

ORIGINAL

Genotyping of news variants of the avian infectious bronchitis virus from Tolima department, Colombia

Genotipificación de variantes del virus de bronquitis infecciosa aviar en el departamento del Tolima, Colombia

Analorena Cifuentes-Rincón,^{1*} MVZ, Priscila D Lopes,¹ M.Sc, Rosa A Sanmiguel P,² M.Sc.

¹Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. ²Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Laboratorio de morfofisiología, grupo IMPRONTA, Sede Ibagué - Colombia. *Correspondence: lorenacifuentesmvz@gmail.com

Received: July 2015; Accepted: February 2016.

ABSTRACT

Objective. The aim of this study was identify the different genotypes of infectious bronchitis virus (IBV) present in commercial poultry farms from different localities of the Tolima Department, Colombia. **Materials and methods.** 105 samples of tracheal swabs of poultry of 21 farms were collected. Poultry had been vaccinated against IBV. An screen to identify positive samples and posteriorly the sequencing of the partial region of the S1 subunit and phylogenetic analysis of the isolates with the reference strains, including the vaccine currently used in the country was performed. **Results.** Poultry all farms had respiratory signs, but only four farms was confirmed the disease. Positive samples of the IBV (HT6, HT9, HT10 and HT11) were pathogenic for embryos 9-days-old. The HT6 sample was grouped in the same cluster that the Massachusetts strains. The HT9 and HT11 samples showed 99% similarity and were grouped genetically distant from the reference strains and other isolated. The HT10 sample showed low similarities with the isolates and reference strains, grouping alone in another cluster. **Conclusions.** New genotypes are circulating in the Tolima Department, where there is a risk of genetic recombination. Is believed that vaccines used were not providing cross-protection against the new genotypes.

Keywords: Characterization, S1 gene, isolation, purification (*Source:DeCS*).

RESUMEN

Objetivo. El objetivo de este estudio fue identificar los diferentes genotipos del virus de bronquitis infecciosa (VBI) presente en granjas avícolas comerciales de diferentes localidades del departamento de Tolima, Colombia. **Materiales y métodos.** Se recolectaron 105 muestras de hisopados traqueales provenientes de aves de 21 granjas. Las aves habían sido vacunadas contra el VBI. Se realizó un "screen" para identificar muestras positivas y posteriormente la secuenciación de la región parcial de la subunidad S1 y el análisis filogenético de los aislamientos con las cepas de referencia, incluidas las vacunas utilizadas actualmente en el país. **Resultados.** Aves de todas las granjas tenían signos respiratorios, pero sólo cuatro granjas confirmaron la enfermedad. Las muestras positivas de VBI (HT6,

HT9, HT10 y HT11) fueron patogénicas para embriones de 9 días de edad. La muestra HT6 se agrupó en el mismo clúster que las cepas de la vacuna Massachusetts. Las muestras HT9 y HT11 mostraron 99% de similitud y agrupan genéticamente distantes de las cepas de referencia y de los aislados. El HT10 mostró baja similitud con aislamientos y cepas de referencia, agrupándose separadamente en otro clúster. **Conclusiones.** Nuevos genotipos circulan en el departamento del Tolima, donde hay un riesgo de recombinación genética. Se estima que las vacunas utilizadas no están ofreciendo una protección cruzada contra los nuevos genotipos.

Palabras clave: Caracterización, gen S1, aislamiento, purificación (*Fuente: DeSC*).

INTRODUCTION

Infectious bronchitis virus (IBV) is the causative agent of infectious bronchitis (IB), an acute and highly contagious in poultry, which primarily affects respiratory tract, but different IBV strains may show variable tissue tropisms and also affect the reproductive, respiratory and renal tract (1). Infected poultry become predisposed to secondary infections, and in this case it causes an increase in mortality rate in breeding (2). The disease has worldwide distribution, being one of the biggest problems of the poultry industry, affecting the performance of laying hens and broilers and expenses to control the disease (2,3).

Both inactivated and live attenuated vaccines have been used to control the IB, nonetheless some outbreaks continue to happen (3). This control is not being effective because of the lack of cross-protection to the large number of variants and serotypes that are emerging. Studies using molecular methods have shown that the new strains or serotypes have only a few changes in amino acid in the S1 portion of the viral spike protein, while most of the genome remains unchanged (4,5). These changes may occur due to an immune pressure caused by widespread use of vaccines, genetic recombination or of coexistent infections, or even a dominant serotype reduction as a result of vaccination, allowing other emerging field strains (1,4,6,7). The transmembrane domain is one of cleavage S1 region of the S virus structural protein, which is a hypervariable region, and the most antigenic and responsible for inducing protection against the virus (3).

In Colombia, vaccines with Massachusetts (Mass), Connecticut (Conn) e Arkansas strains are permitted to marketing (6), and even then, the disease is not being controlled, probably because the vaccine strain does not induce cross-protection to different genotypes that have emerged in the field with point mutations and deletion events insertion in the hypervariable region S1 (4). Other countries such as Brazil, Argentina, Australia and Tunisia also have the

INTRODUCCIÓN

El virus de la bronquitis infecciosa (VBI) es el agente causal de la Bronquitis Infecciosa (BI), una enfermedad aguda, altamente contagiosa para las aves, afectando principalmente los tractos respiratorios, reproductivo y renal (1). Las aves infectadas están predispuestas a infecciones secundarias y en este caso incrementa la tasa de mortalidad (2). Esta enfermedad tiene distribución mundial y es uno de los principales problemas de la industria avícola afectando el desempeño de gallinas ponedoras y pollos de engorde, generando así altos gastos en su control (2,3).

