

FRENTE A GUMBORO Y MAREK



EFICACIA Y RENTABILIDAD DE UNA FORMA CÓMODA Y SEGURA

Vaxxitek® HVT+IBD es la primera vacuna aviar que con una sola dosis administrada en la incubadora, proporciona protección durante toda la vida frente a MD y todas las cepas conocidas de IBD.

EFICACIA

AL REDUCIR MORTALIDAD, SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES DE MD + IBD

RENTABILIDAD

DEMOSTRADA EN DIFERENTES PAÍSES (MÁS DE DOS AÑOS DE EXPERIENCIA)

MÁS DE
10.000
MILLONES
DE DOSIS
APLICADAS



Premio al mejor
producto Veterinario
Animales de producción

Vaxxitek® HVT+IBD Cada dosis de vacuna contiene: • Virus vivo vHVT013-69, como mínimo, $3,6 \log_{10}$ UPF • Excipiente... r.c.e.p. 1 dosis • Disolvente... 6 s.p. 1 dosis INDICACIONES: Inmunización activa de los pollitos. • Para prevenir la mortalidad y reducir los signos clínicos y las lesiones debidas a la bursitis infecciosa aviar. La protección comienza a partir de 14 días después de la vacunación, y persiste al menos hasta la 9ª semana de edad. • Para reducir la mortalidad, los signos clínicos y las lesiones debidas a la enfermedad de Marek. La protección está presente a partir de 4 días después de la vacunación. Una única vacunación permite proteger a los animales durante el periodo de riesgo. CONTRAINDICACIONES: Vacunar solamente aves en buen estado de salud. No utilizar en gallinas durante la puesta o la reproducción. REACCIONES ADVERSAS: Ninguna conocida. Si observa cualquier efecto de gravedad o no mencionado en este prospecto, le rogamos informe del mismo a su veterinario. ESPECIES A LAS QUE VA DESTINADO: Pollitos de 1 día de edad y huevos embrionados de 18 días de edad DOSIFICACIÓN PARA CADA ESPECIE: VIA Y FORMA DE ADMINISTRACIÓN: La vacuna debe ser administrada por vía subcutánea o por vía in ovo. Para la administración in ovo, puede utilizarse una máquina de inyección de huevos automatizada. El dispositivo debe demostrar que libera de forma segura y efectiva la dosis de vacuna apropiada. Deben seguirse estrictamente las instrucciones para la utilización de este aparato. Vía subcutánea: una única inyección de 0,2 ml por pollito a la edad de 1 día. Vía in ovo: una única inyección de 0,05 ml por huevo embrionado a los 18 días de edad. RECOMENDACIÓN PARA UNA CORRECTA ADMINISTRACIÓN: Llevar guantes y gafas protectoras durante las operaciones de descongelado y apertura de las ampollas. Sacar del contenedor de nitrógeno líquido solamente aquellas ampollas que se vayan a utilizar inmediatamente. Descongelar rápidamente el contenido de las ampollas por agitación en agua a 25-30°C. Pasar rápidamente a la etapa siguiente. Tan pronto como estén descongeladas, abrir las ampollas manteniéndolas a la distancia de la longitud del brazo en el momento de su apertura, a fin de prevenir cualquier riesgo de herida en caso de que se rompiera una ampolla de forma brusca. Una vez abierta la ampolla de vacuna, aspirar su contenido con una jeringa estéril de 5 ml. Trasladar la suspensión al disolvente (No utilizar el producto si presenta un aspecto turbio). Aspirar 2 ml del contenido del disolvente con la jeringa. Enjuagar la ampolla con estos 2 ml y trasladar entonces el líquido de enjuague al disolvente. Repetir la operación 1 ó 2 veces. Repetir las operaciones de descongelación, apertura, traslado y enjuagado para el número apropiado de ampollas que serán reconstituidas en el disolvente o bien 1 ampolla para 200 ml de disolvente para administración subcutánea, ó 4 ampollas para 200 ml de disolvente para administración in ovo. La vacuna disuelta preparada como se ha descrito, se homogeniza por agitación suave; de esta manera, está lista para su uso. Entonces, debe ser utilizada inmediatamente (la totalidad de la vacuna disuelta debe ser utilizada en menos de una hora). Por esto, la suspensión de vacuna debe prepararse solo a medida que se vaya utilizando. TIEMPO DE ESPERA: Cero días PRECAUCIONES ESPECIALES DE CONSERVACIÓN: Manténgase fuera del alcance de los niños. Conservar y transportar congelado en nitrógeno líquido (-196°C). No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en la ampolla. Registro nº EU/2/02/032/001.

