
Control serológico de la respuesta a la vacunación *in-ovo* mediante una vacuna por inmunocomplejos frente a IBD en broilers en 2012

C. GARCÍA¹, J.L. BALAGUER², J.M. SORIANO³ y P. CATALÁ-GREGORI^{1*}

¹Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana CECAV, Alquerías del Niño Perdido (Castellón); ²CEVA Animal Health, Barcelona; ³Área de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Burjasot (Valencia);

*direccion@cecav.es

La industria avícola necesita obtener la inmunización uniforme y consistente de los lotes de broilers frente a la Enfermedad de Gumboro (IBD), especialmente cuando se utiliza una única dosis en vacunación *in-ovo*. El objetivo de este estudio fue el control y representación en un mapa dinámico de la respuesta serológica tras una única vacunación *in-ovo* de broilers frente a IBD usando una vacuna de inmunocomplejos.

Durante el período de un año (2012) se analizaron un total de 7576 muestras de sueros de 354 explotaciones de broilers criados en España. Se tomaron 10 ó 15 muestras de suero al azar de manadas de 35 o más días de edad y se analizaron mediante un ELISA disponible comercialmente.

Se obtuvieron títulos de anticuerpos frente a IBD entre 4000 y 14000 en el 95.7% de los lotes, lo que parece mostrar una vacunación adecuada. La edad media de los animales fue de 43 días y el título medio fue de 6846, con un coeficiente de variación de 28.3%. Los datos se representaron en un mapa de España para incluir información geográfica de la ubicación de las explotaciones y para facilitar el seguimiento. No se informó de signos clínicos de IBD en los lotes estudiados.

Los datos de este estudio mostraron una vacunación adecuada frente IBD en manadas de broilers después de la vacunación *in-ovo* en una única dosis con una vacuna por inmunocomplejos, y una nueva herramienta para facilitar el monitoreo de la respuesta serológica, incluyendo información geográfica.

Palabras clave: Broiler; ELISA; Enfermedad de Gumboro; *In-ovo*; Vacuna de inmunocomplejos; Mapa seroprevalencia

Poultry industry needs to obtain uniform and consistent immunization of broiler flocks against Gumboro Disease (IBD), especially when using *in-ovo* single vaccination. The objective of this study was to control and represent in a dynamic map the serological response after *in-ovo* single vaccination in broilers against IBD using an immunocomplex vaccine.

During the period of one year (2012) a total of 7576 sera were analyzed from 354 farms of broilers raised in Spain. 10 or 15 samples were taken from broilers with 35 or more days and were analyzed using a commercially available ELISA. Antibody titers against IBD were between 4000 and 14000 in 95.7% of the flocks, which shows a proper vaccination. The average age of the animals was 43 days, and the mean titer was 6846 with a coefficient of variation of 28.3%. The data were plotted on a map of Spain to include geographic information of the location of farms and to facilitate monitoring. There were no reports of clinical signs of IBD in studied flocks. Data of this study showed a proper vaccination against IBD in broiler flocks after *in-ovo* single vaccination with an immunocomplex vaccine, and a new tool to facilitate the monitoring of the serological response, including geographical information.

Keywords:. Broiler; ELISA; Gumboro Disease; *In-ovo*; Immunocomplex vaccine; Seroprevalence map

Introducción

La enfermedad de Gumboro (IBD) es una infección viral aguda altamente contagiosa de las aves que tiene al tejido linfóide como objetivo primario con una especial predilección por la bolsa de Fabricio, y afecta principalmente a pollos (Catalá-Gregori y Mateo, 2011). El virus de IBD (IBDV) es miembro de la familia *Birnaviridae* y el género *Avibirnavirus* (Dobos et al, 1979; Müller et al, 1979).

IBDV es muy estable y resiste el tratamiento con una gran cantidad de desinfectantes (Benton et al, 1967b; Shirai et al, 1994). La naturaleza robusta de este virus justifica su supervivencia en las granjas, incluso cuando se siguen los procedimientos de limpieza y desinfección (Etteradossi y Saif, 2008).

Se transmite de forma directa entre las aves de la granja y de forma indirecta a través del agua, pienso, polvo, cama, material de la granja, ropa del personal, etc. (Benton *et al.*, 1967). El escarabajo de la cama (*Alphitobius diaperinus*) es capaz de actuar como reservorio del virus de IBD (Snedeker *et al.*, 1967). El virus de IBD también se ha aislado en mosquitos (*Aedes vexans*) (Howie y Thorsen, 1981).