Los programas de vacunación utilizan dos tipos de vacunas, inactivadas y vivas atenuadas para el control de la BI, sin embargo, algunos brotes continúan apareciendo (3). Este control no está siendo efectivo por la falta de protección cruzada ante el gran número de variantes y serotipos que están siendo emergentes. Estudios con métodos moleculares han demostrado que las nuevas cepas o serotipos tienen solo pocos cambios en el aminoácido de la porción S1 de la proteína de la espícula viral, mientras que la mayor parte del genoma permanece sin cambios (4,5). Estos cambios pueden ocurrir debido a una presión inmune causada por el uso generalizado de vacunas, la recombinación genética, las infecciones coexistentes o incluso, una reducción del serotipo dominante como resultado de la vacunación, permitiendo la emergencia de otras cepas de campo (1,4,6,7). El dominio transmembrana es una región S1 de escisión de la proteína estructural de la espícula S, que es una región hipervariable, más antigénica y responsable de inducir protección contra el virus (3).

En Colombia, vacunas con cepas Massachusetts (Mass), Connecticut (Conn) y Arkansas son permitidas en el mercado (6), sin embargo, la enfermedad no está siendo controlada, probablemente porque estas cepas no están induciendo protección cruzada contra los diferentes genotipos que han surgido en el campo con puntos de mutación y delección - eventos de

same situation. Vaccine strategies using licensed vaccines to control the IB have been ineffective, due to the circulation of new genotypes (7-12). Therefore, after identifying the IBV field genotypes it is important to implement appropriate control plans, using specific vaccine strains for each region in order to offer protection against the disease.

The aim of this study was to evaluate the different genotypes of IBV in commercial poultry flocks from different farms of the Tolima Department, in Colombia and their relationship with reference strains, including some vaccine strains allowed in the country.

MATERIALS AND METHODS

Samples. Twenty-one farms of seven different municipalities (Mariquita, Piedras, Ibagué, Coello, Valle de San Juan, San Luis and Guamo) of the Tolima Department have been selected to carry out the sample collection. Samples were taken the rules and ethics committee approval of the Universidad del Tolima. The farms were chosen where poultry had some characteristic respiratory signs. All poultry were vaccinated with live attenuated vaccine containing the Massachusetts strain (M41) (Table 1). Five samples of tracheal swabs of poultry were taken, at random, in each farm. The swabs were placed in special tubes containing 3 ml universal transport medium used for the preservation and transportation of virus (UTM-RT) (Puritan Medical Products, Guilford). After collection the samples, they were frozen at -30 °C. Pools of five samples were prepared to each farm, twenty-one pools in total. The samples were centrifuged at 1800 rpm at 4°C for 10 minutes and the supernatant was collected for analysis. The supernatant was used for identification of positive samples and later for virus isolation.

Reference strains. The GeneBank accession numbers of IBV strains used in this study are: Massachusetts (M41) (AY561711.1); Massachusetts Holland 120 (H120) (GU393335); Massachusetts Holland 52 (H52) (EU817497); Connecticut (Conn 46) (FJ904717); Arkansas DPI (GQ504720); and China QXIBV (AF193423).

The isolated from Brazil (13), Cuba (14) and Argentina (10) were also used to evaluate the phylogenetic relationship with the samples from Colombia. The GeneBank accession numbers of IBV variants are: IBV/Brazil/SC02 (GQ169247), IBV/Brazil/PR07 (GQ169244), IBV/Brazil/SP02 (GQ169250), Cuba/La

inserción en la región S1 de la zona hipervariable (4). Otros países como Brasil, Argentina, Australia y Túnez, también pasan por la misma situación. Estrategias de vacunación usando las vacunas autorizadas para el control de la BI han resultado inefectivas debido a la circulación de nuevos genotipos (7-12). Por lo tanto, después de la identificación de los genotipos de campo (VBI), es importante la implementación de planes de control adecuados, usando cepas vacunales específicas para ofrecer protección contra la enfermedad.

El objetivo de este estudio fue evaluar los diferentes genotipos de VBI en aves comerciales de diversas granjas del departamento del Tolima, en Colombia y su relación con las cepas vacunales permitidas en el país y algunas cepas de referencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. Fueron seleccionadas veintiuna granjas de siete municipios (Mariquita, Piedras, Ibagué, Coello, Valle de San Juan, San Luis y Guamo) del departamento del Tolima para llevar a cabo la recolección de las muestras. Las muestras fueron tomadas bajo las normas y la aprobación del comité de ética de la Universidad del Tolima. Los resultados de granjas muestreadas y positivas se mantuvieron en absoluta reserva denominando cada granja con letras del alfabeto. Las granjas fueron escogidas donde las aves tenían algunos signos respiratorios característicos. Todas las aves fueron vacunadas con una vacuna viva atenuada que contenía la cepa Massachusetts (M41)(Tabla 1). Cinco muestras de hisopados traqueales fueron tomadas al azar en cinco aves de cada granja. Las muestras fueron colocadas en tubos especiales para la preservación y el transporte del virus (UTM-RT) (Puritan Medical Products, Guilford, Maine, USA). Después de colectadas las muestras, fueron congeladas a -30°C. Fueron preparados pools de cinco muestras para cada granja, veintidós pools en total. Las muestras fueron centrifugadas a 1800 rpm a 4°C por diez minutos. El sobrenadante fue colectado para análisis. La mitad fue sujeta a identificación de muestras positivas y la otra mitad fue utilizada para el aislamiento viral de las mismas.

Cepas de referencia. Las cepas de VBI usadas en este estudio y los números de acceso al GenBank son: tres Massachusetts (M41) (AY561711.1), (M41) (AY561711.1), Holanda 120 (H120) (GU393335), Holanda 52 (H52) (EU817497), Connecticut (Conn 46) (FJ904717), Arkansas DPI (GQ504720), y China QXIBV (AF193423).

Las cepas de Brasil (13), Cuba (14) y Argentina (10) también se utilizaron para evaluar la relación filogenética con las muestras procedentes de

Habana/CB6/2009 (HE590762), Cuba/La Habana/CB13/2009 (HE590763), Cuba/La Habana/CB19/2009 (HE590764), AR03BA06 (FJ167386), AR06BA13 (FJ167376), AR06BA14 (FJ167375).

