

## Detección y caracterización del virus de bronquitis infecciosa aviaria en Chile mediante RT-PCR y análisis secuencial

Detection and characterization of infectious bronchitis virus in Chile by RT-PCR and sequence analysis

J C Lopez<sup>1</sup>, R Mcfarlane<sup>1</sup>, J Ulloa<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup>Animal and Food Science Division, Lincoln University, Canterbury, New Zealand.

<sup>2</sup>Instituto de Patología Animal, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

### SUMMARY

A reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay, coupled with sequencing, was used to detect and genetically characterize different infectious bronchitis virus (IBV) isolates in Chile. The RT-PCR procedure included the use of the primers NT1 and NT2 that were located close to the N-terminus of the S1 gene and bracketed the hypervariable region, and the amplified sequences were aligned and analyzed with DNAMAN software, and compared with sequences from GenBank. The level of detection of the RT-PCR assay was equivalent to virus isolation in eggs when testing tissues directly, but the assay was more sensitive when used to detect virus stored in allantoic fluid. The amplimers from all historical Chilean isolates were identical in size (193 bp) and exhibited 71-96% similarity on sequence analysis. These isolates showed between 68-97% similarity to strains from North America, Europe, Asia, New Zealand and Australia.

*Palabras clave:* virus bronquitis infecciosa aviaria, caracterización.

*Key words:* infectious bronchitis virus, characterization.

### INTRODUCCION

Bronquitis infecciosa (BIA) es una enfermedad respiratoria altamente contagiosa de pollos, causada por un virus Corona y caracterizada por estertores traqueales, tos y estornudos, y ocasionalmente diarrea cuando hay compromiso de riñones (Cumming 1963). La infección puede producir aumento de la mortalidad, disminución de la producción de huevos y carne y deterioro en la calidad del huevo (Cavanagh y Naqi 1997).

La enfermedad se informó por primera vez en Chile en 1967 (García y Norambuena 1969) y el virus se aisló en 1975 en pollo de engorde (Hidalgo y col 1976), mostrando alguna relación antigénica con la cepa Massachusetts. Posteriormente Hidalgo y col (1986) obtuvieron aislados antigénicamente diferentes de la cepa Massachusetts.

Cubillos y col (1991) informaron la tipificación de nueve aislados del virus Bronquitis infecciosa (VBI) mediante la técnica de seroneutralización cruzada, se-

ñalando que cinco se relacionaban serológicamente con el tipo Massachusetts y uno con el tipo Connecticut. Los otros tres aislados no presentaron relación antigénica con una gran cantidad de cepas del virus, procedentes de diferentes países y caracterizadas a través de varios años.

A pesar del uso de vacunas, la infección con VBI es frecuente en Chile, y podría estar subdiagnosticada. Comúnmente el diagnóstico se realiza por seroconversión (ELISA) y aislamiento del virus en huevos embrionados. La aplicación de técnicas como reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR), acompañada de análisis de restricción del fragmento (Adzhar y col 1996, Wang y Tsai 1996, Jackwood y col 1997, Escorcia y col 2000), análisis secuencial (Andreasen y col 1991, Zwaagstra y col 1992, Ramneek 2000) o hibridación (Jackwood y col 1992, Kwon y col 1993) ha resultado en nuevas oportunidades para un diagnóstico rápido e identificación de VBI. El presente trabajo pretende detectar y caracterizar genéticamente cepas de VBI aisladas en Chile, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR). Esta técnica reduce en gran medida el tiempo de obtención de resultados, es más sensible, no requiere del uso de cepas de referencia ni de aislamiento en huevos embrionados (Ramneek 1992).

Aceptado: 10.12.2005.

\* julloa@uach.cl Teléfono 56-63-221220

lopezj@lincoln.ac.nz, mcfarlan@lincoln.ac.nz

## MATERIAL Y METODOS

El año 2001 se recolectaron tejidos provenientes de tráquea, ciegos, tonsilas cecales y riñones (n= 85) y tómulas traqueales y cloacales (n= 30), en 7 granjas de la V región y en granjas en la X región, respectivamente. Las muestras se tomaron de lotes con aves que presentaban signología respiratoria. Adicionalmente, se consideraron en el estudio cuatro cepas históricas (Austral 3, 5, 12 y 14), aisladas en los años 80 por Cubillos y col (1991). Para el aislamiento viral, se realizó un total de 6 pasajes seriados en huevos embrionados SPF, como lo describe Gelb y Jackwood (1998), registrándose los cambios patológicos. El RNA viral de Austral 3, 5, 12 y 14 fue extraído de líquido alantoideo y en las cepas aisladas directamente de los tejidos (cepas actuales) mediante el uso de Trizol (Life Technologies, USA). En la reacción de RT-PCR se usaron los partidores NT1 y NT2 (Ramneek 2000), los cuales se unen a la terminación N del gen S1 (+116-308) y cubre la región hipervariable (HVR1) (Cavanagh y col 1988). Para la reacción de RT-PCR se usó "Titan One Tube RT-PCR System" (Roche). Para caracterizar las cepas históricas, los productos de RT-PCR se visualizaron en gel de agarosa (1%), la purificación se realizó con el uso de "Concert Gel Extraction System" (Life Technologies, USA). La secuenciación se efectuó en el Centro de Síntesis y Análisis de Biomoléculas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile con este fin se enviaron 50 ng del producto de PCR y ambos partidores en una concentración de 10 pmoles/ $\mu$ l.

