

DINÁMICA SEROLÓGICA DEL VIRUS DE BRONQUITIS INFECCIOSA EN UNA GRANJA DE POLLO DE ENGORDE DEL DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA

Álvarez DC¹, Usma JA², Jaime J³, Vera VJ⁴

¹ Grupo de Microbiología y Epidemiología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia.

RESUMEN

El virus de bronquitis infecciosa (IBV) causa una enfermedad altamente contagiosa, distribuida mundialmente, que conlleva graves pérdidas económicas. En algunas oportunidades se asocia con otras entidades como los virus de las enfermedades de Gumboro y de Newcastle, *Mycoplasma gallisepticum* y *Escherichia coli*. La alta variabilidad genética del virus ha generado una gran cantidad de cepas virales con diferentes cuadros clínicos. El objetivo del trabajo fue evaluar la dinámica de anticuerpos del IBV en aves vacunadas y no vacunadas contra IBV, alojadas en una explotación de pollo de engorde donde se detectó el agente por RT-PCR, en Fusagasugá, Colombia, y aves vacunadas en semiaislamiento en Bogotá. Para esto se organizaron 3 grupos de aves (Ross 308) de 1 día de edad (44 aves/grupo), las cuales fueron vacunadas con un virus vivo atenuado, cepa Massachusetts H120, y se evaluó la respuesta inmune a través de la prueba de Elisa. Desde el primer día hasta el día 24 de edad se observó una disminución progresiva de los títulos de anticuerpos en los tres grupos, aunque en las aves vacunadas y no vacunadas mantenidas en granja se observaron niveles de anticuerpos superiores al grupo en condiciones de semiaislamiento. A partir del día 28 en las aves alojadas en campo se incrementaron levemente los títulos hasta final de ciclo. El leve aumento en el nivel de anticuerpos puede ser consecuencia de exposición al virus vacunal que generó reversión de patogenicidad, persistencia viral o una exposición tardía al virus de campo.

Palabras clave: Cundinamarca, IBV, prueba de Elisa, serología.

SEROLOGIC DYNAMIC OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS IN A BROILER FLOCK IN CUNDINAMARCA

ABSTRACT

The infectious bronchitis virus (IBV) causes a highly contagious disease, spread worldwide, leading to serious economic losses. Sometimes the disease is associated with other entities such as infectious bursal disease virus, Newcastle disease virus, *Mycoplasma gallisepticum* and *Escherichia coli*. The highly genetic variability of the virus has generated a large number of viral strains with different clinical presentations. The objective was to assess the dynamics of the virus antibodies in birds vaccinated and not vaccinated against IBV, hosted

1 Álvarez DC: dcalvareze@unal.edu.co

2 Usma JA: jausmaa@unal.edu.co

3 Jaime J: jjaimec@unal.edu.co

4 Vera VJ.: vjveraa@unal.edu.co

on a broiler farm where the agent was detected by RT-PCR in Fusagasuga, Colombia and vaccinated birds in semi-isolation conditions in Bogotá. To order this, 3 groups of birds (Ross 308) from 1 day of age (44 birds/group), which were vaccinated with a live attenuated virus strain Massachusetts H120, and the immune response was evaluated through the Elisa test. Since day 24 of age the birds showed a progressive decrease in antibody titers in all three groups, although in the vaccinated and unvaccinated birds kept at the farm were found higher levels of antibodies in the group of semi-isolation. Starting at day 28 in the birds housed in field, the antibodies titles rose slightly until the end of cycle. The slight increase in the level of antibodies may result from exposure to the virus vaccine generated a reversal of pathogenic viral persistence or a late exposure to field virus.

Key words: Cundinamarca, Elisa test, IBV, serology.

INTRODUCCIÓN

El virus de bronquitis infecciosa (IBV) es causante de una enfermedad altamente contagiosa en las aves, que afecta con mayor frecuencia los sistemas respiratorio y urogenital de pollos de engorde durante todo el ciclo productivo. Los signos clínicos más importantes son la presencia de estertores traqueales, tos, estornudos y dificultad respiratoria, los cuales causan alta morbilidad y baja mortalidad, grandes pérdidas económicas debido a la pobre ganancia de peso y baja eficiencia alimenticia (1, 2, 3).

