

PERSISTENCIA DEL VIRUS VACUNAL DE BRONQUITIS INFECCIOSA EN UNA GRANJA AVICOLA DE POLLOS DE ENGORDE EN COLOMBIA

Persistence of Vaccine Infectious Bronchitis Virus in a Broiler Farm in Colombia

Diana Claudia Marcela Álvarez Espejo^{1*}, *Javier Andrés Jaimes-Olaya*², *Jairo Jaime Correa*¹,
*Gloria Consuelo Ramírez Nieto*¹ y *Víctor Julio Vera Alfonso*¹

¹Grupo de Microbiología y Epidemiología Veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá D.C. ²Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de la Salle, Bogotá D.C. - Colombia. *E-mail: dcmalvareze@gmail.com.

RESUMEN

Se evaluó la carga viral del virus de bronquitis infecciosa aviar (VBIA) en una granja de pollos de engorde donde previamente se identificó su presencia por la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR). Se utilizaron aves vacunadas con un inmunógeno vivo atenuado Massachusetts H120, en condiciones de campo y en condiciones de aislamiento y aves no vacunadas alojadas en campo. Se tomaron muestras de hisopados traqueales cada cuatro días, desde el 1 día hasta el día 40 post vacunación. En las aves alojadas en granja no se observaron signos clínicos compatibles con la enfermedad, aunque se detectó el VBIA por qRT-PCR en el grupo vacunado los días 24 y 28 y el día 24 en el grupo no vacunado. En las aves en condiciones de semi-aislamiento, el virus se detectó únicamente el día 28. Posteriormente se realizó la caracterización de las cepas detectadas mediante la secuenciación de nucleótidos de la región S1 del VBIA donde se observó similitud con cepas de origen vacunal del serotipo Massachusetts H120. Se pudo concluir que existe persistencia del VBIA en la granja, en ausencia de sintomatología clínica o de lesiones compatibles con la enfermedad. Igualmente se comprobó la recirculación del virus vacunal a través de la secuenciación de nucleótidos. La ausencia de signos clínicos, sumado a los resultados negativos en la qRT-PCR entre los días 1 – 20, pudo ser consecuencia del cambio en el esquema de vacunación contra la enfermedad de Gumboro en la granja, donde se remplazaron tres vacunas vivas con una vacuna recombinante, modificando de forma positiva la protección contra dicha entidad y disminuyendo la susceptibilidad de las aves

a la BIA. Los resultados de este estudio son una base para investigaciones posteriores que evalúen recirculación e importancia de los VBIA vacunales en condiciones de campo.

Palabras clave: Virus de bronquitis infecciosa, qRT-PCR, persistencia viral.

ABSTRACT

An assessment of viral charge of the infectious bronchitis virus (IBV) was conducted in a broiler flock, where previously the virus was identified by reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR). Presence of IBV was determined in vaccinated poultry with Massachusetts H120 live attenuated immunogen and in non-vaccinated poultry, under field and semi isolation conditions. Samples of tracheal swabs were taken for every four days, since day 1 until 40 days post vaccination. In poultry under the field conditions, IBV was detected by qRT-PCR between 24 – 28 d-old. IBV was detected in vaccinated poultry under the field conditions at 24 – 28 d and in non-vaccinated under the field conditions at 24 d. In the case of vaccinated poultry under the semi-isolation conditions, virus was detected at 28 d. Characterization of the detected strains was made by nucleotide sequencing of the hypervariable region 1 of the IBV S1 gene. Similarity was observed with vaccine derived strain of Massachusetts H120 serotype. It was concluded that there is a presence of the IBV in the farm, in absence of clinical signs or lesions, compatible with the disease. Also found the virus vaccine circulation through nucleotide sequencing. The absence of clinical signs, coupled with the negative results in the qRT-PCR between days 1 – 20, could be a consequence of the change in the vaccination program against Gumboro disease in the farm, where tree live

vaccines were replaced with a recombinant vaccine, positively modifying the protection against that entity and decreasing the susceptibility of the birds to the IBV. The results of this study are a basis for further research that assesses the IBV vaccine circulation and its role under field conditions.

Key words: Infectious bronchitis virus, qRT-PCR, viral persistence.

INTRODUCCIÓN

La bronquitis infecciosa aviar (BIA) es una enfermedad causada por el virus perteneciente a la familia *Coronaviridae* y género *Coronavirus*, el cual se encuentra entre las patologías respiratorias de mayor importancia en pollos (*Gallus gallus*) de engorde y reproductivas en ponedoras comerciales, siendo la causa de múltiples pérdidas económicas debido a efectos, tales como la disminución en la ganancia de peso, el aumento de conversión alimenticia, la disminución en la postura, la mala calidad del huevo y la presencia de enfermedades secundarias, causadas por bacterias como: *Escherichia coli*, *Mycoplasma sinoviae* y *Mycoplasma gallisepticum* [10]. La BIA generalmente ocasiona cuadros clínicos respiratorios, que comienzan luego de un período de incubación de 18 a 36 horas, acompañados posteriormente de tos, estornudos y ruidos traqueales [11].

