



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



ESTUDI DE LES TÈCNIQUES PER LA DETECCIÓ I IDENTIFICACIÓ D'IBV: OPTIMITZACIÓ DE LA RT-PCR

Genís Vandellòs Pont

TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA

Tutor acadèmic: Cristina Reguant Miranda, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, cristina.reguant@urv.cat

En cooperació amb: Centre de Sanitat Avícola de Catalunya i Aragó (CESAC)

Supervisor: Àngela Blanco Andújar, Departament de Virologia, Biologia Molecular i Serologia, ablanco@cesac.net

Tarragona, 8 de juny 2020

Jo, Genís Vandellòs Pont, amb DNI 39941154-K, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/servies/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 8 de juny de 2020



Índex

1. Dades del centre.....	6
2. Resum i paraules clau	7
3. Introducció	8
3.1. Bronquitis infecciosa aviar	9
3.2. Virus de la bronquitis aviar.....	11
3.2.1. Morfologia.....	11
3.2.2. Característiques genòmiques i biologia molecular	11
3.2.3. Serotipatge i genotipatge	14
3.2.4. Mecanisme evolutiu	15
3.2.5. Replicació d'IBV	16
3.3. Diagnosi del virus de la bronquitis aviar	17
3.3.1. Aïllament víric i identificació.....	17
3.3.2. Microscòpia electrònica	17
3.3.3. Immunohistoquímica.....	18
3.3.4. Serologia	18
3.3.5. Tècniques de biologia molecular.....	18
4. Mètodes.....	21
5. Resultats i discussió	22
5.1. RT-PCR convencional	22
5.2. Real Time RT-PCR.....	25
5.3. Seqüenciació	27
5.4. Mètode global òptim	28
6. Conclusions	31
7. Referències	33
8. Autoavaluació	36
9. Agraïments	37

1. Dades del centre

Aquest Treball de Final de Grau havia d'estar basat en l'estada de pràctiques al Centre de Sanitat Avícola de Catalunya i Aragó (CESAC), però a causa de l'emergència sanitària causada pel COVID-19 es va canviar per un treball bibliogràfic mantenint la idea original i en què l'ajuda oferta des del CESAC ha estat clau. El CESAC, situat a Reus, és una empresa nascuda d'un conveni de col·laboració entre les Administracions de Catalunya i Aragó, el Sector Privat i el Sector Cooperatiu de l'avicultura catalana i aragonesa. La seva activitat es basa en donar servei de diagnòstic per al control sanitari de l'aviram, suport a la producció avícola i formació tècnica dels seus associats a través de formació de tècnics i grangers i gestió del moviment pecuari. A més, funcionen com el lloc de trobada i intercanvi de coneixements d'avicultura dels tècnics de Catalunya i Aragó. El CESAC s'erigeix amb un rol clau per l'avicultura, un dels sectors punters a Catalunya on significa el tercer sector agrari català. D'aquesta forma, Catalunya concentra el 33% de la producció d'aquest sector a nivell espanyol, sent-ne la primera comunitat productora. Els seus serveis contribueixen a protegir la sanitat avícola establint un sistema de vigilància sanitària basat en la ràpida detecció de malalties i diagnòstic per tal de combatre-les en les explotacions avícoles. Per aquest motiu, són el laboratori designat pel Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació de la Generalitat de Catalunya per a la realització de les anàlisis oficials de les malalties incloses en els programes oficials de les aus a Catalunya.

Dins l'estructura del CESAC, la meua estada de pràctiques va ser en el Departament de Virologia, Biologia Molecular i Serologia, dirigit per l'Àngela Blanco Andújar, la qual també ha estat la meua tutora professional durant la confecció del Treball Final de Grau.

2. Resum i paraules clau

El virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV) és el causant de la bronquitis infecciosa aviar (IB), malaltia considera la segona major causa de pèrdues en el sector avícola arreu del món. Aquesta malaltia afecta l'espècie *Gallus gallus*, encara que s'ha detectat la presència del virus responsable en altres aus com *Phasianus colchicus* i *Galliformes*. Es tracta d'una malaltia altament infecciosa i que afecta principalment el sistema respiratori, però també és capaç de danyar els sistemes excretor i reproductor, especialment a la producció d'ous i l'empitjorament de les seves característiques. A causa de la manca de protecció creuada entre les diverses soques d'IBV, és fonamental disposar de tècniques que permetin la seva diagnosi i identificació. L'aïllament víric i les tècniques serològiques permeten només la diagnosi, a diferència de les de biologia molecular que també habiliten la identificació. En aquest estudi es pretén examinar l'estat actual de la RT-PCR per la detecció i identificació d'IBV i com millorar-la per obtenir resultats més fiables. A través de bases de dades bibliogràfiques com PubMed, Web of Science i Science Direct es van cercar articles dels últims 5 anys per conèixer l'estat de la tècnica. Actualment els mètodes més estesos són la RT-PCR, la Real Time RT-PCR i la seqüenciació, tenint com a dianes les seqüències de les regions 3'-UTR, 5'-UTR i gen N per a deteccions universals i la seqüència del gen S1 per a deteccions específiques de soca. La combinació d'aquestes tècniques amb els encebadors específics per a aquestes seqüències diana és la que permet adaptar la metodologia als laboratoris i aconseguir la diagnosi d'IBV amb la major sensibilitat, especificitat i límit de detecció possibles.

Paraules clau: Virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV), detecció, identificació, RT-PCR, Real Time RT-PCR, seqüenciació, optimització.

3. Introducció

La detecció de patògens en l'aviram és clau per permetre una adequada sanitat alimentària, ja que la major part de la producció d'aviram acaba sent destinada al sector d'alimentació, sigui pel consum directe dels animals o dels seus ous. Degut a això, durant dècades s'ha estat cercant nous mètodes de detecció o l'optimització d'aquests per aconseguir una millor protecció en primera instància per la salut de les aus, del sector que treballa en la indústria de l'aviram, de la població que en consumeix els productes i, en últim terme, per aconseguir una producció eficaç i econòmicament rentable i beneficiosa. Un dels patògens que més problemes causa és el virus de la bronquitis aviar (IBV, per les seves sigles en anglès "Infectious Bronchitis Virus"). La infecció per aquest virus causa la bronquitis infecciosa aviària (IB, per les seves sigles en anglès "Infectious Bronchitis"), considerada una de les malalties que causa més pèrdues econòmiques en l'avicultura industrial arreu del món (Jackwood MW & de Wit S, 2020).

L'IB és una malaltia altament contagiosa amb un quadre clínic agut que afecta principalment el tracte respiratori superior dels animals de l'espècie *Gallus gallus*. La infecció es pot produir a qualsevol edat de l'animal. A més, la patologia pot presentar diversos tropismes en què a banda de l'afecció del sistema respiratori també pot afectar el sistema reproductor i excretor, produint reduccions en la producció i qualitat dels ous i nefropatologies que poden acabar amb falles renals, respectivament. El virus es troba estès arreu del món i es transmet per inhalació o contacte directe amb aus infectades o materials contaminats. No es té constància de transmissió vertical a la descendència, però es pot trobar en la closca de l'ou per la incubació provinent de l'oviducte o del tracte gastrointestinal. La mortalitat de l'IB depèn de factors intrínsecs a l'hoste i de la soca d'IBV infectant. Degut a una baixa activitat correctora de la polimerasa vírica, apareixen noves soques d'IBV causades per mutacions i recombinacions en el seu genoma. Malauradament, sovint aquests nous tipus compliquen la vacunació ja que tenen poca protecció creuada, o inclús no en tenen. Per aquest motiu es fa difícil prevenir la transmissió i la malaltia (Jackwood MW & de Wit S, 2020).

L'IBV pertany a la família Coronaviridae, subfamília Coronavirinae i al gènere gammacoronavirus. És un virus de RNA de cadena simple de sentit positiu que codifica per a 4 proteïnes estructurals majors, incloent el gen de l'espícula (S1, a partir del seu nom en anglès "spike") el qual és utilitzat preferentment en els tests diagnòstics per la detecció d'IBV. Tot i ser un virus que provoca l'IB en galls i gallines (*Gallus gallus*), s'han detectat coronavirus avians similars a IBV en faisans (*Phasianus colchicus*) i paons

(*Galliformes*) i virus tipus-IBV s'han aïllat en galls d'indi (*Meleagris gallopavo*), xarxets comuns (*Anas crecca*), oques (*Anserinae*), coloms (*Columbiformes*), pintades comunes (*Numida meleagris*), perdius (*Alectoris*) i ànecs (*Anseriformes*) (Jackwood MW & de Wit S, 2020).

Actualment hi ha dos grans tipus principals de tècniques de diagnosi d'IBV: tècniques serològiques i tècniques de biologia molecular. Entre les tècniques serològiques destaquen aquelles per la titulació dels anticossos contra IBV com ELISA, precipitació en gel d'agar (AGP, per les seves sigles en anglès "Agar Gel Precipitation"), inhibició de l'hemaglutinació (HI, per les seves sigles en anglès "Hemagglutination Inhibition"), però no permeten identificar la soca d'IBV. Entre les tècniques moleculars sobresurten la seqüenciació i anàlisi per la classificació filogenètica, en base al gen S1 principalment, i la tècnica de la reacció de la polimerasa en cadena amb retrotranscripció (RT-PCR per les seves sigles en anglès "Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction") i la variant en temps real ("Real Time RT-PCR"). Aquestes tècniques moleculars sí permeten identificar la soca del virus. A banda d'aquestes tècniques principals, també se'n poden utilitzar d'altres menys rellevants com l'aïllament víric i la detecció directa d'IBV usant anticossos específics, però com en el cas de les tècniques serològiques, no són prou específiques com per determinar el tipus de virus concret (Blanco et al., 2015; Jackwood MW & de Wit S, 2020).

