

APLICACIÓN DE TÉCNICAS BASADAS EN BIOLOGIA MOLECULAR PARA EL DIAGNÓSTICO Y TIPIFICACIÓN DE CEPAS VACUNALES DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA (IBV)

Blas ALI Sánchez Peral, M^a José Rodríguez.

INGENASA. Hermanos García Noblejas 41, 28037. Madrid. Spain.

bsanchez@ingenasa.es; mjrodriguez@ingenasa.es

EL VIRUS

La bronquitis infecciosa es una enfermedad respiratoria sumamente contagiosa que produce grandes pérdidas en la industria avícola. El control de esta enfermedad desde el punto de vista epidemiológico es extremadamente importante, ya que la aparición de nuevos brotes tiene un amplio impacto económico. Esta causada por el virus de la bronquitis infecciosa o IBV. Pertenece al Orden Nidovirales, Familia Coronaviridae. Es un virus con envuelta que presenta un diámetro de 60-200nm, tiene un genoma de 27600nt en forma de RNA de hebra sencilla o RNAss, con polaridad positiva. Se han identificado fundamentalmente tres proteínas específicas del virus: la glicoproteína de membrana (M), la proteína de la nucleocápside (N) y la glicoproteína de la espícula (S). La glicoproteína de la espícula comprende dos subunidades (S1 y S2).

En su ciclo biológico IBV infecta pollos de todas las edades, siendo especialmente patogénico en pollos jóvenes. Los signos clínicos de la enfermedad son principalmente, por la presencia de ruidos respiratorios, jadeos, estertores y tos. Basándose únicamente en los síntomas respiratorios, es difícil diferenciarla de la enfermedad de NewCastle. El cuadro de infección por IBV no presenta síntomas nerviosos aunque también viene acompañado por una disminución de la producción y calidad del huevo que nunca baja hasta cero, la mortalidad que genera como resultado del desarrollo de la enfermedad suele ser menor que en el caso de NewCastle (6). IBV presenta una gran variabilidad genética que explica la existencia de numerosos serotipos víricos y subtipos. El virus infecta a los pollos por vía conjuntival, por inhalación, secreciones respiratorias, desechos de animales infectados, agua contaminada, etc. Los pollos infectados desarrollan los signos entre 36-48 horas a partir del momento de la infección (7). Algunos virus IBV tienen una elevada afinidad o tropismo por el riñón, pudiendo causar incluso daño renal, son las denominadas cepas nefropatogénicas (1, 3, 25, 41). En relación a la patogenicidad, hay evidencias de que el uso de ciertas vacunas puede inducir una reacción severa tras su dosificación (12).

En EEUU existen fundamentalmente tres serotipos de IBV; Massachusetts, Connecticut, y Arkansas 99. En Europa hay algunos *clusters* que comprenden diversas variantes: H52, H120, V1259, V1385, D-274, D207, etc. IBV se considera

un patógeno de distribución mundial. Se han descrito numerosas variantes emergentes en diferentes partes del mundo relacionadas con las anteriores o pertenecientes a una nueva generación de variantes de IBV; Israel, México (9,13), Australia, Nueva Zelanda, Chile (8), Egipto, Marruecos (10), India, Corea (23), Quebec (32), Taiwán (35), China (40), etc.

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Las variantes emergentes hacen necesario el estudio y desarrollo de diferentes técnicas de determinación y diagnóstico. Los procedimientos serológicos más utilizados son el enzoinmunoensayo o ELISA (19), la tipificación mediante estudios serológicos por neutralización con antisueros específicos, y Hemaglutinación o HE (31) en los que la mayor parte de los anticuerpos utilizados en esta prueba son dirigidos contra la glicoproteína S1. En las técnicas de cultivo, la confirmación de la presencia de virus es uno de los objetivos más importantes a través del aislamiento en tejidos infectados de tráquea, pulmones, riñones, (5, 7, 27) etc. Otras técnicas más avanzadas y complejas basadas en biología molecular, permiten la expresión de proteínas de superficie para su caracterización y posterior estudio de patogenicidad y serovigilancia por técnicas de tipificación del virus, que comentaremos a continuación.

