

# Control serológico de la respuesta a la vacunación *in-ovo* mediante vacunas por inmunocomplejos frente a IBD en broilers durante 2009, 2010 y 2011.

J.L. BALAGUER<sup>1</sup>, R. SALES<sup>1</sup>, C. GARCÍA<sup>2</sup>, A. L. TUDÓN<sup>2</sup> y P. CATALÁ-GREGORI<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>CEVA Animal Health, Barcelona; <sup>2</sup>Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana CECAV, Alquerías del Niño Perdido (Castellón); \*[direccion@cecav.es](mailto:direccion@cecav.es)

---

La bursitis infecciosa o enfermedad de Gumboro (IBD) está causada por un virus del género *Avibirnavirus*, de la familia *Birnaviridae*. IBD es una enfermedad aguda y altamente contagiosa en aves jóvenes que tiene el tejido linfoide como órgano diana, con una especial predilección por la bolsa de Fabricio. La importancia económica de esta enfermedad se manifiesta de dos maneras. Primero, puede llegar a causar un 20% de mortalidad en pollos de 3 semanas de vida. Segundo, y quizá más importante, provoca una inmunosupresión prolongada de los pollos infectados a edades tempranas.

Hay reconocidos dos serotipos del IBD. Se denominan serotipos 1 y 2. El serotipo 1 es el único que se asocia con la enfermedad clínica y contra el que se han preparado vacunas. En España, en numerosos casos clínicos se han detectado variantes muy virulentas, denominadas vvIBD.

La vacunación frente a IBD en broilers en España es frecuente, contando con vacunas vivas, vectoriales y por inmunocomplejos.

Una herramienta diagnóstica útil, sencilla y económica para evaluar la respuesta a la vacunación frente a IBD es la serología. El ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) es una de las más utilizadas para este fin.

En este trabajo se controlaron serológicamente explotaciones de broilers vacunados *in-ovo* mediante vacunas por inmunocomplejos, durante los años 2009, 2010 y 2011. De media, se analizaron entre 13 y 15 muestras de sangre por explotación con edades superiores o iguales a 35 días. En el periodo contemplado en este estudio (3 años) se analizaron un total de 20610 muestras (4028 en 2009, 6371 en 2010 y 10211 en 2011). Para la determinación del título de anticuerpos frente a IBD se empleó el kit ELISA de Biochek.

Los resultados indican que los valores obtenidos fueron, en general, los esperados tras la vacunación. El título medio y coeficiente de variación medio fue de 6744 y 58,24% en 2009, 6947 y 48,55% en 2010 y de 6621 y 39,83% en 2011. El control serológico se mostró como una herramienta necesaria para el control de la correcta aplicación de la vacuna y de la efectividad de la misma.

---

**Palabras clave:** broiler; ELISA; enfermedad de Gumboro (IBD); Vacunación *in-ovo*; Inmunocomplejos.

---

Infectious bursal disease or Gumboro disease (IBD) is caused by a virus of the genus *Avibirnavirus*, *Birnaviridae* family. IBD is an acute, highly contagious disease in young birds that have lymphoid tissue as target organ, with a predilection for the bursa. The economic importance of this disease is manifested in two ways. First, it can cause a 20% mortality in chicks of 3 weeks old. Second, and perhaps more significant, causes prolonged immunosuppression of chickens infected at an early age.

There are two recognized serotypes of IBD. They are called serotypes 1 and 2. Serotype 1 is the only one that is associated with clinical disease and against which vaccines have been prepared. In Spain, in many clinical cases have been detected very virulent variants, called vvIBD. Vaccination against IBD in broilers in Spain is frequent, with live, vector and immune complexes vaccines.

A useful diagnostic tool, easy and inexpensive to evaluate the response to vaccination against IBD is serology. The ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) is one of the most used for this purpose.

