

Desarrollo de tecnología diagnóstica en sanidad aviar para la detección y caracterización de los virus de la Bronquitis Infecciosa y de Gumboro

Martín Hernández^a, Gonzalo Tomás^a, Ana Marandino^a, Yanina Panzera^a, Diego Hernández^a, Pedro Villegas^c, Alejandro Banda^b, Ruben Pérez^a

^a Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay.

^b Poultry Research and Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, P.O. Box 97813, Pearl MS39288, USA.

^c College of Veterinary Medicine, Poultry Diagnostic and Research Center, The University of Georgia, 953 College Station Road, Athens, GA 30602-4875, USA.

Correspondencia:

Dr. Ruben Pérez. E-mail: rperez@fcien.edu.uy. Tel: (598) 2525.86.19 (interno 141).

1.Introducción

1.1. Avicultura: industria sensible a los problemas sanitarios

Con el principal objetivo de producir carne y huevos a gran escala para el consumo humano, la avicultura industrial viene experimentado a través de los años un crecimiento sostenido a nivel mundial. En la primer década del 2000 la producción de carne de ave tuvo un crecimiento muy superior al resto de las carnes (FAO, 2010). En este período su producción se incrementó un 37,19 %, mientras que la carne de cerdo y la vacuna lo hicieron un 17,67 % y un 10,83 %, respectivamente. El liderazgo de crecimiento alcanzado por la industria avícola se debe en gran medida al poderoso impulso productivo de esta cadena de valor (Desouzart, 2009). El desarrollo y la transferencia de tecnologías de producción, faena y elaboración, han mejorado la inocuidad y eficiencia de los productos avícolas, satisfaciendo las exigencias de la demanda y en estimulando el ensamblaje de unidades productivas a gran escala.

El desarrollo de la industria avícola es evidente en algunos países sudamericanos como Brasil y Argentina, observándose tasas de crecimiento que promedian el 7.4 % anual. De acuerdo a los especialistas, este incremento responde a la intervención de países asiáticos en la demanda de productos, la intensificación e incorporación de tecnología de esta industria, su integración vertical eficiente, el mejoramiento continuo de los sistemas de vigilancia sanitaria, y quizás más importante, el estatus sanitario que ostentan varios países sudamericanos para ingresar a mercados exigentes (Desouzart, 2009; Aho, 2011). La industria también se está desarrollando en Uruguay, constatándose un incremento del volumen de producción del 7.08 % en el 2011 respecto al año anterior (Errea, 2011). Entre las causas de este incremento se encuentran el aumento en el consumo per cápita nacional y fundamentalmente, una mayor participación en el mercado exterior respecto a años anteriores.

La creciente aceptación local e internacional que presentan los productos avícolas sugiere que la tendencia de crecimiento de esta industria continuará en los próximos años. Mantener y mejorar la eficiencia de la cadena productiva es fundamental para continuar con el ritmo de desarrollo. Uno de los principales factores que inciden en la competitividad de esta cadena de valor lo constituye la sanidad de los lotes y las granjas. La cría intensiva a la que son sometidas las aves en la actualidad incrementa notoriamente la incidencia de los problemas sanitarios, favoreciendo la emergencia de patógenos difíciles de controlar. Enfermedades constantemente asociadas a los ciclos productivos, como las provocadas por los virus de la Bronquitis Infecciosa y de Gumboro, generan pérdidas permanentes en los parámetros productivos de las aves. Conocer la epidemiología de estas enfermedades es fundamental para diseñar planes de control efectivos y mejorar los rendimientos productivos. Para ello es necesario contar con técnicas de diagnóstico sensibles, rápidas y efectivas que se ajusten a las características epidemiológico-evolutivas del agente infeccioso en estudio. Las técnicas moleculares han demostrado ser muy eficientes para el desarrollo de metodologías de diagnóstico que integren los conceptos mencionados. Desde luego, el desarrollo de estas metodologías y su eficacia o efectividad requiere un conocimiento profundo del genoma del agente patógeno, así como de su ciclo infeccioso.

1.2. Revisión técnica de los virus abordados

1.2.1. Virus de Bronquitis Infecciosa (IBV).

IBV (género *Coronavirus*, familia *Coronaviridae*) es un virus envuelto con genoma RNA simple hebra, de polaridad positiva y de 27,6 kb de largo. Este virus posee un grupo básico de genes que codifican para la RNA polimerasa (Pol), la espícula de superficie (S), la pequeña proteína de membrana (E), la glicoproteína integral de membrana (M) y la proteína de nucleocápside (N). Contiene además un grupo de genes accesorios que codifican para pequeñas proteínas no estructurales (3a, 3b, 5a y 5b), cuyas funciones aún se desconocen. El virus de la Bronquitis exhibe una enorme y constante capacidad de producir cambios genéticos que generan la aparición continua de nuevos serotipos o variantes. Desde su descripción en los años 30 (Shalk & Hawn, 1931), se han reportado más de 60 variantes antigénicas en el mundo, originadas principalmente en áreas con altos niveles de producción avícola. Los cambios genéticos asociados a estas variantes se generan por la elevada tasa de mutación genética, característica de virus con genoma RNA, y por recombinación genética entre diferentes tipos de IBV (Cavanagh et al., 1988).

IBV es el agente causal de la Bronquitis Infecciosa, una enfermedad aguda que afecta aves de corral de todas las edades, siendo mucho más severa en pollos de hasta dos semanas de edad (Crinion et al., 1971; Munner et al., 1987). La sintomatología que presentan las aves infectadas por IBV es variable y depende de factores tales como la cepa de virus infectante, la edad de las aves y su estado inmunitario. En general se manifiesta con síntomas respiratorios como tos, estornudos, exudados nasales y oculares, estridor y disnea (Shalk et al., 1931). Este cuadro puede agravarse por infecciones bacterianas secundarias, apreciándose un considerable aumento en la mortalidad media del lote (Goryo et al., 1984; Naqui et al., 2001). En gallinas ponedoras se produce un descenso en la producción de huevos, pudiendo llegar a disminuir la postura en un 50 %. Los huevos pueden presentar alteraciones externas características como cáscara rugosa, forma asimétrica, deficiencias en la calcificación y fragilidad excesiva. Se aprecian asimismo alteraciones en la calidad interna del huevo, tales como albúmina acuosa y yema con deficiencias en la pigmentación (Kinde et al., 1991). En el caso de reproductoras, además de la sintomatología respiratoria, se produce un marcado descenso de la fertilidad y muerte embrionaria (Gelb et al., 1991; Cavanagh et al., 1997). Desde los años 60 se reportan también casos de IBV que afectan gravemente el sistema renal, provocando importantes lesiones. A este tipo de virus se los conoce como nefropatógenos (Winterfield & Hitchner, 1962). Dada la gravedad de estas variantes, son consideradas notificables a los centros de investigación y vigilancia sanitaria de referencia para esta enfermedad.

La gran cantidad de variantes antigénicas y las diferentes manifestaciones de las infecciones por IBV representan un problema continuo para su control. En la década del 50 se comenzaron a utilizar las primeras vacunas a partir de cepas de campo atenuadas; 20 años después se desarrollaron vacunas inactivadas. Las actuales vacunas vivas brindan buena protección contra variantes de campo similares, pero los títulos protectivos comienzan a declinar alrededor de nueve semanas después de la vacunación. En pollos de engorde, cuyos ciclos productivos generalmente no exceden los 60 días, la vacunación se efectúa con vacunas vivas a temprana edad para inducir suficiente protección como para cubrir el período total de crianza. En ponedoras y reproductoras

se incluyen varias dosis de vacunas vivas en las primeras etapas de vida y se refuerza con la aplicación de vacunas inactivadas en etapas previas a la producción. Con esto se pretende proteger el ave en todo su ciclo productivo y en el caso de aves reproductoras, transmitir además inmunidad pasiva a la progenie (Cavanagh et al., 2003).