Las técnicas basadas en biología molecular y su incorporación al diagnóstico y tipificación de serotipos ha facilitado los estudios, en concreto la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR Múltiplex (39,26) o PCR adaptada a la restricción de fragmentos polimórficos de longitud variable o RFLP PCR (2, 11, 14, 18, 21, 23, 24, 28, 32, 37) que ha resultado muy útil en la diferenciación de serotipos (4, 16, 20, 22, 34, 38, 39) y en el estudio de variantes emergentes (30, 32). La secuenciación automática de amplificadores de IBV ha permitido llevar a cabo estudios filogenéticos (17, 26, 29, 33). Por otro lado, las técnicas más avanzadas de amplificación por PCR a tiempo real permiten diferenciar por ejemplo, las cepas Arkansas, Connecticut, Beaudette y Massachusetts 41 con una especificidad y la sensibilidad muy elevadas (15), con esta técnica es posible cuantificar en una única prueba la cantidad de inicial de RNA y la presencia de cuasispecies virales (15). La mayor parte de los estudios se centran en la región hipervariable de la proteína S1 (16, 17, 21, 34, 36) cuya relación con la patogenicidad y el perfil fenotipo-genotipo parece evidente (34).

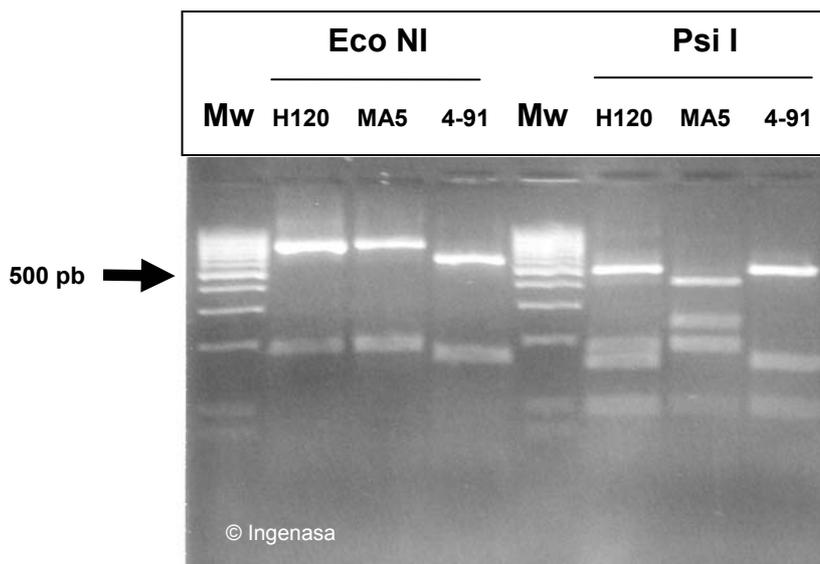
NUEVA TÉCNICA DE TIPIFICACIÓN POR RFLP RT-PCR

En nuestro estudio presentamos un método rápido de diagnóstico y tipificación utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con un paso previo de transcripción o RT-PCR sobre el gen S1. El amplificado es procesado por RFLP, y digerido con enzimas de restricción. Hemos encontrado varios sitios de corte para Eco NI y varias dianas a Psi I con distribución variable dentro de la región amplificada de las cepas estudiadas, que permiten distinguir entre sí las cepas vacunales de IBV ; 4-91, MA5 y H120, las vacunas comerciales más usadas en Europa. En esta aproximación se han utilizado tres cepas vacunales de IBV (4-91, MA5 y H120) de Nobilis®. La extracción de RNA se llevó a cabo mediante el

método clásico de Chomczynski y Sacchi a partir de líofilo resuspendido en PBS estéril. La RT-PCR se desarrolló con el kit comercial SuperScript Invitrogen®, en un solo paso. El tamaño del producto de PCR fue de 757pb. Las cepas vacunales amplificadas se secuenciaron utilizando un sistema de secuenciación automática ABI 373, (Applied Biosystems®). El análisis y la predicción de sitios de restricción se llevó a cabo con de DS Gene 1.5v (Accelrys© software). Para verificar las diferencias entre las cepas 4-91, MA5 y H120 en el gen S1, cada amplificado de 757pb fue digerido con 10 U del Eco NI (10U/μl) y 10 U de Psi I (10U/μl) Fermentas®, de forma individual o con ambas enzimas en el mismo vial. El amplificado fue analizado por electrophoresis de gel de agarose NuSieve® 3:1 (Cambrex Bio Rockland, S.a.) teñido con bromuro de etidio. El gel fue revelado mediante un transiluminador (Fotodyne® 3002) y fotografiado (Polaroid® MP-4).