El virus de BIA (VBIA) presenta serotipos como: Massachusetts, Connecticut, Arkansas, Holte, Gray, entre otros, los cuales están distribuidos mundialmente y algunos de éstos se utilizan como antígenos vacunales [13, 16, 26]. En Colombia, la BIA se encuentra diseminada en las granjas avícolas a pesar de los constantes programas de control y prevención fundamentados en el uso de medidas de bioseguridad y la utilización de vacunas vivas atenuadas e inactivadas [3, 7, 15]. La situación sanitaria de la enfermedad en Colombia fue estudiada por Alvarado y col. [3] determinando el surgimiento de cuatro grupos genotípicos y confirmando por medio de la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa reversa (RT-PCR) la presencia de cepas de campo que poseen alta similitud con los serotipos vacunales Massachusetts y Connecticut, a pesar de que en el país solo está autorizada la vacunación con el primero.

Actualmente, el sector avícola colombiano cuenta con el diagnóstico molecular mediante el uso de la técnica de RT-PCR, la cual se realiza en laboratorios de diagnóstico del sector público y privado a partir de muestras de tráquea e hisopos traqueales principalmente [3]. Empleando técnicas como la secuenciación de nucleótidos, a partir de muestras de ácido ribonucleico (ARN) extraído de tejidos de animales infectados naturalmente se han detectado cepas que presentan alta similitud filogenética con cepas de origen chino [18] y cepas que poseen similitud con serotipos de origen portugués (datos sin publicar). La detección de cepas europeas y asiáticas puede ser indicativa de la grave problemática sanitaria existente en el país, lo

cual compromete la efectividad de los planes vacunales permitiendo el establecimiento de la enfermedad en las granjas.

Debido a esto, los programas de vacunación deben tener en cuenta la determinación de la cepa del virus causante de la enfermedad en el campo, para así elegir la cepa vacunal más adecuada. En condiciones experimentales se ha observado que, luego de la vacunación, un 10% de la población vacunada no queda protegida correctamente contra un desafío con el mismo virus vacunal [9, 14, 29]. En los programas de inmunización para pollos de engorde se emplean vacunas vivas atenuadas, las cuales son frecuentemente administradas al primer día de edad en la planta de incubación, aunque se ha reportado el uso de revacunación alrededor del día 15, la cual se puede realizar con diferentes serotipos con el fin de proteger a las aves ante un desafío tardío con el virus en granja [4, 10, 23, 27].

En relación a la recirculación del VBIA en granjas avícolas se ha determinado la existencia de infecciones persistentes en pollo de engorde y ponedora comercial [12], dado que la infección puede permanecer intacta a la acción de los anticuerpos recirculantes en el tracto respiratorio y digestivo [28]. Se ha reportado la excreción intermitente del virus en gallinas ponedoras vacunadas al primer día de edad, las cuales excretaron el virus a la semana 19 debido probablemente al estrés producido por el inicio de la postura [19], así como la excreción del virus vacunal en pollo de engorde, desde el día 21 hasta el día 35 [28]; esto podría indicar la recirculación del virus en la granja generando infecciones subclínicas que podrían afectar el tracto reproductivo de las aves de postura y permitir la ocurrencia de infecciones bacterianas secundarias en el tracto respiratorio en pollo de engorde [11].

El objetivo del presente estudio fue evaluar la dinámica de presentación del VBIA, desde el primer día de edad hasta el día 40, mediante su cuantificación a través de la reacción en cadena de la polimerasa transcripción reversa en tiempo real (qRT-PCR) en una granja de pollos de engorde, donde tres meses antes se había detectado el agente por RT-PCR, lo cual sugirió la presencia del agente en esta explotación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación geográfica

El experimento se realizó en dos lugares diferentes: El primer sitio fue en una granja comercial situada en el municipio Fusagasugá, departamento de Cundinamarca, a una altura de 1728 m.s.n.m., temperatura promedio de 19°C, donde se detectó previamente el virus de BIA mediante el RT-PCR [4]. El segundo sitio fue una unidad de aislamiento donde las aves se encuentran aisladas de personal y aves silvestres, ubicada en las instalaciones del edificio de Investigaciones Avícolas de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, D.C., a una altura de 2600 m.s.n.m. y una temperatura promedio de 15,2°C [2].

Aves

Ciento treinta y dos aves de un día de edad, de la estirpe Ross 308 fueron distribuidas aleatoriamente en tres grupos experimentales de 44 aves c/u, denominados grupo 1, grupo 2 y grupo 3, distribuyéndose: Grupo 1: aves vacunadas por aspersión en planta de incubación contra la BIA el primer día de edad, las cuales fueron identificadas por medio de un anillo de color rojo en el tarso derecho. Grupo 2: aves no vacunadas contra la BIA, a las cuales no se les colocó anillo de identificación. Las aves de los grupos 1 y 2 fueron alojadas en el mismo galpón de la granja avícola. Grupo 3: aves vacunadas contra el BIA el primer día de edad, alojadas en condiciones de aislamiento en la Universidad Nacional de Colombia, las cuales fueron identificadas por medio de un anillo de color azul en el tarso derecho. Los tres grupos recibieron concentrado y agua a voluntad, así como vacunas contra enfermedades de Newcastle, Marek, Gumboro y viruela aviar. Para Gumboro se utilizó una vacuna recombinante. El plan vacunal empleado se relaciona en la TABLA I.

