

Dinámica de la infección por un nuevo genotipo de virus de Gumboro en pollos de engorde comerciales de 7 y 21 días de edad

R. DOLZ^{1*}, J. STRAUSS¹, K. BERTRAN¹, J. BOBI¹, M. PÉREZ¹, N. MAJÓ^{1,2}

¹Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), 08193, Bellaterra, España.

²Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, España.

*Autor de contacto: roser.dolz@cresa.uab.cat

RESUMEN

En los últimos años se han ido detectando en lotes de pollos de engorde con sintomatología inespecífica y atrofia muy marcada de la bolsa de Fabricio, unas cepas de virus de la enfermedad de Gumboro (IBDV) que corresponden a un nuevo genotipo. El objetivo principal del presente trabajo fue estudiar la dinámica de infección de una de estas nuevas cepas de IBDV en pollos de engorde comerciales de 7 días de edad, con anticuerpos maternos, y en pollos comerciales y pollos specific pathogen free (SPF) de 21 días de vida. En ambos estudios se inocularon experimentalmente los animales y se realizó un seguimiento clínico diario. A los 3, 6 y 10 días post-infección (dpi) se realizaron necropsias, se pesaron los principales órganos linfoides (bazo, timo y bolsa de Fabricio) y se recogieron muestras de bolsas de Fabricio para histopatología y detección del virus mediante una técnica inmunohistoquímica y RT-PCR. También se tomaron hisopos cloacales para determinar la excreción vírica mediante RT-PCR y sangre para determinar mediante ELISA la presencia de anticuerpos frente a IBDV. Los resultados obtenidos demostraron que el nuevo genotipo de IBDV es capaz de infectar tanto pollos de engorde comerciales de una semana de edad, con niveles elevados de anticuerpos frente a IBDV, como pollos de engorde y aves SPF de tres semanas de edad. Esta cepa no causó sintomatología en pollos SPF ni en pollos comerciales de ninguna de las dos edades, pero sí lesiones graves de atrofia, ya macroscópicamente visibles, y pérdida de linfocitos B en la bolsa de Fabricio. Además, se demostró que el virus se mantenía en la bolsa hasta 10 dpi en pollitos comerciales infectados a los 7 días y en pollitos SPF de 21 días, y que se excretaba vía cloacal durante un corto periodo de tiempo (menos de 6 días). El hecho de que esta nueva cepa de IBDV sea capaz de infectar pollos con anticuerpos maternos sugiere que probablemente se trate de cepas antigénicamente distintas a las cepas clásicas y a las cepas altamente virulentas (vvIBDV).

Palabras clave: enfermedad de Gumboro, cepa variante, infección, pollos.

ABSTRACT

In the last years, infectious bursal disease virus (IBDV) strains belonging to a new genotype have been detected in broiler flocks with unspecific clinical signs and severe atrophy of the bursa of Fabricius. The objective of the present study was to determine the infection dynamics of these new strains in 7-day-old commercial broilers, with maternal antibody titers, and 21-day-old commercial broilers and specific pathogen free (SPF) chickens. In both studies birds were experimentally infected and clinical signs were daily checked. At 3, 6 and 10 days post-infection (dpi) birds were necropsied, the main lymphoid organs were weighted (spleen, thymus and bursa) and samples from the bursa of Fabricius were obtained to carry out histopathology, and virus detection by immunohistochemistry and RT-PCR. In addition, cloacal swabs were obtained to evaluate viral shedding by RT-PCR and blood samples were obtained to detect the presence of antibodies against IBDV by ELISA. Results demonstrated that the new IBDV genotype infects all, commercial broilers of one week of age with high maternal antibody levels and commercial broilers and SPF chickens of 21 days of age. No specific symptoms were observed in the infected birds at any age, but severe lesions in the bursa of Fabricius associated with destruction of B lymphocytes were caused.

Furthermore, it was demonstrated that the virus was present up to 10 dpi in commercial broilers infected at 7 days of age and in SPF chickens infected at 21 days of age and that it was shed for a short period of time (less than 6 days) by the cloaca. The ability of the new genotype strains to infect broilers with a high level of maternal antibodies suggests that these new strains may differ antigenically from classic and vvIBDV strains.

