

Caracterización molecular y distribución temporoespacial del Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa: Situación en Cuba

Autor principal

Abdulahi Alfonso Morales¹ y Lester J. Pérez¹.

Otros autores

Carmen L. Perera¹, Orlando Martínez², María T. Frías¹.

Colaboradores

Llilianne Ganges³, Manuel Colas⁴, Roser Dolz³, Rosa Valle³, Kateri Beltran³, Natàlia Majo³.

Entidad ejecutora principal

¹Grupo de Virología Animal, Dirección de Microbiología. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)

Entidades participantes

²Universidad de las Ciencias Informáticas (UCI).

³Centre de Reserca in Sanitat Animal (CRESA).

⁴Laboratorio de Investigaciones y Diagnóstico Animal (LIDA, MINAGRI).

Resumen

La enfermedad infecciosa de la bolsa es una enfermedad viral aguda, altamente contagiosa presente en las áreas avícolas. La aparición de las cepas muy virulentas con alta mortalidad ha ocasionado grandes pérdidas económicas a la industria avícola. En Cuba, a pesar de la vacunación, desde 1992 hasta el 2002 existió una tendencia hacia la ocurrencia de brotes agudos y severos, con la circulación de cepas muy virulentas. A pesar de investigaciones previas, se desconoce la información genética de las cepas de campo, su diversidad y las variaciones espaciales y temporales desde su aparición en Cuba. El objetivo fue determinar la diversidad genética y las características moleculares de las cepas de este virus que han circulado en Cuba en los últimos 20 años, el posible origen de las mismas y su patrón de difusión temporoespacial. Se demostró que en los últimos 20 años han co-circulado cepas atenuadas y muy virulentas. Estas últimas han divergido en dos diferentes linajes, con una disminución progresiva de su diversidad genética. Se encontraron mutaciones relacionadas con el mantenimiento de la estructura de la cápsida y su estabilidad. Se demostró que el origen del virus en el país es diverso, con una introducción inicial a finales de la década del 70 y para las cepas muy virulentas en la del 90 con un patrón de difusión homogéneo por todo el país y un comportamiento endémico, así como variaciones epidémicas en algunos años. Se demostró la utilidad del marcador de 430 pares de bases para inferencias filogenéticas y se confirma la presencia de la primera cepa reordenada en Cuba.

Comunicación corta

Introducción

La Enfermedad Infecciosa de la Bolsa (EIB) es una enfermedad viral aguda y altamente contagiosa que afecta la mayor parte de las áreas avícolas del mundo (Liu y col., 2001) e infecta pollos jóvenes inmaduros sexualmente entre las 3-6 semanas de edad. La enfermedad fue inicialmente reconocida en los años 60 y el signo clínico más relevante encontrado en los animales afectados constituye la destrucción del tejido linfoide en la Bolsa de Fabricio.

Esta enfermedad es causada por el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV, siglas del inglés, infectious bursal disease virus), un virus no envuelto que pertenece a la familia Birnaviridae con genoma que consiste en dos segmentos de ARN de doble cadena (segmentos A y B) (Dobos y col., 1979). El segmento A codifica una proteína precursora en el mayor ORF, que es incidida por un proceso autoproteolítico en las proteínas VP2 (externa de la cápsida), VP4 (proteasa) y VP3 (interna de la cápsida). La VP2 es el antígeno inmunodominante del IBDV.

Hasta la fecha, dos serotipos del IBDV han sido descritos, los cuales pueden ser diferenciados por virus-neutralización. Todos los aislados patogénicos son cepas del serotipo 1, mientras las cepas del serotipo 2 no causan enfermedad ni protege contra infecciones con cepas del serotipo 1. Las cepas del serotipo 1 han sido clasificadas como: virulentas clásicas (cvIBDV), muy virulentas (vvIBDV), variantes (avIBDV) y atenuadas (atIBDV).