A pesar de la vacunación sistemática, es muy común que surjan brotes de la enfermedad en lotes de aves correctamente vacunados. Estos brotes podrían ocurrir por diferencias antigénicas entre los aislados de campo y los serotipos vacunales. Esta situación es particularmente frecuente en IBV debido a que muchas veces se aplican vacunas desconociendo el tipo de virus que circula en el campo; si existen diferencias antigénicas significativas entre la vacuna dosificada y la cepa de campo se generará escasa inmunidad cruzada contra el serotipo circulante (Cavanagh & Naqui, 2003).

1.2.2. Virus de Gumboro (IBDV)

IBDV (género *Avibirnavirus*, familia *Birnaviridae*) es un virus envuelto de cápside icosaédrica con genoma de RNA doble hebra bisegmentado. El segmento genómico A (3,2 kpb) presenta dos regiones codificantes. La región codificante mayor genera una poliproteína que se procesa para originar las proteínas estructurales VP2 y VP3, y la proteasa viral VP4. La segunda región codificante genera la proteína de liberación celular VP5, y se halla mayormente solapada y desfasada en un nucleótido con la región codificante mayor. El segmento B (2,9 kpb) codifica la RNA polimerasa viral RNA dependiente (VP1).

En el mundo circulan tres cepas de IBDV: clásicas (cIBDV), variantes (vaIBDV), e hipervirulentas (vvIBDV). Las cepas clásicas se describieron a comienzos de los 60` en los Estados Unidos y rápidamente se dispersaron por todo el mundo (Cosgrove, 1962). Las cepas variantes A emergieron a mediados de los 80` y se caracterizaron por ser antigénicamente diferentes a las cepas clásicas, aunque presentaban una patogenia similar. Poco tiempo después surgieron las cepas hipervirulentas, antigénicamente similares a las clásicas pero con mayor patogenia. Estas cepas se distribuyeron rápidamente por todos los continentes, causando importantes pérdidas a la industria avícola (van den Berg et al., 1991).

IBDV es el agente causal de la enfermedad de Gumboro o Bursitis Infecciosa que afecta exclusivamente aves de corta edad. El virus infecta los linfocitos B inmaduros que se localizan en la bursa de Fabricius, órgano linfoide primario de las aves durante las primeras semanas de vida. La replicación viral genera depleción linfocitaria, provocando cuadros de inmunodepresión leve hasta casos de inmunosupresión severa y muerte (Hirai et al., 1981). De acuerdo a su sintomatología, la enfermedad de Gumboro tiene dos tipos de presentación: la forma subclínica y la clínica. Estas presentaciones dependen de la edad en que ocurre la infección, del grado de inmunidad de las aves infectadas y principalmente, del tipo de cepa involucrada. La forma subclínica es producida por cepas variantes y clásicas. Las cepas variantes afectan aves menores de tres semanas y generan un cuadro de inmunodepresión con inflamación inicial de la bursa de Fabricius y posterior atrofia de este órgano. Las cepas clásicas originan la forma subclínica, especialmente cuando las aves se infectan antes de las tres semanas de edad. Estas cepas clásicas provocan una leve inflamación de la bursa de Fabricius, pero

no producen atrofia posterior de este órgano como ocurre con las cepas variantes. Tanto en cepas clásicas como variantes se produce una distorsión de los parámetros productivos del lote, disminuyendo el peso y viabilidad de las aves, y un incremento de la susceptibilidad a patógenos oportunistas. Ambas cepas causan enormes pérdidas que generalmente son difíciles de estimar con exactitud, ya que si no existe un plan específico de rastreo el virus de campo puede permanecer mucho tiempo sin ser detectado.

La forma clínica de la enfermedad de Gumboro es producida por cepas hipervirulentas y se presenta generalmente en aves de tres a seis semanas de edad, provocando altos índices de morbilidad y mortalidad en las parvadas. Las aves afectadas generalmente presentan diarrea acuosa y blanquecina (diuresis), anorexia, depresión, erizamiento de las plumas, temores, postración y en etapas finales, deshidratación severa e hipotermia (Figura 1a). En la necropsia puede observarse hemorragias generalizadas, especialmente en masas musculares de muslos y pectorales (Figura 1b). La lesión más característica es la inflamación de la bursa y su posterior atrofia. La bursitis se hace evidente al tercer día de la infección, con la aparición de un exudado gelatinoso amarillento entre la túnica serosa y la pared de la bursa (Figura 1c). En casos muy virulentos, este exudado puede llegar a ser sanguinolento, presentándose focos necróticos en las folias bursales (Figura 1d). Al cuarto día post-infección, la bursa presenta el doble de su tamaño normal y aparecen estriaciones longitudinales en su superficie; posteriormente comienza a disminuir su tamaño hasta atrofiarse completamente. En la etapa aguda de la enfermedad, los animales se encuentran severamente deshidratados y presentan depósito de uratos en los uréteres. Los riñones se encuentran hipertrofiados con aspecto marmóreo, debido probablemente a una nefritis, producida por la replicación viral, o a una nefrosis, producto de acumulo de células en los túbulos renales y deshidratación severa.

Es importante destacar que a mediados de la pasada década se realizó la descripción de virus de campo de IBDV con reordenamiento entre los de los segmentos genómicos A y B, entre cepas hipervirulentas y clásicas (Le Nouën et al., 2006), e incluso entre cepas hipervirulentas y cepas vacunales (Wei et al., 2006). En estos virus reordenados existe una mezcla entre caracteres moleculares, estructurales y funcionales, producto de la combinación de los segmentos de las cepas involucradas. Dependiendo de los segmentos involucrados en el reordenamiento, se producen cambios en la epidemiología de la enfermedad, lo que representa un riesgo para el control sanitario de IBDV.

Las vacunas que se emplean mundialmente para el control de IBDV son confeccionadas a partir de cepas madre de virus clásicos y variantes de referencia. Debido a la similitud antigénica entre los cIBDV y vvIBDV, el control de estos últimos se realiza con planes de vacunación específicos con cepas clásicas. También existen vacunas clásicas inactivadas con emulsión oleosa que ayudan en la transferencia de inmunidad materna, necesaria para la protección de la progenie en los primeros días de edad. Para el caso de cepas variantes, los planes de vacunación incluyen solamente vacunas inactivadas de cepas variantes. Para mejorar la aplicación y el manejo de las vacunas en el campo, en los últimos años se han desarrollado biológicos de alta tecnología, como vacunas recombinantes y vacunas de complejo antígeno-anticuerpo. A pesar del mejoramiento en el diseño y efectividad de las vacunas, siempre que se

desconozca el tipo de cepas de campo que circulan en los sistemas productivos, existirá una enorme dificultad para diseñar y ejecutar planes de vacunación idóneos.

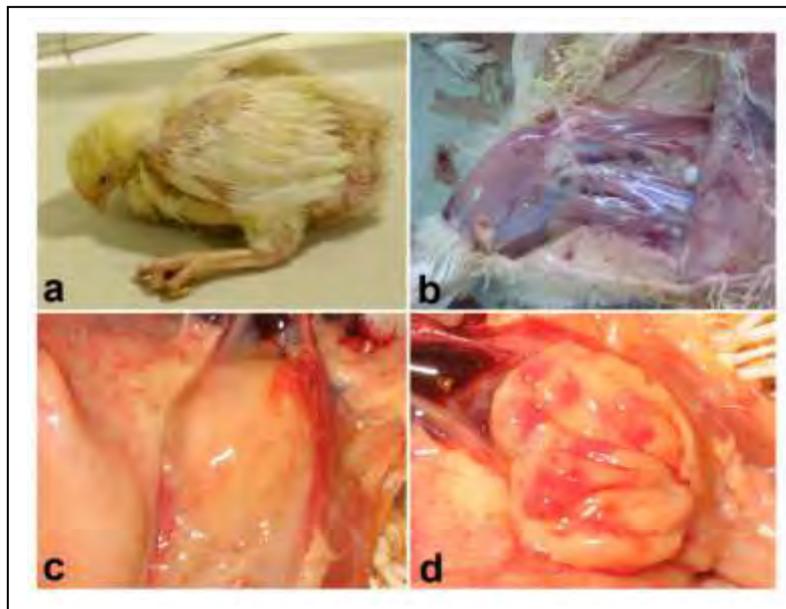


Figura 1. Manifestaciones clínicas asociadas a la enfermedad de Gumboro. a) Ave afectada con erizamiento de plumas, tremores y postración. b) Hemorragias en masas musculares de muslos. c) Exudado entre la túnica serosa y la pared de la bursa. d) Focos necróticos en las folias bursales. Fotos obtenidas de casos clínicos uruguayos.