Los principales problemas originados por el IBV en el pollo de engorde son el síndrome de cabeza hinchada, la miopatía pectoral profunda y la contaminación de los sacos aéreos, lo que lleva al decomiso en plantas de beneficio. La mortalidad suele aparecer en aves jóvenes, como consecuencia de los graves problemas respiratorios. Algunos factores predisponentes para el desarrollo de la enfermedad son la presencia de agentes inmunosupresores como el virus de la enfermedad de Gumboro (IBDV), el virus de la enfermedad de Marek, así como las altas densidades poblacionales y las altas concentraciones de amoníaco. En forma crónica la enfermedad se encuentra asociada a otros agentes secundarios tanto virales como bacterianos, por ejemplo el virus de la enfermedad de Newcastle, *Mycoplasma gallisepticum*, y *Escherichia coli* en la en-

fermedad respiratoria crónica complicada (2, 3, 4).

La enfermedad es causada por un virus RNA envuelto, de cadena sencilla, genoma no segmentado y polaridad positiva. Perteneció al orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, género *Coronavirus* del grupo 3 (2, 3, 5). Posee 4 proteínas estructurales: la glicoproteína de espícula (S) la cual se subdivide en S1 y S2, la proteína de membrana (M), la proteína de la nucleocápside (N) y la proteína de envoltura (E). El virus se replica en el citoplasma, madura en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi y sale de la célula mediante un proceso de gemación (6, 7, 8).

Algunos de los serotipos reconocidos mundialmente son Massachusetts 41, Connecticut, Arkansas, entre otros. En Europa también se han aislado otros serotipos como D274, DI466, B1648, 793/B, 624/I (8). Las cepas variantes Holte, Gray y T australiana presentan gran tropismo por sistema renal, causando un síndrome de nefritis-nefrosis que suele generar mortalidades de hasta el 30% (9).

El diagnóstico de la enfermedad generalmente incluye seguimiento de la historia clínica, detección del antígeno a través de aislamiento viral, Elisa, aglutinación rápida en placa, inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa. La detección de anticuerpos se realiza a través de neutralización viral, Eli-

sa indirecto, inhibición de hemaglutinación, entre otros. La detección del genoma viral se realiza a través de RT-PCR y qRT-PCR. El diagnóstico específico del serotipo actuante es de vital importancia para la prevención y control de la enfermedad (10).

Elisa no presenta especificidad de cepa o de tipo, pero es adecuada para analizar respuestas de anticuerpos a la vacunación en condiciones de campo (13).

Es importante tener en cuenta la glicoproteína de espícula S1 ya que posee regiones hipervariables que ocasionan el surgimiento de nuevas cepas virales a nivel de campo (1, 2, 11). Las pruebas de diagnóstico basadas en técnicas moleculares (RT-PCR y la secuenciación de nucleótidos) se emplean para identificar y caracterizar las diferentes cepas del virus.

Para el control de la enfermedad se utilizan programas de inmunización con una vacuna al primer día de edad con cepas vivas atenuadas "suaves", seguida de revacunación con cepas "más fuertes", las cuales pueden ser muy eficaces. Es de gran importancia tener en cuenta el (los) serotipo(s) predominantes en ciertas zonas y el rango de protección de las vacunas a utilizar (12).

Con el propósito de contribuir al conocimiento del estado inmunológico de los pollos de engorde, el presente estudio evaluó la respuesta inmune a una vacuna contra IBV (virus vivo modificado, cepa Massachusetts), administrada el primer día de edad tanto en aves en condiciones de campo como en un grupo de aves en condiciones de aislamiento, procedentes del mismo lote de reproductoras, mediante el uso de una técnica de detección de anticuerpos tipo Elisa indirecta (FlockChek® Infectious Bronchitis Virus Antibody Test Kit (IDEXX Laboratory, Inc., Westbrook, ME)).

