

DetECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 15 CEPAS DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR EN ESPAÑA DURANTE EL PRIMER SEMESTRE DEL 2011

M. BIARNÉS^{1*}, A. BLANCO¹, Q. CAMPRUBÍ¹, N. CANALS¹ y R. PORTA¹

¹Centre de Sanitat Avícola de Catalunya i Aragó (CESAC), 43206 Reus, Tarragona, España.

*mbiarnes@cesac.org

RESUMEN

La bronquitis infecciosa aviar (IB) es una enfermedad altamente contagiosa, de cuadro agudo que afecta a las aves de la especie *Gallus gallus* de cualquier edad y está producida por un Coronavirus. El objetivo de este estudio fue determinar que genotipos del virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV) están actualmente presentes a nivel de campo en España, mediante técnicas de biología molecular: Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) y Secuenciación parcial del gen S1. Para ello se caracterizaron 15 cepas detectadas de 25 muestras de campo analizadas de diferentes zonas de España con sospecha de IB. El estudio molecular de las secuencias del gen S1 de las 15 cepas muestra la presencia de 3 genotipos de IBV a nivel de campo: Italy-02, QX y 793/B.

Palabras clave: IBV; Italy-02; QX; 4/91; secuenciación.

ABSTRACT

The avian Infectious Bronchitis (IB) is a highly contagious disease with an acute set of symptoms that affects all birds of any age that belong to the Gallus gallus species and it is caused by a Coronavirus. The aim of this study was to confirm the presence of the genotype of the avian infectious bronchitis within the Spanish fields by means of molecular biology techniques: Retrotranscription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and partial sequencing of the S1 gen. This was accomplished by the characterisation of 15 strains detected from 25 field samples analysed from different areas of Spain where IB was suspected to be present. The molecular study of the sequences of the S1 gen of the 15 strains show the presence of 3 genotypes of IBV on field: Italy-02, QX and 793/B.

INTRODUCCIÓN

La bronquitis infecciosa aviar (IB) es una enfermedad altamente contagiosa, de cuadro agudo que afecta a las aves de la especie *Gallus gallus* de cualquier edad y está producida por un gamma Coronavirus. El virus afecta el aparato respiratorio, el sistema reproductor y algunas cepas afectan el sistema renal, aumentando la mortalidad en aves jóvenes. La enfermedad se presenta en forma abrupta, diseminándose rápidamente entre las aves. Actualmente sigue siendo una de las mayores causas de pérdidas económicas en la avicultura industrial de todo el mundo.

El virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV) tiene 4 proteínas estructurales mayores: las glicoproteínas de la espícula (S) y de la membrana (M), la nucleoproteína interna (N) y las pequeñas proteínas de la cubierta (E). La proteína S tiene 2 subunidades y es la subunidad S1 la responsable de la producción de anticuerpos neutralizantes específicos de serotipo.

Fue descrito por primera vez en 1930 en Dakota del norte, USA y en los años 50 ya se empezó a hablar de los diferentes serotipos, desde entonces se han reportado más de 60 serotipos o genotipos. Este hecho obliga a tipificar la cepa de IBV involucrada en el brote.

Tradicionalmente se utilizaba la técnica de Virus Neutralización o la Inhibición de la Hemaglutinación para el serotipado de la cepa, pero debido a su complejidad en la actualidad la secuenciación y posterior análisis genético de la secuencia nucleotídica del gen S1 es el método de elección para determinar el genotipo IBV ya que una de las características importantes del IBV es su elevada diversidad genética especialmente manifiesta en el gen de la proteína S. La tipificación de las cepas del virus de IBV es fundamental para comprender mejor la epidemiología, la evolución de la enfermedad en el tiempo y por supuesto establecer medidas de control.

El objetivo de este estudio es determinar que genotipos del virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV) están actualmente presentes a nivel de campo en España, mediante técnicas de biología molecular: Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) y Secuenciación parcial del gen S1. Para ello se caracterizaron 15 cepas detectadas de 25 muestras de campo analizadas de diferentes zonas de España con sospecha de IB.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Los análisis se realizaron a partir de muestras de traquea y/o riñón y/o tonsilas cecales de casos clínicos sospechoso de bronquitis infecciosa que fueron enviadas directamente por nuestros clientes o bien fueron tomadas en el departamento de necropsias del CESAC durante el estudio *postmortem*, entre enero y junio de 2011. En la tabla 1 se detalla información relativa a los lotes analizados: referencia del caso, tipo de ave, edad, comunidad autónoma donde está ubicada la explotación, vacunas y edad (días) de aplicación y muestra analizada.

Tabla 1. Relación de muestras analizadas. (*)Información no disponible.