RNA extraction. Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instructions (15), directly of the supernatant of the samples suspensions and of the allantoic fluid of embryonated eggs to negative control (ultrapure water).

cDNA synthesis. After extraction, RNA was submitted to cDNA synthesis by using the reverse transcriptase technique (RT). To each reaction 0.5 μ L of RNA was added, 0.25 μ L of Super Script II enzyme (Invitrogen - 200U/ μ L), 0.75 μ L of each primer (20 pmol/ μ L), 0.13 μ L of inhibitor RNase (40U/ μ L), 0.5 μ L of DL-Dithiothreitol (DTT Thermo Scientific- 0,1 M), 0.25 μ L of dNTPs (10mM), 1 μ L of Buffer (5x) and 2.12 μ L of ultrapure water to complete the final volume of 5.5 μ L reaction. The samples were taken to thermocycler following the thermal profile one cycle at 42°C /60 minutes for enzyme activation, one cycle of 70°C /15 minutes for inactivate the reaction and one cycle of 4°C / ∞ .

Virus screening. To make the identification of positive samples was performed Nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (Nested RT-PCR) to amplifying the partial region of the S1 subunit. The initial PCR used primers SX1+ [5'-CAC CTA GAG GTT TGT TAG CAT G -3'] and SX2- [5'-TCC ACC TCT ATA AAC ACC TTT AC -3']. The amplicon was further amplified in a second internal PCR that used primers SX3+ [5'-TAA TAC TGG CAA TTT TTC AGA TGG -3'] and SX4- [5'-AAT ACA GAT TGC TTA CAA CCA CC -3'] (16).

Amplification was performed in two consecutive reactions. In the first, the RT-PCR was carried out in a total volume of 25 μ L, using 5 μ L of cDNA, 11.5 μ L of highly pure water, 5 μ L of Buffer Green (5x), 1.5 μ L of MgCl₂ (25mM), 0.5 μ L of each primer (20 pmol/ μ L) SX1+ and SX2-, 0.5 μ L de dNTPs (10 mM), 0.25 μ L of Taq DNA polymerase (5 U/mL). Amplification was performed in a Thermocycler with the following conditions: one cycle at 94°C for 15 sec and 35 cycles at 94°C for 10 sec, 50°C for 20 sec, and 72°C for 40 sec, and one cycle at 4°C/ ∞ .

The second PCR (Nested) was carried out in a volume of 25 μ L using 1 μ L of amplified product, 15.5 μ L of highly pure water, 5 μ L

Colombia. Los números de acceso de GeneBank de las variantes del IBV son: IBV / Brasil / SC02 (GQ169247), IBV / Brasil / PR07 (GQ169244), IBV / Brasil / SP02 (GQ169250), Cuba / La Habana / CB6 / 2009 (HE590762), Cuba / La Habana / CB13 / 2009 (HE590763), Cuba / La Habana / CB19 / 2009 (HE590764), AR03BA06 (FJ167386), AR06BA13 (FJ167376), AR06BA14 (FJ167375).

Extracción de RNA. El total de RNA fue extraído con kit de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), siguiendo las instrucciones de la manufactura (15), directamente del sobrenadante de las suspensiones de las muestras y del fluido alantoideo de huevos embrionados para control negativo (agua ultrapura).

Síntesis de ADNc. Después de la extracción, el ARN se sometió a síntesis de ADNc mediante el uso de la técnica Reverso Transcriptasa (RT). Para cada reacción se añadió 0.5 μ L de ARN, 0.25 μ L de enzima Super Script II (Invitrogen - 200U/ μ L), 0.75 μ L de cada oligonucleótidos (20 pmol/ μ m), 0.13 μ L de inhibidor de RNase (40U/ μ m), 0.5 μ L de DL-ditiotreitil (DTT Thermo Scientific- 0.1 M), 0.25 μ L de dNTPs (10 mM), 1 μ L de Buffer (5x) y 2.12 μ L de agua ultrapura para completar el volumen final de reacción de 5.5 μ L. Las muestras fueron llevadas al termociclador siguiendo el perfil térmico de un ciclo a los 42°C / 60 minutos, un ciclo de 70°C/15 minutos, y el ciclo final de 4°C/ ∞ .

Detección de muestras positivas. Se utilizó una Reacción en cadena de la polimerasa anidada - Reverso Transcriptasa (Nested RT-PCR) para detectar muestras positivas para VBI. Los oligonucleótidos fueron diseñados para una región parcial de la subunidad S1. La PCR inicial utiliza cebadores SX1+ [5'-CAC CTA GAG GTT TGT TAG CAT G -3'] y SX2- [5'-TCC ACC TCT ATA AAC ACC TTT AC -3']. El amplicón se amplificó con una segunda PCR interna con los oligonucleótidos SX3+ [5'-TAA TAC TGG CAA TTT TTC AGA TGG -3'] y SX4- [5'-AAT ACA GAT TGC TTA CAA CCA CC -3'] (16).

La amplificación se realizó en dos reacciones consecutivas. En el primero, la RT-PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ L, usando 5 μ L de ADNc, 11.5 μ L de agua ultrapura, 5 μ L de Buffer Green (5x), 1.5 μ L de MgCl₂ (25 mM), 0.5 μ L de cada oligo (20 pmol/ μ L) + SX1 y SX2-, 0.5 μ L de dNTPs (10 mM), 0.25 μ L de Taq ADN polimerasa (5 U / ml). La amplificación se realizó en un termociclador con las siguientes condiciones: un ciclo a 94°C durante 15 segundos y 35 ciclos a 94°C durante 10 segundos, 50°C durante 20 segundos y 72°C durante 40 segundos, y un ciclo a 4°C/ ∞ .