Toma de muestras

Se tomaron muestras de hisopos traqueales de cuatro aves por grupo en los días 1 – 4 – 8 – 12 – 16 – 20 – 24 – 28 – 32 – 36 y 40. Las muestras del día 1 fueron tomadas 6 horas después de la vacunación. Los hisopos fueron sumergidos en 1 mL de solución buffer fosfato (PBS) 1X (pH 7,4) y almacenados a -70°C en un congelador Thermo Scientific® Revco ExF, EUA.

Extracción de ARN

Con el fin de realizar la extracción del ARN de las muestras de hisopo traqueal se utilizó el kit de extracción de ARN PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Catalog No 12183-018 Invitrogen® Corporation, CA, EUA). El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Reacción en cadena de la polimerasa transcripción reversa en tiempo real (qRT-PCR)

Por medio de la técnica de qRT-PCR se detectó y cuantificó de forma absoluta el cADN del VBIA, en las muestras de hisopados traqueal proveniente de las aves del experimento. Se emplearon la pareja de iniciadores BIA5'GU391 e BIA3'GL533, (TABLA II) los cuales amplifican un segmento aproximado de 143 pb entre los nucleótidos 391 – 512 donde se localiza la región no transcrita 5' la cual es altamente conservada [8].

Con el fin de realizar la qRT-PCR se empleó el kit de qRT – PCR: SuperScript™ III Platinum® Sybr® Green One-Step qRT-PCR Kit (Cat. No. 11736-059, Invitrogen® Corporation, CA, EUA). La mezcla de RT – PCR de 20 µL contiene: 10 µL del 2X Sybr Green Reaction Mix, 0,4 µL SuperScript™ III RT / Platinum® Taq Mix, 1 µL de cada iniciador (10 µM; Invitrogen® Corporation, CA, EUA) 0,8 µL de albumina de suero bovina (BSA), 2 µL de ARN, y 4,8 µL de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) UltraPure™ (Invitrogen® Corporation, CA, EUA).

Las condiciones de la qRT – PCR para la detección y cuantificación absoluta del VBIA [8] se describen a continuación: RT: 1 ciclo de 50°C por 3 minutos; hot Start: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos; amplificación: 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 1 minutos y 80°C por 0 segundos; extensión final: 1 ciclo de 72°C por 2 minutos. La técnica se realizó en el equipo LightCycler® 2.0 (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), con capilares de 20 µL, LightCycler® Capillaries (20 µL) (Cat. No. 04 929 292 001. Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Así mismo se realizó una curva de Melting [8] para comprobar la especificidad de los iniciadores con la secuencia deseada para la detección del virus. Las condiciones de la curva de Melting fueron: 1 ciclo de 95°C por 0 segundos, 1 ciclo de 70°C por 15 segundos y 1 ciclo de 95°C por 0 segundos (lectura continua), y fue realizada en el mismo equipo LightCycler® 2.0.

TABLA I
PLAN VACUNAL APLICADO A LAS AVES EN EL ESTUDIO DE EVALUACIÓN PROSPECTIVA DEL VIRUS VACUNAL DE BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR.

Vacuna	Tipo de Vacuna	Día	Fabricante	Cepa	Vía	Título vacunal	Dosis aplicada por ave
Enfermedad de Marek Enfermedad de Gumboro	Virus vivo recombinante	1	Merial	HVT - Faragher 52/70	Subcutánea	3,6 log ₁₀ UPF	0,2 mL
Viruela Aviar	Virus activo congelado	1	Merial	FTP-ATCC	Subcutánea	102.DICT 50/dosis	0,2 mL
Enfermedad de Newcastle	virus vivo atenuado	1	Merial	B1	Ocular	106 DIEP 50/dosis	0,03 mL
Bronquitis infecciosa	virus vivo atenuado	1	Meria	Massachusetts H120	Aspersión	102.5 DIEP 50/dosis	0,03 mL
Enfermedad de Newcastle	virus vivo atenuado	8-19	Merial	La Sota	Ocular	10 ⁸ DIEP 50/mL	0,03 mL

TABLA II
INICIADORES UTILIZADOS EN LA PRUEBA DE qRT-PCR.

