

Comunicación corta

DETECCIÓN EN MUESTRA CLÍNICA E IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR POR UN ENSAYO DE REVERSO TRANSCRIPCIÓN ACOPLADO A REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Ana María Acevedo*, Yaima Burgher*, M. Colás, Damaris Relova*, Arisel Correa**, Elsa Bacallao** y Julia Noda***

**Laboratorio de Virología Animal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: acevedo@censa.edu.cu;*

***Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Aviar (LIDA), Boyeros, Ciudad de la Habana. Cuba*

RESUMEN: La bronquitis infecciosa aviar (BIA) es una enfermedad viral ampliamente diseminada en el mundo y se considera una de las principales causas de pérdidas económicas significativas en la industria avícola, debido a que afecta el desarrollo de aves de engorde y ponedoras. En Cuba, el diagnóstico actual se realiza por aislamiento viral y es difícil su identificación por métodos convencionales. Para identificar la posible presencia del virus de la BIA en aislados cubanos se aplicó un ensayo de reverso transcripción acoplado a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) específico para este virus. Las muestras de tráquea-pulmón fueron tomadas como grupos de tres y cuatro aves después de la necropsia de cada una, evaluándose un total de once aves. Las secuencias del virus de la BIA fueron detectadas en dos de los tres grupos evaluados. En uno de estos grupos se logró además, la detección del virus a partir de la muestra clínica; aspecto importante para la diferenciación con enfermedades graves que cursan con un cuadro clínico similar como la Influenza aviar y la Enfermedad de Newcastle. La RT-PCR mostró potencial para ser usado en la identificación de aislados del virus de la BIA, así como en el examen directo a partir de muestras clínicas, lo que aporta posibilidades de su empleo en nuestro país para la detección rápida, sensible y específica de este agente, aspecto esencial en el diagnóstico y control de esta infección viral.

Palabras clave: virus de la bronquitis infecciosa aviar; aislamiento viral; reverso transcripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

DETECTION IN CLINICAL SAMPLE AND IDENTIFICATION OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS ISOLATES BY A REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY

ABSTRACT: Avian infectious bronchitis (AIB) is a viral disease worldwide distributed and it is considered one of the main causes of economic losses for poultry industry because of its characteristic of affecting development of broiler and laying hens. In Cuba, the current diagnosis is carried out by viral isolation and its identification by conventional methods is difficult. In order to identify the possible presence of avian infectious bronchitis virus in cuban isolates a reverse transcription-polymerase chain reaction assay (RT-PCR) specific for this virus was applied. Trachea-lung samples were taken as pools of three and four birds after each necropsy, evaluating a total of eleven birds. The sequences of AIB virus were detected in two of three pools. In one of these pools the detection from clinical sample was also obtained, a very important

aspect for its differentiation with serious diseases with a similar clinical course as Avian influenza and Newcastle disease. The RT-PCR showed a potential in order to be used in the identification of isolates from AIB virus, as well as in the direct examination of clinical samples opening the possibilities of its use in the quick, sensitive and specific detection of this agent in our country an essential aspect in the diagnosis and control of this viral infection.

Key words: avian infectious bronchitis virus; viral isolation; reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

INTRODUCCIÓN

La bronquitis infecciosa aviar (BIA) es una enfermedad respiratoria aguda, altamente contagiosa, que ocasiona un impacto socio-económico severo en la industria avícola mundial. Se caracteriza primariamente por signos respiratorios en los pollos de crecimiento. Las aves infectadas tienen una pobre ganancia de peso y una rápida disminución en la producción y calidad de los huevos, así como un síndrome nefritis/ nefrosis (forma renal) de gran importancia actual provocada por cepas nefropatógenas (1).

La morbilidad es generalmente alta, 100 % en la mayoría de los casos, pero la mortalidad frecuentemente es baja (5%). Esta aumenta cuando actúan cepas nefropatógenas (2) o cuando se presenta complicada con otros agentes patógenos como *Escherichia coli*, micoplasmas y otros virus (3).