In this study, *in-ovo* immune complex vaccinated broiler farms during the years 2009, 2010 and 2011 were serologically monitored. On average, between 13 and 15 blood samples were analyzed from animals aged greater than or equal to 35 days. In the period covered by this study (3 years) a total of 20610 samples (4028 in 2009, 6371 in 2010 and 10211 in 2011) were analyzed. Biochek ELISA kit was used for determination of antibody titre against IBD.

The results indicate that the values obtained were generally the expected values after vaccination. The title mean and coefficient of variation was 58.24% and 6744 in 2009, 6947 and 48.55% in 2010 and 39.83% and 6621 in 2011. The serological testing was found to be a necessary tool for checking the correct application of the vaccine and its effectiveness.

---

**Keywords:** broiler; ELISA; Gumboro disease (IBD); *in-ovo* vaccination; Inmuno-complex.

## Introducción

La enfermedad de Gumboro (IBD) es una infección viral aguda altamente contagiosa de las aves que tiene al tejido linfoide como su objetivo primario con una especial predilección por la bolsa de Fabricio, y afecta especialmente a los pollos. Los primeros brotes ocurrieron en el área de Gumboro (Delaware, EE.UU.), de modo que en 1966 llegó a ser conocido como la enfermedad de Gumboro.

El virus de IBD (IBDV) es un miembro de la familia *Birnaviridae* y el género *Avibirnavirus* (Dobos *et al.*, 1979; Müller *et al.*, 1979). Su genoma consta de dos segmentos de ARN de doble cadena (MacDonald *et al.*, 1980; Müller *et al.*, 1979, Steger *et al.*, 1980), designados A y B. McFerran *et al.* (1980) fueron los primeros en informar variaciones antigénicas entre IBDV, designados serotipo 1 y serotipo 2. El serotipo 1 es patógeno y el serotipo 2 no es virulento. El serotipo 1 es específico de los pollos, el serotipo 2 es común tanto en pollos como en pavos (Jackwood *et al.*, 1983; Kibenge *et al.*, 1988.). En España, en numerosos casos clínicos se han detectado variantes muy virulentas, denominadas vvIBD.

En relación a la sintomatología, patogenia, lesiones, diagnóstico y tratamiento, Catalá-Gregori y Mateo (2011) señalan que el periodo de mayor susceptibilidad a la enfermedad clínica es entre la semana 3 y 6 de vida. Antes de las 3 semanas no se presentan síntomas clínicos, pero la presentación subclínica tiene una gran importancia económica debido a la inmunodepresión.

El mecanismo de acción patogénica del virus no está claro, y se han propuesto algunos como la formación complejos inmunes que causan hemorragias y coagulopatías de la sangre.

Los primeros síntomas aparecen a los 2-3 días tras la infección. Se describen síntomas como plumas sucias, diarrea acuosa, anorexia, deshidratación, depresión, plumas erizadas, temblores, postración, y finalmente, la muerte. Se presenta deshidratación, coloración oscura de la pechuga, hemorragias en muslo y pechuga.

Se producen alteraciones secuenciales de la Bolsa de Fabricio. En relación al tamaño y peso, al tercer día post-infección, la bolsa empieza a aumentar de tamaño a causa del edema y de la hiperemia. El día 4 ya tiene un peso que duplica al normal. El quinto día la Bolsa vuelve a su peso normal, y partir del octavo día pesa aproximadamente un tercio o menos de su peso normal. En relación al aspecto de la serosa, a día 2 y 3 post-infección presenta un exudado gelatinoso amarillento que desaparece a medida que la bolsa retoma su tamaño normal. Los pliegues se hacen más prominentes y el color blanco de la bolsa pasa a ser cremoso. Las bolsas presentan focos de necrosis y petequias y equimosis en la superficie de la mucosa.

En el caso de las cepas vvIBD, se presenta una mayor disminución del peso del timo y más lesiones en las tonsilas cecales, timo, bazo y médula ósea.

A nivel microscópico, ya al primer día post-infección existe degeneración y necrosis de los linfocitos en la zona medular de los folículos. En el tercer o cuarto día, todos los folículos están afectados. El aumento de tamaño de la bolsa se corresponde histológicamente con edema, hiperemia y acumulación de heterófilos. Son características las cavidades quísticas en la zona medular de los folículos una vez que la reacción inflamatoria disminuye.

