Bronquitis Infecciosa Aviar: genotipos identificados en España del 2012 al 2016

A. GINER[1*], F. BLOND[2], T. BRU[3] y R. VILA[3]

[1]Zoetis Spain S.L.U. Av. Europa 20B, 28108, Madrid, España. [2]Zoetis France SAS, 10 Rue Raymond David, 92240, Paris, France. [3]Zoetis Manufacturing Research Spain S.L. 17813, Olot, Girona, España

***Autor de contacto: alberto.giner@zoetis.com**

Resumen

Zoetis realiza desde hace varios años estudios de qPCR Multiplex con muestras provenientes de países de Europa, Norte de África y Oriente Próximo para la identificación de genotipos del virus causante de la Bronquitis Infecciosa Aviar en lotes de pollos de engorde, pollitas futuras ponedoras y reproductoras, ponedoras comerciales y reproductoras pesadas. La técnica utilizada presenta la gran ventaja de poder detectar e identificar más de un genotipo en la misma muestra, permitiendo una información de los lotes más amplia, lo que mejora la toma de decisiones desde el punto de vista de los planes vacunales. El presente trabajo presenta los resultados de las muestras tomadas en España durante los años 2012 al 2016.

Palabras clave: RT-PCR; qPCR Multiplex; muestras; genotipos; identificación

---

Abstract

Zoetis perform since some years ago qPCR Multiplex studies with samples from Europe, North of Africa and Middle East countries for the identification of the genotype from the causative virus of Avian Infectious Bronchitis in broilers, pullets, commercial layers and broiler breeders. The technique used has a big advantage allowing detection and identification of more than one genotype in the same sample, giving wider information of the flocks, improving the decision making from the vaccinal plans point of view. The present paper shows the results from samples taken in Spain since 2012 to 2016.

Introducción y objetivos

La Bronquitis Infecciosa Aviar es causante de grandes pérdidas económicas en la industria avícola a nivel mundial. Es producida por un coronavirus que afecta a la especie *Gallus gallus.* Es bien sabida la facilidad de variación antigénica por eventos de mutación o recombinación que tiene, esto permite al virus adaptarse a cambios en la presión de selección, pudiendo producirse una falta de protección de los planes vacunales aplicados, por esto se hace necesario el poder identificar genotípicamente las cepas presentes de forma rápida y además pudiendo detectar más de una cepa en una misma muestra, en caso de haber más de un genotipo de virus presente.

El objetivo de este estudio es mostrar las identificaciones realizadas en muestras de granjas en España durante los años 2012 al 2016 por medio de técnicas de biología molecular. Zoetis como parte de su programa de soporte a clientes, ofrece desde hace varios años el análisis de muestras para identificación de diferentes cepas del virus causante de la bronquitis infecciosa aviar.

El servicio se realiza con muestras de hisopos traqueales/cloacales que son analizados mediante la técnica de qPCR Multiplex o PCR Multiplex.

Materiales y métodos

Este estudio está basado en 366 muestras tomadas en España durante los años 2012 al 2016 de pollos de engorde, pollitas futuras ponedoras y reproductoras, ponedoras comerciales y reproductoras pesadas. Las muestras han sido tomadas por medio de hisopos secos (sin ningún tipo de medio de cultivo) a nivel de tráquea y/o cloaca (en algún caso incluso de riñón), tanto de casos clínicos sospechosos de bronquitis como de monitorización de rutina.

Para el muestreo se toman 10 hisopos traqueales y/o cloacales de 10 aves por nave o por granja, los cuales son procesados de forma conjunta (pool). Se realiza la extracción del posible ARN viral presente en la muestra y se hace una primera RT-PCR con una combinación específica de cebador y sonda para la proteína N del virus de BI (Bronquitis Infecciosa). Si esta primera RT-PCR es positiva, una segunda PCR (qPCR) es realizada con iniciadores/cebadores que tienen blancos en áreas específicas del gen que codifica la proteína S1, permitiendo detectar distintas variantes genotípicas dominantes (qPCR Multiplex). A diferencia de la mayoría de métodos de secuenciación, esta técnica permite detectar las diferentes cepas presentes en la muestra y no solo la cepa predominante. Aunque el método no permite diferenciar entre cepas vacunales y cepas de campo, usando el Ct (límite de ciclos o Cycling threshold por sus siglas en inglés) y sabiendo el programa vacunal aplicado, nos puede ayudar a diferenciar si es de campo o es de origen vacunal. De forma esporádica se realizan secuenciaciones de aquellos casos en donde se ha encontrado una cepa que se sospecha que pueda ser de origen vacunal aunque no esté incluida en el plan vacunal, con el objetivo de revisar si ha habido una exposición en campo a un virus de origen vacunal.

