

# QX Xindadi, un virus recombinante de bronquitis aviar en los campos españoles.

A. BLANCO <sup>1\*</sup>, N. ANTILLÉS <sup>1</sup>, Q. CAMPRUBÍ <sup>1</sup>, R. JOVÉ <sup>1</sup> y M. BIARNES <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centre de Sanitat Avícola de Catalunya i Aragó (CESAC), Avda. Castellvell 32, 43206 Reus, Tarragona, España.

\* e-mail: [ablanco@cesac.net](mailto:ablanco@cesac.net)

---

El virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV) es una enfermedad altamente contagiosa causante de un gran peso económico a nivel mundial. Los eventos de recombinación y mutaciones son los responsables de su extrema variabilidad y rápida evolución que desembocan en la aparición de nuevas cepas. Algunos de estos recombinantes se adaptan bien, se propagan y acaban siendo dominantes en el campo. El presente estudio reporta la presencia y variabilidad genética de uno de estos recombinantes bien adaptados, las cepas QX Xindadi (XDN). Se caracterizaron muestras desde su primera detección en 2012 hasta el primer semestre de 2018 mediante técnicas de biología molecular: retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y secuenciación parcial del gen S1. Se analizaron 158 cepas XDN a partir de muestras de campo donde había sospecha de IB, provenientes de diferentes áreas de España. Desde su primera detección, esta cepa muestra una tendencia a desplazar las cepas Qx clásicas, siendo detectadas en el 65%, 87,5%, 77%, 46%, 90%, 100% and 68,5% de los casos de QX desde 2012 hasta el final del estudio, respectivamente. El estudio molecular de las secuencias parciales del gen S1 mostró una gran homogeneidad dentro del clúster XDN, hecho que parece indicar que estas cepas fueron originadas a partir de un único promotor recombinante. Estudios más completos deben llevarse a cabo para confirmar el antepasado común de estas cepas.

Infectious Bronchitis virus (IBV) is a highly contagious disease that causes a great economic burden worldwide. Recombination events and mutations are responsible for its extreme variability and rapid evolution leading to new recombinant strains. Some of these recombinants adapt well, spread and become dominants within the fields. The present study reports on the presence and genetic variability of one of these well adapted recombinants, the QX Xindadi (XDN) strains. Samples, from its first detection in 2012 to the first semester of 2018, were characterized by means of molecular biology techniques: retrotranscription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and partial sequencing of the S1 gen. This was accomplished by the characterization of 158 XDN strains detected from field samples analyzed from different areas of Spain where IB was suspected to be present. Since the first detection of this strain, a tendency to replace the classical QX strains has been detected with 65%, 87,5%, 77%, 46%, 90%, 100% and 68,5% of the QX cases since 2012 to the end of this study, respectively. The molecular study of the sequences of the partial S1 gene showed great homogeneity within XDN clade that seems to indicate that all these strains were originated from a unique recombinant founder. Further studies have to be carried out in order to confirm the common ancestor of these strains.

---

**Palabras clave:** Bronquitis Infecciosa Aviar; recombinación; Xindadi; secuenciación; S1.

## Introducción

La bronquitis infecciosa aviar (IB) sigue siendo una de las mayores causas de pérdidas económicas de la avicultura industrial en todo el mundo. 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 virus perteneciente al grupo 3 del género Coronavirus. El cuadro clínico presenta diverso tropismo dependiendo de la cepa causante de la infección pudiendo ocasionar nefritis, afección del aparato

respiratorio y/o del sistema reproductor. El material genético del virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV) se compone de una cadena sencilla de RNA de sentido positivo que codifica para 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 glicoproteína S se divide en 2 subunidades: S1 y S2 siendo la S1 responsable de la producción de anticuerpos neutralizantes específicos de serotipo. Desde su descripción en 1930, se ha constatado una gran tendencia a introducir cambios antigénicos produciendo nuevos serotipos y/o genotipos. Estas cepas pueden adaptarse bien al medio y al huésped y llegar a ser predominantes en una zona o país, o por el contrario no adaptarse bien y desaparecer tan rápido como llegaron. Esta gran capacidad de mutación y recombinación confiere al virus una rápida adaptación a presiones selectivas dificultando el control de la vacunación y obligando a tipificar la cepa de IBV involucrada en cada brote. Para la tipificación del agente se utilizan técnicas moleculares como la secuenciación y posterior análisis filogenético de la secuencia nucleotídica del gen S1. El objetivo de este estudio fue reportar la presencia y variabilidad genética de una de estas cepas bien adaptadas, la cepa QX Xindadi circulante en España, fruto de la recombinación entre cepas QX y cepas del grupo 793/B, mediante el uso de técnicas de biología molecular: Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y secuenciación parcial del gen S1. Para ello se analizaron 158 cepas Xindadi provenientes de muestras de diferentes zonas de España.