MATERIALES Y MÉTODOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO Y ZONA DE MUESTREO

El estudio se realizó en una granja de pollo de engorde con antecedentes de presencia del virus por la técnica de RT – PCR (13) y en una unidad de semiaislamiento. La granja está situada en el municipio de Fusagasugá (Cundinamarca) y la unidad de semiaislamiento en el edificio de investigaciones avícolas de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

De manera aleatoria se distribuyeron 132 aves de 1 día de edad, organizadas en 3 grupos de hembras y machos (44 aves por grupo), las cuales fueron alojadas en piso, bajo condiciones experimentales similares. El grupo 1 estuvo conformado por aves vacunadas contra IBV virus vivo atenuado, cepa Massachusetts H120 al primer día de edad por aspersión, las cuales fueron alojadas en la explotación avícola; grupo 2: aves centinelas sin vacunación contra IBV alojadas en la explotación avícola; grupo 3: aves vacunadas contra IBV virus vivo atenuado, cepa Massachusetts, mantenidas en condiciones de semiaislamiento con una temperatura promedio de 26 °C.

PLAN VACUNAL

El plan vacunal utilizado en todas las aves se describe en la tabla 1.

TOMA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se tomaron muestras de sangre cada cuatro días hasta el día 40. A cada una de las aves se le tomó una muestra de sangre por punción de la vena braquial en tubos sin anticoagulante. Las muestras se transportaron al laboratorio a una temperatura entre 2 y 7 °C, y se realizó una separación completa del suero por coagulación y centrifugación a 3.000 rpm durante 3 minutos, congelán-

Tabla 1. Plan vacunal aplicado a las aves.

| Vacuna | Día | Cepa | Vía |
|-------------------------|------|---------------------|------------|
| Enfermedad de Marek | 1 | HVT | Subcutánea |
| Enfermedad de Gumboro | 1 | Cepa Faragher 52/70 | Subcutánea |
| Viruela aviar | 1 | Cepa FTP-ATCC | Subcutánea |
| Enfermedad de Newcastle | 1 | ----- | Subcutánea |
| Bronquitis infecciosa | 1 | Massachusetts H120 | Aspersión |
| Enfermedad de Newcastle | 8-19 | LaSota | Ocular |

dose a una temperatura de -20 °C hasta su procesamiento.

ESTUDIO RETROSPECTIVO

Se realizó el análisis de los resultados de la prueba de Elisa para el virus de bronquitis infecciosa desde 2004 hasta 2006 en diferentes edades de la explotación avícola (14).

PRUEBA DE ELISA INDIRECTA

La presencia de anticuerpos específicos contra IBV en las muestras se determinó mediante la prueba de Elisa utilizando el estuche comercial FlockChek® Infectious Bronchitis Virus Antibody Test Kit (IDEXX Laboratory, Inc., Westbrook, ME), según recomendaciones del fabricante.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La seropositividad para IBV se determinó mediante el análisis del promedio geométrico (GMT por sus siglas en inglés) y el coeficiente de variación. Así mismo se determinó la asociación entre los grupos y los títulos de anticuerpos y la asociación entre los diferentes días de muestreo y los títulos de anticuerpos por medio del programa de análisis estadístico Statistix versión 1.0 (Analytical Software, USA).

RESULTADOS

Se encontró que los títulos de anticuerpos contra IBV en los tres grupos experimentales disminuyeron progresivamente hasta el día 20 de edad y posteriormente

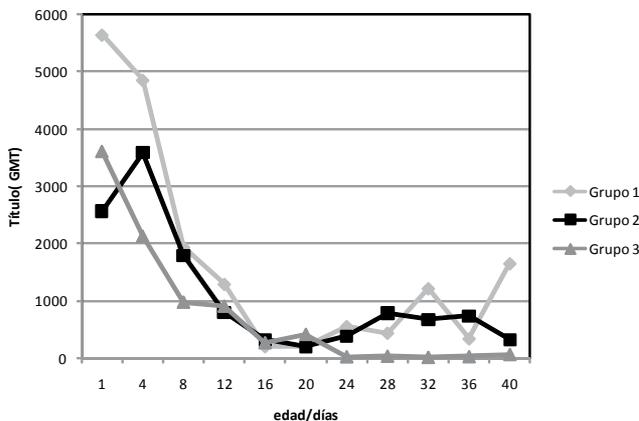


Figura 1. Resultados de los títulos de anticuerpos contra IBV obtenidos en los grupos experimentales desde el primer día hasta el día 40.

