

COM-03

Bronquitis aviar: Epidemiología molecular y evolución de los diferentes genotipos predominantes en España desde 2011

A. BLANCO *, N. ANTILLÉS, Q. CAMPRUBÍ, R. JOVÉ and M. BIARNES

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

*e-mail: ablanco@cesac.net

La Bronquitis Infecciosa Aviar (IB) es una enfermedad altamente contagiosa y una de las mayores causantes de pérdidas económicas en avicultura de producción a nivel mundial. El objetivo de este estudio fue el seguimiento de la evolución y el desplazamiento de los diferentes genotipos detectados en España, desde 2011 hasta el primer semestre de 2015, mediante el uso de técnicas de biología molecular: Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y secuenciación parcial del gen S1. Durante dicho periodo se analizaron un total de 1029 muestras, siendo un 70% de ellas positivas a IB. El análisis filogenético de dichas muestras reveló que la prevalencia anual para los tres genotipos predominantes desde 2011 hasta el primer semestre de 2015 fue de 35,2%, 11,2%, 1,2%, 1,1% y 2% para Italy02, 35,2%, 60%, 27,2%, 7,8% y 27,3% para QX y 22,2%, 28,8%, 66,7%, 90,4% y 63,6% para el grupo 793/B (4/91, 793/B, 1/96 y CR88). Se tiene que considerar que durante el periodo 2013-2015 la gran mayoría de muestras recibidas para detección de IBV, eran muestras de control de vacunación, hecho que hace aumentar la prevalencia total del grupo 793/B. Otro dato relevante es la existencia de los dos clústers de QX (QX y QX Xindadi) circulantes en España y en países vecinos. En España esta cepa de QX recombinante presenta una similitud nucleotídica de un 92% respecto a las cepas QX clásicas y un 98% respecto a la cepa original aislada en Xindadi, Guandong, China, en 2009. Desde la fecha de su aparición en febrero de 2012, se observa una tendencia a desplazar las cepas clásicas anteriores, siendo detectada en el 66,7% de los casos de QX en 2012, en el 84% de los casos de QX en 2013 y en el 72,7% de los casos de QX en 2014, mientras que en el primer semestre de 2015 esta tendencia parece estar cambiando siendo detectada en el 23,8% de los casos de QX. Estas cepas recombinantes con gran similitud a la cepa aislada en Xindadi, parecen tener diferentes patrones de recombinación y diferente patología en los países donde se está aislando. Esta diferente patología es ahora objeto de estudio en el programa europeo Cost Action FA1207 sobre el control de Coronavirus Aviáres. De igual manera, una herramienta para la diferenciación de las cepas del grupo 793/B vacunales o de campo, es necesaria para un mejor entendimiento de la evolución de este virus ante la presión de las diferentes estrategias de vacunación.

The avian Infectious Bronchitis (IB) is a highly contagious disease and one of the major causes of economic losses to the poultry industry worldwide. The aim of this study was the surveillance of evolution and distribution of the different IB isolates detected within the Spanish fields from 2011 to the first six months of 2015 by means of molecular biology techniques: Retrotranscription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and partial sequencing of the S1 gen.

During this period 1029 samples were analysed leading to a 70% of positive IB samples. The phylogenetic analysis revealed that the annual prevalence for the three predominant genotypes since 2011 to the first six months of 2015 were 35.2%, 11.2%, 1.2%, 1.1% y 2% for Italy02, 35.2%, 60%, 27.2%, 7.8% y 27.3% for QX and 22.2%, 28.8%, 66.7%, 90.4% y 63.6% for 793/B group (4/91, 793/B, 1/96 y CR88). It has to consider that during 2013-2015 the vast majority of the samples received for IB detection were for vaccination control, that fact rise the total prevalence of 793/B group. Another relevant data is the existence of two QX Clusters (QX and QX Xindadi) which circulate in Spain and neighbour countries. In Spain this recombinant QX strain shows a nucleotidic identity of 92% with the previous classic QX and 98% of identity with a 2009 Xindadi, Guandong, China isolate. Since the first detection of this strain in 2012 February , a tendency to replace the classical QX strains has been detected with 66.7% of the QX cases in 2012, 84% of the QX cases in 2013 and 72.7% of the QX cases in 2014, while in the first half of 2015 this trend seems to be changing being detected in 23.8% of QX cases. These recombinant strains with great similarity to the strain isolated in Xindadi, seem to have different patterns of recombination and different pathology in countries where being insolated. This different pathology is now under consideration in the European programme Cost Action FA1207 on the control of Avian Coronavirus. Similarly, a tool for differentiating vaccine or field strains of 793/B group, is necessary for a better understanding of the evolution of this virus under pressure from the different vaccination strategies.

