

Monitorización de la vacunación frente a la enfermedad de Marek mediante PCR en tiempo real a partir de pulpa de la pluma

M. BIARNÉS ^{1*}, A. BLANCO¹, Q. CAMPRUBÍ¹ y R. JOVÉ¹

¹ Centre de Sanitat Avícola de Catalunya i Aragó (CESAC), 43206 Reus, Tarragona, España.

* e-mail: mbiarnes@cesac.org

RESUMEN

Para la prevención y control de la enfermedad de Marek la vacunación sigue siendo una herramienta fundamental. Las vacunas más utilizadas son las asociadas a células que deben almacenarse en nitrógeno líquido y manejarse con sumo cuidado para no comprometer dichas células y, en consecuencia, el virus vacunal. Con el objetivo de disponer de una técnica laboratorial para la monitorización de dicha vacunación, en el CESAC se ha puesto a punto la PCR en tiempo real para la detección del DNA viral de los serotipos 1 y 3 a partir de pulpa de la pluma, basada en el método descrito por Cortes y colaboradores (2011). Para ello se analizaron, vacunas comerciales de los serotipos 1 y 3, plumas remeras procedentes de 7 lotes de pollitas, recría de reproductoras, 1 lote de pollitas, recría de ponedoras y 4 lotes de pollos, protegidos con diferentes programas vacunales. De los resultados obtenidos, podemos concluir que la PCR en tiempo real a partir de pulpa de la pluma es una herramienta eficaz y rápida para la monitorización de la vacunación frente a la enfermedad de Marek.

ABSTRACT

To prevent and control Marek's disease, vaccination remains a fundamental tool. The most widely used vaccines are the cell-associated vaccines which must be stored in liquid nitrogen and carefully manipulated to avoid compromising the cells and thus, the vaccine virus. In order to have a laboratory technique for monitoring such vaccination, in CESAC we have set up a real time PCR for the detection of viral DNA of serotypes 1 and 3 from feather pulp, based in the method described by Cortes et al. (2011). Commercial vaccines were analyzed including serotypes 1 and 3, as well as feather pulp from alar tracts from 7 pullet flocks, breeder rearing, 1 pullet flock, layer rearing, 4 broiler flocks, protected with different vaccination programs. From the obtained results, we can conclude that real-time PCR from feather pulp is a quick and effective tool for monitoring the vaccination against Marek's disease.

Palabras clave: Enfermedad de Marek, real time-PCR, pulpa de la pluma, diagnóstico.

Introducción

La Enfermedad de Marek (MD) es una enfermedad linfoproliferativa causada por un alpha-herpesvirus y se caracteriza por una infiltración de células mononucleares en los nervios periféricos así como en diferentes órganos y tejidos. El virus de la enfermedad de Marek (MDV), es un virus ADN que pertenece a la familia Hesperviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae, género Mardivirus y existen 3 serotipos:

Serotipo 1 (MD1): Cepas oncogénicas que en base a su virulencia se dividen en 4 patotipos: cepas suaves (mMDV), cepas virulentas (vMDV), cepas muy virulentas (vvMDV) y cepas muy virulentas plus (vv+MDV).

Serotipo 2 (MD2): Cepas aisladas de pollo, no oncogénicas.

Serotipo 3 (HVT): Herpesvirus de pavos, son ubicuos en los pavos y no son oncogénicos.

Para la prevención y control de la enfermedad de Marek la vacunación, desde su aparición en el año 1970, sigue siendo una herramienta fundamental. Las vacunas más utilizadas son las asociadas a células que deben almacenarse en nitrógeno líquido y manejarse con sumo cuidado para no comprometer dichas células y, en consecuencia, el virus vacunal. Generalmente las reproductoras y ponedoras se vacunan con la cepa Rispens, perteneciente al Serotipo 1 y con alguna cepa HVT, mientras que los pollos suelen vacunarse con alguna cepa HVT. Para controlar que la vacunación se ha llevado a cabo correctamente, a diferencia de otras enfermedades, las técnicas serológicas no son de utilidad.