INTRODUCCIÓN

Desde el año 2002 se lleva a cabo en el CReSA un estudio de vigilancia epidemiológica del virus de la enfermedad de Gumboro (IBDV), mediante la secuenciación parcial del gen VP2 de los virus detectados a partir de muestras clínicas procedentes de explotaciones sospechosas de IBD. Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que los virus altamente virulentos de Gumboro (vvIBDV) son endémicos en nuestro país. No obstante, en los años 2008 y 2009 se empezaron a detectar varias cepas que genéticamente mostraban características únicas y que se agruparon en un nuevo genotipo del IBDV. En algunos casos, estas cepas se aislaron de lotes de pollos de engorde sin ninguna sintomatología clínica específica, mientras que en otros casos se sospechó de inmunosupresión (Dolz *et al.* 2009).

El objetivo principal del presente trabajo fue estudiar la dinámica de infección de una de estas nuevas cepas de IBDV en pollos de engorde comerciales de 7 días de edad, con anticuerpos maternos, y en pollos comerciales y pollos *specific pathogen free* (SPF) de 21 días de vida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Virus

Se seleccionó uno de los casos clínicos a partir de los cuales se había detectado una cepa perteneciente al nuevo genotipo de IBDV. El caso seleccionado se trataba de un lote de broilers que clínicamente presentó incremento de la mortalidad y presencia de problemas respiratorios. Tras la necropsia se observó depleción intensa de la bolsa de Fabricio asociada a la presencia de una cepa de IBDV clasificada previamente mediante RT-PCR y secuenciación parcial del gen VP2 dentro del nuevo genotipo de IBDV.

Para la replicación del virus y obtención del *stock* vírico, se obtuvo un primer inóculo vírico a partir del homogeneizado de las bolsas de Fabricio procedentes del caso al 20% peso/volumen en caldo triptosa fosfato (TPB) (SIGMA, Steinheim, Alemania). Este homogeneizado se centrifugó a 8500 rpm durante 10 min y el sobrenadante se filtró a través de filtros de 0,8 μm , 0,4 μm y 0,22 μm (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda). Diez aves SPF de 3 semanas de vida se infectaron con 0,2ml/ave del inóculo descrito anteriormente por vía intracloual. A los 5 días post-infección (dpi), las aves se sacrificaron y se obtuvieron las bolsas de Fabricio, las cuales se homogeneizaron mediante el mismo procedimiento descrito anteriormente para obtener el *stock* vírico que se alícuotó y congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para confirmar la presencia del virus inoculado originalmente se realizó RT-PCR y secuenciación parcial del gen VP2 de una de las alícuotas del *stock* vírico (Dols *et al.* 2006).

Diseño experimental

Se llevaron a cabo 2 experimentos. En el experimento 1, se utilizaron 13 pollitos broiler (estirpe Ross) de 7 días de vida que se distribuyeron en dos grupos (1A y 1B) alojados en aisladores de presión negativa. El grupo 1A (10 animales) se inoculó vía oral con 0,2ml/ave del *stock* vírico producido anteriormente. El grupo 1B (3 animales) se inoculó con 0,2ml/ave de TPB y se mantuvo como grupo control negativo. De todos los animales, se realizó un seguimiento diario de los signos clínicos. A los 3, 6 y 10 dpi, se tomaron muestras de hisopo cloacal y sangre de 3 aves del grupo 1A y 1 ave del grupo 1B, y posteriormente se sacrificaron. Se realizó la necropsia y evaluación de lesiones macroscópicas, se tomaron los pesos corporales y de la bolsa de Fabricio, y se tomaron muestras de las bolsas de Fabricio, la mitad en formol para su estudio histológico y la otra mitad congelada para la realización de la RT-PCR. Se tomaron también muestras de sangre a los animales a los 7, 13 y 21 días de vida, antes de ser inoculados con la cepa vírica.

En el experimento 2, se utilizaron 5 grupos experimentales (ver Tabla 1): dos grupos de pollos broiler y 3 grupos de pollos SPF. Un grupo de broilers (2D) y uno de pollos SPF (2A) se utilizaron como grupos controles negativos no infectados. Un grupo de broilers (2E) y uno de pollos SPF (2B) se utilizaron para el estudio de la patogenia del virus en ambas estirpes con sacrificios seriados de aves a los 3, 6 y 10 dpi. Se seleccionaron 3 aves de cada grupo infectado y 2 de los dos grupos controles negativos, se obtuvo sangre e hisopo cloacal y se sacrificaron los animales. Se realizó la necropsia y evaluación de lesiones macroscópicas, se tomaron los pesos corporales y de la bolsa de Fabricio, y se tomaron muestras de las bolsas de Fabricio, la mitad en formol para su estudio histológico y la otra mitad congelada para la realización de la RT-PCR.

