

# Bronquitis aviar: Evolución del genotipo QX en España desde 2011.

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

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

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

---

La Bronquitis infecciosa aviar (IB) es una enfermedad altamente contagiosa y una de las mayores causantes de pérdidas económicas en la avicultura de producción a nivel mundial. El objetivo de este estudio fue la comparación de los diferentes aislados de IB del genotipo QX detectados en España desde 2011 hasta el primer semestre de 2014, mediante el uso de técnicas de biología molecular: Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y la secuenciación parcial del gen S1. Durante dicho periodo se analizaron un total de 610 muestras pertenecientes a casos clínicos con sospecha de IB y muestras de control de la vacunación, siendo un 69% de las muestras positivas a IB. El análisis filogenético reveló los valores de prevalencia para el genotipo QX que fueron del 33% en 2011, 52% en 2012, 22% en 2013 y 1,8% en el primer semestre de 2014. En febrero de 2014 aparece un clúster de QX diferente, mostrando una identidad menor (92%) con los aislados previos de QX en España. Este grupo mostró una identidad elevada (98%) con una cepa aislada en Xindadi (China) en 2009. Desde la fecha de su aparición, se observa una tendencia a desplazar las cepas de QX clásicas, siendo detectada en el 65% de los casos de QX en 2012, en el 87,5% de los casos de QX del 2013 y en el 100% de los casos de QX en el primer semestre de 2014.

---

**Palabras claves:** Bronquitis Infecciosa Aviar; clúster; QX; S1; similitud nucleotídica

---

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 to compare the different IB isolates belonging to the QX genotype detected within the Spanish fields from 2011 to the first six months of 2014 by means of molecular biology techniques: Retrotranscription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and partial sequencing of the S1 gen. During this period 610 samples belonging to clinic cases with suspicion of IB and vaccination control, were analysed leading to 69% of positive IB samples. The phylogenetic analysis revealed that QX genotype prevalence was 33% in 2011, 52% in 2012, 22% in 2013 and 1,8% in the first six months of 2014. In February 2012 a different cluster of QX with minor identity (92%) with previous QX Spanish isolates, was detected. This cluster showed a 98% of identity with a 2009 Xindadi (China) isolate. Since the first detection of this strain, a tendency to replace the classical QX strains has been detected with 65% of the QX cases in 2012, 87,5% of the QX cases in 2013 and 100% of the QX cases for the first six months of 2014.

---

**Keywords:** Avian Infectious Bronchitis; cluster; QX; S1; regions of similarity

## 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 llegando en algunos casos al fenómeno conocido como falsas ponedoras.

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. Des de los años 50 se ha constatado su gran tendencia a introducir cambios antigénicos produciendo nuevos serotipos y/o genotipos reportándose más de 60 diferentes. Cierto 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 la Inhibición de la Hemaglutinación, o técnicas etiológicas 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 determinar la evolución observada dentro de un mismo genotipo de IBV, el genotipo QX, en España desde 2011 hasta el primer semestre de 2014, mediante técnicas de biología molecular: Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) y secuenciación parcial del gen S1. Para ello se analizaron 94 cepas pertenecientes al genotipo QX detectadas de muestras de campo analizadas de diferentes zonas de España con sospecha de IB.

## Materiales y métodos

### Muestras

Los análisis se realizaron a partir de muestras de Tráquea y/o hisopos traqueales y/o riñón y/o tonsilas cecales de casos clínicos sospechosos de bronquitis infecciosa 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 94 cepas del genotipo de IB QX cuya distribución se muestra en la Figura 1.

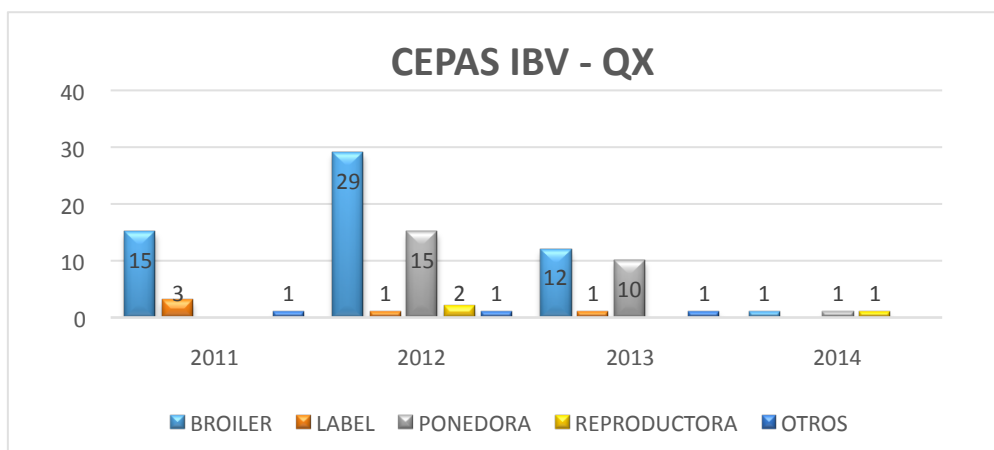


Figura 1. Tipos y distribución de las muestras.