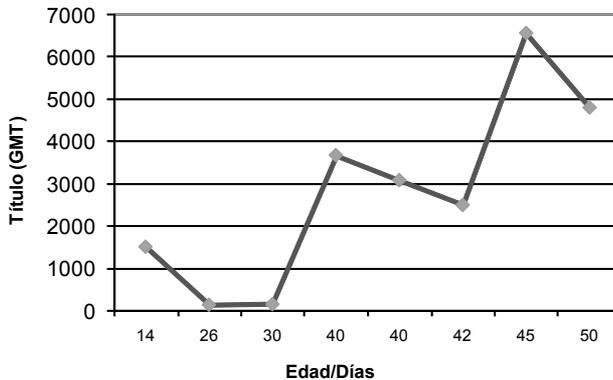


Figura 2. Títulos de anticuerpos contra IBV determinados a través de Elisa para diferentes lotes de la misma granja entre 2004 y 2006 (14).

mostraron un leve incremento a partir del día 28 hasta el día 40 (figura 1).

Al primer día de edad las aves presentaron GMT entre 2.566 y 5.650 y coeficiente de variación (CV%) entre 37 y 67%. En todos los grupos experimentales se encontró una disminución constante en los títulos de anticuerpos desde el primer día de edad hasta el día 20, alcanzando un GMT entre 204 y 417 y CV% entre 31 y 94%. Para el día 24 se observó un leve incremento de GMT, la cual fue de 554 en el grupo 1 y 381 en el grupo 2, hasta el día 40 en que se observó GMT de 1.653 en el grupo 1 y 323 en el grupo 2, con un CV% de 24,6% y 64,4% respectivamente. En el grupo tres, a partir del día 20 se observó una seronegatividad constante hasta el día 40. Se detectó diferencia estadística significativa entre los tres grupos ($p < 0,05$) y entre los días de muestreo ($p < 0,05$).

Por medio de un análisis retrospectivo se analizaron las serologías para IBV en lotes anteriores de pollo de engorde a final de ciclo; se observó un GMT entre 2.000 y 6.500 al final de ciclo (figura 2).

DISCUSIÓN

Los resultados observados con la prueba de Elisa al primer día de edad indican un adecuado paso de anticuerpos maternos

de las reproductoras pesadas a los pollitos debido a que presentaron títulos homogéneos con un GMT mayor de 3.000. Se encontró en los tres grupos experimentales un descenso en la curva de producción de anticuerpos del día 2 al día 16, lo cual se puede relacionar con el comportamiento normal del catabolismo de los anticuerpos maternos (15).

Los altos títulos de anticuerpos observados en los dos primeros muestreos (días 1 y 4) se relacionan con la inmunidad pasiva de las aves, lo cual puede interferir con la respuesta inmune del antígeno vacunal, llevando al marcado descenso en los títulos de anticuerpos entre los días 8 y 20 (12, 16, 17). Con relación al grupo 3, los títulos de anticuerpos observados demuestran el comportamiento de la respuesta inmune en ausencia de una exposición a agente viral de campo.

Desde el día 24 hasta el 40 se comenzó a evidenciar un leve incremento en los títulos de anticuerpos en los grupos 1 y 2, lo cual se puede relacionar con el comportamiento histórico de los anticuerpos en la granja al final del ciclo (40-45 días) (14). Es importante hacer énfasis en el posible contacto de las aves en la granja con el agente viral de campo o en la recirculación constante del antígeno vacunal (13, 18, 19, 20, 21), conllevando a la

persistencia del agente en los animales y al aumento de los títulos de anticuerpos (22), como se observó después del día 24. Matthijs *et al.* demostraron la alta capacidad que posee la vacuna viva contra el IBV H120 para diseminarse en los pollos de engorde; esto induce el probable establecimiento de la vacuna en forma endémica en la granja avícola o la persistencia del virus en las aves (19).