3.1. Bronquitis infecciosa aviar

La bronquitis infecciosa aviar (IB) és una malaltia aguda i altament contagiosa, causada pel virus de la bronquitis aviar (IBV) i que principalment afecta el tracte respiratori superior de galls i gallines de l'espècie *Gallus gallus*. Sovint no només afecta el tracte respiratori, sinó que també ho fa en el sistema excretor i reproductor segons la soca vírica en qüestió. Els principals símptomes del quadre clínic de la malaltia són tos, esternuts, raneres traqueals, conjuntivitis, dispnea, infeccions bacterianes secundàries, aspecte deprimat, reducció del pes corporal i ingesta d'aliment, plomes eriçades, excrements humits, augment de la ingesta d'aigua, disminució de la producció, mida i qualitat dels ous amb deformacions, closques primes amb arrugues i albúmina aquosa. Amb la progressió de la malaltia van apareixent lesions en els aparells respiratori, excretor i reproductor que poden acabar tenint un desenllaç fatal. Tot i que la mortalitat per IB és d'aproximadament un 5%, la freqüent aparició d'infeccions secundàries per *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma*

imitans, *Avibacterium paragallinarum*, virus de la malaltia de Newcastle i virus de la grip aviar pot elevar la mortalitat fins al 60% (Jackwood, 2019).

L'IB va ser observada per primera vegada a Dakota del Nord, Estats Units, l'any 1930 i va ser primerament documentada l'any 1931 per Schalk i Hawn. El 1941 es va desenvolupar la primera vacuna per prevenir l'IBV. No obstant, el 1956 es va descobrir que l'IBV posseïa diferents serotips i que entre ells no posseïen protecció creuada, el que suposa un gran problema en la prevenció de l'IB. A més a més, el 1960 es van descriure les primeres soques d'IBV amb un tropisme diferent del sistema respiratori (Fabricant, 1998). Fins a l'actualitat s'ha innovat en les tècniques pel diagnòstic i detecció d'IBV, permetent una optimització del procés. Gràcies a la seqüenciació s'ha pogut classificar les diferents soques filogenèticament i caracteritzar l'evolució d'IBV. (Lin & Chen, 2017).

Totes aquestes característiques provoquen que l'IB sigui considerada la segona major causa de pèrdues en la indústria aviar arreu del món, només per darrere l'altament patogènica grip aviar (de Wit & Cook, 2019). Degut a que la morbiditat de la patologia és de pràcticament el 100% i totes les afectacions de mortalitat i sobre la producció descrites anteriorment, és vital la recerca per sobreposar-se a la manca de protecció creuada entre les diverses soques víriques d'IBV per prevenir la malaltia i tractar-la un cop contreta (Jackwood MW & de Wit S, 2020).

El contagi de la malaltia és extremadament elevat i és capaç d'expandir-se ràpidament entre l'aviram. El període d'incubació de l'IB és curt: entre les primeres 24-48 hores després de la infecció es comencen a mostrar els primers símptomes clínics. La transmissió pot ser bé per inhalació o ingestió de partícules víriques. Aquestes poden arribar des de les aus infectades a les susceptibles per contacte directe entre elles o contacte indirecte mitjançant aerosols, femtes o de superfícies contaminades. Al tractar-se d'una malaltia que principalment afecta el sistema respiratori, els aerosols generats en les vies respiratòries són el mode de transmissió més important per la seva elevada càrrega viral en la fase aguda de la infecció, que s'assoleix entre els dies 3 i 5 post infecció. No obstant, si la malaltia esdevé crònica els reservoris d'IBV són les tonsil·les cecals i els ronyons. La transmissió vertical de la malaltia no sembla ser rellevant, ja que els pollets nascuts de progenitors malalts no han desenvolupat símptomes. Malgrat l'IB només es manifesta i transmet en *Gallus gallus*, es considera que altres espècies portadores del virus com faisans (*Phasianus colchicus*) i paons (*Galliformes*) podrien ser reservoris d'IBV, on el virus podria multiplicar-se i produir nous brots (Jackwood MW & de Wit S, 2020).

Les úniques formes d'immunitzar l'aviram de la malaltia són la vacunació i haver passat recentment l'IB i només protegeixen contra la soca d'IBV que els ha infectat, ja que no existeix protecció creuada entre soques. Respecte la segona opció, no existeix un tractament específic contra l'IB, sinó per pal·liar els símptomes del seu quadre clínic i el subministrament adequat d'antibiòtics per combatre les infeccions bacterianes secundàries (Jackwood MW & de Wit S, 2020). Per tant, la complementació de vacunacions contra diverses soques d'IBV és l'eina més eficaç per evitar contraure la patologia. S'usen diversos tipus de vacunes: vives atenuades, inactivades i les més punteres i encara prometedores vacunes recombinants. Un programa de vacunació adequat ha de protegir per l'espectre de soques d'IBV abundants en aquella regió, ja que no es pot abastir totes les soques que circulen arreu del món i no hi ha protecció creuada entre aquestes. Per aquest motiu les vacunes es dispensen en diverses injeccions amb una sola soca o combinant-ne diverses en una sola dosi. Malauradament, l'elevada mutabilitat i recombinabilitat de l'IBV suposa un repte en el desenvolupament constant de noves vacunes per protegir l'avicultura (Bande et al., 2015).

3.2. Virus de la bronquitis aviar

El virus de la bronquitis aviar (IBV) és el causant de la bronquitis infecciosa aviar (IB). L'IBV pertany al gènere Gammacoronavirus, dins la subfamília Coronavirinae, família Coronaviridae i ordre Nidovirales, en el mateix gènere al qual pertany el coronavirus de gall d'indi (TCoV, per les seves sigles en anglès "Turkey Coronavirus") entre altres (Jackwood MW & de Wit S, 2020).

3.2.1. Morfologia

Morfològicament es tracta d'un virus embolcallat amb un aspecte pleomòrfic amb un diàmetre d'aproximadament 120 nm amb unes projeccions a la superfície, les espícules, d'uns 20 nm de llargada, que li proporcionen l'aspecte de corona amb el què s'anomena la seva família vírica (Jackwood MW & de Wit S, 2020). Les diverses soques d'IBV poden variar en la seva densitat segons la seva abundància d'espícules en la superfície, variant entre 1,15 g/mL i 1,18 g/mL (Jackwood MW & de Wit S, 2020).

3.2.2. Característiques genòmiques i biologia molecular

El genoma d'IBV és una cadena simple de RNA en sentit positiu d'aproximadament entre 27,5 i 28 kb de llargada. Aquest està format per quatre gens que codifiquen per proteïnes estructurals i gens que codifiquen per proteïnes no-estructurals i accessòries (Bande et

al., 2015). Les quatre proteïnes estructurals són les de: l'espícula (S, de l'anglès "Spike"), l'embolcall (E, de l'anglès "envelope"), la membrana (M, de l'anglès "membrane") i la nucleocàpsida (N, de l'anglès "nucleocapsid"). L'IBV posseeix 15 proteïnes no-estructurals, que deriven de la modificació post-traducciona de les poliproteïnes 1a i 1ab, mentre que entre les accessorïes destaquen les proteïnes 3a, 3b, 5a i 5b (Jackwood MW & de Wit S, 2020; Lin & Chen, 2017). Els gens queden distribuïts de la següent manera en el genoma d'IBV, el qual es troba capat en l'extrem 5' i amb una cua de poly-A en l'extrem 3': 5'-UTR-leader-1a/1ab-S-3a-3b-E-M-5a-5b-N-3'-UTR-poly(A) (Bande et al., 2015; Jackwood MW & de Wit S, 2020).

Les regions no traduïdes (UTRs, de les seves sigles en anglès "Untranslated Regions") interaccionen amb les proteïnes de la polimerasa viral codificades per la transcripció i replicació del RNA d'IBV (Jackwood MW & de Wit S, 2020). Les poliproteïnes no-estructurals 1a i 1b es troben codificades de manera solapada en el genoma d'IBV i són traduïdes a través de diferents pautes de lectura oberta (ORFs, de les seves sigles en anglès "Open Reading Frames"). Posteriorment, són modificades de manera post-traducciona per aconseguir les 15 proteïnes no-estructurals, entre les quals constituïran la RNA polimerasa RNA-dependent (RDRP, per les seves sigles en anglès "RNA-dependent RNA polymerase") vírica per la replicació d'IBV (Jackwood MW & de Wit S, 2020). El virus es replica en el citoplasma de la cèl·lula hoste, produint-se 5 mRNAs. El mRNA corresponent al genoma complet d'IBV codifica per les poliproteïnes 1a i 1ab, que acabaran esdevenint les 15 proteïnes no-estructurals encarregades de formar la RDRP, mentre que la resta de mRNAs subgenòmics codificaran per les proteïnes estructurals S, E, M i N i les no-estructurals 3a, 3b, 5a i 5b (Jackwood MW & de Wit S, 2020).

- Proteïna S: formada per 1.160 aminoàcids i un pes d'entre 150 i 200 kDa, és una proteïna transmembrana altament glicosilada. Post-traducciona és dissociada en dues proteïnes: S1 (520 aminoàcids) i S2 (625 aminoàcids). S1 té un rol en la unió al receptor de la cèl·lula hoste, mentre que S2 contribueix a la fusió del virus amb la cèl·lula. Addicionalment, S1 és un important component immunogènic, ja que conté epítops responsables de la neutralització per anticossos (Bande et al., 2015), hemaglutinació i en la determinació del tropisme del virus (Lin & Chen, 2017), com també s'hi ha observat una gran variabilitat que es considera clau en el serotipatge i classificació d'IBV (Jackwood MW & de Wit S, 2020).
- Proteïna E: conté nombrosos dominis hidrofòbics transmembrana en l'extrem N-terminal i hidrofílics citoplasmàtics en l'extrem C-terminal. Es relaciona la

seva funció amb la formació de l'embolcall víric, de canals iònics, acoblament i apoptosi (Bande et al., 2015).

- Proteïna M: constituïda per entre 220 i 262 aminoàcids, sobresurt lleugerament a la superfície de la partícula vírica. Es troba glicosilada en el domini N-terminal (Bande et al., 2015). És la proteïna transmembrana més abundant i té un paper clau en l'acoblament d'IBV interaccionant amb les proteïnes N i S (Bande et al., 2016).