## **Materiales y métodos**

### Muestras

Los análisis se realizaron a partir de muestras de tejidos (tráquea y/o riñón y/o tonsilas cecales) y/o de hisopos (traqueales y/o cloacales) que fueron enviadas directamente por nuestros clientes o bien fueron tomadas en el departamento de necropsias del CESAC durante el estudio *postmortem*. El estudio incluye 158 cepas de IB correspondientes al clúster XDN.

### Extracción de ARN

La extracción de ARN de las muestras remitidas se realizó mediante 2 kits comerciales a partir de macerado procedente de las muestras con PBS. Se procedió de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los dos kits utilizados fueron, el kit comercial QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen) y el kit comercial Maxwell 16 miRNA Tissue kit (Promega). La cantidad de muestra utilizada para ambos kits fue 140 µl y 200 µl del macerado, respectivamente, y la elución final de ARN se realizó con 60µl de buffer AVE o 75 µl de agua libre de RNAsas, respectivamente. El kit de Qiagen se utilizó de forma única hasta finales de 2016, a partir de esa fecha, el kit empleado mayoritariamente fue el de Promega. En nuestras manos, ambos kits pudieron utilizarse indistintamente ya que el rendimiento de los dos kits, en las condiciones mencionadas, es comparable.

### RT-PCR

Los cebadores utilizados para la RT-PCR de IBV fueron los descritos por Cavanagh *et al*, 1999, XCE1+ y XCE3- y 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 ExoProStar 1-step (GE Healthcare) si provenía del producto de PCR o mediante el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macerrey-Nagel) si tuvo que purificarse desde gel de agarosa, siguiendo las instrucciones del fabricante en ambos casos. Posteriormente se llevó a cabo la reacción de secuenciación: Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), utilizando los primers XCE1+ y XCE3-. El producto de la reacción se

secuenciación se purificó con etanol. Para la secuenciación se empleó un 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

#### 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 5.2 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 5.2. Para elaborar la matriz identidad de las muestras se utilizó el programa BioEdit 7.2.6. (Tabla 1)

## Resultados y discusión

El presente estudio está integrado en el programa de vigilancia de bronquitis infecciosa llevado a cabo en el CESAC. Este programa de vigilancia consiste en recoger todos los datos obtenidos de muestras de campo en las que se ha detectado IBV y contrastarlos para poder tener una imagen de los genotipos circulantes en España cada año. El gráfico 1, muestra el desplazamiento de genotipos desde 2011 hasta el primer semestre de 2018. Debe tenerse en cuenta que, a partir de 2013, la mayoría de muestras recibidas para la detección de IBV, corresponden a muestras de control de vacunación, hecho que hace aumentar la prevalencia total del grupo 4/91 (4/91, 793/B, CR88, 1/96). También cabe destacar que a partir de 2017 se recibe gran cantidad de muestras correspondientes a controles de vacunación de individuos de la misma nave y que, por tanto, una vez detectada la prevalencia individual, no se lleva a cabo la secuenciación de cada muestra, y es por esta razón que el grupo de muestras no secuenciadas se ve claramente incrementado.

