ajudando a compreender as bases moleculares da sua variação antigênica e patogenicidade. Estas informações podem ser utilizadas para o desenvolvimento de métodos de detecção mais efetivos, bem como para a produção de vacinas (Dormitorio et al., 2007). Assim, alguns métodos moleculares, como *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *western blotting* e RT-PCR quantitativa, vêm sendo atualmente utilizados com sucesso, para diagnóstico e diferenciação das variantes patogênicas do IB DV (Jackwood e Sommer, 1999; Lin et al., 1993; Zierenberg et al., 2001; Ashraf et al., 2007; Gomes et al., 2005; Jackwood et al., 2003; Wu et al., 2007).

1.5. Controle

Um dos grandes desafios da avicultura mundial têm sido o controle e a prevenção da IBD. Isso se deve à alta resistência do IBDV às condições ambientais e também a sua distribuição global. Segundo Durairaj et al. (2011), o controle da IBD pode ser estabelecido unicamente com um sólido programa de vacinação, acompanhado de um programa de biossegurança adequado.

A imunização de aves com vacinas (inativadas ou vivas) é o principal método usado para o controle da IBD (Rajput et al., 2010). As vacinas inativadas são usadas principalmente para produzir níveis elevados, duradouros e uniformes de anticorpos em aves previamente vacinadas com vacinas vivas ou expostas naturalmente ao vírus de campo (O'Hagan et al., 2001).

As vacinas vivas são produzidas a partir de linhagens virais muito ou pouco atenuadas, conhecidas como intermediárias e fortes (*hot*), respectivamente. As vacinas vivas fortes produzem uma ampla e longa proteção, mas possuem uma patogenicidade residual e um risco de reversão da virulência (Habib et al., 2006). Além disso, a utilização de vacinas vivas para a proteção de aves de campo portadoras de anticorpos maternos pode não ser eficiente, pois os anticorpos maternos, que protegem as aves até três semanas de idade, reduzem a resposta imune à imunização ativa (Zhou et al., 2010). Algumas vacinas vivas podem causar uma moderada atrofia bursal, o que pode promover a infecção por patógenos oportunistas (Zhou et al., 2010). Logo, torna-se necessário o desenvolvimento de vacinas mais seguras e eficazes contra o IBDV a campo.

Com intuito de aumentar a segurança e a eficácia das vacinas, proteínas virais recombinantes têm sido testadas e vem se mostrando uma alternativa satisfatória para o controle da IBD (Pitcovski et al., 2003; Rong et al., 2005; Tsukamoto et al., 2000). Villegas et al., (2008) demonstraram que frangos vacinados com a VP2 completa não apresentaram morbidade e nem mortalidade quando comparados com outro grupo que foi vacinado apenas com a região hipervariável dessa proteína e apresentou 30% de morbidade e mortalidade. Em outro trabalho, Perozo et al. (2008) demonstraram que um adenovírus recombinante expressando a VP2 induziu imunidade protetora contra o vvIBDV, em aves livres de patógenos específicos (SPF). Além disso, a vacinação dessas aves com o adenovírus recombinante não afetou o tecido linfóide bursal, demonstrando assim seu potencial para ser utilizada em aves jovens. Do mesmo modo,

Wu et al. (2004) demonstraram que a utilização de uma vacina comercial em aves, seguida por uma imunização das mesmas com a VP2 expressa em planta (*Arabidopsis thaliana*), produziu nessas aves, uma proteção de 90% contra a linhagem variante E.

As vacinas de DNA são também uma alternativa para a prevenção e controle da doença. Alguns estudos demonstraram que a utilização de vacinas de DNA, compostas pelas ORFs VP2, VP3 e VP4, pode ser uma estratégia eficaz para a proteção de aves contra diversas linhagens de IBDV (Chang et al., 2003; Hsieh et al., 2006; Park et al., 2009; Chen et al., 2011). Além disso, Hsieh et al. (2010) demonstraram que uma vacina de DNA constituída por um DNA plasmidial codificando a poliproteína VP234 foi capaz de conferir proteção em aves com anticorpos maternos contra o IBDV.

1.6. Diversidade genética

Desde o final da década de 80, quando o IBDV propiciou elevadas perdas econômicas para a indústria avícola, diversos estudos de genotipagem da sequência da VP2 têm sido amplamente usados como forma de traçar a distribuição e a diversidade genética do IBDV (Hon et al., 2006; Jackwood e Sommer-Wagner, 2007; Jackwood et al., 2009; Li et al., 2009; Sreedevi et al., 2007). Estudos demonstraram ainda que os principais epítomos neutralizantes do IBDV estão localizados na região hipervariável da VP2 (Coulibaly et al., 2005; Eterradossi et al., 1997).

A região hipervariável da VP2 tem sido o principal alvo de estudos devido à sua alta taxa de mutação e antigenicidade. Análises utilizando anticorpos monoclonais demonstraram que mudanças de resíduos de aminoácidos na região hipervariável da VP2 podem levar a emergência de novas variantes de IBDV ou a atenuação viral (Durairaj et al., 2011; van den Berg, 2000). Os determinantes moleculares que distinguem os isolados altamente virulentos (vvIBDV) dos isolados atenuados de IBDV não estão totalmente elucidados, mas sabe-se que a mudança de resíduos de aminoácidos específicos (nas posições 222, 254, 256, 272, 279, 280, 294, 299, 317 e 318) dentro da região hipervariável da VP2 podem levar a uma alteração da virulência do isolado viral (Durairaj et al., 2011; Qi et al., 2009; Lazarus et al., 2008; van den Berg et al., 2004). Portanto, a dinâmica de mutação na sequência da VP2 pode exercer um papel chave na evolução e virulência do IBDV. Além disso, os processos de recombinação e *reassortment* (rearranjo de segmentos genômicos virais) entre linhagens vacinais e selvagens podem aumentar a probabilidade da emergência de novos vírus

quiméricos (Hon et al., 2008).

Análises filogenéticas têm revelado histórias evolutivas independentes para os dois segmentos genômicos do IBDV (Islam et al., 2001b; Yamaguchi et al., 1997), sugerindo que o evento de *reassortment* também pode exercer um papel na mudança patogênica do vírus. Existem poucos estudos que tratam da ocorrência natural de *reassortment* do IBDV (Wei et al., 2006; Wei et al., 2008). De acordo com esses estudos, a co-infecção de animais com linhagens atenuadas e altamente virulentas pode acarretar uma troca dos segmentos genômicos de RNA dupla fita gerando novas linhagens virais. Segundo Wei et al. (2008), vírus que possuem o segmento A derivado de um atIBDV e o segmento B derivado de um vvIBDV, são patogênicos embora não tão virulentos como os vvIBDVs.

Adicionalmente, outros estudos também demonstraram que a recombinação homóloga pode ter um importante papel na diversidade genética do IBDV, pois o processo de recombinação entre linhagens vacinais e selvagens pode resultar na emergência de novos grupos de vvIBDV (He et al., 2009; Hon et al., 2008). Regiões de recombinação foram encontradas em ambos os segmentos genômicos das linhagens de IBDV avaliadas e uma nova sub-linhagem composta por três sequências também foi encontrada (He et al., 2009).

Considerando a grande diversidade genética dos isolados de IBDV, este trabalho propõe uma definição de genotipagem não arbitrária e uma nomenclatura unificada para os isolados virais de IBDV. Além disso, este trabalho busca obter informações mais detalhadas a respeito da diversidade genética e evolução molecular do IBDV, e identificar os possíveis eventos de introdução do vírus na avicultura brasileira. Estas informações são importantes para uma melhor caracterização dos surtos e para elaboração de melhores métodos de controle e prevenção da doença, como a adequação dos programas de vacinação e o estabelecimento de políticas sanitárias para o controle da disseminação do vírus.

1.7. Referências Bibliográficas

Ashraf, S., Tang, Y., Saif, Y.M., 2007, Development of differential RT-PCR assays and molecular characterization of the complete VP1 gene of five strains of very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 51, 935-941.

Azad, A.A., Barrett, S.A., Fahey, K.J., 1985, The characterization and molecular

- cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus. *Virology* 143, 35-44.
- Benton, W.J., Cover, M.S., Rosenberger, J.K., Lake, R.S., 1967, Physicochemical properties of the infectious bursal agent (IBA). *Avian Dis* 11, 438-445.
- Berg, T.P., Gonze, M., Meulemans, G., 1991, Acute infectious bursal disease in poultry: Isolation and characterisation of a highly virulent strain. *Avian Pathol* 20, 133-143.
- Bottcher, B., Kiselev, N.A., Stel'Mashchuk, V.Y., Perevozchikova, N.A., Borisov, A.V., Crowther, R.A., 1997, Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J Virol* 71, 325-330.
- Box, P., 1989, High maternal antibodies help chicks beat virulent strains. *World Poultry* 53,17-19.
- Cao, Y.C., Yeung, W.S., Law, M., Bi, Y.Z., Leung, F.C., Lim, B.L., 1998, Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. *Avian Dis* 42, 340-351.
- Chang, H.C., Lin, T.L., Wu, C.C., 2003, DNA vaccination with plasmids containing various fragments of large segment genome of infectious bursal disease virus. *Vaccine* 21, 507-513.
- Chen, Y.Y., Hsieh, M.K., Tung, C.Y., Wu, C.C., Lin, T.L., 2011, Infectious bursal disease DNA vaccination conferring protection by delayed appearance and rapid clearance of invading viruses. *Arch Virol*. DOI 10.1007/s00705-011-1127-4.
- Chettle, N., Stuart, J.C., Wyeth, P.J., 1989, Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Vet Rec* 125, 271-272.
- Cosgrove, S. D., 1962, An apparently new disease of chickens-avian nephrosis. *Avian Dis* 6,385-389.
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas, B., Rey, F.A., 2005, The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell* 120, 761-772.
- Di Fabio, J.C., G.; Gardi, Y.; Rossini, L. I.; Toquin, D.; Eterradosi, N. , 1999, Very virulent IBD spreads to South América. *Word Poutry Elsevier* 15, 88-91.
- Dias, A.C.C., Souza, F. D., Silva, E. M. S., Eller, M. R., Barrios, P. R., Santos, B. M., Moraes, M. P., Lamêgo, M. R. A. , 2004, Sequencing and phylogenetic analysis of the Infectious Bursal of Disease Virus isolates from outbreak in layer flocks in the state of Minas Gerais. *Brazilian Journal of Microbiology* 40, 1-3.

- Dobos, P., Hill, B.J., Hallett, R., Kells, D.T., Becht, H., Teninges, D., 1979, Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol* 32, 593-605.
- Dormitorio, T.V., Giambrone, J.J., Guo, K., Jackwood, D.J., 2007, Molecular and phenotypic characterization of infectious bursal disease virus isolates. *Avian Dis* 51, 597-600.
- Durairaj, V., Sellers, H.S., Linnemann, E.G., Icard, A.H., Mundt, E., 2011, Investigation of the antigenic evolution of field isolates using the reverse genetics system of infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch Virol*.
- Etteradossi, N., Toquin, D., Rivallan, G., Guittet, M., 1997, Modified activity of a VP2-located neutralizing epitope on various vaccine, pathogenic and hypervirulent strains of infectious bursal disease virus. *Arch Virol* 142, 255-270.
- Fahey, K.J., Erny, K., Crooks, J., 1989, A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. *J Gen Virol* 70, 1473-1481.
- Gomes, A.D., Abreu, J.T., Redondo, R.A., Martins, N.R., Resende, J.S., Resende, M., 2005, Genotyping of infectious bursal disease virus strains by restriction fragment length polymorphism analysis of the VP1, VP2, and VP3 genes. *Avian Dis* 49, 500-506.
- Habib, M., Hussain, I., Fang, W.H., Rajput, Z.I., Yang, Z.Z., Irshad, H., 2006, Inactivation of infectious bursal disease virus by binary ethylenimine and formalin. *J Zhejiang Univ Sci B* 7, 320-323.
- He, C.Q., Ma, L.Y., Wang, D., Li, G.R., Ding, N.Z., 2009, Homologous recombination is apparent in infectious bursal disease virus. *Virology* 384, 51-58.
- Hernandez, M., Banda, A., Hernandez, D., Panzera, F., Perez, R., 2006, Detection of very virulent strains of infectious bursal disease virus (vvIBDV) in commercial broilers from Uruguay. *Avian Dis* 50, 624-631.
- Hon, C.C., Lam, T.T., Yip, C.W., Wong, R.T., Shi, M., Jiang, J., Zeng, F., Leung, F.C., 2008, Phylogenetic evidence for homologous recombination within the family Birnaviridae. *J Gen Virol* 89, 3156-3164.
- Hon, C.C., Lam, T.Y., Drummond, A., Rambaut, A., Lee, Y.F., Yip, C.W., Zeng, F., Lam, P.Y., Ng, P.T., Leung, F.C., 2006, Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent infectious bursal disease virus and reassortment of its genome segment B. *J Virol* 80, 8503-8509.

- Hsieh, M.K., Wu, C.C., Lin, T.L., 2006, The effect of co-administration of DNA carrying chicken interferon-gamma gene on protection of chickens against infectious bursal disease by DNA-mediated vaccination. *Vaccine* 24, 6955-6965.
- Hsieh, M.K., Wu, C.C., Lin, T.L., 2010, DNA-mediated vaccination conferring protection against infectious bursal disease in broiler chickens in the presence of maternal antibody. *Vaccine* 28, 3936-3943.
- Ikuta, N., El-Attrache, J., Villegas, P., Garcia, E.M., Lunge, V.R., Fonseca, A.S., Oliveira, C., Marques, E.K., 2001, Molecular characterization of Brazilian infectious bursal disease viruses. *Avian Dis* 45, 297-306.
- Islam, M.R., Zierenberg, K., Eterradossi, N., Toquin, D., Rivallan, G., Muller, H., 2001a, Molecular and antigenic characterization of Bangladeshi isolates of infectious bursal disease virus demonstrate their similarities with recent European, Asian and African very virulent strains. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48, 211-221.
- Islam, M.R., Zierenberg, K., Muller, H., 2001b, The genome segment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains. *Arch Virol* 146, 2481-2492.
- Jackwood, D.J., Gough, R.E., Sommer, S.E., 2005, Nucleotide and amino acid sequence analysis of a birnavirus isolated from penguins. *Vet Rec* 156, 550-552.
- Jackwood, D.H., Saif, Y.M., 1987, Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis* 31, 766-770.
- Jackwood, D.J., Saif, Y.M., Hughes, J.H., 1982, Characteristics and serologic studies of two serotypes of infectious bursal disease virus in turkeys. *Avian Dis* 26, 871-882.
- Jackwood, D.J., Saif, Y.M., Moorhead, P.D., 1985, Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens. *Avian Dis* 29, 1184-1194.
- Jackwood, D.J., Sommer-Wagner, S., 2007, Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virology* 365, 369-375.
- Jackwood, D.J., Sommer-Wagner, S.E., Pharo, H.J., 2007, The use of gamma irradiation for the inactivation of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis* 51, 606-608.
- Jackwood, D.J., Sommer-Wagner, S.E., Stoute, A.S., Woolcock, P.R., Crossley, B.M.,

- Hietala, S.K., Charlton, B.R., 2009, Characteristics of a very virulent infectious bursal disease virus from California. *Avian Dis* 53, 592-600.
- Jackwood, D.J., Sommer, S.E., 1999, Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States. *Avian Dis* 43, 310-314.
- Jackwood, D.J., Spalding, B.D., Sommer, S.E., 2003, Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction detection and analysis of nucleotide sequences coding for a neutralizing epitope on infectious bursal disease viruses. *Avian Dis* 47, 738-744.
- Lazarus, D., Pasmanik-Chor, M., Gutter, B., Gallili, G., Barbakov, M., Krispel, S., Pitcovski, J., 2008, Attenuation of very virulent infectious bursal disease virus and comparison of full sequences of virulent and attenuated strains. *Avian Pathol* 37, 151-159.
- Li, Y., Wu, T., Cheng, X., Zhang, C., 2009, Molecular characteristic of VP2 gene of infectious bursal disease viruses isolated from a farm in two decades. *Virus Genes* 38, 408-413.
- Lin, Z., Kato, A., Otaki, Y., Nakamura, T., Sasmaz, E., Ueda, S., 1993, Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis* 37, 315-323.
- Liu, M., Vakharia, V.N., 2006, Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *J Virol* 80, 3369-3377.
- Lombardo, E., Maraver, A., Espinosa, I., Fernandez-Arias, A., Rodriguez, J.F., 2000, VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology* 277, 345-357.
- Lukert, P.D., Saif, Y.M., 1997, Infectious bursal disease. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM (eds) *Diseases of poultry*, 10th edn. Iowa State University Press, Ames, pp. 721-738.
- Mandeville, W.F., Cook, F.K., Jackwood, D.J., 2000, Heat lability of five strains of infectious bursal disease virus. *Poult Sci* 79, 838-842.
- McNulty, M.S., Saif, Y.M., 1988, Antigenic relationship of non-serotype 1 turkey infectious bursal disease viruses from the United States and United Kingdom. *Avian Dis* 32, 374-375.
- Mor, S.K., Narang, G., Jindal, N., Mahajan, N.K., Sharma, P.C., Rakha, N.K., 2010,

- Epidemiological studies on Infectious bursal disease in broiler chickens in Haryana, India. *International Journal of Poultry Science* 9, 395-400.
- Morgan, M.M., Macreadie, I.G., Harley, V.R., Hudson, P.J., Azad, A.A., 1988, Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-kDa product. *Virology* 163, 240-242.
- Muller, H., Islam, M.R., Raue, R., 2003, Research on infectious bursal disease-the past, the present and the future. *Vet Microbiol* 97, 153-165.
- Muller, R., Kaufer, I., Reinacher, M., Weiss, E., 1979, Immunofluorescent studies of early virus propagation after oral infection with infectious bursal disease virus (IBDV). *Zentralbl Veterinarmed B* 26, 345-352.
- Mundt, E., Kollner, B., Kretzschmar, D., 1997, VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J Virol* 71, 5647-5651.
- Nagarajan, M.M., Kibenge, F.S., 1997, The 5'-terminal 32 basepairs conserved between genome segments A and B contain a major promoter element of infectious bursal disease virus. *Arch Virol* 142, 2499-2514.
- Nakano, M.P., M.A.S.C.; Saliba, A.M.; Nobre, D.; Narimatsu, M.N., 1972, A ocorrência de doença de Gumboro no Brasil. Diagnóstico anatomopatológico. *Biológico* 38, 60-66.
- O'Hagan, D., MacKichan, M., Singh, M., 2001, Recent development in adjuvant for vaccines against infectious diseases. *Biomol Eng* 18,69-85.
- Park, J.H., Sung, H.W., Yoon, B.I., Kwon, H.M., 2009, Protection of chicken against very virulent IBDV provided by in ovo priming with DNA vaccine and boosting with killed vaccine and the adjuvant effects of plasmid-encoded chicken interleukin-2 and interferon-gamma. *J Vet Sci* 10, 131-139.
- Paula, M.B.C.Y., J.; Coutinho, M. D. B.; Silva, P. L.; Ferraz, R. A.; Oliveira, T. F. M.; Queiróz, D. A. O. , 2004, Identification and molecular characterization of the Infectious Bursal Disease Vírus (IBDV) from an outbreak in a broiler flocks in Midwestern Brazil. . *Brazilian Journal of Microbiology* 35, 352-358.
- Perozo, F., Villegas, P., Estevez, C., Alvarado, I.R., Purvis, L.B., Williams, S., 2008, Protection against infectious bursal disease virulent challenge conferred by a recombinant avian adeno-associated virus vaccine. *Avian Dis* 52, 315-319.
- Phong, S.F., Hair-Bejo, M., Omar, A.R., Aini, I., 2003, Sequence analysis of Malaysian infectious bursal disease virus isolate and the use of reverse transcriptase nested polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay for the detection

- of VP2 hypervariable region. *Avian Dis* 47, 154-162.
- Pitcovski, J., Gutter, B., Gallili, G., Goldway, M., Perelman, B., Gross, G., Krispel, S., Barbakov, M., Michael, A., 2003, Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine* 21, 4736-4743.
- Qi, X., Gao, H., Gao, Y., Qin, L., Wang, Y., Gao, L., Wang, X., 2009, Naturally occurring mutations at residues 253 and 284 in VP2 contribute to the cell tropism and virulence of very virulent infectious bursal disease virus. *Antiviral Res* 84, 225-233.
- Rajput, Z. I., Xiao, C. W., Hu, S. H., Habib, M., Soomro, N. A., 2010, Enhancement of immune responses to infectious bursal disease vaccine by supplement of an extract made from *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng. seeds. *Poult Sci* 89, 1129-1135.
- Razmyar, J., Peighambari, S.M., 2008, Molecular characterization of Iranian infectious bursal disease viruses. *Avian Dis* 52, 665-669.
- Remorini, P., Calderon, M.G., Aguirre, S., Periolo, O., La Torre, J., Mattion, N., 2006, Characterization of infectious bursal disease viruses from Argentina. *Avian Dis* 50, 245-251.
- Rong, J., Cheng, T., Liu, X., Jiang, T., Gu, H., Zou, G., 2005, Development of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine* 23, 4844-4851.
- Sharma, J.M., Kim, I.J., Rautenschlein, S., Yeh, H.Y., 2000, Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev Comp Immunol* 24, 223-235.
- Saif, Y.M., 1999. Control y prevención de la enfermedad infecciosa de la bursa. In: XIV Congresso Latino-Americano de Avicultura, Lima - Peru, pp. 37-38.
- Saif, Y.M., 1984, Infectious bursal disease virus type. In: Proceedings of the 19th national meeting on poultry health and condemnations, Ocean City, MD, pp. 105-107.
- Saukas, T.N., 1998. Caracterização de amostra do vírus da doença infecciosa bursal (doença de Gumboro) isolada no Brasil. Universidade Rural do Rio de Janeiro.
- Spies, U., Muller, H., Becht, H., 1987, Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res* 8, 127-140.