Merial es una empresa líder en innovación, que provee una amplia gama de productos para mejorar la salud, el bienestar y el rendimiento de los animales. Merial cuenta con unos 5000 empleados y está presente en más de 150 países en todo el mundo. Sus ventas durante el año 2005 superaron los 1900 millones de US\$. Merial es fruto de la fusión entre Merck & Co. y sanofi-aventis. Para más información, consulte nuestras webs www.merial.com y <http://es.merial.com> Merial LABORATORIOS, S.A. c/ Tarragona, 161, Locales D/E 08014 BARCELONA Tel.: (+34) 93 2928383 Fax.: (+34) 932928389 www.merial.com



www.merial.com

Los resultados serológicos. Limitaciones y aplicaciones prácticas para la enfermedad de Gumboro

Javier Torrubia Díaz

Director Técnico Avicultura, Merial laboratorios S.A.

Introducción

La serología es una herramienta fundamental y clásica en un programa de medicina preventiva; los datos obtenidos deben ser comparados frecuentemente, de forma que sea una herramienta dinámica que nos pueda mostrar los cambios de situación en cada granja o explotación relativos al nivel y al tipo de desafío.

Las pruebas serológicas detectan las respuestas humorales de anticuerpos en el huésped frente a diferentes antígenos; las pruebas usualmente detectan anticuerpos séricos –de ahí su nombre– pero eventualmente pueden ser utilizadas para detectar anticuerpos en yema o en cualquier otro líquido corporal. Una prueba positiva indica que el ave posee anticuerpos contra el antígeno evaluado, lo que puede tener significados diversos. En caso de algunas enfermedades en las que la inmunidad es primordialmente de base celular, apenas se realizan pruebas serológicas para medir anticuerpos (por ejemplo, Marek, viruela, etc)

Pruebas serológicas cualitativas

Las pruebas serológicas pueden ser cuantitativas o cualitativas. En las pruebas cualitativas, como la aglutinación en placa o la inmunodifusión en gel de agar, el resultado se expresa como positivo o negativo. En general, estas pruebas suelen ser poco sensibles y el suero normalmente no se diluye para ser procesado.

Pruebas serológicas cuantitativas

Las pruebas cuantitativas permiten detectar la cantidad de anticuerpos que hay en la muestra; en el caso de la inhibición de la hemoaglutinación, la microaglutinación y la seroneutralización los sueros se diluyen en diluciones dobles seriadas y el resultado usualmente se expresa como el «título», que indica la

dilución mayor en la que se observa una reacción positiva. El título es proporcional a la cantidad de anticuerpos que hay en la muestra y el resultado se expresa como la dilución, ej. 1:256 o su inverso ej. 256, aunque también se pueden expresar en forma de Logaritmo en base 2, por ejemplo, $1:256 = \text{Log}_2 8$.

En otros casos, como en las pruebas ELISA, el suero sólo es diluido una vez antes de ser procesado y se utiliza un antisuero marcado con una enzima. El resultado se basa en una reacción colorimétrica que es medida con un espectrofotómetro, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de anticuerpos de la muestra y el título es calculado matemáticamente haciendo una comparación con los títulos de los controles positivos y negativos. Los resultados son además clasificados en «grupos o perfiles» en un histograma, ya que la expresión gráfica de los resultados facilita en gran medida su interpretación.