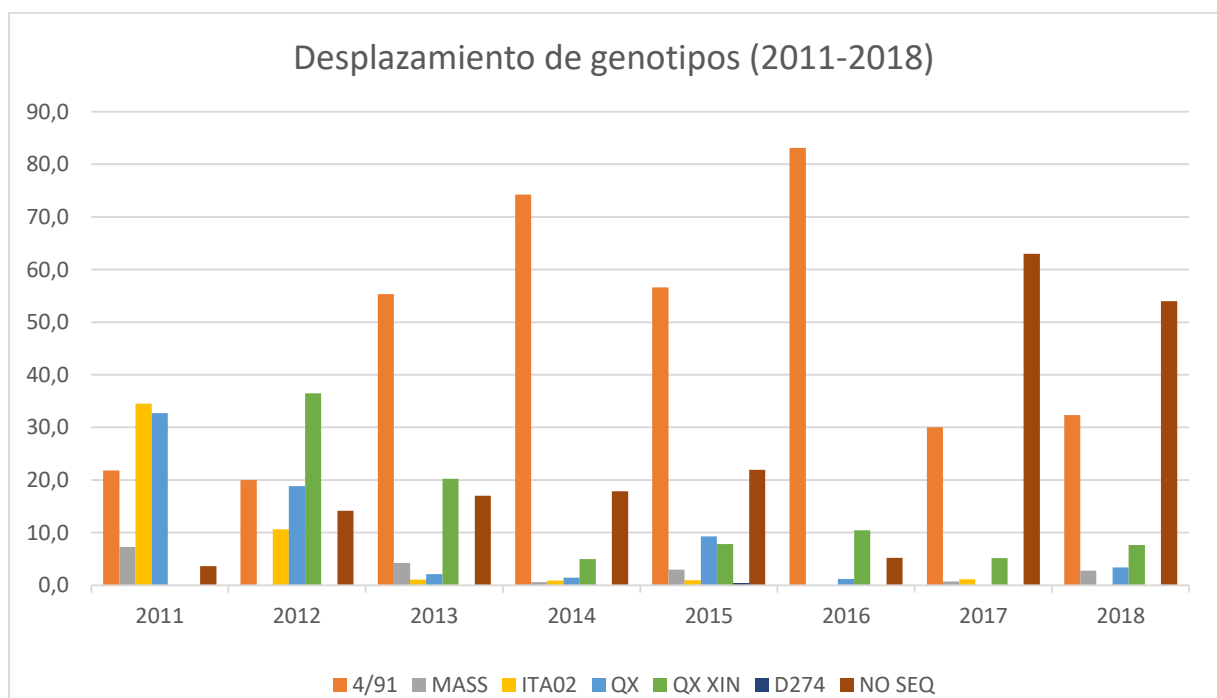
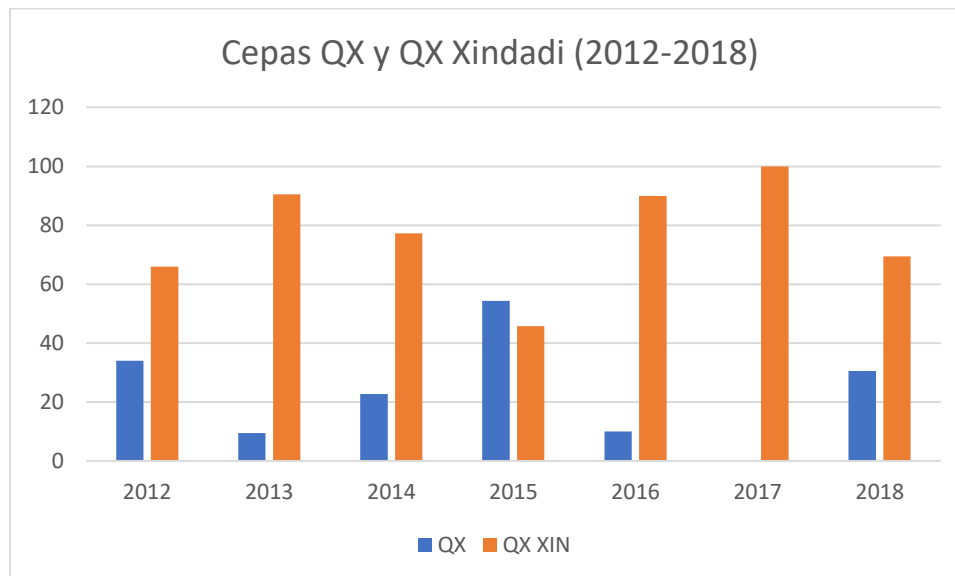


Gráfico 1. Distribución de los genotipos de IBV desde 2011 a primer semestre de 2018.

De los resultados obtenidos se observa la presencia de dos grupos mayoritarios de cepas QX, el grupo existente desde principios de 2011 y el grupo que aparece por primera vez en febrero de 2012 al que se denominó QX Xindadi debido a su similitud (98%) con la cepa con número de acceso al GenBank

GU938442.1. aislada en Xindadi, China, en 2009. Desde su aparición, se observa una tendencia a desplazar las cepas clásicas anteriores, siendo detectada en el 65%, 87,5%, 77%, 46%, 90%, 100% y 68,5% de los casos de QX desde 2012 hasta el final del estudio, respectivamente. En el gráfico 2 se muestra la frecuencia anual de QX y QX Xindadi.