- Sreedevi, B., LeFever, L.J., Sommer-Wagner, S.E., Jackwood, D.J., 2007, Characterization of infectious bursal disease viruses from four layer flocks in the United States. *Avian Dis* 51, 845-850.
- Stoute, S.T., Jackwood, D.J., Sommer-Wagner, S.E., Cooper, G.L., Anderson, M.L., Woolcock, P.R., Bickford, A.A., Senties-Cue, C.G., Charlton, B.R., 2009, The diagnosis of very virulent infectious bursal disease in California pullets. *Avian Dis* 53, 321-326.
- Sun, J.H., Lu, P., Yan, Y.X., Hua, X.G., Jiang, J., Zhao, Y., 2003, Sequence and analysis of genomic segment A and B of very virulent infectious bursal disease virus isolated from China. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50, 148-154.
- Tsukamoto, K., Tanimura, N., Hihara, H., Shirai, J., Imai, K., Nakamura, K., Maeda, M., 1992, Isolation of virulent infectious bursal disease virus from field outbreaks with high mortality in Japan. *J Vet Med Sci* 54, 153-155.
- Tsukamoto, K., Tanimura, N., Mase, M., Imai, K., 1995, Comparison of virus replication efficiency in lymphoid tissues among three infectious bursal disease virus strains. *Avian Dis* 39, 844-852.
- Tsukamoto, K., Satoh, T., Saitoh, S., Tanimura, N., Hamazaki, N., Mase, M., Yamaguchi, S., 2000, Dual-viral vector approach induced strong and long-lasting protective immunity against very virulent infectious bursal disease virus. *Virology* 269, 257-267.
- van den Berg, T.P., 2000, Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol* 29, 175-194.
- van den Berg, T.P., Morales, D., Eterradossi, N., Rivallan, G., Toquin, D., Raue, R., Zierenberg, K., Zhang, M.F., Zhu, Y.P., Wang, C.Q., Zheng, H.J., Wang, X., Chen, G.C., Lim, B.L., Muller, H., 2004, Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. *Avian Pathol* 33, 470-476.
- Villegas, P., Hamoud, M., Purvis, L.B., Perozo, F., 2008, Infectious bursal disease subunit vaccination. *Avian Dis* 52, 670-674.
- Wei, L., Hou, L., Zhu, S., Wang, J., Zhou, J., Liu, J., 2011, Infectious bursal disease virus activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway by interaction of VP5 protein with the p85alpha subunit of PI3K. *Virology* 417, 211-220.

- Wei, Y., Li, J., Zheng, J., Xu, H., Li, L., Yu, L., 2006, Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. *Biochem Biophys Res Commun* 350, 277-287.
- Wei, Y., Yu, X., Zheng, J., Chu, W., Xu, H., Yu, L., 2008, Reassortant infectious bursal disease virus isolated in China. *Virus Res* 131, 279-282.
- Wu, C.C., Rubinelli, P., Lin, T.L., 2007, Molecular detection and differentiation of infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 51, 515-526.
- Wu, H., Singh, N.K., Locy, R.D., Scissum-Gunn, K., Giambrone, J.J., 2004, Expression of immunogenic VP2 protein of infectious bursal disease virus in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol Lett* 26, 787-792.
- Yamaguchi, T., Ogawa, M., Miyoshi, M., Inoshima, Y., Fukushi, H., Hirai, K., 1997, Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus. *Arch Virol* 142, 1441-1458.
- Zhou, X., Wang, D., Xiong, J., Zhang, P., Li, Y., She, R., 2010, Protection of chickens, with or without maternal antibodies, against IBDV infection by a recombinant IBDV-VP2 protein. *Vaccine* 28, 3990-3996.
- Zierenberg, K., Raue, R., Muller, H., 2001, Rapid identification of very virulent strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis. *Avian Pathol* 30, 55-62.

2. ARTIGOS

2.1. Artigo I

Proposta de modelo de classificação de *Infectious bursal disease virus* (IBDV) com base em evidências moleculares

Manuscrito em preparação

Proposta de modelo de classificação de *Infectious bursal disease virus* (IBDV) com base em evidências moleculares

1. Introdução

O *Infectious bursal disease virus* (IBDV) é o agente etiológico da doença infecciosa da bursa (*infectious bursal disease*, IBD), uma doença economicamente importante e altamente contagiosa de aves jovens. O IBDV é um vírus não envelopado com o capsídeo contendo um genoma de dois segmentos (segmento A e B) de dupla fita de RNA (Dobos et al., 1979). O segmento A codifica uma poliproteína precursora que é clivada por autoproteólise para produzir a VP2 madura (proteína capsidial externa), a VP4 (protease viral) e a VP3 (proteína capsidial interna) (Kibenge et al., 1988). O segmento B codifica a VP1 (RdRp viral), responsável pela replicação e transcrição viral (von Einem et al., 2004). Dois sorotipos do vírus são conhecidos, mas apenas o sorotipo 1 causa doença imunossupressora em frangos (Jackwood et al., 1985). Dentro do sorotipo 1, podem ser diferenciados três principais subtipos, clássicos (cvIBDV), variantes (avIBDV) e hipervirulentos (vvIBDV).

Desde o final dos anos 80, quando o IBDV levou a grandes perdas econômicas na indústria avícola, estudos de genotipagem das sequências da VP2 têm sido amplamente utilizados como uma forma de avaliar a diversidade genética do IBDV (Hon et al., 2006; Jackwood and Sommer-Wagner, 2007; Jackwood et al., 2009; Li et al., 2009; Sreedevi et al., 2007). Estes estudos demonstraram que os principais epítomos neutralizantes do IBDV estão localizados na região hipervariável da VP2 (hvVP2) (Coulibaly et al., 2005; Eterradosi et al., 1997). Como resultado, a hvVP2 tem sido o principal alvo dos estudos com o IBDV. Análises utilizando anticorpos monoclonais demonstraram que alterações em resíduos de aminoácidos nesta região podem levar ao surgimento de novas variantes de IBDV ou a atenuação viral (Berg, 2000; Durairaj et al., 2011). Se os resíduos de aminoácidos essenciais para a virulência são conhecidos, é possível deduzir fenótipos virulentos diretamente a partir das sequências (Berg, 2000).

Apesar do grande número de estudos filogenéticos com a hvVP2, não há consenso sobre os critérios utilizados para definição dos diferentes subtipos de IBDV. Esses estudos utilizam desde abordagens mais simples, tais como métodos de distância (UPGMA e *Neighbor-joining*) até abordagens filogenéticas mais robustas, como a

máxima verossimilhança (ML) e a inferência Bayesiana (BI). Apesar de agrupar as sequências com suporte estatístico, as análises filogenéticas permitem uma classificação dos isolados virais de forma intuitiva (Olvera et al., 2010).

A visão sistemática da diversidade genética de isolados virais e a proposta de modelos de classificação têm sido utilizadas por virologistas para compreender a evolução da patogênese viral, para identificar o potencial zoonótico, e para melhorar o desenvolvimento de vacinas (Olvera et al., 2010). No entanto, o mandato do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, <http://ictvonline.org/>) não inclui qualquer consideração abaixo do nível de espécie. Assim, com o rápido aumento do sequenciamento, tornou-se cada vez mais urgente fornecer um sistema racionalizado e útil, abaixo do nível de espécie (Fauquet and Stanley, 2005). Alguns grupos de pesquisa têm proposto critérios para definição dos genótipos de alguns vírus (Biagini et al., 1999; Fauquet and Stanley, 2005; Grau-Roma et al., 2008; Olvera et al., 2007; Segales et al., 2008; Zheng et al., 2006). Estes estudos definem os genótipos de um vírus em particular, com base em semelhanças de sequência, e um limite de distância genética (*distance threshold*) é geralmente definido.

Considerando as diferenças nos níveis de virulência entre os isolados de IBDV, propõe-se neste trabalho uma definição de genotipagem não arbitrária e uma nomenclatura unificada para os isolados virais de IBDV. Nesta abordagem, os conjuntos de todas as sequências de VP2 e hvVP2 disponíveis no GenBank foram analisados e agrupados por diferentes métodos.

2. Materiais e métodos

2.1. Preparando os conjuntos de dados de sequências para as análises

Dois conjuntos de dados de sequências de nucleotídeos foram formados por sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>). Um conjunto de 96 sequências completas codificadoras (cds) da VP2 (1356pb) foi selecionado para propor a genotipagem dos isolados de IBDV e um conjunto de 475 sequências parciais de VP2 (hvVP2) foi selecionado para testar o agrupamento proposto. O conjunto hvVP2 corresponde às sequências parciais do GenBank que cobrem totalmente a região hipervariável da VP2 (471pb), entre os nucleotídeos 610 e 1080. As regiões hipervariáveis das 96 cds de VP2 também foram selecionadas e

adicionadas ao conjunto hvVP2, totalizando 561 sequências. As sequências destes dois conjuntos de dados foram alinhadas usando o ClustalW (Thompson et al., 1994) e o número de sítios segregantes foi calculado usando o programa DnaSP v5 (Librado e Rozas, 2009).

2.2. Genotipagem dos isolados de IBDV

A genotipagem do IBDV foi baseada em metodologias propostas para outros vírus. A matriz de distância entre os pares de sequências (*pairwise distance* ou *p-distance*) foi calculada a partir das sequências da VP2 alinhadas e os isolados foram agrupados pelos métodos UPGMA (*Unweighted Pair Group Method plus Arithmetic Mean*) e NJ (*Neighbor-joining*) (Figura 1) utilizando o programa MEGA versão 5 (Tamura et al., 2011). A confiabilidade do agrupamento por UPGMA foi estimada em 10.000 repetições tipo *bootstrap*. A confiabilidade do agrupamento por NJ foi estimada em 100.000 repetições tipo *bootstrap*. O conjunto de sequências hvVP2 alinhadas foi analisado da mesma maneira para testar a reprodutibilidade dos genótipos.

2.3. Agrupamentos filogenéticos dos isolados de IBDV

Para testar os genótipos propostos, dois métodos filogenéticos foram selecionados para agrupar os isolados do IBDV de forma evolutiva. As hipóteses filogenéticas foram inferidas por máxima verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB). Para agilizar a construção de árvores filogenéticas, um modelo de substituição de nucleotídeos foi estimado usando o programa jModelTest (Posada, 2008). Esta abordagem fornece os parâmetros a serem estimados durante o cálculo das árvores filogenéticas, evitando o excesso de parâmetros nos modelos para estimar as topologias e tamanhos de ramos. As hipóteses filogenéticas inferidas por ML foram calculadas utilizando o programa MEGA versão 5 (Tamura et al., 2011) e a confiabilidade das árvores foram estimadas em 1000 repetições tipo *bootstrap*. As hipóteses filogenéticas inferidas por IB foram calculadas utilizando o programa MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) pelo método *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC), em duas corridas, com 50.000.000 de gerações e uma frequência de amostragem de 1000. Das árvores geradas, 25% foram descartadas para produzir a árvore consenso.

2.4. Análise de recombinação

Evidências filogenéticas de recombinação foram testadas e os pontos de recombinação (*breakpoints*) entre os genótipos de IBDV foram preditos utilizando vários métodos ($P < 0,01$) implementados no programa RDP3 versão 3.44 (Martin et al., 2010), incluindo RDP (Martin and Rybicki, 2000), GENECONV (Padidam et al., 1999), Chimaera (Posada and Crandall, 2001), MaxChi (Smith, 1992), 3Seq (Boni et al., 2007), e Bootscan/Recscan (Posada and Crandall, 2001).

2.5. Estimativa da pressão seletiva nos códons

Para avaliar as pressões seletivas sobre os códons em cada genótipo do IBDV, a diferença entre as taxas de substituição não sinônimas (dN) e sinônimas (dS) por códon foram avaliadas usando os métodos *single-likelihood ancestor counting* (SLAC), *fixed-effects likelihood* (FEL) e *internal branches fixed-effects likelihood* (IFEL), implementados no DataMonkey (<http://www.datamonkey.org/>). Valores $dN - dS < 0$, $= 0$, > 0 indicam seleção negativa, evolução neutra e seleção positiva, respectivamente. As estimativas da diferença de taxas de substituição foram realizadas a partir de uma árvore filogenética inferida usando o algoritmo de *Neighbor-Joining* com distâncias corrigidas sob o melhor modelo de substituição selecionado pelo DataMonkey.

2.6. Modelagem molecular e análises estruturais da VP2

Para cada genótipo do IBDV, estruturas monoméricas da VP2 foram obtidas utilizando as técnicas de modelagem molecular por homologia disponíveis no servidor *Swiss-Model Automated Module server* (Arnold et al., 2006). Estas estruturas foram modeladas a partir do consenso das sequências de aminoácidos da hvVP2 de cada genótipo IBDV. As sequências de cada consenso foram alinhadas com a sequência da estrutura monomérica de VP2 (acesso 1WCD no *Protein Data Bank*; <http://www.pdb.org/>) e os polimorfismos característicos de cada genótipo foram modelados como mutações na respectiva estrutura. Para identificar possíveis diferenças na estrutura da proteína VP2 dos diferentes genótipos, sobreposições entre as estruturas monoméricas modeladas e a estrutura cristalina 1WCD foram realizadas no programa PyMOL (Schrodinger, 2010).

Em seguida, estruturas triméricas de cada proteína VP2 modelada foram construídas utilizando o programa Modeller 9.9 (Sanchez and Sali, 2000). As cadeias O, P e Q da estrutura 2.6A do IBDV (acesso 2GSY no *Protein Data Bank*) foram utilizadas como modelo. Para prever as possíveis consequências das mudanças dos resíduos de aminoácidos na proteína capsidial do IBDV, a distribuição de carga residual na superfície da proteína VP2 foi analisada usando o programa *Molegro Molecular Viewer* (Thomsen and Christensen, 2006).

3. Resultados

3.1. Definição dos genótipos do IBDV

A comparação das distâncias entre os pares de sequências (*p-distance*) é um método amplamente aceito na virologia (Olvera et al., 2010). O valor limite (*threshold*) de 0,032 foi selecionado para agrupar os isolados de IBDV em três genótipos: IBDV-1, IBDV-2 e IBDV-3 (Figura 1). A *p-distance* corresponde à razão: [número de diferenças] / [tamanho da sequência], e um valor de 0,032 significa que todos os isolados virais incluídos no mesmo genótipo têm uma identidade de nucleotídeos maior que 96,8%.

Entre os isolados virais de IBDV pertencentes ao conjunto de sequências da VP2, 52 (55,2%) foram classificados no genótipo IBDV-1, 43 (43,8%) no genótipo IBDV-2, e 1 (1,0%) no genótipo IBDV-3. A classificação dos genótipos dos isolados de IBDV é detalhada na Tabela S1 e resumida na Tabela 1. No genótipo IBDV-1, foram incluídos predominantemente os isolados virais caracterizados como clássicos (cvIBDV) e variantes (avIBDV). Os isolados hipervirulentos (vvIBDV) foram classificados principalmente no genótipo IBDV-2. O único representante do IBDV-3 foi um isolado viral clássico (cvIBDV) identificado na Austrália em 1986.

Para testar a reprodutibilidade dos três genótipos propostos, o conjunto de sequências hvVP2 também foi agrupado a partir de uma matriz de *p-distance* (Figura 3). Os três genótipos foram também definidos nesse conjunto de dados, utilizando as sequências da VP2 classificadas anteriormente como referência. Entre os isolados virais do conjunto de sequências da hvVP2, 265 (47,3%) foram classificados no genótipo IBDV-1, 242 (43,2%) no genótipo IBDV-2, e 12 (2,2%) no genótipo IBDV-3 (Tabela 1). Além disso, um quarto grupo contendo 41 (7,3%) sequências de hvVP2 não classificadas foi definido como genótipo IBDV-4.

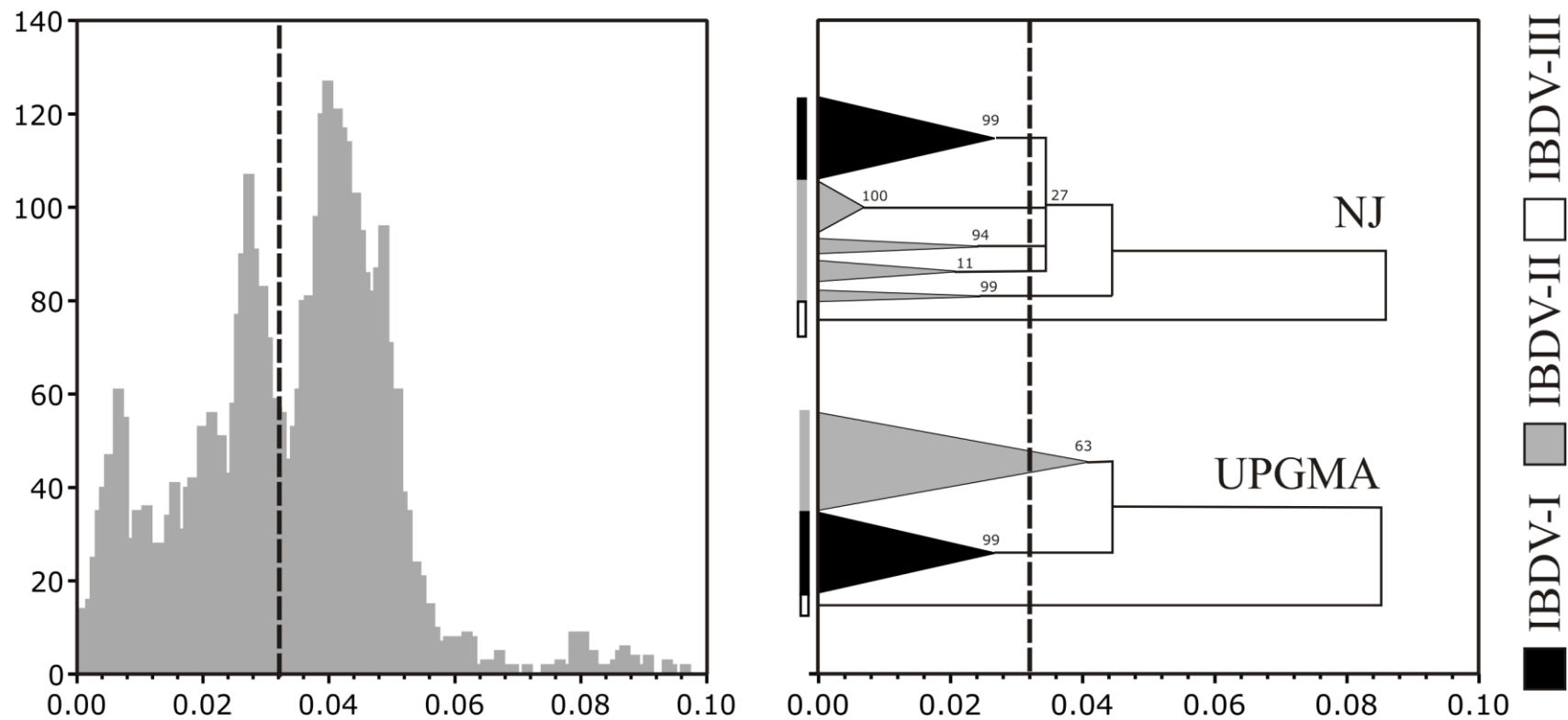


Figura 1. Gráfico: Distribuição de frequência das distâncias entre os pares de sequências da VP2. Árvores: árvore de *Neighbor-joining* (NJ) e UPGMA deduzidas a partir da comparação de 96 sequências completas da VP2. As linhas tracejadas indicam o valor limite proposto para distinguir os três genótipos. Sequências pertencentes a genótipos distintos mostram distâncias genéticas > 0,032.

Tabela 1. Resumo da classificação dos isolados virais nos quatro genótipos do IBDV.

Região	País	IBDV-1	IBDV-2	IBDV-3	IBDV-4
-	-	6	-	-	-
África	Egito	3	2	-	-
África	Nigéria	-	1	-	-
África	Tanzânia	-	1	-	-
África	Zâmbia	-	1	-	-
Ásia	Bangladesh	-	1	-	-
Ásia	China	40	84	-	-
Ásia	Índia	2	1	-	-
Ásia	Indonésia	-	3	-	-
Ásia	Irã	3	22	-	-
Ásia	Israel	-	2	-	-
Ásia	Japão	3	3	-	-
Ásia	Malásia	7	33	-	-
Ásia	Nepal	-	1	-	-
Ásia	Paquistão	1	2	-	-
Ásia	Coréia do Sul	5	7	-	2
Ásia	Taiwan	25	13	-	-
Ásia	Turquia	-	1	-	-
Ásia	Vietnã	5	15	-	-
América Central	Cuba	1	-	-	-
América Central	República Dominicana	-	5	-	-
Europa	Croácia	1	1	-	-
Europa	França	1	1	-	-
Europa	Alemanha	5	11	-	-
Europa	Luxemburgo	1	-	-	-
Europa	Holanda	1	1	-	-
Europa	Espanha	6	8	-	-
Europa	Reino Unido	2	1	-	-
América do Norte	Canadá	100	-	-	34
América do Norte	México	-	-	-	1
América do Norte	EUA	42	-	-	-
Oceania	Austrália	1	-	12	-
América do Sul	Brasil	1	10	-	4
América do Sul	Equador	1	-	-	-
América do Sul	Uruguai	-	6	-	-
América do Sul	Venezuela	2	5	-	-
Total		265	242	12	41