El diagnóstico se basará en la sintomatología, lesiones macroscópicas de la bolsa de Fabricio y técnicas laboratoriales como ELISA y PCR. Las muestras de elección para la biología molecular serán las bolsas de Fabricio. El examen histológico de las bolsas de Fabricio en el estudio de la anatomía patológica es de gran utilidad para apoyar el diagnóstico.

No hay tratamiento. Se recomiendan medidas de bioseguridad y como medida preventiva es común la vacunación con vacunas (vivas, vectoriales y por inmunocomplejos) en los pollos, y la vacunación de los progenitores en aras de obtener una buena inmunidad materna hasta las 3 semanas de vida de la descendencia.

Según González y Balaguer (2011), uno de los mayores cambios sufridos en el organigrama de producción avícola en los últimos años en el mundo es la evolución y el protagonismo que han adquirido los programas de vacunación en la planta de incubación. La vacunación vía subcutánea o *in-ovo* en la planta está cada vez más generalizada, y en el caso de la prevención frente a IBD, aproximadamente el 30% de los broilers vacunados frente a esta enfermedad en España en 2011 se vacunaron en sala de incubación.

Una forma de controlar la correcta vacunación frente a IBD en la sala de incubación es la serología a gran escala. Así, en este trabajo se estudió los datos de respuesta serológica en granja frente a IBD en animales vacunados en sala de incubación.

## Material y métodos

El estudio se realizó en explotaciones avícolas de broilers ubicadas en España, vacunadas con la vacuna CEVAC® Transmune aplicada *in-ovo* el día 18 de incubación. A estas manadas no se les aplicó en campo ninguna vacuna frente a IBD.

De media, se analizaron entre 13 y 15 muestras de sangre por explotación con edades superiores o iguales a 35 días. En el periodo contemplado en este estudio (3 años) se analizaron un total de 20610 muestras (4028 en 2009, 6371 en 2010 y 10211 en 2011).

Se realizó una punción con una aguja o bisturí en la vena braquial, recogiendo la sangre en un tubo de vidrio de 5 mL con tapón a presión (un tubo por animal) hasta conseguir aproximadamente 3 mL de muestra. Los tubos se mantuvieron horizontales y a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo, para ser posteriormente refrigerados hasta su llegada al laboratorio.

Para la determinación del título de anticuerpos frente a IBD se empleó el kit ELISA de Biochek, un ensayo inmunoenzimático diseñado para la detección de anticuerpos frente a IBDV en sueros. Previo al análisis, se dejó atemperar los reactivos del kit (22-27°C) y luego, se agitaron suavemente. Los controles no se diluyeron. Se cambiaron las puntas de las pipetas cada vez que se tomó una muestra. El primer paso consistió en el vertido de 100µL de control negativo no diluido en los pocillos A1 y B1, y 100µL de control positivo no diluido en los pocillos C1 y D1. Posteriormente, se vertieron 100µL de muestra diluida 1/500 en los pocillos correspondientes. Para ello, se realizó una dilución intermedia 1/50 en placa de fondo plano sin tapizar (5 µL de suero en 245 µL de diluyente) seguida de una dilución 1/10 en placa tapizada con antígeno de IBD (10 µL de la dilución 1/50 en 90 µL de diluyente). La placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente (22-27°C). Transcurrido este tiempo, se aspiró el contenido líquido de todos los pocillos y se lavó 4 veces con 350 µL/pocillo de tampón de lavado. Se aspiró completamente y se vertieron 100 µL/pocillo de conjugado (anticuerpo de anti-gallina: Alcalino-fosfatasa en tampón Tris con estabilizadores proteicos, rojo disperso (red dye) inerte y azida de sodio como conservante (0.1% p/v)). Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente (22-27°C). Se repitió el lavado 4 veces. Se vertió 100µL/pocillo de la solución de sustrato PNPP (p-nitrofenilfosfato disuelto en tampón de dietanolamina con cofactores enzimáticos). Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente (22-27°C). Se vertió 100

$\mu\text{L}$ /pocillo de la solución de parada (hidróxido sódico en tampón de dietanolamina) para terminar la reacción. Finalmente, se calibró el lector en blanco con aire y se midió los valores de absorbancia a 405 nm.