**Gráfico 2. Distribución de QX y QX Xindadi desde 2011 a 2018.**

La figura 1 muestra la representación del análisis filogenético aplicado a las cepas del estudio. Las secuencias de las cepas de referencia aparecen con su número de acceso al GenBank. Las secuencias obtenidas en el CESAC, para las muestras analizadas, se describen según la nomenclatura recomendada por la acción COST FA1207 (red europea que conecta a expertos en coronavirus aviares). La recomendación de nomenclatura es: género CoV/AvCoV/huésped/país/ID de la muestra/año. Dependiendo del lugar y la extensión del país, debe especificarse la zona, por ejemplo, en el caso de EEUU, debería añadirse el estado. El ID de la muestra es precedido de una S (muestra) o I (aislado vírico) que diferencie el método de obtención del agente. En caso de añadir información, debe respetarse la estructura recomendada. Las secuencias correspondientes al grupo XDN aparecen en color azul y pueden verse agrupadas todas en el mismo clúster. La homogeneidad de las secuencias dentro de este clúster, se comprobó con la matriz identidad. La cepa de mayor proximidad a las cepas XDN circulantes por España es la cepa de referencia aislada en Xindadi en 2009, situada en la ramificación del clúster XDN. El grupo QX clásico puede verse en un clúster completamente diferente al de las XDN. La localización del clúster XDN puede relacionarse con el hecho de ser fruto de la recombinación de cepas pertenecientes a los clústeres 793/B y QX y por ello, cercana en la representación gráfica. En el análisis filogenético se incluyeron dos aislados esporádicos, en color rosa, aunque cercanos a estos dos grupos, presentan un grado de identidad menor.

En la Tabla 1 se muestra la matriz identidad para 10 aislados y dos cepas de referencia, la cepa QX aislada en Xindadi en 2009 (K) y la cepa QX clásica D388 (L). Los aislados de elección para elaborar la matriz identidad simplificada fueron una cepa perteneciente al clúster QX Xindadi de cada año (2012-2018=A-G, respectivamente), una cepa perteneciente al clúster QX clásica (H) y dos aislados esporádicos (I, J). La cepa QX clásica de elección corresponde al primer aislado de QX que se secuenció en el CESAC (gammaCoV/IBV/Ck/Spain/1307/2011). Los dos aislados esporádicos, también incluidos en el árbol filogenético, representan el ejemplo de cepas que no se adaptan bien y desaparecen.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
A	ID	0,994	0,991	0,994	0,991	0,991	0,991	0,902	0,882	0,878	0,976	0,902
B	0,994	ID	0,997	1,000	0,997	0,997	0,997	0,908	0,884	0,884	0,982	0,908
C	0,991	0,997	ID	0,997	1,000	0,994	0,994	0,905	0,882	0,881	0,979	0,905
D	0,994	1,000	0,997	ID	0,997	0,997	0,997	0,908	0,884	0,884	0,982	0,908
E	0,991	0,997	1,000	0,997	ID	0,994	0,994	0,905	0,882	0,881	0,979	0,905
F	0,991	0,997	0,994	0,997	0,994	ID	1,000	0,905	0,882	0,881	0,979	0,905
G	0,991	0,997	0,994	0,997	0,994	1,000	ID	0,905	0,882	0,881	0,979	0,905
H	0,902	0,908	0,905	0,908	0,905	0,905	0,905	ID	0,911	0,964	0,890	0,988
I	0,882	0,884	0,882	0,884	0,882	0,882	0,882	0,911	ID	0,882	0,884	0,905
J	0,878	0,884	0,881	0,884	0,881	0,881	0,881	0,964	0,882	ID	0,869	0,970
K	0,976	0,982	0,979	0,982	0,979	0,979	0,979	0,890	0,884	0,869	ID	0,896
L	0,902	0,908	0,905	0,908	0,905	0,905	0,905	0,988	0,905	0,970	0,896	ID

**Tabla 1. Matriz identidad.**

Estudios previos de cepas españolas pertenecientes al grupo QX Xindadi entre 2012 y 2014, mostraron una gran homogeneidad que parecía apuntar hacia un único evento de recombinación, es decir, a un único progenitor (Moreno et. al 2017). Los resultados obtenidos de la matriz identidad para estas cepas mostraron diferencias menores al 1% en la mayoría de los casos, traducéndose a ningún o un único cambio aminoacídico en la zona secuenciada. Este dato da soporte a la hipótesis de un único progenitor, en el caso de las XDN circulantes en España. A nivel europeo, se ha reportado diferente comportamiento a nivel de patogenicidad y tropismo en las cepas Xindadi de diferentes países, así como diferencias a nivel de patrones de recombinación. Se deben llevar a cabo estudios moleculares más amplios sobre el gen de la espícula para poder estudiar en más profundidad estas recombinaciones, su repercusión en cambios aminoacídicos y su posible relación con la patogenicidad.