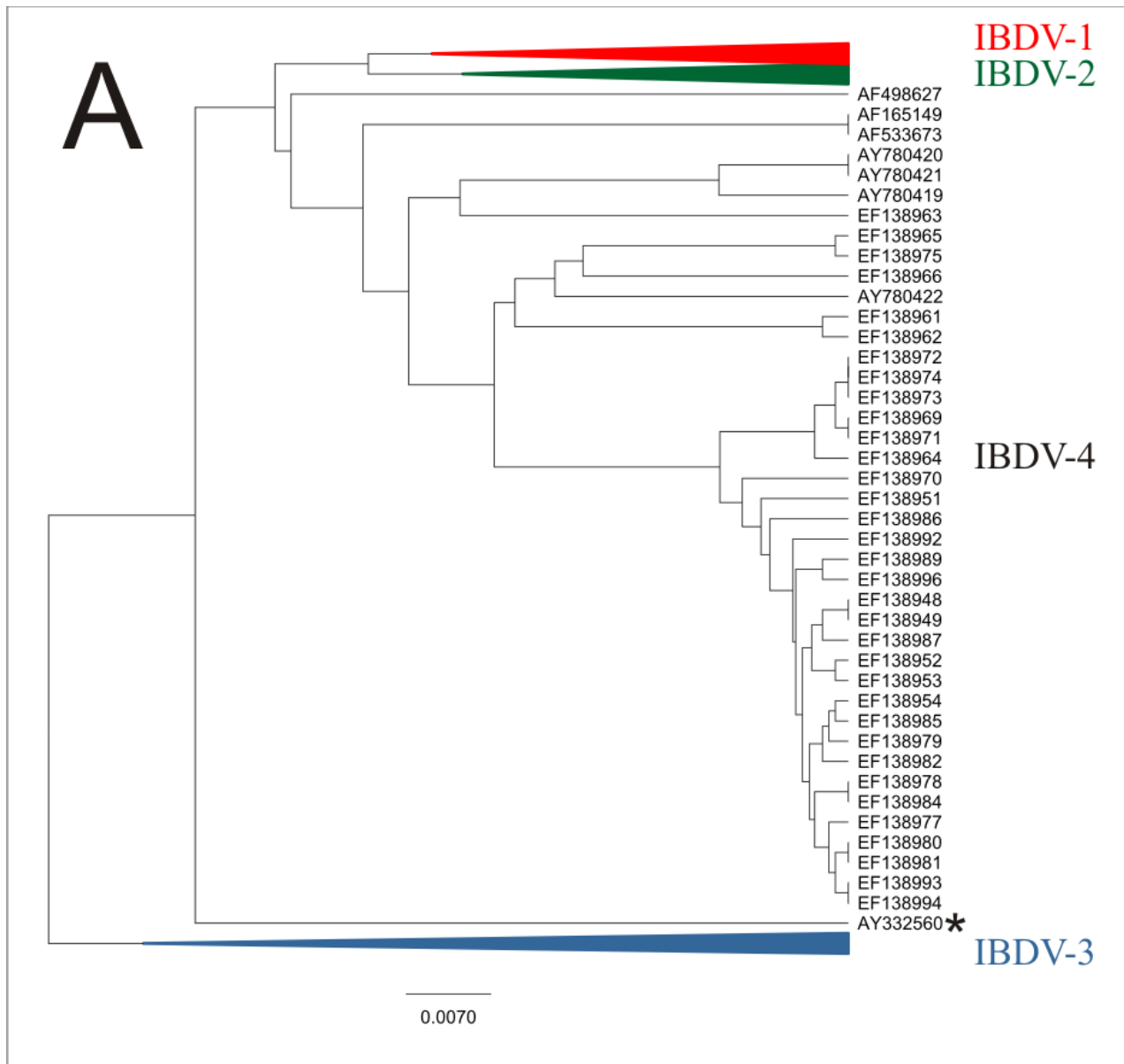
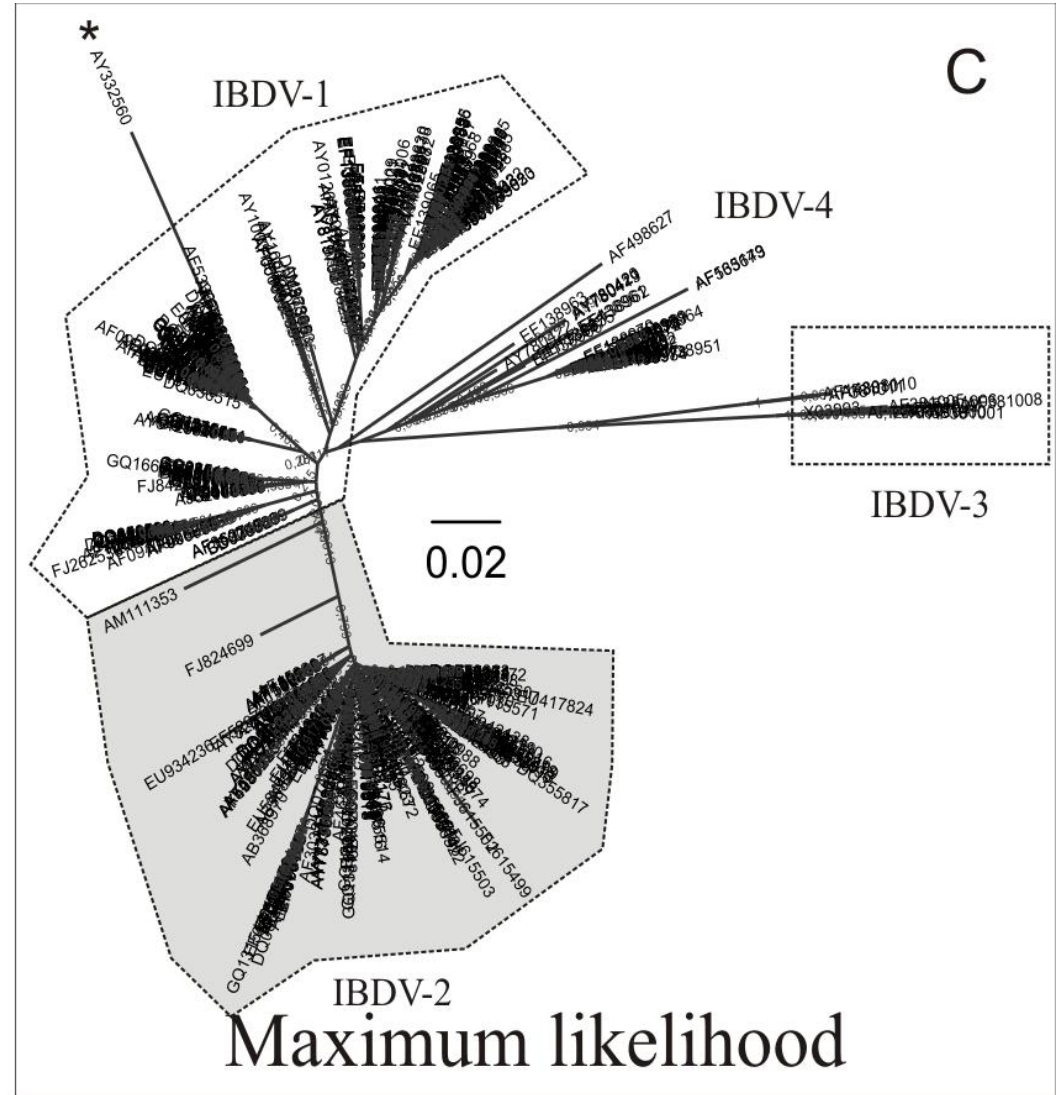
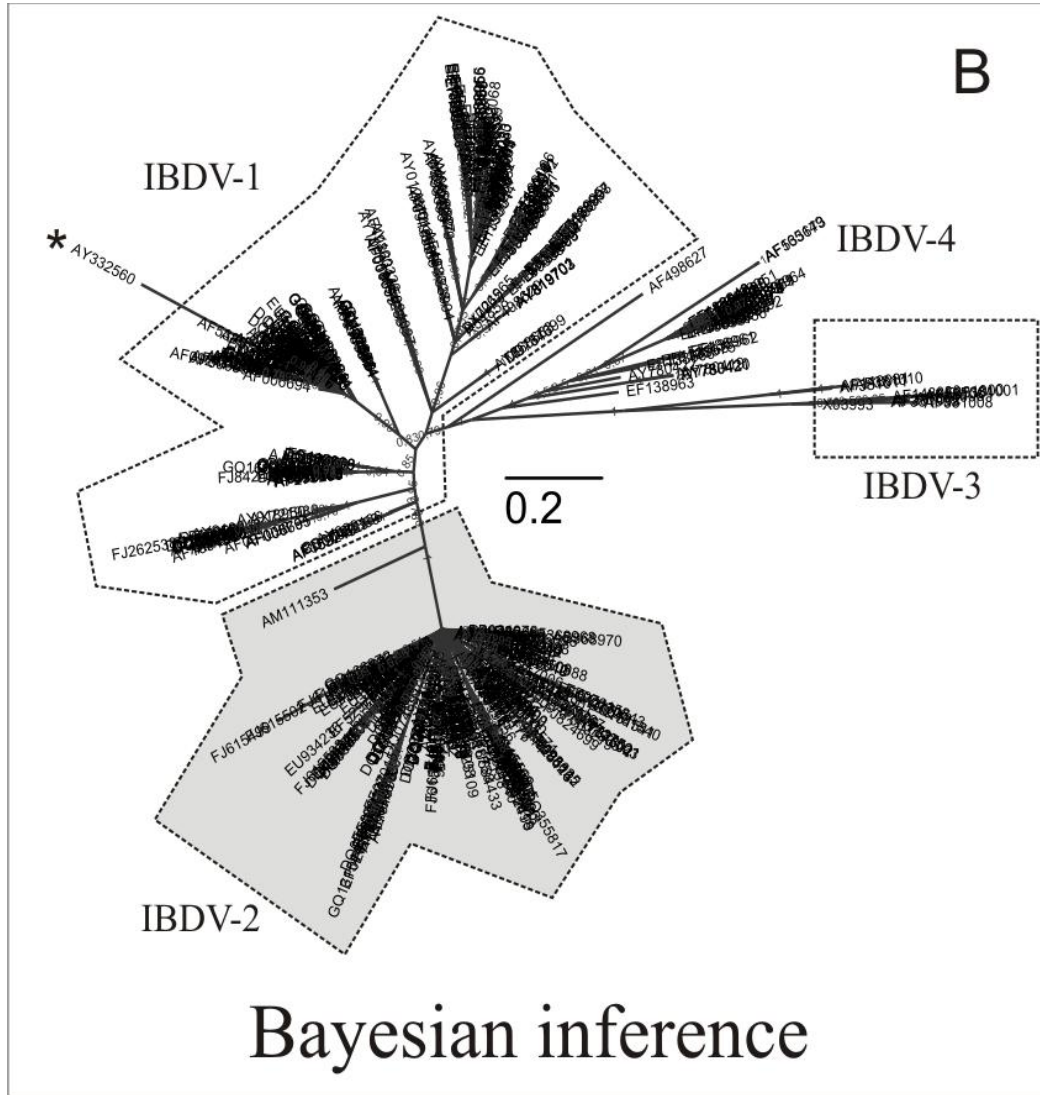


Figura 3. Relações evolutivas entre os genótipos do IBDV baseadas na hvVP2. (A) Árvore das 561 sequências da hvVP2 agrupadas por UPGMA. As mesmas topologias de árvores e porcentagens similares de suporte dos ramos internos foram verificadas nas árvores construídas pelos métodos de Inferência Bayesiana (B) e Máxima Verossimilhança (C). *A sequência AY332560 (isolado viral vacinal) foi definida como não classificada.



Os isolados virais dos genótipos IBDV-1 e IBDV-2 estão disseminados na Ásia, América Central, Europa e América do Sul. Na América do Norte, os isolados virais foram classificados apenas nos genótipos IBDV-1 e IBDV-4. Isolados virais do IBDV-4 também foram identificados na Ásia e América do Sul. Os isolados virais do IBDV-3, por sua vez, estão restritos a Oceania (Austrália).

As submissões de genótipos IBDV-1 e IBDV-2 no GenBank apresentam o mesmo padrão entre os anos 1986 e 2009 (Tabela S1), período em que todas as sequências de IBDV foram submetidas ao banco de dados. Durante este período, as submissões de sequências permaneceram quase constantes e apresentaram um grande aumento em 2004, 2006 e 2009. As sequências do genótipo IBDV-3 foram submetidas, principalmente em 2001 e do genótipo IBDV-4, principalmente em 2006. Considerando a faixa de submissões neste período de 15 anos, uma taxa de mutação de $1,42 \times 10^{-2}$ mutações por sítio por ano foi calculada para as sequências da VP2 e uma taxa de $4,26 \times 10^{-2}$ mutações por sítio por ano para as sequências da hvVP2 (Tabela S2). Estas taxas de mutações refletem o alto nível de polimorfismos na região hipervariável da VP2.

3.2. Agrupamentos filogenéticos

As hipóteses filogenéticas inferidas por máxima verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB) apresentaram resultados congruentes. Todos os três genótipos propostos (IBDV-1, IBDV-2, e IBDV-3) pelo agrupamento UPGMA e NJ, a partir de matrizes de *p-distance*, foram apoiadas por significativos valores de confiabilidade nas árvores filogenéticas (Figuras 2 e 3).

Na árvore filogenética inferida a partir das sequências hvVP2 (Figura 3), o agrupamento do genótipo IBDV-4 também foi apoiado por valores de confiança significativos. A única discrepância está relacionada à sequência AY332560, um isolado viral vacinal (Merial Select Inc., EUA). Esta sequência foi inicialmente classificada no genótipo IBDV-4, mas as topologias das árvores filogenéticas mostram que ela se diferencia de todos os outros isolados virais. Para os critérios de classificação propostos, esta sequência foi definida como não classificada.

3.3. Análise de recombinação

Nas análises das sequências da VP2 e da hvVP2, nenhum evento de recombinação significativo ($P < 0,01$) foi detectado pelos métodos implementados no programa RDP3. Como critério de seleção, foram considerados significativos os eventos preditos por mais de 3 dos 6 métodos.

3.4. Estimativa da pressão seletiva nos códons

A proteína VP2 do IBDV possivelmente está sob seleção purificadora (negativa). A estimativa da razão dN/dS (substituições não sinônimas/ sinônimas) para a VP2 (0,191) (Tabela 2) e para a hvVP2 (0,186) (Tabela 3) sugerem que a seleção negativa é a principal força evolutiva que atua sobre os códons da proteína VP2. No conjunto de sequências da VP2, 106 códons foram preditos estar sob seleção negativa e quatro códons (5, 222, 249 e 284) sob seleção positiva. Para o conjunto de sequências da hvVP2, 95 códons foram preditos estar sob seleção negativa e apenas 1 (222) sob seleção positiva.

Tabela 2. Pressões seletivas sobre os códons das sequências e genótipos da VP2.

	Número de isolados	Número de códons	dN/dS	Sítios neutros*	Sítios negativamente selecionados*	Sítios positivamente selecionados*
IBDV-1	53	452	0.254	413	37	2
IBDV-2	42	452	0.147	402	49	1
IBDV-3	1	452	-	-	-	-
IBDV	96	452	0.191	342	106	4

*Significância estatística dos testes: $P < 0,05$

Nas análises das sequências da VP2 (Tabela 2), os isolados do genótipo IBDV-1 apresentam o maior valor da razão dN/dS, o menor número de códons sob seleção negativa, e o maior o número de códons sob seleção positiva, quando comparados aos isolados do genótipo IBDV -2 (Tabela 2). Os valores para o genótipo IBDV-3 não puderam ser determinados, pois apenas uma sequência (X03993) foi incluída neste grupo. Nas análises das sequências hvVP2 (Tabela 3), o genótipo IBDV-1 também

apresentou o maior valor da razão dN/dS. No entanto, os genótipos IBDV-2 e IBDV-3 apresentam maior e menor número de códons sob seleção purificadora, respectivamente.

Tabela 3. Pressões seletivas sobre os códons das sequências e genótipos da hvVP2.

	Número de isolados	Número de códons	dN/dS	Sítios neutros*	Sítios negativamente selecionados*	Sítios positivamente selecionados*
IBDV-1	265	157	0.265	103	53	1
IBDV-2	242	157	0.139	89	68	0
IBDV-3	12	157	0.190	144	13	0
IBDV-4	41	157	0.140	124	33	0
IBDV	560	157	0.186	61	95	1

*Significância estatística dos testes: $P < 0,05$

Para a comparação das mudanças dos códons entre os genótipos de IBDV, o consenso das sequências de aminoácidos da hvVP2 de cada genótipo foram alinhados (Figura 4). O alinhamento dos consensos indicou que o resíduo K249 está presente apenas nas sequências do genótipo IBDV-1, e uma busca por esse aminoácido em todas as sequências confirmaram essa observação. Nenhum resíduo exclusivo foi identificado nas sequências do genótipo IBDV-2. Os aminoácidos A222, I242, I256, I294 e D279 foram predominantes nas sequências deste genótipo. A222 também foi encontrado em sequências de todos os outros genótipos, I242, I256, I294 também foram encontrados no IBDV-1; D279 também foi encontrado no IBDV-1 e IBDV-3. No genótipo IBDV-3, os aminoácidos N258, V264, G279 e N332 são exclusivos, e V305 foi também encontrado em sequências do IBDV-2. No IBDV-4, os aminoácidos S222, N254, P289, I290, F296 e K359 são predominantes entre as sequências. O resíduo S222 foi também encontrado em sequências dos genótipos IBDV-1 e IBDV-2; N254 foi também encontrado no IBDV-1; P289, I290, F296, K359 foram também encontrados no IBDV-2 (Figura 4).

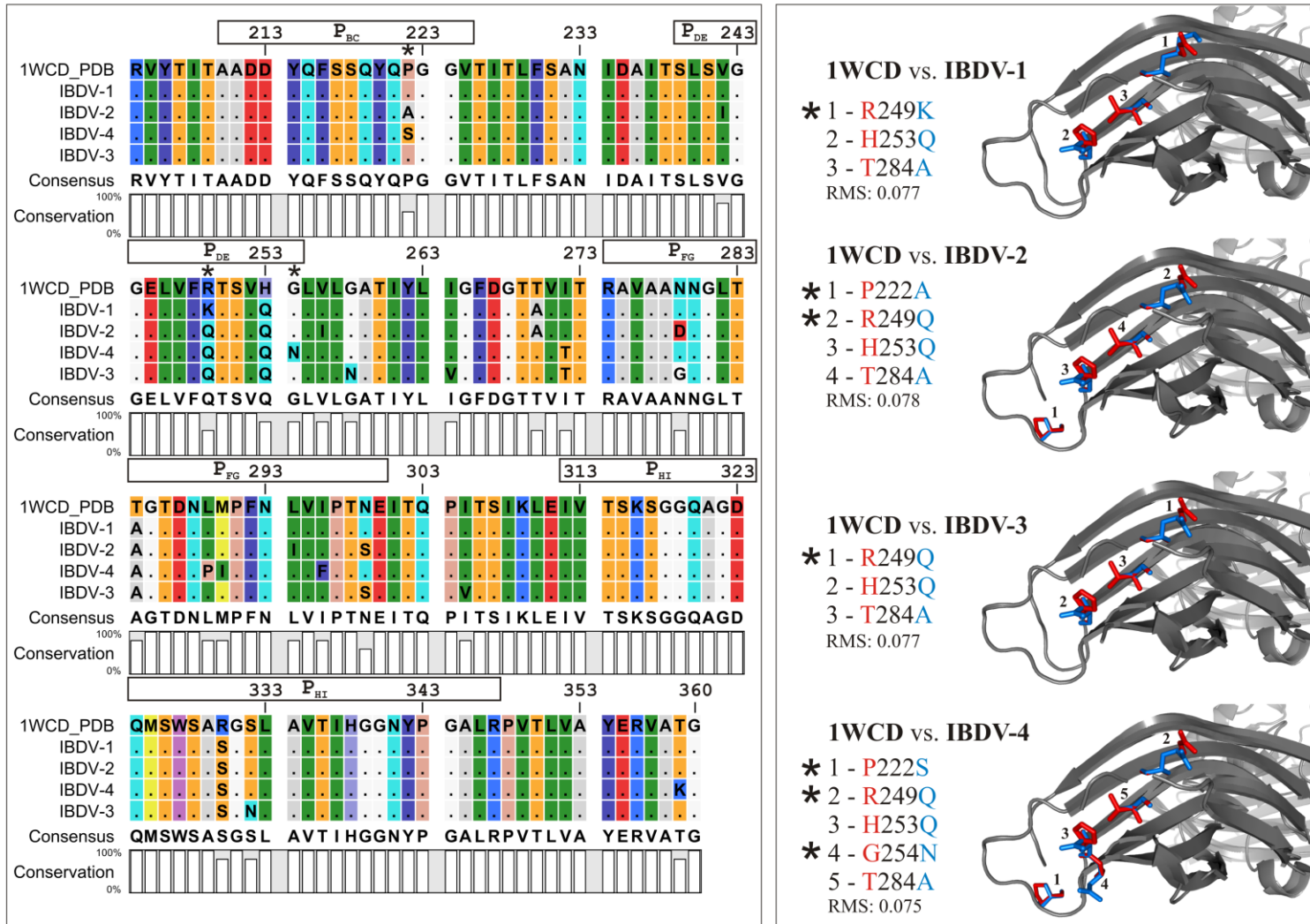


Figura 4. Substituições de aminoácidos nas sequências consenso da região hipervariável (aminoácidos 204-360) da proteína VP2 dos quatro genótipos do IBDV. (*) Aminoácidos variantes entre os genótipos. Diferenças nas sobreposições de estruturas da proteína VP2. Estruturas monoméricas modeladas para os genótipos (vermelho). Estrutura do cristal 1WCD (azul). RMS: *Root Mean Square Deviation*.

3.5. Modelagem molecular e análises estruturais da VP2

Com o objetivo de identificar a presença de diferenças estruturais na proteína VP2 de isolados dos diferentes genótipos, os quatro modelos monoméricos construídos para representar cada genótipo foram sobrepostos ao cristal 1WCD (Figura 4). As sobreposições estruturais demonstraram que alguns dos aminoácidos polimórficos (222, 249, 254) que diferenciam os genótipos estão presentes em regiões de loops do domínio de projeção da VP2 (Coulibaly et al., 2005). As mudanças H253Q e T284A foram observadas apenas entre a estrutura do cristal e dos genótipos, assim, os aminoácidos Q253 e A284 são conservados em todos os genótipos. As diferenças entre os modelos dos genótipos e a estrutura do cristal podem ser visualizadas na Figura 4.

Análise da distribuição de carga residual na superfície da VP2 mostrou que a mudança de alguns aminoácidos específicos na sequência desta proteína, possivelmente, leva a mudanças nas superfícies eletrostáticas das estruturas triméricas. A distribuição da carga residual na superfície da VP2 foi bastante semelhante nos modelos triméricos representativos dos genótipos IBDV-1, IBDV-3 e IBDV-4. Entretanto, mostrou-se bem diferente no modelo representativo do genótipo IBDV-2 (Figura 5). Nesse modelo, a região negativamente carregada (ao redor da região com carga residual positiva), localizada no domínio de projeção exposto da VP2, foi maior do que a verificada nos modelos dos demais genótipos.

Além disso, foi possível observar mudanças conformacionais nos *loops* dos modelos triméricos representativos de cada genótipo (Figura 5). Os modelos dos genótipos IBDV-1 e IBDV-3 exibiram um padrão de conformação mais aberto em torno da região positiva, enquanto os modelos IBDV-2 e IBDV-4 exibiram um padrão de conformação mais fechada em torno da mesma região.