Artículo patrocinado por



**FRENTE A GUMBORO Y MAREK
EFICACIA Y RENTABILIDAD**



Seroneutralización

Dentro de las pruebas serológicas cuantitativas, la seroneutralización está considerada de referencia para cualquier estudio serológico pues es la que más se correlaciona entre la respuesta «in vitro» y la respuesta «in vivo». En esta prueba se puede valorar la capacidad que tienen los anticuerpos presentes en un suero problema para neutralizar la actividad biológica de un antígeno. Se añade una mezcla de virus a una concentración constante que previamente ha estado en contacto con diferentes diluciones del suero problema sobre las células. Se van observando las células sobre la que se han añadidos las distintas diluciones para ver si el virus las ha infectado o no mediante la tinción con un conjugado o por el efecto citopático. De esta forma se puede medir la capacidad de neutralización viral de un suero problema.

La prueba de seroneutralización es, sin duda alguna, la más fiable, pero su complejidad, laboriosidad y elevado coste, hace que se deje para investigación o trabajos muy específicos. Se tiende a emplear pruebas menos exactas, pero más sencillas y sobre todo, más fáciles de automatizar.

Inhibición de la hemoaglutinación

Esta prueba se basa en la característica de algunos microorganismos que son capaces de aglutinar eritrocitos de mamíferos o aves, lo que puede utilizarse para caracterizar virus, o medir anticuerpos en suero, por ejemplo: Orthomyxovirus, Paramyxovirus y Coronavirus, así como Mycoplasma.

Consiste en enfrentar diluciones seriadas de una muestra frente a un antígeno con un título determinado hasta que no se produce reacción -aglutinación de los

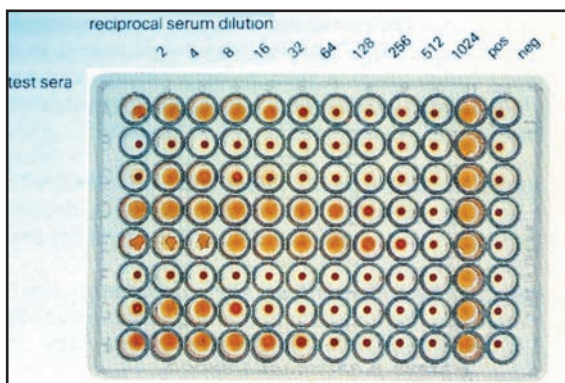


Fig. 1. Placa de Inhibición de la hemoaglutinación

eritrocitos-. Los resultados normalmente se expresan como un título (la recíproca de la mayor dilución del suero problema que inhibe completamente la hemoaglutinación).

Aunque es más laboriosa y menos automatizable que ELISA, es preferida su utilización para algunas enfermedades como EDS y bronquitis infecciosa en la que la abundancia de serotipos permite la aplicación de los diferentes antígenos, frente a ELISA ya que los kits disponibles comercialmente, normalmente se restringen a un solo antígeno.

ELISA

El término ELISA, acrónimo de «Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay», también conocido como EIA -enzimoinmunoanálisis- es similar a las pruebas de radioinmunoensayo -RIA-, más utilizadas en medicina humana, excepto en que en este caso los anticuerpos indicadores se unen a una enzima, en vez de hacerlo a una molécula fluorescente o un isótopo radiactivo.

Las enzimas sirven como marcadores debido a que cuando se combinan con su sustrato producen un cambio de color que hace la reacción visible, pudiéndose cuantificar bien por diluciones o por la lectura espectrofotométrica de la intensidad del color y medir su intensidad. No requieren instrumentos sofisticados.

Los kits ELISA proporcionan varios valores, como son la Media Geométrica del Título -GMT- que viene a ser la raíz cuadrada -elevada al número de elementos analizados- de los valores, en este caso de los títulos. La ventaja de este valor es que es menos sensible a valores extremos frente a la media aritmética, por lo que este valor es relevante para la interpretación de los resultados en cualquier situación del coeficiente de variación -CV-. Otro valor es el título medio, que es la media aritmética