Los siguientes genotipos de Bronquitis Infecciosa son testados habitualmente: Massachusetts, D274, 793B, D1466, Italy02, Arkansas*, QX, IS/1494/06**, Q1*** (*Tabla 1*). Las muestras que han salido positivas a la primera RT-PCR pero negativas a la segunda qPCR, si se dispone de material genético suficiente (calidad y/o cantidad), son enviadas a un laboratorio externo para su secuenciación.

Tabla 1. Genotipos identificados por qPCR Multiplex.

Genotipos identificados
793B
Massachusetts
D274
Arkansas*
Itay02
D1466
QX
IS/1494/06**
Q1***

* Este primer/cebador específico se ha incluido porque una vacuna que contiene el serotipo Arkansas es comercializada en el R.U. y en Grecia.
**Este primer/cebador específico para Variante 2 se introdujo el año 2015
***Este primer/cebador específico para Q1 se introdujo a mediados del año 2016

Resultados y discusión

A continuación se observan distintos gráficos que muestran en resumen los resultados de las analíticas realizadas del 2012 al 2016.

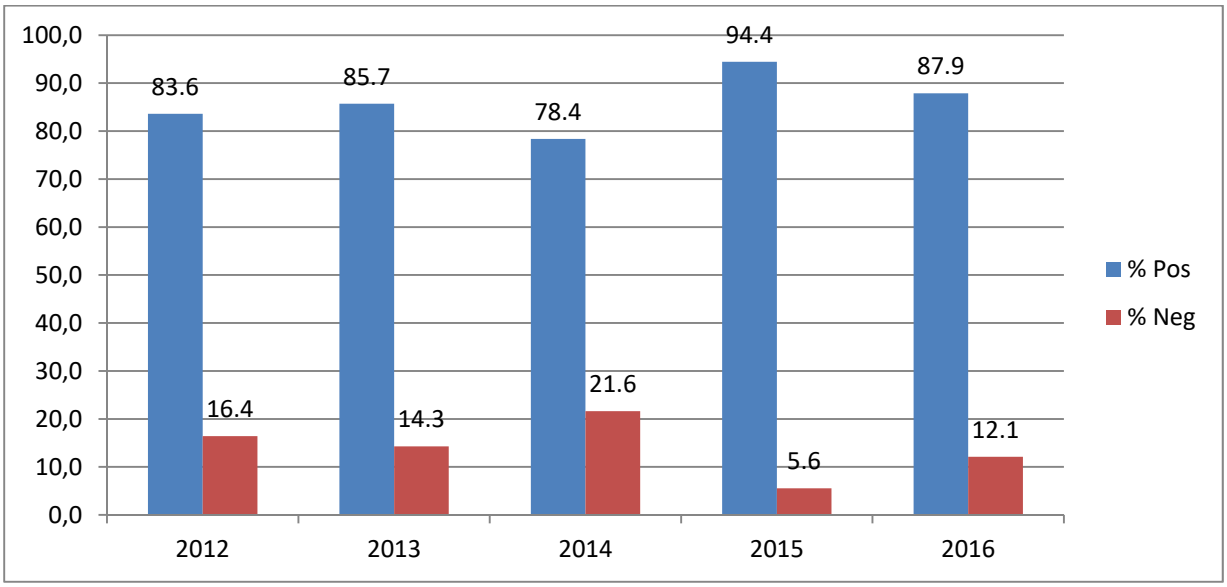

Figura 1. Porcentaje de muestras positivas y negativas por año.

Las 366 muestras procesadas dieron un porcentaje de muestras positivas al virus de la Bronquitis Infecciosa que varió del 78.4 al 94.4% durante los diferentes años analizados.