El análisis de restricción individual sobre el gen S1 de las tres vacunas (4-91, MA5 y H120) reveló la existencia de dos sitios de restricción (Psi I y Eco NI) con distribución variable entre las tres cepas vacúnales. Figura 1

Figura 1. Patrones de restricción de las cepas vacunales

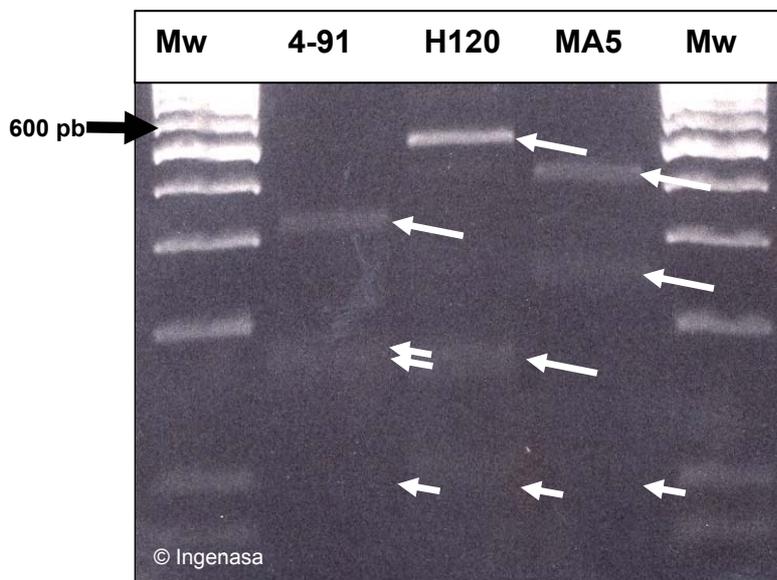


. Mw: Marcador de peso molecular Gene Ruler®
(Fermentas)

La unión de las dos enzimas de restricción mediante digestión doble sobre el gen S1 de las tres vacunas (4-91, MA5 y H120) muestran tres patrones claramente diferentes para cada una de las tres cepas vacunales. La cepa 4-91 tiene una diana Eco NI y dos dianas Psi I; la cepa H120 dos sitios Psi I, y MA5 dos dianas Psi I. Este perfil da lugar a los siguientes fragmentos de restricción, en cada caso: 318, 176, 165, y 98pb en la cepa **4-91**; 494, 165, y 98pb en la cepa **H120** y 410, 249, 98pb en la cepa **MA5**. Figura 2. Respecto a las muestras de campo de IBV recibidas en el laboratorio podemos decir que hasta el momento los patrones de restricción son distintos a los encontrados en las vacunas analizadas; presentan la misma diana Eco NI que las cepas vacúnales pero la

diana Psi I tiene muchas variaciones respecto a las cepas 4-91, MA5 y H120. Por tanto la digestión doble rinde patrones claramente diferenciarles de dichas cepas. (Datos no presentados) que validan este método de tipificación. En sucesivos estudios se tratará de ofrecer más información a cerca de las muestras, de las dianas presentes, así como de la correlación que observamos hasta ahora, en relación con las vacunas.

Figura 2. Patrones de restricción mixta de las cepas vacunales



*

CONCLUSIONES

El objetivo principal de este estudio ha sido de obtener un método rápido de diagnóstico y diferenciación genotípica de las tres vacunas más utilizadas en Europa; H120, la variante de Holanda (serotipo Massachussets); 4-91, variante de Inglaterra y MA5 cepa derivada de la cepa Massachussets. El uso de una técnica común tal como la PCR y el análisis de las mutaciones puntuales por RFLP nos ha permitido diferenciar las cepas vacunales estudiadas. El alineamiento del fragmento correspondiente al gen S1 en varias secuencias: 4406173, gi: 4406174, gi: 4406175, gi: 4406176, gi: 32402577, gi: 32402575 etc. presenta una elevada variabilidad, basada en cambios puntuales, inserciones y deleciones (32), de hecho hay estudios que ponen de manifiesto que determinadas variantes de IBV no se pueden amplificar con oligonucleótidos que son útiles para otras variantes de IBV (22). Es posible encontrar en la región estudiada otros sitios de restricción aunque las variaciones puntuales mostradas en este trabajo nos han parecido las más significativas.

En la mayor parte de estudios de IBV basados en RFLP se han estudiado y analizado nuevas variantes de IBV, comparando homología con cepas ya conocidas: H120, Connecticut, Holte, JMK, Ark, Delaware, SE, Md, Florida...(18, 32, 35, 38), etc. Nos parece interesante conocer en detalle los patrones moleculares de estas vacunas (MA5, H120 y 4-91) y dada la gran

variabilidad que presenta en particular esta región de IBV (gen S1), puede ser una manera de analizar los cambios de posibles variantes emergentes.