La segunda PCR (anidada) se llevó a cabo en un volumen de 25 μ L usando 1 μ L de producto

of Buffer Green (5x), 1.75 μL of MgCl_2 (25 mM), 0.5 of each primer (20 pmol/ μL) SX3+ and SX4-, 0.5 μL de dNTPs (10 mM), 0.25 μL of Taq DNA polymerase (5 U/mL). A Thermal cycle was performed with the same equipment following these steps: one cycle at 94°C for 15 sec and 35 cycles at 94°C for 10 sec, 50°C for 20 sec, and 72°C for 40 sec, and one cycle at 4°C/∞. Amplification was verified by electrophoresis 1.5% agarose gel in 1 x TBE buffer (2 mM of EDTA, 90 mM of Tris-Borate, pH 8.3), using a 100bp ladder as a molecular weight marker for confirmation of the length of the PCR products. Gels were stained with ethidium bromide (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Virus isolation. The technique was performed according to Owen et al (17) protocol for IBV isolation in embryonated eggs SPF (Specific Pathogen Free). Briefly, the supernatants of IBV-positive samples (as determined by virus screening) were filtered through 0.45 μm ; 0.1 ml was inoculated into four 9-day-old specific-pathogen-free embryonated chicken eggs (ICA, Bogotá, Colombia) by the allantoic cavity route. Eggs were incubated at 37°C and candled on a daily basis to check for embryo viability. Allantoic fluids were harvested 72 h post inoculation and two further blind serial passages were performed in a similar way. Each passage (allantoic fluid) was tested for the presence of IBV by Nested RT-PCR described above.

DNA sequencing and phylogenetic analysis. Sequencing was performed in Corporación CorpoGen (CorpoGen Investigación y Biotecnología, Bogotá, Colombia). It was used 20 μL of amplicon unpurified corresponding to the S1 region. In the Corporation CorpoGen, the product was submitted to purification by alcoholic precipitation (18) for removal of small molecules as dNTPs and primers not annealed. After the purification process, samples were analyzed on an agarose gel to verify the presence of a single band without drags. For sequencing it was used the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit using capillary electrophoresis and the sequencer ABI3730XL according to the manufacturer's instructions. The nucleotides (nt) sequences were edited and aligned with the program Clustal W (28), through Bioedit and analyzed *Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods* (PAUP) (19) with 2000 bootstrap replicates. The sequences S1 of the isolates and of the six reference sequences retrieved from GeneBank were aligned through the Neighbor-Joining method (20). The evolutionary distances were computed using the p-distance method (21)

amplificado, 15.5 μL de agua ultrapura, 5 μL de Buffer Green (5x), 1.75 μL de MgCl_2 (25 mM), 0.5 μL cada primer (20 pmol / l) SX3+ y SX4-, 0.5 μL de dNTPs (10 mM), 0.25 μL de Taq ADN polimerasa (5 U / ml). Un ciclo térmico se realizó con el mismo equipo siguiendo estos pasos: un ciclo a 94°C durante 15 segundos y 35 ciclos a 94°C durante 10 segundos, 50°C durante 20 segundos y 72°C durante 40 segundos, y un ciclo a 4°C/∞. La amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en tampón TBE 1x (2 mM de EDTA, 90 mM de Tris-Borato, pH 8.3), utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb como para la confirmación de la longitud de los productos de PCR. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.2 mg/ml).

Aislamiento viral. La técnica se realizó de acuerdo a Owen et al (17) Protocolo para el aislamiento de IBV en huevos embrionados SPF (libres de patógenos específicos). Brevemente, los sobrenadantes de las muestras de IBV-positivas (determinada por la detección de virus) se filtraron a través de 0.45 μm ; 0.1 ml se inoculó en huevos de gallina embrionados libres de patógenos específicos de 9 días de edad (ICA, Bogotá, Colombia) por la vía cavidad alantoidea. Los huevos se incubaron a 37°C y al trasluz diariamente para comprobar la viabilidad de los embriones. Fluidos alantoideos se cosecharon 72 h después de la inoculación y dos pases en serie adicionales se realizaron de una manera similar. Cada pasaje (fluido alantoideo) se ensayó para determinar la presencia de IBV por Nested RT-PCR descrita anteriormente.

Secuenciación de ADN y análisis filogenético. La secuenciación se realizó en la Corporación CorpoGen (CorpoGen Investigación y Biotecnología, Bogotá, Colombia). Se utilizó un fragmento de 20 μL de PCR no purificado correspondiente a la región S1. En la Corporación CorpoGen, el fragmento de PCR fue sometido a purificación por precipitación alcohólica para eliminación de pequeñas moléculas como dNTPs y restos de oligos. Después del proceso de purificación, se analizaron las muestras en un gel de agarosa para verificar la presencia de una sola banda sin lastres. Para la secuenciación se utilizó un kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 Cycle utilizando capilar de electroforesis y el secuenciador ABI3730XL de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secuencias de nucleótidos (nt) fueron editadas y alineadas con el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6 (MEGA6) (12) con 1000 repeticiones de arranque. Las secuencias S1 de los aislados y de las seis secuencias de referencia recuperados de GenBank fueron alineados a través del método Neighbor-Joining (13). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando

and they are in the units of the number of base differences per site.

RESULTS

Of 21 samples, four were positive for IBV (HT6, HT9, HT10 and HT11), three positive samples isolated in Ibagué and one in Coello. The field IBV isolates obtained from tracheal swabs of the broilers with respiratory disease symptoms are presented in table 1.

Table 1. Field IBV isolates obtained from tracheal swabs of the broilers with respiratory disease symptoms

Farm	Isolate	Municipality	Sector	GenBank	Age vaccination*
A	HT6	Ibagué	Chucuní	En6Chu14mVa	1 st day
B	HT9	Ibagué	Ambalá	En9Am10mVa	10 th day
C	HT10	Ibagué	Chapetón	En10Cha15mVa	1 st day
D	HT11	Coello	Cocora	En11Coe14mVa	1 st day

*Age of the poultry vaccinated with attenuated live vaccine containing serotype M41 Massachusetts

Virus isolation in chicken embryos for positive samples produced lesions characteristic of IBV, such as curled, hemorrhagic and stunted embryos.