## **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**

En la Figura 2 se muestra el árbol filogenético de las cepas QX analizadas y cepas de referencia. Las cepas de referencia aparecen identificadas por el número de acceso al Genbank. Las cepas analizadas se identifican mediante País de Origen/año/referencia interna del CESAC. Los aislados ubicados en diferentes clústers se muestran en diferente color.

De los resultados obtenidos se observa la presencia de dos grupos mayoritarios de cepas QX, el grupo existente previo al estudio (datos 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 las cepas de este nuevo clúster muestran una tendencia a desplazar las cepas clásicas anteriores, siendo detectadas en el 65% de los casos de QX en 2012, en el 87,5% de los casos de 2013 y en el 100% de los casos de QX en el primer semestre de 2014.

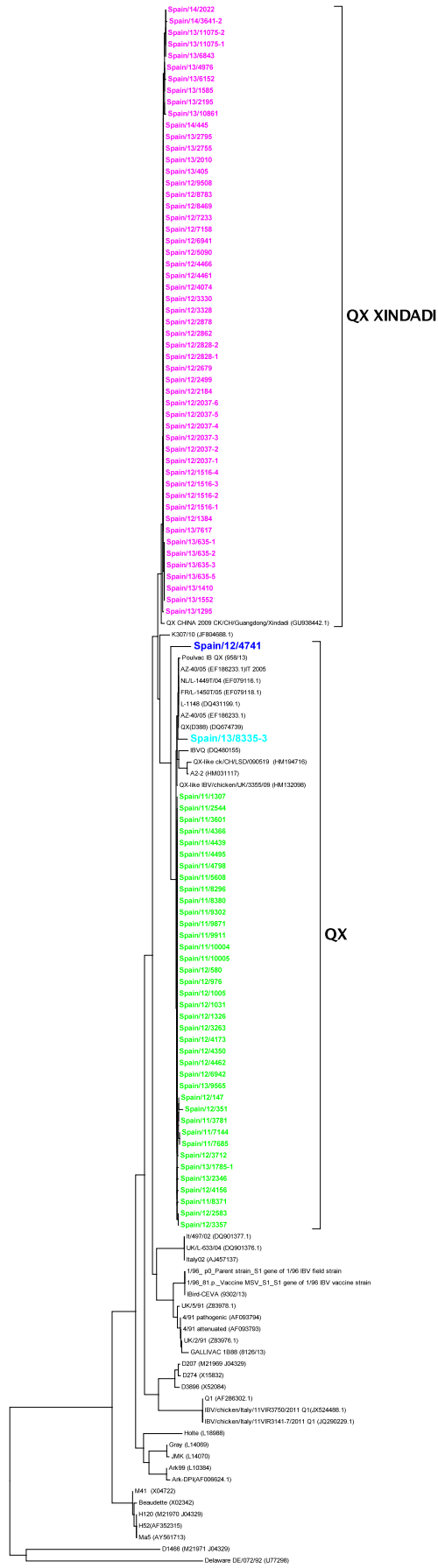


Figura 2. Árbol filogenético.

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.

**Tabla 1. Matriz identidad.**

| Matriz Identidad            | Spain/11/1307 | Spain/12/1384 | Spain/12/4741 | Spain/13/8335-3 | QX(D388)<br>(DQ674739) | QX 2009/Xindadi<br>(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                              |

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=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&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 algunos de los casos donde fue detectado el genotipo QX Xindadi en recría de ponedoras, los técnicos de campo sugirieron una menor patogenicidad, no obstante, esta suposición debe ser analizada en más profundidad y debe acompañarse de un estudio de desafío en aves SPF.

Deberían llevarse a cabo estudios moleculares más amplios sobre el gen de la espícula para poder estudiar en más profundidad estas recombinaciones, su repercusión en cambios aminoácidos y su posible relación con la patogenicidad.

## Referencias

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

**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**: 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.