Con el fin de prevenir la enfermedad en los pollos de engorde se puede utilizar vacunas vivas atenuadas convencionales en el agua potable, vacunas en vectores vía subcutánea o *in-ovo*, y vacunas de inmunocomplejos vía subcutánea o *in-ovo*.

La serología constituye un método de diagnóstico específico, sensible y de bajo costo para el control de la inmunización. Además, la información geográfica de la ubicación de la explotación es interesante debido a que IBDV es altamente contagioso y es útil para monitorizar la respuesta serológica a la vacuna en estudios a gran escala.

El objetivo de este trabajo consistió en monitorear y representar geográficamente con una nueva herramienta informática la respuesta serológica de los pollos de engorde criados en explotaciones de España a los que se les administró una vacuna de inmunocomplejos frente a IBD *in-ovo* en la incubadora.

Material y métodos

El estudio se realizó en explotaciones avícolas de broilers ubicadas en España, vacunadas con una única dosis de vacuna CEVAC® Transmune aplicada *in-ovo* el día 18 de incubación. Se evaluó la respuesta serológica en pollos de 35 o más días de edad.

Se recogieron muestras de sangre en tubos de vidrio de 5 ml (un tubo por animal) tomándose aproximadamente 3 ml de muestra en cada tubo. Los tubos se mantuvieron en posición horizontal a temperatura ambiente hasta la formación de coágulos, para ser posteriormente refrigerados hasta su llegada al laboratorio. Una vez en el laboratorio, las muestras se registraron utilizando el programa ORALIMS (Nobel Biocare AB, Gothenburg, Suecia), un programa basado en ORACLE. Cada lote de suero se le asigna un número de registro para mantener la trazabilidad en todo el proceso de análisis y evaluación de los resultados. Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos. Así, los glóbulos rojos se depositaron en la parte inferior del tubo y el suero en la parte superior. Se recogió alrededor de 250 μ l de cada suero en placas de fondo plano de 96 pocillos, que se identificaron con el número de registro correspondiente.

Para el análisis, se utilizó BioChek kit ELISA IBD, (BioChek, ER Reeuwijk, Países Bajos), que es un inmunoensayo comercial para detectar anticuerpos de IBD. Previo al análisis, se dejó atemperar los reactivos del kit (20-27°C) y luego, se agitaron suavemente por inversión y con movimiento circular. El primer paso consistió en el vertido de 100 \pm 2 μ L de control negativo no diluido en los pocillos A1 y B1, y 100 \pm 2 μ L de control positivo no diluido en los pocillos C1 y D1. Posteriormente, se vertieron 100 \pm 2 μ L de muestra diluida en los pocillos correspondientes. Se diluyó las muestras 1:500 (dilución intermedia 1:25, seguido de dilución en la placa tapizada de ELISA de 1:20) con el diluyente de muestras. Para preparar la dilución 1:25 se mezcló 10,0 \pm 0,2 μ L en 240 \pm 2 μ L de diluyente, posteriormente se tomó 5,0 \pm 0,1 μ L de la dilución 1:25 sobre 95 \pm 2 μ L de diluyente de las muestras en la placa de ELISA. Los controles no se diluyeron. Se cambiaron las puntas de las pipetas cada vez que se tomó una muestra. Se mezcló bien las muestras diluidas antes de agregarlas a la placa tapizada con antígeno. La placa se incubó durante 30 \pm 2 minutos a temperatura ambiente (21,5 \pm 3,5°C). Transcurrido este tiempo, se aspiró el contenido líquido de todos los pocillos y se lavó con 350 \pm 7 μ L de agua destilada o desionizada (repetir de 3 a 5 veces). Se aspiró completamente y se vertieron 100 \pm 2 μ L de conjugado a cada pocillo. Se incubó durante 30 \pm 2 minutos a temperatura ambiente (21,5 \pm 3,5°C). El lavado se repitió de 3 a 5 veces. Se vertió 100 \pm 2 μ L de la solución de reactivo sustrato en cada pocillo. Se incubó durante 15 \pm 1 minutos a temperatura ambiente (21,5 \pm 3,5°C). Se vertió 100 \pm 2 μ L de la solución de frenado en cada pocillo para terminar la reacción. Finalmente, se calibró el lector en blanco con aire y se midió los valores de absorbancia a 405 nm (A(405)). Consideramos el ensayo válido cuando la absorbancia media del control negativo estuvo por debajo de 0,3 y la diferencia entre la absorbancia media del control positivo y del control negativo (CPx-CNx) fue mayor de 0,15. La presencia o ausencia de anticuerpos frente al microorganismo se determina por medio de una relación entre el valor de A(405) de la muestras con la media del control positivo. El control positivo está normalizado y representa concentraciones significativas de anticuerpos antiviral en el suero. La concentración relativa de anticuerpos en la muestra se determina a través del cálculo del cociente de la absorbancia de la muestra con respecto a la del control positivo, M/P. Las muestras de suero que tengan cocientes M/P superiores o iguales a 0,2 contienen anticuerpos de IBD y deben considerarse positivas. La mejor manera de evaluar el estado inmunitario de un grupo de aves es mediante el control y el seguimiento de los títulos de anticuerpos en muestras representativas en función del tiempo. Los datos resultantes para el grupo permiten evaluar la distribución de los títulos de anticuerpos y analizar los cambios en el tiempo. En los casos de animales vacunados el coeficiente de variación debería ser menor o igual al 40%.