2. Objetivos de la investigación

El objetivo general del presente trabajo fue desarrollar técnicas moleculares para la detección y caracterización de los virus de Bronquitis infecciosa y Gumboro que circulan en la industria avícola de Uruguay.

3. Técnicas moleculares para la detección y la caracterización genética de los agentes virales

Las técnicas moleculares son las herramientas básicas que se requieren para el diseño de metodologías de detección y caracterización genómica. La mayoría de ellas tienen como base la reacción en cadena de la polimerasa, también conocida como PCR (siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*). Mediante esta técnica se amplifican regiones del genoma viral que permiten su detección y análisis. La región de interés se amplifica utilizando pequeños oligonucleótidos (primers o cebadores) que hibridan con las secuencias flanqueantes y actúan como iniciadores de la síntesis de las nuevas moléculas. El proceso de síntesis se repite varias veces durante la reacción de PCR y genera un gran número de copias de la región de interés. El fragmento amplificado

(amplicón) puede visualizarse por un proceso de electroforesis en un soporte sólido, como un gel de agarosa o poliacrilamida (Figura 2).

Debido a que la técnica de PCR sólo funciona utilizando un molde de DNA, los virus con genoma de RNA como IBV e IBDV, requieren un paso previo de retrotranscripción (RT). En esta etapa, la información del RNA genómico es transcrita de forma reversa en DNA complementario para que este pueda ser utilizado como molde en la reacción de PCR. El proceso total de retrotranscripción y posterior amplificación por PCR, en el que se parte de RNA y se genera un amplicón de la secuencia de DNA de interés, se conoce como RT-PCR (Figura 2).

Una vez amplificada la región genómica de interés se debe obtener información de su secuencia nucleotídica para poder caracterizar al virus. Existen metodologías de caracterización directa o indirecta de acuerdo al tipo de información que brindan. Una caracterización directa implica la secuenciación completa del amplicón, lo cual brinda la mayor información sobre la región amplificada del genoma. En la caracterización indirecta la información se obtiene sólo a partir de sitios específicos del genoma. Uno de los sistemas más utilizados es el Polimorfismo del Largo de los Fragmentos de Restricción o RFLP (siglas del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) en el que se utilizan enzimas de restricción que reconocen secuencias específicas del amplicón y generan cortes en el DNA. De esta manera se forman fragmentos de diferente longitud que, al ser sometidos a una corrida electroforética, producen patrones de RFLP característicos (Figura 2). Cambiando las enzimas y las regiones genómicas utilizadas, se pueden obtener patrones de restricción que llegan a diferenciar distintas variantes virales.

En los últimos años se implementó el análisis en tiempo real de la reacción de PCR. El PCR en tiempo real (Real Time PCR) es ideal para el desarrollo de metodologías de diagnóstico. Entre sus ventajas se encuentran la facilidad de empleo, mayor rapidez en la obtención de los resultados y un menor riesgo de contaminación por no requerir la manipulación posterior del amplicón. Esta técnica permite también caracterizar el amplicón y establecer el número de copias de genomas que hay en una muestra, lo que convierte a la PCR en tiempo real en una técnica tanto cualitativa como cuantitativa.

El funcionamiento básico del PCR a tiempo real se basa en la lectura del progreso de la reacción de PCR ciclo a ciclo. El incremento exponencial de las moléculas de DNA se registra en cada etapa de la reacción de amplificación, lo que permite que la amplificación y detección de las nuevas copias de DNA se realice de manera simultánea (Figura 2). Esto se logra mediante el uso de compuestos que se acoplan y emiten fluorescencia durante el proceso de síntesis del amplicón. El equipo de PCR en tiempo real contiene una cámara de lectura especial (cámara CCD) capaz de detectar la emisión de fluorescencia en cada ciclo. Debido a que la fluorescencia es proporcional a la cantidad de amplicón formado, se puede inferir el número de copias genómicas que existían al comienzo de la reacción de PCR.

En el desarrollo de este proyecto se seleccionó un sistema de fluorescencia de sondas (oligonucleótidos cortos de 15 a 20 bases) de hidrólisis o TaqMan, las cuales brindan una gran especificidad. El principio de esta herramienta se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET: siglas del inglés *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) entre dos fluoróforos adyacentes. Uno de los fluoróforos opera como donador (en inglés *reporter*) emitiendo fluorescencia, y el segundo fluoróforo actúa como aceptor (en inglés *quencher*) absorbiendo la energía del

primero. La sonda contiene ambos fluoróforos ubicados en sus extremos opuestos. Mientras la sonda esta intacta y ambos fluoróforos se encuentran próximos, la fluorescencia emitida por el donador se encuentra bloqueada o apagada por efecto del aceptor; para que se produzca la emisión de fluorescencia se requiere una separación física de ambos fluoróforos.

Las sondas TaqMan son complementarias al amplicón e hibridan con el mismo a medida que va ocurriendo la amplificación por PCR. Durante el proceso de síntesis, la Taq polimerasa se encuentra con la sonda hibridizada y la degrada mediante su actividad exonucleásica. La degradación de la sonda produce la separación del donador y el aceptor, generando la emisión de fluorescencia. A medida que avanza la reacción de PCR, la fluorescencia se registra en cada ciclo y puede visualizarse en forma gráfica (Figura 2).