Referencia	Tipo Ave	Edad	CCAA	Vacunas (Edad)	Muestras
279/2011	Broiler	34	Castilla León	*	Traquea + Tonsilas cecales
1307/11	Broiler	46	Andalucía	Ma5(1)+IB Primer (12)	Traquea
1468-2/11	Broiler	-	Baleares	*	Traquea
2001/11	Broiler	20	Andalucía	Ma5(1)+IB Primer (12)	Traquea + Tonsilas cecales + Riñón
2397/11	Broiler	28	Valencia	*	Riñón
2544/11	Broiler	31	Cataluña	H120(1)	Traquea + Tonsilas cecales + Riñón
2746/11	Broiler	21	Valencia	H120(1) + 4/91(1)	Traquea + Tonsilas cecales + Riñón
2748/11	Broiler	15	Valencia	H120(1) + 4/91(1)	Traquea + Tonsilas cecales + Riñón
2750/11	Broiler	28	Valencia	H120(1) + 4/91(1)	Traquea + Tonsilas cecales + Riñón
2752/11	Broiler	4	Valencia	H120(1) + 4/91(1)	Traquea + Tonsilas cecales + Riñón
3781/11	Label	20	País Vasco	Sin vacunar	Traquea + Tonsilas cecales + Riñón
3895/11	Broiler	40	Castilla León	*	Traquea + Riñón
4366/11	Broiler	26	Cataluña	H120 (1)	Traquea + Tonsilas cecales + Riñón
4372/11	Broiler	35	Cataluña	*	Traquea + Tonsilas cecales + Riñón
4886/11	Broiler	-	Andalucía	*	Traquea + Tonsilas cecales + Riñón

Extracción de ARN

La extracción de ARN de las muestras remitidas se realizó a partir de 140µl de macerado procedente de las muestras con agua de biología molecular. Se procedió de acuerdo con las instrucciones del

fabricante del kit comercial QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen). La elución final de ARN se hizo con 60µl de buffer AVE.

RT-PCR

Los cebadores utilizados para la RT-PCR de IBV fueron los descritos por Cavanagh *et al*, 1999, XCE1+ y XCE3- que amplifican parcialmente la secuencia del gen que codifica para la proteína de la espícula S1 obteniéndose un producto de 383pb. La retrotranscripción y amplificación se llevaron a cabo en un solo paso con el kit One Step RT-PCR de Qiagen. El producto de RT-PCR se detectó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE y teñido con Syber Safe (Invitrogen).

Secuenciación de las muestras amplificadas

El producto de la RT-PCR se purificó mediante el kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante con elución final de 30µl en buffer 6. Posteriormente se llevó a cabo la reacción de secuenciación: Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) con un volumen final de 10µl. Se utilizaron los primers XCE1+ y XCE3-. El producto de la reacción de secuenciación se purificó con etanol. Para la secuenciación se empleó un 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) con polímero POP6 y capilar corto.

Tratamiento de secuencias

Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa DNASTAR Lasergene SeqMan 7.0.0. La comparación de secuencias nucleotídicas obtenidas con secuencias publicadas en el Genbank se realizó con el programa MEGA 5.01 mediante ClustalW, y el análisis filogenético (Figura 1) de las secuencias se realizó mediante el método de Neighbor-Joining con un bootstrap de 1000 réplicas también con el programa MEGA 5.01.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 2 se detalla las referencias y los resultados obtenidos de la secuenciación parcial del gen S1 de las muestras amplificadas en cada uno de los casos.

