

COMPARACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA ESTÁNDAR Y ELISA DE RANGO EXTENDIDO PARA LA ENFERMEDAD INFECCIOSA DE LA BURSA EN AVES

Magali Salas M.¹, Eliana Icochea D'A.² y César Gavidia Ch.³

ABSTRACT

A total of 180 paired serum samples from 3 breeder groups (broiler's grandparents and parents), and layers) were used to detect antibodies against the Infectious Bursal Disease virus through the ELISA test. Animals were tested at three ages (1-3 days, 16, and 27 weeks of age). Two commercial kits were tested: the standard ELISA (ELISA-IBD) and the new named Extended Range ELISA (ELISA-XR). The latter detected higher titres of antibodies than the ELISA-IBD. Broiler's parents had the higher levels of antibodies indicating better immune response than the other two groups. The titre distribution had a more uniform distribution using the ELISA-IBD rather than the ELISA-XR; however all titres were above the minimum accepted ranges when the ELISA-XR was used ($p < 0.05$). The results indicated that the new ELISA-XR was more efficient in detecting antibodies against the Infectious Bursal Disease virus.

Key words: Infectious Bursal Disease virus (IBDV), antibodies, ELISA Standard (ELISA IBD), ELISA of Extended Range (ELISA IBD-XR)

RESUMEN

Se utilizaron 180 muestras de suero pareadas procedentes de 3 lotes de reproductores abuelos y padres de pollos de carne y gallinas de postura, testadas entre 1 a 3 días, 16 y 27 semanas de edad para detectar anticuerpos contra el virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa, por la prueba de ELISA. Se compararon dos kits comerciales de ELISA, uno convencionalmente usado "ELISA IBD" y uno nuevo de Rango Extendido denominado "ELISA IBD-XR". La prueba de ELISA IBD-XR detectó más títulos que la prueba de ELISA estándar. Los reproductores padres de carne mostraron los mayores niveles de anticuerpos mostrando tener mejor capacidad de respuesta inmune que las reproductoras abuelas y las gallinas de postura. La distribución de títulos entre ambas pruebas mostró mayor uniformidad en la prueba de ELISA Estándar que en la de Rango Extendido, sin embargo, a diferencia de la prueba de ELISA Estándar todos los títulos estuvieron por encima de los rangos mínimos aceptables ($p < 0.05$). Estos resultados permiten concluir que el nuevo kit de ELISA de Rango Extendido fue más eficiente en detectar anticuerpos contra el virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa que el Kit de ELISA Estándar.

Palabras clave: Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (VEIB), anticuerpos, ELISA Estándar (ELISA IBD), ELISA de Rango Extendido (ELISA IBD-XR)

¹ Práctica privada

² Laboratorio de Patología Aviar y Producción Avícola, FMV-UNMSM. E-mail: micohead@vet.unmsm.edu.pe

³ Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva, FMV-UNMSM

INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades que causa más daño en la economía de las empresas avícolas es la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (EIB), caracterizada principalmente por su efecto de inmunosupresión en su presentación subclínica. Este virus tiene predilección por atacar los linfocitos B inmaduros de aves jóvenes, atrofiando la Bursa de Fabricio, lo cual causa graves daños en el sistema inmune del ave.

Durante los últimos años y debido a los cambios observados en el comportamiento del virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (VEIB) como la aparición de cepas variantes, la empresa privada⁴ ha desarrollado un kit de ELISA denominado ELISA de rango extendido para la detección de anticuerpos contra el VEIB. El kit está basado en la misma técnica de la prueba de ELISA estándar, utilizada convencionalmente, pero emplea como antígeno la proteína VP2 para recubrir las microplacas, parte hipervariable del gen que la codifica, con lo cual ha demostrado tener una mejor detección de anticuerpos específicos para una amplia variedad de antígenos del VEIB. Esta técnica es capaz de detectar tanto cepas clásicas como las variantes (Jackwood, 1997). El programa particular de ELISA, FlockChek, con el cual se trabajó en el presente estudio, permite estimar la cantidad de anticuerpos presente en una muestra de suero en particular.

