

Sensibilidad de dos kits ELISA en la monitorización de la respuesta humoral inducida tras la vacunación con una vacuna recombinante HVT-ILT (Innovax ILT®)

R. DOLZ¹, M. TRISTAN¹, L. CANELA¹, C. HERNÁNDEZ¹, P. ARANA² y M. ESCODA¹

¹MSD AH, Polígono Industrial El Montalvo I, C/ Zeppelin, 6 Parcela 38, 37008, Carbajosa de la Sagrada, Salamanca, España

²AQUIMISA, C/ Hoces del Duratón nº 30-34, Polígono Industrial “El Montalvo II”, 37008 Salamanca, España

email: roser.dolz@merck.com

El objetivo de este estudio fue determinar la dinámica de seroconversión frente al virus de laringotraqueítis infecciosa (ILTV), así como la sensibilidad de dos kits ELISA comerciales para la detección de anticuerpos frente a ILTV, tras la vacunación con una vacuna recombinante basada en el herpesvirus del pavo (HVT) como vector de dos genes del ILTV (Innovax ILT®). En el estudio se incluyeron un total de 9 lotes de aves vacunadas al día de vida con Innovax ILT®: 3 de gallinas ponedoras, 5 de gallinas reproductoras y 1 lote de pollos de crecimiento lento. A las 4, 8 y 12 semanas post vacunación (spv) (4, 6 y 8 spv en el caso de los pollos) se obtuvieron entre 15 y 20 muestras de sangre de cada uno de los lotes. Los títulos de anticuerpos frente a ILTV se obtuvieron mediante el uso de dos kits ELISA comerciales, un kit ELISA clásico tapizado con partículas víricas completas *Infectious Laryngotracheitis Antibody Detection kit* (Biochek) y un kit de nueva generación tapizado con proteína recombinante *gI IDVET-ID Screen ILT gI Indirect* (IDVET). En total se analizaron con ambos kits un total de 446 sueros, 113 de gallinas ponedoras, 273 de gallinas reproductoras pesadas y 60 de pollos de crecimiento lento. Del total de sueros analizados, el ELISA de IDVET detectó un mayor porcentaje de sueros positivos (77%) que el ELISA de Biochek (60%). Esta diferencia en la detección de muestras positivas entre ambos kits se observó en todas las edades muestreadas, pero fue mayor en los muestreos iniciales de 4 spv (34% vs 15%) y 8 spv (93% vs 72%) que en el muestreo final (93% vs 83%). Además, en todas las edades muestreadas, el ELISA de IDVET obtuvo mayores títulos medios y ratios S/P que el kit ELISA de Biochek. Al analizar la dinámica de seroconversión con el kit que mostró mayor sensibilidad (IDVET) se observó un inicio de la seroconversión a las 4 semanas (34% de los sueros muestreados positivos) y prácticamente la seroconversión completa de los lotes a las 8 semanas (93% de los sueros muestreados). Los títulos medios aumentaron progresivamente desde las 4 spv (778) hasta las 12 spv (3873), así como la ratio S/P (0,346 a las 4 spv hasta 1,595 a las 12 spv). No se observaron diferencias entre el tipo de ave, ponedoras y reproductoras, alcanzando prácticamente los mismos porcentajes de aves positivas a las 8 y 12 spv (91% frente a 92% a las 8 spv; 93% frente a 95% a las 12 spv). Así pues, el presente estudio muestra mayor eficacia del kit de ELISA tapizado con la proteína recombinante en la detección temprana de la seroconversión frente a ILTV tras la vacunación con una vacuna recombinante. Además, se demuestra una seroconversión inicial hacia las 4 spv que se completa alrededor de las 8 spv, con un porcentaje de positivos entre el 93-100% en cada lote, y títulos medios alrededor de 3000.

