

Detección rápida y cuantificación de diferentes serotipos europeos del virus de la Bronquitis infecciosa aviar mediante RT-PCR cuantitativa

H.NAJAFI¹, M.NOFRARÍAS², M.CORTEY², S.PINA², R.VALLE², R.SÁNCHEZ^{2*} y N. MAJÓ^{2,3}

¹Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Tehran, Iran.

²IRTA, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRSA, IRTA-UAB), Campus de la Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, España.

³Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra, Barcelona, España.

Introducción y Objetivo

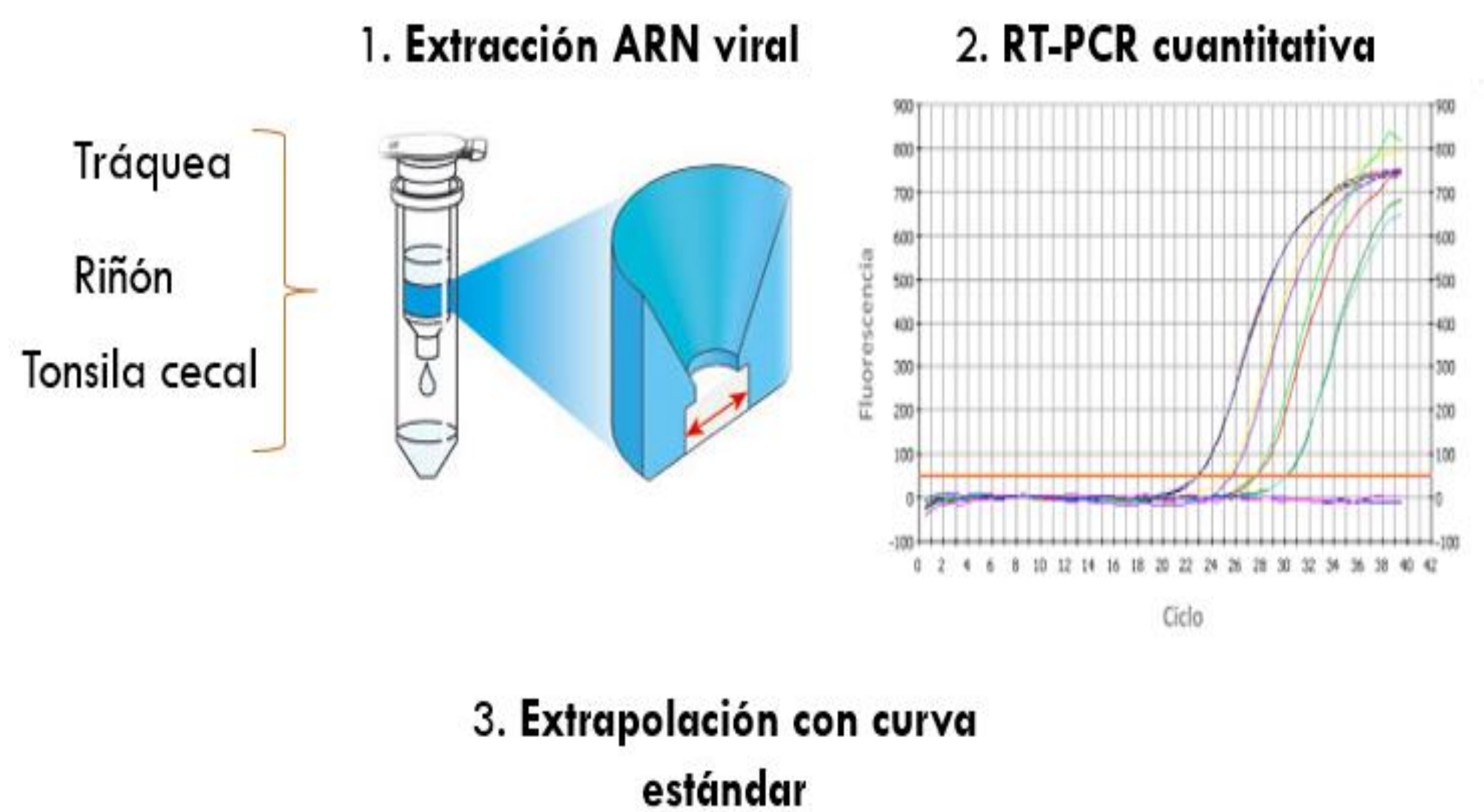
La bronquitis infecciosa aviar (IB) es una enfermedad de las aves presente mundialmente que produce serias consecuencias económicas. Por ello, es importante **diferenciarla rápidamente de otras enfermedades respiratorias aviares**.