- Proteïna N: interacciona directament amb les proteïnes E i M per l'acoblament de la partícula vírica. A més, s'uneix al RNA víric per formar un complex ribonucleoproteic helicoidal (RNPC, per les seves sigles en anglès "Ribonucleoprotein complex") ajudant en la transcripció, replicació, traducció i empaquetat del genoma d'IBV en el procés de la replicació vírica. També s'ha vist que és capaç d'induir la resposta citotòxica dels limfòcits T a través dels epítops del seu extrem C-terminal (Bande et al., 2015; Jackwood MW & de Wit S, 2020).

- Proteïnes no-estructurals: a través de diferents ORFs se sintetitzen primerament les poliproteïnes 1a i 1b, que són processades post-transcripcionalment en 15 proteïnes no-estructurals (Nsps, de les seves sigles en anglès "Nonstructural proteins") per dues proteases codificades en la pròpia poliproteïna: proteasa tipus papaïna (PLP, per les seves sigles en anglès "Papain-like protease") i la proteasa principal (Mpro, per les seves sigles en anglès "Main protease"). Les Nsps estan involucrades en la regulació de les funcions de la cèl·lula hoste i la formació de la RDRP. Malgrat la majoria de coronavirus posseeixen 16 Nsps, a l'IBV, igual que a altres gammacoronavirus, li manca la Nsp 1. Per això, les 15 Nsps d'IBV s'anomenen de Nsp 2 a Nsp 16 (Jackwood MW & de Wit S, 2020; Lin & Chen, 2017).

- Proteïnes accessòries 3a, 3b, 5a i 5b: totes quatre tenen una seqüència característica única respecte altres coronavirus del gènere gammacoronavirus. Tot i que la seva funció encara no és completa coneguda, es creu que contribueixen a la violència del virus (Bande et al., 2015). Tanmateix, s'ha observat com poden manca en algunes soques d'IBV (Bande et al., 2016).

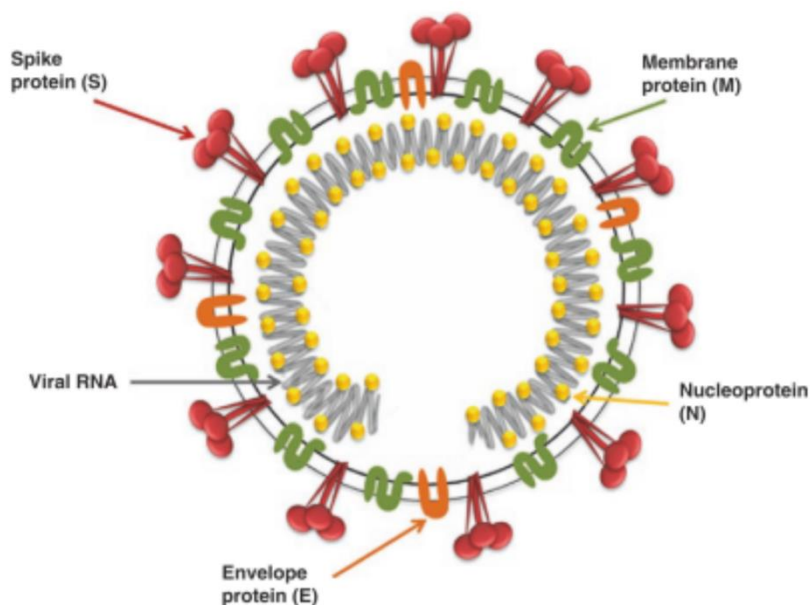


Figura 1. Representació esquemàtica de l'estructura d'IBV (Abdel-Moneim, 2017).

3.2.3. Serotipatge i genotipatge

El serotipatge i genotipatge són els dos mètodes emprats actualment per la classificació de les diferents soques d'IBV, de les quals avui en dia ja en consten més de 65 (Abdel-Moneim, 2017; Jackwood MW & de Wit S, 2020). Tot i que comparteixen una mateixa finalitat, els seus procediments fan que puguem descriure'ls per separat perquè són diferents i ens aporten diferents informacions.

El serotipatge es basa en la resposta per anticossos contra la proteïna S1 d'IBV (Jackwood MW & de Wit S, 2020). Aquesta proteïna és molt variable en la seva seqüència, amb una variació aproximada d'entre el 20% i 25% entre serotips, però inclús s'ha arribat a observar diferències del 50%, fet que produeix la no protecció creuada entre soques del virus a partir d'una diferència estimada del 5% (Bande et al., 2017). Per determinar el serotip al que pertany es duu a terme un tractament amb anticossos neutralitzants contra S1 amb la tècnica de la inhibició de l'hemaglutinació (IH) (Jackwood MW & de Wit S, 2020).

El genotipatge s'ha erigit com un mètode més específic per la determinació de noves soques d'IBV, però no aporta la capacitat per determinar la similitud dels epítops en la proteïna S1 que ens atorga el serotipatge. (Jackwood MW & de Wit S, 2020). Es fonamenta en la seqüenciació del gen que codifica per S1, una de les regions més variables del genoma d'IBV. Com a norma general, es considera que les soques que tenen una similitud superior al 90% en el gen S1 estaran relacionades serològicament,

és a dir, que pertanyerien al mateix serotip (Jackwood MW & de Wit S, 2020). Classificant filogenèticament IBV a través del gen S1, s'han identificat 6 principals genotips diferents (GI a GVI) amb 32 llinatges diferents (Bande et al., 2017).

Més enllà de la manca de protecció creuada pels diferents serotips d'IBV, també s'ha reportat com les diferències genotípiques de les soques d'IBV es troben relacionades amb el tropisme del virus, és a dir, els teixits en els que s'hi unirà amb més afinitat (Bande et al., 2017).

Arreu del món emergeixen constantment noves soques d'IBV, algunes de les quals es troben estretament relacionades amb les soques utilitzades en la vacunació, mentre d'altres simplement són variacions de soques que són específiques d'una regió geogràfica (Bande et al., 2017). Per aquest motiu la prevenció s'ha de centrar en augmentar l'eficàcia de les vacunes actuals i desenvolupar-ne de noves contra les variants d'IBV predominants en una determinada regió (Bande et al., 2017). A Europa es van detectar les primeres soques d'IBV al principi de la dècada dels anys 1970. Les variants més predominants al continent europeu són la 793B, Mass, H120, M41, IBM, Italy02 i una variant estretament relacionada a la xinesa QX. Aquesta última tot i ser detectada per primera vegada l'any 2004, ha esdevingut un dels principals reptes recents perquè a l'arribar a Europa ha canviat el seu tropisme i també afecta els ronyons i l'oviducte (Bande et al., 2017).

A data d'avui encara no s'ha assolit una nomenclatura estandarditzada, però la majoria d'autors han adoptat el sistema suggerit per Cavanagh l'any 2001, amb una alta similitud respecte l'emprat pels virus de la grip aviar (Jackwood MW & de Wit S, 2020). La nomenclatura és la següent: IBV/tipus d'au/país d'origen/tipus genètic o serotip/designació de soca/any d'aïllament. D'aquesta manera permet que ràpidament s'obtingui informació específica de la soca que la distingeix d'una altra similar (Jackwood MW & de Wit S, 2020).

3.2.4. Mecanisme evolutiu

L'evolució d'IBV és la responsable del sorgiment de noves soques constantment, degut a la gran diversitat genètica que se'n deriva (Jackwood MW & de Wit S, 2020). Les mutacions en el genoma i les recombinacions són les dues fonts principals de variabilitat genètica.

Les mutacions es produeixen principalment per l'elevada taxa d'error i limitada capacitat correctora de la RDRP, la polimerasa viral, produint tant com insercions, delecions o substitucions (Bande et al., 2015). La RDRP d'IBV, la qual està formada per les Nsps

descrites anteriorment, té un domini 3' a 5' exoribonucleasa en la Nsp 14 involucrat en evitar errors i reparar-los, però continua tenint una elevada taxa de mutacions elevada que arriba a ser de $1,2 \times 10^3$ mutacions/posició/any (Jackwood MW & de Wit S, 2020). Es creu que la Nsp 14 juga un paper evolutiu clau permetent un equilibri entre fidelitat i diversitat, permetent una major adaptació a la pressió selectiva ambiental (Lin & Chen, 2017). Especialment aquestes mutacions es produeixen en el gen S, que juntament amb la seva funció d'unió a la cèl·lula hoste i contenir els epítops reconeguts pels anticossos, poden provocar l'aparició de noves soques i serotips que inclús siguin capaços d'infectar altres espècies (Jackwood MW & de Wit S, 2020).

La recombinació es pot dur a terme quan dues soques d'IBV entren en contacte. Es creu que l'ús de vacunes vives atenuades podria desencadenar processos recombinatoris quan una nova soca d'IBV entra en contacte amb elles (Bande et al., 2015). S'ha observat com les Nsp 2, 3 i 16, juntament amb la proteïna S, són els gens que tenen un major grau de recombinació (Bande et al., 2015).

Un cop produïts aquests mecanismes que atorguen la diversitat genètica, entren en joc els mecanismes de pressió selectiva perquè les noves soques que s'hagin pogut produir perdurin. La gran majoria no acaben sent rellevants, però algunes sí que acaben prosperant i esdevenint endèmiques en regions específiques, tal i com s'han reportat constantment durant les últimes dècades noves soques d'IBV arreu del món (Lin & Chen, 2017).