Palabras clave: Serología, ELISA, recombinante, HVT, ILT, vacuna

The objective of this study was to determine the seroconversion dynamics against Infectious Laryngotracheitis virus (ILTV) as well as the sensitivity of two commercial ELISA kits to detect ILTV antibodies after vaccination with a recombinant vaccine based on turkey herpesvirus vector (HVT) of two ILTV genes (Innovax ILT®). In this study a total of 9 flocks vaccinated at day of age with Innovax ILT® were included: 3 layer flocks, 5 broiler breeder flocks and 1 slow growth chicken flock. At 4, 8 and 12 weeks post vaccination (wpv) (4, 6 and 8 wpv in the case of chickens) 15 to 20 blood samples were obtained per flock. Antibody titers against ILTV were determined by the use of two commercial ELISA kits, a classical kit coated with whole viral particles *Infectious Laryngotracheitis Antibody Detection kit* (Biochek) and a new generation kit coated with recombinant protein gI *IDVET-ID Screen ILT gI Indirect* (IDVET). A total of 446 serum samples were analyzed with both kits, 113 samples from layers, 273 samples from broiler breeders and 60 samples from slow growth chickens. From the total of serum samples analyzed, IDVET ELISA kit detected a hisgher percentage of positive serum (77%) than Biochek ELISA kit (60%). This difference in the detection of positive samples between both kits was observed at all sampling times, but it was higher in the early samplings at 4 wpv (34% vs 15%) and 8wpv (93% vs 72%) than at the final sampling (93% vs 83%). In addition, at all sampled ages, the IDVET ELISA kit showed higher average titers and S/P ratios than the Biochek ELISA kit. When the seroconversion dynamics was analyzed with the ELISA kit that had shown higher sensitivity (IDVET), beginning of seroconversion was observed at 4 wpv (34% of serum sampled were positive) and almost complete seroconversion of flocks was observed at 8 wpv (93% of serum sampled were positive). Average titers increased progressively since 4 wpv (778) up to 12 wpv (3873), as well as the S/P ratio (0,346 at 4wpv to 1,595 at 12wpv). No differences were observed among type of bird, layers or broiler breeders, both reaching the same percentage of seropositive birds at 8 and 12 wpv (91% vs 92% at 8wpv; 93% vs 95% at 12 wpv). Therefore, the present study shows a higher efficacy of the ELISA kit coated with a recombinant protein in the early detection of seroconversion against ILTV after vaccination with a recombinant vaccine. Moreover, it is demonstrated that seroconversion starts at 4 wpv and is almost completed at 8 wpv, with a percentage of positive birds around 93-100% and average titer of approximately 3000.

Keywords: *Campylobacter*; prevalence; broiler farms; biosecurity

INTRODUCCIÓN

Los kits usados habitualmente en la serología frente al virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILTV) utilizan partículas víricas completas de ILT para tapizar las placas de ELISA. Teniendo en cuenta que tras la vacunación con vacunas recombinantes, únicamente se desarrollan anticuerpos frente a los genes insertados en el vector, es posible que estos kits sean menos eficaces a la hora de detectar la seroconversión, especialmente en las primeras semanas postvacunaicón. Algunos laboratorios han desarrollado en estos últimos años kits de ELISA tapizados con proteínas recombinantes en lugar de virus completos. En concreto, IDVET tiene un kit en el que únicamente se utiliza la glicoproteína I (gI) de ILT para tapizar las placas.

Innovax ILT® es una vacuna recombinante en la que dos genes de ILT (gI; gD) se han insertado en un virus vector de Marek HVT. La replicación del virus de Marek conlleva la expresión de los dos genes de ILT insertados en su genoma, y el desarrollo de respuesta inmune frente al virus de ILT.

El objetivo de este estudio fue determinar la dinámica de seroconversión frente al virus de laringotraqueítis infecciosa (ILTV), así como la sensibilidad de dos kits ELISA comerciales para la detección de anticuerpos frente a ILTV, tras la vacunación con una vacuna recombinante basada en el herpesvirus del pavo (HVT) como vector de dos genes del ILTV (Innovax ILT®).

MATERIAL Y MÉTODOS

En el estudio se incluyeron un total de 9 lotes de aves vacunadas al día de vida con Innovax ILT®: 3 de gallinas ponedoras, 5 de gallinas reproductoras y 1 lote de pollos de crecimiento lento. A las 4, 8 y 12 semanas post vacunación (spv) (4, 6 y 8 spv en el caso de los pollos) se obtuvieron entre 15 y 20 muestras de sangre de cada uno de los lotes.