Las cepas vvIBDV aparecen en Bélgica durante los años 80 asociada con alta mortalidad en pollos jóvenes, y han sido la fuente de grandes pérdidas económicas en la industria avícola en muchos países. Lo que define una cepa como vvIBDV es primeramente la capacidad para causar una alta mortalidad en pollos susceptibles. Sin embargo, los estudios "in vivo" son caros, consumen mucho tiempo y a veces no son posibles, por consiguiente, desde que las cepas vvIBDV fueron descritas, estudios de genotipificación basados en secuencias de la región hipervariable de VP2 han sido ampliamente usados como procedimientos para determinar cambios en la virulencia y estudios filogenéticos del IBDV (Jeon y col., 2008).

Los impactos económicos de la enfermedad son múltiples, incluidas las pérdidas debidas a la morbilidad y la mortalidad, la inmunosupresión en los pollos que sobreviven después de la infección por IBDV donde se agravan las infecciones con otros agentes patógenos, la reducción de la capacidad del pollo para responder a la vacunación y el riesgo de introducción a lugares exóticos al importar productos infectados de aves de corral. El impacto económico de la enfermedad está influenciado por la patogenicidad de la cepa del virus, la susceptibilidad de la raza o línea de pollo, otros patógenos prevalentes y prácticas ambientales y de gestión (Ashraf, 2005).

Las pérdidas debidas a las cepas clásicas del IBDV alcanzan hasta 50% de morbilidad y menos de 3% de mortalidad en los pollos de engorde y hasta 20% de mortalidad en pollos Leghorn comerciales. Las pérdidas debidas a cepas muy virulentas en Europa han alcanzado del 30-40% de mortalidad en pollos de engorde y 50-70% en ponedoras comerciales.

En Cuba, el primer informe de la EIB se realizó en 1982. Para el control de la enfermedad se ha venido aplicando vacunas vivas desde 1986. Sin embargo, a pesar de existir una política de vacunación, a partir de 1992 y hasta el 2002 existió una tendencia hacia la ocurrencia de brotes agudos y severos. Posteriormente en Cuba se observó una disminución significativa del número de brotes y de casos anuales por Gumboro (OIE, 2014).

En nuestro país, se realizaron estudios relacionados con la caracterización de cepas del IBDV, por la importancia de la misma para la avicultura nacional y por los graves impactos que ocasionó, realizaron la evaluación patogénica de 10 aislados cubanos del IBDV de diferentes regiones del país donde se evidenció signos clínicos severos y alta mortalidad en pollos libres de patógenos específicos (SPF), en algunas cepas con valores entre 33-93%.

Estos estudios de patogenicidad demostraron la circulación de cepas vvIBDV. Realizaron los primeros análisis moleculares de aislados cubanos por reverso transcripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y por polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) donde se demostró de igual forma la presencia de vvIBDV en nuestro país.

A pesar de los estudios realizados en la caracterización de las cepas de IBDV, hasta el momento se desconoce la información genética de las cepas de campo del IBDV en Cuba, su diversidad genética y las variaciones espaciales y temporales de este virus desde su aparición en el país. De ahí la necesidad de conocer la diversidad genética en el tiempo y las características moleculares de los virus que han circulado en Cuba en los últimos 20 años.

El aporte de esta investigación permitiría mejorar el programa de control establecido para esta enfermedad al contar con las bases moleculares para la adquisición o diseño de vacunas más efectivas de acuerdo a las cepas circulantes, conocer la efectividad del programa de vacunación, lograr entender mejor la epidemiología molecular del IBDV y el diseño de metodologías diagnósticas sobre bases moleculares actualizadas.

Resultados.

1. Obtención de secuencias de un fragmento del segmento a y b.

Se realizó la caracterización molecular de la región hipervariable del gen VP2 y de un fragmento del gen de la polimerasa del virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa demostrándose que 39 de 45 cepas, colectadas entre 1992 y 2011, poseían los marcadores moleculares de cepas muy virulentas, las cuales estaban diseminadas en todo el país, el resto correspondía con cepas atenuadas, no evidenciándose la presencia de otros subtipos virales. Se pudo determinar que las cepas muy virulentas a partir del 2008 mutan la serina por asparagina de la posición 299, lo cual pudiera influir en su adaptabilidad al medio ambiente. El conocimiento de los subtipos virales que han circulado y circulan en el país contribuiría al diseño o adquisición de vacunas más específicas, así como el diseño de un programa de control y medidas de bioseguridad que contribuyan a un mejor control de las cepas virales circulantes y el diseño de herramientas moleculares específicas para su detección y diferenciación.