El tratamiento descriptivo y representación gráfica de los datos se realizó mediante el programa Microsoft Excel 2007.

## Resultados y discusión

La monitorización de la respuesta humoral frente a IBD en las explotaciones de broilers constituye una herramienta de control clave para los servicios técnicos veterinarios.

Los resultados indican que los valores obtenidos fueron, en general, los esperados tras la vacunación. El título medio y coeficiente de variación medio fue de 6744 y 58,24% en 2009, 6947 y 48,55% en 2010 y de 6621 y 39,83% en 2011 (Fig.1 y 3).

El título medio durante los 3 años de seguimiento fue similar en los periodos analizados, y el esperado como protector según el fabricante. Cabe destacar que el coeficiente de variación medio disminuyó desde el 58,24% en 2009 hasta el 39,83% en 2011, quizá originado en una mayor homogeneidad y mejora de la aplicación de la vacuna en las salas de incubación. Así mismo, el coeficiente de variación medio analizado por edad, tiende a disminuir desde los 35d hasta los 53d, llegando a valores por debajo del 40% en 2011 desde los 38d, en prácticamente todas las edades (Fig. 2). Al analizar el título medio frente a IBD según la edad, vemos como a lo largo del estudio, se obtienen valores elevados y persistentes de inmunidad, entre los 35 y los 53d de vida (Fig. 4).

Estos resultados están en consonancia con el estudio de Balaguer *et al.* (2007).