The allantoic fluid of embryonated SPF eggs infected with IBV samples were harvested and submitted to RNA extraction and thereafter cDNA synthesis. Nested RT-PCR was performed to amplify the product of S1 region with 392 bp. The amplified region was confirmed by agarose gel and the product of the nested RT-PCR was used for sequencing of the samples.

The partial region of the S1 subunit of the four isolates was compared with the sequences of reference strains Massachusetts M41, H52 and H120, 46 Connecticut, Arkansas DPI and China QXIBV (Figure 1). The similarity of the isolates and reference strains is shown in table 2.

The HT6 strain isolated from a poultry farm located in Ibagué showed closed relationship with the vaccine strain M41, with 99% of similarity. Between this strain and the H120, Conn 46, H52, Arkansas DPI and China QXIBV the identity was 98%, 97%, 98%, 82% and 80%, respectively. Among the isolates, the HT6 showed 83% of similarity with HT9 and HT11 and 82% with HT10. Two strains, one isolated on Coello (HT9) and the other in Ibagué (HT11) were grouped in the same cluster and were 99% similar, but these isolates were genetically distant from the reference strains. The HT10 strain isolated in Ibagué, showed a

el método de p-distancia (14) y están en las unidades de la serie de diferencias de bases por sitio.

RESULTADOS

De 21 muestras, cuatro fueron positivos para VBI (HT6, HT9, HT10 y HT11), tres muestras positivas aisladas en Ibagué y una en Coello. Las aves de las cuatro granjas positivas (A, B, C y D) habían sido vacunadas con vacuna viva atenuada (M41) como se muestra en la tabla 1.

Después de la confirmación de las muestras positivas por Nested RT-PCR, fueron enviadas para aislamiento viral. Después del aislamiento del virus se realizó embriodiagnosic donde las muestras positivas mostraron lesiones características de la enfermedad, como enrollamiento, hemorragia y enanismo en los embriones infectados.

Fue colectado el líquido alantoideo y sometido a extracción de RNA y síntesis de ADNc. Se realizó RT-PCR anidada para amplificar el producto de la región S1 con 392 pb. La región amplificada se confirmó por gel de agarosa y el producto de la RT-PCR anidada se usó para la secuenciación de la región parcial de las muestras. La subunidad S1 de los cuatro aislamientos se comparó con las secuencias de las cepas de referencia Massachusetts M41, H52 y H120, Connecticut 46, y Arkansas DPI y China QXIBV (Figura 1). La similitud de los aislados y cepas de referencia se muestra en la tabla 2.

La cepa aislada HT6 de una granja avícola situada en Ibagué mostró una estrecha relación con la cepa vacunal M41, con un 99% de similitud. Entre esta cepa y la H120, Conn 46, H52, Arkansas DPI y China QX IBV la identidad fue del 98%, 97%,

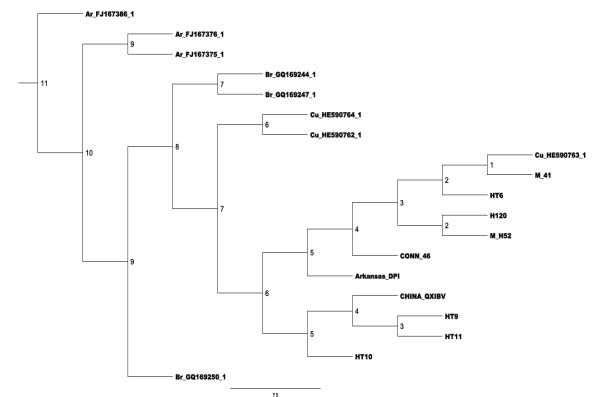


Figure 1. Phylogenetic relationships of the Colombia IBM samples (HT6, HT9, HT10, HT11) and some reference strains based on S1 partial nt. Numbers along the branches refer to bootstrap values.

Table 2. Similarity analysis of nucleotide from the S1 gene of Colombian isolates and reference strains

	Percent nucleotide similarity									
	HT6	HT9	HT10	HT11	M41	H120	Conn46	H52	Arkansas DPI	China QxIBV
HT6	100%	83%	82%	83%	99%	98%	97%	98%	82%	80%
HT9	83%	100%	85%	99%	83%	83%	83%	83%	82%	84%
HT10	82%	85%	100%	85%	83%	82%	82%	83%	84%	83%
HT11	83%	99%	85%	100%	83%	83%	83%	83%	82%	84%

low similarity rate with the reference strains. Among the isolates, the HT10 showed 82% of similarity with the HT6 and 85% with HT9 and HT11.

Isolates of Colombia showed low similarity in nucleotide sequences with the Brazilian and Argentine isolates (<75%). However, they showed on average of 82% of similarity with the Cuban isolates (Table 3). HT6 showed 99% nucleotide identity with the isolated Cuba / La Habana / CB13 / 2009

Table 3. Similarity analysis of nucleotide from the S1 gene of Colombian isolates and Cuban variants.

	Percent nucleotide similarity		
	Cuba/La Havana/ CB6/2009	Cuba/La Havana/ CB13/2009	Cuba/La Havana/ CB19/2009
HT6	82%	99%	80%
HT9	82%	82%	84%
HT10	81%	82%	82%
HT11	83%	82%	84%

DISCUSSION

The IBV is widespread in all the regions of the world causing economic losses to the poultry industry (1,8,9,11,22,23). Biosecurity practices associated with the control measures are used to prevent both the infection and the spread of IB on farms (3). One of the control measures are the vaccination protocols using both live attenuated and inactivated, but disease outbreaks continue to occur worldwide (5). In several regions of the world, including most of the South American countries, the Massachusetts is the only officially authorized strain for vaccine, but in some countries are released other strains such Connecticut, Arkansas, D207, D3896, 4/91 (1,5). In Colombia, the use of vaccines containing serotype Massachusetts, Arkansas and Connecticut are allowed by Instituto Colombiano Agropecuario (6), but in the field are often used the vaccine containing the Massachusetts strain.