Palabras clave: Bronquitis Infecciosa Aviar; Genotipo; S1; recombinante; similitud nucleotídica

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.

Fue descrito por primera vez en 1930 en Dakota del norte, USA. Desde los años 50 se ha constatado su gran tendencia a introducir cambios antigénicos produciendo nuevos serotipos y/o genotipos reportándose más de 60 diferentes. Ciertamente es, que se cree firmemente que una gran cantidad de serotipos o genotipos no llegan a ser detectados o se detectan esporádicamente y desaparecen 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 serológicas como la Virus Neutralización o técnicas moleculares como la secuenciación y posterior análisis filogenético de la secuencia nucleotídica del gen S1. La elección de la técnica dependerá del objetivo del estudio. La tipificación

de las cepas del virus de IB 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 fue el seguimiento de la evolución y el desplazamiento de los diferentes genotipos detectados en España, desde 2011 hasta el primer semestre de 2015, 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 720 muestras positivas a IB correspondientes a controles de vacunación o muestras con sospecha de IB.

Materiales y métodos

Muestras

Los análisis se realizaron a partir de muestras de tráquea o hisopos traqueales y/o riñón y/o tonsilas cecales 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 720 cepas de IB.

En el gráfico 1 se muestra la distribución de las muestras dependiendo del tipo de ave.

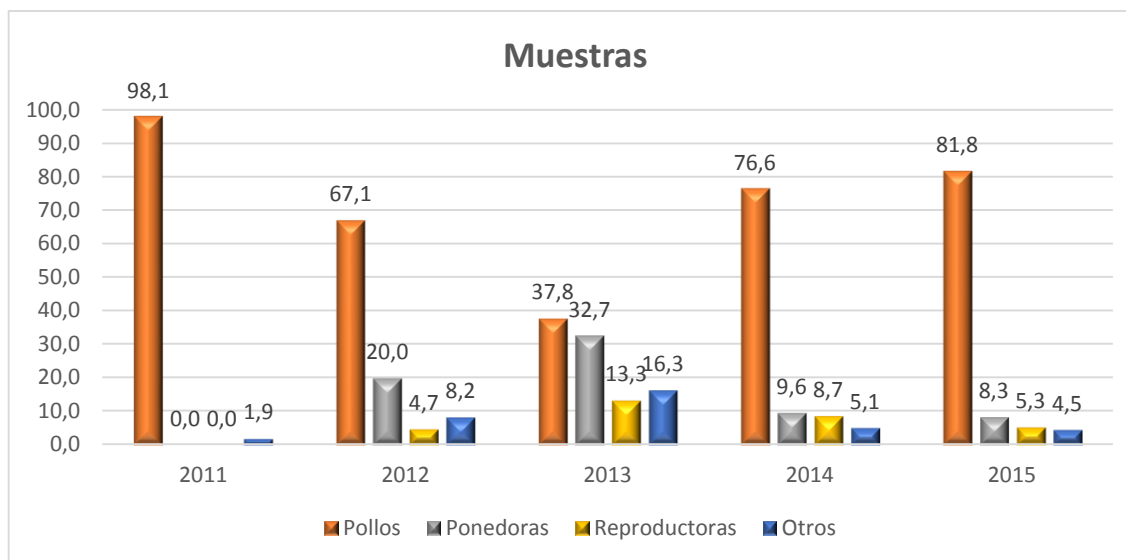


Gráfico 1. Distribución de las muestras según tipo ave.

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 ExoProStar 1-step (GE Healthcare) si provenía del producto de PCR o mediante el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-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 de 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 los aislados pertenecientes a los diferentes grupos se utilizó el programa BioEdit 7.1.3.0. (Tabla 1)

Resultados y discusión

Tal y como se muestra en el gráfico 2, el análisis filogenético de las 720 muestras reveló que, la prevalencia anual para los tres genotipos predominantes desde 2011 hasta el primer semestre de 2015 fue de: 35,2%, 11,2%, 1,2%, 1,1% y 2% para Italy02, 35,2%, 60%, 27,2%, 7,8% y 27,3% para QX y 22,2%, 28,8%, 66,7%, 90,4% y 63,6% para el grupo 793/B (4/91, 793/B, 1/96 y CR88). Debe tenerse en cuenta que durante el periodo 2013-2015 la gran mayoría de muestras recibidas para detección de IBV, eran muestras de control de vacunación, hecho que hace aumentar la prevalencia total del grupo 793/B.