La utilización de la prueba de ELISA, como un sistema de chequeo de parvadas, es el método más efectivo, ya que permite hacer un seguimiento de títulos y detectar anomalías en la curva de anticuerpos, en comparación a un estándar establecido por cada empresa. El responsable de la producción utiliza esta información para identificar y manejar efectivamente un problema de salud en los lotes de aves.

⁴ IDEXX Laboratories

El objetivo del presente estudio fue comparar dos pruebas serológicas: la prueba de ELISA Estándar y el ELISA IBD-XR para la detección de anticuerpos contra el VEIB.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

El tamaño de muestra se obtuvo mediante la fórmula de diferencia de medias. Para el presente trabajo, el tamaño de muestra fue de 20 aves por lote, siendo el total de lotes igual a 9 (n=180). Para el estudio, las aves fueron agrupadas tomando en cuenta el tipo de explotación (3 grupos) y la edad (3 grupos) como se detalla en el Cuadro 1.

Las muestras de sangre fueron colectadas mediante punción de la vena braquial con agujas desechables 21G x 1^{1/2}, en frascos de vidrio estériles, identificadas adecuadamente, y almacenadas en refrigeración a +4°C hasta su uso análisis.

Pruebas de ELISA

Las 180 muestras de suero pareadas fueron evaluadas simultáneamente por la prueba de ELISA Estándar (IBD) y ELISA de Rango Extendido (IBD-XR) para la detección de anticuerpos contra el VEIB.

Los materiales y reactivos utilizados son los mismos para las dos pruebas, con la diferencia que el antígeno es de origen bursal (gp58) para el caso del ELISA Estándar, y de origen viral (VP2) para el caso del ELISA de Rango Extendido.

Controles Positivo y Negativo

Para que el ensayo sea válido, la diferencia entre la absorbancia promedio para el control positivo y el control negati-

Cuadro 1. Distribución de los lotes de trabajo por línea de explotación y edad

Tipo de reproductores	1- 3 días	16 semanas	27 semanas
Abuelos de carne	Lote A	Lote D	Lote G
Padres de carne	Lote B	Lote E	Lote H
Postura	Lote C	Lote F	Lote I

vo (CPx-CNx) debió ser mayor que 0.075. La absorbancia promedio para el control negativo debió ser menor o igual que 0.150. La presencia o ausencia de anticuerpos contra el virus IBD se determinó por medio de una relación entre el valor de A(650) de la muestra con el promedio para el control positivo. El control positivo está normalizado y representa concentraciones significativas de anticuerpos anti-IBD en el suero de pollo. La concentración relativa de anticuerpos en la muestra se determinó a través del cálculo del cociente de la absorbancia de la muestra con respecto a la del control positivo (M/P).

Interpretación

Las muestras de suero que tuvieron cocientes M/P inferiores o iguales a 0.2 fueron consideradas negativas. Los cocientes M/P superiores a 0.2 (títulos superiores a 396) fueron considerados positivos indicando que hubo inmunización o exposición al virus IBD (IDEXX Laboratories, 1999).

Análisis Estadístico

Se aplicó el análisis de varianza de una sola vía para analizar las pruebas serológicas comparando cada etapa de vida y línea comercial. La prueba de Tukey fue aplicada para determinar diferencias entre promedios.

RESULTADOS

En el Cuadro 2 se puede observar que la prueba ELISA IBD-XR incrementó la capacidad en la detección de anticuerpos, com-

parado con la prueba ELISA Estándar para la EIB ($p < 0.05$). Por otro lado se pudo apreciar que los tres lotes de aves evaluadas mostraron el mayor nivel de anticuerpos a las 27 semanas. Así mismo, se puede observar que las reproductoras de carne poseen un perfil de respuesta inmune que sigue una tendencia ascendente para alcanzar su máximo nivel a las 27 semanas de edad. Las diferencias estadísticas entre promedios encontrados entre lotes de diferentes edades según la prueba utilizada se muestran en el Cuadro 2.

Los resultados indican que si bien se obtuvieron mayores títulos de anticuerpos con la prueba de ELISA IBD-XR en comparación con el ELISA Estándar, se obtuvo mayor uniformidad con la prueba del ELISA Estándar que con la prueba ELISA IBD-XR (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

En la crianza de aves reproductoras, ponedoras comerciales y pollos de carne se aplican intensos programas de vacunación. Sin embargo, un programa de vacunación es incompleto si no incluye el monitoreo serológico periódico a través del ciclo de vida a fin de determinar si el lote experimentó algún desafío en campo y evaluar la eficacia de la vacunación (Zander, 1997).