Finalmente, un grupo de pollos SPF (2C) se utilizó para la valoración de la mortalidad y se tomaron hisopos cloacales de todos ellos a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 y 15 dpi para la evaluación de la excreción vírica.

Tabla 1. Distribución de los grupos experimentales, tratamiento y muestras tomadas

Grupo	Nº Animales	Tipo de ave	Tratamiento	Vía inoculación	Días de muestreo (dpi)	Nº animales muestreados/día	Muestras
2A	10	SPF	TPB	Oculonasal	3, 6 y 10	2	HC, Sa, AS
2B	10	SPF	Virus Variante	Oculonasal	3, 6 y 10	3	HC, Sa, AS
2C	10	SPF	Virus Variante	Oculonasal	1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 y 15	10	HC
2D	6	Broiler	TPB	Oculonasal	3, 6 y 10	2	HC, Sa, AS
2E	10	Broiler	Virus Variante	Oculonasal	3, 6 y 10	3	HC, Sa, AS

HC: Hisopo cloacal; Sa: sangre sin anticoagulante; AS: Animal sacrificado; TPB: Caldo Triptosa Fosfato

Histopatología e inmunohistoquímica

Las muestras de bolsa de Fabricio fueron fijadas con formalina al 10 %, incluidas en parafina y teñidas mediante hematoxilina - eosina. La valoración de las lesiones se realizó siguiendo el sistema de valoración descrito en la Farmacopea Europea: 0: <5% de los folículos afectados, 1: 5-25% de los folículos afectados, 2: 25- 50% de los folículos afectados, 3: 50-75% de folículos afectados, 4: >75% ó <100% de folículos afectados, y 5: la totalidad de folículos está afectada. Se considera afectación de folículo si el 75% de su población linfocitaria está disminuida. Se utilizó una técnica inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal frente a la proteína VPX descrita previamente (Dolz *et al.* 2006).

RT-PCR y secuenciación

Para la extracción de RNA vírico a partir de bolsas de Fabricio, se maceraron 30 mg de tejido en 200 µL de agua libre de RNAsas y se tomaron 150 µL del sobrenadante obtenido tras una centrifugación. En el caso de los hisopos cloacales, éstos se resuspendieron en 500 µL de medio TPB y se utilizaron 150 µL para la extracción. La RT-PCR y secuenciación se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Dolz *et al.* 2005.

ELISA

Las muestras de sangre sin anticoagulante se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min y se obtuvo el suero que se congeló a -20 °C hasta la realización del ELISA. Se utilizó un kit de ELISA comercial para la detección específica de anticuerpos frente a IBDV (BioChek CV, Gouda, Holanda) siguiendo las instrucciones que indica el fabricante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde el año 2008, los estudios de seguimiento epidemiológico de cepas de Gumboro circulantes en España basados en la secuenciación parcial de la proteína VP2 y realizados a partir de muestras de

campo remitidas al CReSA, han demostrado la circulación de un nuevo genotipo de IBDV en España (Dolz *et al.*, 2009). Previamente, en 2006 Jackwood y colaboradores (2006) también describieron la presencia de cepas genéticamente distintas en España y en Francia, aisladas de lotes asintomáticos, pero en ninguno de los dos casos fue posible determinar la capacidad patógena de estos virus. En el presente estudio se ha aislado en aves SPF uno de los virus clasificados previamente como perteneciente a este nuevo genotipo y se ha demostrado que estas cepas son capaces de infectar broilers de 1 semana de vida y aves SPF y broilers de 3 semanas de vida, causando lesiones evidentes en las bolsas de Fabricio.