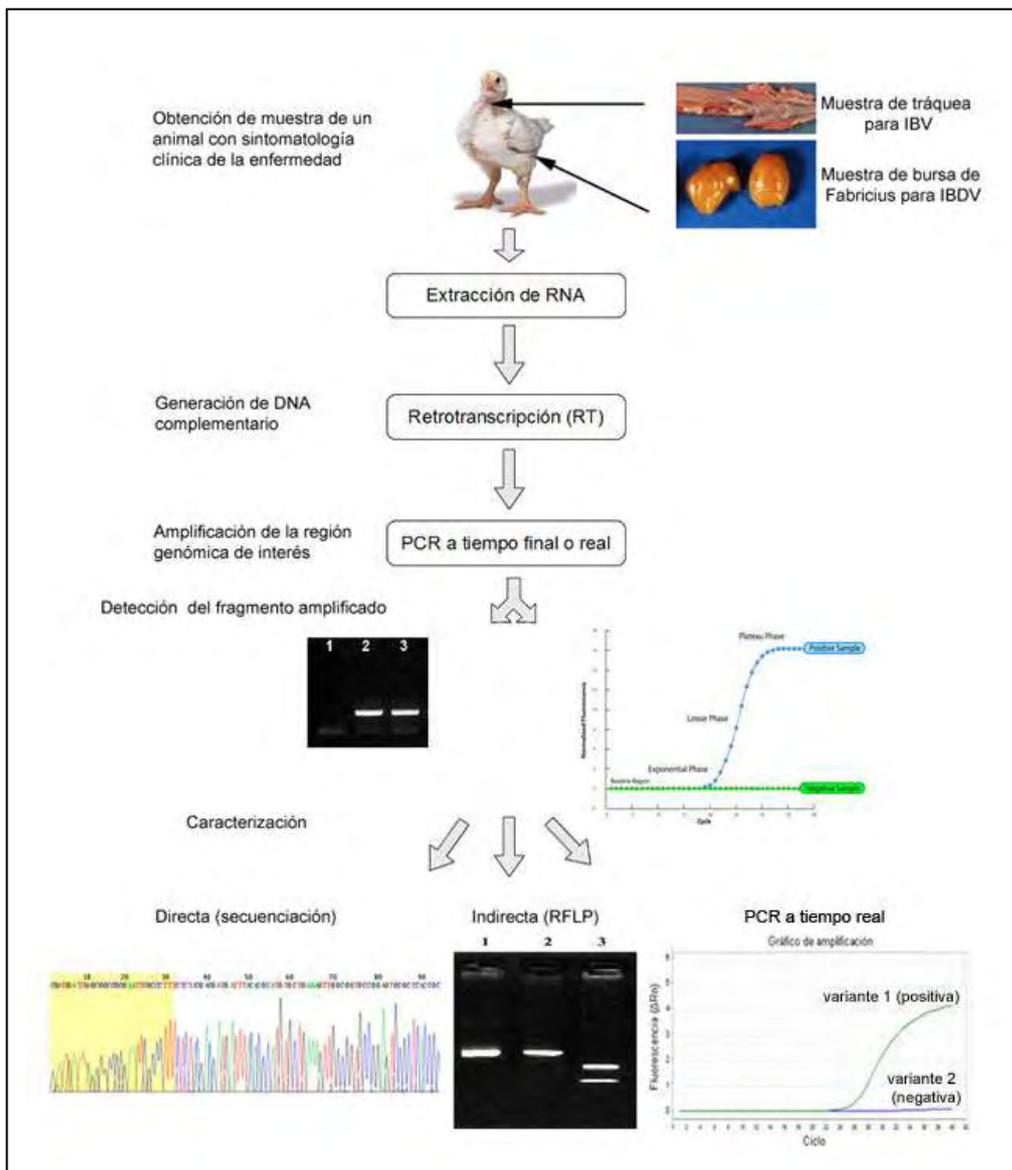


Figura 2. Estrategia y metodología molecular utilizada para la detección y caracterización de agentes virales. El RNA viral se extrae de la muestra correspondiente (traqueas para IBV y bursa de Fabricius para IBDV). Posteriormente se lo somete a una reacción de retrotranscripción para generar el cDNA requerido como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR puede ser a tiempo final o real. El amplicón generado por la PCR a tiempo final puede caracterizarse por secuenciación o por el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP). La caracterización por PCR en tiempo real puede realizarse utilizando sondas específicas para cada variante genética.

4. Descripción de los productos obtenidos

El objetivo del proyecto se cumplió mediante el desarrollo de los siguientes productos:

4.1. Productos para el virus de la Bronquitis Infecciosa

4.1.1. Estandarización de metodologías de diagnóstico de IBV

La estandarización de estas metodologías implicó la puesta a punto de la extracción de RNA de la muestra de partida, así como de la reacción de retrotranscripción (RT) y de las reacciones de PCR en tiempo final y tiempo real (Figura 2). Para ello se trabajó con vacunas liofilizadas con virus de serotipo Massachusetts que se comercializan en Uruguay, y muestras de campo de granjas uruguayas colectadas de animales con sintomatología presuntiva de IBV. Durante el proyecto se analizaron más de 30 lotes de granjas del departamento de Canelones, de los cuales ocho resultaron positivos. Todos los diagnósticos clínicos y la toma de muestras fueron realizados por médicos veterinarios especialistas en avicultura.

La toma y almacenamiento de las muestras es una etapa crítica en el procedimiento de diagnóstico de IBV. El virus replica principalmente en tráqueas, pulmones y tonsilas cecales, por lo que se debe colectar tejidos de estos órganos para un diagnóstico adecuado. Una vez colectadas, las muestras se deben guardar lo más pronto posible en un freezer a -20°C para evitar la degradación del virus y llevar al diagnóstico de falsos negativos. A dicha temperatura pueden conservarse en buenas condiciones para su análisis durante varios días. La conservación a largo plazo de la muestra requiere su almacenamiento en un freezer a -80°C .

Las metodologías desarrolladas fueron estandarizadas para el procesamiento de muestras en pool (conjunto de muestras de una misma granja) o muestras individuales, observándose buenos resultados en ambos casos. Para la extracción de RNA de las muestras se probaron técnicas estándar y kits específicos de extracción, verificándose que ambos procedimientos pueden ser utilizados para la aplicación de las técnicas de amplificación estandarizadas. Durante el proceso de retrotranscripción se generó cDNA del RNA viral y del genoma del ave. De esta forma se utilizó un único cDNA para las PCR en tiempo final o PCR en tiempo real. La detección del cDNA del ave se utilizó como control interno de la reacción para asegurar que las técnicas habían sido realizadas adecuadamente.

El diseño de la metodología de diagnóstico para PCR a tiempo final consistió en la amplificación de una región del gen N de IBV (Figura 3), cuya conservación asegura la detección de cualquier cepa de IBV, sin importar a qué serotipo pertenezca (Zwaagstra et al., 1992). También se estandarizó la amplificación del gen S para obtener información precisa del tipo de variante a la que pertenece el virus analizado. Las metodologías estandarizadas por nuestro grupo brindaron buenos resultados en la cepa vacunal y en los virus de campo analizados.

Los amplicones obtenidos de la cepa vacunal, así como de las muestras de campo positivas, fueron secuenciados y sometidos a análisis comparativos de secuencias, confirmando el correcto funcionamiento de la metodología estandarizada.

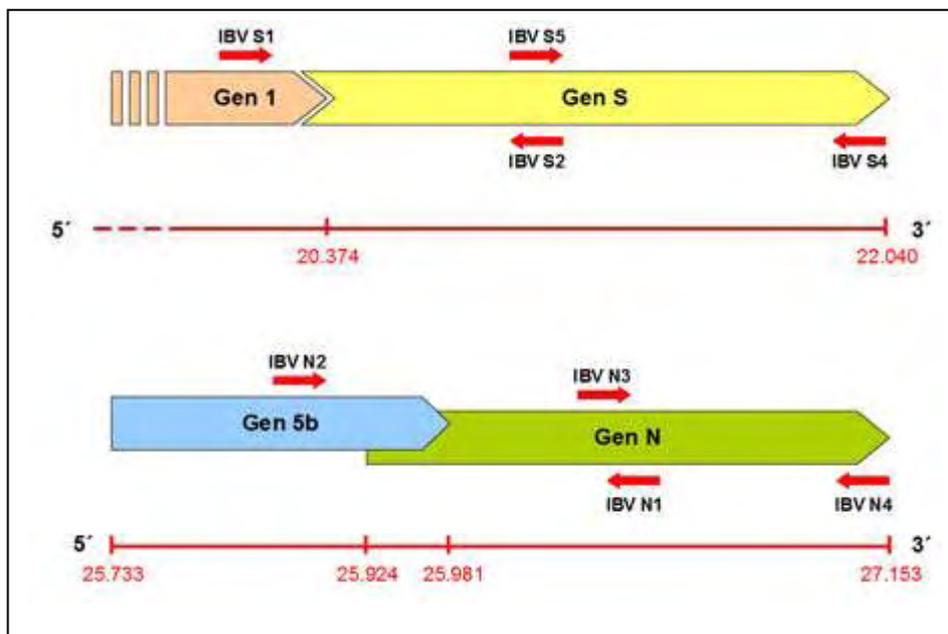


Figura 3. Representación gráfica de las dos regiones del genoma de IBV amplificadas por la prueba desarrollada para PCR en tiempo final. Con flechas rojas horizontales se indica la posición de los primers utilizados en las reacciones de RT-PCR. En el margen superior se esquematizan los genes 1 y S. En el margen superior se esquematizan los genes 5b y N. Sobre la línea roja se señalan las posiciones nucleotídicas en el genoma.