2. Inferencia filogenética. clasificación molecular.

Se realizó el análisis filogenético para el gen VP2 de todas las cepas cubanas secuenciadas evidenciándose que todas aquellas que poseían el marcador molecular de cepas muy virulentas se agrupaban filogenéticamente en el grupo de cepas de referencia del subtipo muy virulento. Las cepas muy virulentas que mutaron la serina por asparagina en la posición 299 originaron un subgrupo independiente, dando lugar a un linaje independiente dentro del grupo de las muy virulentas; esto es posible que represente un marcador evolutivo para las mismas. Similares resultados fueron encontrados en cepas brasileñas y españolas, sin conocerse aún las implicaciones de estas mutaciones. El resto de las cepas se agruparon con el grupo de las atenuadas. La clasificación por

inferencia filogenética demostró una correspondencia con los marcadores moleculares descritos para las cepas muy virulentas y atenuadas.

3. Tasa de sustitución, escala-tiempo de la historia evolutiva y análisis filodinámico.

Se pudo demostrar con la aplicación de programas bioinformáticos de última generación que la diversificación de este virus en los diferentes subtipos (clásicas, variantes, atenuadas) en el mundo ocurrió alrededor del año 1922 (entre 1869-1960).

La aparición del subtipo muy virulento a escala mundial resultó sobre el año 1970 (1956-1985). La fecha más probable para la llegada del virus al país estuvo alrededor del año 1977 (1952-1992), lo cual estuvo en correspondencia con el primer informe de la presencia del virus en Cuba de 1982. Por eso podemos decir que una importante importación de animales procedentes de la URSS en 1978 pudo haber sido la causa más probable para la introducción de este virus en el país. La media estimada de la tasa de mutaciones para las cepas cubanas fue 1.94×10^{-3} lo que se corresponde con una de las más altas del mundo.

La historia demográfica de las cepas muy virulentas en Cuba mostró una tendencia hacia un crecimiento inicial de la diversidad genética entre 1994-1996 que indicó un comportamiento epidémico del virus, posiblemente generado por la introducción inicial de estas cepas. Sin embargo, desde el año 1999, cuando se aplicó un nuevo programa de vacunación se observó una disminución discontinua de la diversidad genética del virus en el país, lo cual es una evidencia de la efectividad de ese programa de control. A pesar de la disminución discontinua de esta diversidad genética en el año 2006 se observa un pequeño pico de incremento de la diversidad, lo cual pudiera estar relacionado con la aparición del subgrupo de cepas muy virulentas, que corresponde con el linaje que mutaron la serina en la posición 299 y es el que predomina actualmente en el campo.

Esta investigación permitió poder estimar las fechas de origen de los diferentes subtipos del virus, la llegada del virus al país y su historia evolutiva en Cuba.

4. Filogenia de asociación rango geográfico y análisis filogeográfico.

Se pudo demostrar que la evolución a escala global de las cepas muy virulentas del virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa no es homogénea, sino que presenta una estructura geográfica, sin embargo para Cuba la distribución de estas cepas es homogénea por toda la isla.

Con esta investigación se hace un importante aporte al conocimiento científico sobre el origen, evolución y difusión de este virus en el mundo, siendo el primer estudio al respecto. Se constató que el mismo se originó en Irán alrededor del año 1981 y que a partir de este país llegó a Europa en 1987, específicamente a Bélgica y a los Países Bajos en 1988 con su posterior difusión por todo ese continente, lo cual cambia completamente los conocimientos precedentes en la

literatura científica sobre el origen y difusión de este agente viral a escala mundial.