Gen	Iniciador	Dirección	Secuencia (Dirección 5' - 3')	Tamaño del producto (pb)	Referencia
Región no transcrita 5'	BIA5'GU391	5'	GCTTTTGAGCCTA GCGTT	143	Callison y col. [8]
	BIA3'GL533	3'	GCCATGTTGTCAC TGTCTATTG	143	

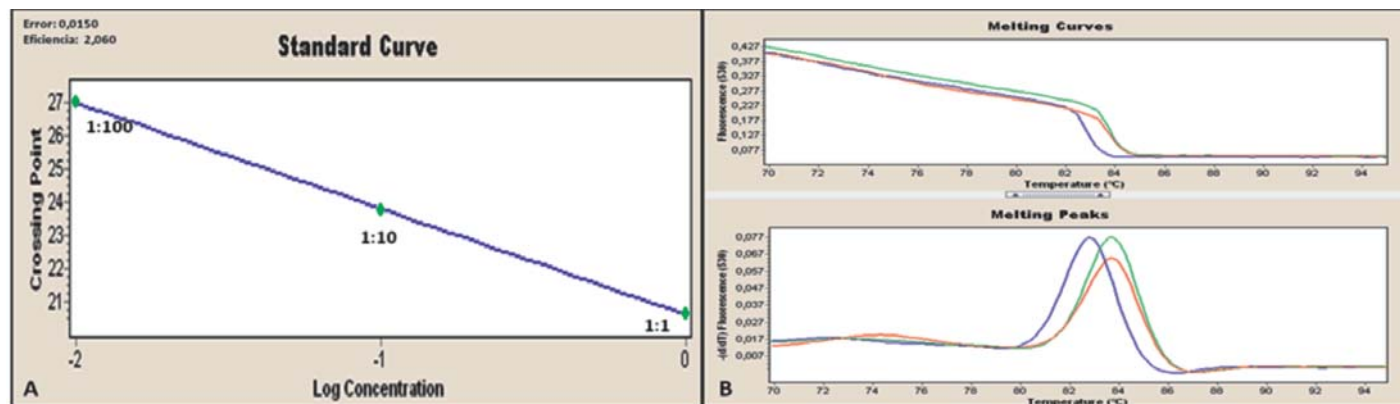


FIGURA 1. A: CURVA PATRÓN LOG₁₀ DE TRES DILUCIONES: 1:1, 1:10 Y 1:100. EFICIENCIA: 2,060. ERROR: 0,0150. ECUACIÓN DE LA CURVA: Y = -3,185X + 30,15. R² = 0,999. B: CURVA DE MELTING PATRÓN LOG₁₀ DE 3 DILUCIONES.

Curvas estándar y cuantificación absoluta del BIA

Para determinar la concentración del virus en las muestras analizadas por medio de cuantificación absoluta con qRT-PCR se realizó una curva patrón con diluciones logarítmicas en base 10 (Log₁₀), de un ARN proveniente de una vacuna contra el VBIA (con título 10² DIE_{50%}), el cual fue cuantificado por medio del kit Quant-iT™ RNA Assay Kit (Invitrogen®). Se encontró que el virus contenido en la vacuna se puede detectar hasta la tercera dilución en base 10 (dilución 1/1000) (FIG. 1), lo cual fue comprobado por medio de la curva de Melting. El análisis de la curva patrón se realizó por medio del Software LightCycler® Version 4.0 (Roche Applied Science) [8]. La ecuación de la curva y la determinación del coeficiente de determinación múltiple (R²), se calcularon de acuerdo a lo reportado por Callison y col. [8]. Posterior a la elaboración de la curva patrón se realizó la comparación del punto en el cual se inició la detección del punto de corte (CP) de cada muestra, con la curva patrón, por consiguiente una muestra se consideró como positiva cuando el CP fue igual o inferior del CP de la última dilución de la curva patrón (1/1000). Posteriormente se identificó el título final de virus encontrado en cada muestra de acuerdo al título de cada una de las diluciones de la curva patrón.

Secuenciación de nucleótidos y elaboración del dendograma

Se realizó la secuenciación de nucleótidos de las muestras positivas, los cuales fueron analizados por la técnica de RT-PCR descrita por Moscoso y col. [25]. Estas muestras fue-

ron enviadas a MacroGen® (Seoul, Korea) para la secuenciación de nucleótidos. Se elaboró el dendograma por medio del análisis filogenético de Neighbour-Joining utilizando el programa Bioedit Sequence Alignment Editor® [8]. Las secuencias obtenidas se ensamblaron y editaron para ser comparadas con secuencias de cepas vacunales y secuencias de origen colombiano con el programa Mega® versión 4.02 para Windows® [8] (Center for Evolutionary Functional Genomics, AZ, EUA). Los números de acceso al Genbank utilizados para el dendograma son: Aislamiento 299402: AY606324; Arkansas 99: L10384; Arkansas DPI: AF094815; Beaudette: DQ001336; Connecticut: L18990; CO1657T: AY604546; CO1692T: AY604547; CO8043 CT: AY604550; CO8043T: AY604549; CO1694T: AY604548; CU510: AY561716; DEO72: AF274435; Florida: 18288: AF274437; H120: J04329; Holte: L18988; Massachusetts 41: X04722; Aislamiento NV M41: AY561711.