El resultado se analizó y se comparó usando el programa computacional Blast (Altschul y col 1990) y DNAMAN (Version 2.6, Lynnon-Biosoft, Canadá). Los números de acceso de las secuencias en GenBank son: AY227799, AY227800, AY227801, AY227802.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Cuando se utilizó el método de RT-PCR para detectar VBI en las cepas históricas, se presentaron amplificadas de igual tamaño (193 pb) en todas las muestras (cuadro 1), sin embargo, cuando se inocularon en huevos

**Cuadro 1.** Comparación entre RT-PCR y aislamiento viral en diferentes muestras.

Comparison between RT-PCR and virus isolation in different samples.

	Directamente los tejidos	Tómulas	Cepas históricas
RT-PCR	2*/85	0/30	4/4
Aislamiento viral	1/85	0/30	1/4

\* positivos/número total de muestras.

embrionados, sólo una de las cuatro muestras produjo signos característicos de VBI en embriones (Cavanagh y Naqi 1997), posterior a seis pasajes seriados. De las 85 muestras de tejido recolectadas durante el 2001, dos fueron positivas a RT-PCR y sólo una a aislamiento viral. Ninguna de las muestras obtenidas mediante tómulas fue positiva en RT-PCR o en aislamiento viral en huevos embrionados. Las diferencias en los resultados obtenidos con las dos técnicas diagnósticas pueden explicarse por la capacidad que tiene RT-PCR de detectar el ARN viral en muestras, independiente de la patogenicidad y viabilidad del virus (De Wit 2000). En el caso de las cepas históricas la viabilidad pudo haberse perdido por el largo período de almacenamiento de las muestras (20 años) y la temperatura en que fueron conservadas ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Además, los resultados pueden ser influenciados por la recolección y transporte de las muestras (Ramneek 2000) y la recolección de tejidos y tómulas en una etapa tardía de la enfermedad. La posibilidad de aislar el virus es mayor en la fase aguda de la enfermedad (Ignjatovic y Ashton 1996).

Cuando RT-PCR se empleó directamente en muestras de tejido renal, los partidores ligaron otros elementos complementarios, produciendo una coamplificación de una falsa secuencia, en este caso, ADN mitocondrial de pollo, el cual puede ser distinguido fácilmente por su menor peso molecular (Ramneek 2000).

Cada secuencia de las cepas históricas Austral 3, 5, 12 y 14, fue comparada mediante alineamiento secuencial con la base de datos del GenBank. El cuadro 2 muestra los grados de relación (expresados en porcentaje) entre las secuencias de las cepas en estudio y algunas de las cepas internacionales con las cuales presentaron alta homología. Cabe resaltar que con ninguna secuencia (glicoproteína 1) se encontró 100% de homología. Las cepas Austral 3, 5 y 14 mostraron entre ellas una gran similaridad (superior al 95%). La cepa Austral 12 fue

**Cuadro 2.** Identidad nucleotídica (%) de la región S1 (193pb) de cepas de Chile, de vacunas y algunas cepas de VBI de Nueva Zelandia, Australia, Taiwán y UK.

Nucleotide identity from the S1 region (193 bp) of Chilean, vaccinal and New Zealand, Australia, Taiwan, and UK strains of IBV.

	A		Mass		NZ		NZ		A12		UK/1	
	A 3	A 5	12	A 14	H120	41	A	D	N2/75	11	42/86	
A 3	-	95	72	95	71	71	76	79	79	70	80	
A 5		-	71	96	72	72	78	80	83	72	79	
A 12			-	72	97	94	68	72	70	76	73	
A 14				-	71	71	78	78	81	71	78	

A: Austral, H: Holanda, Mass: Massachusetts, NZA y NZD: Nueva Zelandia, N2/75: Australia, A1211: Taiwán, UK/142/86: Reino Unido.

similar a las cepas vacunales Mass 41 y H120 en un 94% y 97%, respectivamente. Por su parte, Austral 3, 5 y 14 mostraron una similitud de 71% y 72% con las cepas vacunales H120 y Mass 41.

Se observó concordancia entre los resultados de la secuenciación y seroneutralización cruzada, mostrando que la cepa Austral 12 y la cepa vacunal Massachusetts están estrechamente relacionadas (Cubillos y col 1991). Esto se podría deber en parte a la incorporación genética de elementos de la cepa vacunal, pero esto sólo podría ser confirmado con una secuenciación más extensa. La comparación de las otras cepas chilenas (Austral 3, 5 y 14) con secuencias de cepas de otros países, muestra que hay una sustancial divergencia genética, lo cual coincide con los antecedentes serológicos (Cubillos y col 1991). En Latinoamérica, los serotipos prevalentes normalmente difieren entre países y estos con frecuencia son diferentes a serotipos presentes en otras partes del mundo (Cook 2002). De los resultados obtenidos se puede afirmar que RT-PCR permite realizar un diagnóstico rápido de BIA, detectando incluso cepas que han perdido la capacidad de multiplicarse, y que los cuatro aislados obtenidos en la década de los 80 por investigadores de la Universidad Austral de Chile son variantes de VBI propias de Chile.