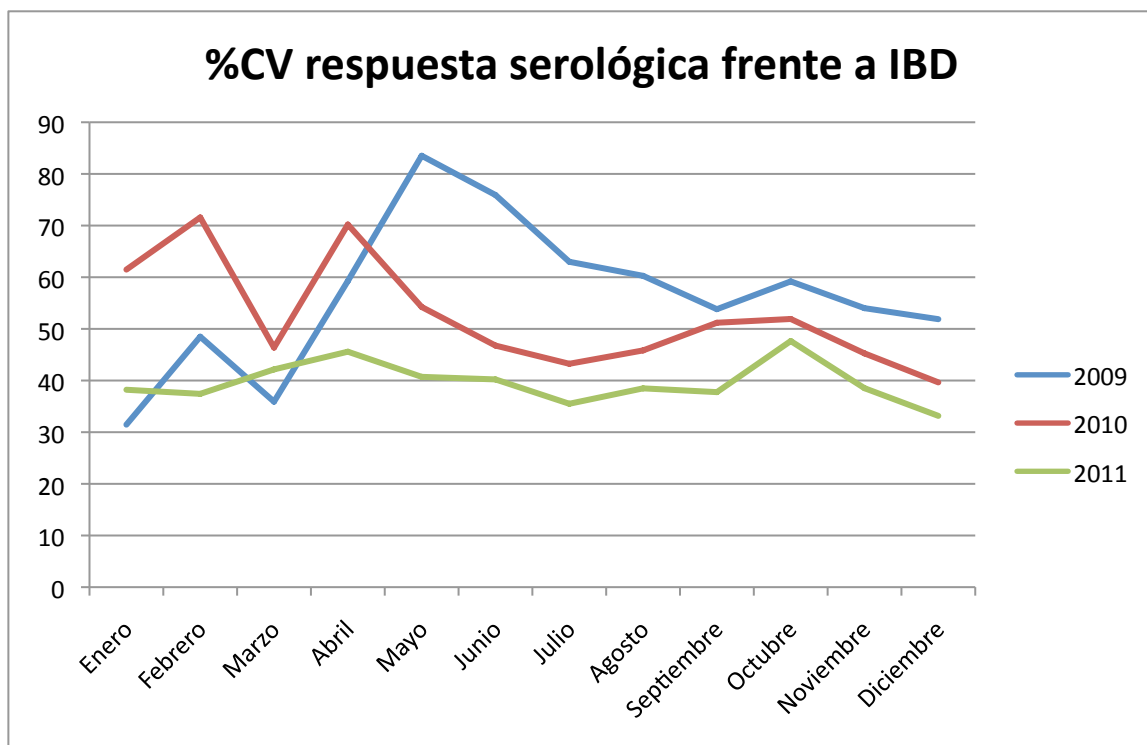


Figura 1. Evolución del % de coeficiente de variación en la respuesta serológica frente a IBD en 2009, 2010 y 2011.

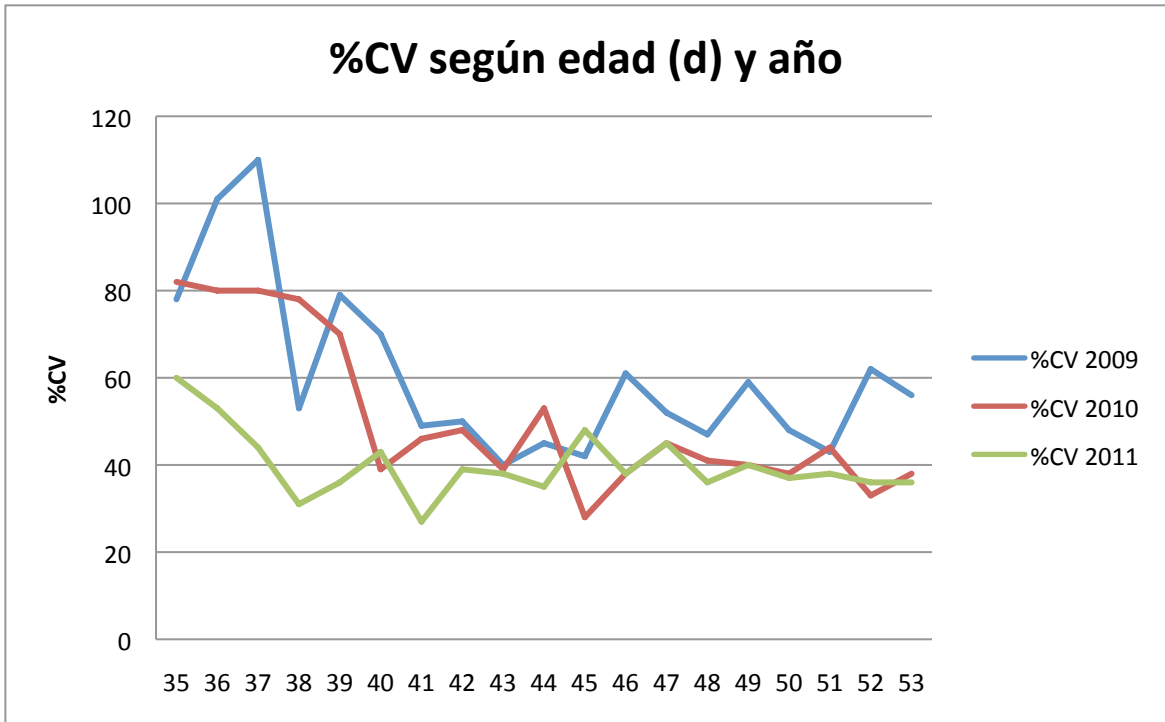


Figura 2. Evolución de % de coeficiente de variación en la respuesta serológica frente a IBD en 2009, 2010 y 2011, según la edad en días.