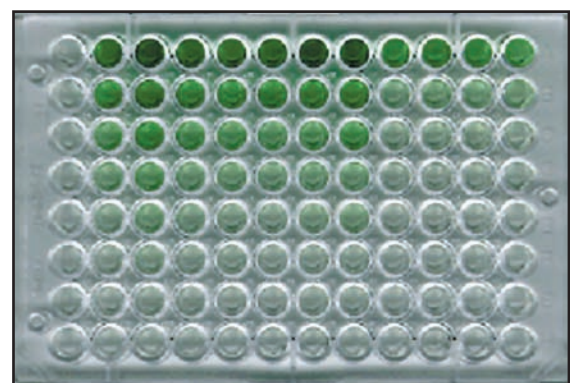


Fig. 1. Placa de ELISA

-suma y promedio- de los títulos. Este valor carece de significación cuando algunas de las muestras tienen títulos que corresponden al grupo O, ó títulos con valores excepcionalmente altos. En todo caso, los extremos pueden hacer variar la apreciación, por lo que en muchos casos el criterio es eliminar estos valores ya que también pueden suceder contaminación de las muestras y fallos de las pipetas que agregan los reactivos. Este valor es relevante siempre y cuando tengamos un CV bajo.

El tercer valor es el coeficiente de variación -CV- que representa la dispersión de los títulos e indica cómo de variable es la respuesta del título medio en un plantel. Cuanto menor sea el CV más uniformes serán los títulos y mejor la vacunación. En la mayoría de los casos, tras la aplicación correcta de una vacuna inactivada, el CV debería ser menor del 40%. Tras la aplicación de vacunas vivas, el CV debería ser menor del 60%. Pero tras la primovacunación, más importante que el CV, es que todas las aves sean positivas.

La principal ventaja de la prueba ELISA es la capacidad de automatización y de procesamiento de grandes cantidades de muestras, así como la disponibilidad de diferentes kits comerciales, por lo que es la prueba más utilizada. Sin embargo también muestra limitaciones, como son su poca aceptación o difícil correlación en algunas enfermedades como EDS, pneumovirus, laringotraqueitis, etc.

Sin embargo, a excepción de la seroneutralización, ninguna de las pruebas serológicas por sí mismas indica grado de protección, sino que indican el nivel de anticuerpos específicos contra un antígeno en particular. Este nivel de anticuerpos debe ser racionalmente interpretado para poder decir si indica protección, exposición de campo o infección activa. La evaluación rutinaria y periódica del título de anticuerpos deberá correlacionarse con los calendarios de vacunación, el comportamiento clínico y el rendimiento productivo del lote para establecer los parámetros esperados de acuerdo a la edad y a la función zootécnica de las aves para establecer los niveles considerados «normales» e interpretar adecuadamente las variaciones de la «normalidad» como inmunidad insuficiente, la exposición de campo no controlada o la enfermedad clínica aparente. Las llamadas «líneas de base» indican el nivel normal esperado de anticuerpos en un lote a una edad determinada, permiten identificar con facilidad los cambios en el nivel de anticuerpos debidos a cambios en las vacunaciones o a exposiciones de campo y se pueden correlacionar con los objetivos de rendimiento productivo.

En el caso de las pruebas serológicas, lo normal es que se requiera de un muestreo seriado del lote para detectar

seroconversión o bien, un incremento en el título de anticuerpos de las aves, lo cual es muy sugestivo de una exposición de campo hacia el agente evaluado.

Se ha de ser muy cauto a la hora de hacer predicciones sobre títulos protectivos. En primer lugar porque el grado de protección depende de muchas variables, como las cepas vacunales utilizadas, la virulencia de las cepas de campo involucradas, el tipo de ave, el programa y método de aplicación de la vacuna y otras variables locales. Así por ejemplo, un título ELISA de 4000 frente a ND puede ser protector en una granja y no en otras.

Limitaciones y aplicaciones prácticas para la enfermedad de Gumboro

En el caso particular de la enfermedad de Gumboro, existen diferentes kits ELISA comerciales, cada uno de ellos con sus características especiales. Así, por ejemplo, el kit comercial seguramente más ampliamente utilizado, de origen americano, utiliza como antígeno el mismo que se utiliza en una vacuna intermedia clonada -también muy utilizada en la práctica-, pero la consecuencia es que al utilizar ese kit, los títulos conseguidos si se ha empleado esa vacuna son mayores que si se ha vacunado con otras cepas como las derivadas de la cepa Lukert o la S-706 por ejemplo.