Análisis estadístico

Se utilizó la estadística descriptiva con el fin de analizar la variable cuantitativa: concentración del virus obtenido por qRT – PCR en cada grupo y cada día de muestreo. Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wills a las variables cuantitativas cuantificación absoluta para verificar los supuestos del modelo [22]. El experimento se analizó utilizando un modelo completamente al azar con arreglo de parcelas divididas en el tiempo (3 x 11). Se realizó la prueba de normalidad de los datos, la cual fue negativa analizándose posteriormente por medio de una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis [22]. Los

análisis se realizaron utilizando el programa Statistix Version 1.0 (Analytical Software, EUA) [22].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La capacidad de detección de la técnica de qRT-PCR fue comprobada por medio de la detección de un RNA proveniente de una vacuna comercial viva atenuada contra la BIA. El producto de qRT-PCR fue visualizado por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (FIG. 2) y fue utilizado como control positivo en todos los ensayos.

Los resultados de la qRT-PCR para la detección del VBIA en los tres grupos experimentales (FIG. 3), tuvieron resultados similares en los días 1 – 4 – 8 – 12 – 16 – 20 – 36 - 40 con un CP superior a 23, lo cual fue indicativo de una baja o nula cantidad de virus para detectarse por la qRT-PCR (resultado negativo). En contraste, las muestras positivas presentaron un CP menor a 22, como se presenta en la TABLA III. Mediante el uso de la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis no se observaron diferencias significativas entre los grupos 1, 2 y 3 ($P > 0,05$) aunque se observaron diferencias significativas entre los días de muestreo ($P < 0,05$).

El análisis filogenético de Neighbour-Joining mostró que las cuatro muestras positivas por la técnica de qRT-PCR, provenientes del grupo 1, día 24 (Colombia09Unal09), grupo 1, día 28 (Colombia09Unal10), grupo 2, día 24 (Colombia09Unal11) y grupo 3 día, 28 (Colombia09Unal12) se encuentran estrechamente relacionadas con la cepa Massachusetts H120, con porcentaje de identidad del 99% el cual corresponde con la vacuna viva atenuada aplicada a las aves (FIG. 4) [13, 21, 24].

La detección del virus por qRT-PCR los días 24 y 28 en las aves vacunadas en campo y en el día 28 en las aves en condiciones de aislamiento está relacionada con la persistencia que puede inducir el VBIA en el hospedador. Este hallazgo concuerda con lo reportado por Naqi y col. [28], quienes monitorearon del día 1 al día 175, pollitos vacunados al primer día de edad con una vacuna viva del serotipo Massachusetts y mantenidos bajo condiciones de estricto aislamiento, detectándose la excreción intermitente del virus entre los días 21 - 35 y la no excreción viral hasta el día 74 (39 días de no excreción) detectándose nuevamente el día 75 el virus en hisopos traqueales, hisopos cloacales y tráquea.

En este mismo estudio se analizaron por RT-PCR los genes N y S1 de las cepas detectadas, observándose la ausencia de cambios genéticos. Estos autores sugieren que, el virus puede permanecer intacto en el tracto respiratorio y digestivo gracias a la pobre influencia que tienen los anticuerpos circulantes sobre estos órganos [28].

Recientemente se han reportado eventos similares de persistencia viral [12] como el surgimiento de infecciones persistentes en pollo de engorde y ponedora comercial. Jones y col. [19] mencionan la excreción intermitente del virus en gallinas

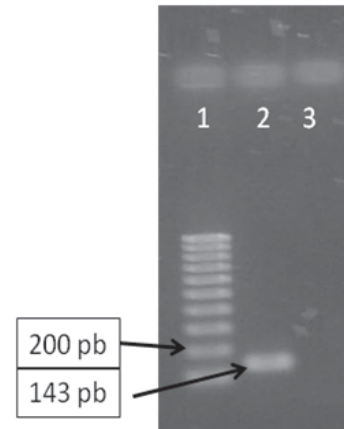


FIGURA 2. PRODUCTOS DE LA RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE BIA POR MEDIO DE LOS INICIADORES VBIA5'GU391 Y VBIA3'GL533: CARRIL 1) MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 100 – 1000 BP; 2) CONTROL POSITIVO CEPA MASSACHUSETTS; 3) CONTROL NEGATIVO.

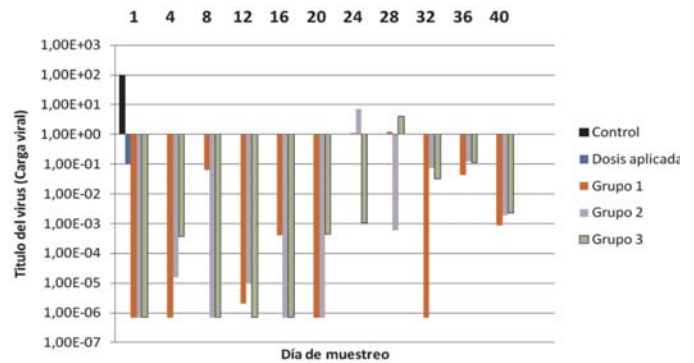


FIGURA 3. CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DEL VBIA EN LOS HISOPOS TRAQUEALES. CONTROL: TÍTULO DE VIRUS EN LA VACUNA SIN DILUIR (1×10^2 O $1,00E+2$). DOSIS APLICADA: DOSIS VACUNAL APLICADA A CADA AVE (1×10^{-1} O $1,00E-01$). NÓTESE LA PRESENCIA DE VIRUS EN EL GRUPO 1 LOS DÍAS 24 Y 28, EN EL GRUPO 2 EL DÍA 24 Y EN EL GRUPO 3 EL DÍA 28. NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS ($P > 0,05$).