In this study, IBV field strains were isolated, same the poultry being vaccinated with Massachusetts

98%, 82% y 80%, respectivamente. Entre los aislamientos, el HT6 mostró 83% de similitud con HT9 y HT11 y 82% con HT10. Dos cepas, uno aislado en Coello (HT9) y el otro en Ibagué (HT11) se agruparon en el mismo grupo y fueron 99% similares, sin embargo, estas muestras quedaron genéticamente distantes de las cepas de referencia. La cepa aislada HT10 en Ibagué, mostró una tasa baja de similitud con las cepas de referencia. Entre los aislamientos, el HT10 mostró 82% de similitud con la HT6 y 85% con HT9 y HT11.

Los aislamientos de Colombia mostraron baja similitud de secuencias de nucleótidos con los aislados de Brasil y Argentina (<75%). Sin embargo, mostraron en promedio de 82% de similitud con los aislamientos cubanos (Tabla 3). HT6 mostró una identidad de nucleótidos del 99% con la cepa Cuba / La Habana / CB13 / 2009.

DISCUSIÓN

El IBV es generalizado en todas las regiones del mundo, causando pérdidas económicas a la industria avícola (1,8,9,11,22,23). Prácticas de bioseguridad asociadas con las medidas de control se utilizan para evitar la infección y la propagación del IB en las granjas (3). Una de las medidas de control son los protocolos de vacunación utilizando tanto vacunas vivas atenuadas e inactivadas, sin embargo, los brotes de enfermedades continúan ocurriendo en todo el mundo (5). En varias regiones, incluyendo la mayoría de los países de América del Sur, el Massachusetts es la única cepa de autorización administrativa para la vacuna, pero en algunos países se lanzan con otras cepas tales Connecticut, Arkansas, D207, D3896, 4/91 (1,5). En Colombia, el uso de las vacunas que contienen el serotipo Massachusetts, Arkansas y Connecticut están autorizados por el Instituto Colombiano Agropecuario (6), pero en el campo a menudo se utiliza la vacuna que contiene la cepa Massachusetts.

En este estudio, las cepas de campo IBV fueron aislados de las aves de corral siendo vacunado con serotipo Massachusetts en los primeros días de vida (Tabla 1). La cepa HT6 mostró un 99% de similitud con una cepa de la vacuna utilizada en Colombia (M41). HT6 también mostró alta similitud (99%)

serotype in the first days of life (Table 1). The HT6 strain showed 99% of similarity with a vaccine strain used in Colombia (M41). HT6 also showed high similarity (99%) with Cuba/La Habana/CB13/2009 isolated. In the study of Acevedo et al (14), this isolate was grouped in the same clade of the M41 strain, in which HT6 also grouped. Therefore, it is believed that the HT6 strain may have been an isolated of vaccine strain. The isolation of vaccine strain in chickens with IB symptoms can be related to the virulence reversion of live attenuated vaccine which may cause dissemination and persistence of the vaccine virus (24), or even with the immunosuppression of birds with consequent increased vaccine reactions, resulting in clinical signs compatible with IB (10). In a study of phylogenetic relationship in Argentina, vaccine strains were also isolated in the country and they were grouped in the same cluster of the Massachusetts strains (10).

The other three strains were clustered with a genetic distance range from the vaccine strains, demonstrating that virus isolation in these poultry may have been a failure in vaccination programs. Poultry in the farms C and D were vaccinated in the 1st day of life whereas poultry from the farm B were vaccinated in the 10th day (Table 1). Several factors can influence the magnitude and the duration of the expected response, like the age of the poultry, maternal immunity levels, immunogenicity of the vaccine, interval between vaccination and infection and immune response of the host (5). It is believed that this case may have influenced by the use of a single vaccine dose in the first day of life, which is often insufficient to induce the necessary protection ranges throughout the life of the poultry. Besides that, the vaccine used containing serotype Massachusetts cannot have induced cross-protection against these genotypes (5). Although vaccines containing other strains are allowed in Colombia, as Arkansas and Connecticut, further studies should be performed to evaluate the range protection of these vaccines against these new genotypes, since the similarity presented was low, around 83%, among the isolates HT9, HT10 and HT11 and Massachusetts, Connecticut and Arkansas strains.

In a phylogenetic analysis study realized in Brazil, it was observed that the isolates were native and presented low identity with the vaccine strain. Moreover, they observed that the vaccine containing the Massachusetts strain unique freed by the Agricultural Defense Agency, probably did not supply cross-protection against these variants. As result, frequent outbreaks have been occurred (8). In another current phylogenetic study realized in Brazil it was observed that other IBV genotype had arisen and grouped separately from previous

con la cepa Cuba / La Habana / CB13 / 2009. En el estudio de Acevedo et al (14), esta cepa fue agrupada en el mismo clado de la cepa M41, en el que HT6 también se agrupó. Sin embargo, se cree que la cepa HT6 puede haber sido un aislado de la cepa de vacuna. El aislamiento de la cepa de vacuna en pollos con síntomas IB puede estar relacionado con la reversión de virulencia de la vacuna viva atenuada que puede causar la difusión y la persistencia del virus (24), o incluso con la inmunosupresión de las aves con el consiguiente aumento de las reacciones de la vacuna, que resulta en signos clínicos compatibles con el IB (10). En un estudio de la relación filogenética en Argentina, cepas de la vacuna también se aislaron en el país y se agrupan en el mismo clado de las cepas de Massachusetts (10).