La estandarización de una **RT-PCR cuantitativa** (RT-qPCR) que presente como diana el locus 5'-UTR del genoma viral, una región altamente conservada, permitiría una mayor **sensibilidad de detección** que la RT-PCR convencional. Asimismo, permitiría **cuantificar la carga viral** presente en la muestra, facilitando el control de la enfermedad.

El objetivo del presente estudio es **determinar la capacidad de detección y cuantificación de las cepas europeas de IB más prevalentes en Europa (M41, Italy 02, QX, 4/91)** mediante el uso de una RT-qPCR que presenta como diana la región **5'-UTR** del genoma de IBV

Materiales y métodos

El líquido alantoideo de embriones SPF infectados con la cepa de referencia **M41** y los serotipos europeos **Italy 02, QX y 4/91**, así como muestras de tráquea, riñón y tonsila cecal positivas a IB obtenidas de campo fueron testadas mediante RT-qPCR con el uso de *primers* y sonda TaqMan específicos de la región 5'-UTR [1,2]



Resultados y discusión

La técnica de RT-qPCR con el uso de *primers* específicos de la región 5'-UTR del genoma de IBV fue capaz de **detectar** la cepa de referencia M41, así como las cepas de IBV más prevalentes en Europa (Italy 02, QX, 4/91) **a partir del líquido alantoideo** y sobre **muestras congeladas obtenidas de campo** (Tabla 1).

El uso de la RT-qPCR también **permitió la cuantificación de la carga viral** presente en las muestras. El número de copias de ARN vírico presente en cada muestra pudo ser determinada mediante extrapolación a la curva estándar generada a partir de diluciones seriadas del producto 5'-UTR de la cepa M41. El ensayo tiene un **límite de detección y cuantificación de 100 copias por reacción** (Figura 1).