Otro ejemplo es un segundo kit ELISA comercial, bastante utilizado en Europa, de origen holandés, que en condiciones normales alcanza títulos algo más altos que el primer kit mencionado, por lo que es difícil hacer comparaciones entre títulos provenientes de laboratorios que utilicen estos 2 tipos de kits. Hay que tener en cuenta, además, que en muchas empresas e integraciones se emplea a menudo la conocida fórmula de Deventer, la cual proporciona una herramienta útil para estimar el momento óptimo de vacunación de un plantel específico, basándose en el nivel y la vida media de los anticuerpos maternos, la edad de los pollos a la toma de muestras, los antecedentes genéticos de los pollos y la cepa de la vacuna de IBD -de Witt, 2001-. Pero la fórmula de Deventer se elaboró con los valores proporcionados por un determinado kit.

Pero también hay algunas diferencias entre los kits y los anticuerpos detectados. Recordemos que el genoma del virus de la enfermedad de Gumboro codifica 5 proteínas diferentes, de VP1 a VP5. Las proteínas VP2 y VP3 son las principales proteínas estructurales, que constituyen el exterior e interior de la cápside del virus, respectivamente. Los epítomos localizados en la proteína VP2 son capaces de provocar los anticuerpos neutralizantes protectivos frente al IBDV y son determi-

nantes del serotipo. El sitio antigénico responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes se encuentra dentro de una región muy pequeña, conocida como dominio variable de VP2, y es altamente dependiente de la conformación. Por el contrario, VP3 es un antígeno específico de grupo que es reconocida por anticuerpos no neutralizantes, que puede reaccionar de forma cruzada con los dos serotipos.

Recientemente se ha lanzado un nuevo kit ELISA, el kit PROFLOK Plus IBD Ab test -Synbiotics, San Diego, California-. La diferencia entre los kits clásicos utilizados hasta ahora y este nuevo kit se encuentra en la naturaleza del antígeno IBDV que recubre las placas. Los kits clásicos utilizan generalmente antígenos derivados de cepas clásicas replicadas en cultivo de tejidos. El test PROFLOK Plus IBD Ab utiliza un antígeno de una cepa clásica derivada de bolsas nativas. Este último permite una detección más precisa de los anticuerpos VP2 protectivos del IBDV. Este test mejorado es más sensible que los tests clásicos y muestra una alta correlación con la prueba VN. Los kits clásicos aunque detectan casi todos los anticuerpos frente a las diferentes VP, sobre todo detectan los anticuerpos anti VP3.

El advenimiento de vacunas de última generación contra la enfermedad de Gumboro, como son las vacunas vectoriales que por su conformación producen una respuesta de anticuerpos VP2 -Vaxxitek HVT+IBD, Merial Laboratorios SA-, ha provocado una nueva situación en relación a los kits ELISA disponibles hasta ahora, ya que con estos kits clásicos, la respuesta de anticuerpos es menor que los conseguidos con las vacunas vivas clásicas, pero con el kit PROFLOK Plus IBD Ab, se ha demostrado que la respuesta es más temprana y bastante mayor.

En varios ensayos recogidos por Prandini y col. -2008- utilizando diferentes vacunas y diferentes kits ELISA, se demostró que después de una disminución inicial de anticuerpos maternos

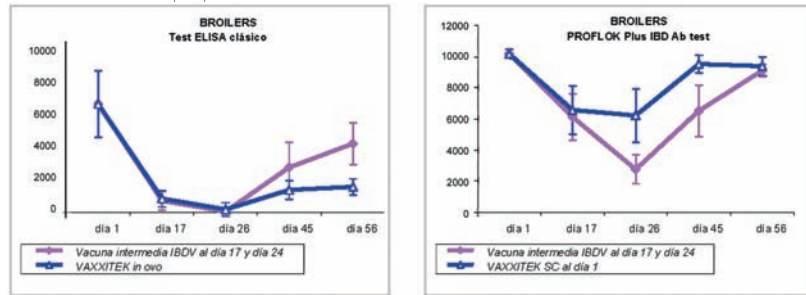


Fig. 3. Títulos medios de anticuerpos ELISA IBDV (\pm desviación estándar) en pollos vacunados con vacunas intermedias o con vacuna vectorial (De Prandini F. y col., 2008).