En el diseño de la metodología de diagnóstico para PCR a tiempo real se utilizó una sonda TaqMan cuya secuencia blanco se ubica en una región no-codificante del genoma de IBV conocida como región no-transcripta 5' o UTR. Esta región se encuentra muy conservada entre las cepas de diferentes serotipos (Callison et al., 2006) lo que asegura la detección de los diferentes tipos de IBV circulantes. Como parte de los ajustes y actualizaciones a la técnica original, se utilizó un fluorocromos de mejor rendimiento para el marcaje de la sonda y se diseñó como control interno de la reacción una sonda de detección del gen de la actina de pollo. El producto final desarrollado brindó excelentes resultados para la cepa vacunal y para los casos de campo positivos (Figura 4). Comparativamente, esta técnica fue más sensible y rápida que la desarrollada para PCR a tiempo final, lo que mejora la capacidad de diagnóstico y respuesta. El proceso total, desde la recepción de la muestra a la obtención del resultado, lleva tan solo cuatro horas. Igual de importante es la posibilidad de detectar el virus en forma totalmente objetiva; el software del equipo de real time es el que establece si la muestra es positiva o negativa, agregando automatización al proceso. La metodología estandarizada incluyó el sistema de cuantificación viral de la muestra problema, lo que se conoce como cuantificación absoluta. Para ello se generó una curva estándar utilizando diluciones seriadas de RNA viral generadas por transcripción *in vitro*. Las diluciones fueron cuantificadas para establecer el número de copias genómicas presentes; debido a que la transcripción *in vitro* genera solo RNA viral de tamaño conocido, el número de copias se estima a partir de su concentración. Esta curva estándar presenta una relación lineal entre el número de copias genómicas del virus y el Ct, que representa el ciclo donde la reacción de PCR cruza un determinado umbral de

fluorescencia. La muestra a ser cuantificada se procesa con los estándares de concentración generados y, determinando su Ct, se puede inferir la cantidad de copias del genoma viral que existe en la muestra analizada (Figura 5) El método de cuantificación desarrollado establece el título de un virus en una muestra dada, información que es extremadamente importante para entender la epidemiología de un brote, comprender el curso de un proceso infeccioso, y efectuar estudios de eficacia de vacunas y de inmunoprotección entre distintas cepas.

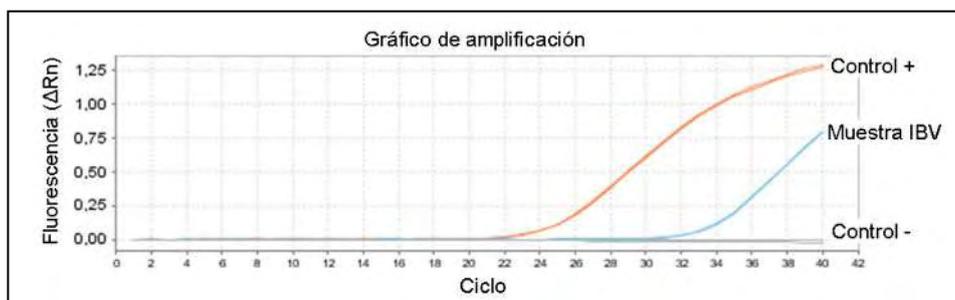


Figura 4. Aplicación de la prueba de RT-PCR en tiempo real para detección de cepas uruguayas de IBV. El gráfico de amplificación incluye el resultado del análisis de una muestra positiva para IBV (en color azul), una cepa vacunal como control positivo de la reacción (en color rojo) y el control negativo (color gris), cada uno de ellos realizados por duplicado.

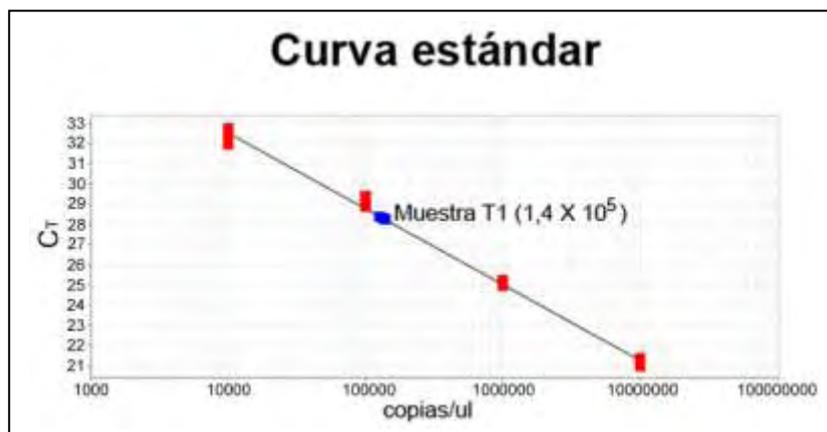


Figura 5. Curva estándar de IBV. Se muestran los cuatro puntos rojos correspondientes a las cuatro diluciones seriadas de RNA de concentración conocida, y el punto azul correspondiente a la muestra uruguaya (IBV-T1) que se cuantificó en el ensayo.

4.1.2. Caracterización genética de las cepas de IBV circulantes en Uruguay

Los virus de campo detectados por las metodologías de diagnóstico desarrolladas fueron posteriormente caracterizados mediante la secuenciación completa de los genes que codifican para la nucleoproteína N (1229 pares de bases de longitud) y la glicoproteína de superficie S1 (1716 pb de longitud). Para caracterizar estos genes se

diseñaron primers específicos a partir de alineamientos de un gran número de cepas de diferentes serotipos (Figura 3). Los amplicones se obtuvieron por RT-PCR y fueron secuenciados en forma automática por el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo.

Las secuencias codificantes de N y S1 tienen diferentes tasas de evolución. La nucleoproteína N evoluciona a una tasa mucho menor que la de S, de manera que es bastante más conservada entre los serotipos y variantes de IBV. Es conveniente contar con las dos secuencias para lograr una caracterización más amplia ya que ambas brindan información sobre diferentes aspectos del virus. Por otro lado, debido a que se ubican en sitios distantes del genoma, su comparación permite detectar eventos de recombinación entre variantes, algo que ocurre frecuentemente en estos virus.

La caracterización de los casos positivos permitió determinar la presencia en diferente frecuencia de dos variantes de IBV circulando en el territorio nacional (Marandino et al., manuscrito en preparación). Estas variantes también se encuentran circulando en Argentina y Brasil (Rimondi et al., 2009; Chacón et al., 2011). Mediante el análisis de sus secuencias se pudo observar que las variantes presentan entre sí considerable homología en el gen N pero difieren sustancialmente en S1. Pudimos constatar que ambas variantes muestran cierta divergencia respecto a la cepa vacunal Massachussets. Para la secuencia S1, la similitud aminoacídica y nucleotídica con la cepa vacunal fue de $71.8 \pm 3.6 \%$ y $74.15 \pm 3.0 \%$, respectivamente. Para la secuencia N, la similitud aminoacídica y nucleotídica con la cepa vacunal fue de $90.6 \pm 0.8 \%$ y $89.2 \pm 0.7 \%$, respectivamente.

La identificación de estas variantes representa el punto de partida de futuros estudios que permitan establecer con exactitud los niveles de protección de las vacunas con respecto a las variantes circulantes en nuestro territorio.

4.2. Productos para el virus de Gumboro

El desarrollo de las metodologías de diagnóstico por PCR en tiempo final y PCR en tiempo real para IBDV se realizó a partir de muestras de pollos parrilleros colectadas en granjas de engorde uruguayas. Durante el transcurso del proyecto se analizaron más de 50 lotes con síntomas presuntivos de IBDV, de los cuales quince resultaron positivos.

Debido a que IBDV se replica en linfocitos B de la bursa de Fabricius, este órgano representa la muestra ideal para su diagnóstico. Las metodologías desarrolladas fueron estandarizadas para el procesamiento de muestras en pool o muestras individuales, observándose muy buenos resultados en ambos casos. Al igual que para el virus de Bronquitis Infecciosa, el mantenimiento de la muestra a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento fue fundamental para efectuar un buen diagnóstico. El método de extracción genómica incluido en los productos desarrollados fue previamente estandarizado por nuestro grupo (Hernández et al., 2006).

A todos los casos positivos se los sometió a una clasificación primaria mediante la caracterización por secuenciación de la región hipervariable de VP2 y posteriores

análisis comparativos de acuerdo a metodologías previamente estandarizadas (Hernández et al., 2006; Hernández et al., 2010).