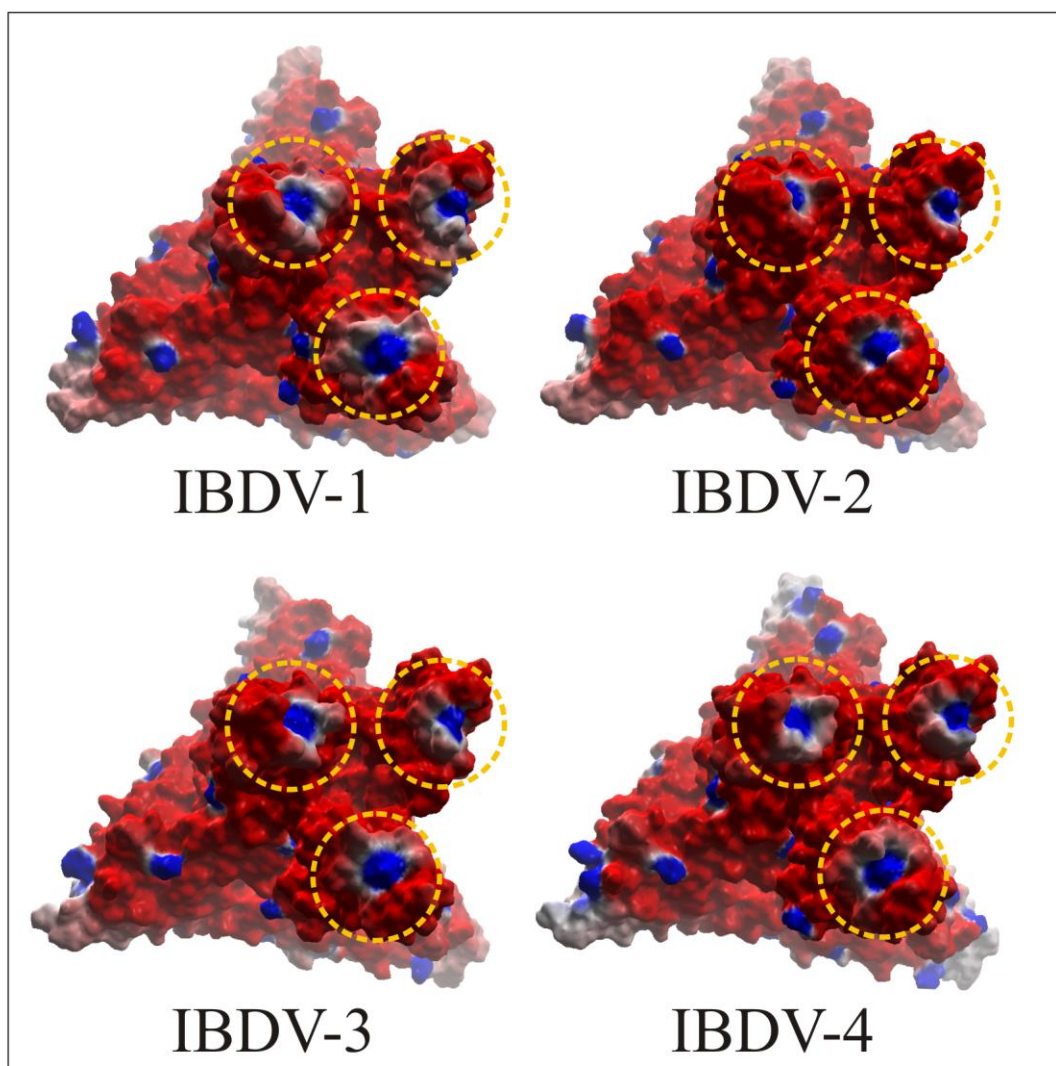


Figura 5. Distribuição da carga residual na superfície das estruturas triméricas da VP2 correspondentes aos quatro genótipos do IBDV. As regiões, vermelha, branca e azul possuem carga residual negativa, neutra e positiva, respectivamente. As regiões circuladas nas estruturas triméricas representam o domínio de projeção da VP2.

4. Discussão

Estudos de caracterização de isolados de IBDV circulantes vêm sendo baseados na classificação padrão da região hipervariável da VP2 (hvVP2) de isolados previamente caracterizados (Banda and Villegas, 2004; Jackwood et al., 2006; Jackwood et al., 2009; Li et al., 2009; Lojkic et al., 2008; Sreedevi et al., 2007). Este estudo aplicou uma extensa análise das sequências da VP2 e hvVP2 disponíveis no GenBank, para propor uma classificação não arbitrária dos isolados de IBDV. Além disso, as pressões evolutivas sobre as sequências da VP2 e percepções de mudanças nas superfícies estruturais e eletrostáticas dessa proteína nos isolados de IBDV também foram apresentadas.

Os agrupamentos com base em *p-distance* (*pairwise distance*) são amplamente utilizados por diversos grupos de pesquisa em virologia, a fim de definir um sistema de classificação não arbitrário com base no genótipo viral (Biagini et al., 1999; Fauquet and Stanley, 2005; Grau-Roma et al., 2008; Olvera et al., 2007; Segales et al., 2008; Zheng et al., 2006). Os resultados apresentados nos agrupamentos por UPGMA e NJ das matrizes de *p-distance* indicam claramente que as sequências da VP2 de IBDV podem ser divididas em três genótipos principais (IBDV-1 a IBDV-3), com vários clusters incluídos em cada um (Figura 1). Além disso, um quarto genótipo (IBDV-4) foi proposto para as sequências hvVP2 não agrupadas (Figura 3). Para avaliar a robustez do sistema de classificação, os isolados de IBDV foram agrupados de acordo com suas relações evolutivas. As hipóteses filogenéticas dos conjuntos de dados de sequência (VP2 e hvVP2) foram inferidas pelos métodos de ML e IB (Figuras 2 e 3), e nenhuma discrepância entre os genótipos e os agrupamento filogenéticos foi observada. Assim, as sequências de ambas, VP2 e hvVP2, podem ser utilizadas para realizar a genotipagem dos isolados de IBDV.

A classificação em quatro diferentes genótipos (IBDV-1 a IBDV-4) também foi apoiada por características moleculares e biológicas (Tabela S1). Os genótipos IBDV-1 e IBDV-3 agruparam os isolados caracterizados como cvIBDV e avIBDV. IBDV-2 agrupou sequências de isolados vvIBDV. Finalmente, isolados caracterizados como cvIBDV e atIBDV (atenuados) foram incluídos no IBDV-4. Além disso, um componente geográfico está possivelmente relacionado com a diferenciação dos genótipos (Tabela 1). Os isolados virais do genótipo IBDV-1 estão dispersos em todas as regiões geográficas. Por outro lado, os conjuntos de dados (VP2 e hvVP2) sugerem

que os isolados do genótipo IBDV-2, possivelmente, não estão em circulação na América do Norte e Oceania. Os isolados do genótipo IBDV-3 parecem ser restritos a Oceania, sendo identificados apenas na Austrália. Os isolados do genótipo IBDV-4, por sua vez, foram identificados apenas na Ásia, América do Norte e América do Sul.

Os valores de dN/dS fornecem um meio de avaliar pressões evolutivas adaptativas que atuam nos códons de uma proteína (Kimura, 1983). Os resultados mostraram que a proteína VP2 do IBDV possivelmente está sob seleção purificadora (negativa) (Tabelas 2 e 3). No entanto, a região hipervariável da VP2, onde estão localizados os principais epítomos neutralizantes do IBDV, apresentou três códons (222, 249 e 284) sob seleção positiva (Eterradossi et al., 1997; Vakharia et al., 1994). Em alguns vírus, os epítomos estão sob seleção positiva, uma vez que são submetidos à alta pressão imunológica e têm uma alta taxa de mudanças de aminoácidos para se evadirem da resposta imune (Durairaj et al., 2011; Suzuki, 2004).

A proporção de códons que parecem evoluir sob seleção purificadora foi maior na hvVP2 (Tabela 3) quando comparada a VP2 completa (Tabela 2). Isso pode ser explicado pelo fato da região hipervariável da VP2 ser a região que mais sofre variações e, possivelmente, a seleção purificadora deve atuar sob um maior número de códons para manter a estrutura viável da proteína. Além disso, o valor global de dN/dS foi maior para o IBDV-1 quando comparado ao IBDV-2. Isso sugere que os isolados clássicos e variantes pertencentes ao IBDV-1 estão sob menores restrições a mudanças que os isolados hipervirulentos agrupados no IBDV-2. Apesar de algumas modificações específicas já terem sido descritas como características dos isolados vvIBDV, nossos resultados indicam que dentre os genótipos circulantes, IBDV-2 é o menos sujeito a variações. Semelhante ao IBDV-1, IBDV-3 e IBDV-4 possuem um pequeno número de códons sob seleção purificadora o que também sugere que os isolados pertencentes a esses genótipos estão mais sujeitos a mudanças que os isolados vvIBDV.

Além disso, as taxas de mutação da VP2 e hvVP2 foram estimadas considerando a faixa de anos de submissão das sequências no GenBank (1986-2009). Sabe-se que uma sequência do genoma pode ser publicada um longo tempo após a sua detecção (Olvera et al., 2007). No entanto, os anos de detecção dos mais antigos e dos mais recentes correspondem a esta faixa. A estimativa das taxas de substituições por sítio, por ano (subs/sítio/ano) das sequências da VP2 e hvVP2 foram $1,42 \times 10^{-2}$ subs/sítio/ano e $4,26 \times 10^{-2}$ subs/sítio/ano, respectivamente (Tabela S2). As taxas de substituição vêm sendo estimadas para vários vírus RNA e os valores geralmente variam de 10^{-2} a 10^{-5}

subs/sítio/ano, com a maioria dos vírus exibindo taxas dentro de uma ordem de grandeza de 10^{-3} subs/sítio/ano (Duffy et al., 2008; Hanada et al., 2004; Jenkins et al., 2002).

A presença de resíduos de aminoácidos específicos em determinadas posições puderam ser definidas como características dos genótipos propostos (Figura 4). Alguns desses resíduos foram previamente caracterizados. A presença dos resíduos P222, K249, N279 e N299 são características de isolados atenuados (Durairaj et al., 2011; Kwon and Kim, 2004; Yamaguchi et al., 1996), enquanto A222, I256, D279 e I294 são características de isolados vvIBDV (Islam et al., 2001; Jackwood and Sommer-Wagner, 2011; Le Nouen et al., 2006; Yamaguchi et al., 1996).

Todos os aminoácidos polimórficos representados nas sobreposições estruturais estão em loops do domínio P da VP2 (Figura 4) e, portanto, estão em um estado de vibração mais elevada, pois não estão envolvidos em interações permanentes que os estabilizam (Lua et al., 2011). O aminoácido na posição 222 (loop P_{BC}) é importante para modular a expressão de epítomos neutralizantes na VP2 do IBDV (Letzel et al., 2007). Já os aminoácidos nas posições 249 e 254 (loop P_{DE}) são importantes no tropismo celular, e na adaptação em cultura de células (Coulibaly et al., 2005). Assim, é possível que mudanças nessas posições levem a uma interação diferencial (menos ou mais estável) entre o receptor celular e os diferentes genótipos virais. Interações que promovam uma maior estabilidade no sistema vírus-receptor celular podem levar a uma maior eficácia no processo de infecção viral (Coulibaly et al., 2005).

O RMSD (*Root Mean Square Deviation*) é frequentemente usado no estudo estrutural de proteínas para medir a distância média entre os átomos (geralmente carbonos alfa) da estrutura predita e da estrutura no cristal (Coutsias et al., 2004). Os valores médios de RMSD entre as estruturas do cristal e dos diferentes genótipos foram pequenos (Figura 4), logo, os modelos construídos podem ser considerados viáveis para análise (Carugo and Pongor, 2001). O padrão de conformação e a distribuição de cargas nas superfícies eletrostáticas da VP2 se diferem nos modelos dos genótipos virais (Figura 5). Essas alterações possivelmente contribuem para uma interação diferencial dos isolados com o receptor celular. Uma vez que os isolados pertencentes ao genótipo IBDV-2 são os mais patogênicos, a conformação mais fechada, juntamente com uma maior quantidade de resíduos com carga residual negativa (ao redor da região com resíduos com carga residual positiva) verificada em seu modelo, pode favorecer a

interação vírus-receptor celular e conseqüentemente o aumento da patogenicidade do isolado viral, o que deve ser melhor investigado no futuro.

Em resumo, o presente trabalho contribui para o estabelecimento de uma definição de genótipos para o IBDV e fornece critérios para a classificação do IBDV abaixo do nível de gênero. As sequências da hvVP2 são marcadores filogenéticos confiáveis para a genotipagem do IBDV, uma vez que foram capazes de reconstruir árvores similares as das sequências completas da VP2. Finalmente, a possível existência de diferenças de virulência ou imunogênica entre os genótipos tem que ser mais bem estudada.

5. Referências

- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T., 2006, The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22, 195-201.
- Banda, A., Villegas, P., 2004, Genetic characterization of very virulent infectious bursal disease viruses from Latin America. *Avian Dis* 48, 540-549.
- Berg, T.P., 2000, Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol* 29, 175-194.
- Biagini, P., Gallian, P., Attoui, H., Cantaloube, J.F., de Micco, P., de Lamballerie, X., 1999, Determination and phylogenetic analysis of partial sequences from TT virus isolates. *J Gen Virol* 80 (Pt 2), 419-424.
- Boni, M.F., Posada, D., Feldman, M.W., 2007, An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* 176, 1035-1047.
- Carugo, O., Pongor, S., 2001, A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein Sci* 10, 1470-1473.
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas, B., Rey, F.A., 2005, The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell* 120, 761-772.
- Coutsias, E.A., Seok, C., Dill, K.A., 2004, Using quaternions to calculate RMSD. *J Comput Chem* 25, 1849-1857.
- Dobos, P., Hill, B.J., Hallett, R., Kells, D.T., Becht, H., Teninges, D., 1979, Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol* 32, 593-605.

- Duffy, S., Shackelton, L.A., Holmes, E.C., 2008, Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet* 9, 267-276.
- Durairaj, V., Sellers, H.S., Linnemann, E.G., Icard, A.H., Mundt, E., 2011, Investigation of the antigenic evolution of field isolates using the reverse genetics system of infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch Virol*.
- Eterradossi, N., Toquin, D., Rivallan, G., Guittet, M., 1997, Modified activity of a VP2-located neutralizing epitope on various vaccine, pathogenic and hypervirulent strains of infectious bursal disease virus. *Arch Virol* 142, 255-270.
- Fauquet, C.M., Stanley, J., 2005, Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Arch Virol* 150, 2151-2179.
- Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., Lopez-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Fraile, L., Olvera, A., Segales, J., 2008, A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet Microbiol* 128, 23-35.
- Hanada, K., Suzuki, Y., Gojobori, T., 2004, A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. *Mol Biol Evol* 21, 1074-1080.
- Hon, C.C., Lam, T.Y., Drummond, A., Rambaut, A., Lee, Y.F., Yip, C.W., Zeng, F., Lam, P.Y., Ng, P.T., Leung, F.C., 2006, Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent infectious bursal disease virus and reassortment of its genome segment B. *J Virol* 80, 8503-8509.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001, MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754-755.
- Islam, M.R., Zierenberg, K., Eterradossi, N., Toquin, D., Rivallan, G., Muller, H., 2001, Molecular and antigenic characterization of Bangladeshi isolates of infectious bursal disease virus demonstrate their similarities with recent European, Asian and African very virulent strains. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48, 211-221.
- Jackwood, D.J., Cookson, K.C., Sommer-Wagner, S.E., Le Galludec, H., de Wit, J.J., 2006, Molecular characteristics of infectious bursal disease viruses from asymptomatic broiler flocks in Europe. *Avian Dis* 50, 532-536.

- Jackwood, D.J., Saif, Y.M., Moorhead, P.D., 1985, Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens. *Avian Dis* 29, 1184-1194.
- Jackwood, D.J., Sommer-Wagner, S., 2007, Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virology* 365, 369-375.
- Jackwood, D.J., Sommer-Wagner, S.E., 2011, Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease Birnavirus (IBDV). *Virology* 409, 33-37.
- Jackwood, D.J., Sommer-Wagner, S.E., Stoute, A.S., Woolcock, P.R., Crossley, B.M., Hietala, S.K., Charlton, B.R., 2009, Characteristics of a very virulent infectious bursal disease virus from California. *Avian Dis* 53, 592-600.
- Jenkins, G.M., Rambaut, A., Pybus, O.G., Holmes, E.C., 2002, Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J Mol Evol* 54, 156-165.
- Kibenge, F.S., Dhillon, A.S., Russell, R.G., 1988, Identification of serotype II infectious bursal disease virus proteins. *Avian Pathol* 17, 679-687.
- Kimura, M., 1983, *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kwon, H.M., Kim, S.J., 2004, Sequence analysis of the variable VP2 gene of infectious bursal disease viruses passaged in Vero cells. *Virus Genes* 28, 285-291.
- Le Nouen, C., Rivallan, G., Toquin, D., Darlu, P., Morin, Y., Beven, V., de Boisseson, C., Cazaban, C., Comte, S., Gardin, Y., Etteradossi, N., 2006, Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. *J Gen Virol* 87, 209-216.
- Letzel, T., Coulibaly, F., Rey, F.A., Delmas, B., Jagt, E., van Loon, A.A., Mundt, E., 2007, Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *J Virol* 81, 12827-12835.
- Li, Y., Wu, T., Cheng, X., Zhang, C., 2009, Molecular characteristic of VP2 gene of infectious bursal disease viruses isolated from a farm in two decades. *Virus Genes* 38, 408-413.
- Librado, P., Rozas, J., 2009, DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Lojkic, I., Bidin, Z., Pokric, B., 2008, Sequence analysis of both genome segments of three Croácian infectious bursal disease field viruses. *Avian Dis* 52, 513-519.

- Lua, S., Qin, H., Lim, L., Shi, J., Gupta, G., Song, J., 2011, Structural, Stability, Dynamic and Binding Properties of the ALS-Causing T46I Mutant of the hVAPB MSP Domain as Revealed by NMR and MD Simulations. *PLoS One* 6, e27072.
- Martin, D., Rybicki, E., 2000, RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16, 562-563.
- Martin, D.P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D., Lefevre, P., 2010, RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26, 2462-2463.
- Olvera, A., Busquets, N., Cortey, M., de Deus, N., Ganges, L., Nunez, J.I., Peralta, B., Toskano, J., Dolz, R., 2010, Applying phylogenetic analysis to viral livestock diseases: moving beyond molecular typing. *Vet J* 184, 130-137.
- Olvera, A., Cortey, M., Segales, J., 2007, Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 357, 175-185.
- Padidam, M., Sawyer, S., Fauquet, C.M., 1999, Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265, 218-225.
- Posada, D., 2008, jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25, 1253-1256.
- Posada, D., Crandall, K.A., 2001, Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13757-13762.
- Sanchez, R., Sali, A., 2000, Comparative protein structure modeling. Introduction and practical examples with modeller. *Methods Mol Biol* 143, 97-129.
- Schrodinger, L.L.C., 2010, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.
- Segales, J., Olvera, A., Grau-Roma, L., Charreyre, C., Nauwynck, H., Larsen, L., Dupont, K., McCullough, K., Ellis, J., Krakowka, S., Mankertz, A., Fredholm, M., Fossum, C., Timmusk, S., Stockhofe-Zurwieden, N., Beattie, V., Armstrong, D., Grassland, B., Baekbo, P., Allan, G., 2008, PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec* 162, 867-868.
- Smith, J.M., 1992, Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* 34, 126-129.
- Sreedevi, B., LeFever, L.J., Sommer-Wagner, S.E., Jackwood, D.J., 2007, Characterization of infectious bursal disease viruses from four layer flocks in the United States. *Avian Dis* 51, 845-850.

- Suzuki, Y., 2004, Negative selection on neutralization epitopes of poliovirus surface proteins: implications for prediction of candidate epitopes for immunization. *Gene* 328, 127-133.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011, MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28, 2731-2739.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.
- Thomsen, R., Christensen, M.H., 2006, MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem* 49, 3315-3321.
- Vakharia, V.N., He, J., Ahamed, B., Snyder, D.B., 1994, Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res* 31, 265-273.
- von Einem, U.I., Gorbalenya, A.E., Schirmer, H., Behrens, S.E., Letzel, T., Mundt, E., 2004, VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* 85, 2221-2229.
- Yamaguchi, T., Ogawa, M., Inoshima, Y., Miyoshi, M., Fukushi, H., Hirai, K., 1996, Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus. *Virology* 223, 219-223.
- Zheng, D.P., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2006, Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312-323.

Material Suplementar

Tabela S1. Genotipagem dos isolados de IBDV e dados associados.