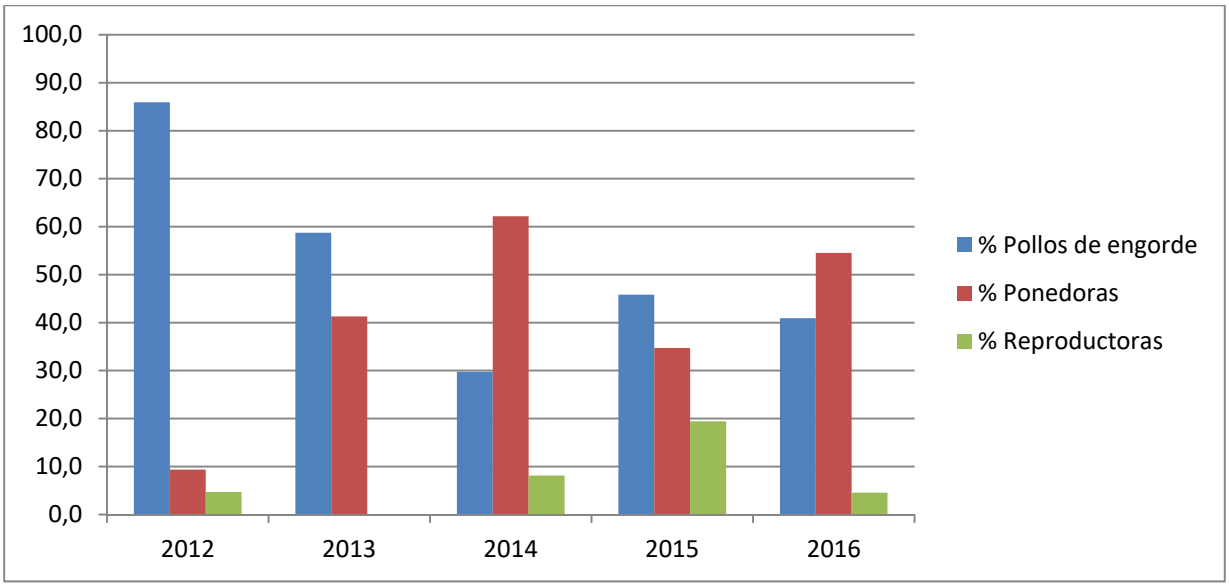

Figura 2. Porcentaje de muestras analizadas por tipo de ave.

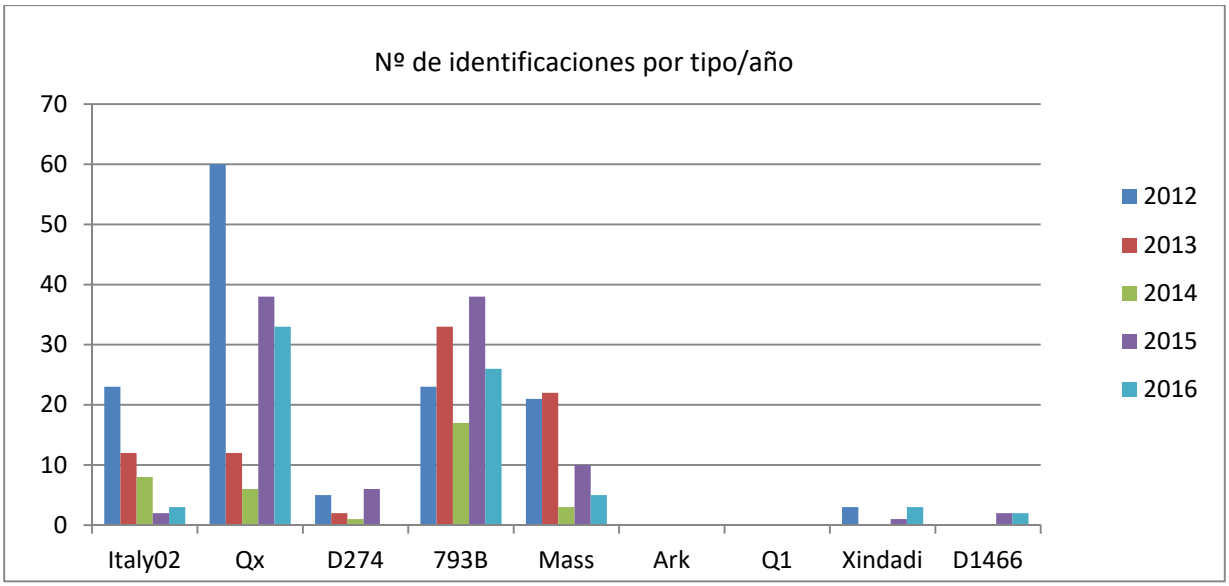

Figura 3. Número de identificaciones por genotipo por año.