El diagnóstico de la BIA requiere el aislamiento viral y su identificación. Tradicionalmente, los serotipos del virus de la BIA han sido identificados usando ensayos de inhibición de la hemaglutinación (4) y virus neutralización en embriones de pollo (5), cultivo de órganos traqueales (TOCs) (6) y cultivos celulares (7). La neutralización de focos fluorescentes y los ELISAs con anticuerpos monoclonales se han utilizado en la diferenciación de cepas de este virus (8, 9). Sin embargo, estos métodos son laboriosos, caros, consumen tiempo y algunos requieren el aislamiento y cultivo de los virus (10).

Los ensayos de detección molecular se han empleado para solventar estas dificultades. Además, estas técnicas tienen un gran atractivo ya que son capaces de cubrir diferentes aspectos del diagnóstico como la detección del virus, la caracterización y análisis epidemiológico (11).

La reverso transcripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en combinación con el Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (12) o con secuenciación (13) han sido usados exitosamente para discriminación de diferentes cepas del virus de la BIA o para análisis filogenéticos. Estas técnicas han probado ser sensibles y rápidas para detectar ácidos nucleicos virales en material clínico (14).

En Cuba, la Bronquitis infecciosa aviar se reportó asociada a la forma respiratoria crónica de la enfermedad (15), se logró el aislamiento viral en embrión de pollo y su identificación por virus neutralización. Para el control de la enfermedad se introdujo la vacunación con el empleo de vacuna viva atenuada cepa H120 con resultados satisfactorios durante varios años. Sin embargo, con el empleo de la prueba ELISA en el diagnóstico serológico, se observó un descenso marcado de anticuerpos entre tres y seis meses postvacunación de la tercera dosis como evidencia de una pobre inmunidad en las ponedoras (16, 17). En la actualidad se realiza solamente el diagnóstico por aislamiento viral, y es difícil su identificación por métodos convencionales ya que se requiere de

embriones de pollo libre de patógenos específicos (LPE), además una vez obtenido el aislamiento se requieren de otras técnicas como la inmunofluorescencia o seroneutralización para determinar la presencia de este agente infeccioso. En cuanto al diagnóstico serológico sólo se emplea un ELISA comercial importado en el monitoreo de las reproductoras de forma esporádica. La detección por métodos moleculares no ha sido empleada en nuestro país anteriormente para la identificación de aislamientos del virus de la BIA.

Con estos antecedentes y la constante presentación de brotes de enfermedad respiratoria y mortalidad nos propusimos como objetivo identificar la posible presencia del virus de la BIA en aislados cubanos por un ensayo de RT-PCR específico para este virus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de aves con clínica respiratoria, de una granja de la provincia de La Habana. Las aves tenían de 9-10 meses de postura y habían recibido tres dosis de vacuna (cepa vacunal H120, serotipo Massachussets), siguiendo el esquema de vacunación de 1, 35 y 85 días de edad.

El cuadro clínico consistió en: secreciones nasales desde serosa hasta catarral, nódulo facial de consistencia dura uni y bilateral con pérdida de la visión, estornudo, disnea y conjuntivitis) y enflaquecimiento marcado (caquexia). Las principales lesiones anatómo-patológicas macroscópicas observadas en las aves fueron: rinitis serosa hasta muco-fibrinosa, neumonía focal (lóbulo anteroventral bilateral), atrofia serosa de la grasa coronaria, hemorragia y congestión hepática, atrofia esplénica, degeneración ovárica con folículos deformes en algunas aves y atrofia genital.

Muestras de tráquea-pulmón fueron tomadas en grupos de tres y cuatro aves, después de la necropsia de cada una. Se trabajó con un total de once aves. Estas muestras fueron maceradas con mortero y arena estéril realizando una dilución 1:10 en solución salina buferada (PBS) a la cual se le añadió Penicilina en concentración final de 1000 U/mL y estreptomycin 1000 µg/mL. Las muestras así tratadas se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora y posteriormente se clarificaron por centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos. Finalmente el sobrenadante se cosechó estérilmente y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

La presencia de anticuerpos al virus de la BIA fue identificada por un ensayo ELISA (Flock Chek, IDEXX Laboratories, versión 06-0110208).