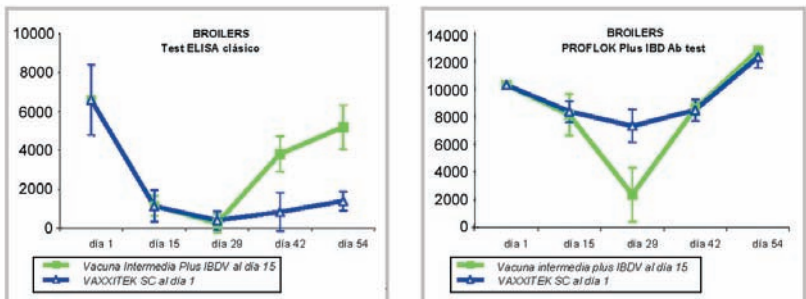


Fig. 4. Títulos medios de anticuerpos ELISA IBDV (\pm desviación estándar) en pollos vacunados con una vacuna intermedia Plus o con vacuna vectorial (SC al día 1) (De Prandini F. y col., 2008)

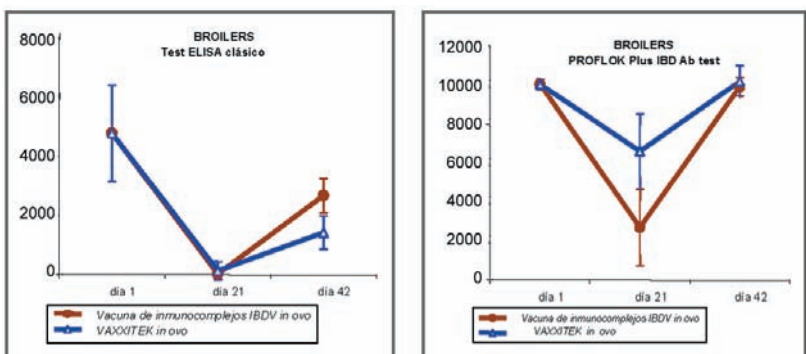


Fig. 5. Títulos medios de anticuerpos ELISA IBDV (\pm desviación estándar) en pollos vacunados con una vacuna de Inmuno Complejos o con vacuna vectorial (in ovo) (De Prandini F. y col., 2008)

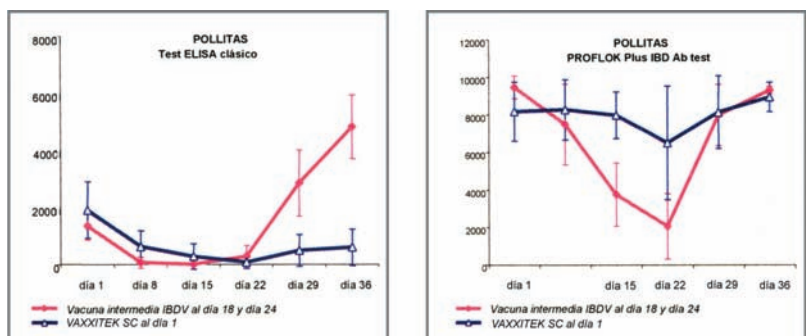


Fig. 6. Títulos medios de anticuerpos ELISA IBDV (\pm desviación estándar) en pollitas vacunadas con una vacuna intermedia o con vacuna vectorial (SC al día 1) (De Prandini F. y col., 2008).