3.2.5. Replicació d'IBV

El procés de replicació d'IBV s'inicia amb la unió de la partícula vírica a la cèl·lula hoste mitjançant la proteïna S, seguida de la fusió de les membranes de virus i cèl·lula per acabar amb l'entrada d'IBV en la cèl·lula hoste. Ràpidament es posa en marxa la maquinària molecular per crear noves còpies del virus, formant-se la polimerasa viral (RDRP) a través de les proteïnes Nsp 2 a 16 en les vesícules de doble membrana a l'aparell de Golgi (Jackwood MW & de Wit S, 2020). La RDRP transcriurà el RNA genòmic viral, usat com a mRNA, com també els diferents mRNA subgenòmics per posteriorment ser traduïts en el citoplasma i donar lloc a totes les proteïnes virals. Les proteïnes S, E i M s'inserten en la membrana de l'aparell de Golgi, mentre que la proteïna N s'uneix al recent sintetitzat genoma viral per formar la nucleocàpsida d'IBV (Jackwood MW & de Wit S, 2020). La nucleocàpsida interacciona amb les proteïnes E i M, causant que les partícules víriques sobresurtin de la superfície citoplasmàtica del reticle endoplasmàtic. Finalment, les partícules víriques són transportades fins a la membrana plasmàtica en vesícules, on s'hi fusionaran per sortir de la cèl·lula hoste. No obstant no

és l'única forma d'alliberació d'IBV, ja que també es poden alliberar a través de la lisi cel·lular (Jackwood MW & de Wit S, 2020).

3.3. Diagnosi del virus de la bronquitis aviar

Un dels elements claus per poder garantir una adequada sanitat avícola i fer front a l'IBV és aconseguir un diagnòstic eficaç en el menor temps possible. Des del descobriment d'aquest virus i l'IB que causa, s'han desenvolupat tècniques cada cop més sofisticades per refinar la seva diagnosi, sigui basada en la simptomatologia, detecció d'anticossos contra IBV, detecció d'IBV o el seu aïllament (Jackwood MW & de Wit S, 2020). A través de la diagnosi d'IBV és possible la identificació de la soca del virus o el seu serotip, permetent-nos acotar la millor estratègia de prevenció i tractament possible (Jackwood MW & de Wit S, 2020). Finalment, l'elecció de la tècnica a emprar dependrà del tipus de mostra a analitzar, disponibilitat de materials i equipament, propòsit del test i si es duu a terme en el laboratori o en l'explotació avícola (Bande et al., 2016). A continuació descriurem les principals tècniques de diagnòstic d'IBV.

3.3.1. Aïllament víric i identificació

Aquesta tècnica va ser de referència pel diagnòstic d'IBV durant un llarg període, tot i que avui en dia encara s'utilitza en alguns casos (Bande et al., 2016). El fonament de la tècnica consisteix en la presa de mostra de teixits infectats per IBV, preferentment entre els 3 i 5 dies post infecció ja que són els que tenen els títols vírics més elevats, per ser inoculats i aïllats (Jackwood MW & de Wit S, 2020). En funció del tropisme de la soca vírica, les mostres es poden extreure de tràquea, ronyó, proventricle, tonsil·les cecals i oviducte. La inoculació i posteriorment aïllament d'IBV comunament es fan en la cavitat al·lantoica d'ous de gallina embrionals, cultius cel·lulars o d'òrgans. Malgrat tot, aquesta tècnica sovint ha d'anar acompanyada de tests de biologia molecular que permetin la identificació de la soca vírica (Bande et al., 2016).

3.3.2. Microscòpia electrònica

La detecció i identificació d'IBV a través de la microscòpia electrònica es basa en les característiques morfològiques del virus. La seva forma característica dels coronavirus i el seu diàmetre (120 nm aproximadament) es combinen amb la tinció amb àcid fosfotúngstic per determinar la presència i identitat del virus (Bande et al., 2016). La microscòpia electrònica de transmissió és una altra tècnica útil per determinar cèl·lules infectades amb partícules víriques. Tanmateix, la microscòpia electrònica s'utilitza

principalment en l'estudi del mecanisme d'infecció i replicació d'IBV en lloc de com un test diagnòstic específic (Bande et al., 2016).

3.3.3. Immunohistoquímica

Basada en les reaccions d'antigen-anticòs, dos principals mètodes immunohistoquímics s'usen per a la diagnosi d'IBV: immunoperoxidasa i immunofluorescència (Bande et al., 2016). La tècnica de la immunoperoxidasa s'usa en la localització d'IBV en mostres de teixits, però la tècnica de la immunofluorescència s'empra molt més freqüentment amb el mateix objectiu (Bande et al., 2016).

3.3.4. Serologia

Les diverses tècniques que engloba la serologia es basen en la detecció d'anticossos contra IBV. D'aquesta forma, títols elevats d'aquests signifiquen una infecció recent per IBV. Les tècniques serològiques més emprades són l'ELISA, la precipitació en gel d'agar (AGP per les seves sigles en anglès "Agar Gel Precipitation") i la inhibició de l'hemaglutinació (HI per les seves sigles en anglès "Hemagglutination Inhibition") (Jackwood MW & de Wit S, 2020). L'ELISA és el test més utilitzat pel seu cost econòmic, gran quantitat de mostres que pot processar i el curt temps d'anàlisi. No obstant, igual que l'AGP, no poden diferenciar el serotipatge de la soca d'IBV, fet que sí permet l'HI però amb una sensibilitat menor que l'ELISA en els seus respectius resultats (Bande et al., 2016). Tot i que la serologia no permet la identificació de la soca vírica, representa el mètode amb un menor temps d'anàlisi per la diagnosi d'IBV. Per tant, es troba consolidada com un dels mètodes més estesos en la detecció d'aquest virus.

3.3.5. Tècniques de biologia molecular

Les tècniques de biologia molecular han emergit com la metodologia idònia per la diagnosi d'IBV. Compta amb diverses avantatges respecte les altres metodologies esmentades anteriorment com l'obtenció de resultats en un temps curt, preu barat, indicació del nivell de càrrega viral en la mostra i la identificació de la soca vírica (Jackwood MW & de Wit S, 2020). L'estudi del gen S1 d'IBV és el que dota les tècniques de biologia molecular d'aquestes virtuts. L'amplificació del gen possibilita la detecció, mentre que la seva seqüenciació caracteritza la soca del virus i identifica si es tracta d'una soca coneguda o d'una nova (Jackwood MW & de Wit S, 2020). Les principals tècniques de biologia molecular utilitzades en la diagnosi d'IBV són la transcripció reversa de la reacció de la polimerasa en cadena (RT-PCR, per les seves sigles en anglès "Reverse Transcriptase Polymarase Chain Reaction"), RT-PCR en temps real (Real Time RT-PCR, per la traducció de l'anglès), polimorfisme de llargada de fragments

de restricció (RFLP, per les seves sigles en anglès “Restriction Fragment Length Polymorphism”) i seqüenciació genòmica (Bande et al., 2016).

- RT-PCR: és el mètode referent per a la detecció d'IBV (Jackwood MW & de Wit S, 2020). Com a tècnica, es considera el model més efectiu per la detecció de RNA en mostres. Es basa en l'amplificació del RNA directament o a través d'una síntesi prèvia de DNA complementari (cDNA). La mida de l'amplicó fruit de la RT-PCR serà el que ens permetrà confirmar o descartar la presència d'IBV (Jackwood MW & de Wit S, 2020). Principalment s'usen dos tipus d'encebadors (els coneguts “primers” en anglès): els dissenyats en regions variables del genoma d'IBV i els dirigits a regions conservades. Els de regions variables, especialment el gen S, ens podran permetre no només detectar la presència del virus sinó també identificar la soca en qüestió, mentre que els de regions conservades, com els UTR i el gen N, només serviran com a diagnòstic d'IBV (Bande et al., 2016). No obstant, per millorar l'especificitat en l'ús d'encebadors en zones conservades i no obtenir falsos positius per la presència de virus similars a IBV com el TCoV, s'han desenvolupat modificacions de la RT-PCR com la nested RT-PCR, múltiplex RT-PCR i l'amplificació isotèrmica mitjançada per bucle de transcripció inversa (RT-LAMP, per les seves sigles en anglès “Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification”) (Bande et al., 2016). De totes maneres, per assegurar-nos de la identificació de la soca vírica caldrà dur a terme una seqüenciació.

- Real Time RT-PCR: dissenyada com una variació de la RT-PCR que permetés augmentar la seva sensibilitat i especificitat, és possible detectar l'IBV i quantificar-lo (Bande et al., 2016). Presenta l'avantatge respecte la RT-PCR convencional de l'obtenció de resultats en menor temps. A més d'utilitzar el tipus d'encebadors que hem descrit per la RT-PCR, requereix de l'ús d'una sonda, que és la que ens permet seguir en temps real l'amplificació del gen objectiu. Per aquest motiu, tot i que permet una major discriminació en la detecció d'IBV cal una posterior seqüenciació per conèixer la soca vírica (Jackwood MW & de Wit S, 2020).

- RFLP: aquesta tècnica permet la diferenciació de soques d'IBV a continuació d'una amplificació per RT-PCR. L'ús d'enzims de restricció per originar fragments de diferent mida únics per a cada soca aconsegueix la distinció a través d'una electroforesi, ja que obtindrem un patró de bandes únic per a cada soca vírica (Bande et al., 2016). No obstant, no totes les soques poden ser distingides ja que no totes tenen un patró únic per les dianes dels enzims de restricció, pel que és un impediment per l'aplicació com a mètode universal (Bande et al., 2016).

- Seqüenciació i anàlisi filogenètic: es tracta del procediment més fiable pel genotipatge d'IBV. Es fonamenta en l'amplificació per RT-PCR del gen S1, el qual es considera hipervariable, per ser seqüenciat posteriorment (Bande et al., 2016). Un cop obtinguda la seqüència, es compara amb les que hi ha emmagatzemades en diverses bases de dades per saber si es tracta d'una soca d'IBV coneguda o d'una nova. Addicionalment, és possible la construcció d'arbres filogenètics i conèixer l'evolució i proximitat entre soques d'IBV (Bande et al., 2016). El desenvolupament de tècniques de seqüenciació de nova generació possibilita que l'anàlisi sigui més ràpid, el que permetrà l'extensió com a mètode universal per la diagnosi d'IBV (Bande et al., 2016).