4.2.1. Técnica de múltiplex RT-PCR/RFLP

En el marco del presente proyecto se desarrolló y validó una prueba molecular de detección y caracterización genética para PCR en tiempo final que discrimina por patogenicidad las cepas tradicionales de IBDV y detecta casos con segmentos genómicos reordenados. La metodología, a la que denominamos múltiplex RT-PCR/RFLP, se basa en la amplificación simultánea de regiones informativas de los segmentos genómicos A y B, seguida de un paso de caracterización indirecta de ambos amplicones por medio de un ensayo de RFLP, utilizando una única enzima de restricción (Figura 2). Las características de este producto fueron recientemente publicadas en la revista *Avian Diseases* (Hernández et al., 2011). El desarrollo requirió un análisis exhaustivo de las secuencias nucleotídicas de ambos segmentos genómicos de las cepas de IBDV de circulación mundial. Este análisis permitió identificar cambios asociados al fenotipo de patogenicidad que fueran reconocidos por una única enzima de restricción. Una vez detectados los sitios candidatos, se diseñaron juegos de primers específicos para crear un sistema de restricción que generara patrones de RFLP capaces de clasificar por patogenicidad cada segmento genómico (Figura 6 y 7).

La metodología se estandarizó con las cepas de campo de alta y baja patogenicidad previamente caracterizadas. Debido a que no contamos con cepas reordenadas, se generaron reordenamientos artificiales mediante la combinación de clones con insertos provenientes de segmentos genómicos de diferentes cepas.

La aplicación del múltiplex RT-PCR/RFLP en las muestras de campo fue muy efectiva en cuanto a su aplicación y utilidad. La estandarización lograda, efectividad de detección y nivel informativo obtenido, además del bajo costo de aplicación en comparación con otras técnicas de diagnóstico y caracterización molecular, son algunas de las virtudes destacables de esta metodología. Sin embargo, lo más importante desde el punto de vista epidemiológico es que el uso de esta técnica asegura la detección de casos de IBDV con segmentos genómicos reordenados. El reordenamiento de segmentos genómicos entre cepas co-infectantes genera una oportunidad de escape del virus que debe considerarse para comprender la epidemiología viral en su totalidad. Se espera que la capacidad de detección y practicidad de aplicación de la metodología desarrollada fomenten su uso como técnica de rutina en los diferentes laboratorios que diagnostican esta enfermedad.

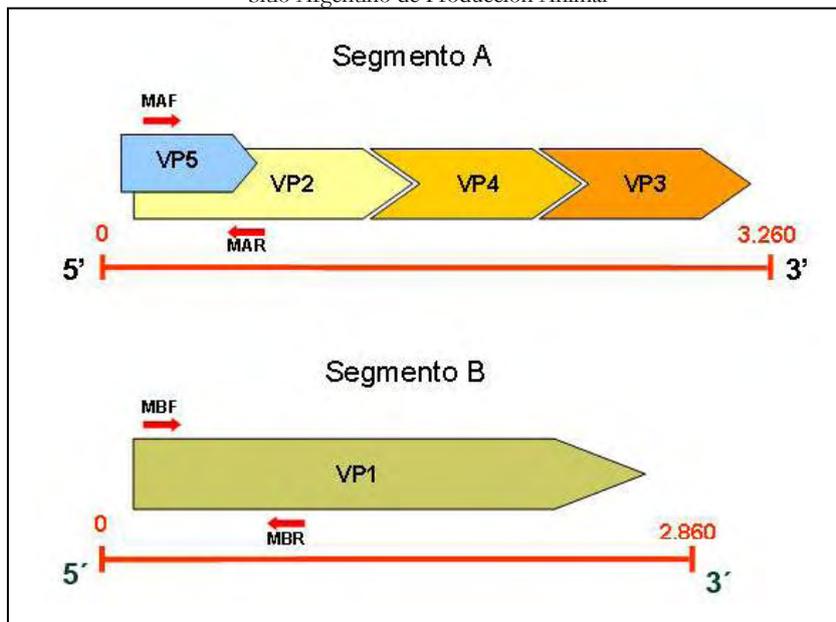


Figura 6. Posición de los primers diseñados para la prueba de múltiplex RT-PCR (flechas rojas). En el margen superior se representa el segmento genómico A con sus dos marcos abiertos de lectura: el que codifica para VP5, y el que codifica para la poliproteína pVP2-VP4-VP3. En el margen inferior se representa el segmento genómico B el que codifica para VP1.

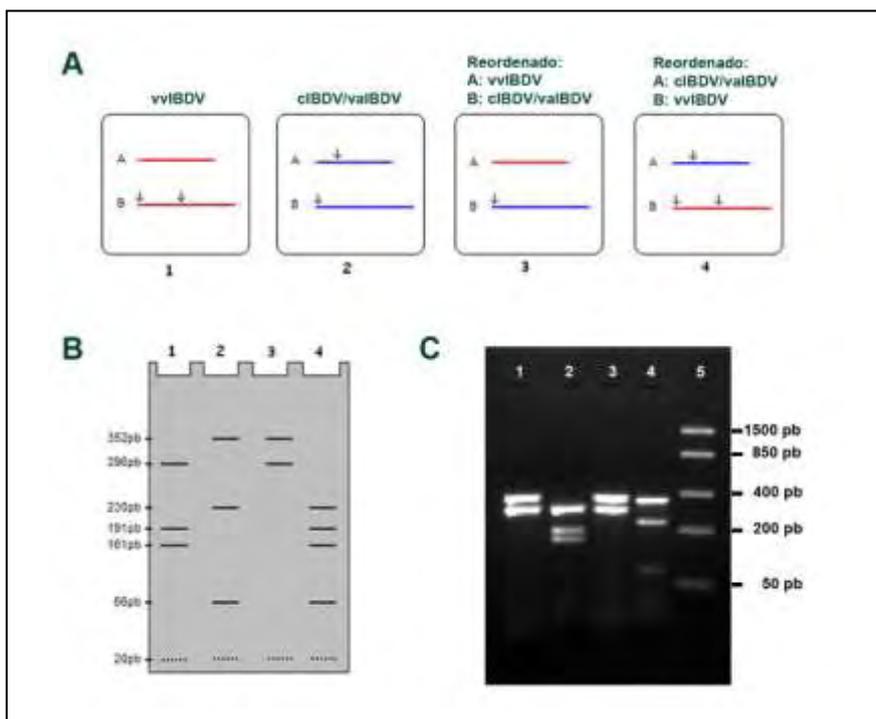


Figura 7. Técnica de múltiplex RT-PCR/RFLP para IBDV. A) Esquema de los cuatro tipos virales diferenciados por RFLP. Se representan los amplicones del segmento A y del segmento B de cada tipo viral y los sitios de corte de la enzima TfiI (flechas). B) Patrón de bandas en una muestra de alta patogenicidad (1), baja patogenicidad (2), y los dos reordenamientos posibles (3 y 4). Las bandas de 20pb no se visualizan en un gel de agarosa. C) Aplicación de la prueba múltiplex RT-PCR/RFLP en cepas de campo uruguayas de alta (carriles 1 y 2) y baja patogenicidad (carriles 3 y 4). Para ambas cepas se observa primero el producto de la amplificación del múltiplex RT-PCR sin digerir (carriles 1 y 3), y luego el mismo producto sometido al RFLP (carriles 2 y 4). En el carril 5 se ve el marcador de peso molecular.

4.2.2. Técnica de PCR en tiempo real con sondas de discriminación alélica.

En el presente trabajo se desarrolló una prueba de diagnóstico, caracterización y cuantificación por PCR en tiempo real para IBDV. El desarrollo implicó el estudio exhaustivo de secuencias de las principales cepas de IBDV con circulación mundial. Mediante este análisis se identificó la región genómica cuyas características garantizan el mejor rendimiento de la prueba. A partir de estudios evolutivos, en los que se incluyeron análisis de la frecuencia de cambio de marcadores genéticos y estudio de presiones selectivas, se escogió como secuencia blanco para el diseño de la prueba de PCR en tiempo real, la región de superposición de los genes VP5/VP2. Nuestro grupo de investigación realizó una extensa investigación del modelo de genes superpuestos VP5/VP2 de IBDV (Hernández et al., 2010). Los genes superpuestos son relativamente comunes en virus RNA y representan regiones con un tipo de evolución diferente al resto del genoma. En estas regiones, un mismo nucleótido puede intervenir en la codificación de dos aminoácidos diferentes, de manera que dicha base se encuentra bajo un doble filtro de selección. La interacción evolutiva de los marcos de lectura participantes genera una gran estabilidad en la región superpuesta y asegura una mayor conservación de los marcadores de diferenciación, permitiendo que la metodología se pueda aplicar en todos los tipos de cepas circulantes.