Acesso no GenBank	Grupo	País	Data de submissão	Isolado
<u>AF006694</u>	IBDV-1	China	1997-JUN-5	atenuado/vacinal
AF006695	IBDV-1	China	1997-JUN-5	-
AF006697	IBDV-1	China	1997-JUN-5	-
AF006699	IBDV-1	China	1997-JUN-5	-
<u>AF006701</u>	IBDV-1	China	1997-JUN-5	-
AF051837	IBDV-1	China	1998-MAR-3	atenuado/vacinal
AF051839	IBDV-1	China	1998-MAR-3	vvIBDV
AF091097	IBDV-1	EUA	1998-SEP-11	avIBDV
AF091098	IBDV-1	EUA	1998-SEP-11	cvIBDV
AF091099	IBDV-1	EUA	1998-SEP-11	avIBDV
AF092171	IBDV-1	China	1998-SEP-15	-
<u>AF109154</u>	IBDV-1	Taiwan	1998-NOV-24	cvIBDV
AF121256	IBDV-1	EUA	1999-JAN-18	-
<u>AF133904</u>	IBDV-1	EUA	1999-MAR-8	avIBDV
<u>AF140705</u>	IBDV-1	Cuba	1999-APR-6	atenuado/vacinal
AF159219	IBDV-1	Alemanha	1999-JUN-15	-
<u>AF194428</u>	IBDV-1	Holanda	1999-OCT-12	atenuado/vacinal
AF279288	IBDV-1	China	2000-JUN-16	vvIBDV
AF312371	IBDV-1	China	2000-OCT-10	vvIBDV
AF321054	IBDV-1	China	2000-NOV-14	atenuado/vacinal
<u>AF321055</u>	IBDV-1	China	2000-NOV-14	atenuado/vacinal
<u>AF321056</u>	IBDV-1	China	2000-NOV-14	vvIBDV
<u>AF362747</u>	IBDV-1	Alemanha	2001-MAR-20	cvIBDV
<u>AF362771</u>	IBDV-1	Alemanha	2001-MAR-21	atenuado/vacinal
AF457104	IBDV-1	Taiwan	2001-NOV-27	-
AF457105	IBDV-1	Taiwan	2001-NOV-27	-
AF457106	IBDV-1	Taiwan	2001-NOV-27	-
AF498628	IBDV-1	EUA	2002-APR-5	-
AF498629	IBDV-1	EUA	2002-APR-5	-
AF498630	IBDV-1	EUA	2002-APR-5	-
AF498631	IBDV-1	EUA	2002-APR-5	cvIBDV
AF498632	IBDV-1	EUA	2002-APR-5	cvIBDV
AF498633	IBDV-1	EUA	2002-APR-5	cvIBDV
AF498634	IBDV-1	Venezuela	2002-APR-5	-
AF498635	IBDV-1	EUA	2002-APR-5	avIBDV
<u>AF499929</u>	IBDV-1	Luxemburgo	2002-APR-8	atenuado/vacinal
AF533672	IBDV-1	Coréia do Sul	2002-JUL-30	-
AF533674	IBDV-1	Coréia do Sul	2002-JUL-30	-
AF533676	IBDV-1	Coréia do Sul	2002-JUL-30	-
AF533678	IBDV-1	Coréia do Sul	2002-JUL-30	-

<u>AJ310185</u>	IBDV-1	França	2001-MAR-26	atenuado/vacinal
<u>AJ427340</u>	IBDV-1	Índia	2002-JAN-7	-
<u>AJ577092</u>	IBDV-1	Vietnã	2003-JUL-15	-
<u>AJ621158</u>	IBDV-1	Índia	2004-JAN-17	-
<u>AX027586</u>	IBDV-1	EUA	2000-JUN-29	-
<u>AX323155</u>	IBDV-1	-	2001-DEC-6	quimérico
<u>AX721965</u>	IBDV-1	Japão	2003-APR-2	avIBDV
<u>AX721980</u>	IBDV-1	Japão	2003-APR-2	cvIBDV
<u>AY012677</u>	IBDV-1	EUA	2000-NOV-7	avIBDV
<u>AY012678</u>	IBDV-1	EUA	2000-NOV-7	avIBDV
<u>AY012679</u>	IBDV-1	EUA	2000-NOV-7	avIBDV
<u>AY012680</u>	IBDV-1	EUA	2000-NOV-7	avIBDV
<u>AY012681</u>	IBDV-1	EUA	2000-NOV-7	avIBDV
<u>AY012682</u>	IBDV-1	EUA	2000-NOV-7	avIBDV
<u>AY012683</u>	IBDV-1	EUA	2000-NOV-7	vvIBDV
<u>AY029166</u>	IBDV-1	EUA	2001-MAR-29	cvIBDV
<u>AY100319</u>	IBDV-1	Equador	2002-APR-26	avIBDV
<u>AY100320</u>	IBDV-1	Venezuela	2002-APR-26	avIBDV
<u>AY311479</u>	IBDV-1	Egito	2003-JUN-1	cvIBDV
<u>AY319768</u>	IBDV-1	China	2004-APR-9	atenuado/vacinal
<u>AY321509</u>	IBDV-1	China	2003-JUN-12	-
<u>AY332562</u>	IBDV-1	Coréia do Sul	2003-JUN-30	-
<u>AY368653</u>	IBDV-1	EUA	2003-AUG-15	avIBDV
<u>AY462026</u>	IBDV-1	EUA	2003-NOV-10	cvIBDV
<u>AY462027</u>	IBDV-1	EUA	2003-NOV-10	avIBDV
<u>AY512594</u>	IBDV-1	China	2003-DEC-23	-
<u>AY628216</u>	IBDV-1	China	2004-MAY-18	-
<u>AY770584</u>	IBDV-1	Espanha	2004-OCT-4	-
<u>AY770585</u>	IBDV-1	Espanha	2004-OCT-4	-
<u>AY770586</u>	IBDV-1	Espanha	2004-OCT-4	-
<u>AY770587</u>	IBDV-1	Espanha	2004-OCT-4	-
<u>AY770588</u>	IBDV-1	Espanha	2004-OCT-4	-
<u>AY770589</u>	IBDV-1	Espanha	2004-OCT-4	-
<u>AY819701</u>	IBDV-1	EUA	2004-NOV-5	cvIBDV
<u>AY819702</u>	IBDV-1	EUA	2004-NOV-5	cvIBDV
<u>AY819703</u>	IBDV-1	EUA	2004-NOV-5	cvIBDV
<u>AY841900</u>	IBDV-1	Vietnã	2004-NOV-28	-
<u>AY841902</u>	IBDV-1	Vietnã	2004-NOV-28	-
<u>AY918948</u>	IBDV-1	EUA	2005-FEB-3	cvIBDV
<u>AY918950</u>	IBDV-1	EUA	2005-FEB-3	cvIBDV
<u>BD009827</u>	IBDV-1	-	1996-JUL-19	atenuado/vacinal
<u>CS074543</u>	IBDV-1	-	2005-APR-20	atenuado/vacinal
<u>CS140538</u>	IBDV-1	-	2005-AUG-4	atenuado/vacinal
<u>CS140664</u>	IBDV-1	-	2005-AUG-4	atenuado/vacinal
<u>D00499</u>	IBDV-1	Canadá	1993-APR-29	cvIBDV
<u>D00867</u>	IBDV-1	Alemanha	1993-APR-29	cvIBDV
<u>D00868</u>	IBDV-1	Reino Unido	1993-APR-29	cvIBDV

D00869	IBDV-1	Reino Unido	1993-APR-29	cvIBDV
D10065	IBDV-1	Austrália	1991-NOV-7	avIBDV
DD187399	IBDV-1	EUA	1994-MAR-29	quimérico
DQ074690	IBDV-1	Malásia	2005-MAY-25	cvIBDV
DQ187988	IBDV-1	Brasil	2005-AUG-31	cvIBDV
DQ202329	IBDV-1	China	2005-SEP-9	cvIBDV
DQ355819	IBDV-1	EUA	2006-JAN-8	atenuado/vacinal
DQ355820	IBDV-1	EUA	2006-JAN-8	atenuado/vacinal
DQ403248	IBDV-1	China	2006-FEB-16	atenuado/vacinal
DQ656494	IBDV-1	China	2006-MAY-25	-
DQ656495	IBDV-1	China	2006-MAY-25	-
DQ656498	IBDV-1	China	2006-MAY-25	-
DQ656499	IBDV-1	China	2006-MAY-25	-
DQ656502	IBDV-1	China	2006-MAY-25	-
DQ656503	IBDV-1	China	2006-MAY-25	-
DQ656504	IBDV-1	China	2006-MAY-25	-
DQ656505	IBDV-1	China	2006-MAY-25	-
DQ656511	IBDV-1	China	2006-MAY-25	-
DQ656513	IBDV-1	China	2006-MAY-25	-
DQ656515	IBDV-1	China	2006-MAY-25	-
DQ656516	IBDV-1	China	2006-MAY-25	-
DQ656517	IBDV-1	China	2006-MAY-25	cvIBDV
DQ656518	IBDV-1	China	2006-MAY-25	-
DQ656521	IBDV-1	China	2006-MAY-25	-
DQ659246	IBDV-1	China	2006-MAY-31	-
DQ787429	IBDV-1	Paquistão	2007-JAN-25	-
DQ899751	IBDV-1	Irã	2006-AUG-12	-
DQ899752	IBDV-1	Irã	2006-AUG-12	-
DQ899753	IBDV-1	Irã	2006-SEP-18	-
DQ906921	IBDV-1	China	2006-AUG-17	cvIBDV
EF070159	IBDV-1	Malásia	2006-OCT-20	-
EF070166	IBDV-1	Malásia	2006-OCT-20	-
EF070171	IBDV-1	Malásia	2006-OCT-20	-
EF070173	IBDV-1	Malásia	2006-OCT-20	-
EF138950	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138955	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138956	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138957	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138958	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138959	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138960	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138968	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	cvIBDV
EF138976	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	cvIBDV
EF138983	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	cvIBDV
EF138988	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	cvIBDV
EF138990	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	cvIBDV
EF138991	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	cvIBDV

EF138995	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF138997	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF138998	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF138999	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139000	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139001	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139002	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139003	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139004	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139005	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139006	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139007	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139008	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139009	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139010	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139011	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139012	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139013	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139014	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139015	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139016	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139017	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139018	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139019	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139020	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139021	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139022	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139023	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139024	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139025	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139026	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139027	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139028	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139029	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139030	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139031	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139032	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139033	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139034	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139035	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139036	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139037	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139038	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139039	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139040	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139041	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139042	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-

EF139043	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139044	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139045	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139046	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139047	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139048	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139049	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139050	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139051	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139052	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139053	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139054	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139055	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139056	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139057	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139058	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139059	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139060	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139061	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139062	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139063	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139064	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139065	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139066	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139067	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139068	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139069	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139070	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139071	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139072	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139073	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139074	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139075	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139076	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139077	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	avIBDV
EF139078	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139079	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139080	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF139081	IBDV-1	Canadá	2006-NOV-24	-
EF418033	IBDV-1	EUA	2007-FEB-1	cvIBDV
EF418034	IBDV-1	EUA	2007-FEB-1	cvIBDV
EF418035	IBDV-1	EUA	2007-FEB-1	cvIBDV
EF418036	IBDV-1	EUA	2007-FEB-1	cvIBDV
EF646853	IBDV-1	Japão	2007-MAY-24	-
EU162087	IBDV-1	EUA	2007-SEP-18	cvIBDV
EU162088	IBDV-1	EUA	2007-SEP-18	cvIBDV
EU162089	IBDV-1	EUA	2007-SEP-18	cvIBDV

<u>EU184689</u>	IBDV-1	Croácia	2007-OCT-1	-
<u>EU595671</u>	IBDV-1	China	2008-MAR-12	atenuado/vacinal
<u>EU595672</u>	IBDV-1	China	2008-MAR-12	atenuado/vacinal
<u>EU883569</u>	IBDV-1	Egito	2008-JUL-11	-
<u>FJ262538</u>	IBDV-1	Egito	2008-SEP-29	-
<u>FJ615498</u>	IBDV-1	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ842492</u>	IBDV-1	Vietnã	2009-MAR-18	-
<u>FJ842497</u>	IBDV-1	Vietnã	2009-MAR-18	-
<u>GM601034</u>	IBDV-1	-	2008-JUN-12	-
<u>GQ131545</u>	IBDV-1	Malásia	2009-MAY-7	-
<u>GQ131546</u>	IBDV-1	Malásia	2009-MAY-7	-
<u>GQ166970</u>	IBDV-1	China	2009-MAY-10	-
<u>GQ866119</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-SEP-2	-
<u>GQ866120</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-SEP-2	-
<u>GQ985435</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-SEP-22	-
<u>GQ985436</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-SEP-22	-
<u>GQ985437</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-SEP-22	-
<u>GQ985438</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-SEP-22	-
<u>GQ985439</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-SEP-22	-
<u>GQ985440</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-SEP-22	-
<u>GQ985441</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-SEP-22	-
<u>GQ985442</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-SEP-22	-
<u>GQ985443</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-SEP-22	-
<u>GQ985444</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-SEP-22	-
<u>GU135651</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-OCT-27	-
<u>GU172370</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-NOV-2	-
<u>GU172371</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-NOV-2	-
<u>GU172372</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-NOV-3	-
<u>GU206814</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-NOV-17	-
<u>GU206815</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-NOV-17	-
<u>GU206816</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-NOV-17	-
<u>GU299810</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-DEC-10	-
<u>GU299811</u>	IBDV-1	Taiwan	2009-DEC-10	-
<u>M64285</u>	IBDV-1	EUA	1993-AUG-2	avIBDV
<u>M97346</u>	IBDV-1	EUA	1994-NOV-2	-
<u>X16107</u>	IBDV-1	Alemanha	1989-AUG-16	cvIBDV
<u>X54858</u>	IBDV-1	EUA	1990-OCT-11	avIBDV
<u>AB024076</u>	IBDV-2	Japão	1999-FEB-23	-
<u>AB368968</u>	IBDV-2	Zâmbia	2007-NOV-18	-
<u>AB368970</u>	IBDV-2	Tanzânia	2007-NOV-18	vvIBDV
<u>AF006696</u>	IBDV-2	China	1997-JUN-5	-
<u>AF006698</u>	IBDV-2	China	1997-JUN-5	-
<u>AF006700</u>	IBDV-2	China	1997-JUN-5	-
<u>AF051838</u>	IBDV-2	China	1998-MAR-3	vvIBDV
<u>AF092943</u>	IBDV-2	China	1998-SEP-17	vvIBDV
<u>AF159207</u>	IBDV-2	Alemanha	1999-JUN-15	vvIBDV
<u>AF159208</u>	IBDV-2	Alemanha	1999-JUN-15	vvIBDV

AF159209	IBDV-2	Alemanha	1999-JUN-15	vvIBDV
AF159210	IBDV-2	Alemanha	1999-JUN-15	vvIBDV
AF159211	IBDV-2	Alemanha	1999-JUN-15	vvIBDV
AF159212	IBDV-2	Alemanha	1999-JUN-15	vvIBDV
AF159214	IBDV-2	Alemanha	1999-JUN-15	vvIBDV
AF159215	IBDV-2	Alemanha	1999-JUN-15	vvIBDV
AF159216	IBDV-2	Alemanha	1999-JUN-15	vvIBDV
AF159217	IBDV-2	Alemanha	1999-JUN-15	vvIBDV
AF159218	IBDV-2	Alemanha	1999-JUN-15	vvIBDV
<u>AF165150</u>	IBDV-2	Coréia do Sul	1999-JUL-6	vvIBDV
<u>AF165151</u>	IBDV-2	Coréia do Sul	1999-JUL-6	vvIBDV
<u>AF240686</u>	IBDV-2	Holanda	2000-MAR-1	vvIBDV
<u>AF247006</u>	IBDV-2	Malásia	2000-MAR-21	vvIBDV
AF248612	IBDV-2	Malásia	2000-MAR-21	vvIBDV
AF260317	IBDV-2	Malásia	2000-APR-24	-
AF262030	IBDV-2	Malásia	2000-APR-29	vvIBDV
AF279287	IBDV-2	Taiwan	2000-JUN-16	vvIBDV
<u>AF281651</u>	IBDV-2	China	2000-JUN-23	vvIBDV
AF303219	IBDV-2	Taiwan	2000-SEP-5	vvIBDV
AF322444	IBDV-2	Indonésia	2000-NOV-21	vvIBDV
<u>AF362776</u>	IBDV-2	Bangladesh	2001-MAR-21	vvIBDV
AF427103	IBDV-2	Vietnã	2001-OCT-1	vvIBDV
AF457103	IBDV-2	Taiwan	2001-NOV-27	-
AF464901	IBDV-2	Malásia	2002-JAN-2	-
AF498625	IBDV-2	República Dominicana	2002-APR-5	-
AF498626	IBDV-2	República Dominicana	2002-APR-5	-
<u>AF508176</u>	IBDV-2	Coréia do Sul	2002-APR-30	vvIBDV
<u>AF508177</u>	IBDV-2	Coréia do Sul	2002-APR-30	-
<u>AF527039</u>	IBDV-2	Malásia	2002-JUL-5	vvIBDV
<u>AF533670</u>	IBDV-2	Coréia do Sul	2002-JUL-29	vvIBDV
AF533675	IBDV-2	Coréia do Sul	2002-JUL-30	-
AF533677	IBDV-2	Coréia do Sul	2002-JUL-30	-
<u>AJ318896</u>	IBDV-2	Reino Unido	2001-AUG-15	vvIBDV
<u>AJ879932</u>	IBDV-2	Venezuela	2005-FEB-10	vvIBDV
AM111353	IBDV-2	França	2005-OCT-4	vvIBDV
<u>AY099456</u>	IBDV-2	Nigéria	2002-APR-24	vvIBDV
AY115569	IBDV-2	Vietnã	2002-MAY-28	vvIBDV
AY115570	IBDV-2	Vietnã	2002-MAY-28	vvIBDV
AY115571	IBDV-2	Vietnã	2002-MAY-28	-
<u>AY134874</u>	IBDV-2	China	2002-MAY-28	vvIBDV
AY318758	IBDV-2	Egito	2003-JUN-8	vvIBDV
<u>AY323952</u>	IBDV-2	Irã	2003-JUN-16	vvIBDV
AY333088	IBDV-2	Malásia	2003-JUN-30	vvIBDV
AY367560	IBDV-2	Nepal	2003-AUG-14	-
AY520909	IBDV-2	Malásia	2004-JAN-8	vvIBDV

AY520910	IBDV-2	Malásia	2004-JAN-8	vvIBDV
AY520911	IBDV-2	Malásia	2004-JAN-8	vvIBDV
AY525106	IBDV-2	Brasil	2004-JAN-13	vvIBDV
AY525108	IBDV-2	Brasil	2004-JAN-13	vvIBDV
AY525109	IBDV-2	Brasil	2004-JAN-13	vvIBDV
AY525110	IBDV-2	Brasil	2004-JAN-13	vvIBDV
AY525111	IBDV-2	Brasil	2004-JAN-13	vvIBDV
AY525112	IBDV-2	República Dominicana	2004-JAN-13	vvIBDV
AY525113	IBDV-2	República Dominicana	2004-JAN-13	vvIBDV
AY525114	IBDV-2	República Dominicana	2004-JAN-13	vvIBDV
AY525115	IBDV-2	Venezuela	2004-JAN-13	vvIBDV
AY525116	IBDV-2	Venezuela	2004-JAN-13	vvIBDV
AY525117	IBDV-2	Venezuela	2004-JAN-13	vvIBDV
AY525118	IBDV-2	Venezuela	2004-JAN-13	vvIBDV
AY525119	IBDV-2	Espanha	2004-JAN-13	vvIBDV
<u>AY598356</u>	IBDV-2	China	2004-APR-13	vvIBDV
AY624999	IBDV-2	China	2004-MAY-13	-
AY628214	IBDV-2	China	2004-MAY-18	-
AY628215	IBDV-2	China	2004-MAY-18	-
AY628217	IBDV-2	China	2004-MAY-18	-
AY628218	IBDV-2	China	2004-MAY-18	-
<u>AY704912</u>	IBDV-2	Irã	2004-AUG-3	vvIBDV
AY737498	IBDV-2	Taiwan	2004-AUG-29	-
AY737499	IBDV-2	Taiwan	2004-AUG-29	-
AY737500	IBDV-2	Taiwan	2004-AUG-29	-
AY737501	IBDV-2	Taiwan	2004-AUG-29	-
AY737502	IBDV-2	Taiwan	2004-AUG-29	-
AY737503	IBDV-2	Taiwan	2004-AUG-29	-
AY737504	IBDV-2	Taiwan	2004-AUG-29	-
AY737505	IBDV-2	Taiwan	2004-AUG-29	-
AY737506	IBDV-2	Taiwan	2004-AUG-29	-
AY769978	IBDV-2	Brasil	2004-SEP-30	vvIBDV
AY769979	IBDV-2	Brasil	2004-SEP-30	vvIBDV
AY770581	IBDV-2	Espanha	2004-OCT-4	vvIBDV
AY770582	IBDV-2	Espanha	2004-OCT-4	vvIBDV
AY770583	IBDV-2	Espanha	2004-OCT-4	vvIBDV
AY770590	IBDV-2	Espanha	2004-OCT-4	vvIBDV
AY770591	IBDV-2	Espanha	2004-OCT-4	vvIBDV
AY770592	IBDV-2	Espanha	2004-OCT-4	vvIBDV
AY770593	IBDV-2	Espanha	2004-OCT-4	vvIBDV
AY780418	IBDV-2	Brasil	2004-OCT-7	vvIBDV
AY780423	IBDV-2	Brasil	2004-OCT-7	vvIBDV
AY791998	IBDV-2	Malásia	2004-OCT-25	vvIBDV
AY841901	IBDV-2	Vietnã	2004-NOV-28	-

AY870343	IBDV-2	Irã	2004-DEC-29	vvIBDV
AY970665	IBDV-2	Malásia	2005-MAR-21	vvIBDV
AY996923	IBDV-2	Taiwan	2005-APR-1	-
<u>D49706</u>	IBDV-2	Japão	1995-MAR-15	vvIBDV
<u>D83985</u>	IBDV-2	Japão	1996-MAR-12	vvIBDV
DQ000436	IBDV-2	Malásia	2005-APR-6	vvIBDV
DQ074691	IBDV-2	Malásia	2005-MAY-25	vvIBDV
<u>DQ286035</u>	IBDV-2	Brasil	2005-NOV-9	vvIBDV
DQ297821	IBDV-2	Uruguai	2005-NOV-18	vvIBDV
DQ297822	IBDV-2	Uruguai	2005-NOV-18	vvIBDV
DQ297823	IBDV-2	Uruguai	2005-NOV-18	vvIBDV
DQ297824	IBDV-2	Uruguai	2005-NOV-18	vvIBDV
DQ297825	IBDV-2	Uruguai	2005-NOV-18	vvIBDV
DQ297826	IBDV-2	Uruguai	2005-NOV-18	vvIBDV
<u>DQ355815</u>	IBDV-2	Vietnã	2006-JAN-8	vvIBDV
<u>DQ355816</u>	IBDV-2	Vietnã	2006-JAN-8	vvIBDV
<u>DQ355817</u>	IBDV-2	Vietnã	2006-JAN-8	vvIBDV
<u>DQ355818</u>	IBDV-2	Vietnã	2006-JAN-8	vvIBDV
DQ450988	IBDV-2	China	2006-MAR-16	-
DQ630445	IBDV-2	Irã	2006-MAY-7	-
DQ630446	IBDV-2	Irã	2006-MAY-7	-
DQ630447	IBDV-2	Irã	2006-MAY-7	vvIBDV
DQ630448	IBDV-2	Irã	2006-MAY-9	vvIBDV
DQ630449	IBDV-2	Irã	2006-MAY-9	vvIBDV
DQ630450	IBDV-2	Irã	2006-MAY-9	vvIBDV
DQ630451	IBDV-2	Irã	2006-MAY-9	vvIBDV
DQ630452	IBDV-2	Irã	2006-MAY-9	vvIBDV
DQ630453	IBDV-2	Irã	2006-MAY-9	vvIBDV
DQ630455	IBDV-2	Irã	2006-MAY-9	vvIBDV
DQ630457	IBDV-2	Irã	2006-MAY-9	vvIBDV
DQ630458	IBDV-2	Irã	2006-MAY-9	vvIBDV
DQ656496	IBDV-2	China	2006-MAY-25	-
DQ656497	IBDV-2	China	2006-MAY-25	-
DQ656500	IBDV-2	China	2006-MAY-25	-
DQ656501	IBDV-2	China	2006-MAY-25	-
DQ656506	IBDV-2	China	2006-MAY-25	-
DQ656507	IBDV-2	China	2006-MAY-25	-
DQ656512	IBDV-2	China	2006-MAY-25	-
DQ656514	IBDV-2	China	2006-MAY-25	-
DQ656519	IBDV-2	China	2006-MAY-25	-
DQ656520	IBDV-2	China	2006-MAY-25	-
DQ656522	IBDV-2	China	2006-MAY-25	-
<u>DQ778035</u>	IBDV-2	Vietnã	2006-JUN-15	vvIBDV
DQ779963	IBDV-2	Irã	2006-JUN-15	-
DQ785171	IBDV-2	Irã	2006-JUN-18	-
DQ785172	IBDV-2	Irã	2006-JUN-18	vvIBDV
DQ785173	IBDV-2	Irã	2006-JUN-18	vvIBDV