Malauradament, encara no s'ha pogut desenvolupar una tècnica de diagnosi d'IBV òptima i universal en tots els casos. Centrant-nos en la RT-PCR, la qual actualment s'ha erigit com la principal metodologia per la detecció del virus, sovint requereix de diversos assajos per validar un resultat positiu o negatiu i considerar-lo fiable completament. Conseqüentment no s'ha aturat la recerca de l'optimització de la RT-PCR, sigui en base de les condicions de la tècnica base o a través de diverses modificacions com hem observat anteriorment. Per aquest motiu, en aquest treball voldrem recercar sobre l'estat actual de la RT-PCR per a la detecció d'IBV i quins haurien de ser els passos a seguir per optimitzar-la, tot millorant els protocols actuals.

4. Mètodes

La metodologia de la recerca duta a terme per a aquest treball bibliogràfic es basa en la cerca en bases bibliogràfiques per obtenir articles científics que tractessin la temàtica escollida.

D'aquesta manera, en portals com PubMed, Web of Science i ScienceDirect es van utilitzar les següents paraules i conceptes claus: “avian infectious bronchitis”, “avian infectious bronchitis virus”, “detecció de avian infectious bronchitis virus”, “diagnosi de avian infectious bronchitis virus”, “RT-PCR” i “Real Time RT-PCR”, com a termes més destacats. Com es pot observar, s'empraven en anglès ja que és l'idioma predominant en el món de la ciència i la forma d'obtenir la major quantitat d'informació possible.

Per refinar la cerca, es van utilitzar filtres de cerca per obtenir els articles publicats en els últims 5 anys. No obstant, per ampliar la informació també s'han tingut en compte els articles majoritàriament citats pels articles més recents, encara que d'una data prèvia a la del filtratge. Això ens permetia aprofundir i obtenir els protocols que sovint es trobaven citats però no descrits en els articles més recents.

5. Resultats i discussió

La RT-PCR per la detecció d'IBV és una tècnica àmpliament estesa arreu del món degut a la ubiqüitat amb la que s'ha escampat aquest virus. Juntament amb la seva patogenicitat, ha fet que esdevingui un risc pel sector avícola i que aquest cerqui contínuament la millor manera de detectar-lo. Per aquest motiu, i sumada la necessitat de conèixer la soca infectant en qüestió, la RT-PCR és una tècnica clau i cal que sigui eficaç per la detecció i eventual posterior seqüenciació per a la identificació de la soca d'IBV.

Per facilitar el procés d'anàlisi dels procediments actuals, els dividirem segons si la RT-PCR és Real Time o convencional – és a dir, sense ser Real Time –. Com que ambdós es poden utilitzar com a pas previ de la seqüenciació, aquesta tècnica la comentarem a posteriori. En últim terme discutirem com seria el millor protocol tenint en compte tot el que s'haurà esmentat prèviament.

5.1. RT-PCR convencional

Durant les dues últimes dècades s'han desenvolupat diverses variacions del protocol de la tècnica cercant la manera d'ajustar-se a l'estudi que els ocupava en aquell moment. Per aquest motiu, l'origen de les mostres i la finalitat de la prova són els dos majors condicionants en escollir els encebadors i les condicions de la reacció.

En primera instància, una de les principals diferències és optar per realitzar la RT-PCR en una sola etapa (coneguda en anglès com a “One Step”), incloent-hi la retrotranscripció del RNA viral, o sintetitzar prèviament el cDNA i posteriorment dur a terme la PCR. Escollir una o altra estratègia comportarà l'ús de kits comercials amb característiques diferents. Si s'opta per dues etapes caldran kits que continguin l'activitat enzimàtica transcriptasa inversa aïllada de la resta i, un cop realitzada, s'afegeixin a la reacció els components necessaris per dur a terme la PCR (Loa et al., 2016; Nguyen et al., 2013). En canvi, en les OneStep s'incorpora l'activitat transcriptasa inversa en la polimerasa que ens permetrà amplificar el material genètic, de tal manera que per evitar interferències es pugui desnaturalitzar per xoc tèrmic l'activitat transcriptasa inversa un cop ja hagi realitzat la seva funció (Alsultan et al., 2019; Sun & Liu, 2016). Comparativament, l'alternativa en una etapa comporta resultats més fiables ja que ens evita haver d'exposar el cDNA producte de la retrotranscripció a possibles contaminacions pel fet de no requerir afegir-hi els reactius necessaris per a amplificar el material genètic per a que sigui detectat. Tanmateix, els kits comercials corresponents

són més cars (Alsultan et al., 2019) que l'eficiència comparativa que es guanya respecte als kits comercials per a una prèvia síntesi de cDNA i una posterior amplificació (Loa et al., 2016) i és per aquest motiu que encara se segueix apostant per aquesta metodologia.

En segon terme, l'elecció dels encebadors serà en funció de la regió del genoma que es pretén usar com a diana per a l'amplificació. S'han usat diverses regions i gens com el gen N (Alsultan et al., 2019; Loa et al., 2016; Sun & Liu, 2016), gen S1 (Alsultan et al., 2019; Blanco et al., 2015; Franzo et al., 2015; Wang et al., 2015) i regió 3'-UTR (Dolz et al., 2012; Sun & Liu, 2016) com a les tres seqüències més destacades. Cadascuna presenta les seves pròpies avantatges i inconvenients, basats en la similitud de les seqüències entre les diverses soques d'IBV i amb la resta de virus similars. El gen S1 és el que presenta major variabilitat, tenint una similitud d'entre el 70% i 80% mentre amb altres coronavirus pot arribar a ser de tant sols del 36% (Milek & Blicharz-Domańska, 2018). Aquesta característica el converteix en l'ideal perquè la detecció sigui específica d'IBV, però pot presentar problemes per evitar que els encebadors siguin específics de soca i no permetin una detecció de qualsevol soca d'IBV (Geerligs et al., 2011). En canvi, el gen N i la regió 3'-UTR són dues de les seqüències més conservades en el genoma d'IBV (Sun & Liu, 2016). Tot i que bé es cert que poden contenir algunes petites variacions entre soques d'IBV, permeten la detecció universal del virus. No obstant, l'ajust d'aquestes petites diferències permetria incrementar l'eficiència de les amplificacions i, per resoldre-ho, es postula la degeneració dels encebadors per millorar la seva unió al material genètic d'IBV (Sun & Liu, 2016), més enllà del disseny de nous encebadors. D'aquesta manera, en funció de l'anàlisi que duguem a terme serà més convenient utilitzar uns encebadors per una diana o altres. Si es tracta d'un estudi en què coneixem quines són les soques més abundants, escollir el gen S1 serà millor, mentre que si és de caràcter més general i no sabem quines soques hi haurà i inclús si n'hi pot haver alguna de nova, la decisió més sensata serà triar el gen N o la regió 3'-UTR.

Malgrat tenir la capacitat de decidir quins encebadors usar i de dissenyar-ne de nous per millorar la seva unió a la seva seqüència diana, encara resta possible que es produeixin amplificacions inespecífiques o insuficients per a la detecció d'IBV a causa de contaminacions per altres virus o una quantitat inicial molt reduïda. Per superar aquestes problemàtiques s'han desenvolupat dues variacions de la RT-PCR convencional: la múltiplex RT-PCR i la nested RT-PCR. La múltiplex RT-PCR consisteix en l'amplificació de diverses seqüències genòmiques simultàniament, permetent una detecció més sensible (Bande et al., 2016). Per poder distingir els amplicons, s'usen

encebadors per a dues regions genòmiques diferents de mides distintes, de tal forma que es puguin distingir per la seva mida (Bande et al., 2016). Tot i que fins a la data només s'ha usat per discernir IBV d'altres virus similars, com ara bé TCoV, que poden coexistir en una mateixa mostra basant-se en les diferències entre gen N – similar entre ells – i gen S1 – diferent entre ells – (Loa et al., 2016; Nguyen et al., 2013), aquesta tècnica podria utilitzar-se per distingir soques particulars utilitzant encebadors específics de soca basant-se en el gen S1. D'altra banda, la nested RT-PCR involucra dues reaccions d'amplificació consecutives: en la primera s'amplifica la seqüència del genoma víric i en la segona s'afegeixen encebadors per un fragment específic de l'amplicó produït en la primera reacció (Fellahi et al., 2015; Franzo et al., 2015). Aquest procediment permet eliminar els productes inespecífics que es puguin produir en la primera reacció i les possibles contaminacions en el producte final (Fellahi et al., 2015; Franzo et al., 2015). A més, donades les seves característiques també és útil per la detecció d'IBV en aquelles mostres que en contenen uns nivells molt baixos (Sadri et al., 2019). Ambdues modificacions no són excloents i poden ser combinades (Nguyen et al., 2013). Encara que les tècniques múltiplex i nested RT-PCR confereixen una major sensibilitat en la detecció d'IBV, el seu major cost pot suposar una barrera per la implementació en la majoria de laboratoris (Bande et al., 2016).

En tercer lloc, escollir les condicions de reacció és determinant per a la RT-PCR. La RT-PCR es divideix en etapes: retrotranscripció, inhibició transcriptasa reversa i activació polimerasa, cicles per a l'ampliació de la seqüència diana – desnaturalització, alineament i unió de l'encebador i extensió – i la separació per electroforesi de l'amplicó (Alsultan et al., 2019). Cada procediment té unes característiques de temperatura, temps de durada i nombre de cicles adaptat als encebadors i kits comercials que s'usen. Per aquest motiu existeix una gran diversitat entre metodologies (Loa et al., 2016; Sun & Liu, 2016; Wang et al., 2015). La retrotranscripció oscil·la sobre els 50 °C i 30 minuts, sintetitzant el cDNA, més estable que el RNA, requerit per ser amplificat (Alsultan et al., 2019; Wang et al., 2015). A continuació aquest és desnaturalitzat al voltant de 94 °C durant 5 minuts, de tal manera que l'activitat transcriptasa inversa queda inhibida irreversiblement i permet l'activació de la polimerasa (Nguyen et al., 2013; Sun & Liu, 2016). Tot seguit es duen a terme els cicles que permeten que el material genètic estigui en forma de cadena simple perquè s'hi uneixin els encebadors i la maquinària enzimàtica amplifiqui la seqüència diana. El nombre de cicles i les condicions de cada etapa varien molt en funció del kit comercial i els encebadors emprats. El protocol més comú compta amb entre 30 i 40 cicles a 94 °C 1 minut, 60 °C 1 minut, 72 °C 2 minuts en cadascuna de les respectives etapes, amb una extensió final a 72 °C i 10 minuts,

aproximadament (Culver et al., 2008; Wang et al., 2015). Un cop obtingut el producte de la reacció, se'l separarà mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa, que en funció de la mida de l'amplicó serà al 1% o 2% (Franzo et al., 2015; Sun & Liu, 2016). Seleccionar les condicions adequades als reactius que usem ens permetrà obtenir un producte de millor qualitat, puresa i quantitat adequades per a la detecció d'IBV.