Tabla 2. Genotipos detectados

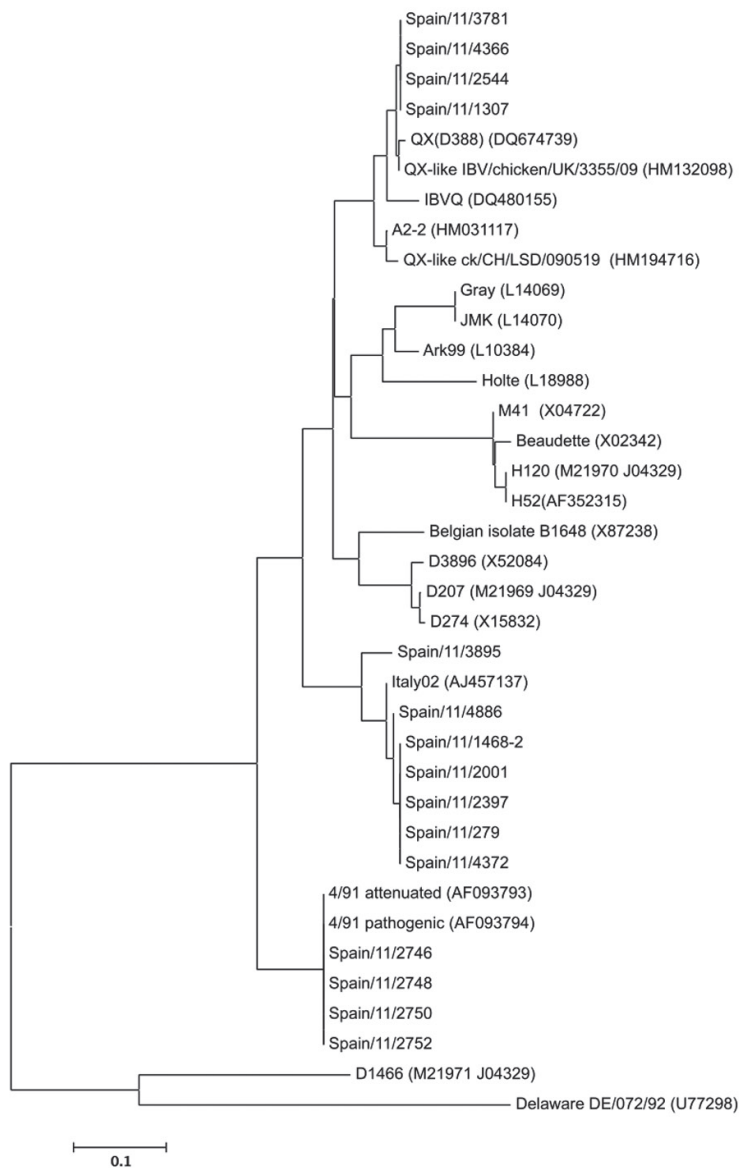
Referencia	Genotipo
279/2011	Italy-02
1307/11	QX
1468-2/11	Italy-02
2001/11	Italy-02
2397/11	Italy-02
2544/11	QX
2746/11	4/91
2748/11	4/91
2750/11	4/91
2752/11	4/91
3781/11	QX
3895/11	Italy-02
4366/11	QX
4372/11	Italy-02
4886/11	Italy-02

En la figura 1 aparecen las cepas de referencia y sus números de acceso en el Genbank, mientras que las muestras analizadas en el CESAC se identifican mediante País de Origen/año/referencia interna del CESAC.

Las referencias 2746/11, 2748/11, 2750/11 y 2752/11 corresponden a lotes de broilers vacunados en sala con H120 y 4/91, la secuenciación parcial del gen S1 no nos permite distinguir entre cepas 4/91 patógenas y cepas 4/91 vacunales, para ello se realizará la secuenciación completa del gen S1.

La caracterización molecular realizada en las 15 cepas analizadas reveló que los genotipos observados en España en el primer semestre de 2011 fueron de tipo 4/91 (4), QX (4) e Italy-02 (7), siendo este último el genotipo predominante.

Figura 1. Árbol filogenético



REFERENCIAS

CAVANAGH, D. Coronaviruses in poultry and other birds. Review. *Avian Pathology*, 2005, 34:439-448.

CAVANAGH D., DAVIS, P.J., COOK, J.K.A., D., KANT, A. & KOCH, G. (1992) Location of the amino-acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious-bronchitis virus. *Avian Pathology*. 21:33-43.

CAVANAGH, D. & GELB J. (2008) *Infectious Bronchitis. Diseases of Poultry*. 12th, Saif, Y.M. . Blackwell Publishing, Iowa, EEUU : 117-135.

CAVANAGH, D., MAWDITT, K., BRITTON, P. & NAYLOR, C.J. (1999) Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, 28: 593-605.

DE WITT, J.J. (2000). Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathology*, 29:71-93.

DOLZ, R., PUJOLS, J., ORDOÑEZ, G., PORTA, R. y MAJÒ, N. (2006) Antigenic and molecular characterization of isolates of the Italy 02 infectious bronchitis virus genotype. *Avian Pathology*. 35: 77-85.

DOLZ, R., PUJOLS, J., ORDOÑEZ, G., PORTA, R. y MAJÒ, N. (2008) Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis in Spain over a fourteen year period. *Virology* 374(1):50-59.

GELB, J., JR. & JACKWOOD, M.W. (1998). Infectious Bronchitis. In D.E.Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson & W.M. Reed (eds.), *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th edn Pennsylvania: The American Association of Avian Pathologists. pp: 169 174.

MORENO, A., FALLACARA, F., TOSI, G. & MASSI, P. (2008) Bronquitis infecciosa aviar, una enfermedad que cambia. Evolución e importancia de las cepas variantes. *Proceedings del XLV Symposium científico de avicultura, AECA, Barcelona*. pp:95-102.

ZANELLA, A., LAVAZZA, A., MARCHI, R., MORENO MARTIN, A. & PAGANELLI, F. (2003). Avian infectious bronchitis: characterization of new isolates from Italy. *Avian Diseases*, 47:, 180-185.