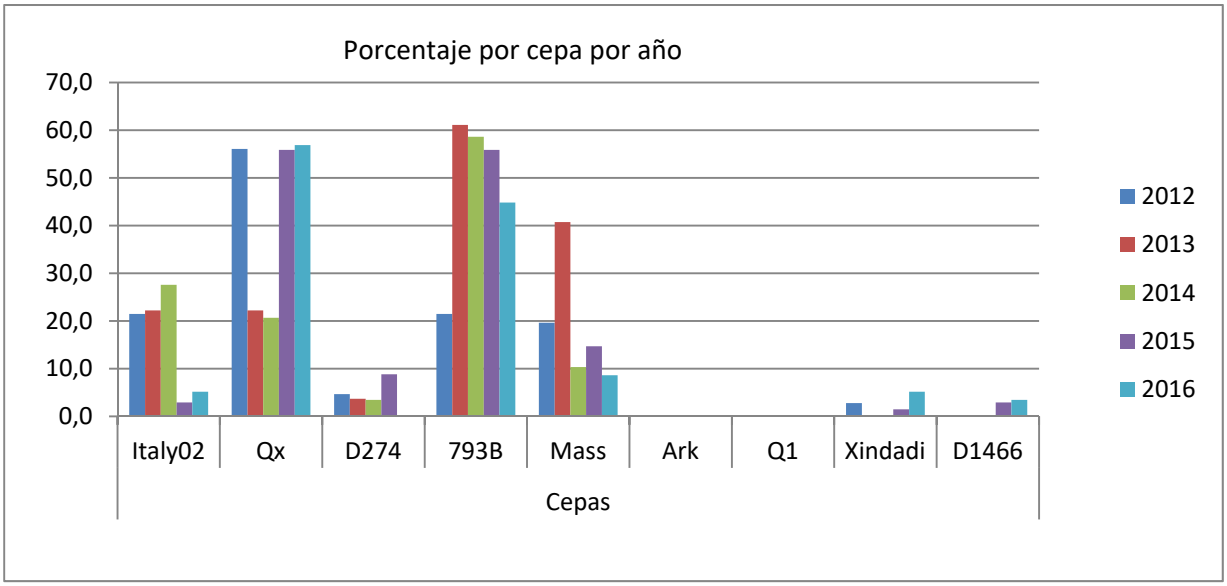

Figura 4. Porcentaje de identificaciones por cepa por año.

Según las identificaciones realizadas podemos concluir:

- Se observa una disminución de Italy02 durante los últimos años pero sigue presente.
- Se detectan cepas vacunales tipo Massachusetts, 793B y D274.
- No se han detectado las cepas Arkansas y Q1.
- Ha habido identificaciones puntuales de la cepa D1466 de origen Holandesa.
- Se han identificado por secuenciación algunas cepas tipo Xindadi.
- Los aislamientos del grupo 793B en general se consideran de origen vacunal. En algunos casos donde era identificado en aves que teóricamente no habían recibido la vacuna, se realizó secuenciación y se estableció su origen vacunal con homologías superiores al 99%.
- El genotipo QX luego de su elevada presencia en el año 2012 y su disminución posterior, ha tenido un repunte importante durante 2015 y 2016.