5.2. Real Time RT-PCR

Com a necessitat de reduir la durada del protocol per la detecció d'IBV i quantificar la càrrega viral, es va començar a implementar la Real Time RT-PCR en la seva diagnosi. L'addició d'una sonda fluorescent per poder seguir en temps real l'amplificació cicle a cicle, mitjançant lectura espectrofotomètrica, ens permetrà estalviar-nos l'electroforesi en gel d'agarosa per a la detecció del producte de la reacció (Jones et al., 2011). De forma anàloga, convindrà escollir les condicions de reacció i els encebadors a utilitzar, a més de la sonda que ens permeti la lectura a una longitud d'ona determinada.

Com seguim partint del RNA viral, hi ha d'haver una prèvia síntesi de cDNA per dur a terme la PCR i seguir-la a temps real. La Real Time RT-PCR permet la lectura del producte en el propi termociclador, que cal que dugui incorporat un espectrofotòmetre, pel que s'eviten possibles contaminacions entre la reacció i la lectura dels resultats. Per aquest motiu, es tendeix a utilitzar protocols OneStep, és a dir, que ja duen incorporada l'activitat transcriptasa inversa i no caldrà interaccionar amb la mostra fins a l'obtenció del resultat final (Mo et al., 2020; Sadri et al., 2019).

Les principals seqüències dianes utilitzades en la Real Time RT-PCR són el gen S1, gen N i la regió 5'-UTR, a diferència de la RT-PCR convencional que preferia la 3'-UTR. La regió 5'-UTR també és una regió bastant conservada en el genoma d'IBV, però que ofereix una major sensibilitat que la regió 3'-UTR en aquesta tècnica (Jones et al., 2011). L'ús d'aquestes seqüències permet la detecció d'IBV en dos tipus: deteccions universals – usant gen N i regió 5'-UTR – (Fellahi et al., 2015; Mo et al., 2020) i deteccions específiques de soca – usant gen S1 – (Roh et al., 2014; Tucciarone et al., 2018). Les deteccions universals ens ofereixen una millor sensibilitat, especificitat i límit de detecció en la diagnosi d'IBV, però requereixen d'una posterior seqüenciació per identificar la soca (Roh et al., 2014). No obstant, la conservació del gen N en el gènere coronavirus causa que puguin haver-hi ampliacions inespecífiques que no corresponguin a IBV, com és el cas de TCoV (Meir et al., 2010). La variabilitat en el gen S1 és la que ens permet realitzar la detecció específica de soca amb els encebadors adequats, pel que si obtenim un producte en la reacció podrem identificar-ne la soca sense requerir d'una

seqüenciació posterior (Roh et al., 2014). L'elecció dels encebadors dependrà de la diana que perseguim, però a més caldrà tenir en compte el disseny de la sonda. Aquesta duu incorporat un fluorocrom i s'unirà entre els encebadors usats per l'amplificació, de tal manera que quan la polimerasa actuï s'alliberarà el fluorocrom. Aquesta alliberació podrà ser llegida per l'espectrofotòmetre a la longitud d'ona adequada al tipus de fluorocrom usat (Jones et al., 2011). L'ús d'aquestes sondes confereix una major sensibilitat i especificitat respecte a la RT-PCR convencional, encara que encareix el procés pel seu cost i la necessitat de comptar amb un termociclador que posseeixi un espectrofotòmetre incorporat (Meir et al., 2010).

Les condicions de la Real Time RT-PCR s'hauran d'ajustar en funció dels kits comercials que s'usin, els encebadors emprats i la sonda utilitzada per al seguiment de la reacció. Les etapes que comprenen la seva metodologia són lleugerament diferents a les de la RT-PCR convencional i són les següents: retrotranscripció, inhibició transcriptasa reversa i activació polimerasa, cicles per a l'ampliació de la seqüència diana – desnaturalització i alineament, unió de l'encebador i amplificació – i la lectura de la fluorescència de la sonda (Alsultan et al., 2019; Mo et al., 2020). Com es pot observar, hi ha dues diferències principals. La primera és que el cicle només comprèn dues etapes de perfil de temperatura, pel que en una sola fase es duu a terme l'alineament i unió dels encebadors – i també sonda en aquest cas – amb l'amplificació del fragment (Sadri et al., 2019; Tucciarone et al., 2018). La segona és que, enlloc de realitzar una amplificació final per tenir prou producte per ser distingit en l'electroforesi, directament es passa a la lectura espectrofotomètrica que es repeteix en cada cicle per poder quantificar la càrrega viral (Jones et al., 2011). D'aquesta manera les condicions de les etapes queden de la forma descrita a continuació. La retrotranscripció sol ser al voltant de 50–55 °C 15–30 minuts (Alsultan et al., 2019; Mo et al., 2020; Roh et al., 2014). La inhibició de l'activitat transcriptasa i activació de la polimerasa a 95 °C 5 minuts (Fellahi et al., 2015). Finalment, entre 40 i 50 cicles en els que l'etapa de desnaturalització és a 95 °C 15 segons, d'alineament, unió dels encebadors i amplificació és a 60 °C 30 segons i lectura de la fluorescència a la longitud d'ona definida pel fluorocrom que conté la sonda usada (Fellahi et al., 2015; Meir et al., 2010; Mo et al., 2020).

Per tant, la Real Time RT-PCR s'erigeix com una alternativa més sensible i específica per a la detecció d'IBV que la RT-PCR convencional, que a més també permet la quantificació de la càrrega viral i una reducció substancial en la durada de la tècnica per obtenir els resultats. Segons la seqüència diana que utilitzem, podrem identificar la soca sense requerir d'una posterior seqüenciació.

5.3. Seqüenciació

La seqüenciació ens permet caracteritzar la mostra analitzada i identificar la soca d'IBV, realitzant el genotipatge del virus. Sovint la seqüenciació per a la identificació filogenètica es duu a terme després d'una RT-PCR convencional o Real Time de caràcter genèric, és a dir no específiques de soca. En aquests casos es pot partir del producte de la reacció anterior i identificar la soca a través de la seqüència diana que havíem seleccionat prèviament (Maurel et al., 2011). No obstant, el gen N i les regions 3'-UTR i 5'-UTR es troben bastant conservades dins l'espècie d'IBV i, per aquest motiu, no són idònies per distingir-ne la soca (Miłek & Blicharz-Domańska, 2018). Conseqüentment, és millor optar per usar la mostra originària per realitzar una RT-PCR específica per a la seqüenciació, que es basarà en seqüències variables com el gen S1 (Fellahi et al., 2015; Sadri et al., 2019; Tucciarone et al., 2018). També s'utilitza la seqüenciació en base al gen S sencer (Listorti et al., 2017) i a tot el genoma d'IBV (Franzo et al., 2015), però són variants minoritàries respecte a la predominant que és en base al gen S1.

Per tant, el protocol de seqüenciació més habitual se centra en el gen S1 a partir de la mostra original (Fellahi et al., 2015; Sadri et al., 2019; Tucciarone et al., 2018). Partint d'aquesta, es duu a terme una primera RT-PCR amb l'objectiu d'amplificar tot el gen S1 i, per fer-ho, utilitza encebadors per a les regions flanquejants del gen S1 (Tucciarone et al., 2018). Aquesta primera reacció RT-PCR, a excepció de l'ús d'encebadors específics de les regions flanquejants del gen S1, segueix unes condicions molt similars a les d'una RT-PCR convencional, tal i com hem descrit prèviament en l'apartat "5.1 RT-PCR convencional" (Han et al., 2011; Tucciarone et al., 2018). Posteriorment, el producte d'aquesta primera reacció és utilitzat com a substrat d'una segona PCR, anomenada PCR de seqüenciació (Han et al., 2011). En aquesta s'utilitzen diversos parells d'encebadors per generar amplicons de diferents mides i en diferents posicions del gen S1, en unes condicions similars a la primera reacció (Tucciarone et al., 2018). Finalment, mitjançant eines bioinformàtiques són analitzats els diversos fragments generats entre les dues reaccions per ser comparats en diverses bases de dades per determinar la seva relació amb les seqüències corresponents a les soques recopilades en aquests arxius (Bande et al., 2016). Amb aquesta comparació es determina a quina soca pertany la mostra d'IBV analitzada o, en cas de no correspondre's amb cap prèviament registrada, el descobriment d'una soca nova. La implementació de tècniques de seqüenciació de nova generació, capaces de seqüenciar tot el genoma d'IBV més

ràpidament, podria ajudar a reduir el temps de seqüenciació i agilitzar el genotipatge del virus (Bande et al., 2016).

5.4. Mètode global òptim

Un cop descrits com són els principals mètodes de RT-PCR per la detecció i diagnosi d'IBV, cadascun amb les seves virtuts i defectes, és l'hora d'analitzar quin és el mètode òptim. Per a determinar-ho, ens situarem en diversos supòsits de necessitats que pot tenir un laboratori a l'hora de detectar i diagnosticar IBV. Tractarem la cerca de tres opcions: la més ràpida, la més barata i la d'una major sensibilitat, especificitat i límit de detecció. Creiem que aquestes poden ser les més representatives a l'hora de dur aquesta tècnica i obtenir un resultat fiable. En tots els casos contemplarem com a requeriment detectar la presència d'IBV i conèixer a quina soca pertany.