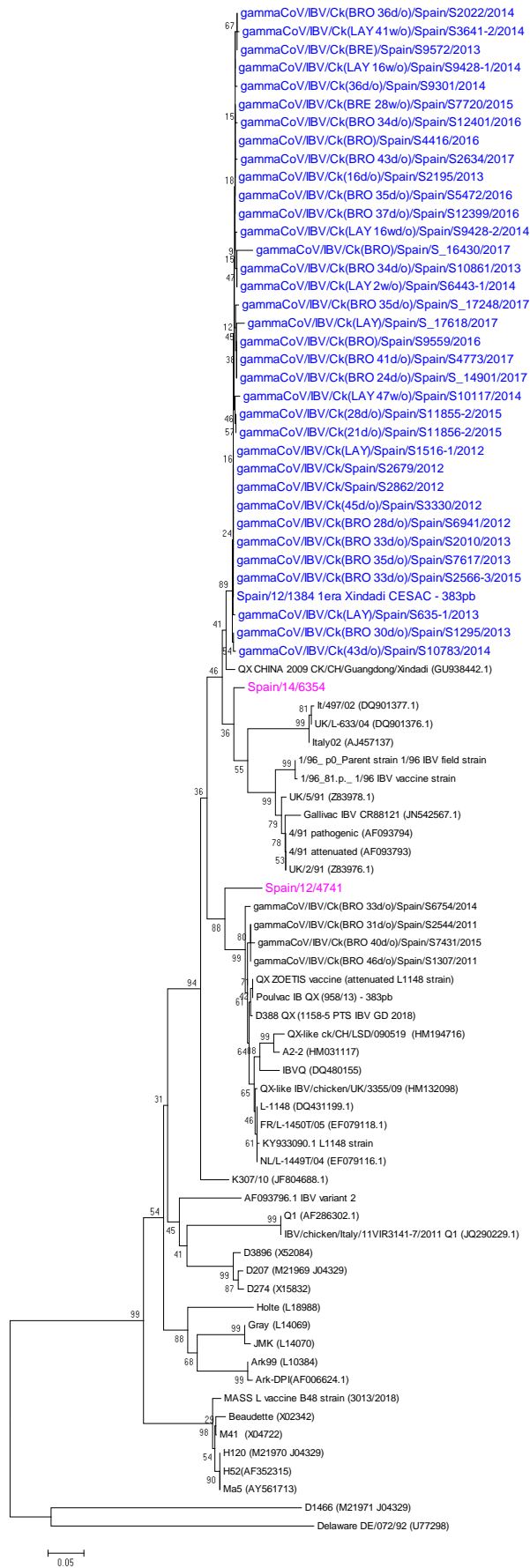


Figura 1. Árbol filogenético. Neighbor-Joining con Bootstrap de 1000 réplicas. Las cepas XDN se muestran en azul y los aislados esporádicos se muestran en rosa.

## Referencias

- BLANCO, A., ANTILLÉS, N., CAMPRUBÍ, Q., JOVÉ, R. & BIARNÉS, M.** (2015). Bronquitis aviar: Epidemiología molecular y evolución de los diferentes genotipos predominantes en España desde 2011, LII Simposio científico de Avicultura, 28–30 October, Malaga (Spain).
- 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*. 12<sup>th</sup>, 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.
- DE WITT, J.J., COOK, J.K.A., VAN DER HEIJDEN, H.M.J.F.** (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathology*, **40**:223-235.
- 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.
- DOLZ, R., VERGARA-ALERT, J., PEREZ, M., PUJOLS, J. y MAJÒ, N.** (2011) New insights on infectious bronchitis virus pathogenesis: characterization of Italy 02 serotype in chicks and adult hens. *Veterinary Microbiology* **156**(2012):256-264.
- DUCATEZ, M.F. & THE EUROPEAN UNION COST ACTION FA1207** (2016) Recommendations for a standardized avian coronavirus (AvCoV) nomenclature: outcome from discussions within the framework of the European Union COST Action FA1207: “towards control of avian coronaviruses: strategies for vaccination, diagnosis and surveillance”, *Avian Pathology*, 45:5, 602-603, DOI: [10.1080/03079457.2016.1211834](https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1211834)
- 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.
- MORENO, A., FRANZO, G., MASSI, P., TOSI, G., BLANCO, A., ANTILLÉS, N., BIARNÉS, M., MAJÓ, N., NOFRARÍAS, M., DOLZ, R., LELLI, D., SOZZI, E., LAVAZZA, A. & CECCHINATO, M.** (2017) A novel variant of the infectious bronchitis virus resulting from recombination events in Italy and Spain, *Avian Pathology*, 46:1, 28-35.
- 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.