La herramienta informática desarrollada para este estudio constó de tres fases: recogida de datos, análisis de datos y la representación de los datos. Para la recolección de datos, los procesos de extracción, transformación y carga (ETL) permiten la obtención de datos de múltiples fuentes diferentes para cargar en una base de datos con el fin de ser analizados en otro sistema operativo. Por lo tanto, se integraron para este trabajo, Oracle y el software BioChek 2010.

Para el análisis de los datos, hemos desarrollado una aplicación informática denominada On-line Analytical Processing (OLAP), que permite el análisis dinámico y geográfico con cubos multidimensionales que contienen información de la respuesta serológica y la integración de los resultados de la IBD de este estudio. Un cubo es una base de datos multidimensional, en el que el almacenamiento físico de los datos se lleva a cabo en un vector multidimensional. Podemos considerar cubos OLAP como una extensión de las dos dimensiones de una hoja de cálculo, que pueden ser más de tres dimensiones, también denominados hipercubos. Finalmente, después de que se obtuvieron los datos mediante los procesos ETL y analizados, utilizando la herramienta de OLAP, el siguiente paso fue que la representación geográfica. Un sistema de información geográfica GIS (Geographic Information System, GIS) fue integrado con el servidor de código abierto llamado GeoServer. Esta herramienta genera información geográfica española, como las comunidades, provincias, regiones o ciudades. Los datos para cada muestra se asociaron a los códigos de identificación de cada unidad geográfica. Esta información está contenida en el REGA (Registro General de Explotaciones Ganaderas) para cada explotación, estableciendo así la relación entre GIS y OLAP. Por lo tanto, los datos se clasifican por zonas usando la identificación con colores.

Resultados y discusión

Se muestrearon animales de 35 días o más con una edad media de 43 días y una desviación estándar de 5. 10 ó 15 muestras de sangre fueron tomadas por lote, con un total de 7576 muestras de suero analizadas, de 603 lotes criados en 354 granjas. El título medio y el coeficiente medio de variación fueron 6846 y 28.3%, respectivamente.

Los títulos medios para la interpretación de broilers vacunados *in-ovo* con CEVAC® Transmune utilizando el kit ELISA BioChek IBD se refleja en la Tabla 1.

Tabla 1 Títulos de referencia de Biochek CEVAC ® TRANSMUNE IBD

Animales	Título medio	Interpretación	Color
Broilers \geq 35 días	<4000	Títulos por debajo de lo esperado para inmunización con CEVAC® TRANSMUNE. Posible deficiencia en la vacunación o retraso en la seroconversión	Amarillo
	4000-14000	Títulos esperados tras correcta inmunización con CEVAC® TRANSMUNE <i>in ovo</i>	Verde
	>14000	Posible desafío de campo	Rojo

La figura 1 muestra el título medio del ELISA frente a IBD según la edad de pollos de engorde. Estos resultados muestran una inmunización protectora entre 35 y 51 días de edad, con valores de títulos medios que oscilan entre 6331 y 7426. El coeficiente de variación medio (CV) fue de 28,3% en este periodo, lo que indica una inmunización elevada y uniforme. La ecuación de ajuste de la curva polinómica de los títulos medios fue: $y = -0.003x^6 + 0.2187x^5 - 6.1473x^4 + 84.257x^3 - 589.46x^2 - 1900.8x + 5130.1$; donde y es el título medio y x la edad de pollos de engorde en días; R^2 fue 0.7703.