DQ785174	IBDV-2	Irã	2006-JUN-18	vvIBDV
<u>DQ825652</u>	IBDV-2	China	2006-JUN-27	atenuado/vacinal
DQ899750	IBDV-2	Irã	2006-AUG-12	-
DQ899754	IBDV-2	Irã	2006-AUG-12	-
DQ927040	IBDV-2	Israel	2006-AUG-29	-
DQ927042	IBDV-2	Israel	2006-AUG-29	vvIBDV
EF043078	IBDV-2	Turquia	2006-OCT-5	vvIBDV
EF070157	IBDV-2	Malásia	2006-OCT-20	-
EF070158	IBDV-2	Malásia	2006-OCT-20	-
EF070160	IBDV-2	Malásia	2006-OCT-20	-
EF070161	IBDV-2	Malásia	2006-OCT-20	-
EF070168	IBDV-2	Malásia	2006-OCT-20	-
EF070170	IBDV-2	Malásia	2006-OCT-20	-
EF070172	IBDV-2	Malásia	2006-OCT-20	-
EF070174	IBDV-2	Malásia	2006-OCT-20	-
EF070175	IBDV-2	Malásia	2006-OCT-20	-
EF070176	IBDV-2	Malásia	2006-OCT-20	-
EF070177	IBDV-2	Malásia	2006-OCT-20	-
EF070178	IBDV-2	Malásia	2006-OCT-20	-
EF070179	IBDV-2	Malásia	2006-OCT-20	-
EF080952	IBDV-2	China	2006-OCT-16	vvIBDV
EF423571	IBDV-2	China	2007-FEB-5	-
<u>EF517528</u>	IBDV-2	China	2001-DEC-5	vvIBDV
EF529700	IBDV-2	Paquistão	2007-MAR-29	vvIBDV
EU042137	IBDV-2	China	2007-JUL-17	vvIBDV
EU042138	IBDV-2	China	2007-JUL-17	vvIBDV
EU042139	IBDV-2	China	2007-JUL-18	vvIBDV
EU042140	IBDV-2	China	2007-JUL-18	vvIBDV
EU042141	IBDV-2	China	2007-JUL-18	vvIBDV
EU042142	IBDV-2	China	2007-JUL-18	vvIBDV
EU042143	IBDV-2	China	2007-JUL-18	vvIBDV
EU042144	IBDV-2	China	2007-JUL-18	vvIBDV
EU042145	IBDV-2	China	2007-JUL-18	vvIBDV
EU042146	IBDV-2	China	2007-JUL-18	vvIBDV
EU042147	IBDV-2	China	2007-JUL-18	vvIBDV
<u>EU184687</u>	IBDV-2	Croácia	2007-OCT-1	vvIBDV
EU328326	IBDV-2	China	2007-DEC-6	vvIBDV
EU328327	IBDV-2	China	2007-DEC-6	vvIBDV
EU328328	IBDV-2	China	2007-DEC-6	vvIBDV
EU328331	IBDV-2	China	2007-DEC-6	vvIBDV
EU328332	IBDV-2	China	2007-DEC-6	vvIBDV
EU328333	IBDV-2	China	2007-DEC-6	vvIBDV
EU328334	IBDV-2	China	2007-DEC-6	vvIBDV
EU328335	IBDV-2	China	2007-DEC-6	vvIBDV
EU417823	IBDV-2	China	2008-JAN-19	-
EU417824	IBDV-2	China	2008-JAN-19	-
EU584433	IBDV-2	Egito	2008-MAR-21	vvIBDV

<u>EU595667</u>	IBDV-2	China	2008-MAR-27	atenuado/vacinal
<u>EU595668</u>	IBDV-2	China	2008-MAR-12	atenuado/vacinal
<u>EU595669</u>	IBDV-2	China	2008-MAR-12	atenuado/vacinal
<u>EU595670</u>	IBDV-2	China	2008-MAR-12	atenuado/vacinal
<u>EU714287</u>	IBDV-2	Indonésia	2008-MAY-10	-
<u>EU714288</u>	IBDV-2	Indonésia	2008-MAY-10	-
<u>EU788042</u>	IBDV-2	Índia	2008-JUN-3	vvIBDV
<u>EU934236</u>	IBDV-2	Paquistão	2008-JUL-30	vvIBDV
<u>FJ156280</u>	IBDV-2	China	2008-AUG-22	-
<u>FJ615494</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-5	-
<u>FJ615495</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615496</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615497</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615499</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615500</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615501</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615502</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615503</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615504</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615505</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615506</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615507</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615508</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615509</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615510</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615511</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615512</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615513</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615514</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615515</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615516</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615517</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615518</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ615519</u>	IBDV-2	China	2009-JAN-11	-
<u>FJ695138</u>	IBDV-2	China	2009-FEB-2	-
<u>FJ824672</u>	IBDV-2	China	2009-MAR-12	-
<u>FJ824699</u>	IBDV-2	Malásia	2009-MAR-12	atenuado/vacinal
<u>FJ842491</u>	IBDV-2	Vietnã	2009-MAR-18	vvIBDV
<u>FJ842493</u>	IBDV-2	Vietnã	2009-MAR-18	vvIBDV
<u>FJ842495</u>	IBDV-2	Vietnã	2009-MAR-18	vvIBDV
<u>FJ842498</u>	IBDV-2	Vietnã	2009-MAR-18	vvIBDV
<u>FJ842499</u>	IBDV-2	Vietnã	2009-MAR-18	vvIBDV
<u>GQ131540</u>	IBDV-2	Malásia	2009-MAY-7	vvIBDV
<u>GQ131541</u>	IBDV-2	Malásia	2009-MAY-7	vvIBDV
<u>GQ131542</u>	IBDV-2	Malásia	2009-MAY-7	vvIBDV
<u>GQ131543</u>	IBDV-2	Malásia	2009-MAY-7	vvIBDV
<u>GQ131544</u>	IBDV-2	Malásia	2009-MAY-7	-

GQ166972	IBDV-2	China	2009-MAY-11	-
GQ451330	IBDV-2	China	2009-AUG-3	vvIBDV
AF148080	IBDV-3	Austrália	1999-MAY-4	-
AF148081	IBDV-3	Austrália	1999-MAY-4	-
AF381000	IBDV-3	Austrália	2001-MAY-15	cvIBDV
AF381001	IBDV-3	Austrália	2001-MAY-15	cvIBDV
AF381002	IBDV-3	Austrália	2001-MAY-15	cvIBDV
AF381004	IBDV-3	Austrália	2001-MAY-15	cvIBDV
AF381005	IBDV-3	Austrália	2001-MAY-15	cvIBDV
AF381006	IBDV-3	Austrália	2001-MAY-15	cvIBDV
AF381008	IBDV-3	Austrália	2001-MAY-15	cvIBDV
AF381010	IBDV-3	Austrália	2001-MAY-15	avIBDV
AF381011	IBDV-3	Austrália	2001-MAY-15	avIBDV
X03993	IBDV-3	Austrália	1986-NOV-15	cvIBDV
AF165149	IBDV-4	Coréia do Sul	1999-JUL-6	-
AF498627	IBDV-4	México	2002-APR-5	cvIBDV
AF533673	IBDV-4	Coréia do Sul	2002-JUL-30	-
AY780419	IBDV-4	Brasil	2004-OCT-7	atIBDV
AY780420	IBDV-4	Brasil	2004-OCT-7	atIBDV
AY780421	IBDV-4	Brasil	2004-OCT-7	atIBDV
AY780422	IBDV-4	Brasil	2004-OCT-7	atIBDV
EF138948	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138949	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138951	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138952	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138953	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138954	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138961	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138962	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138963	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138964	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138965	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138966	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138969	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138970	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138971	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138972	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138973	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138974	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138975	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138977	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138978	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138979	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138980	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138981	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138982	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138984	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-

EF138985	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138986	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138987	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138989	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138992	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138993	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138994	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
EF138996	IBDV-4	Canadá	2006-NOV-24	-
AY332560	Não classificada	-	2003-JUN-30	atenuado/vacinal

As 561 sequências dos isolados do IBDV foram identificadas de acordo com o país de origem e classificação de genótipos. Esta tabela também lista a data de submissão e os códigos de acesso das sequências no GenBank. Os códigos sublinhados correspondem às sequências codificantes completas da VP2. *A sequência AY332560 (isolado viral vacinal) foi definida como não classificada.

Tabela S2. Estimativa das taxas de mutação dos isolados de IBDV.

Conjunto de dados	Faixa de submissão*	Sítios	Total de mutações (Eta)	Taxa de mutação*
IBDV hvVP2	1986-2009	471	502	0,0426 mutações por sítio por ano
IBDV VP2	1986-2009	1356	481	0,0142 mutações por sítio por ano

* Considerando os anos de submissão das sequências no GenBank (Tabela S1).

2.2. Artigo II

**Tracking the epidemiology of Infectious bursal disease
virus (IBDV): an evolutionary approach**

Fernanda M. F. Silva, Pedro M. P. Vidigal, Luciana W. Myrha, Juliana L.
R. Fietto, Abelardo Silva Jr, Márcia R. Almeida

Manuscrito em preparação

Tracking the epidemiology of Infectious bursal disease virus (IBDV): an evolutionary approach

Summary

Infectious bursal disease is a highly contagious disease of young chickens caused by infectious bursal disease virus (IBDV). Genome segment A encodes the capsid protein (VP2), while segment B encodes the RNA-dependent RNA polymerase (VP1). In this work, the epidemiology of viral isolates of IBDV was assessed in an evolutionary way. The selective forces that have been operating during the molecular evolution of IBDV were investigated. The VP1 polymerase appeared to have evolved under strong purifying selection, while VP2 was subjected to a milder purifying selection. In phylogenetic analyses, the VP1 and VP2 isolates were grouped into three main clusters (VP1-I to III and VP2-I to III). The classic (cvIBDV) and antigenic variants (avIBDV) of IBDV strains were included in VP1-I and VP2-II,III clusters. The virulent variants (vvIBDV), in turn, were included in VP1-II,III and VP2-I clusters. These phylogenetic clusters were also distinguished in the haplotype networks. For VP1-I, the H1 haplotype was found to be the most widespread, being identified in Asia, Africa, Europe, and North America. For VP1-II, the H2 haplotype was found to be the most widespread (Asia, Africa, Europe, and Oceania), and is the main ancestral lineage of this cluster. VP1-III was only identified in Asia. In the VP2 haplotype network, the haplotype Hap34 was the most frequent and widespread, being identified in Asia, Africa, South America, Europe, and North America. Haplotype Hap34 was also the main ancestral lineage from which all of the other classic (cvIBDV), virulent (vvIBDV), and variant (avIBDV) lineages originated. In addition, the phylogeographic analysis of VP2 suggests that IBDV isolates were introduced into Brazil by at least three events of viral introduction.

Keywords: Infectious bursal disease virus; epidemiology; phylogeography; molecular evolution; avian diseases.

1. Introduction

The potential for genetic variability of RNA viruses has long been considered to be fundamental to their evolution, adaptation and escape from host responses (Moya *et al.*, 2000). The properties of large population size, high replication rate, and short generation time are responsible, in general, for the extremely high genetic variability of RNA viral populations. Recombination and segmentation may also play an important role in generating new genetic variability (Domingo & Holland, 1997). The mutation rate is also a critical parameter for understanding virus evolution, and restrictions in genetic diversity within a population of viruses lead to lower adaptability and pathogenicity (Denison *et al.*, 2011).

Infectious bursal disease virus (IBDV) is the etiologic agent of infectious bursal disease (IBD), an acute and highly contagious disease affecting young chickens. Infectious bursal disease virus is a non-enveloped virus with a capsid containing a genome of two segments (segment A and B) of double-stranded RNA (Dobos *et al.*, 1979). Segment A encodes a precursor polyprotein in a major open reading frame (ORF) that is cleaved by autoproteolysis to yield mature VP2 (outer capsid), VP4 (protease), and VP3 (inner capsid) (Kibenge *et al.*, 1988). The VP2 antigen is the immunodominant antigen of IBDV (Vakharia *et al.*, 1994). Segment B encodes VP1 (viral RdRp), which is responsible for viral replication and transcription (von Einem *et al.*, 2004).

Epidemiological research is critical for understanding viral evolution. The genetic typing of VP2 sequences has been widely used as a way to trace the changes in virulence of IBDV isolates (Banda & Villegas, 2004; Hon *et al.*, 2006; Jackwood & Sommer-Wagner, 2007; Sreedevi *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 1997). Some studies have shown that most exchanges of amino acid residues of VP2 occur in the four hydrophilic loops of the viral capsid (Coulibaly *et al.*, 2005). These exchanges indicate that selective pressure for the evolution of IBDV is directly focused on the capsid regions that are immediately exposed to the immune system (Durairaj *et al.*, 2011).

Furthermore, the prediction of viral genealogies can support an epidemiological framework when these data are correlated in a multidisciplinary way using evolutionary approaches, economic statistics, and information about viral isolation (Vidigal *et al.*, 2012). In this work, the epidemiology of viral isolates of IBDV was assessed evolutionarily. First, the selective forces that operated during the diversification of

IBDV were tested. Then, Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) coalescent analyses were used to estimate the evolutionary relationship between viral isolates. Finally, phylogeographical approaches were selected to predict the dispersal of IBDV in a historical and geographical context.

2. Methods

2.1. Viral samples

Twenty-nine samples of bursa of Fabricius were analyzed in this work. These samples were collected in 1997 and 2000-2009, and are derived from the major regions of poultry production in Brazil: 4 samples from Minas Gerais (MG), 11 samples from São Paulo (SP), 8 samples from Paraná (PR), 1 sample from Mato Grosso (MT), and 5 samples from Santa Catarina (SC) (Fig. 1; Table 1).

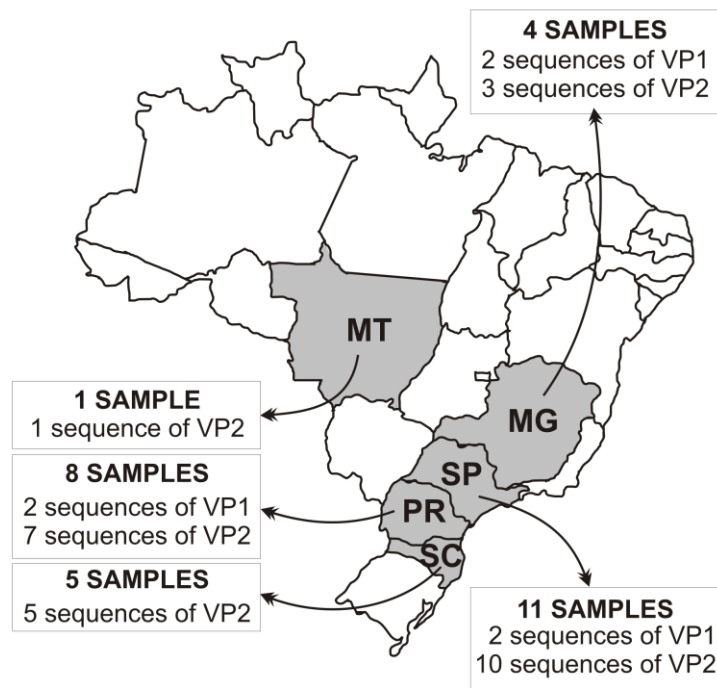


Figure 1. Sampling of the viral isolates of IBDV in Brazil. Brazilian states: MG = Minas Gerais; MT= Mato Grosso; PR = Paraná; SC = Santa Catarina; SP = São Paulo.

2.2. RNA extraction, RT-PCR, and sequencing

Total viral RNA of the samples was extracted from 250 μ L of homogenized bursa tissue using 750 μ L of TRIZOL LS reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. Total RNA was quantified by spectrophotometry (OD260) and stored at -80 °C. Viral cDNA was amplified using the SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. The PCR reaction was performed using 15 μ L of GoTaq Green Master Mix (PROMEGA), 20 pmol of each specific primer, and 2 μ L of the viral cDNA, and the final reaction volume was made up to 30 μ L. A 625 bp VP2 fragment was amplified using the primer pair VP2-F1 (5'-ATGACAAACCTGCAAGATCAAACC-3') and VP2-R1 (5'-TTATGGTGTAGACTCTGGGCCTGT-3'). A 752 bp VP2 fragment was amplified using the primer pair VP2-F2 (5'-AGAGTCTACACCATAACTGCAGCC-3'), and VP2-R2 (5'-CCTCCTTATGGCCCGGAT-3'). The VP1 polymerase was amplified using the primer pairs previously described by Yu *et al.* (2010).

The PCR products were purified from agarose gels and sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, Korea). The contigs of the nucleotide sequences of VP1 and VP2 were assembled using the CAP3 program (Huang & Madan, 1999). The 26 complete coding sequences of VP2 and the 6 of VP1 were submitted to GenBank (Table 1).

2.3. Selecting data for analysis

The complete coding sequences of VP1 (n=63) and VP2 (n=76) from the IBDV isolates were downloaded from the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). The sequences of isolates that originated from adapted cell cultures or were associated with recombination and reassortment events were not considered because these sequences represent breakpoints in genealogies and could bias phylogenetic and phylogeographic analyses. Thus, the final dataset selected contained 69 sequences of VP1 and 102 sequences of VP2, including the sequences of the Brazilian isolates (Tables S1 and S2). The sequences sets were aligned using ClustalW (Thompson *et al.*, 1994).

Table 1. Sequences of the Brazilian isolates of IBDV.

Target	Accession number	Isolate	Area of isolation*	Collection Year	Haplotype code	Phylogenetic group
VP1	JN982245	SP14	SP	2004	H12	VP1-I
VP1	JN982248	SC11	PR	2004	H23	VP1-I
VP1	JN982246	MG1	MG	2009	H21	VP1-I
VP1	JN982247	MG8	MG	2009	H22	VP1-I
VP1	JN982249	SP11	PR	2004	H24	VP1-II
VP1	JN982250	SP6	SP	2004	H25	VP1-II
VP2	JN982253	SP9	PR	2004	Hap29	VP2-II
VP2	JN982251	MG8	MG	2009	Hap19	VP2-II
VP2	JN982252	MG4	MG	2009	Hap29	VP2-II
VP2	JN982258	SP17	SP	1997	Hap34	VP2-I
VP2	JN982266	SP30	SP	2000	Hap34	VP2-I
VP2	JN982257	SP5	SP	2001	Hap33	VP2-II
VP2	JN982263	SC6	SC	2001	Hap34	VP2-I
VP2	JN982259	SP25	SP	2001	Hap34	VP2-I
VP2	JN982260	SP26	SP	2001	Hap34	VP2-I
VP2	JN982261	SP28	SP	2001	Hap34	VP2-I
VP2	JN982254	SC9	SC	2002	Hap1	VP2-I
VP2	JN982268	SC10	SC	2002	Hap34	VP2-I
VP2	JN982256	SP33	SP	2003	Hap24	VP2-I
VP2	JN982264	SP20	PR	2003	Hap34	VP2-I
VP2	JN982265	SP21	PR	2003	Hap34	VP2-I
VP2	JN982255	SP22	SP	2004	Hap11	VP2-I
VP2	JN982262	SP11	PR	2004	Hap34	VP2-I
VP2	JN982269	SC12	MG	2005	Hap34	VP2-I
VP2	JN982267	SC8	SC	2005	Hap34	VP2-I
VP2	JN982273	SC5	PR	2000	Hap34	VP2-II
VP2	JN982276	SP10	SP	2001	Hap34	VP2-II
VP2	JN982270	SP14	SP	2004	Hap18	VP2-II
VP2	JN982271	SC1	MT	2004	Hap20	VP2-II
VP2	JN982274	SP3	PR	2004	Hap34	VP2-II
VP2	JN982275	SP8	PR	2004	Hap34	VP2-II
VP2	JN982272	SC2	SC	2005	Hap20	VP2-II

*Brazilian states: MG = Minas Gerais; MT= Mato Grosso; PR = Paraná; SC = Santa Catarina; SP = São Paulo.

2.4. Recombination analysis

The presence of recombinant viral isolates could mislead the interpretation of IBDV genealogies. Phylogenetic evidence for recombination was tested and recombination breakpoints were predicted using several methods ($p < 0.05$) found in

RDP3 version 3.44 (Martin *et al.*, 2010), including RDP (Martin & Rybicki, 2000), GENECONV (Padidam *et al.*, 1999), Chimaera (Posada & Crandall, 2001), MaxChi (Smith, 1992), 3Seq (Boni *et al.*, 2007), and Bootscan/Recscan (Posada & Crandall, 2001). Only the recombination events predicted by at least three methods were taken as valid, and the recombinant sequences were removed from the dataset in all subsequent analyses.

2.5. Estimation of selection pressures

The selective pressures over the complete coding sequences of VP1 and VP2 were estimated using three different statistical tests of neutrality (Tajima's D, Fu and Li's D, and Fu and Li's F tests) found in DnaSP v5 (Librado and Rozas, 2009). These methods test whether or not the number of segregating sites in the sample significantly departs from the neutral expectation (Fu & Li, 1993; Tajima, 1989).

Next, selective pressures on each codon were evaluated using the difference between non-synonymous (dN) and synonymous (dS) substitution rates per codon using the single-likelihood ancestor counting (SLAC), fixed-effects likelihood (FEL), and internal branches fixed-effects likelihood (IFEL) methods, found in DataMonkey (<http://www.datamonkey.org/>). Values of $dN - dS < 0$, $= 0$, > 0 indicate negative selection, neutral evolution, and positive selection, respectively. Estimates of the difference in substitution rates were made from a phylogenetic tree inferred using the neighbor-joining algorithm with distances corrected under the TIM2 model (substitution code 010232) found in DataMonkey.

2.6. Phylogenetic trees

The phylogenetic hypotheses were inferred by Bayesian inference (BI) using the program MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). In order to expedite the construction of phylogenetic trees, a model of nucleotide substitution was estimated using the program jModeltest (Posada, 2008). This approach provided the parameters to be estimated by the program MrBayes, avoiding excess parameters of the models for estimating the topologies and sizes of branches. The phylogenetic trees were calculated using the Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method in four runs with

20,000,000 generations and a sample frequency of 1000. A total of 25% of the trees generated were burned to produce the two consensus trees (Figs. 2 and 3).

2.7. Clustering definition

The viral isolates of IBDV were clustered based on genotyping methodologies proposed for other virus. Two matrices of pairwise distances (p-distance) were calculated from the VP1 and VP2 aligned sequences, and the isolates were grouped by the neighbor-joining (NJ) method (Figures 2 and 3) using MEGA version 5 (Tamura *et al.*, 2011). The statistical confidence of phylogenetic trees was estimated by 100,000 bootstrap replicates and a p-distance threshold was selected to define the clusters (Figs. 2 and 3).