Para el aislamiento viral, los homogenados de órganos se inocularon en embriones de pollo de 8-10 días de desarrollo, libre de patógenos específicos (LPE). Se utilizaron a razón de 10 embriones por muestra y se inocularon por la vía de la cavidad alantoidea con volumen de 0.25 mL por embrión. Los embriones fueron incubados a 37°C y diariamente se chequeó su viabilidad. A las 72 horas post-inoculación, se cosechó el líquido alantoideo y se realizaron dos pases ciegos en embrión de pollo.

Cada pase (líquido alantoideo) fue evaluado por RT-PCR para detección del virus de la BIA.

La cepa de referencia viral usada como control positivo fue la cepa M41, serotipo Massachusetts.

Para la extracción del ARN viral se empleó el reactivo TRI Reagent[®] LS según las instrucciones del fabricante (Sigma, EE.UU). El ARN fue resuspendido en 10 uL de agua libre de nucleasas (*Promega, Madison, WI, USA*).

A partir del RNA total extraído se sintetizó la cadena de ADN complementaria al RNA con el uso de la enzima reverso transcriptasa del virus de la leucemia Moloney-Murina (M-MLV RT) (*Promega, Madison, WI, USA*) en un volumen final de reacción de 20 μL . Del ARN extraído 5 μL se incubaron con 4 μL de cebadores *random* (50 ng/ μL) (*Promega, Madison, WI, USA*) y 1 μL de dNTP (10 mM) a 70°C por 10 min., posteriormente, la mezcla se colocó en hielo durante 5 min. para mantener el ácido nucleico desnaturalizado. Luego de la incubación se le añadieron a la mezcla 4.7 μL de agua libre de nucleasa (*Promega, Madison, WI, USA*), 4 μL de la solución tampón de reacción 5X [250 mM Tris-HCl (pH 8.3 a 25°C), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT], 0.5 μL de inhibidor de ribonucleasas RNAsin 40U/ μL (*Promega, Madison, WI, USA*) y 0.8 μL de M-MLV RT 200U/ μL (*Promega, Madison, WI, USA*), la mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 15 min, seguida de 37°C durante 1 hora y desnaturalización final a 94°C durante 5 min.

Para las reacciones de amplificación fueron seleccionados oligonucleótidos diseñados dentro de la región 3' no traducida (UTR) altamente conservada los cuales son universales para todos los tipos conocidos de virus de la BIA (18). Para la amplificación de un segmento de 266 pb de la región 3'UTR del virus, 5 μL de cada cDNA se adicionaron a la mezcla de PCR, la que se realizó en un volumen final de 50 μL y contenía: 1x GoTaq Green Master Mix (*Promega*) [200uM de cada dNTP, 1.5mM MgCl₂ (pH 8.5)], 0.5 μM de cada cebador (UTR 41+/UTR 11-) y 18 μL de agua libre de nucleasas (*Promega*). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador (*Eppendorf Mastercycler*) y el programa consistió de una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos; seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min. alineamiento a 48°C por 1,5 min. y extensión a 72°C por 2 min. Finalmente se realizó una extensión final a 72°C por 10 min. (Tabla 1)

TABLA 1. Secuencia y posiciones de los oligonucleótidos usados para el ensayo de la RT-PCR./ *Sequence and position of the oligonucleotides used for RT-PCR assay*

Oligonucleótido	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Gen	Posición en el genoma
UTR 41+	ATG TCT ATC GCC AGG GAA ATG TC	3'UTR	27 342 a 27 364
UTR 11	GCT CTA ACT CTA TAC TAG CCT A	3'UTR	27 586 a 27 607
UTR 31	GGG CGT CCA AGT GCT GTA CCC	3'UTR	27 501 a 27 520

Para la segunda amplificación, cinco microlitos de cada cDNA amplificado se adicionaron a la mezcla la que se realizó en un volumen final de 50 μL , contenía los mismos reactivos de la primera amplificación y los cebadores UTR 41+/UTR 31-, los que amplifican un fragmento de 179 pb de la región 3'UTR del virus de la BIA. La amplificación se realizó empleando el programa antes mencionado.