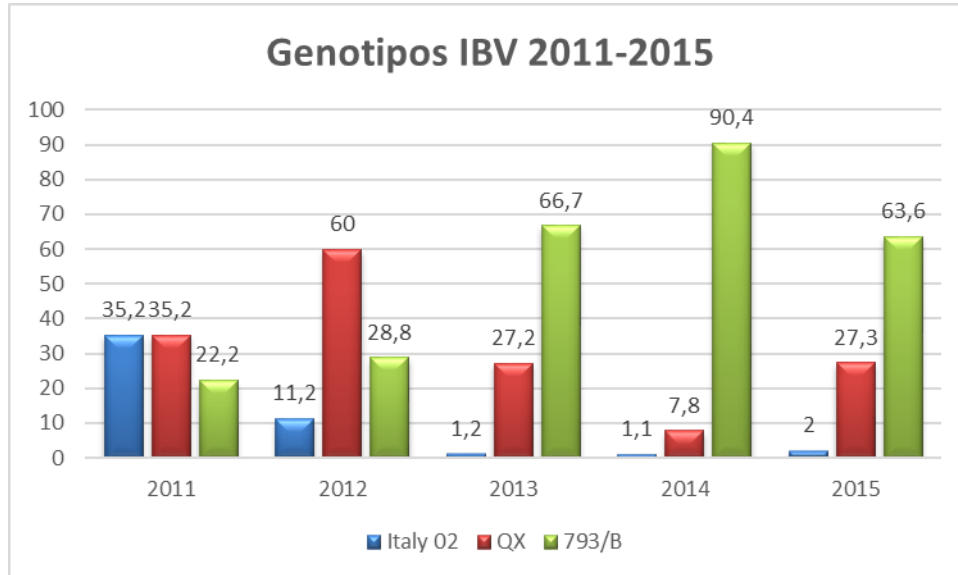


Gráfico 2. Distribución de los genotipos de IBV desde 2011 a 2015.

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 que presentó una identidad del 92% con las cepas de QX anteriores y al que se denominó internamente 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 la fecha de su aparición en febrero de 2012, se observa una tendencia a desplazar las cepas clásicas anteriores, siendo detectada en el 66,7% de los casos de QX en 2012, en el 84% de los casos de QX en 2013 y en el 72,7% de los casos de QX en 2014, mientras que en el primer semestre de 2015 esta tendencia parece estar cambiando siendo detectada en el 23,8% de los casos. En el gráfico 3 se muestra la frecuencia anual de QX y QX Xindadi.

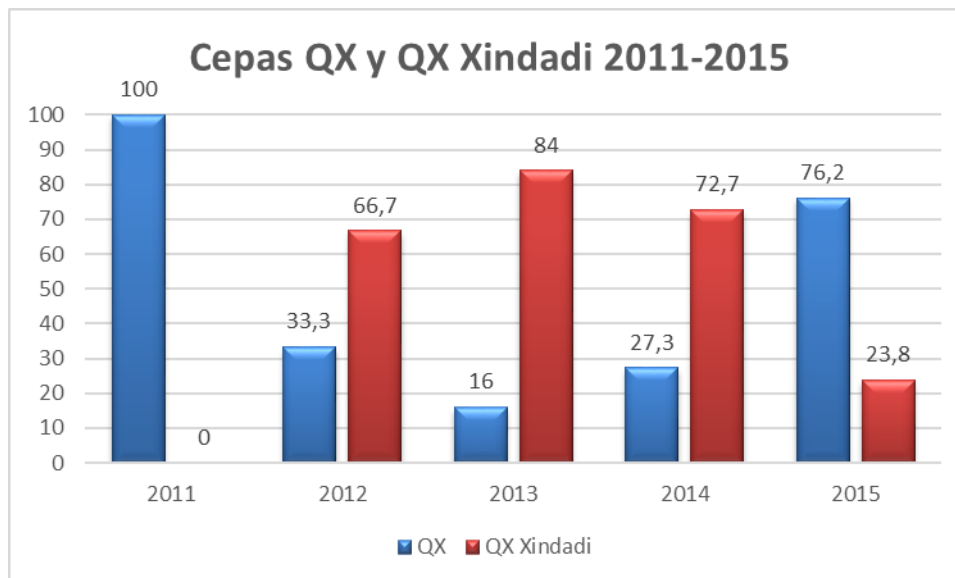


Gráfico 3. Distribución de QX y QX Xindadi desde 2011 a 2015.