- Mètode més ràpid: en aquest cas suposarem que l'objectiu és detectar i diagnosticar IBV amb la major rapidesa possible, sense cap altra limitació. A partir d'aquí discutirem sobre dues possibilitats: que sapiguem quina serà probablement la soca d'IBV present en la mostra i que no en tenim cap sospita i podria ser-ne qualsevol. En el primer supòsit, si esperem que es tracti d'una soca en concret, escolliríem realitzar una Real Time RT-PCR amb encebadors per al gen S1 específics per la soca esperada (Mo et al., 2020). D'aquesta forma, amb una sola reacció aconseguiríem detectar i diagnosticar l'IBV, genotipar-lo i atribuir la soca en qüestió. En el segon supòsit, sense cap sospita de quina soca pot ser, triaríem també una Real Time RT-PCR, ja que és el mètode més ràpid (Roh et al., 2014), però aquest cop amb la regió 5'-UTR com a diana (Sadri et al., 2019). Havent aconseguit detectar la presència d'IBV a través d'una de les seves regions més conservades (Bande et al., 2016), pel que aconseguiríem detectar qualsevol soca, realitzaríem la seqüenciació del genoma viral en base al gen S1 per identificar de quina soca es tracta (Tucciarone et al., 2018). El primer supòsit seria l'opció més ràpida, però no sempre es donaran les condicions per aplicar-lo, i per aquest motiu el segon supòsit seria l'opció que s'acabaria aplicant predominantment.

- Mètode més barat: una de les principals limitacions en implementar una metodologia és el seu cost. Per aquest motiu, avaluarem quin és el mètode més barat que ens garanteix la detecció i diagnosi d'IBV. Com hem desglossat per discutir el mètode més ràpid, ens situarem en dos supòsits segons si intuïm o no de quina soca es tracta. En el primer cas, en què intuïm de quina soca es tracta, optaríem per una RT-PCR convencional, amb una síntesi prèvia de cDNA, sobre el gen S1 (Meir

et al., 2010) amb encebadors específics de soca (Geerligs et al., 2011), aconseguint amb un sol procediment detectar i identificar la soca d'IBV. En el segon cas, en què no tenim cap indici de quina soca pot ser, realitzaríem també una RT-PCR convencional amb prèvia síntesi de cDNA, però sobre el gen N per obtenir una detecció universal (Ducatez et al., 2009). Tot seguit i partint de la mostra original, seqüenciariem el gen S1 d'IBV per conèixer-ne la soca a la que pertany (Tucciarone et al., 2018). També com en el cas del mètode més ràpid, el primer supòsit que hem fet serà menys probable que el segon i, en conseqüència, el segon serà el que aplicarem més sovint.

- Mètode amb major sensibilitat, especificat i límit de detecció: en aquesta ocasió cerquem el mètode que ens permeti la detecció i diagnosi d'IBV més fiable possible. Plantejarem dues opcions, ja que entre elles no s'han testat per determinar quina metodologia seria més òptima, però també perquè sigui més fàcil l'adaptació a la disponibilitat particular de recursos de cada laboratori. La primera opció consisteix en una combinació OneStep de la múltiplex RT-PCR i nested RT-PCR, que són dues variacions que milloren les característiques de la RT-PCR convencional (Bande et al., 2016). S'utilitzarien encebadors per a la regió 3'-UTR o el gen N (Nguyen et al., 2013; Sun & Liu, 2016), que ens conferirien la detecció de qualsevol soca d'IBV (Milek & Blicharz-Domańska, 2018), i el gen S1 (Wang et al., 2015). D'aquesta manera, amb les característiques de la múltiplex RT-PCR aconseguiríem la detecció d'IBV per una regió conservada – regió 3'-UTR o gen N – i confirmar que es tracta d'IBV i no d'un virus similar, com ara TCoV, que podria causar falsos positius per una regió espècie-específica – gen S1 –. Amb les característiques de la nested RT-PCR ens assegurariem d'obtenir amplificacions sense productes inespecífics i contaminacions. Per identificar la soca d'IBV seqüenciariem el seu genoma complet (Franzo et al., 2015). Aquesta combinació de tècniques ens garantiria que el resultat obtingut sigui completament fiable. La segona opció consistiria en una primera Real Time RT-PCR amb encebadors per a la regió 5'-UTR (Sadri et al., 2019), perquè s'ha demostrat com la tècnica més sensible i específica al combinar-la amb aquesta seqüència diana (Jones et al., 2011). Per últim, també es realitzaria una seqüenciació del genoma complet del virus per conèixer la soca present en la mostra (Franzo et al., 2015).

Cal mencionar que la discussió dels mètodes s'ha fet principalment en base a les característiques de les tècniques i les regions genòmiques que s'usen com a dianes i no en base als encebadors utilitzats perquè aquests, amb el coneixement de les regions dianes, es poden dissenyar per millorar la seva afinitat per unir-s'hi. Conseqüentment,

el disseny de nous encebadors o l'elecció de determinats encebadors durà a ajustar la seva concentració per a la tècnica en qüestió, com també les condicions de cada etapa de reacció ja que es veuran condicionades pels encebadors escollits per a la detecció i diagnosi d'IBV.

6. Conclusions

En aquest estudi hem revisat l'estat actual de la tècnica RT-PCR, incloent les seves variacions, per a la detecció i diagnosi d'IBV. Aquest és un virus altament contagiós que provoca la malaltia d'IB en l'espècie *Gallus gallus* i és considerat la segona causa de pèrdues en el sector avícola del món. Degut a la seva baixa protecció creuada entre serotips d'IBV, pren un rol vital la detecció i identificació de la soca vírica, principalment a través de les tècniques de biologia molecular on destaca la RT-PCR. Hem analitzat el protocol de la tècnica, de les seves variacions i de la posterior seqüenciació per a la identificació filogenètica del virus amb l'objectiu de millorar els processos actuals i optimitzar la diagnosi d'IBV.

D'aquesta manera, les principals conclusions d'aquest treball són:

1. Les metodologies de biologia molecular de detecció i identificació d'IBV estan en progrés constant. Des dels inicis de la implantació d'aquestes tècniques s'han estat adaptant contínuament als nous coneixements sobre el genoma del virus, les característiques de les seqüències dels seus gens i l'aparició de noves soques. S'han acabat imposant com a tècniques predominants la RT-PCR, la Real-Time RT-PCR i la seqüenciació.
2. L'elecció de seqüències més conservades o variables permet una detecció universal o específica de soca. Les seqüències del gen N i les regions 3'-UTR i 5'-UTR són les òptimes per detectar la presència d'IBV, independentment de la soca, mentre que la variabilitat del gen S1 unida al disseny d'encebadors específics de soca ens permet la detecció d'una soca concreta i identificar-la.
3. Les condicions de reacció cal ajustar-les als encebadors i kit de reactius que s'usin. Els encebadors escollits, que són en funció de quina seqüència es vol amplificar i per tant el tipus de detecció que es vol dur a terme, i el kit comercial de reactius seran els que determinaran les condicions de reacció.
4. La tria de la tècnica ens determinarà el cost, la durada i la sensibilitat, especificitat i límit de detecció de l'anàlisi. Les característiques de cada tècnica són idònies per adaptar-se en cas de tenir limitacions al laboratori. La RT-PCR convencional amb síntesi prèvia de cDNA és la més barata, la Real-Time RT-PCR la més ràpida i utilitzar les seqüències més conservades amb les variacions de la RT-PCR com la múltiplex i la nested milloren la seva sensibilitat i especificitat. Complementant-ho amb la seqüenciació, identificarem la soca d'IBV.
5. L'optimització de la diagnosi d'IBV rau en la combinació de tècnica, seqüència diana i encebadors. Són els tres pilars que ens proporcionaran la màxima

fiabilitat en el resultat obtingut. Conèixer les avantatges que aporta cadascun farà que ajustem la metodologia als requeriments del nostre anàlisi.

7. Referències

- Abdel-Moneim, A. S. (2017). Coronaviridae: Infectious bronchitis virus. In *Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of Livestock* (pp. 133–166). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47426-7_5
- Alsultan, M. A., Alhammadi, M. A., & Hemida, M. G. (2019). Infectious bronchitis virus from chickens in Al-Hasa, Saudi Arabia 2015-2016. *Veterinary World*, 12(3), 424–433. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.424-433>
- Bande, F., Arshad, S. S., Hair Bejo, M., Moeini, H., & Omar, A. R. (2015). Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. In *Journal of Immunology Research* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2015/424860>
- Bande, F., Arshad, S. S., Omar, A. R., Bejo, M. H., Abubakar, M. S., & Abba, Y. (2016). Pathogenesis and Diagnostic Approaches of Avian Infectious Bronchitis. In *Advances in Virology* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/4621659>
- Bande, F., Arshad, S. S., Omar, A. R., Hair-Bejo, M., Mahmuda, A., & Nair, V. (2017). Global distributions and strain diversity of avian infectious bronchitis virus: A review. *Animal Health Research Reviews*, 18(1), 70–83. <https://doi.org/10.1017/S1466252317000044>
- Blanco, A., Antillés, N., Camprubí, Q., Jové, R., & Biarnes, M. (2015). *Bronquitis aviar: Epidemiología molecular y evolución de los diferentes genotipos predominantes en España desde 2011*.
- Culver, F., Britton, P., & Cavanagh, D. (2008). RT-PCR Detection of Avian Coronaviruses of Galliform Birds (Chicken, Turkey, Pheasant) and in a Parrot. In D. Cavanagh (Ed.), *SARS- and Other Coronaviruses* (Vol. 454, pp. 35–42). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-181-9>
- de Wit, J. J. (Sjaak., & Cook, J. K. A. (2019). Spotlight on avian pathology: infectious bronchitis virus. In *Avian Pathology* (Vol. 48, Issue 5, pp. 393–395). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1617400>
- Dolz, R., Vergara-Alert, J., Pérez, M., Pujols, J., & Majó, N. (2012). New insights on infectious bronchitis virus pathogenesis: Characterization of Italy 02 serotype in chicks and adult hens. *Veterinary Microbiology*, 156(3–4), 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.001>
- Ducatez, M. F., Martin, A. M., Owoade, A. A., Olatoye, I. O., Alkali, B. R., Maikano, I., Snoeck, C. J., Sausy, A., Cordioli, P., & Muller, C. P. (2009). Characterization of a new genotype and serotype of infectious bronchitis virus in Western Africa. *Journal of General Virology*, 90(11), 2679–2685. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012476-0>
- Fabricant, J. (1998). The Early History of Infectious Bronchitis. *Avian Diseases*, 42(4), 648. <https://doi.org/10.2307/1592697>
- Fellahi, S., Ducatez, M., Harrak, M. El, Guérin, J. L., Touil, N., Sebbar, G., Bouaiti, E. A., khataby, K., Ennaji, M. M., & El-Houadfi, M. (2015). Prevalence and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in poultry flocks in Morocco from 2010 to 2014 and first detection of Italy 02 in Africa. *Avian Pathology*, 44(4), 287–295. <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1044422>