## RESUMEN

Una técnica de reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR) junto a una secuenciación fue usada para detectar y caracterizar genéticamente virus diferentes de bronquitis infecciosa aviar (VBIA) aislados en Chile. El procedimiento de RT-PCR incluyó el uso de los partidores NT1 y NT2, los cuales se localizaron cerca del término N del gen S1 y cubrieron la región hipervariable. La secuencia amplificada fue alineada y analizada con el programa computacional DNAMAN, y comparada con secuencias reportadas en GenBank. El nivel de detección de la técnica de RT-PCR fue equivalente al aislamiento viral en huevos cuando se usaron directamente tejidos, pero el ensayo fue más sensitivo cuando fue usado para detectar virus almacenados en fluido alantoideo. Los amplificados de todos los aislados históricos de Chile fueron idénticos en tamaño (193pb) y exhibieron entre ellos, al analizar la secuencia una similitud del 71 al 96%. Estos aislados mostraron entre 68 y 97% de similitud con cepas de Estados Unidos, Europa, Asia, Nueva Zelanda y Australia.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Laboratorio de Biotecnología Acuática y al Laboratorio de Patología aviar, Universidad Austral de Chile, por su asistencia técnica, a la Escuela de Graduados por su apoyo en este proyecto.

## REFERENCIAS

Adzhar A, K Shaw, P Britton, D Cavanagh. 1996. Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis

virus by the polymerase chain reaction. *Avian Pathol* 25, 817-836.

Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers, DJ Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Bioq* 5, 403-410.

Andreasen JR Jr, MW Jackwood, DA Hilt. 1991. Polymerase chain reaction amplification of the genome of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 35, 216-220.

Cavanagh D, PJ Davis, APA Mockett. 1988. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. *Virus Res* 11, 141-150.

Cavanagh D, SA Naqi. 1997. Infectious Bronchitis. En Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM (eds). *Diseases of Poultry*, 10<sup>th</sup> ed. Pp 511-526. University Press, Ames Iowa State.

Cook JKA. 2002. Infectious Bronchitis: The worldwide situation. *Memorias del X Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar*. Amevea. The University of Georgia, USA.

Cubillos A, J Ulloa, V Cubillos, J Cook. 1991. Characterization of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. *Avian Pathol* 20, 85-99.

Cumming RB. 1963. Infectious avian nephrosis (uaremia) in Australia. *Aust Vet J* 39, 145-147.

De Wit JJ. 2000. Technical review, detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 29, 71-93.

Escorcía M, MW Jackwood, B Lucio, VM Petrone, C López, T Fehervari, G Téllez. 2000. Characterization of Mexican strains of avian infectious bronchitis isolated during 1997. *Avian Dis* 44, 944-947.

García A, M Norambuena. 1969. Diagnóstico preliminar de la bronquitis infecciosa en Chile. *Rev Soc Med Vet Chile* 19, 27-33.

Gelb J JR, MW Jackwood. 1998. Infectious bronchitis. In Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM, (eds). *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*, 4<sup>th</sup> ed. Pp169-174. The American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania.

Hidalgo H, R Gallardo, S Rosende. 1976. Isolation of infectious bronchitis virus from broiler chickens in Chile. *Avian Dis* 20, 601-603.

Hidalgo H, R Gallardo, H Toro. 1986. Antigenic and pathogenic properties of three isolated of infectious bronchitis virus obtained from vaccinated chickens. *J Vet Med* B33, 26-35.

Ignjatovic J, F Ashton. 1996. Detection and differentiation of avian infectious bronchitis viruses using a monoclonal antibody based ELISA. *Avian Pathol* 25:721-736

Jackwood MW, HM Kwon, DA Hilt. 1992. Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. *Avian Pathol* 36, 403-409.

Jackwood MW, NMH Yousef, DA Hilt. 1997. Future development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 41,105-110.

Kwon HM, MW Jackwood, J Jr Gelb. 1993. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restricting fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis* 37, 194-202.

Lin Z, A Kato, Y Kudov, KS Umeda. 1991. Typing of recent infectious bronchitis virus isolates causing nephritis in chickens. *Arch Virol* 120, 145-149.

C LOPEZ Y COL

Ramneek. 2000. Thesis for degree of Doctor of Philosophy at Lincoln University . Typing of infectious bronchitis virus and relationship to protection in poultry. Lincoln New Zealand.

Wang CH, CT Tsai. 1996. Genetic grouping for the isolates of avian infectious bronchitis virus in Taiwan. *Arch Virol* 141,1677-1688.

Zwaagstra KS, B Van der Zeijst, JC Austers.1992. Rapid detection and identification of avian infection bronchitis virus. *J Clin Microbiol* 30, 79-84.