Nuestro método permite conocer con certeza los patrones exactos en cada caso. En laboratorios de diagnóstico que no tienen acceso a técnicas de última generación tales como la PCR a tiempo real pueden estar interesados en disponer de un método rápido (también más barato) para discernir y distinguir estos serotipos vacunales de otros aislados silvestres utilizando estas vacunas como control positivo de amplificación (por ejemplo). Obviamente éste método no pretende ser una técnica de reemplazo de otras técnicas, sino una alternativa más en el conocimiento del virus. La gran diferencia existente en esta zona permite mediante secuenciación del fragmento amplificado analizar el porcentaje de homología , mediante alineamiento de secuencias, entre distintos brotes de IBDV . Estudiar y diferenciar un número mayor tanto de muestras vacunales de IBV, como de muestras salvajes será uno de nuestros próximos objetivos.

REFERENCIAS

1. Amin A, Mostageer M. A preliminary report on an avian infectious bronchitis virus strain associated with nephritis nephrosis syndrome in chickens. *Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association*. 37:71-79. 1977
2. Alvarado I.R., Villegas P., El-Attrache J, Brown T.P. Evaluation of the protection conferred by commercial vaccines against the California 99 isolate of infectious bronchitis virus. *Avian Dis*. 47(4):1298-304. 2003.
3. Butcher, G. D., R. W. Winterfield, D. P. Shapiro. Pathogenesis of H13 nephropathogenic infectious bronchitis virus. *Avian Dis*. 34(4): 916-921. 1990
4. Callison SA, Jackwood MW, Hilt DA. Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates. *Avian Dis*.45(2):492-9. 2001.
5. Castro, A. E., B. Reynolds, D. Hill, H. Lu. Diagnosis of avian infectious bronchitis virus in clinical and field specimens using tracheal ring organ cultures and serology. In: *Proceedings of the thirty-seventh western poultry disease conference, Davis, California*. pp: 36-40. 1988.
6. Cavanahg, D., Naqi S. A. Infectious Bronchitis. In: Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard, C. W., McDougald, L. R., Saif, Y. M. (eds.). *Diseases of Poultry 10th, ed.* Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp. 511-526. 1997.
7. Cook, J. K., J. H. Darbyshire, R. W. Peters. The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Virol*. 50(1-2): 109-118. 1976.
8. Cubillos, A., J. Ulloa, V. Cubillos, J. K. A. Cook. Characterisation of strain of infectious bronchitis virus isolated in Chile. *Avian Path*. 20: 85-99. 1991.
9. Escorcía M., Jackwood M.W., Lucio B., Petrone V.M., Lopez C., Fehervari T., Tellez G. Characterization of Mexican strains of avian infectious bronchitis isolated during 1997. *Avian Dis*. 44(4): 944-7. 2000.
10. El Houadfi, M. D., R. C. Jones, J. K. A. Cook, A. G. Ambali. The isolation and characterisation of six avian infectious bronchitis viruses isolated in Morocco. *Avian Path*.15: 93-105. 1986.
11. Falcone E, D'Amore E, Di Trani L, Sili A, Tollis M. Rapid diagnosis of avian infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 64(2):125-30. 1997.

12. Farsang A., Ros C., Renstrom L.H., Baule C., Soos T., Belak S. Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain. *Avian Pathol.* 31(3):229-36. 2002.
13. Gelb J Jr, Ladman BS, Tamayo M, Gonzalez M, Sivanandan V. Novel infectious bronchitis virus S1 genotypes in Mexico 1998-1999. *Avian Dis.* 45(4):1060-3. 2001.
14. Jackwood M.W., Yousef N.M., Hilt D.A. Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 41(1):105-10. 1997.
15. Jackwood,^a M. W., Hilt,D. A. ^a and Callison^a S. A.. Detection of Infectious Bronchitis Virus by Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction and Identification of a Quasispecies in the Beaudette Strain *Avian Dis.* 47(3): 718-724. 2003.
16. Keeler CL Jr, Reed KL, Nix WA, Gelb J Jr. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. *Avian Dis.* 42(2):275-84. 1998.
17. Kingham, B. F., C. L. Keeler, Jr., W. A. Nix, B. S. Ladman, and J. Gelb, Jr. Identification of avian infectious bronchitis virus by direct automated cycle sequencing of the S-1 gene. *Avian Dis.* 44(2): 325-335. 2000.
18. Kwon HM, Jackwood MW, Gelb J Jr. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.*37(1):194-202. 1993.
19. Kwon HM, Jackwood MW, Brown TP, Hilt DA. Polymerase chain reaction and a biotin-labeled DNA probe for detection of infectious bronchitis virus in chickens. *Avian Dis.* 37(1):149-56.1993.
20. Lee C.W., Hilt D.A. Jackwood M.W. Identification and analysis of the Georgia 98 serotype, a new serotype of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*45(1):164-72. 2001.
21. Lee C.W., Hilt D.A. Jackwood M.W. Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypevariable region in the S1 gene. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15(4):344-8. 2003.
22. Lee C.W., Hilt D.A., Jackwood M.W. Redesign of primer and application of the reverse transcriptase polymerase chain reaction and restriction fragment legth polymorphism test to the DE072 strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 44(3): 650-4. 2000.