Con el objetivo de disponer de una técnica laboratorial para la monitorización de dicha vacunación, en el CESAC se ha puesto a punto la PCR en tiempo real para la detección del ADN viral de los serotipos 1 y 3 a partir de pulpa de la pluma, basada en el método descrito por Cortes y colaboradores (2011).

Materiales y métodos

Muestras

En este trabajo se analizaron 2 tipos de muestras, por una parte se tomaron 4 plumas remeras por animal para la monitorización de la vacunación y por otra, se muestrearon diferentes órganos y tejidos para comprobar la distribución de las cepas vacunales en las aves. Así mismo, para comprobar la especificidad de la técnica se analizó un lote de pollos (referencia: 6406) que no fue vacunado. En las tablas 1 y 2 se detalla la información relativa a los lotes analizados: referencia del caso, tipo de ave, edad en el muestreo en semanas, programa vacunal frente a la enfermedad de Marek y aves muestreadas.

En ninguno de los lotes muestreados y durante la duración del estudio, se observó signos o lesiones compatibles con la enfermedad de Marek.

Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras remitidas y de la vacuna, se realizó a partir de 140µl de macerado procedente de pulpa de la pluma o tejidos con agua de biología molecular, o a partir de 140µl de las diluciones decimales de la vacuna. Se procedió de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit comercial QIAamp DNA Mini kit (Qiagen). La elución final de ADN se hizo con 100µl de buffer AE.

PCR en tiempo real

Se puso a punto la PCR en tiempo real para los serotipos 1 y 3 de la enfermedad de Marek utilizando los cebadores y sondas descritos por Gimeno *et al*, 2008, gb (serotipo 1) y ncr (serotipo 3). Los cebadores del serotipo 1 tienen su diana en el gen de la glicoproteína B, mientras que los cebadores del serotipo 3 tienen su diana en una región no codificante entre el ORF HVT072 y HVT073. La amplificación se llevó a cabo con el kit AgPath-ID One Step RT-PCR de Ambion, en el amplificador 7300 Real Time PCR System de Applied Biosystems. Se utilizó un kit de RT-PCR haciendo un paso previo de inactivación de la retrotranscriptasa. El ciclo térmico fue de 10 minutos a 95°C, seguido de 55 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. La lectura de fluorescencia se realiza en el segundo paso del ciclo de amplificación.

Sensibilidad de la técnica

Para determinar la sensibilidad de la PCR en tiempo real se realizaron diluciones seriadas decimales de 10^{-1} a 10^{-8} , de una vacuna comercial compuesta por una cepa del Serotipo 1 (CVI988 o Rispens) y una cepa del Serotipo 3 (FC-126), concretamente , Nobilis® Rismavac + CA 126, con un título aproximado $\geq 3,0 \log_{10}$ ufp/dosis de cada serotipo. Lote de fabricación L-A531A. La extracción de ADN y la PCR en tiempo real, de cada una de las diluciones se llevó a cabo tal y como está descrito anteriormente.

Resultados y discusión

En las tablas 3 y 4 se detallan los resultados obtenidos en la PCR en tiempo real para la detección de los serotipos 1 y 3. En las columnas se especifica la referencia del caso, tipo de ave, edad en el muestreo en semanas, número de aves muestreadas, número de análisis realizados, ya que en algunos caso se hizo un pool de las muestras y en otros los análisis fueron individuales y, en la dos últimas columnas, resultados positivos a MD1 y a HVT en relación a los analizados, separados por una barra (/).

En la tabla 5 se muestra los resultados obtenidos en la prueba de sensibilidad de la técnica, en ella se detalla la dilución decimal analizada y el resultado cualitativo obtenido (Positivo / Negativo).

El estudio reveló que:

El lote de pollos que no fue vacunado frente a la enfermedad de Marek, obtuvo resultado negativo para los 2 serotipos.

La cepa vacunal del serotipo 1 (Rispens) fue detectada hasta la dilución 10^{-6} y la cepa vacunal del serotipo 3 (HVT) se detectó hasta la dilución 10^{-7} .