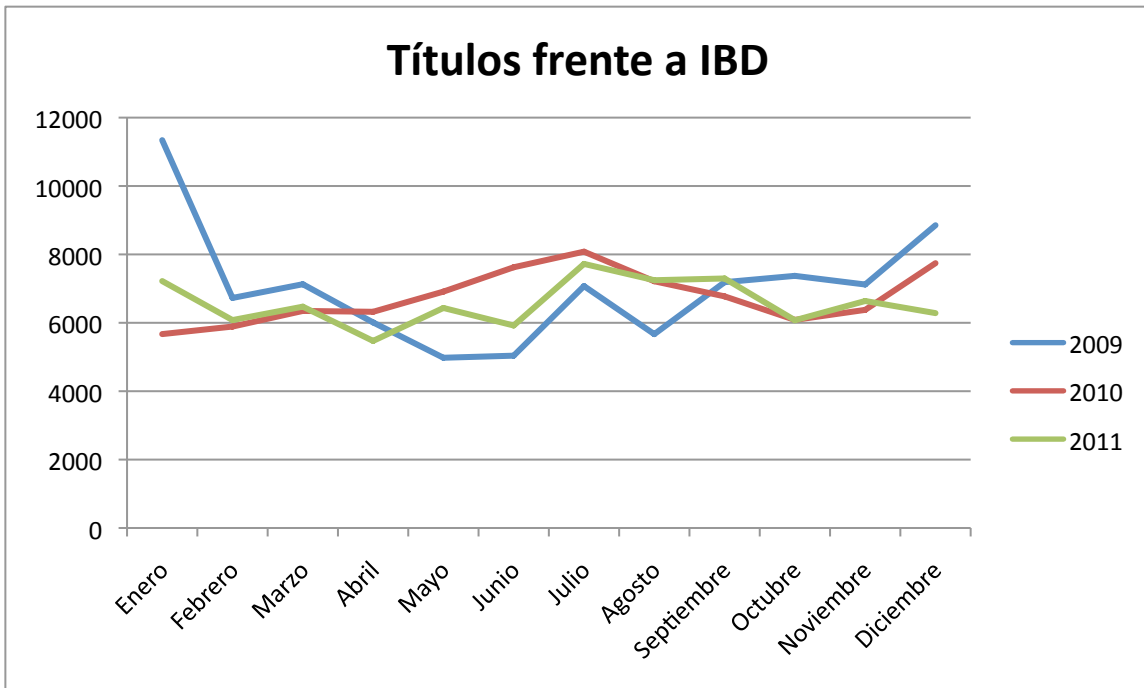
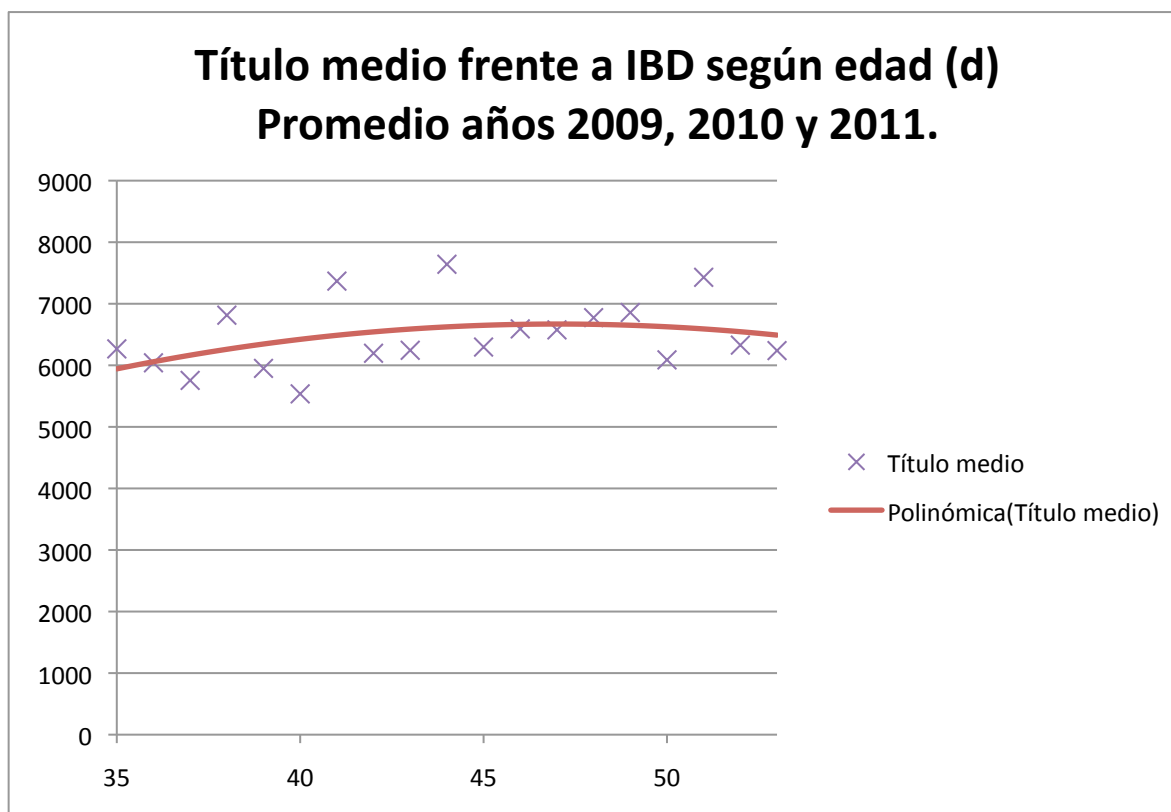