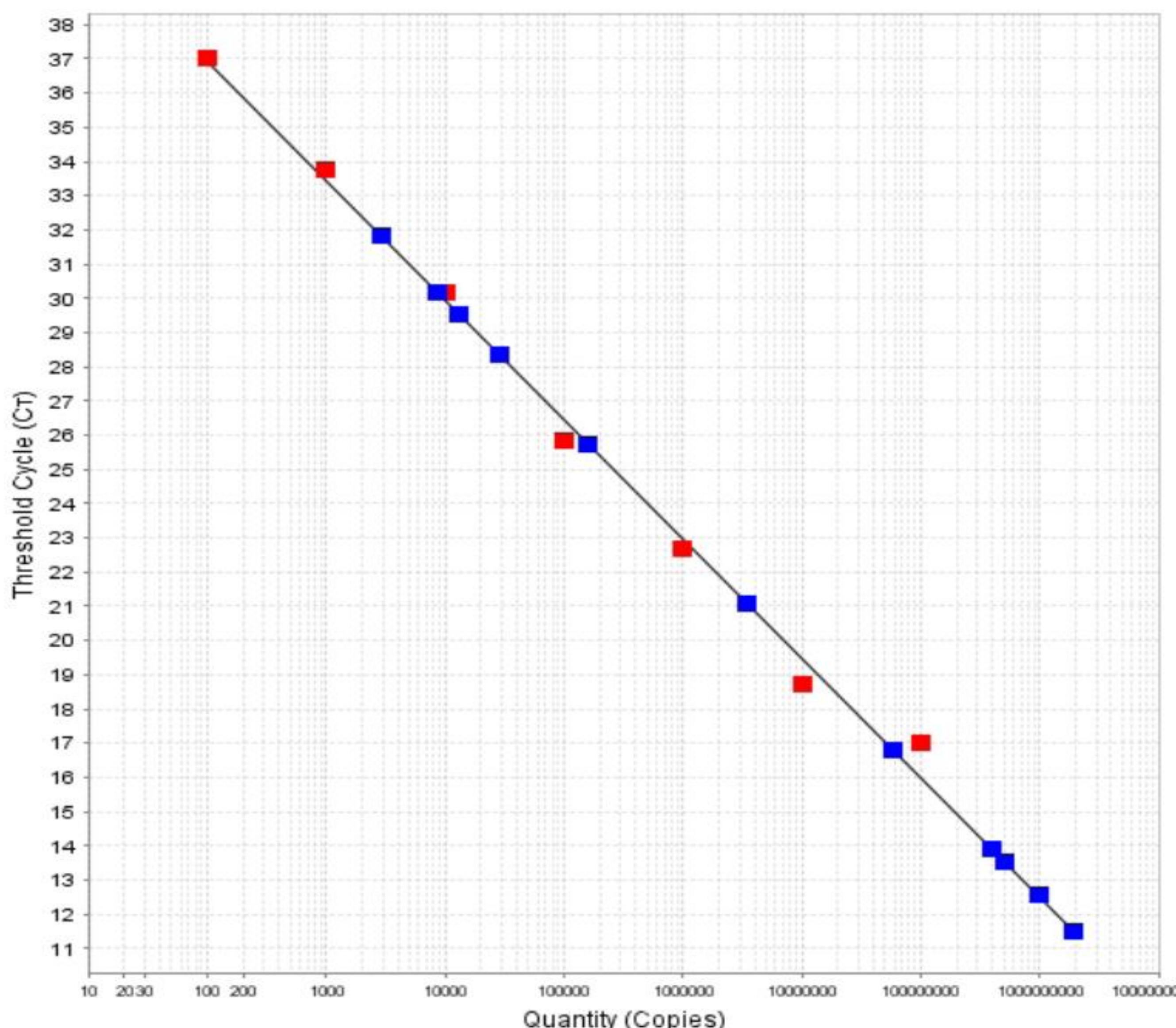


Figura 1. Curva estándar generada a partir de diluciones seriadas del producto 5'-UTR de la cepa de referencia M41 (rojo) y extrapolación de las muestras (azul)

Genotipo	Tipo de muestra	Año	Ct
M41	Líquido alantoideo	-	11,5268
4/91	Líquido alantoideo	2012	12,5482
Italy 02	Líquido alantoideo	2011	13,9208
QX	Líquido alantoideo	2011	13,5583
M41	Tráquea	2012	28,3731
M41	Tráquea	2014	29,5584
4/91	Tráquea	2014	25,7591
QX	Tráquea	2012	21,0989
QX Xindadi	Riñón	2013	16,8088
Italy 02	Tonsila cecal	2013	31,8435
Italy 02	Tonsila cecal	2013	30,1523

Tabla 1. Relación del tipo de muestra con valor Ct obtenido.

Conclusiones

El protocolo de RT-qPCR con el uso de *primers* y sonda específicos de la region 5'-UTR puede ser usada **satisfactoriamente para detectar y cuantificar los serotipos de IBV más prevalentes en Europa (Italy 02, QX, 4/91)** directamente a partir de muestras obtenidas de campo.



Permite obtener una mayor sensibilidad de detección, así como cuantificar la carga viral de la muestra.

Referencias

- CALLISON *et al.*, (2006) *Journal of Virological Methods*, **138**:60-65.
- ROH *et al.*, (2014) *Avian Diseases*, **58**:398-403.