Los productos de PCR (10 μL) se visualizaron bajo transiluminador de luz ultravioleta después de electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con Bromuro de etidio (0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a 100 volts durante 30 min., en tampón TBE 0.5X (90mM Tris-borate, 2 mM EDTA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En nuestro país, a pesar de que las aves son sometidas a un programa de vacunación intensivo se están presentando brotes de enfermedad respiratoria y mortalidad, por lo que es evidente la necesidad de dilucidar lo que está sucediendo en el campo. Entre los agentes que pudieran estar incidiendo en esta situación se encuentra el virus de la BIA, que junto a otros patógenos involucrados como bacterias pueden complicar el diagnóstico de un brote de enfermedad respiratoria.

En la población evaluada encontramos altos títulos de anticuerpos al virus de la BIA (Tabla 2) lo que sugiere una hipótesis de circulación viral en estas aves con clínica respiratoria compatible.

TABLA 2. Títulos de anticuerpos al virus de la BIA obtenidos por ensayo de ELISA./ *Antibody titers to avian infectious bronchitis obtained by ELISA test.*

# de Ave	Títulos
9	2219
10	1110
11	1218
12	2387
13	914
14	2781
15	511
16	715
17	2671
18	6644
19	4666

Para confirmar este diagnóstico se hacen necesarios los ensayos de aislamiento viral e identificación por técnicas moleculares específicas para la detección del virus.

Los resultados del aislamiento viral después de 3 pases sucesivos realizados en embrión de pollo revelaron en dos de los grupos evaluados evidencia de multiplicación viral determinado por mortalidad embrionaria con lesiones similares a las producidas por el virus de la BIA.

Mediante el ensayo de RT-PCR se logró identificar estos dos aislamientos y además directamente de la muestra clínica como se aprecia en la Figura 1 donde se evidencian amplificaciones de la talla esperada (179 pb) específicas para los cebadores utilizados. Este ensayo desarrollado por Cavanagh en 2002 (18) y utilizado por diferentes autores (19,20) ha resultado una herramienta muy útil en este trabajo al confirmar la presencia de forma específica y sensible del virus de la BIA en aves con procesos respiratorios.