A la región de Asia, sobre todo China y Japón llegaron las variantes muy virulentas del virus sobre el año 1992. Para la Región Caribe, las cepas muy virulentas llegaron alrededor del año 1995 y en América del Sur para el año 2000.

Estas variantes muy virulentas llegaron a nuestro país entre los años 1993-1995, específicamente a la región occidental, que es precisamente donde se encontraban las mayores poblaciones avícolas del país y que coincidió precisamente con el aumento epizootico del número de brotes epizooticos. Si tenemos en cuenta todo esto, la importación de aves procedentes de Holanda en 1993 pudo haber sido la causa más probable de introducción de los virus muy virulentos en nuestro país. Una vez que las cepas muy virulentas llegaron a Cuba el virus se propagó rápidamente desde la región occidental hacia el oriente del país en sólo tres años para una difusión completa por todo el territorio nacional para el año 2001.

5. Presión de selección y cálculo de distancia de la estructura de cristal.

A nivel de la región hipervariable del gen VP2 del virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa se pudieron encontrar altos valores de entropía que reflejan muchas zonas con alto grado de variabilidad entre cepas y donde la mayoría de las mutaciones encontradas estaban bajo presión de selección neutral. El valor más alto de entropía se encontró en la posición 299 de la región hipervariable, que coincide precisamente con la mutación serina por asparagina encontrada en las cepas cubanas y que las subdivide en dos subgrupos filogenéticos. Por lo tanto, estos resultados podrían sugerir que los cambios fijados a través del tiempo en la posición 299 podrían ser mutaciones más ventajosas consideradas como deriva génica.

Cuando se realizaron los cálculos de la estructura de cristal de esta molécula se pudo demostrar que la mutación por asparagina aporta una mayor estabilidad al trímero de la VP2 que es la unidad que forma la cápsida viral al reducirse la distancia espacial entre las cadenas, por tanto este evento de deriva antigénica generado al azar pudo haber aportado una ventaja adaptativa a estas cepas que reemplazaron casi completamente a sus predecesoras. Todo esto es una evidencia que el virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa continua su proceso evolutivo mutando y adaptándose a las nuevas condiciones, originando nuevas variantes que le permitan su estabilidad en el tiempo y su permanencia en las poblaciones avícolas con potencialidad de originar brotes cada vez que las condiciones de bioseguridad no sean cumplidas adecuadamente.

El estudio de 20 años de evolución viral contribuye de manera significativa al entendimiento de la epidemiología de este agente viral y mejorar las estrategias de control. La emergencia de nuevas cepas incrementa la importancia de la vigilancia de la situación en el campo. Además, el incremento del comercio internacional de huevos, aves y carne, así como y la producción avícola y los riesgos de nuevas cepas, hace que sean necesarias estas investigaciones que

nos permita entender mejor la epidemiología molecular de este agente viral para su control y prevención.

6. Evaluación de la señal filogenética y análisis filogenético del genoma completo, del marcador filogenético y de las secuencias cubanas para el gen VP1.

Se pudo demostrar que tanto para el genoma completo como para el marcador propuesto las secuencias tienen la suficiente calidad filogenética para ser usadas en los estudios de inferencia filogenética. Además este resultado constituye la primera evidencia para la ciencia de que con un fragmento del gen de la polimerasa viral (marcador propuesto de solo 430 pares de bases) se aporta la misma información filogenética que el genoma completo, por lo que esto constituye un gran ahorro en recursos humanos, materiales, financieros y en tiempo, al no tener que secuenciar el genoma completo de la polimerasa viral para realizar una inferencia filogenética de clasificación molecular. Además el uso de solo un fragmento permite incorporar un mayor número de secuencias de muestras de campo en los estudios moleculares de este agente viral.

Esta investigación permitió identificar la primera cepa de IBDV reordenada de Cuba que constituye además uno de los pocos informes de reordenados naturales a nivel mundial para este agente viral.