Las otras tres cepas se agruparon distantes genéticamente de las cepas de la vacuna, lo que demuestra el aislamiento del virus en estas aves de corral es que los programas de vacunación probablemente no funcionaron correctamente. Aves de corral en las granjas C y D fueron vacunados en el 1er día de vida, mientras que las aves de corral de la granja B fueron vacunados en el día 10 (Tabla 1). Varios factores pueden influir en la magnitud y la duración de la respuesta esperada, como la edad de las aves de corral, los niveles de inmunidad materna, la inmunogenicidad de la vacuna, el intervalo entre la vacunación y la infección y la respuesta inmune del huésped (5). Se cree que en este caso pudo haber influido el uso de una dosis única de la vacuna en el primer día de vida, que es a menudo insuficiente para inducir los rangos de protección necesarias durante toda la vida de las aves de corral. Además de eso, la vacuna utilizada contiene serotipo Massachusetts no puede haber inducido una protección cruzada contra estos genotipos (5). Aunque las vacunas que contienen otras cepas están permitidos en Colombia, como Arkansas y Connecticut, más estudios deben llevarse a cabo para evaluar la protección de estas vacunas frente a estos nuevos genotipos, ya que la similitud presentada fue baja, en torno al 83%, entre los aislamientos HT9, HT10 y HT11 y cepas de Massachusetts, Connecticut y Arkansas.

En un estudio de análisis filogenético realizado en Brasil, se observó que los aislados eran nativos y se presentan bajo identidad con la cepa de la vacuna. Por otra parte, se observó que la vacuna que contiene la cepa Massachusetts única liberado por la Agencia de Defensa Agrícola, probablemente no proporcionó una protección cruzada contra estas variantes. Como resultado, se han producido brotes frecuentes (8). En otro estudio filogenético actual realizado en Brasil se observó que otro genotipo IBV había surgido y se agrupan por separado de los aislados anteriores en el país y también de la

isolates in the country and also from the vaccine strain (11). This condition is not restricted to Brazil and it can be found in many other countries, such as Argentina (10), EEUU (25), Tunisia (9) and Australia (7). In these countries new genotypes also emerged. This shows the importance of molecular characterization of IBV in each region and the selection of strains which may be more suitable to the development of specific and effective vaccines against the disease.

The IBV is a RNA virus, and like other RNA virus, undergo frequent mutations in its genome due to the function of the errors done by RNA polymerase, as result causes deletions and mutation points (4,26). In addition, this virus has a high ability for genetic recombination (1, 4). These factors are involved in the outgrowth of new genotypes, with little change in the amino acids of the protein S1 already result in a change of serotype (4, 5, 24). Thus, genotyping of the IBV becomes an important tool for the epidemiologic study and identification of new genotypes, and also important to identify potential strains that could be used for the development of new vaccines (5).

The farms selected for the study housed poultry that presented respiratory symptoms, such as nasal discharge, snicking, sneezing, rales (the vibration emanating from lower in the respiratory tract watery), watery eyes and lethargy (2). The virus was isolated from trachea. The trachea is a major focus of the primary replication of IBV, reaching viral titer with maximum value in the first day post-infection (2). Despite the poultry presented respiratory signs, in most of the farms the IBV was not isolated, demonstrating that these signs can be confused with other respiratory diseases such as Laryngotracheitis and Coryza. Thus the diagnosis is essential for the confirmation of IB (27).

The HT9 and HT11 isolated of Ibagué and Coello cities, respectively, were grouped in the same cluster. On the other hand, these strains showed low similarity with the other isolates and reference strains. Already HT10 isolated in Ibagué showed low similarity with the other isolates and reference strains, being grouped separately for phylogenetic analysis. This demonstrates that new genotypes are present in Tolima Department, the most of them in Ibagué. This situation is critical, because in this case there is a risk of genetic recombination (1, 4).

In conclusion there is an outgrowth of new genotypes in the Tolima Department, with a high risk of genetic recombination. The vaccine containing the Massachusetts strain was insufficient to induce protection against the circulating genotypes of IBV,

cepa de la vacuna (11). Esta condición no se limita a Brasil y que se puede encontrar en muchos otros países, como Argentina (10), EEUU (25), Túnez (9) y Australia (7). En estos países nuevos genotipos también surgieron. Esto muestra la importancia de la caracterización molecular de IBV en cada región y la selección de cepas que pueden ser más adecuados para el desarrollo de vacunas específicas y eficaces contra la enfermedad.

El IBV es un virus ARN, y al igual que otros virus de ARN, se someten a frecuentes mutaciones en su genoma debido a la función de los errores realizados por la ARN polimerasa, como resultado provoca supresiones y puntos de mutación (4,26). Además, este virus tiene una alta capacidad para la recombinación genética (1,4). Estos factores están implicados en la aparición de nuevos genotipos, con pocos cambios en los aminoácidos de la proteína S1 ya como resultado un cambio de serotipo (4,5,24). De este modo, la genotipificación del IBV se convierte en una herramienta importante para el estudio epidemiológico y la identificación de nuevos genotipos, y también es importante para identificar las cepas potenciales que se podrían utilizar para el desarrollo de nuevas vacunas (5).

Las granjas seleccionadas para el estudio de corral estabuladas que presenta síntomas respiratorios, tales como secreción nasal, estornudos, estertores (la vibración que emana de baja en el tracto respiratorio acuosa), ojos llorosos y letargo (2). El virus fue aislado de tráquea. La tráquea es un foco importante de la replicación del virus de bronquitis infecciosa primaria, alcanzando el título viral con el valor máximo en el primer día post-infección (2). A pesar de las aves de corral presentado signos respiratorios, en la mayoría de las granjas del IBV no fue aislado, lo que demuestra que estos síntomas se pueden confundir con otras enfermedades respiratorias como la laringotraqueitis y coriza. Así, el diagnóstico es esencial para la confirmación de IB (27).

El HT9 y HT11 aislado de Ibagué y Coello ciudades, respectivamente, fueron agrupados en el mismo grupo. Por otra parte, estas cepas mostraron baja similitud con los otros aislados y cepas de referencia. Ya HT10 aislado en Ibagué mostraron baja similitud con los otros aislados y cepas de referencia, que se agrupan por separado para el análisis filogenético. Esto demuestra que de los nuevos genotipos que están presentes en el departamento de Tolima, la mayoría se encuentra en Ibagué. Esta situación es crítica, ya que en este caso existe el riesgo de recombinación genética (1,4).