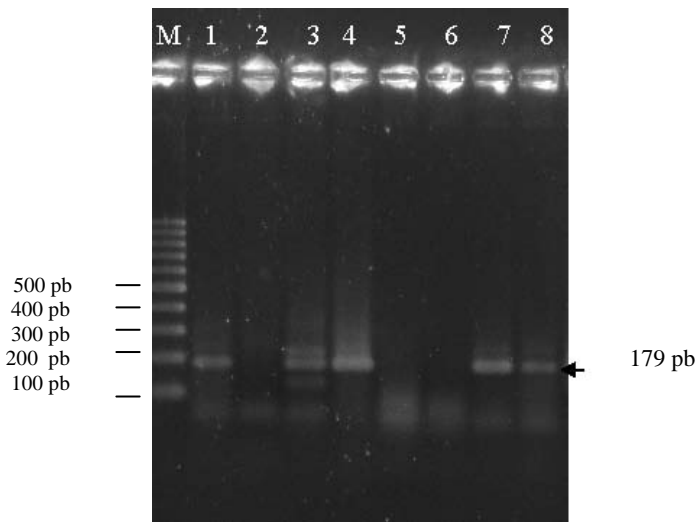


FIGURA 1. Electroforesis en gel de agarosa (2 %) de la RT-PCR para detección de Bronquitis infecciosa aviar en muestras de campo sospechosas. M: Marcador de Peso molecular de 100 pb, Líneas: 1: control positivo, (cepa M41), 2: control negativo negativo (agua libre de nucleasas), 3: MO (13-15), 4: 2P (13-15), 5: MO (9-12), 6: 3P (9-12), 7: 3P (16-19), 8: 4P (16-19)/ MO: Muestra original-P: Pase en embrión de pollo./ *Agarose gel electrophoresis (2%) of RT-PCR for detection of avian infectious bronchitis in suspected field samples. M: Molecular weight marker 100bp, Lanes: 1: positive control (M41 strain), 2: negative control (nuclease water free), 3: MO (13-15), 4: 2P (1315), 5: MO (9-12), 6: 3P (9-12), 7: 3P (16-19), 8: 4P (1619)/ MO: Original simple-P: Passage in embryonated chicken eggs.*

La ventaja de disponer de esta herramienta de diagnóstico (RT-PCR) nos permite revelar de forma rápida y específica el virus a la vez que es capaz de detectar mínimas cantidades del ácido nucleico viral, independientemente de la viabilidad de los viriones (21). Además consume menos tiempo que el aislamiento viral, método convencional utilizado para el diagnóstico que demora días y requiere de la posterior identificación del mismo.

El hecho de detectar el virus directamente de la muestra clínica resulta de gran importancia pues permite el diagnóstico rápido frente a un problema respiratorio donde se pueden presentar otras enfermedades graves que tienen un cuadro clínico muy similar como la influenza aviar y la enfermedad de Newcastle.

Otro aspecto a considerar es el tiempo transcurrido entre la última dosis de vacuna recibida por la aves y el momento en que se presenta el proceso respiratorio y son tomadas las muestras para el diagnóstico. Estas aves tenían de 9-10 meses de postura, aproximadamente 13 meses post-vacunación, lo que nos sugiere que la presencia de este virus identificado por RT-PCR esté relacionado con un virus diferente del vacunal.

En estudios realizados por Cavanagh *et al.* (22) encontraron que las cepas vacunales del tipo Massachusetts aplicadas al 1 día de edad se detectaron por RT-PCR hasta 7 días post-vacunación. Este período de excreción pudiera ser más largo como lo demostró Naqi *et al.* (23), quienes encontraron que en pollitos de 1 día de edad expuestos al virus vacunal se produjo una excreción periódica de virus en tráquea y cloaca hasta 77 días post-inoculación.

En el caso de los anticuerpos, Cavanagh (24) demuestra que se detectan en el suero a los 5 días después de una vacunación o infección primaria frente al virus de la BIA y estos declinan después de los 21 días. Como estas aves reciben tres inmunizaciones los títulos después de la última dosis pueden mantenerse por un tiempo más prolongado y comienzan a declinar aproximadamente a los tres meses

post-vacunación.

En nuestro estudio las aves tenían 13 meses postvacunación lo cual sugiere que los títulos elevados se relacionan con una infección por este virus y no a la persistencia del virus vacunal.

Del análisis de los resultados obtenidos podemos concluir que en las muestras evaluadas se detectó el virus de la BIA y confirma la hipótesis de su presencia en estas aves con procesos respiratorios, identificadas por primera vez en nuestro país por técnicas moleculares.

No obstante, es necesario continuar estudios para la caracterización antigénica y molecular de estos aislados para la diferenciación de la cepa vacunal H120 y de otros serotipos variantes de este virus que pueden producir trastornos respiratorios en aves vacunadas.