La técnica de PCR en tiempo real desarrollada detecta la presencia de IBDV y simultáneamente lo clasifica como una cepa de baja (clásica/variante) o de alta (hipervirulenta) patogenia (Figura 8). El modelo de discriminación está basado en la variación de una base nucleotídica (A/G) entre ambos tipos de cepas. Este polimorfismo de nucleótido simple (SNP) se identificó como uno de los más estables del genoma de IBDV para la diferenciación de este tipo de cepas. Para detectar e identificar este SNP, la prueba diseñada incluyó un par de sondas TaqMan-MGB (minor groove-binding). Estas sondas son altamente específicas y se unen únicamente a secuencias que son 100% idénticas. De esta forma, cada sonda se une exactamente a la secuencia correspondiente a la variante de alta o baja patogenia, permitiendo su diferenciación (Figura 8). Para validar esta metodología también se realizaron curvas estándar con ambas sondas, estableciendo de esta forma su rango de acción. La técnica detecta un mínimo de 10 a 100 copias virales y puede utilizarse también como método de cuantificación viral (Tomás et al., 2012).

La metodología desarrollada ofrece la posibilidad de contar con un sistema de diagnóstico y caracterización de IBDV de alta tecnología, muy conveniente para organismos de vigilancia sanitaria relacionados a la industria avícola nacional e internacional. Hasta el momento es la única metodología para PCR en tiempo real que permite con total objetividad la identificación y clasificación de todas las cepas de IBDV. Este desarrollo otorga rapidez y automatización al diagnóstico de la enfermedad de Gumboro, hecho que consideramos muy relevante para este modelo viral. El virus de Gumboro provoca sus mayores efectos negativos a partir de la mitad del ciclo productivo, generalmente desde los 21 días de edad, cuando los costos incorporados al producto son más significativos. Detectar e identificar el virus que afecta lotes de pollos en plena producción generará beneficios económicos inmediatos para el productor, volviendo más competitiva a la industria.

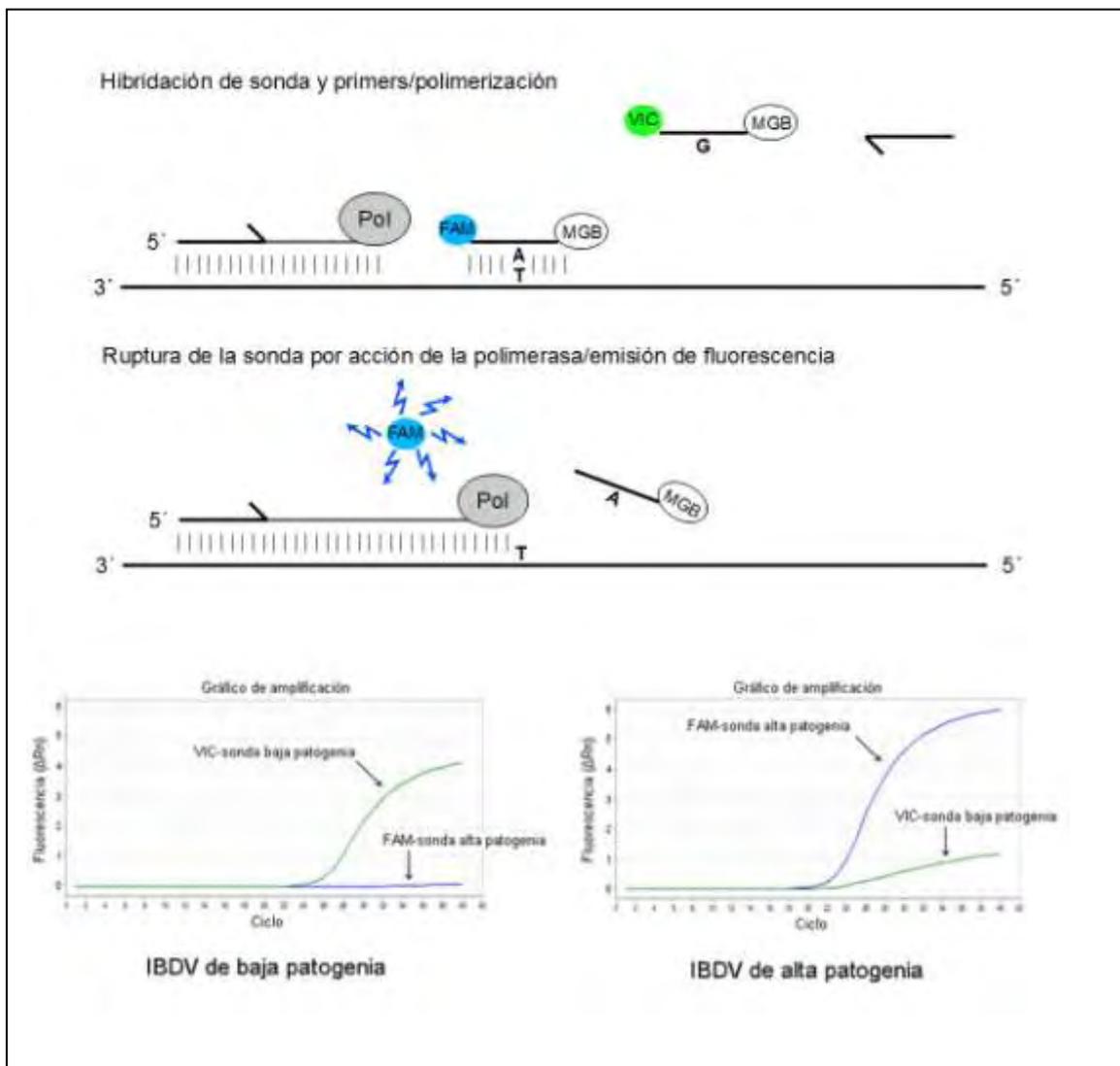


Figura 8. Aplicación de la prueba de RT-PCR en tiempo real para la detección y caracterización de las cepas de IBDV. En el margen superior se esquematiza la acción de las sondas TaqMan-MGB de discriminación alélica. En el margen inferior se presentan los gráficos de amplificación para muestras uruguayas de baja (izquierda) y alta patogenicía (derecha). La fluorescencia emitida por la sonda de baja patogenicia se indica en color verde, y la de la sonda de alta patogenicia en color azul. Las muestras se realizaron por duplicado.

4.2.3. Caracterización genética de las cepas circulantes en Uruguay

La aplicación de las técnicas de diagnóstico desarrolladas y el análisis de secuencias del genoma viral, tanto del segmento A como del B, permitió detectar una importante variabilidad de los IBDV circulantes en nuestro país. Dos de las tres cepas que circulan en el mundo están presentes en la industria avícola nacional. Se pudo determinar la existencia de virus de alta (vvIBDV) y de baja patogenicidad (cIBDV) típicos, sin observarse la presencia de cepas variantes (vaIBDV). Con la aplicación del múltiplex RT-PCR/RFLP constatamos que no existen virus con segmentos genómicos reordenados en las muestras analizadas. Lo más notable fue detectar una alta prevalencia de un tipo de IBDV de baja patogenicidad con características genéticas que lo diferencian de los típicos IBDV de baja patogenicidad (cIBDV y vaIBDV).

El nuevo grupo de IBDV detectado en Uruguay se asocia en un clado diferente respecto a las cepas de baja patogenicidad (Hernández et al., manuscrito en preparación). Los análisis realizados indicaron que presentan secuencias nucleotídicas y aminoácidas específicas, particularmente en la región codificante de la proteína de cápside VP2. Mediante análisis informáticos determinamos que existen virus de diversas partes del mundo, incluyendo países de la región como Argentina, que son genéticamente similares a los casos uruguayos analizados. Este grupo podría estar indicando que un nuevo tipo de IBDV ha emergido en los últimos años. No obstante, para determinar si existe un nuevo linaje de IBDV se deberán realizar estudios más extensos que incluyan la búsqueda de marcadores específicos, la secuenciación total del genoma, la caracterización de virus de diferentes regiones y la realización de análisis de antigenicidad. Si esto se confirma estaríamos frente al mayor cambio epidemiológico de IBDV de los últimos 25 años.