Todos los lotes de pollitas, cría de reproductoras, obtuvieron resultado positivo para los 2 serotipos investigados a edades comprendidas entre 2 y 9 semanas de vida.

En la pulpa de las plumas del lote de cría de ponedoras de 9 semanas de edad, también se detectó el ADN de los 2 serotipos.

En las ponedoras comerciales que se analizaron 75 semanas post-vacunación, se detectó el serotipo 3 mientras que no se amplificó el ADN del serotipo 1. Señalar que estas aves estuvieron alojadas en el CESAC desde las 17 semanas de vida, sin contacto con otras aves.

De los 3 lotes de broilers analizados, 2 obtuvieron resultado positivo a HVT, cepa vacunal utilizada, mientras que en un lote no se detectó, hecho que hizo pensar en una aplicación incorrecta de la vacuna.

Referente a los diversos tejidos analizados, el serotipo 1 fue detectado en encéfalo, ojos, corazón y bazo mientras que el serotipo 3 fue detectado en todos los órganos y tejidos analizados.

De los resultados obtenidos, podemos concluir que la PCR en tiempo real a partir de la pulpa de la pluma es una herramienta eficaz y rápida para la monitorización de la vacunación frente a la enfermedad de Marek.

Referencias

BAIGENT, S., SMITH, L., CURRIE, R., and NAIR, V. (2007). Correlation of MDV vaccine virus genome load in feather tips with protection, using an experimental challenge model. *Avian Pathology*, 36: 467-474.

CORTES, A.L., MONTIEL, E.R., LEMIERE, S., and GIMENO, I.M. (2011). Comparison of blood and feather pulp samples for the diagnosis of Marek's disease and for monitoring Marek's disease vaccination by Real-Time PCR. *Avian Diseases*, 55(2): 302-310.

KUHNLEIN, U., SPENCER, J. L., CHAN, M., PRASLICKOVA, D., LINHER, K., KULENKAMP, A., and ANSAH, G. (2006). Relationship between Marek's disease and the time course of viral genome proliferation in feather tips. *Avian Diseases*, 50: 173-178.

SCHAT, K. A. and NAIR, V. (2008). Group I Adenovirus Infections. *Diseases of Poultry*. 12th, Saif, Y.M. Blackwell Publishing, Iowa, EEUU : 452-514.

Tabla 1. Relación de muestras de pulpa de la pluma analizadas.

Referencia	Tipo Ave	Edad (semanas)	Programa vacunal	Muestra	Aves muestreadas
4539	Broiler	2	HVT 1/3 dosis in-ovo	Pulpa pluma	5
4540	Broiler	3	HVT 1/3 dosis in-ovo	Pulpa pluma	5
4541	Broiler	2	HVT 1/3 dosis in-ovo	Pulpa pluma	3
5134	Ponedoras	75	Rispens + HVT, 1 dosis en incubadora	Pulpa pluma	2
5249	Recría reproductoras	4	Rispens + HVT, doble dosis en incubadora y Rispens + HVT, 1 dosis en granja a 7d/v	Pulpa pluma	5
5667	Recría reproductoras	5	Rispens + HVT, doble dosis en incubadora y Rispens + HVT, 1 dosis en granja a 7d/v	Pulpa pluma	5
6406	Broilers	4	No vacunados	Pulpa pluma	10
6528	Recría reproductoras	2	Rispens + HVT, 1 dosis en incubadora y revacunación con Rispens 1 dosis a 7 días	Pulpa pluma	5
6529	Recría ponedoras	9	Rispens + HVT, 1 dosis en incubadora	Pulpa pluma	5
7216	Recría reproductoras	6	Rispens + HVT, doble dosis en incubadora	Pulpa pluma	5
7217-1	Recría reproductoras	4	Rispens + HVT, doble dosis en incubadora	Pulpa pluma	5
7217-2	Recría reproductoras	4	Rispens doble dosis y HVT 1 dosis en incubadora	Pulpa pluma	5
7217-3	Recría reproductoras	4	Rispens + HVT, doble dosis en incubadora y Rispens 1 dosis en granja a 7d/v	Pulpa pluma	5

Tabla 2. Relación de órganos y tejidos analizados.