ponedoras posterior a la vacunación al primer día de edad, donde se observa la excreción del virus en la séptima semana de edad, luego desaparece, y se re-excreta al comienzo de la madurez sexual, lo que puede asociarse con la habilidad de los *Coronavirus* de establecer infecciones persistentes en el sistema respiratorio y digestivo del hospedador [1]. En este experimento, la persistencia encontrada puede ser el resultado de la vacunación contra el agente, puesto que se ha relacionado la inmunización con el surgimiento de nuevos serotipos de virus y con la infección persistente en las aves [28].

La falta de signos clínicos y lesiones compatibles con la enfermedad en las aves durante el experimento en campo, sumado a los resultados negativos en la qRT-PCR entre los días 1 – 20, conllevan a discutir acerca de la presencia del

TABLA III
MUESTRAS POSITIVAS AL VBIA POR qRT-PCR.

Grupo experimental	Día de muestra	CP	Cuantificación (Título viral)
1	Día 24	16	1,10E+00
	Día 28	17	1,21E+00
2	Día 24	10	7,29E+00
3	Día 28	15	4,11E+00

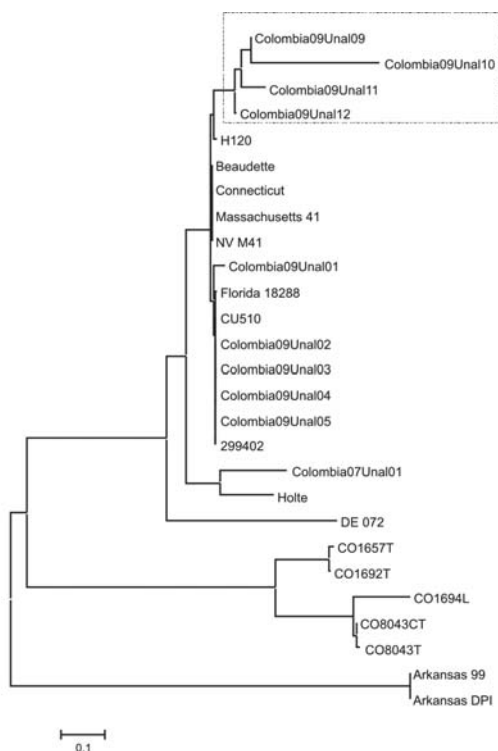


FIGURA 4. ÁRBOL FILOGENÉTICO. SE OBSERVA LA UBICACIÓN DE LAS CEPAS COLOMBIA09UNAL09, COLOMBIA09UNAL10, COLOMBIA09UNAL11 Y COLOMBIA09UNAL12 Y LA ESTRECHA RELACIÓN CON LA CEPA VACUNAL MASSACHUSETTS H120.

VBIA en la granja, teniendo en cuenta que, en la historia de la misma se reportaba la presencia de cuadros clínicos de BIA. Sin embargo, la ausencia de cuadros clínicos puede relacionarse con un cambio en el esquema de vacunación contra la enfermedad de Gumboro en la granja, el cual estaba compuesto por tres vacunas a virus vivo atenuado contra Gumboro, pero desde el lote anterior al experimento se reemplazaron las tres vacunas vivas con una vacuna recombinante, la cual tiene menor impacto sobre el sistema inmune de las aves [20] modificando de forma positiva la protección contra dicha entidad y disminuyendo la susceptibilidad de las aves a la presentación otras enfermedades [20]. En el caso de la BIA, las manifestaciones clínicas se han relacionado con la inmunodeficiencia producida por la enfermedad de Gumboro [17] y por la anemia infecciosa aviar [31].

La importancia del virus de la enfermedad de Gumboro fue demostrada por Toro y col. [32], quienes evaluaron los efectos de la inmunodeficiencia viral en la infección de VBIA en pollos de engorde observando que, los signos clínicos y las lesiones histopatológicas fueron mayores en las aves que se encontraban inmunosuprimidas por la enfermedad de Gumboro comparadas con aves inmunocompetentes [17, 32].

Por otro lado, el día 24 se detectó el virus en el grupo de aves no vacunadas (grupo 2), sin presencia de sintomatología clínica de la enfermedad. Este hallazgo puede sugerir que en la granja se está presentando una recirculación del antígeno vacunal, lo cual se comprobó a través de la secuenciación de nucleótidos [8, 24, 25]. Esta recirculación es posible debido a las características de la vacuna utilizada en la granja, la cual al ser viva atenuada, puede ser re-excretada por las aves vacunadas y así transmitirse a las aves susceptibles [24].