2.8. Haplotype networks

The 2634 and 1356 nt multiple alignment (excluding sites with gaps) of the VP1 and VP2 sequences contained 813 (30.9%) and 420 (31.0%) polymorphic sites, respectively. This high level of polymorphisms in the sequences of VP1 and VP2 breaks the criteria for network reconstruction proposed by Bandelt *et al.* (1999). Thus, the number of segregating sites in the three codon positions of the VP1 and VP2 sequences was calculated using DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009). The sites of the second codon position were the least polymorphic and were selected. Using these approaches, the number of polymorphic sites was reduced to 109 in 878 nt (12.4%) of VP1 and 68 in 452 nt (15.0%) of VP2. Following this, these sequences were grouped into haplotypes (groups of sequences with 100% identity) using SNAP Workbench v2.0 (Aylor *et al.*, 2006; Price & Carbone, 2005). The infinite sites model of genome evolution (Kimura, 1969) was considered, and the violations to this model were removed (five sites of VP1 and six sites of VP2). The sequences of the IBDV isolates were grouped into 45 haplotypes for VP1 and 39 haplotypes for VP2 (Tables S1 and S2), containing 104 segregating sites in 873 nt (11.9%) of VP1 and 62 segregating sites in 446 nt (13.9%) of VP2. The haplotype networks were calculated using the median-joining algorithm (Bandelt *et al.*, 1999) implemented in the Network 4.5.1.0 program (<http://www.fluxus-technology.com>).

3. Results

3.1. Recombination analysis

Significant recombination events were only detected in the analysis of VP1 sequences: event 1: isolate DQ679813 (Turkey, vvIBDV) as a recombinant of D49707 (Japan, vvIBDV) and DQ679812 (Turkey, vvIBDV) ($p = 1.158 \times 10^{-6}$); event 2: isolate EF517529 (China, vvIBDV) as a recombinant of GQ452269 (China, vvIBDV) and AY598355 (Singapore, vvIBDV) ($p = 2.538 \times 10^{-41}$).

3.2. Estimation of selection pressures

In the tests of neutrality (Table S3) no significance was found in the analysis of the VP1 sequences, thus the evolution of this ORF possibly followed the model of neutrality. On the other hand, the statistical significance found in the analysis of VP2 suggests that the evolution of this ORF possibly occurred under the influence of selection. The high negative values of the coefficients of the tests also suggest that purifying selection took place (Table S3).

In the analysis of the selective pressures on codons (Table 2), the results suggest that negative selection, or purifying selection, was the main evolutionary force operating during the evolutionary diversification of IBDV. Codons that were under purifying selection were found scattered along the ORFs, thus suggesting that full proteins, rather than particular domains, were under a greater purifying force (Table 2).

The global values of dN/dS provide a method of assessing the adaptive evolutionary pressures that act on a gene (Kimura, 1983). A dN/dS value of close to 0 means that a protein is essentially conserved at the amino acid level (purifying or negative selection imposed by functional constraints). Approximately 25% of the VP1 codons appeared to be evolving under purifying selection, with a global dN/dS estimate of 0.075, indicating strong purifying selection (Table 2). In the analysis of VP2, 12% of the codons seemed to be evolving under purifying selection with a global estimate of dN/dS of 0.160. These observations suggest that this protein also evolved under purifying selection, but with fewer restrictions than those imposed for VP1.

Table 2. Codon selection pressures on the sequences of VP1 and VP2.

Protein sequences	dN/dS	Neutral sites*	Positives selected sites*	Codon	Negatives selected sites*	Codon
VP1	0,075	654(74.5%)	1(0.1%)	141	223(25.4%)	14, 18, 20, 22, 23, 26, 34, 35, 39, 44, 47, 52, 53, 60, 62, 64, 68, 69, 77, 86, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 102, 108, 116, 125, 128, 129, 130, 135, 139, 148, 149, 151, 152, 154, 155, 156, 158, 159, 160, 162, 165, 167, 171, 173, 175, 177, 178, 180, 182, 187, 188, 190, 194, 198, 201, 203, 205, 211, 212, 220, 223, 224, 237, 246, 247, 250, 269, 270, 272, 275, 276, 277, 282, 283, 291, 298, 307, 310, 319, 320, 323, 325, 329, 331, 333, 335, 342, 343, 349, 351, 358, 370, 374, 379, 380, 382, 385, 386, 398, 401, 409, 420, 421, 422, 425, 426, 431, 432, 435, 436, 437, 438, 440, 442, 447, 449, 454, 455, 462, 466, 468, 469, 470, 477, 479, 489, 496, 498, 499, 510, 514, 528, 533, 536, 537, 541, 555, 556, 560, 572, 574, 575, 586, 587, 596, 597, 602, 603, 605, 609, 610, 611, 620, 623, 647, 660, 667, 669, 671, 673, 674, 675, 680, 684, 687, 692, 693, 697, 699, 700, 701, 708, 710, 712, 713, 715, 720, 724, 726, 727, 733, 734, 739, 745, 746, 748, 749, 750, 753, 760, 762, 763, 770, 772, 775, 776, 784, 785, 789, 790, 803, 804, 806, 807, 808, 812, 813, 815, 816, 817, 826, 857, 865, 872, 873, 874
VP2	0,160	396(87.6%)	3(0.7%)	222, 294, 320	53(11.7%)	2, 62, 93, 95, 121, 135, 145, 148, 157, 159, 162, 164, 165, 168, 179, 185, 186, 195, 207, 209, 211, 215, 226, 228, 232, 233, 237, 239, 248, 259, 273, 274, 288, 293, 299, 313, 319, 328, 336, 338, 342, 348, 361, 366, 369, 378, 387, 409, 412, 413, 420, 442, 448

*Statistical significance of tests: $p < 0.05$.

A value of dN/dS >1 means that non-synonymous mutations offer fitness advantages to a protein and have higher fixation probabilities than synonymous mutations (diversifying or positive selection). In VP1, only the site of codon 141 (Val→Leu, Val→Ile) ($p = 0.040$) was identified as being influenced by positive selection. In VP2, the sites of codons 222 (Ala→Pro, Pro→Ser, Pro→Thr, Pro→Gln) ($p = 0.006$), 294 (Ile→Leu, Leu→Ile) ($p = 0.026$) and 320 (Gln→Val, Gln→Lys) ($p = 0.049$) were identified as being influenced by positive selection. These three codons are located in the VP2 hypervariable region, attended by the major neutralizing epitopes of IBDV (Etteradossi *et al.*, 1997; Vakharia *et al.*, 1994).

3.3. Phylogenetic trees

In the VP1 phylogenetic tree (Fig. 2), the isolates were grouped into three main clusters called VP1-I to III. These clusters are supported by high values of posterior probabilities and were proposed by the genotyping methodology. A pairwise-distance threshold value of 0.08 was selected to cluster the viral isolates, considering the NJ phylogenetic tree and the histogram with mismatches distribution (Fig. 2). Thus, the viral isolates of each cluster presents sequences of VP1 with identities greater than 92%. The VP1-I group contained the isolates that were characterized as being classic (cvIBDV) and antigenic variants (avIBDV). The VP1-II and VP1- III groups contained the isolates that were characterized as being very virulent (vvIBDV).

In the VP2 phylogenetic hypothesis (Fig. 3) the isolates were also grouped into three clusters called VP2-I to III. VP2-I contained the isolates characterized as being very virulent variants (vvIBDV) and VP2-II contained the classic (cvIBDV) and antigenic variants (avIBDV). The only representative of VP2-III (GenBank ID: X03993) is a classic (cvIBDV) viral isolate identified in 1986. These three clusters are supported by high value of posterior probabilities. In genotyping, the VP2-I cluster were separated from VP2-II by a p-distance threshold of 0.025. Thus, the identities between sequences of VP2-I isolates is greater than 97.5%. The isolate of VP2-III, in turn, is separated from VP2-I and II isolates by a p-distance of 0.065.

The geographical distribution of isolates of VP1-I to III and VP2-I to III clusters is summarized in Table 3. In Brazil, the six VP1 sequences were grouped in both clusters VP1-I (4) and VP1-II (2) (Fig. 2); in the analysis of VP2 (Fig. 3), the 26 sequences were grouped into VP2-I (15) and VP2-II (11). Thus, 15 of 26 Brazilian isolates are probably vvIBDV (Table 3).

3.4. Phylogeographic analysis

In the haplotype networks (Figs. 4a and 4b) the sequences of VP1 and VP2 were grouped into haplotypes and identified according to their geographical origin. These haplotypes represent groups of viral sequences that are closely related in evolutionary terms. The haplotype network represents an alternative view of the genealogical relationships between viral isolates and allows a more practical discussion on the epidemiology of these isolates (Vidigal *et al.*, 2012). In the haplotype network, the central haplotypes represent the possible ancestors.

The isolates of VP1-I and VP1-II clusters have been identified in Asia, Africa, South America and Europe (Table 3). The isolates of VP1-III cluster have been only identified in Asia. In North America and the Caribbean, only VP1-I isolates were identified. In Oceania, only VP1-II isolates were identified. These three main lineages observed in the phylogenetic tree could also be distinguished in the haplotype network (Fig. 4a). Of the 45 haplotypes of VP1, only 5 haplotypes (11.1%) (H1, H2, H12, H14 and H30) grouped isolates that originated from different countries and were possibly related to spreading events of the virus.

In the VP1-I cluster, the H1 haplotype (n=13, 19.1%) was found to be the most widespread, being identified in seven countries in Asia, Africa, Europe, and North America. However, the haplotype H14 is possibly the main ancestral lineage from which the other isolates of VP1-I originated. In the VP1-II cluster, the H2 haplotype (n=6, 8.8%) was found to be the most widespread and is possibly the main ancestral lineage from which the other isolates of this group originated. The H2 haplotype was identified in five countries in Asia, Africa, Europe and Oceania. In the VP1-III cluster, the H38 haplotype (n=1, 1.5%) is possibly the main ancestral lineage from which the other isolates of this group originated. The H38 haplotype was only identified in Asia.

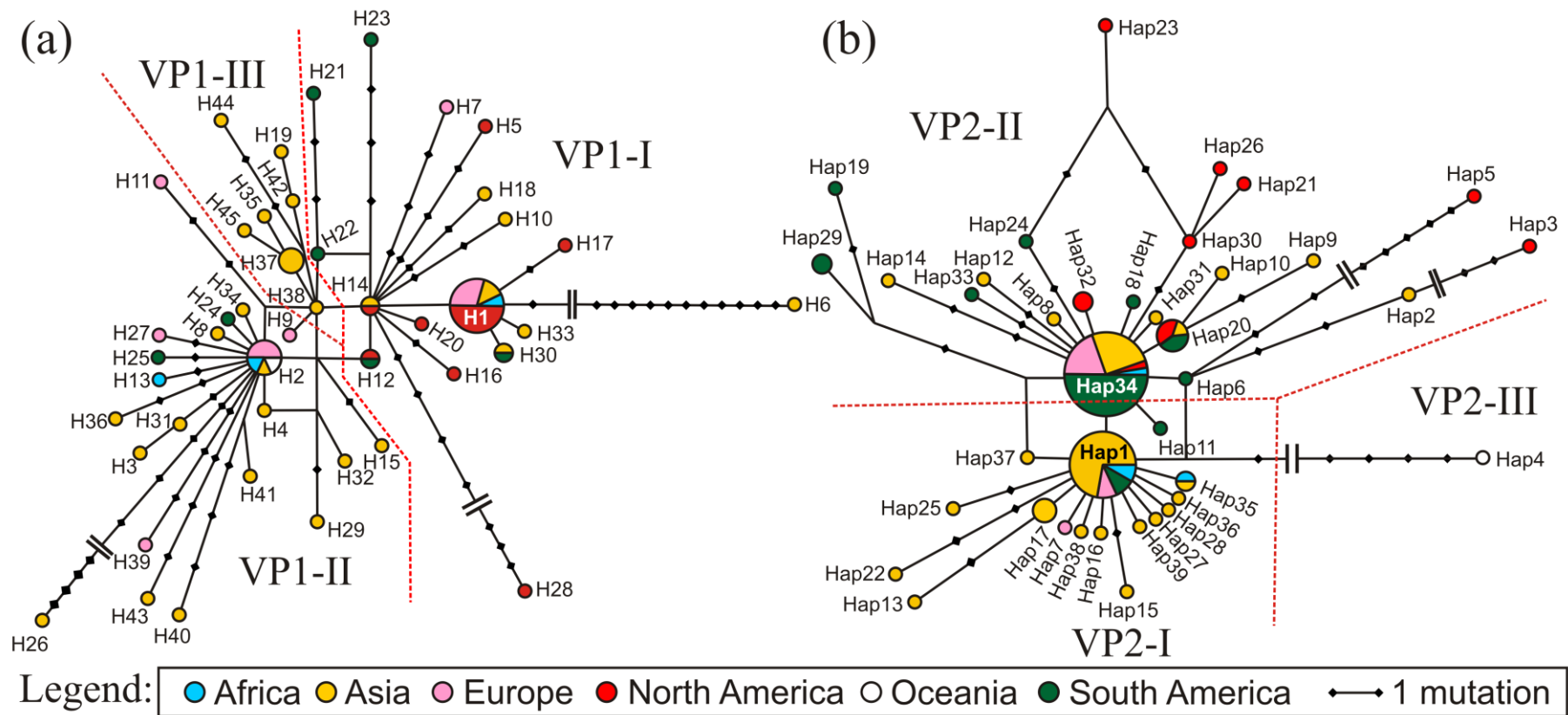


Figure 4. Haplotype networks of (a) VP1 and (b) VP2 sequences. Median-joining (MJ) network of all haplotypes built using the Network 4.5.1.0 program. The size of each circumference is proportional to the haplotype frequency and the size of each branch is proportional to the number of mutations between the haplotypes. The red discontinuous line in haplotype networks marks the separation of the VP1 and VP2- phylogenetic clusters.

Table 3. Summary of the phylogenetic clustering of the sequences of VP1 and VP2.

Geographic Region	Country	VP1-I	VP1-II	VP1-III	VP2-I	VP2-II	VP2-III	Total/ Country
Africa	Egypt	-	-	-	-	1	-	1
	Nigeria	-	1	-	1	-	-	2
	Tanzania	-	1	-	1	-	-	2
	Zambia	1	-	-	1	-	-	2
Asia	Bangladesh	-	1	-	1	-	-	2
	China	7	3	9	9	9	-	37
	India	-	-	-	-	2	-	2
	Iran	-	-	-	2	-	-	2
	Israel	1	3	-	-	-	-	4
	Japan	1	1	-	3	1	-	6
	Malaysia	-	2	-	2	-	-	4
	Singapore	-	-	1	-	-	-	1
	South Korea	-	-	-	3	-	-	3
	Taiwan	2	-	-	-	1	-	3
	Turkey	-	1	-	-	-	-	1
	Vietnam	-	-	-	10	3	-	13
	Caribbean	Cuba	1	-	-	-	1	-
Europe	Croatia	1	2	-	1	1	-	5
	France	-	1	-	-	1	-	2
	Germany	4	-	-	-	3	-	7
	Luxemburg	1	-	-	-	1	-	2
	Netherlands	-	2	-	1	-	-	3
	United Kingdom	-	1	-	1	1	-	3
North America	Canada	1	-	-	-	-	-	1
	USA	12	-	-	-	11	-	23
Oceania	Australia	-	1	-	-	-	1	2
South America	Brazil	4	2	-	16	12	-	34
	Venezuela	-	-	-	1	-	-	1
Total/ Cluster		36	22	10	53	48	1	170

The strains of clusters VP2-I and VP2-II were identified in Asia, Africa, South America and Europe (Table 3). In North America and Caribbean only VP2-II isolates were identified, whereas in the Oceania only VP2-III isolate was identified. These clusters are also distinguished in haplotype network (Fig. 4b). The Hap1 (n=21, 20.6%) and Hap34 (n=35, 34.3%) haplotypes were the most frequent and widespread throughout the countries. Haplotype Hap34 represents the main ancestral lineage from which all of the other classic (cvIBDV), virulent (vvIBDV), and variant (avIBDV) isolates originated. In turn, the Hap1 haplotype was found to be the main ancestor of the very virulent (vvIBDV) isolates that were included in VP2-I. Haplotype Hap34 was identified in 11 countries in Asia, Africa, South America, Europe, and North America.

The Hap1 haplotype was identified in 12 countries of these continents, except for North America.

The haplotype networks also revealed the possibility of multiples events of introduction of IBDV in Brazil (Fig. 4). The VP1 sequences of the Brazilian isolates were found in six different haplotypes (H12 and H21-H25) and their possible ancestors were H2, H14 and H38 haplotypes (Fig. 4a). The 26 VP2 sequences were found in nine haplotypes (Table 1). Haplotype Hap34 was also the most frequently found haplotype in Brazil ($n = 16$, 61.5%), and the other haplotypes are their possible descendants. In addition to haplotype Hap34, the Hap20 and Hap1 haplotypes were identified in Brazil and are among the haplotypes that grouped the isolates originating from different countries (Fig. 4b).

4. Discussion

The results of this work provide important insights into the epidemiology of IBDV through an assessment of the genetic diversity of and selective pressures on viral isolates and through the prediction of dispersal routes using phylogeographic approaches.

As an indicator of the action of natural selection in gene sequences, the dN/dS ratio is versatile and widely used and provides an estimate of selective pressure at the protein level (Kimura, 1983). The results of the dN/dS ratio analysis suggest that purifying selection was the main evolutionary force operating during the evolutionary diversification of IBDV (Table 2). As expected, VP1 is subjected to strong restrictions and, therefore, seems unable to tolerate high levels of sequence variation given its critical role in viral replication and transcription (von Einem *et al.*, 2004). The differences between the results of the neutrality test and the substitution rate analysis for the VP1 sequences may have been due to the different parameters used in these approaches. The tests of neutrality were mainly based on the differences between the number of segregating sites and the average number of differences between pairs of sequences (Tajima, 1989), unlike the other analyses that were based on the difference between non-synonymous (dN) and synonymous (dS) substitution rates per codon.

The VP2 protein is also subjected to restrictions once the contact points between the single VP2 molecules become important for the stability of the VP2 homotrimer, the unit that forms the viral capsid (Coulibaly *et al.*, 2005; Letzel *et al.*, 2007). The amino

acids involved in changes of virulence, and which are more susceptible to exchange, do not participate in any of the important contacts in the interactions between the subunits that stabilize the virion, which indicates that the main amino acids involved in this interaction are less susceptible to exchange (Coulibaly *et al.*, 2005) and are possibly under purifying selection.

Positively selected codons were only identified in one and three sites in VP1 and VP2 ($p < 0.05$), respectively. Codon 141 of VP1 is located in the N-terminal domain of the protein, which interacts with the central domain to keep the polymerase active site of VP1 in a closed conformation (Pan *et al.*, 2007). Codons 222 and 320 of VP2 are located in hydrophilic loops P_{BC} and P_{HI}, respectively, which are two regions of high antigenic activity that are critical for virus neutralization (Lee *et al.*, 2006; Letzel *et al.*, 2007). A prominent feature of many viruses is that they contain positively selected sites in their region of neutralizing epitopes, since these regions are under strong selection by the host immune system (Durairaj *et al.*, 2011; Suzuki, 2004). Codon 294 is located near the hydrophilic loop of VP2 P_{FG}, a region that plays important roles in viral infectivity and pathogenicity (Lee *et al.*, 2006).

Homologous recombination might also play a role in shaping the adaptive evolution of IBDV (He *et al.*, 2009; Hon *et al.*, 2008). Two unique recombination events were detected in the VP1 sequences by at least four of the six statistical methods found in RDP3. The sequences of recombinant VP1 were isolated in Asian countries and their possible parental sequences of vvIBDV were also isolated on the same continent. A small number of recombination events was also found in other studies of IBDV recombination (He *et al.*, 2009; Hon *et al.*, 2008), suggesting a low frequency of recent homologous recombination between the strains of IBDV.

The analysis of VP1 and VP2 sequences has been widely used as a means of tracing the spread of IBDV and changes in virulence. For the VP1 phylogenetic hypothesis the isolates were grouped into three main clusters (VP1-I to III). Eight polymorphic sites were found to be different between VP1 clusters but were conserved within them. The amino acid residues 4I, 61V, 145N, 287T, 508R, 511R, 646G, and 687S were characteristic of VP1-I, while 4V, 61I, 145T, 287A, 508K, 511S, 646S, and 687P were characteristic to VP1-II and VP1-III (Fig. 2). Most of the amino acid residues that are characteristic of VP1-II and III were identified in the vvIBDV isolates and it was speculated that they may increase virulence by enhancing VP1 activity (Yamaguchi *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2010).

Equally to VP1, the VP2 phylogenetic hypothesis grouped the isolates into three clusters (VP2-I to III). A comparison of the polymorphic sites of VP2 clusters revealed seven (P222A, V242I, V256I, T270A, N279D, L294I, N299S) new amino acid changes at specific sites that could be responsible for enhanced virulence since they differed between VP2-I (vvIBDV), and VP2-II and III (cvIBDV and avIBDV) (Fig. 3). Four residue variations (P222A, V256I, L294I, and N299S) found between the VP2 clusters were previously observed and thought to be possible determinants of virulence (Islam *et al.*, 2001; Jackwood & Sommer-Wagner, 2011; Le Nouen *et al.*, 2006).

Three Brazilian isolates of IBDV (MG8, SP11 and SP14) had both VP1 and VP2 sequences. In the analysis of VP1, the isolates MG8 (JN982247) and SP14 (JN982245) were found in the VP1-I cluster and isolate SP11 (JN982249) was found in the VP1-II cluster. In the analysis of VP2, the isolate SP11 (JN982262) was found in the VP2-I cluster, and MG8 (JN982251) and SP14 (JN982270) in the VP2-II cluster. These observations suggest that the VP2-II (cvIBDV and avIBDV) cluster represent a possible diversification of the VP1-I viral lineage. In turn, the VP2-I (vvIBDV) cluster is possibly a diversification of the VP1-II viral lineage. Therefore, we suggest the importance of sequencing both VP1 and VP2 of the IBDV isolates and of correlating the phylogenetic hypotheses to better understand the evolution of the pathogenicity of this virus.