7. Escala-tiempo de la historia evolutiva.

La evolución de este agente viral demuestra que las principales ramas de diversificación de las cepas muy virulentas ocurrieron entre 1984 y 1986 lo que reafirma que el reordenamiento probable del segmento B ocurre entre 1980 y 1985 y fue el causante del inicio de la expansión de vvIBDV a partir de 1985, posiblemente por incremento de la virulencia del virus en sinergia con el segmento genómico A. Se demostró que el reordenamiento genético de la cepa cubana ocurre en Cuba posterior a la introducción de las cepas muy virulentas.

Este reordenamiento ocurrió entre una cepa muy virulenta que aportó el segmento A y una cepa atenuada que aportó el segmento B, cambiando posiblemente el patrón de virulencia de esta cepa viral.

Originalidad e impacto científico

- ✓ Se realizó por primera vez para Cuba la caracterización molecular para los dos segmentos del virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa donde se demuestra que la mayoría de las cepas que circulan pertenecen al subtipo muy virulento.
- ✓ Se demostró la presencia de dos linajes o subgrupos dentro del grupo de cepas muy virulentas del virus que demuestra su evolución desde su introducción en el país.
- ✓ Se determinó por primera vez el patrón temporal y espacial de difusión para las cepas muy virulentas a nivel mundial y para Cuba, identificando además su país de origen.
- ✓ La dinámica poblacional con la disminución de la diversidad genética de las cepas muy virulentas evidenció que el programa de control por vacunación contra la enfermedad es efectivo.

- ✓ Se demostró la utilidad de un marcador filogenético de solo 430 pb de VP1 para inferencias filogenéticas que contribuye significativamente a un ahorro considerable de recursos económicos y computacionales.
- ✓ Se identificó por primera vez para Cuba la presencia de una cepa natural reordenada con un posible cambio de patogenicidad.

Impacto económico

Estos resultados constituyen aportes al conocimiento sobre el origen, evolución y difusión del virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa, así como de sus características moleculares y antigénicas, elementos imprescindibles a tener en cuenta para el diseño o adquisición de vacunas más efectivas, y la mejora de las estrategias de control que apoyen el programa de bioseguridad. Aporta las bases moleculares para el diseño de herramientas diagnósticas que permita identificar y diferenciar los diversos subtipos de este agente viral. Todo lo cual contribuye finalmente al aumento de los rendimientos productivos y de los indicadores de salud de la masa avícola, que se revertiría en una mejora de la seguridad alimentaria de la población.

Referencias Bibliográficas

- [1] Ashraf, S. Studies on infectious bursal disease virus (Tesis doctoral). Ohio: Univ. of Ohio; 2005.
- [2] Jeon WJ, Lee EK, Joh SJ, Kwon JH, Yang CB, Yoon YS, et al. Very virulent infectious bursal disease virus isolated from wild birds in Korea: Epidemiological implications. *Virus research*. 2008; 137:153-6.
- [3] Liu HJ, Huang PH, Wu YH, Lin MY, Liao MH. Molecular characterization of very virulent infectious bursal disease viruses in Taiwan. *Research Veterinary Science*. 2001; 70:139-147.
- [4] OIE (World Organisation for Animal Health) WAHID (World Animal Health Information Database) 2014.

Publicaciones

- ✓ Alfonso A, Noda J. Análisis retrospectivo del comportamiento epizootiológico de la Enfermedad de Gumboro en Cuba. *REDVET* (publicación periódica en línea) 2012;13(10). Se consigue en: URL: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101012.html>
- ✓ Alfonso-Morales A, Martínez-Pérez O, Dolz R, Valle R, Perera CL, Bertran K, et al. Spatiotemporal Phylogenetic Analysis and Molecular Characterisation of Infectious Bursal Disease Viruses Based on the VP2 Hyper-Variable Region. *PloS one*. 2013;8(6):e65999.
- ✓ Alfonso-Morales A, Rios L, Martínez-Pérez O, Dolz R, Valle R, Perera CL, et al. Evaluation of a Phylogenetic Marker Based on Genomic Segment B of Infectious Bursal Disease Virus: Facilitating a Feasible Incorporation of this Segment to the Molecular Epidemiology Studies for this Viral Agent. *PloS one*. 2015;10(5):e0125853.