Los resultados observados en este estudio contrastan con los altos títulos de anticuerpos para IBV observados en los lotes anteriores (figura 2), así como con la identificación del agente viral por medio RT-PCR. Los hallazgos de esta investigación se pueden relacionar con el reciente cambio en la vacunación contra la enfermedad de Gumboro, en la cual se utilizaban tres vacunas a virus vivo atenuado, y se reemplazó por una vacuna recombinante, modificando de forma positiva la protección contra dicha entidad y disminuyendo la susceptibilidad de las aves a la presentación de IBV.

El inmunógeno recombinante es una vacuna viva contra la enfermedad de Gumboro y la enfermedad de Marek. La cepa de la vacuna es un *Herpesvirus* de pavo (HTV) recombinante, que expresa la proteína VP2 del virus de la enfermedad de Gumboro cepa Faragher 52/70 (23). Le Gross realizaron un estudio en campo, en el cual se confirmó la efectividad de la vacuna en aves de la estirpe Ross posterior a un desafío viral con una cepa del virus muy virulento del IBDV (24). Así mismo se han observado hallazgos similares con el uso de otras vacunas recombinantes usando el virus HVT en aves SPF (25). Otro aspecto importante es la capacidad de replicación que posee el vector HVT en presencia de anticuerpos maternos, la cual disminuye el impacto de estos contra la eficiencia de la vacuna (23).

El IBV se ha relacionado con inmunodeficiencia en las aves producida por la enfermedad de Gumboro y por la anemia

infecciosa aviar. Varios autores han evaluado los efectos de la inmunodeficiencia viral en la infección de IBV en pollos de engorde, y observaron que los signos clínicos y lesiones histopatológicas fueron mayores en las aves que se encontraban inmunosuprimidas por la enfermedad de Gumboro (26, 27).

La respuesta a la vacunación evidenciada en los tres grupos experimentales fue la esperada de acuerdo con el tipo de vacuna utilizada (12); se presentaron GMT menores de 5.000, lo cual generó hasta el día 12 altos títulos de anticuerpos de corta duración. Es de vital importancia la protección vacunal contra esta entidad, teniendo en cuenta aspectos como el tipo de vacuna utilizado, la edad de las aves a vacunar y el procedimiento (12).

Con base en los resultados del presente estudio, se puede concluir que, en las condiciones de esta granja, es recomendable la revacunación de las aves contra IBV al inicio del periodo de desprotección evidenciado (días 14-15), lo que puede generar una seroconversión media, incrementando los títulos de anticuerpos contra IBV y mejorando la protección contra la entidad hasta el final del ciclo.

Es importante verificar constantemente, a través de seguimiento serológico de la granja, la eficacia de las vacunas aplicadas, en especial si estas se han cambiado recientemente.

AGRADECIMIENTOS

A la empresa Pollo Andino y al Dr. Gustavo Granados por la oportunidad de trabajar en sus granjas y contribuir al desarrollo del proyecto; a la Dra. Martha Pulido y a todo el personal del edificio de investigaciones avícolas y del laboratorio de patología aviar de la Universidad Nacional de Colombia por prestar su colaboración y facilitar las instalaciones para el desarrollo del experimento.

