

GENOTIPIFICACIÓN DEL SEGMENTO B DE CEPAS MUY VIRULENTAS DE VIRUS DE ENFERMEDAD DE GUMBORO

J. Toskano*¹, I. Nuñez¹ y N. Majó^{1,2}

¹Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España; ²Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España.

Abstract

Genotyping of segment B of Very Virulent strains of Infectious Bursal Disease.

The complete segment B of seven strains of very virulent Infectious Bursal Disease Virus strains (vvIBDV) was genotyped. The strains came from broilers bred in several Spanish regions in different years, and it included the strains responsible for the first outbreaks in Spain at the beginning of the nineties. These sequences were compared with eight sequences of vvIBDV from different origins, three attenuated classic strains and an antigenic variant strain. On the basis of the analysis of segment B, all the vvIBDV strains in the study presented high similarity among them. In addition, there were 17 unique amino acid substitutions in the vvIBDV strains with respect to the attenuated strains analyzed. These results would support the hypothesis that the VP1 could play an important role in the virulence of the virus.

Resumen

Se amplificó y analizó el segmento B completo de siete cepas muy virulentas del virus de la enfermedad de Gumboro (vvIBDV), provenientes de lotes de pollos de engorde de distintas regiones españolas y de diferentes años, incluyendo cepas aisladas en los primeros brotes que ocurrieron en España a principios de los 90. Estas secuencias fueron alineadas con secuencias de ocho vvIBDV de diferentes orígenes, de tres cepas clásicas atenuadas y de una cepa variante antigénica. En base al análisis del segmento B, todas las cepas vvIBDV del estudio presentaron una elevada similitud entre ellas. Además, se encontraron 17 sustituciones aminoacídicas únicas en las cepas vvIBDV respecto a las cepas atenuadas analizadas. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que la VP1 podría jugar un papel importante en la virulencia del virus.

1. Introducción

La enfermedad de Gumboro (IBD) es causada por un virus miembro de la familia Birnaviridae, del género Avibirnavirus (Brown & Skinner, 1996; Van den Berg, 2000). Posee una cápside icosaédrica de aproximadamente 60 nm y no presenta envuelta (Dobos et al., 1979). El genoma esta compuesto por una doble cadena de RNA bisegmentada. El segmento A codifica para las proteínas VP2, VP3 y VP4 (Azad et al., 1985; Hudson et al., 1986), siendo las dos primeras proteínas estructurales y la VP4 una proteasa viral (Brown & Skinner, 1996; Sanchez & Rodriguez, 1999). El segmento A también codifica para la proteína no estructural VP5 de aproximadamente 17 kDa, que cumple un papel importante en el proceso de patogénesis (Yao et al., 1998). El segmento B codifica para una proteína de 90 kDa conocida como VP1. Esta proteína tiene actividad RNA polimerasa dependiente de RNA y es responsable de la replicación del genoma y de la síntesis del RNA mensajero (Spies et al., 1987). Se conoce que los determinantes antigénicos específicos de serotipo y responsables de la inducción de anticuerpos neutralizantes están situados en el VP2 (Becht et al., 1988), y por este motivo, desde finales de los años ochenta y durante la década de los noventa, se creía que los principales factores de virulencia de este agente vírico se encontraban localizados básicamente en esta proteína. Posteriormente, y mediante sistemas de genética reversa, Boot y colaboradores (Boot et al., 2000), demostraron que la sustitución de la VP2 entre un fenotipo clásico y un vv no resultaba en un incremento de virulencia del virus mosaico obtenido y sugirieron que la VP2 no era el único determinante de virulencia. Recientemente, algunos autores han sugerido que la proteína VP1 no solo podría tener un papel en la eficacia de la replicación vírica si no también en la virulencia (Boot et al., 2000; Islam et al., 2001; Liu & Vakharia, 2004; Zierenberg et al., 2004).

El objetivo de este trabajo fue identificar los cambios en el gen de la VP1 que podrían explicar las diferencias en cuanto a virulencia entre las cepas vvIBDV y cepas atenuadas. Además, el estudio

de diferentes cepas vvIBDV aisladas en España en los últimos años podría permitir conocer la evolución temporal de las mismas.

2. Materiales y Métodos

Cepas del estudio

Para el estudio del segmento B se utilizaron 7 cepas vvIBDV españolas, cuyas características se resumen en la tabla 1 y la cepa vacunal atenuada D78.