23. Lee S.K., Sung H.W. Kwon H.M. S1 glycoprotein gene analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Korea. *Arch. Virol.* 149(3):481-94. 2004.
24. Lin Z., Kato A., Kudou Y., Ueda S. A new typing method for the avian bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. *Arch. Virol.* 116(1-4):19-31. 1991.
25. Liu S., Kong X. A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. *Avian Pathol.* 33(3):321-7. 2004.
26. Liu HJ, Lee LH, Shih WL, Lin MY, Liao MH. Detection of infectious bronchitis virus by multiplex polymerase chain reaction and sequence analysis. *J Virol Methods.* 109(1):31-7. 2003.
27. Lucio, B., Fabricant. J. Tissue tropism of three cloacal isolated and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 34(4): 865-870. 1990.
28. Mondal S.P., Lucio-Martinez B., Naqi S.A. Isolation and characterization of a novel antigenic subtype of infectious bronchitis virus serotype DE072. *Avian Dis.* 45(4): 1054-9. 2001.
29. Moore K.M., Bennet J.D., Seal B.S., Jackwood M.W. Sequence comparison of avian infectious bronchitis virus S1 glycoproteins of the Florida serotype and five variant isolates from Georgia and California. *Virus genes.* 17(1):63-83. 1998.
30. Nix WA, Troeber DS, Kingham BF, Keeler CL Jr, Gelb J Jr. Emergence of subtype strains of the Arkansas serotype of infectious bronchitis virus in Delmarva broiler chickens. *Avian Dis.* 44(3):568-81. 2000.
31. Ruano M, El-Attrache J, Villegas P. A rapid-plate hemagglutination assay for the detection of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 44(1):99-104. 2000.
32. Smati R, Silim A, Guertin C, Henrichon M, Marandi M, Arella M, Merzouki A. Molecular characterization of three new avian infectious bronchitis virus (IBV) strains isolated in Quebec. *Virus Genes.* 25(1):85-93. 2002.
33. Stephensen CB, Casebolt DB, Gangopadhyay NN. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Res.* 60(2):181-9. 1999.
34. Wang CH, Huang YC. Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Arch Virol.* 145(2):291-300. 2000.

35. Wang, C.H., Tsai, C.T. Genetic grouping for the isolates of avian infectious bronchitis virus in Taiwan. *Arch. Virol.* 141 (9): 1677-88. 1996.
36. Wang L, Xu Y, Collisson EW. Experimental confirmation of recombination upstream of the S1 hypervariable region of infectious bronchitis virus. *Virus Res.* 49(2):139-45. 1997.
37. Wang, X. and M.I. Khan. Use of RT-PCR RFLP to examine the interaction between infectious bronchitis viruses in ovo. *Avian Pathol.* 29(5): 441-448. 2000.
38. Wang, X., and M.I. Khan. Molecular characterization of an infectious bronchitis virus strain isolated from an outbreak in vaccinated layers. *Avian Dis.* 44(4): 1000-6. 2000.
39. Wang, X., and M.I. Khan. A multiplex PCR for Massachusetts and Arkansas serotypes of infectious bronchitis virus. *Molecular and Cellular Probes.* 13(1):1-7.1999.
40. Yu L, Jiang Y, Low S, Wang Z, Nam SJ, Liu W, Kwangac J.Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis.* 45(2): 416-24.2001.
41. Zhou J.Y., Zhang D.Y., Ye J.X. and Cheng L.Q. Characterization of an avian infectious bronchitis virus isolated in China from chickens with nephritis. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 51(4):147-52. 2004.