REFERENCIAS

1. Cavanagh D, Naqi S. Infectious bronchitis. En: Saif Y, editor. *Diseases of Poultry*. 11ª ed. Iowa: Iowa State Press; 2003. p. 16-179.
2. Cavanagh D. Coronaviruses in poultry and others birds. *Avian pathol*. 2005; 34:439-48.
3. Ignjatovic J, Sapats S. Avian Infectious Bronchitis Virus. *Rev Sci Tech* 2000; 19(2):493-508.
4. Prince R, Potter L, Luginhbul R, Choamiak T. Effect of ventilation rate on the performance of chick inoculated with IBV. *Poult Sci*. 1962; 41:268-72.
5. Jones R. Bronquitis infecciosa, actualidad de un viejo problema. *Memorias XX Seminario Avícola Internacional*; abril 28-30, 1999, Bogotá, Colombia.
6. Huang Y, Lee H, Cheng M, Wang Ch. S1 and N gene analysis of avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. *Avian dis* 2004; 48:581-89.
7. Michael M, Holmes K. Coronaviridae: The viruses and their replication. En: Knipe D, ed. *Fields Virology*. 4ª ed.; 2001. p. 40-95.
8. Sapats S, Ashton F, Wright P, Ignjatovic J. Novel variation in the N protein of avian infectious bronchitis virus. *Virology* 1996; 226:416-419.
9. Chan RM. La bronquitis infecciosa de las aves y métodos de genética molecular usados en su diagnóstico. *Cienc Vet* 1994;6:9-10.
10. OIE. Bronquitis infecciosa aviar. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2004. [Acceso en noviembre de 2008]. Disponible en URL: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.7.06_Bronquitis_infecciosa_aviar.pdf
11. Kwon H, Jackwood W, Gelb J Jr. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian dis*. 1993; 37:194-202.
12. Smith J. Control de bronquitis infecciosa. *Plumazos* 2007; 31:4-18.
13. Álvarez D, Vera V. Evaluación prospectiva de la carga viral del virus de bronquitis infecciosa aviar en granjas de pollo de engorde con antecedentes de la enfermedad [tesis de maestría]. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.; 2009.
14. Pollo Andino S. A. Serologías para bronquitis infecciosa. Datos sin publicar. 2004 -2006.
15. De Herdt P, Ducatelle A, Uyttebroek E, Sneep A, Torbeyns R. Infectious Bronchitis Serology in broilers and broiler breeders: Correlations between antibody titers and performance in vaccinated flocks. *Avian dis*. 2001; 45:612-19.
16. Mondal S, Naqi S. Maternal antibody to infectious bronchitis virus: Its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. *Vet immun and immunopathol* 2008; 79:31-40.
17. Mockett A, Cook J, Huggins M. Maternally derived antibody to infectious bronchitis virus: Its detection in chick trachea and serum and its role in protection. *Avian pathol* 1987; 16:407-16.
18. Callison S, Hilt D, Boynton T, Sample B, Robinson R, Swayne D, Jackwood M. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *J of Virol Meth* 2006; 138:60-65.
19. Matthijs M, Bouma A, Velkers F, van Eck J, Stegeman J. Transmissibility of Infectious Bronchitis Virus H120 vaccine strain among broilers under experimental conditions. *Avian dis* 2008; 52:461-6.
20. Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res* 2007; 38:281-7.
21. McKinley E, Hilt D, Jackwood M. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. *Vaccine* 2008; 26:1274-84.
22. Naqi S, Gay K, Patalla P, Mondal S, Liu R. Establishment of persistent Avian Infectious Bronchitis Virus infection in antibody-free

- and antibody-positive chickens. *Avian dis* 2003; 47:594-601.
23. Merial. VAXXITEK HVT + IBD, Technical Marketing Manual. 2006.
 24. Le Grosa F, Dancera A, Giacomini C, Pizzoni L, Bublot M, Graziani M, Prandini F. Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. *Vaccine* 2009; 27: 592-6.
 25. Tsukamoto K, Saito S, Saeki S, Tanimura N, Isobe T, Mase M. Complete, longlasting protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by a single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing VP2 antigens. *J Virol* 2002; 76:5637-45.
 26. Toro H, van Sante V, Li L, Lockaby S, van Sante E, Hoerr F. Epidemiological and experimental evidence for immunodeficiency affecting avian infectious bronchitis. *Avian pathol* 2006; 35:455-64.
 27. Van Ginkel F, Van Santen V, Gulley S, Toro H. Infectious Bronchitis Virus in the chicken harderian gland and lachrymal fluids: Viral load, infectivity, immune cell response and effects of viral immunodeficiency. *Avian dis* 2008; 52:608-17.

Recibido 17-03-09 y aprobado 12-06-09