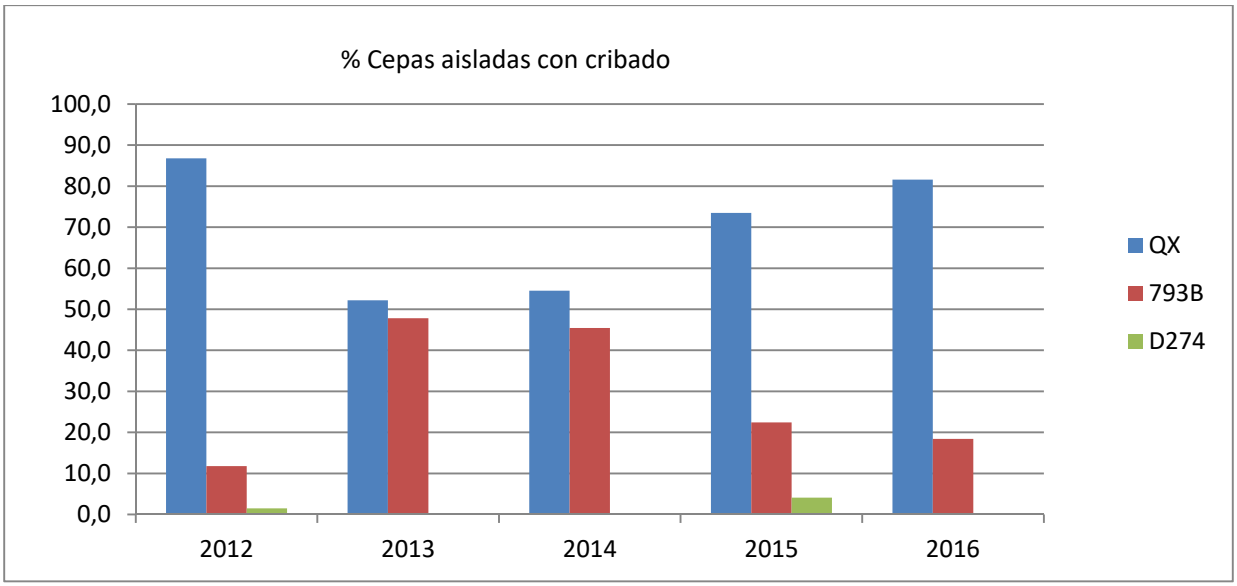

Figura 5. % de Identificaciones por cepa por año excluyendo resultados con vacunación homóloga o sin plan vacunal conocido.

Para poder mostrar de la manera más clara posible los hallazgos de cepas de campo, se han cribado los datos excluyendo las muestras que recibieron vacunaciones homólogas a las cepas encontradas (QX, 793B, D274, Mass) o aquellas muestras en donde el plan vacunal no fue suministrado, adicionalmente se han eliminado los resultados de cepas vacunales sin presencia de cepas de campo homólogas (Arkansas) o cepas de campo sin disponibilidad de vacunas homólogas (Italy02, D1466 y Xindadi). Esto nos permite ver que la cepa QX de campo sigue siendo el mayor desafío, habiéndose producido un incremento durante los años 2015 y 2016, luego de su disminución en los años 2013 y 2014.

Los resultados mostrados demuestran que la técnica de qPCR Multiplex utilizada es una herramienta muy valiosa ya que nos permite identificar más de una cepa por muestra en caso de estar presentes, permitiendo una visión más completa de la epidemiología, especialmente cuando es normal identificar cepas de origen vacunal debido a la elevada presión de vacunación.

BIBLIOGRAFÍA

BLANCO, A., ANTILLÉS, N., CAMPRUBÍ, Q., JOVÉ, R. y BIARNES, M. (2015) Bronquitis Aviar: Epidemiología molecular y evolución de los diferentes genotipos predominantes en España desde 2011. Comunicación LII Simposio Científico Avicultura

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

FRANZO, G., NAYLOR, C. J., LUPINI, C., DRIGO, M., CATELLI, E., LISTORTI, V., PRESENTE, P., GIOVANARDI, D., MORANDINI, E. and CECCHINATO, M. (2014) Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype´s disappearance. *Vaccine* 32: 6765-6767.

MONNE, I., CATTOLI, G., JONES, R., WORTHINGTON, K and WIJMENGA, W. (2008) QX GENOTYPES OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS CIRCULATING IN Europe. *The Veterinary Record* 163: 606-607.

WORTHINGTON, K.J., CURRIE, R.J.W. and JONES, R.C. (2008) A reverse transcriptase-polymerase chain reaction suvey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathology* 37: 247-257.