Ninguna de las aves desafiadas con la cepa vírica en los experimentos mostró signos clínicos aparentes de infección. No obstante, histológicamente este virus causó depleción linfocitaria severa tras una breve fase de linfocitosis en ausencia de cambios inflamatorios. Este comportamiento difiere del observado con las cepas vvIBDV, principales responsables de brotes de IBDV en Europa en los últimos años, y se asemeja al descrito para las cepas variantes americanas (Rosenberg *et al.*, 1985). Así, por primera vez se demuestra la presencia de cepas circulantes en Europa con un patotipo distinto al de las cepas vvIBDV y similar al de las cepas variantes americanas.

No se observaron signos clínicos aparentes ni mortalidad asociados a la infección con la cepa del nuevo genotipo de IBDV en ninguno de los grupos experimentales (pollos SPF y broiler; 7 y 21 días de vida). Sin embargo, en todos los casos, se observó una afectación grave de la bolsa de Fabricio, con atrofia visible macroscópicamente (Figura 1) y depleción linfoide grave. Estas lesiones se empezaron a observar a los 3 dpi, se agravaron hacia los 10 dpi y se prolongaron hasta los 21 dpi, tal como se observó en las bolsas de Fabricio del grupo 2C. Aunque las lesiones fueron de mayor intensidad en las aves SPF infectadas a los 21 días de vida, también fueron evidentes en los pollos broiler infectados tanto a los 7 como a los 21 días de vida. Esta depleción linfoide se observó tras una breve fase de linfocitosis en ausencia de cambios inflamatorios. Este comportamiento difiere del observado con las cepas vvIBDV y se asemeja al descrito para las cepas variantes americanas. Además, las lesiones observadas en la bolsa a los 15 dpi demuestran que la depleción linfoide causada por la infección se prolonga en el tiempo, lo cual puede comprometer de forma grave la capacidad de respuesta inmunitaria de las aves frente a otros agentes infecciosos capaces de producir enfermedad.

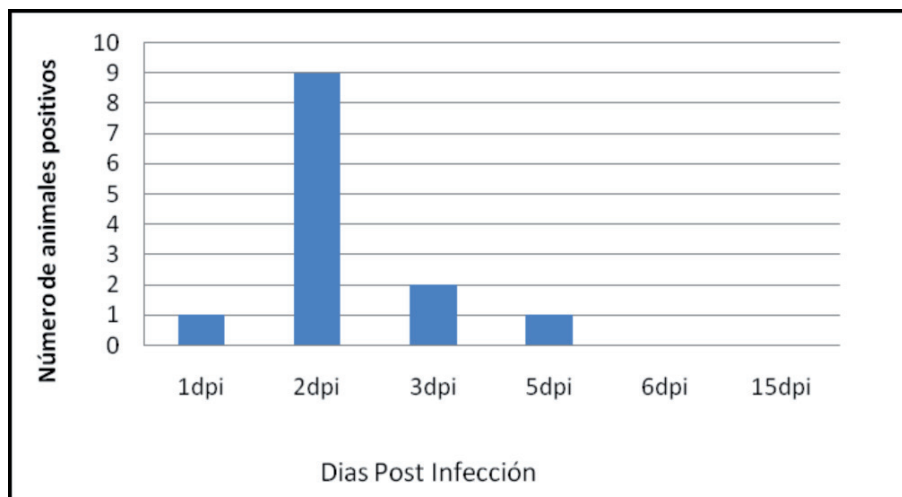
Figura 1. Bolsas de Fabricio. 1A, ave SPF 3 dpi grupo control negativo inoculado con TPB a los 21 días de vida. 1B, ave SPF 3dpi infectada con la cepa del nuevo genotipo a los 21 días de vida. Se aprecia atrofia marcada de la bolsa 1B respecto el control negativo 1A y presencia de fibrina en la luz de la bolsa



El virus se detectó en la bolsa de Fabricio mediante RT-PCR desde los 3 dpi hasta los 10 dpi en las aves SPF infectadas a los 21 días de vida y en los broilers infectados a los 7 días de vida. En los broilers infectados a los 21 días de vida, el virus se detectó hasta los 6 dpi. Por el contrario, la excreción del virus se demostró en hisopos cloacales durante un periodo muy corto de tiempo (menos de 6 dpi).

El seguimiento de excreción vírica en hisopos clocales en el grupo 2C (Figura 2) evidenció que el pico máximo de excreción ocurre entre 1-3 dpi, momento en que las aves infectadas son fuente de infección para el resto de aves susceptibles. Teniendo en cuenta que las aves infectadas no muestran sintomatología clínica, es probable que esta infección pase desapercibida en el campo, lo cual conlleva un riesgo mayor de diseminación del virus de explotaciones afectadas a explotaciones susceptibles.