Las muestras de sangre se remitieron a Aquimisa donde se realizó la serología. Los títulos de anticuerpos frente a ILTV se obtuvieron mediante el uso de dos kits ELISA comerciales, un kit ELISA clásico tapizado con partículas víricas completas *Infectious Laryngotracheitis Antibody Detection kit* (Biochek) y un kit de nueva generación tapizado con proteína recombinante gI *IDVET-ID Screen ILT gI Indirect* (IDVET). En ambos casos la determinación de anticuerpos se realizó siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

En total se analizaron con ambos kits un total de 446 sueros, 113 de gallinas ponedoras, 273 de gallinas reproductoras pesadas y 60 de pollos de crecimiento lento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sensibilidad entre los dos kits de ELISA comerciales

Del total de muestras testadas a las 4, 6, 8 y 12 spv, el kit de IDVET detectó un mayor porcentaje de muestras positivas (78%) que el kit de Biochek (61%). A pesar de que esta diferencia se observó en todos los tiempos muestreados, fue mayor en los muestreos iniciales, de las 4spv a las 8 spv (Figura 1). De la misma manera, el kit de IDVET obtuvo mayores títulos de anticuerpos y mayor ratio S/P en las mismas muestras de suero que el kit de Biochek (Figura 2). Al analizar la distribución de sueros por grupos de ELISA, se observó claramente que con el kit de IDVET, especialmente a las 8 y 12 spv, las muestras se situaban en grupos de títulos superiores en comparación con el kit de Biochek, lo cual correlaciona con los mayores títulos obtenidos con el kit de IDVET.

Así pues, el uso de un kit ELISA tapizado con la proteína recombinante insertada en la vacuna vectorizada, en este caso la gI, permite detectar de forma más precoz la seroconversión frente a ILTV tras la vacunación con la vacuna vectorizada y a su vez, detectar mayores títulos de anticuerpos. Por lo tanto, mediante el uso de este kit se obtiene una mejor monitorización de la vacunación con Innovax ILT®.

Dinámica de seroconversión tras la vacunación con Innovax ILT® al día de vida

Teniendo en cuenta que el kit de IDVET mostró una mejor detección de la seroconversión frente a ILTV tras la vacunación con Innovax ILT®, los resultados descritos a continuación son los obtenidos con el uso de éste kit.

A las 4 spv se detectó un inicio de la seroconversión frente a ILTV tras la vacunación con Innovax ILT®, pero aún en un porcentaje bajo de los sueros testados (34%). Sin embargo, a las 6-8 spv en la mayoría de los lotes testados se observó una seroconversión prácticamente completa de los lotes, siendo el porcentaje de seropositividad (93-95%) muy similar al observado posteriormente a las 12 spv (94%). Todos los lotes testados excepto uno, un lote de ponedoras, mostraron porcentajes de seroconversión a las 12 semanas superiores al 90% (entre el 92 y 100%).

Al comparar la dinámica de seroconversión entre los diferentes tipos de ave, reproductoras pesadas, ponedoras y pollos de crecimiento lento, se observaron diferencias en el primer muestreo a las 4 semanas, pero no en los muestreos posteriores ni en los porcentajes de seroconversión finales (Figura 3). A las 4 semanas, el mayor porcentaje de seroconversión se observó en los pollos de crecimiento lento (75%), seguido de las ponedoras (40%) y de las reproductoras pesadas (23%). Por el contrario, a las 8 spv los porcentajes de seroconversión eran prácticamente iguales entre los tres tipos de aves: 95% en pollos de crecimiento lento, 91% en ponedoras y 92% en reproductoras pesadas. Teniendo en cuenta que las reproductoras pesadas en muchos casos se vacunan también al día de vida con doble dosis de Rispens, estos resultados indican que no existe una interacción entre ambas vacunas aunque se administre doble dosis de Rispens.

Respecto a los títulos obtenidos, se observa un incremento del título medio y de la media geométrica a las distintas semanas post vacunación. Así, a las 4 spv el título medio obtenido fue de alrededor de 700, que aumentó a 2800 aproximadamente entre las 6 y 8 spv. y alcanzó finalmente valores de 3800 a las 12 spv.

Por lo tanto, tras la vacunación al día de vida con la vacuna recombinante HVT-ILT Innovax ILT®, se inicia la seroconversión hacia las 4spv y prácticamente entre las 6 y 8 spv esta seroconversión es completa, alcanzando más del 90% de seropositividad en los lotes y un título medio de 3800 aproximadamente. Los resultados obtenidos indican que no existen diferencias en los porcentaje finales de seroconversión obtenidos entre los diferentes tipos de ave vacunados (reproductoras pesadas, ponedoras y pollos de crecimiento lento).