durante las 2 primeras semanas de edad, la respuesta media de anticuerpos ELISA depende del tipo de vacuna administrada -figuras 3 a 5-. Utilizando el test ELISA clásico de IBD, los títulos de anticuerpos se mantuvieron a bajo nivel en los pollos entre los 15 y 21/28 días de edad, y a partir de ahí, subieron. Con estos test clásicos, la seroconversión observada fue menor en el grupo de vacuna vectorial que en los otros grupos vacunados. En cambio, utilizando el test ELISA IBD Plus, la media de los títulos de anticuerpos en los grupos de vacuna vectorial permanecieron altos (> 6000) desde el día 15/17 hasta los días 26/29. En contraste, la media de títulos en las aves vacunadas con las vacunas de virus vivos clásicas, disminuyó hasta el día 21/28 y, a continuación, aumentó al día 42/45, lo que sugiere un vacío inmunitario en estas aves. El patrón de respuesta de anticuerpos después de la vacunación en el campo con vacunas intermedias y la vacuna vectorial fue muy similar en broilers y pollitas (comparar las figuras 3 a 5 con la figura 6).

Una segunda y muy importante ventaja de la vacuna vectorial es que es independiente de los anticuerpos maternos -MDA-. La presencia de MDA en pollos es un problema importante, ya que pueden interferir con las vacunas clásicas de virus vivos de IBD, sean intermedias, intermedias plus o de inmuno-complejos. En presencia de anticuerpos maternos, la inmunización activa con vacunas clásicas sigue siendo arriesgada. Después de la disminución de los anticuerpos maternos, las aves que no responden a la vacunación son susceptibles a la infección por IBDV. Los resultados ELISA ilustran el vacío inmunitario observado en los grupos vacunados con vacunas de virus vivos -incluyendo las vacunas de inmuno complejos- entre aproximadamente los 15 y 28 días de edad. En cambio, tras la vacunación con la vacuna vectorial y utilizando la prueba ELISA IBD Plus específica -que se correlaciona bien con la prueba de neutralización- se observó una respuesta activa y fuerte anti VP2 desde el día 15 de edad en los pollos vacunados con la vacuna vectorial. Por lo tanto, no se produjo vacío inmunitario durante el período de edad de 3 a 5 semanas, el más importante para el desafío con IBDV de campo.

Una última ventaja para la vacuna vectorial es que el uso combinado de los kits ELISA clásicos e IBD Plus, permite diferenciar las aves vacunadas con la vacuna vectorial de las aves infectadas o vacunadas con vacunas de virus vivos.

Resumen y conclusiones

- La técnica que más ampliamente se emplea en el caso particular de la enfermedad de Gumboro es la prueba ELISA.
- Los títulos ELISA conseguidos con los kits clásicos no indican grado de protección, sino el nivel de anticuerpos específicos contra un antígeno en particular.
- Para IBD existen diferentes kits ELISA comerciales, cada uno de ellos con sus características especiales en lo referente a valores.
- Los kits clásicos aunque detectan casi todos los anticuerpos frente a las diferentes VP, sobre todo detectan los anticuerpos anti VP3.
- Un nuevo kit ELISA IBD Plus, permite una detección más precisa de los anticuerpos VP2 protectivos del IBDV y se correlaciona bien con la prueba de neutralización, la única prueba serológica que indica títulos protectivos.
- Tras la vacunación con una vacuna vectorial, con los kits ELISA clásicos la respuesta de anticuerpos es menor que los conseguidos con las vacunas vivas clásicas, pero con el kit ELISA IBD Plus, la respuesta es más temprana y mayor.
- Con el test ELISA IBD Plus, la media de los títulos de anticuerpos en los grupos vacunados con vacuna vectorial permanecieron altos desde el día 15/17 hasta los días 26/29. En contraste, en las aves vacunadas con las vacunas de virus vivos clásicas, disminuyó hasta el día 21/28 y, a continuación, aumentó al día 42/45, lo que sugiere un vacío inmunitario en estas aves.
- Tras la vacunación con la vacuna vectorial no se produjo vacío inmunitario durante el período de edad de 3 a 5 semanas, el más importante para el desafío con IBDV de campo.
- El uso combinado de los kits ELISA clásicos e IBD Plus, permite diferenciar las aves vacunadas con la vacuna vectorial, de las aves infectadas o vacunadas con vacunas de virus vivos.

Referencias bibliográficas

Se enviarán a quienes las soliciten. ●