La respuesta a la vacunación contra el VBIA evidenciada qRT-PCR en los tres grupos experimentales del presente estudio fue similar a la reportada por otros autores [30]. La protección vacunal contra esta entidad es un factor importante que está influenciado por otros aspectos, como el tipo de inmunógeno utilizado, la edad de las aves y el procedimiento, los que al ser modificados pueden cambiar la inmunidad de la población, tanto de forma positiva como negativa [30]. En resultados del experimento publicados anteriormente [5, 6] se encontró una adecuada capacidad protectora de la vacuna utilizada, caracterizada por una disminución constante en los títulos de anticuerpos desde el primer día de edad hasta el día 20, alcanzando una media geométrica (MGE) entre 204 - 417 y un coeficiente de variación (CV) entre 31 - 94%. Posteriormente, para el día 24 se observó un leve incremento de la MGE, la cual fue de 554 en el grupo 1 y 381 en el grupo 2, hasta el día 40 donde se observó un MGE de 1653 en el grupo 1 y 323 en grupo 2, con un CV de 24,6 y 64,4%, respectivamente. En el grupo tres, a partir del día 20 se observó una seronegatividad constante hasta el día 40 [6].

CONCLUSIONES

La evaluación de la dinámica del VBIA en la granja de pollos de engorde seleccionada, permitió determinar que, posterior a la vacunación con un inmunógeno vivo atenuado, la carga viral es muy baja para ser detectada por pruebas como qRT-PCR, a

pesar del adecuado estatus inmunológico de las aves. El hallazgo del VBIA de origen vacunal en los días 24 y 28 en los tres grupos experimentales puede ser indicativo de la persistencia del agente en aves sanas, lo cual hace necesario continuar con estudios que contribuyan a determinar los efectos de la persistencia viral en aves que se encuentren en condiciones de riesgo. Así mismo se demostró el impacto que tuvo el cambio en el plan vacunal contra la enfermedad de Gumboro en la presentación de la BIA, ya que se evidenció la desaparición de los signos clínicos en la granja, a pesar de la presencia del VBIA. Los resultados obtenidos en este estudio son de interés, tanto para la academia como para la industria avícola, y se constituyen en una base para investigaciones posteriores en el impacto de la vacunación y la epidemiología de la BIA.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la empresa Pollo Andino S.A. por brindar la oportunidad de trabajar en sus granjas y contribuir al desarrollo del proyecto; al personal del edificio de Investigaciones Avícolas y del laboratorio de Patología Aviar de la Universidad Nacional de Colombia por prestar su colaboración y facilitar las instalaciones para el desarrollo del experimento. Este proyecto fue financiado por la División Nacional de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá D.C., código 8010026.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADAMI, C.; POOLEY, J.; GLOMB, J.; STECKER, E.; FAZAL, F.; FLEMING, J.; BAKER, S. Evolution of Mouse Hepatitis Virus (MHV) during Chronic Infection: Quasispecies Nature of the Persisting MHV RNA. **Virology**. 209:337-346.1995.
- [2] ALCALDIA MAYOR DE BOGOTA D.C. **Atlas Ambiental de Bogotá D.C.** Editorial Secretaría Distrital de Ambiente. Pp 41- 47. 2007.
- [3] ALVARADO, I.; VILLEGAS, P.; MOSSOS, N.; JACKWOOD, M. Molecular Characterization of Avian Infectious Bronchitis Virus Strains Isolated in Colombia During 2003. **Avian Dis.** 49:494-499. 2005.
- [4] ALVARADO, I.; VILLEGAS, P.; EL-ATTRACHE, J.; JACKWOOD, M. Detection of Massachusetts and Arkansas Serotypes of Infectious Bronchitis Virus in Broilers. **Avian Dis.** 50: 292-297. 2006.
- [5] ALVAREZ, D. Evaluación prospectiva de la carga viral del virus de Bronquitis Infecciosa Aviar en granjas avícolas de pollo de engorde con antecedentes de presencia de la enfermedad. Universidad Nacional de Colombia. Tesis de Grado. 79-81. 2009.
- [6] ALVAREZ, D.; USMA, J.; JAIME, J.; VERA, V. Dinámica serológica del virus de Bronquitis Infecciosa en una granja de pollo de engorde del departamento de Cundinamarca. **Rev. Fac. de Med. Vet. y Zoot.** 56(2):105-112. 2009.
- [7] BOX, P.; BERESFORD, A.; ROBERTS, B. Protection of laying hens against infectious bronchitis with inactivated emulsion vaccines. **Vet. Rec.** 106:264-268.1980.
- [8] CALLISON, S.; HILT, D.; BOYNTON, T.; SAMPLE, B.; ROBISON, R.; SWAYNE, D.; JACKWOOD, M. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. **J. Vir. Meth.** 138:60-65. 2006.
- [9] CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; BRITTON, P.; NAYLOR, C.J. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions, **Avian Pathol.** 28:593-605. 1999.
- [10] CAVANAGH, D.; NAQI, S. Infectious Bronchitis. In: **Diseases of Poultry**. Saif Y.M.; Barnes H.J.; Glisson J.R.; Fadly A.M.; McDougald L.R.; Swayne D.E. (Eds.). 11th Ed. Iowa, Ames. Ed Iowa State University Press. Pp 161-179. 2003.
- [11] CAVANAGH, D. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. **Avian Pathol.** 32(6): 567-582. 2003.
- [12] CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Vet. Res.** 38:281-287. 2007.
- [13] CHEN, H.; HUANG, Y.; WANG, C. Identification of Taiwan and China-like recombinant avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. **Virus Res.** 140: 121-129. 2009.
- [14] COOK J.; ORBELL, S.; WOODS, M.; HUGGINS, M. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous types. **Avian Pathol.** 28:47-49. 1999.
- [15] DARBYSHIRE, J.; PETERS, R. Sequential development of humoral immunity and assesment of protection in chickens following vaccination and challenge with avian infectious bronchitis virus. **Res. in Vet. Sci.** 37:77-86. 1984.
- [16] JACKWOOD, M. Bronquitis Infecciosa: Hallazgos recientes en cepas del virus de la Bronquitis Infecciosa. **XI Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar.** Georgia, 05/22 – 26. EUA. Pp 1-6. 2006.
- [17] JAIMES, J.A. Uso de técnicas moleculares para la identificación y caracterización de cepas de campo y cepas vacunales del virus de la enfermedad de Gumboro. Universidad Nacional de Colombia. Tesis de Grado. Pp 28-29. 2008.
- [18] JAIMES, J.; VERA, V.; MOSSOS, N. Evaluación clínica, serológica y molecular de la coinfección con el virus de