Cepa IBDV	Clasificación	Procedencia	Año de Aislamiento
GIRONA	Muy virulenta	Girona	Inicios de los 90
AUXAM	Muy virulenta	Islas Baleares	Inicios de los 90
SP/31/02	Muy virulenta	Andalucía	2002
SP/50/02	Muy virulenta	Galicia	2002
AP/1296-1/04	Muy virulenta	Castilla León	2004
CR/21-1/05	Muy virulenta	Islas Baleares	2005
CR/60/06	Muy virulenta	Cataluña	2006

Tabla 1. Procedencia y año de aislamiento de las cepas vvIBDV estudiadas.

Amplificación del segmento B y secuenciación

El RNA viral fue purificado a partir de 150µl del sobrenadante con un kit de extracción de RNA comercial (Nucleo Spin ®RNA Virus. (Macherey-Nagel). El segmento B fue amplificado en 3 fragmentos utilizando 3 pares de primers (Kong et al., 2004). El cDNA de cada fragmento fue obtenido mediante RT-PCR en un solo paso utilizando el kit SuperScript™III OneStep RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen Corporation). El producto de PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% usando bromuro de etidio para el revelado. Para la cuantificación y purificación del cDNA se utilizó el Kit MinElute Gel Extraction (Qiagen, Inc). Una vez obtenido el fragmento purificado el cDNA fue clonado en el sistema Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning (Invitrogen Corporation). El inserto fue verificado por PCR y extraído del plásmido con el kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). Los productos extraídos fueron secuenciados utilizando el kit ABI PRISM Big Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing ready reaction (PE Biosystems). Los resultados de la secuenciación fueron analizados con el programa ABI 3100 Avant (PE biosystem) con el método dideoxy-mediate Chain-terminations. El ensamblaje de las secuencias se realizó mediante el programa informático ChromasPro y su alineamiento con el programa CLUSTALW. El análisis filogenético se llevó a cabo con el programa MEGA versión 3.1 mediante el método Neighbor-joining con 1000 repeticiones para obtener mayor fiabilidad. Se seleccionaron secuencias completas del gen VP1 de distintas cepas ya publicadas en el Genbank, para su comparación con las secuencias obtenidas. Las cepas fueron: 2512W(Accesión nº AF083092), Cu-1(AF362775), BD 3/99(AF362770), OKYM(D49707), IL4(AF083094), Tasik(AF322445), HK46(AF092944), UK661(X92761), D6948(AF240687), HOL(DQ679811), Var E(AF133904).

3. Resultados

El árbol filogenético resultante de los análisis de las secuencias aminoacídicas de la VP1, mostró que todas las cepas vvIBDV, excepto la SP/31/02, se agrupaban en un mismo *cluster* (Figura 1). En este *cluster* de cepas vvIBDV, se observaban dos grupos, uno de ellos reunía a las cepas que ocasionaron los primeros brotes en España (AUXAM y GIRONA), junto con la cepa UK661 de Reino Unido y otras cepas vvIBDV más modernas. El otro grupo de cepas vvIBDV se encontraba formado por cepas vvIBDV aisladas en España en estos últimos años. Las cepas variantes antigénicas y cepas atenuadas se agruparon en un *cluster* aparte.

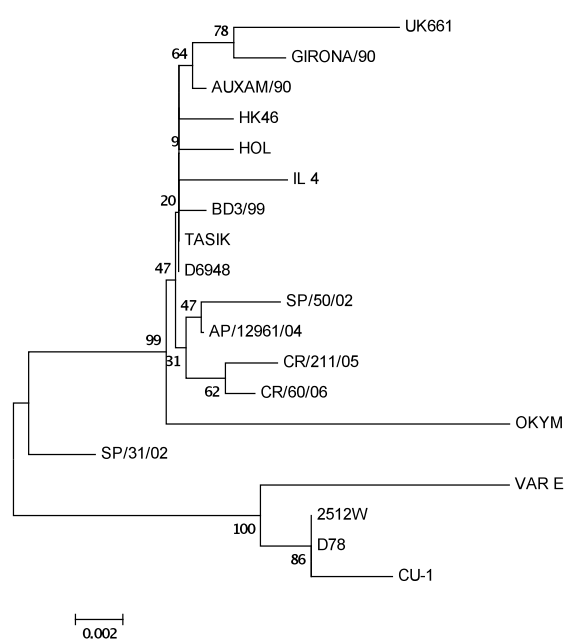


Figura 1. Árbol filogenético basado en las secuencias de aminoácidos de la VP1 de las cepas españolas y otras cepas vvIBDV de diferentes orígenes, elaborado con el método Neighbor-joining, con 1000 repeticiones.