En la Tabla 1 se muestra la matriz identidad para cuatro aislados y dos cepas de referencia, la cepa QX clásica y la cepa QX aislada en Xindadi en 2009. Los aislados de elección para elaborar la matriz identidad fueron uno de cada grupo diferente siendo la cepa Spain/11/1307 el primer aislado de QX que se secuenció en el CESAC y la cepa Spain/12/1384 el primer aislado secuenciado en el CESAC que se clasificaba en el grupo que denominamos QX Xindadi. El aislado Spain/12/4741 y el aislado Spain/13/8335-3 tienen ubicaciones diferentes a los otros dos grupos y por ello se han incluido en la matriz identidad. En color verde se muestra la máxima identidad entre cepas.

Matriz Identidad	Spain/11/1307	Spain/12/1384	Spain/12/4741	Spain/13/8335-3	QX(D388) (DQ674739)	QX 2009/Xindadi (GU938442.1)
Spain/11/1307	ID	0,908	0,912	0,964	0,988	0,891
Spain/12/1384	0,908	ID	0,885	0,885	0,908	0,982
Spain/12/4741	0,912	0,885	ID	0,883	0,906	0,885
Spain/13/8335-3	0,964	0,885	0,883	ID	0,970	0,870
QX(D388) (DQ674739)	0,988	0,908	0,906	0,970	ID	0,897
QX 2009/Xindadi(GU938442.1)	0,891	0,982	0,885	0,870	0,897	ID

Tabla 1. Matriz identidad.

Se observa la aparición esporádica de algunas cepas diferentes a las habitualmente encontradas que al alinearlas en el Blast (GenBank) muestran identidades inferiores al 97% con las secuencias registradas (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=Blast_Search&LINK_LOC=blasthome). Esta aparición esporádica de cepas ligeramente diferentes a las habituales se da también en otros genotipos. Este hecho se relaciona con la alta capacidad de mutación y recombinación del virus de la bronquitis aviar. Estas cepas pueden no adaptarse al medio y/o al huésped y desaparecer o por el contrario adaptarse correctamente y formar un nuevo clúster genético.

En relación a las nuevas cepas donde hay una buena adaptación, nos encontramos, por ejemplo, con las cepas correspondientes al clúster de las QX Xindadi. A nivel Europeo, existe una red que conecta a expertos científicos en coronavirus aviarios. Esta red, Cost Action FA1207, se centra en facilitar la cooperación entre científicos, la armonización de la nomenclatura y clasificación y la vigilancia de los

coronavirus aviaries a nivel europeo. Este programa impulsa la promoción a nivel mundial mediante un gran meeting bienal de expertos en el tema para lograr una mayor propagación de los avances conseguidos a nivel europeo y la comparación con la situación en el resto del globo. Uno de los temas ahora tratados en este programa es la aparición de cepas QX Xindadi por Europa.

Se ha reportado diferente comportamiento en las cepas de los diferentes países, así como diferencias a nivel de patrones de recombinación. Se están llevando 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. Nuestro laboratorio está en estos momentos implicado en un estudio sobre estas cepas en España e Italia junto con el CRESA (Belaterra), IZSLER (Brescia) y el MAPS de l'Università degli Studi di Padova (Padova). Los resultados preliminares indican que las QX Xindadi de estos dos países son fruto de la recombinación entre las cepas QX y cepas del grupo 793/B. Así como una diferencia en la patogenicidad y tropismo, ya que en España, en algunos de los casos donde fue detectado el genotipo QX Xindadi en recría de ponedoras, los técnicos de campo sugirieron una menor patogenicidad, y en Italia los reportes coinciden en daños renales causados por estas cepas, no obstante, esta suposición debe ser analizada en más profundidad y debe acompañarse de un estudio de desafío en aves SPF.

De igual manera, una herramienta para la diferenciación de las cepas del grupo 793/B vacunales o de campo, es necesaria para un mejor entendimiento de la evolución de este virus ante la presión de las diferentes estrategias de vacunación.

Referencias

- CAVANAGH, D.** (2005) Coronaviruses in poultry and other birds. Review. *Avian Pathology*, **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.
- 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.
- 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.