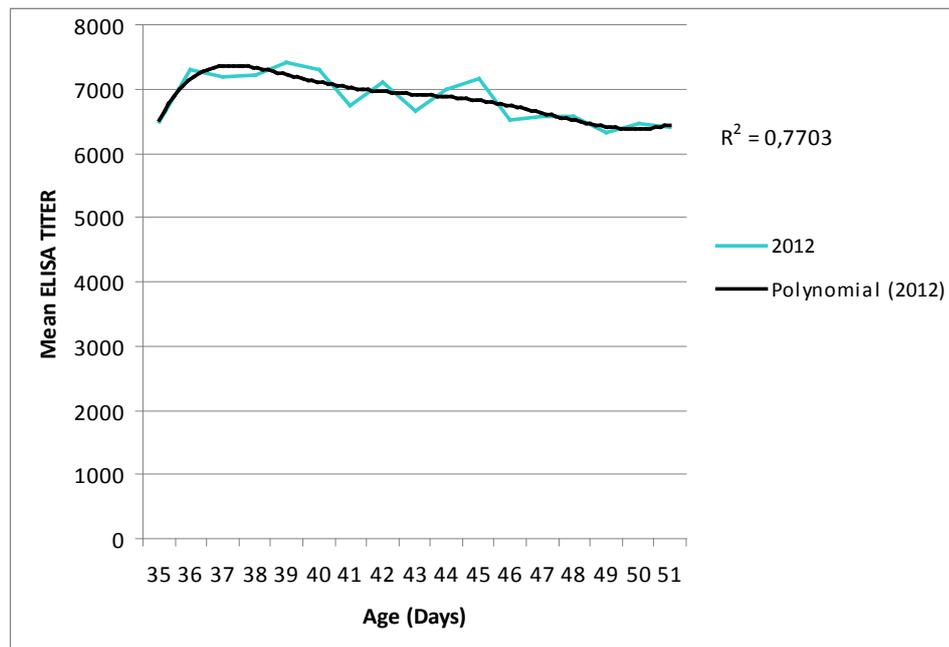


Figura 1 Media geométrica de los títulos de ELISA para broilers vacunados con una única dosis *in-ovo* con vacuna de inmunocomplejos para IBD durante el año 2012.

Los datos geográficos se representaron en un mapa de España (Figura 2), que representa gráficamente la seroprevalencia de anticuerpos contra el virus, teniendo en cuenta la distribución espacial y el conjunto de datos del período (año 2012).