5. Conclusiones

En el presente trabajo se presentó el desarrollo y estandarización de cuatro métodos de diagnóstico molecular para los virus de Gumboro y Bronquitis Infecciosa. Los métodos fueron diseñados considerando aspectos evolutivos de ambos modelos biológicos e integraron conceptos de tecnología avanzada en el campo de la biología molecular.

Todas las metodologías inicialmente propuestas en el proyecto INIA-FPTA 264 fueron desarrolladas y aplicadas exitosamente en muestras de campo uruguayas, tanto para Bronquitis Infecciosa como para Gumboro. Todos los productos desarrollados fueron sometidos a pruebas y controles de validación en el centro de referencia para enfermedades aviares Poultry Research and Diagnostic Laboratory (PRDL) del Colegio de Medicina Veterinaria de la Universidad Estatal de Mississippi. Bajo la supervisión de especialistas de dicho centro, las metodologías fueron testadas utilizando cepas de referencia.

La aplicación en muestras de campo de las cuatro metodologías desarrolladas brinda información básica sobre el estado de situación de las enfermedades de Bronquitis Infecciosa y Gumboro en la industria avícola de Uruguay. Ambas

enfermedades se presentan con características muy particulares que motivan estudios más profundos y continuos para lograr desarrollar planes de control integrales.

En vista de los resultados obtenidos, podemos decir que las herramientas de detección y caracterización desarrolladas son altamente aplicables para los programas sanitarios que necesita desarrollar la industria avícola. La realidad epidemiológica a la que nos enfrentamos requiere este tipo de herramientas y estudios para describir la dinámica de las principales enfermedades que afectan la industria avícola del Uruguay. Continuando con este camino seguramente se logrará producir de manera cada vez más competitiva y se continuará ubicando al Uruguay en un sitio de privilegio como país que fomenta la incorporación tecnológica al sector agropecuario.

6. Bibliografía

- Aho P. Lower input prices in 2012. En: Broiler Economics. Aviagen Poultry Bulletin **19**. 2011.
- Callison SA, Hilt DA, Boynton TO, Sample BF, Robison R, Swayne DE, Jackwood MW. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *J. Virol. Methods* **138**:60-65. 2006.
- Cavanagh D, Davis P, Mockett A. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. *Virus Res.* **11**:141–150. 1988.
- Cavanagh D & Naqui S. In: *Diseases of Poultry*, 10th edition. Eds. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDouglas LR, Saif YM. Iowa State University Press. 511–526. 1997.
- Cavanagh D & Naqui S. In: *Diseases of Poultry*, 11th edition. Eds. Saif AM, Fadly YM, McDouglas LR, Swayne DE. Iowa State University Press. 101–119. 2003.
- Cavanagh D. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Path.* **32**:567-82. 2003.
- Chacón J, Nogueira J, Assayag M, Peloso C, Pedroso A, Piantino A. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Path.* **40**:153-162. 2011.
- Cosgrove A. An apparently new disease of chickens-avian nephrosis. *Avian Dis.* **6**:385-389. 1962.
- Crinion RA, Ball RA, Hofstad MS. Pathogenesis of oviduct lesions in immature chickens following exposure to infectious bronchitis virus at one day old. *Avian Dis.* **15**:32-41. 1971.
- Desouzart O. La alta calidad de las carnes de aves y sus efectos en la evolución del mercado. V Intestinal Health Food Safety Seminar – Brasil. 2009.
- Errea E. Carne aviar: situación y perspectivas. Anuario OPYPA 2011. 97-105. 2011. ([http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,7,594,O,S,0,MNU;E;66;8;MNU;,"](http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,7,594,O,S,0,MNU;E;66;8;MNU;,)).
- FAO Statistical Yearbook 2010, B10 - Producción de carne bovina, ovina y caprina; B11 - Producción de carne de cerdo y de pollo. 2010. (<http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/ess-yearbook2010/yearbook2010-production/es/>).
- Gelb J, Wolff J, Moran C. Variant Serotypes of Infectious Bronchitis Virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian Dis.* **35**:82-87. 1991.

Goryo M, Umemura T, Itakura C. Concurrence of nephrosis-nephritis due to infectious bronchitis virus and infectious bursal disease in broiler chickens. *Avian Path.* **13**:191-200. 1984.

Hernández M, Banda A, Hernández D, Panzera F, Pérez R. Detection of very virulent strains of infectious bursal disease virus (vvIBDV) in commercial broilers from Uruguay. *Avian Dis.* **50**:624-631. 2006.

Hernández M, Tomás G, Hernández D, Villegas P, Banda A, Maya L, Panzera Y, Pérez R. Novel multiplex RT-PCR/RFLP diagnostic test to differentiate low- from high-pathogenic strains and to detect reassortant Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis.* **55**(3):368-374. 2011.

Hernández M, Villegas P, Hernández D, Banda A, Maya L, Romero V, Tomás G, Pérez R. Sequence variability and evolution of the terminal overlapping VP5 gene of the infectious bursal disease virus. *Virus Genes* **41**:59-66. 2010.

Hirai M, Funakoshi T, Nakai T, Shimakura S. Sequential changes in the number of surface immunoglobulin-bearing B lymphocytes in infectious bursal disease virus-infected chickens. *Avian Dis.* **25**:484-496. 1981.

Kinde H, Daft BM, Castro AE, Bickford AA, Gelb J, Reynolds, B. Viral pathogenesis of a nephrotropic infectious bronchitis virus isolated from commercial pullets. *Avian Dis.* **35**:415-421. 1991.

Le Nouën C, Rivallan G, Toquin D, Darlu P, Morin Y, Beven V, Boisseson C, Cazaban C, Comte S, Gardin Y, Etteradossi N. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. *J. Gen. Virol.* **87**:209-216. 2006.

Munner M, Newman J, Halvorsen D, Siva-Nandan V, Com C. Effect of Avian Infectious Bronchitis Virus (Arkansas strain) on vaccinated laying chickens. *Avian Dis.* **31**:820-828. 1987.

Naqui 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.* **45**:52-62. 2001.

Rimondi A, Craig M, Vagnozzi A, König G, Delamer M, Pereda A. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus from outbreaks in Argentina (2001-2008). *Avian Path.* **38**:149-153. 2009.

Shalk A & Hawn M. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J. Am. Vet. Med. Assn.* **78**:413. 1931.

Tomás G, Hernández M, Marandino A, Panzera Y, Maya L, Hernández D, Pereda A, Banda A, Villegas P, Aguirre S, Pérez R. Development and validation of a TaqMan-MGB real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection and characterization of infectious bursal disease virus. *J. Virol. Methods.* En revisión. 2012.

van den Berg T, Gonze M, Meulemans G. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Path.* **20**:133-143. 1991.

Wei Y, Li J, Zheng J, Xu H, Li L, Yu L. Genetic reassortment of infectious bursal disease in nature. *BBRC.* **350**:277-287. 2006.

Winterfield R & Hitchner S. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am J. Vet. Res.* **23**:1273-1279. 1962.

Zwaagstra KA, van der Zeijst BA, Kusters JG. Rapid detection and identification of avian infectious bronchitis virus. *J. Clin. Microbiol.* **30**:79-84. 1992.

Sitios web de soporte

FAOSTAT – FAO Statistic (<http://faostat.fao.org/default.aspx>).

OIE - World Organization for Animal Health. (<http://www.oie.int/es/>).

PDRC - Poultry Diagnostic and Research Center – Georgia University, USA. (<http://www.avian.uga.edu/faculty/index.php>).

USDA – United States Department of Agriculture. (<http://www.usda.gov/wps/portal/usdahome>).