- Franzo, G., Listorti, V., Naylor, C. J., Lupini, C., Laconi, A., Felice, V., Drigo, M., Catelli, E., & Cecchinato, M. (2015). Molecular investigation of a full-length genome of a Q1-like IBV strain isolated in Italy in 2013. *Virus Research*. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.07.008>
- Geerligs, H. J., Boelm, G. J., Meinders, C. A. M., Stuurman, B. G. E., Symons, J., Tarres-Call, J., Bru, T., Vila, R., Mombarg, M., Karaca, K., Wijmenga, W., & Kumar, M. (2011). Efficacy and safety of an attenuated live QX-like infectious bronchitis virus strain as a vaccine for chickens. *Avian Pathology*, 40(1), 93–102. <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.542742>
- Han, Z., Sun, C., Yan, B., Zhang, X., Wang, Y., Li, C., Zhang, Q., Ma, Y., Shao, Y., Liu, Q., Kong, X., & Liu, S. (2011). A 15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious bronchitis coronavirus in China. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(1), 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.09.002>
- Jackwood, M. W. (2019). *Infectious Bronchitis in Poultry*. Merck Veterinary Manual. <https://www.merckvetmanual.com/poultry/infectious-bronchitis/infectious-bronchitis-in-poultry#>. Data de consulta: 2 d'abril 2020.
- Jackwood MW, & de Wit S. (2020). Infectious Bronchitis. In Z. G. Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL, de Wit S, Grimes T, Johnson D, Kromm M, Prajitho TY, Rubinoff I (Ed.), *Diseases of Poultry* (14th ed., pp. 167–188). John Wiley and Sons, Inc. <https://doi.org/doi:10.1002/9781119371199.ch4>
- Jones, R. M., Ellis, R. J., Cox, W. J., Errington, J., Fuller, C., Irvine, R. M., & Wakeley, P. R. (2011). Development and Validation of RT-PCR Tests for the Detection and S1 Genotyping of Infectious Bronchitis Virus and Other Closely Related Gammacoronaviruses Within Clinical Samples. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(5), 411–420. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01222.x>
- Lin, S. Y., & Chen, H. W. (2017). Infectious bronchitis virus variants: Molecular analysis and pathogenicity investigation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18102030>
- Listorti, V., Laconi, A., Catelli, E., Cecchinato, M., Lupini, C., & Naylor, C. J. (2017). Identification of IBV QX vaccine markers: Should vaccine acceptance by authorities require similar identifications for all live IBV vaccines? *Vaccine*, 35(42), 5531–5534. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.021>
- Loa, C. C., Wu, C. C., & Lin, T. L. (2016). A Multiplex Polymerase Chain Reaction for Differential Detection of Turkey Coronavirus from Chicken Infectious Bronchitis Virus and Bovine Coronavirus. In *Animal Coronaviruses* (pp. 131–138). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3414-0_12
- Maurel, S., Toquin, D., Briand, F. X., Quéguiner, M., Allée, C., Bertin, J., Ravillion, L., Retaux, C., Turblin, V., Morvan, H., & Etteradossi, N. (2011). First full-length sequences of the S gene of European isolates reveal further diversity among Turkey coronaviruses. *Avian Pathology*, 40(2), 179–189. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.551936>
- Meir, R., Maharat, O., Farnushi, Y., & Simanov, L. (2010). Development of a real-time TaqMan® RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus in chickens, and comparison of RT-PCR and virus isolation. *Journal of Virological Methods*, 163(2), 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.09.014>
- Milek, J., & Blicharz-Domańska, K. (2018). Coronaviruses in avian species-review with focus on epidemiology and diagnosis in wild birds. *Journal of Veterinary Research (Poland)*, 62(3), 249–255. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0035>

- Mo, J., Angelichio, M., Gow, L., Leathers, V., & Jackwood, M. W. (2020). Validation of specific quantitative real-time RT-PCR assay panel for Infectious Bronchitis using synthetic DNA standards and clinical specimens. *Journal of Virological Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113773>
- Nguyen, T. T., Kwon, H. J., Kim, I. H., Hong, S. M., Seong, W. J., Jang, J. W., & Kim, J. H. (2013). Multiplex nested RT-PCR for detecting avian influenza virus, infectious bronchitis virus and Newcastle disease virus. *Journal of Virological Methods*, 188(1–2), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.12.004>
- Roh, H.-J., Jordan, B. J., Hilt, D. A., & Jackwood, M. W. (2014). Detection of Infectious Bronchitis Virus with the Use of Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase–PCR and Correlation with Virus Detection in Embryonated Eggs. *Avian Diseases*, 58(3), 398–403. <https://doi.org/10.1637/10764-010914-reg.1>
- Sadri, N., Ghalyanchilangeroudi, A., Fallah Mehrabadi, M., Hosseini, H., Shayeganmehr, A., Sediqian, M., Jabbarifakhr, M., Hamdan, A., & Mousavi, F. (2019). *Genotyping of avian infectious bronchitis virus in Afghanistan (2016-2017): the first report* (Vol. 20, Issue 1).
- Sun, J., & Liu, S. (2016). An RT-PCR Assay for Detection of Infectious Bronchitis Coronavirus Serotypes. In *Animal Coronaviruses* (pp. 121–130). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3414-0_11
- Tucciarone, C. M., Franzo, G., Berto, G., Drigo, M., Ramon, G., Koutoulis, K. C., Catelli, E., & Cecchinato, M. (2018). Evaluation of 793/B-like and Mass-like vaccine strain kinetics in experimental and field conditions by real-Time RT-PCR quantification. *Poultry Science*, 97(1), 303–312. <https://doi.org/10.3382/ps/pex292>
- Wang, Z. X., Gao, S. M., Zheng, Q. W., Sun, M. H., Jia, W. X., & Ren, T. (2015). Epidemiology and Evolutionary Characteristics of Avian Infectious Bronchitis Virus in China. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 21(2), 179–186. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2014.11999>

8. Autoavaluació

Aquest Treball de Final de Grau bibliogràfic m'ha servit per aplicar tots els coneixements de recerca en bases de dades científiques, gestors bibliogràfics i citació d'articles apresos al llarg del grau de Biotecnologia, com també tots els coneixements específics del tema tractat com l'ús de tècniques de biologia molecular i de virologia.

No obstant, en primera instància havia de tractar-se d'un treball experimental basant en la meua estada de pràctiques al CESAC. L'objectiu havia de ser millorar el mètode RT-PCR usat per a la detecció d'IBV, ja que donades les característiques d'aquest virus, els resultats de la tècnica sovint eren inespecífics i calia repetir el test per validar el resultat obtingut. A causa de l'emergència sanitària pel COVID-19 es va adaptar el treball per fer-lo en modalitat bibliogràfica, aprofundint en les tècniques RT-PCR de detecció d'IBV usades per conèixer el seu estat actual i estudiar com es podria optimitzar la seva metodologia per aconseguir una eficaç detecció i diagnosi del virus, perquè amb la cancel·lació de les pràctiques semblava impossible dur a terme els experiments necessaris. Malgrat tot, l'estada sí que va ser suficient perquè aprengué més sobre les tècniques serològiques i de biologia molecular que hi duien a terme.

Més enllà dels objectius del treball en sí, pretenia que la realització del mateix fos una prova de tots els coneixements apresos al llarg dels cursos acadèmics del grau i alhora aprofundir en l'ús i l'aplicació d'una de les tècniques de biologia molecular més aplicades arreu.

Finalment, considero que confeccionar un treball d'aquestes característiques m'ha enriquit com a biotecnòleg i ha acabat de completar la meua formació. Per aquest motiu, estic satisfet de la feina realitzada i del resultat d'aquest Treball de Final de Grau.

9. Agraïments

En primer lloc, vull agrair a l'Àngela Blanco, Responsable del Departament de Virologia, Biologia Molecular i Serologia, la Mar Biarnés, Directora Tècnica i Responsable de Qualitat, i el Ramón Jové, Director de Programes, per donar-me l'oportunitat de realitzar una estada de pràctiques al CESAC, per guiar-me durant el treball i compartir amb mi tots els seus coneixements i consells.

En segon lloc, vull mostrar la meva gratitud a tots els membres del CESAC per fer-me sentir molt còmode en la meva estada com si fos un membre més del grup, acollir-me amb els braços oberts i sempre disposats a ajudar-me.

En tercer lloc, dono les gràcies a la Cristina Reguant per ser la meva tutora acadèmica, sempre donant-me la seva ajuda i suport per millorar aquest treball i donar-li el format idoni amb les seves indicacions i consells.

I en últim terme però no per això menys importat, agraeixo a tota la meva família i amics per ser sempre al meu costat per donar-me ànims per seguir endavant i completar aquest treball.