Figura 2. Excreción vírica en aves SPF infectadas a los 21 días de vida con la cepa del nuevo genotipo de IBDV. Se muestra el número de animales positivos mediante RT-PCR de IBDV en hisopos clocales desde 1dpi hasta 15 dpi



Los broilers utilizados en este estudio mostraron niveles altos de anticuerpos maternos al día de vida mediante ELISA (título medio de 8368). A los 7 días de vida, momento en que se infectaron, los broilers tenían un título medio de 3929. A pesar de la presencia de niveles de anticuerpos maternos elevados, los resultados de RT-PCR y de histología, junto con la seroconversión observada, demostraron que el nuevo genotipo de IBDV infectó estas aves. Por lo tanto, las cepas de este nuevo genotipo son capaces de infectar y causar una depleción linfocitaria severa de la bolsa de Fabricio en aves de 1 semana de vida con altos niveles de anticuerpos maternos. En primer lugar, este hecho demuestra que los planes vacunales frente a IBDV utilizados actualmente en España en reproductoras pesadas con la finalidad de proteger de la infección a los pollitos durante las 3 primeras semanas de vida no son eficaces frente a estas nuevas cepas. Si además tenemos en cuenta que los virus se detectaron en explotaciones de broilers vacunadas frente a IBDV, es también probable que los planes vacunales utilizados en explotaciones en pollos de engorde tampoco sean eficaces en la protección frente a estas cepas. Por todo ello, es probable que los cambios genéticos en este nuevo genotipo también hayan producido cambios en algunos epítomos, que permitan a estas cepas evadir la inmunidad creada por cepas clásicas. Sería necesario realizar estudios con anticuerpos monoclonales o de seroneutralización para determinar las características antigénicas de este nuevo genotipo de IBDV.

La ausencia de signos clínicos en las aves afectadas comporta una dificultad en el diagnóstico clínico de esta infección. Es probable que el clínico no sospeche de una posible infección por IBDV hasta que la inmunosupresión causada por la infección favorezca la aparición de otras patologías, que a su vez enmascararán la causa inicial del problema. Además, si tenemos en cuenta que el virus puede infectar aves antes de las 3 semanas de vida, es probable que los muestreos rutinarios para el control de IBDV realizados actualmente hacia los 35 días de vida no detecten las infecciones tempranas. Por lo tanto, sería recomendable realizar muestreos en edades más tempranas o de forma longitudinal en aquellas explotaciones en que se detecten problemas de inmunosupresión.

El presente estudio demuestra por primera vez la presencia de cepas en España, y probablemente en Europa, con un patotipo similar a las cepas variantes americanas. Aunque no se han realizado

estudios antigénicos, se ha demostrado que los planes vacunales actuales no protegen frente a la infección con estas cepas. A pesar de que en la actualidad la detección de cepas del nuevo genotipo es esporádica, es posible que los muestreos rutinarios no sean los más adecuados para la detección de estas cepas de IBDV y, por consiguiente, que se deban cambiar las estrategias de muestreo para determinar su importancia epidemiológica.

BIBLIOGRAFÍA

DOLZ, R.; MAJÓ, N.; ORDÓÑEZ, G. and PORTA, R. 2005. Viral genotyping of infectious bursal disease viruses isolated from the 2002 acute outbreak in Spain and comparison with previous isolates. *Avian Diseases*, 49: 332-339.

DOLZ, R.; BERTRAN, K. and MAJÓ, N. 2009. Circulación de un nuevo genotipo de virus de Gumboro en España. 46º Simposio Científico de Avicultura de AECA. Zaragoza.

JACKWOOD, D.J.; COOKSON, K.C.; SOMMER-WAGNER, S.E.; LE GALLUDEC, H. and DE WIT, J.J. 2006. Molecular characteristics of infectious bursal disease viruses from asymptomatic broiler flocks in Europe. *Avian Diseases*, 50: 532-536.

ROSENBERG, J.K.; CLOUD, S.; GELB, J.; ODOR, E. and DONMS, E. 1985. Sentinel bird survey of Delmarva broiler flocks. Proc. 20th Nat Meet Poult Health Condemn.