REFERENCIAS

1. Wang H, Wu Q, Huang Y, Liu P. Isolation and identification of infectious bronchitis virus from chickens in Sicuani, China. *Avian Dis.* 1997;41:279-282.
2. Zanella A, Lavazza A, Marchi R, Moreno Martín A, Paganelli, F. Avian infectious bronchitis: characterization of new isolate from Italy. *Avian Dis.* 2003;47:180-185.
3. Naqi S, Thompson G, Rauman R, Mohammed, H. The exacerbating effect of infectious bronchitis virus infection on the infectious bursal disease virus induced suppression of opsonization by *Escherichia coli* antibody in chickens. *Avian Dis.* 2001;45:52-62.
4. King D, Hopkins S. Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the haemagglutination inhibition test. *Avian Dis.* 1984;28:727-733.
5. Dawson P, Gough R. Antigenic variation in strains of avian infectious bronchitis virus. *Arch.Gesamte Virusforsch.* 1971;34:32-39.
6. Darbyshire J, Rowell R, Cook J, Peters R. Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralisation tests in tracheal organ cultures. *Arch. Virol.* 1974;61:227-238.
7. Hopkins S. Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque purified isolates. *Avian Dis.* 1979;18:231-239.
8. Csermelyi M, Thijssen R, Orthel F, Burger A, Kouwenhoven B, Luticken D. Serological classification of recent infectious bronchitis virus isolates by the neutralisation of immunofluorescent foci. *Avian Pathol.* 1988;17:139-148.
9. Koch G, Hartog L, Kant A, Van Roozelaar D, De Boer G. Antigenic differentiation of avian bronchitis virus variant strains employing monoclonal antibodies. *J Vet Med.* 1986;42:80-97.
10. Kwon HM, Jackwood MW, Gelb JJr. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.* 1993;37:194-202.
11. Aldous EW, Alexander DJ. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathol.* 2001;30:117-128.
12. Song CS, Lee YJ, Kim JH, Sung HW, Lee CW, Izumiya Y, et al. Epidemiological classification of infectious bronchitis virus isolated in Korea between 1986 and 1997. *Avian Pathol.* 1998;27:409-416.
13. Gelb JJr, Weisman Y, Ladman BS, Meir R. S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). *Avian Pathol.* 2005;34:194-203.
14. Mardini Karim, Noormohammadi AH, Ignatovic J, Browning GF. Typing infectious bronchitis virus strains using reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction fragment

- length polymorphism analysis to compare the 37.5 kb to their genomes. *Avian Pathol.* 2006;35(1):63-69.
15. Guilarte O. Identificación de los niveles de anticuerpos contra el virus de la bronquitis infecciosa y el virus de Newcastle en aves afectadas con la enfermedad respiratoria crónica. *Rev Cub Ciencia Avíc.* 1985;12:15-26.
 16. Cuello S, Noda J, Alfonso P, Perera C. Bronquitis infecciosa aviar. Cinética de anticuerpos posvacunales en reproductoras y su transferencia a la progenie. *Rev Salud Anim.* 2004;25(1):42-47.
 17. Noda J, Cuello S, Alfonso P, Casañas P. Bronquitis Infecciosa Aviar: Obtención de antígeno y detección de anticuerpos por inhibición de la hemoaglutinación. *Rev Cub Ciencia Avíc.* 2002;26(2):89-95.
 18. Cavanagh D, Mawditt K, Welchman D, Britton P, Gough RE. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. *Avian Pathol.* 2002;31:81-93.
 19. Villarreal L, Brandaño P, Chacón J, Assayag M, Maiorka P, Raffi P, et al. Orchitis in Roosters with Reduced Fertility Associated with Avian Infectious Bronchitis Virus and Avian Metapneumovirus Infections. *Avian Dis.* 2007;51:900-90.
 20. Villarreal L, Brandaño P, Chacón J, Saldenberg A, Assayag M, Jones R, et al. Molecular Characterization of Infectious Bronchitis Virus Strains Isolated from the Enteric Contents of Brazilian Laying Hens and Broilers. *Avian Dis.* 2007;51:974-978.
 21. Jackwood MW, Kwon HM, Hilt DA. Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and DNA probes. *Avian Dis.* 1992;36:403-409.
 22. Cavanagh D, Mawditt K, Britton P, Naylor CJ. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 1999;28:593-605.
 23. Naqi S. Establishment of persistent avian infectious bronchitis virus infection in antibody free and antibody-positive chickens. *Avian Dis.* 2003; 47:594-601.
 24. Cavanagh D. Survey acute respiratory syndrome vaccine development: Experience of vaccination. *Avian Pathol.* 2003;32(6):567-582.

(Recibido 6-5-2009; Aceptado 2-2-2010)