Figura 3. Evolución de los títulos serológicos frente a IBD en 2009, 2010 y 2011.



**Figura 4. Evolución de los títulos serológicos frente a IBD en 2009, 2010 y 2011, según la edad en días.**

El control serológico se mostró como una herramienta necesaria para el control de la correcta aplicación de la vacuna y de la efectividad de la misma.

Podemos concluir que los resultados serológicos indican que CEVAC® Transmune, aplicada *in-ovo*, indujo una inmunidad elevada, homogénea y persistente, en el periodo analizado.

Estos hallazgos remarcan la importancia de monitorizar la eficacia de la vacunación frente a IBD. La serología es una herramienta económica y efectiva, siendo su empleo de manera regular útil para monitorizar la respuesta inmune y construir una línea base para cada integración. De esta manera las desviaciones de esta línea base pueden sugerir cambios de tendencia (infecciones de campo, errores en la vacunación,...) que nos permitirían implementar las correspondientes medidas correctoras.

## Referencias

**BALAGUER J.L., ROMEO F., CEPERO R., LARA C., MARTINO A., RUBIO J.M., GARDIN Y., WARIN S., PALYA V., y COMTE S.** (2007). Empleo de una nueva vacuna de tipo complejo inmune frente a la enfermedad de Gumboro: Resultados de campo. XLIV Symposium científico de WPSA-AECA, Valencia.

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

**GONZÁLEZ C. y BALAGUER J.L.** (2011) BIOSEGURIDAD EN LA SALA DE INCUBACIÓN. *Selecciones Avícolas*, **Marzo 2011**:7-11.

**JACKWOOD D.J. y SAIF Y.M.** (1983) Prevalence of antibodies to infectious bursal disease virus serotypes I and II in 75 Ohio chicken flocks. *Avian Dis.* **27**:850-854.

- KIBENGE F.S., DHILLON A.S. y RUSSELL R.G.** (1988) Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol.* **69**:1757-1775.
- MACDONALD R.D.** (1980) Immunofluorescent detection of double-stranded RNA in cells infected with reovirus, infectious pancreatic necrosis virus, and infectious bursal disease virus. *Can J Microbiol.* **26**:256-261.
- MCFERRAN J.B., MCNULTY M.S., MCKILLOP E.R., CONNOR T.J., MCCRACKEN R.M., COLLINS D.S. y ALLAN G.M.** (1980) Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. *Avian Pathol.* **9**:395-404.
- MÜLLER H., SCHOLTISSEK C. y BECHT H.** (1979) The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J Virol.* **31**:584-589.
- STEGER D., MÜLLER H. y RIESNER D.** (1980) Helix-core transitions in double-stranded viral RNA: Fine resolution melting and ionic strength dependence. *Biochem Biophys Acta* **606**:274-285.