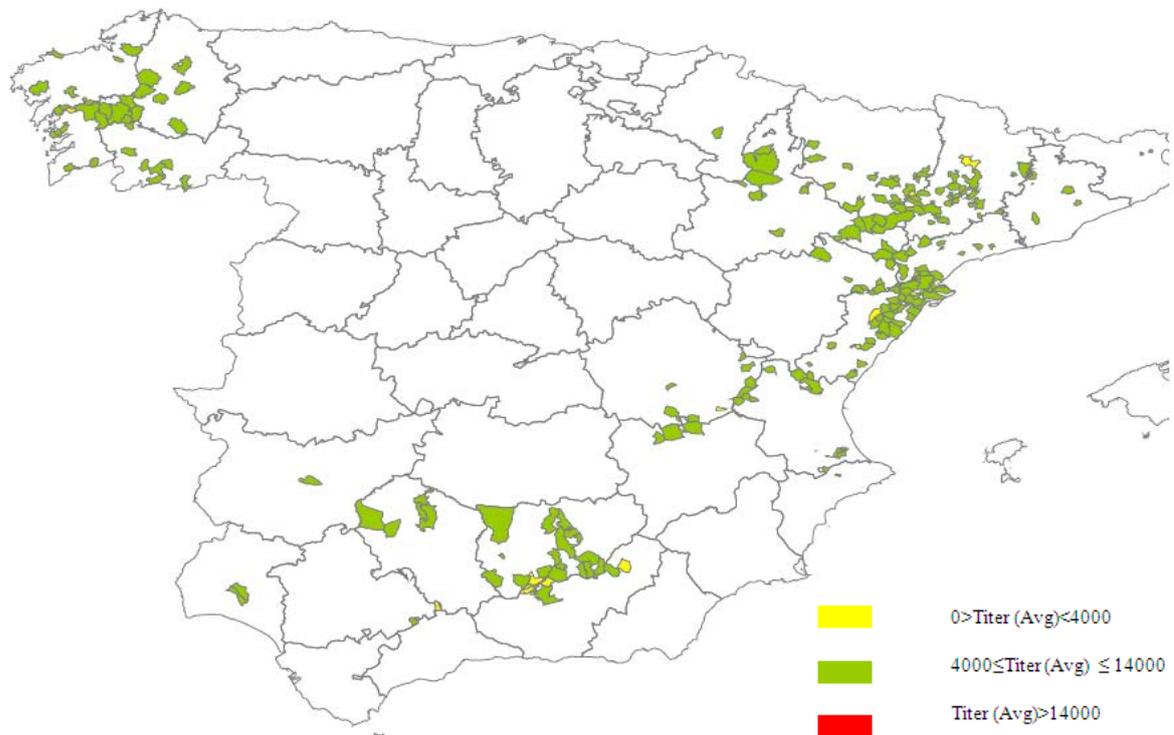


Figura 2 Mapa de seroprevalencia de IBD en España en broilers vacunados con una única dosis *in-ovo* con vacuna de inmunocomplejos para IBD durante el año 2012.

El amarillo representa las zonas con títulos medios menores de 4000. Las zonas verdes corresponden a títulos entre 4000 y 14000, lo que sugiere una vacunación de pollos de engorde adecuada con CEVAC® Transmune. Los títulos mayores de 14000 corresponden a la seroconversión, y aparecerían en color rojo.

La mayoría de las zonas están coloreadas en verde, mostrando que, en general, los títulos medios después de la vacunación son los esperados, en ausencia de signos clínicos. Los títulos menores a 4000 se obtuvieron en las siguientes regiones: Altorricón, Benalúa de las Villas, Catí, Costur, La Galera, Isona i Conca Dellà, Montillana, Noalejo, Valga y Villarta. Por lo tanto, la vacunación no se consideró adecuada en estas zonas. No se detectó seroconversión en este estudio. No se reportaron signos clínicos de IBD.

El seguimiento del manejo de la vacuna de forma adecuada en la incubadora y su administración eficiente a cada pollito con un día de edad o en huevos embrionados de pollo es crítico para obtener una inmunización consistente y uniforme, sobre todo cuando se utiliza una única dosis de vacuna para proteger contra una enfermedad específica durante la vida del ave. Este seguimiento serológico ayudó a evaluar la eficiencia en la administración en la incubadora en una única dosis de vacuna aplicada *in-ovo* basada en inmunocomplejos frente a IBD y confirmó la calidad de la administración de la misma (Balaguer *et al.*, 2013).

Los datos de este estudio mostraron una vacunación y protección adecuadas frente IBD en manadas de broilers después de la vacunación *in-ovo* en una única dosis con una vacuna por inmunocomplejos, y una nueva herramienta para facilitar el monitoreo de la respuesta serológica, incluyendo información geográfica.

Referencias

BALAGUER, J.L., SALES, R., GARCIA, C., TUDÓN, A.L., CATALÁ-GREGORI, P., LOZANO, F. y PANIAGO, M. (2013) Monitoring *in-ovo* Single Broiler Vaccination Against IBD with an Immune-Complex IBD Vaccine in Spain. 62nd Western Poultry Disease Conference. USA

BENTON, W.J., COVER M, S. y ROSENBERGER, J.K. (1967a) Studies on the transmission of the infectious bursal agent (IBA) of chickens. *Avian Dis.* **11**:430-438.

BENTON, W.J., COVER, M.S., ROSENBERGER, J.K. y LAKE, R.S. (1967b) Physicochemical properties of the infectious bursal agent (IBA). *Avian Dis.* **11**:438-445.

CATALÁ-GREGORI, P. y MATEO, D. (2011) Patología básica del broiler, en Curso Básico de Producción de broiler, CECAV.

DOBOS, P., HILL, B.J., HALLETT, R., KELLS, D.T., BECHT, H. y TENINGES, D. (1979) Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol.* **32**:593-605.

ETERRADOSSI, N. y SAIF, Y.M. (2008) Diseases of Poultry. 12 th edition. Chapter 7 Page 185-208.

HOWIE, R.I. y THORSEN, J. (1981) Identification of a strain of infectious bursal disease virus isolated from mosquitoes. *Can J Comp Med.* **45**:315-320.

MÜLLER, H.C., SCHOLTISSEK, C. y BECHT, H. (1979) Genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J Virol* **31**:584-589.

SHIRAI, J., SEKI, R., KAMIMURA, R. y MITSUBAYASHI, S. (1994) Effects of invert soap with 0.05% sodium hydroxide on infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* **38**:240-243.

MITSUBAYASHI, S. (1994) Effects of invert soap with 0.05% sodium hydroxide on infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* **38**:240-243.

SNEDEKER, C., WILLS, F.K. y MOULTHROP, I. M. (1967) Some studies on the infectious bursal agent. *Avian Dis* **11**: 519-528.