Referencia	Tipo Ave	Edad (semanas)	Programa vacunal	Muestra	Aves muestreadas
5177	Broilers	3	HVT 1/3 dosis in-ovo	Encéfalo	3
5667	Recría reproductoras	5	Rispens + HVT, doble dosis en incubadora y Rispens + HVT, 1 dosis en granja a 7d/v	Ojos	5
5667	Recría reproductoras	5	Rispens + HVT, doble dosis en incubadora y Rispens + HVT, 1 dosis en granja a 7d/v	Encéfalo	5
5667	Recría reproductoras	5	Rispens + HVT, doble dosis en incubadora y Rispens + HVT, 1 dosis en granja a 7d/v	Hígado	5
5667	Recría reproductoras	5	Rispens + HVT, doble dosis en incubadora y Rispens + HVT, 1 dosis en granja a 7d/v	Corazón	5
5667	Recría reproductoras	5	Rispens + HVT, doble dosis en incubadora y Rispens + HVT, 1 dosis en granja a 7d/v	Bazo	5
5667	Recría reproductoras	5	Rispens + HVT, doble dosis en incubadora y Rispens + HVT, 1 dosis en granja a 7d/v	Nervio Ciático	5
6406	Broilers	4	No vacunados	Encéfalo	10

Tabla 3. Resultados obtenidos en las muestras de pulpa de la pluma analizadas.

Referencia	Tipo Ave	Edad (semanas)	Aves muestreadas	Análisis	Positivos MD1	Positivos HVT
4539	Broiler	2	5	1	0/1	1/1
4540	Broiler	3	5	1	0/1	1/1
4541	Broiler	2	3	1	0/1	0/1
5134	Ponedoras	75	2	2	0/2	2/2
5249	Recría reproductoras	4	5	5	5/5	5/5
5667	Recría reproductoras	5	5	5	5/5	5/5
6406	Broilers	4	10	1	0/1	0/1
6528	Recría reproductoras	2	5	5	5/5	5/5
6529	Recría ponedoras	9	5	5	5/5	5/5
7216	Recría reproductoras	6	5	5	5/5	5/5
7217-1	Recría reproductoras	4	5	1	1/1	1/1
7217-2	Recría reproductoras	4	5	1	1/1	1/1
7217-3	Recría reproductoras	4	5	1	1/1	1/1

Tabla 4. Resultados obtenidos en los diferentes órganos y tejidos analizados.

Referencia	Tipo Ave	Edad (semanas)	Muestra	Aves muestreadas	Análisis	Positivos MD1	Positivos HVT
5177	Broilers	3	Encéfalo	3	1	0/1	1/1
5667	Recría reproductoras	5	Ojos	5	1	1/1	1/1
5667	Recría reproductoras	5	Encéfalo	5	5	4/5	5/5
5667	Recría reproductoras	5	Hígado	5	1	0/1	1/1
5667	Recría reproductoras	5	Corazón	5	1	1/1	1/1
5667	Recría reproductoras	5	Bazo	5	1	1/1	1/1
5667	Recría reproductoras	5	Nervio Ciático	5	1	0/1	1/1
6406	Broilers	4	Encéfalo	10	1	0/1	0/1

Tabla 5. Prueba de sensibilidad de la técnica. Resultados cualitativos obtenidos en las diferentes diluciones decimales analizadas.

Dilución	Resultado MD1	Resultado HVT
10 ⁻¹	Positivo	Positivo
10 ⁻²	Positivo	Positivo
10 ⁻³	Positivo	Positivo
10 ⁻⁴	Positivo	Positivo
10 ⁻⁵	Positivo	Positivo
10 ⁻⁶	Positivo	Positivo
10 ⁻⁷	Negativo	Positivo
10 ⁻⁸	Negativo	Negativo