En conclusión, nuevos genotipos están circulando en el Departamento del Tolima, presentando un alto riesgo de recombinación genética. La vacuna

demonstrating the necessity of using vaccines with different serotypes that induce cross-protection or develop new vaccines against these variants.

Conflicts of interest

The authors declare they have no conflicts of interest with regard to the work presented in this report.

Acknowledgement

Universidad Cooperativa de Colombia (UCC) and Comité para el Desarrollo de la Investigación (CONADI)

que contiene la cepa Mass no fue suficiente para inducir protección contra los genotipos circulantes de VBI, lo que demuestra la necesidad de utilizar vacunas con diferentes serotipos que inducen protección cruzada o desarrollar nuevas vacunas contra estas variantes.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés en relación con el trabajo que se presenta en este informe.

Agradecimientos

Universidad Cooperativa de Colombia (UCC) y Comité para el Desarrollo de la Investigación (CONADI).

REFERENCES

1. Jackwood MW. Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World. *Avian Dis* 2012; 56(4):634-641.
2. Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res* 2007; 38(2):281-297.
3. Dhama K, Singh SD, Barathidasan R, Desingu PA, Chakraborty S, Tiwari R et al. Emergence of Avian Infectious Bronchitis Virus and its variants need better diagnosis, prevention and control strategies: a global perspective. *Pak J Biol Sci* 2014; 17(6):751-767.
4. Montassier HJ. Molecular Epidemiology and Evolution of Avian Infectious Bronchitis Virus. *Rev Bras Cienc Avic* 2010; 12(2):87-96.
5. Wit JJ, Cook JKA, Van Der Heijden HMJF. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol* 2011; 40(3):223-235.
6. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Listado de biológicos veterinarios vigentes a Marzo-2015. Colombia: O Instituto; 2015. URL Disponible en: <http://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Regulacion-y-Control-de-Medicamentos-Veterinarios/Biologicos/Productos-biologicos-veterinarios/Copia-de-BASE-BIOLOGICOS-VETERINARIOS-MARZO-2015.aspx>.
7. Ignjatovic J, Gould G, Sapats S. Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. *Arch Virol* 2006; 151(8):1567-1585.
8. Villarreal LYB, Brandão PE, Chacón JL, Saidenberg ABS, Assayag MS, Jones RC et al. Molecular Characterization of Infectious Bronchitis Virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. *Avian Dis* 2007; 51(4):974-978.
9. Bourogâa H, Miled K, Gribâa L, El Behi I, Ghram A. Characterization of new variants of Avian Infectious Bronchitis Virus in Tunisia. *Avian Dis* 2009; 53(3):426-433.
10. Rimondi A, Craig MI, Vagnozzi A, König G, Delamer M, Pereda A. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001-2008). *Avian Pathol* 2009; 38(2):149-153.
11. Fraga AP, Balestrin E, Ikuta N, Fonseca ASK, Spilki FR, Canal CW et al. Emergence of a new genotype of Avian Infectious Bronchitis Virus in Brazil. *Avian Dis* 2013; 57(2):225-232.
12. Fernando FS, Montassier MFS, Silva KR, Okino CH, Oliveira ES, Fernandes CC, et al. Nephritis Associated with a S1 Variant Brazilian Isolate of Infectious Bronchitis Virus and Vaccine Protection Test in Experimentally Infected Chickens. *Int J Poult Sci* 2013; 12(11):639-646.
13. Montassier MFS, Brentano L, Montassier HJ, Richtzenhain LJ. Genetic Grouping of Avian Infectious Bronchitis Virus Isolated in Brazil Based on RT-PCR/ RFLP Analysis of the S1 Gene. *Pesq Vet Bras* 2008; 28: 190-194.

14. Acevedo AM, Martínez N, Brandão P, Perera CL, Frías MT, Barrera M, Pérez LJ. Phylogenetic and molecular characterization of coronavirus affecting species of bovine and birds in Cuba. *Biotechnol Apl* 2013; 30:228-231.
15. Chomczynski P, Sacchi N. Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-159.
16. Jones RC, Worthington KJ, Capua I, Naylor CJ. Efficacy of live infectious bronchitis vaccines against a novel European genotype, Italy 02. *Vet Rec* 2005; 156:646-647.
17. Owen RL, Cowen BS, Hattel AL, Naqi SA, Wilson RA. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland-52 strain of IBV. *Avian Pathol* 1991; 20(4):663-673.
18. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; 132(1):06-13.
19. Swofford DL. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods*. Sinauer Associates: Sunderland, MA; 1998.
20. Saitou N. and Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4(4):406-425.
21. Nei M.; Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. 1ed. Oxford, New York: Oxford University Press; 2000.
22. Bochkov YA, Batchenko GV, Shcherbakova LO, Borisov AV, Drygin VV. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. *Avian Pathol* 2006; 35(5):379-393.
23. Sabarinath A, Sabarinath GP, Tiwari KP, Kumthekar SM, Thomas D, Sharma RN. Seroprevalence of Infectious Bronchitis Virus in birds of Grenada. *Int J Poult Sci* 2011; 10(4):266-268.
24. Bande F, Arshad SS, Bejo MH, Moeini H, Omar AR. Progress and Challenges toward the Development of Vaccines against Avian Infectious Bronchitis. *J Immunol Res* 2015; 1-12.
25. Kulkarni AB, Resurreccion RS. Genotyping of Newly Isolated Infectious Bronchitis Virus Isolates from Northeastern Georgia. *Avian Dis* 2010; 54(4):1144-1151.
26. Caron LF. Etiology and immunology of infectious bronchitis virus. *Rev Bras Cienc Avic* 2010; 12(2):115-119.
27. Ou SC, Giambrode JJ. Infectious laryngotracheitis virus in chickens. *World J Virol* 2012; 1(5):142-149.
28. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22(22):4673-80.