The phylogeographic analysis showed that IBDV isolates are widespread throughout the geographic regions analyzed (Fig. 4). However, the analysis of VP1 (Figs. 2 and 4a) showed that only the VP1-I viral lineage has been identified in North America and only the VP1-II lineage has been identified in Oceania. In order to establish an epidemiological context in the phylogeographic analyses, we focused on and considered all information about VP2 sequences that was available in GenBank, including papers published on viral isolation, and the live poultry trading statistics available on the United Nations Commodity Trade Statistics Database DESA/UNSD, UN Comtrade (<http://comtrade.un.org/>; accessed on November 1, 2011), following the approaches suggested by Vidigal *et al.* (2012). Considering the lack of information regarding the sequences of VP1, only the isolates with available VP2 sequences were analyzed in this context.

Haplotype Hap34 was first identified in the United Kingdom in 1970 (Bygrave & Faragher, 1970) and later in an outbreak in Germany in 1975 (Genbank), and is therefore the oldest haplotype and possibly the ancestor of all of the VP2 sequences

analyzed (Fig. 4b). In Brazil, haplotype Hap34 was first identified in 1983, then in 1997, and again between 2000 and 2005. This haplotype has the longest circulation time in the country, and is also the most frequently found and most widespread haplotype in poultry. According to the statistics available at the UN Comtrade, the United Kingdom is the main exporter of live poultry to Brazil and is one of the countries with the longest history of commerce, with business transactions recorded between the years 1989-2009. Thus, it is possible that one of the first sources of the Hap34 haplotype in Brazil originated from imports of British poultry.

In turn, the Hap1 haplotype was first identified in the Netherlands in 1989 and is widespread among Asian countries. This haplotype was identified in Brazil in 2002. According to the UN Comtrade, the poultry trade between Brazil and the Netherlands moved about \$64,000 between the years 1992 and 1997, but no records of poultry trade between Brazil and Asian countries. Thus, it is possible that one source of the spread of the Hap1 haplotype in Brazil originated from Dutch poultry imports. Finally, the Hap20 haplotype was identified in the USA, Vietnam and Brazil in the 2000s. This haplotype was probably introduced into Brazil through the importation of subclinically infected North American animals, since the USA is the main origin of imports of poultry into Brazil (totaling \$992.9 million between 1990 and 2002).

In conclusion, we have shown, for the first time, that the evolutionary process in IBDV is shaped by a combination of very low recombination rates and relatively low rates of nucleotide substitution, which itself is a function of purifying selection operating on VP1 and VP2. In addition, the results of the phylogeographic analysis of VP2 suggests that IBDV isolates were introduced into Brazil by at least three events of viral introduction, which probably occurred through the importation of subclinically infected animals, reinforcing the importance of establishing effective sanitary barriers on trade in live poultry.

5. Acknowledgements

The authors would like to thank Maria Judite Bittencourt and Isabela Cristina Simoni from Instituto Biológico (www.biologico.sp.gov.br), and Iara Maria Trevisol from Embrapa Suínos e Aves for kindly providing some of the viral samples. This research was supported by the Brazilian Government Agencies CNPq (Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais).

6. References

- Aylor, D. L., Price, E. W. & Carbone, I. (2006). SNAP: Combine and Map modules for multilocus population genetic analysis. *Bioinformatics* 22, 1399-1401.
- Banda, A. & Villegas, P. (2004). Genetic characterization of very virulent infectious bursal disease viruses from Latin America. *Avian Dis* 48, 540-549.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Rohl, A., (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16, 37-48.
- Boni, M. F., Posada, D. & Feldman, M. W. (2007). An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* 176, 1035-1047.
- Bygrave, A. C. & Faragher, J. T. (1970). Mortality associated with Gumboro disease. *Veterinary Record* 86, 758-759.
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas, B. & Rey, F. A. (2005). The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell* 120, 761-772.
- Denison, M. R., Graham, R. L., Donaldson, E. F., Eckerle, L. D. & Baric, R. S. (2011). Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biol* 8, 270-279.
- Dobos, P., Hill, B. J., Hallett, R., Kells, D. T., Becht, H. & Teninges, D. (1979). Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol* 32, 593-605.
- Domingo, E. & Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 51, 151-178.
- Durairaj, V., Sellers, H. S., Linnemann, E. G., Icard, A. H. & Mundt, E. (2011). Investigation of the antigenic evolution of field isolates using the reverse genetics system of infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch Virol* 156, 1717-1728.
- Eterradossi, N., Toquin, D., Rivallan, G. & Guittet, M. (1997). Modified activity of a VP2-located neutralizing epitope on various vaccine, pathogenic and hypervirulent strains of infectious bursal disease virus. *Arch Virol* 142, 255-270.

- Fu, Y. X. & Li, W. H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133, 693-709.
- He, C. Q., Ma, L. Y., Wang, D., Li, G. R. & Ding, N. Z. (2009). Homologous recombination is apparent in infectious bursal disease virus. *Virology* 384, 51-58.
- Hon, C. C., Lam, T. Y., Drummond, A., Rambaut, A., Lee, Y. F., Yip, C. W., Zeng, F., Lam, P. Y., Ng, P. T. & Leung, F. C. (2006). Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent infectious bursal disease virus and reassortment of its genome segment B. *J Virol* 80, 8503-8509.
- Hon, C. C., Lam, T. T., Yip, C. W., Wong, R. T., Shi, M., Jiang, J., Zeng, F. & Leung, F. C. (2008). Phylogenetic evidence for homologous recombination within the family Birnaviridae. *J Gen Virol* 89, 3156-3164.
- Huang, X. & Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9, 868-877.
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754-755.
- Islam, M. R., Zierenberg, K., Eterradossi, N., Toquin, D., Rivallan, G. & Muller, H. (2001). Molecular and antigenic characterization of Bangladeshi isolates of infectious bursal disease virus demonstrate their similarities with recent European, Asian and African very virulent strains. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48, 211-221.
- Jackwood, D. J. & Sommer-Wagner, S. (2007). Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virology* 365, 369-375.
- Jackwood, D. J. & Sommer-Wagner, S. E. (2011). Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease Birnavirus (IBDV). *Virology* 409, 33-37.
- Kibenge, F. S., Dhillon, A. S. & Russell, R. G. (1988). Identification of serotype II infectious bursal disease virus proteins. *Avian Pathol* 17, 679-687.
- Kimura, M. (1969). The rate of molecular evolution considered from the standpoint of population genetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63, 1181-1188.
- Kimura, M. (1983). *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

- Le Nouen, C., Rivallan, G., Toquin, D., Darlu, P., Morin, Y., Beven, V., de Boissezon, C., Cazaban, C., Comte, S., Gardin, Y. and other authors (2006). Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. *J Gen Virol* 87, 209-216.
- Lee, C. C., Ko, T. P., Chou, C. C., Yoshimura, M., Doong, S. R., Wang, M. Y. & Wang, A.H. (2006). Crystal structure of infectious bursal disease virus VP2 subviral particle at 2.6Å resolution: implications in virion assembly and immunogenicity. *J Struct Biol* 155, 74-86.
- Letzel, T., Coulibaly, F., Rey, F. A., Delmas, B., Jagt, E., van Loon, A. A. & Mundt, E. (2007). Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *J Virol* 81, 12827-12835.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Martin, D. & Rybicki, E. (2000). RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16, 562-563.
- Martin, D. P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D. & Lefevre, P. (2010). RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26, 2462-2463.
- Moya, A., Elena, S. F., Bracho, A., Miralles, R. & Barrio, E. (2000). The evolution of RNA viruses: A population genetics view. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6967-6973.
- Padidam, M., Sawyer, S. & Fauquet, C. M. (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265, 218-225.
- Pan, J., Vakharia, V.N. & Tao, Y.J. (2007). The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7385-7390.
- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25, 1253-1256.
- Posada, D. & Crandall, K.A. (2001). Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13757-13762.
- Price, E. W. & Carbone, I. (2005). SNAP: workbench management tool for evolutionary population genetic analysis. *Bioinformatics* 21, 402-404.

- Qi, X., Gao, H., Gao, Y., Qin, L., Wang, Y., Gao, L. & Wang, X. (2009). Naturally occurring mutations at residues 253 and 284 in VP2 contribute to the cell tropism and virulence of very virulent infectious bursal disease virus. *Antiviral Res* 84, 225-233.
- Smith, J. M. (1992). Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* 34, 126-129.
- Sreedevi, B., LeFever, L. J., Sommer-Wagner, S. E. & Jackwood, D. J. (2007). Characterization of infectious bursal disease viruses from four layer flocks in the United States. *Avian Dis* 51, 845-850.
- Suzuki, Y. (2004). Negative selection on neutralization epitopes of poliovirus surface proteins: implications for prediction of candidate epitopes for immunization. *Gene* 328, 127-133.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.
- Vakharia, V. N., He, J., Ahamed, B. & Snyder, D. B. (1994). Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res* 31, 265-273.
- Vidigal, P. M. P., Mafra, C. L., Silva, F. M. F., Fietto, J. L. R., Jr, A. S. & Almeida, M. R. (2012). Tripping over emerging pathogens around the world: a phylogeographical approach for determining the epidemiology of Porcine circovirus-2 (PCV-2), considering global trading. *Virus Research* 163, 320-327.
- von Einem, U. I., Gorbalenya, A. E., Schirrmeier, H., Behrens, S. E., Letzel, T. & Mundt, E. (2004). VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* 85, 2221-2229.
- Yamaguchi, T., Ogawa, M., Miyoshi, M., Inoshima, Y., Fukushi, H. & Hirai, K. (1997). Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus. *Arch Virol* 142, 1441-1458.
- Yu, F., Qi, X., Yuwen, Y., Wang, Y., Gao, H., Gao, Y., Qin, L. & Wang, X. (2010). Molecular characteristics of segment B of seven very virulent infectious bursal disease viruses isolated in China. *Virus Genes* 41, 246-249.

Supplementary material

Table S1. Phylogenetic clustering of the VP1 sequences.

Phylogenetic cluster	Haplotype code	Haplotype Frequency	Accession code	Country	Collection Year	Submission Year
VP1-I	H1	13	AB368969	Zambia	2004	2007
VP1-I	H1	13	AF083092	Israel	-	1998
VP1-I	H1	13	AF362772	Germany	-	1994
VP1-I	H1	13	AF362775	Germany	-	2001
VP1-I	H1	13	AF499930	Luxembourg	-	2002
VP1-I	H1	13	DQ403249	China	-	2006
VP1-I	H1	13	EU162090	USA	-	2007
VP1-I	H1	13	EU162091	USA	-	2007
VP1-I	H1	13	EU162092	USA	-	2007
VP1-I	H1	13	EU162093	USA	-	2007
VP1-I	H1	13	EU162094	USA	-	2007
VP1-I	H1	13	EU162095	USA	-	2007
VP1-I	H1	13	EU184690	Croatia	-	1998
VP1-II	H2	6	AB368971	Tanzania	2002	2007
VP1-II	H2	6	AF240687	Netherlands	-	2000
VP1-II	H2	6	AF322445	Australia	-	2000
VP1-II	H2	6	DQ927043	Israel	-	2006
VP1-II	H2	6	EU184686	Croatia	2002	2007
VP1-II	H2	6	EU184688	Croatia	2000	2007
VP1-II	H3	1	AF083094	Israel	-	1998
VP1-II	H4	1	AF092944	China	-	1998
VP1-I	H5	1	AF133905	USA	-	1999
VP1-I	H6	1	AF203880	China	-	1999
VP1-I	H7	1	AF362748	Germany	1975	2001
VP1-II	H8	1	AF362770	Bangladesh	-	1999
VP1-I	H9	1	AF362774	Germany	-	1994
VP1-I	H10	1	AF493979	China	1997	2002
VP1-II	H11	1	AM111354	France	-	2005
VP1-I	H12	2	AY029165	USA	-	2001
VP1-I	H12	2	JN982245*	Brazil	2004	2011
VP1-II	H13	1	AY099457	Nigeria	-	2002
VP1-I	H14	2	AY103464	China	1997	2002
VP1-I	H14	2	AY918949	USA	-	2005
VP1-I	H15	1	AY134875	China	-	2002
VP1-I	H16	1	AY368654	USA	-	2003

VP1-I	H17	1	AY459321	USA	-	2003
VP1-I	H18	1	AY654284	China	-	2004
VP1-III	H19	1	AY705393	China	-	2004
VP1-I	H20	1	AY918947	USA	-	2005
VP1-I	H21	1	JN982246*	Brazil	2009	2011
VP1-I	H22	1	JN982247*	Brazil	2009	2011
VP1-I	H23	1	JN982248*	Brazil	2004	2011
VP1-II	H24	1	JN982249*	Brazil	2004	2011
VP1-II	H25	1	JN982250*	Brazil	2004	2011
VP1-II	H26	1	D49707	Japan	-	1995
VP1-II	H27	1	DQ679811	Netherlands	-	2006
VP1-I	H28	1	U62661	Canada	-	1996
VP1-I	H29	1	DQ679814	Taiwan	-	2006
VP1-I	H30	2	DQ906922	China	-	2006
VP1-I	H30	2	EF688065	Cuba	-	1999
VP1-II	H31	1	DQ927041	Israel	-	2006
VP1-I	H32	1	EF576658	Taiwan	-	2006
VP1-I	H33	1	EF646854	Japan	-	2007
VP1-II	H34	1	EU595673	China	-	2008
VP1-III	H35	1	FJ040159	China	-	2008
VP1-II	H36	1	GQ166971	China	2008	2009
VP1-III	H37	4	GQ449689	China	-	2009
VP1-III	H37	4	GQ449691	China	-	2009
VP1-III	H37	4	GQ449692	China	-	2009
VP1-III	H37	4	GQ451331	China	2005	2009
VP1-III	H38	1	GQ449690	China	-	2009
VP1-II	H39	1	NC_004179	United Kingdom	-	1995
VP1-II	H40	1	AF527038	Malaysia	-	2002
VP1-II	H41	1	AF527040	Malaysia	-	2002
VP1-III	H42	1	AY598355	Singapore	1996	2004
VP1-II	H43	1	DQ679812	Turkey	-	2006
VP1-III	H44	1	EF517529	China	-	2007
VP1-III	H45	1	GQ452269	China	-	2009

The accession codes marked with an asterisk (*) correspond to IBDV isolates sequenced in this work.

Table S2. Phylogenetic clustering of the VP2 sequences.

Phylogenetic cluster	Haplotype code	Haplotype Frequency	Accession code	Country	Collection Year	Submission Year
VP2-I	Hap1	21	AB024076	Japan	-	1999
VP2-I	Hap1	21	AB368968	Zambia	2004	2007
VP2-I	Hap1	21	AF240686	Netherlands	1989	2000
VP2-I	Hap1	21	AF281651	China	-	2000
VP2-I	Hap1	21	AF508176	South Korea	-	2002
VP2-I	Hap1	21	AF508177	South Korea	-	2002
VP2-I	Hap1	21	AF533670	South Korea	1992	2002
VP2-I	Hap1	21	AJ318896	United Kingdom	-	2001
VP2-I	Hap1	21	AJ879932	Venezuela	2002	2005
VP2-I	Hap1	21	AY099456	Nigeria	-	2002
VP2-I	Hap1	21	AY323952	Iran	-	2003
VP2-I	Hap1	21	AY598356	China	1996	2004
VP2-I	Hap1	21	D49706	Japan	-	1995
VP2-I	Hap1	21	DQ355815	Vietnam	-	2006
VP2-I	Hap1	21	DQ355816	Vietnam	-	2006
VP2-I	Hap1	21	DQ355818	Vietnam	-	2006
VP2-I	Hap1	21	EF517528	China	-	2001
VP2-I	Hap1	21	EU595667	China	-	2008
VP2-I	Hap1	21	FJ842499	Vietnam	2003	2009
VP2-I	Hap1	21	GQ166972	China	-	2009
VP2-I	Hap1	21	JN982254*	Brazil	2002	2011
VP2-II	Hap2	1	AF109154	Taiwan	-	1998
VP2-II	Hap3	1	AY918948	USA	-	2005
VP2-III	Hap4	1	X03993	Australia	-	1986
VP2-II	Hap5	1	AY918950	USA	-	2005
VP2-II	Hap6	1	AF140705	Cuba	-	1998
VP2-I	Hap7	1	EU184687	Croatia	2000	2008
VP2-II	Hap8	1	AF321056	China	2000	2000
VP2-II	Hap9	1	AF006701	China	-	1997
VP2-II	Hap10	1	FJ842492	Vietnam	2005	2009
VP2-I	Hap11	1	JN982255*	Brazil	2004	2011
VP2-II	Hap12	1	AJ621158	India	-	2004
VP2-I	Hap13	1	FJ842495	Vietnam	2002	2009
VP2-II	Hap14	1	EF646853	Japan	-	2007
VP2-I	Hap15	1	FJ695138	China	2007	2009
VP2-I	Hap16	1	FJ824672	China	2007	2009
VP2-I	Hap17	3	DQ778035	Vietnam	-	2006

VP2-I	Hap17	3	FJ842491	Vietnam	1987	2009
VP2-I	Hap17	3	FJ842493	Vietnam	2003	2009
VP2-II	Hap18	1	JN982270*	Brazil	2004	2011
VP2-II	Hap19	1	JN982251*	Brazil	2009	2011
VP2-II	Hap20	5	DQ355819	USA	-	2006
VP2-II	Hap20	5	DQ355820	USA	-	2006
VP2-II	Hap20	5	FJ842497	Vietnam	2002	2009
VP2-II	Hap20	5	JN982271*	Brazil	2005	2011
VP2-II	Hap20	5	JN982272*	Brazil	2005	2011
VP2-II	Hap21	1	M64285	USA	1985	1992
VP2-I	Hap22	1	DQ355817	Vietnam	-	2006
VP2-II	Hap23	1	AY462027	USA	-	2003
VP2-I	Hap24	1	JN982256*	Brazil	2003	2011
VP2-I	Hap25	1	D83985	Japan	-	1996
VP2-II	Hap26	1	AF133904	USA	-	1999
VP2-I	Hap27	1	AY134874	China	-	2002
VP2-I	Hap28	1	AF527039	Malaysia	-	2002
VP2-II	Hap29	2	JN982252*	Brazil	2009	2011
VP2-II	Hap29	2	JN982253*	Brazil	2004	2011
VP2-II	Hap30	1	X54858	USA	-	1990
VP2-II	Hap31	1	AF321054	China	1997	2000
VP2-II	Hap32	2	AY368653	USA	-	2003
VP2-II	Hap32	2	M97346	USA	-	1994
VP2-II	Hap33	1	JN982257*	Brazil	2001	2011
VP2-II	Hap34	35	AF321055	China	1997	2000
VP2-II	Hap34	35	AF362747	Germany	1975	2001
VP2-II	Hap34	35	AF362771	Germany	-	2001
VP2-II	Hap34	35	AF499929	Luxembourg	-	2002
VP2-II	Hap34	35	AJ310185	France	-	2001
VP2-II	Hap34	35	AJ427340	India	1999	2002
VP2-II	Hap34	35	AJ577092	Vietnam	-	2003
VP2-II	Hap34	35	AY029166	USA	-	2001
VP2-II	Hap34	35	AY311479	Egypt	2001	2003
VP2-II	Hap34	35	AY319768	China	-	2003
VP2-II	Hap34	35	AY321509	China	-	2003
VP2-II	Hap34	35	D00869	United Kingdom	1970	1986
VP2-II	Hap34	35	DQ187988	Brazil	1983	2005
VP2-II	Hap34	35	DQ202329	China	-	2005
VP2-I	Hap34	35	DQ286035	Brazil	-	2005
VP2-II	Hap34	35	DQ403248	China	-	2006

VP2-II	Hap34	35	DQ906921	China	-	2006
VP2-II	Hap34	35	EU184689	Croatia	1998	2007
VP2-I	Hap34	35	JN982268*	Brazil	2002	2011
VP2-I	Hap34	35	JN982269*	Brazil	2005	2011
VP2-II	Hap34	35	JN982273*	Brazil	2000	2011
VP2-I	Hap34	35	JN982263*	Brazil	2001	2011
VP2-I	Hap34	35	JN982267*	Brazil	2005	2011
VP2-II	Hap34	35	JN982276*	Brazil	2001	2011
VP2-I	Hap34	35	JN982262*	Brazil	2004	2011
VP2-I	Hap34	35	JN982258*	Brazil	1997	2011
VP2-I	Hap34	35	JN982264*	Brazil	2003	2011
VP2-I	Hap34	35	JN982265*	Brazil	2003	2011
VP2-I	Hap34	35	JN982259*	Brazil	2001	2011
VP2-I	Hap34	35	JN982260*	Brazil	2001	2011
VP2-I	Hap34	35	JN982261*	Brazil	2001	2011
VP2-II	Hap34	35	JN982274*	Brazil	2004	2011
VP2-I	Hap34	35	JN982266*	Brazil	2000	2011
VP2-II	Hap34	35	JN982275*	Brazil	2004	2011
VP2-II	Hap34	35	X16107	Germany	1975	1989
VP2-I	Hap35	2	AB368970	Tanzania	2002	2007
VP2-I	Hap35	2	AF362776	Bangladesh	1999	2001
VP2-I	Hap36	1	AF247006	Malaysia	-	2000
VP2-I	Hap37	1	AY704912	Iran	-	2004
VP2-I	Hap38	1	FJ842498	Vietnam	2003	2009
VP2-I	Hap39	1	DQ825652	China	-	2006

The accession codes marked with an asterisk (*) correspond to IBDV isolates sequenced in this work.

Table S3. Neutrality tests of the VP1 and VP2 sequences.

	Tajima's D	P	Fu and Li's D	P	Fu and Li's F	P
VP1	-0,44500	> 0.10	-1,78733	> 0.10	-1,48718	> 0.10
VP2	-1,78373*	< 0.05	-3,55001*	< 0.02	-3,31951*	< 0.02

*Significant values: $p < 0.05$

3. CONCLUSÕES GERAIS

- Foi possível estabelecer uma definição de genótipos para o IBDV e fornecer critérios claros para a classificação do IBDV abaixo do nível de gênero.
- O valor limite de 0,032 foi selecionado para agrupar os isolados de IBDV em três genótipos: IBDV-1, IBDV-2 e IBDV-3. Além disso, um quarto genótipo contendo sequências de hvVP2 não classificadas foi definido como IBDV-4.
- As sequências da região hipervariável da VP2 são marcadores filogenéticos confiáveis para a genotipagem do IBDV, uma vez que foram capazes de reconstruir a mesma árvore das sequências completas da VP2.
- Esse é o primeiro trabalho que demonstra que o processo evolutivo do IBDV está associado a uma combinação de taxas de recombinação muito baixas e taxas relativamente baixas de substituição de nucleotídeos, em função da seleção purificadora que atua nas proteínas VP1 e VP2.
- A partir da análise filogeográfica da VP2 foi possível sugerir que os isolados de IBDV foram introduzidos no Brasil, por pelo menos, três eventos de introdução viral.