Las distancias filogenéticas del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cepas vvIBDV españolas, con la cepa vvIBDV de referencia D6948, muestran una similitud alta, que varía desde 99 al 99,8%. Por otro lado, la similitud entre las cepas españolas de los años recientes (2002 al 2006) y las cepas que originaron los primeros brotes fue del 99 al 99.7% excepto la cepa SP/31/02 que mostró una similitud de 98.9%.

En cuanto al análisis detallado de los cambios aminoacídicos, se observaron 17 sustituciones aminoacídicas comunes en las cepas vvIBDV frente a las cepas clásicas atenuadas. Además se identificaron 11 sustituciones presentes sólo en las cepas españolas, dos de las cuales 337(I→K) y 341(P→Q) también están presentes en la cepa UK661. Cabe remarcar que en las cepas atenuadas se identificó una sustitución en la posición 13(K→T) que no se observa en las cepas vv y En la cepa variante antigénica.

4. Discusión y Conclusiones

El análisis del segmento B de las cepas vvIBDV, demostró que se trata de una parte del genoma altamente conservada, en cepas vvIBDV provenientes de diferentes países y aisladas en diferentes años. En el caso de las cepas españolas, cabe destacar que las cepas aisladas en los primeros brotes (años 90) presentan una gran similitud con las primeras cepas vvIBDV europeas, mientras que cepas vvIBDV españolas aisladas en estos últimos años ya han evolucionado, formando un grupo independiente, si bien no se han observado sustituciones aminoacídicas únicas de este grupo.

Por otra parte, el presente estudio demuestra que existen cambios aminoacídicos únicos en el segmento B, de las cepas vvIBDV respecto a las atenuadas. Estos resultados confirman la tesis del trabajo de Islam et al. (2001) que ya apuntaron la posibilidad que los cambios aminoacídicos que se encontraban al comparar cepas vvIBDV y cepas clásicas atenuadas podrían estar involucrados en el aumento en la virulencia (Islam et al., 2001).

5. Bibliografía

- Azad, A. A., et al. (1985). "The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus." *Virology* 143(1): 35-44.
- Becht, H., et al. (1988). "Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus." *J Gen Virol* 69 (Pt 3): 631-40.
- Boot, H. J., et al. (2000). "Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype." *J Virol* 74(15): 6701-11.
- Boot, H. J., et al. (2000). "Generation of full-length cDNA of the two genomic dsRNA segments of infectious bursal disease virus." *J Virol Methods* 84(1): 49-58.
- Brown, M. D., et al. (1996). "Coding sequences of both genome segments of a European 'very virulent' infectious bursal disease virus." *Virus Res* 40(1): 1-15.
- Dobos, P., et al. (1979). "Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes." *J Virol* 32(2): 593-605.
- Hudson, P. J., et al. (1986). "Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus." *Nucleic Acids Res* 14(12): 5001-12.
- Islam, M. R., et al. (2001). "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(12): 2481-92.
- Kong, L. L., et al. (2004). "Sequence analysis of both genome segments of two very virulent infectious bursal disease virus field isolates with distinct pathogenicity." *Arch Virol* 149(2):425-34.
- Liu, M., et al. (2004). "VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo." *Virology* 330(1): 62-73.
- Sanchez, A. B., et al. (1999). "Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis." *Virology* 262(1):190-9.
- Spies, U., et al. (1987). "Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products." *Virus Res* 8(2): 127- 40.
- Van den Berg, T. P. (2000). "Acute infectious bursal disease in poultry: a review." *Avian Pathol* 29: 175-194.
- Yao, K., et al. (1998). "Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions." *J Virol* 72(4): 2647-54.
- Zierenberg, K., et al. (2004). "Generation of serotype 1/serotype 2 reassortant viruses of the infectious bursal disease virus and their investigation in vitro and in vivo." *Virus Res* 105(1): 23-34.