- la enfermedad de Newcastle y con el virus de bronquitis infecciosa. **Rev. Col. de Cien. Pec.** 20(4):595-596. 2007.
- [19] JONES, R.; AMBALI, A. Re-excretion of an enterotropic infectious bronchitis virus by hens at point of lay after experimental infection at day old. **Vet. Rec.** 120:617-620. 1987.
- [20] LE GROS, F.; DANCER, A.; GIACOMINI, C.; PIZZONIB, L.; BUBLLOT, M.; GRAZIANIC, M.; PRANDINIC, F. Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. **Vaccine.** 27:592-596. 2009.
- [21] LIU, S.; CHEN, J.; HAN, Z.; ZHANG, Q.; SHAO, Y.; KONG, X.; TONG, G. Infectious bronchitis virus: S1 gene characteristics of vaccines used in China and efficacy of vaccination against heterologous strains from China. **Avian Pathol.** 35(5):394-399. 2006.
- [22] MARTINEZ, N.; MARTINEZ R. Análisis de datos estándar y no estándar. **Diseño de Experimentos.** Fondo Nacional Universitario. Santafé de Bogotá, Colombia. 15-20. 1997.
- [23] MATTHIJS, M.; BOUMA, A.; VELKERS, F.; VAN ECK, J.; STEGEMAN, J. Transmissibility of Infectious Bronchitis Virus H120 Vaccine Strain among Broilers under Experimental Conditions. **Avian Dis.** 52:461-466. 2008.
- [24] MCKINLEY, E.; HILT, D.; JACKWOOD, M. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. **Vaccine.** 26:1274-1284. 2008.
- [25] MOSCOSO, H.; RAYBON, E.; THAYER, S.; HOFACRE, C. Molecular Detection and Serotyping of Infectious Bronchitis Virus from FTA - Filter Paper. **Avian Dis.** 49:24-29. 2005.
- [26] MUNEER, M.A.; NEWMAN, J.A.; HALVORSON, D.A.; B. SIVANANDAN, V.; COON, C.N. Effects of avian infectious bronchitis virus (Arkansas strain) on vaccinated laying chickens. **Avian Dis.** 31:820-828. 1987.
- [27] MURCIA, D.; PULIDO, M.; CASTAÑEDA R. Evaluación de dos planes vacunales para bronquitis infecciosa en pollo de engorde. En: Pasantía en el laboratorio de Patología Aviar de la facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia en el primer semestre del 2006. Pp 20-25. 2006.
- [28] NAQI, S.; GAY, K.; PATALLA, B.; MONDAL, S.; LIU, R. Establishment of Persistent Avian Infectious Bronchitis Virus Infection in Antibody-Free and Antibody-Positive Chickens. **Avian Dis.** 47:594-601. 2003.
- [29] OTSUKI, K.; NAKAMURA, T.; KUBOTA, N.; KAWAOKA, Y.; TSUBOKURA, M. Comparison of two strains of avian infectious bronchitis virus for their interferon induction viral growth and development of virus neutralizing antibody in experimentally infected chickens. **Vet Microbiol.** 15:31-40. 1987.
- [30] SMITH, J. Control de la Bronquitis Infecciosa. **Plumazos.** 31:4-18. 2007.
- [31] TODD, D. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. **Dev. Comp. Imm.** 24: 247-255. 2000.
- [32] TORO, H.; VAN SANTEN, V.; LI, L.; LOCKABY, L.; VAN SANTEN, E.; HOERR, F. Epidemiological and experimental evidence for immunodeficiency affecting avian infectious bronchitis. **Avian Pathol.** 35(6):455-464. 2006.