Figura 1. Comparación del porcentaje de seropositividad frente a ILTV a distintas semanas tras la vacunación con Innovax ILT® al día de vida, obtenido con los kits de ELISA de IDVET y Biochek.

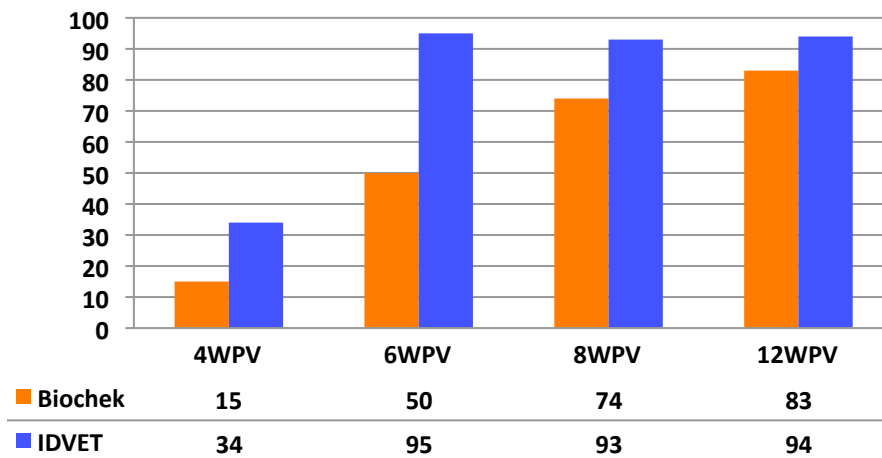


Figura 2. Comparación del título medio y media geométrica obtenido con los kits de ELISA de IDVET y Biochek a distintas semanas tras la vacunación con Innovax ILT® al día de vida.

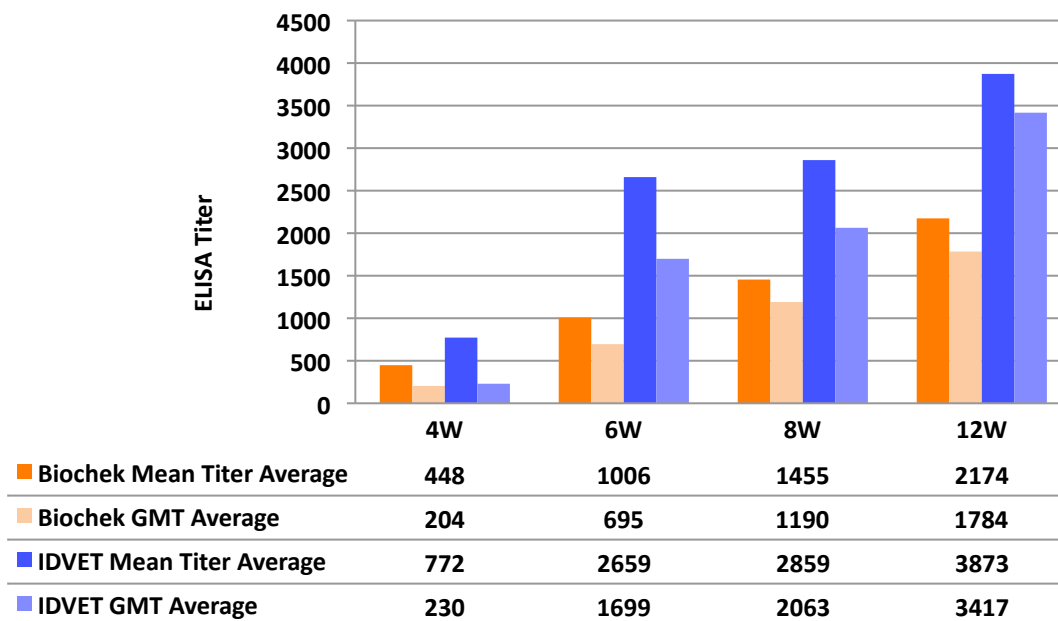


Figura 3. Comparación del porcentaje de seroconversión obtenido con un kit ELISA de IDVET en diferentes tipos de ave, reproductoras pesadas, ponedoras y pollos de crecimiento lento, vacunados al día de vida con Innovax ILT®.