La prueba de ELISA es la prueba serológica más usada en la evaluación de anticuerpos del virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (Lukert y Saif, 1997). Durante la última década, debido a la presión

Cuadro 2. Títulos promedio obtenidos por la prueba ELISA Estándar (E) y de Rango Extendido (RE) en reproductores de carne abuelos y padres, y reproductoras de postura, en muestras colectadas a tres edades

Tipo de reproductores	Edad					
	1-3 días		16 semanas		27 semanas	
	E	RE	E	RE	E	RE
Abuelos de Carne	2,585 ^a	4,963 ^a	3,124 ^a	3,785 ^a	7,247 ^a	14,024 ^a
Padres de Carne	4,204 ^b	9,453 ^b	5,090 ^b	10,615 ^b	6,953 ^a	18,530 ^b
Postura	3,282 ^{ab}	4,279 ^a	2,278 ^a	4,154 ^a	4,197 ^b	5,131 ^c

a, b, c Valores con letras diferentes entre columnas (prueba de ELISA entre lotes de una misma edad) son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$)

Cuadro 3. Coeficientes de variación obtenidos por la prueba ELISA Estándar (E) y de Rango Extendido (RE) en reproductoras de carne abuelos y padres, y reproductoras de postura, en muestras colectadas a tres edades

Tipo de reproductores	Edad					
	1-3 días		16 semanas		27 semanas	
	E	RE	E	RE	E	RE
Abuelos de carne	39.3	47.2	21.9	62.5	23.5	34.1
Padres de carne	28.5	40.3	28.5	40.1	27.1	27.8
Postura	37.2	43.8	43.8	66.0	12.2	35.7

de selección ejercida por las vacunas y otros factores medioambientales, el virus ha sufrido variaciones antigénicas y como consecuencia de esto los anticuerpos contra serotipos variantes no son eficientemente detectados por la prueba de ELISA Estándar, exigiendo el uso de una prueba que esté a la par con los cambios en el comportamiento que ha sufrido el virus. La prueba de ELISA IBD-XR detectó más títulos de anticuerpos que la prueba de ELISA Estándar, confirmando resultados obtenidos en estudios anteriores (Sayd, 1999 y Cosenza, 2000). Estos autores atribuyen este efecto a la presencia de una porción de la proteína viral VP2 (región hipervariable del virus) obtenida por ingenie-

ría genética y utilizada como antígeno en la elaboración de la microplaca del nuevo kit de ELISA; además, dicha proteína viral contiene una mayor cantidad de epítomos antigénicos, y por ello las microplacas se encuentran enriquecidas, pudiendo detectar con facilidad tanto cepas clásicas como variantes.

Haciendo un análisis de los resultados de títulos obtenidos de acuerdo al lote de aves evaluados, las reproductoras padres de carne mostraron en ambas pruebas serológicas los mayores niveles de anticuerpos maternos a las 16 y 27 semanas de edad, demostrando una mejor capacidad de respuesta inmune, indicando que la inmunidad pasiva que recibirán

los pollos de carne sería más alta que la que recibirán las pollitas de postura comercial. Se ha afirmado que la inmunidad materna en estos dos últimos tipos de aves es de menor interés, porque este tipo de aves son sometidas a estrictas condiciones de aislamiento de granja, medidas de bioseguridad y manejo, a diferencia de los pollos de carne donde la exposición a agentes infecciosos puede ocurrir tan temprano como al primer día de edad, siendo la inmunidad pasiva en este caso de vital importancia (Zander, 1997). De otro lado, los pollos de carne son mucho más susceptibles a la EIB que pollitas o reproductoras como consecuencia del estrés fisiológico que produce su alta tasa de crecimiento (Lukert y Saif, 1997).

La lectura del histograma de la prueba de ELISA expresa principalmente dos valores: el nivel o título de anticuerpos y la uniformidad de los mismos. Referente a esto último, la distribución de títulos entre ambas pruebas mostró una mejor uniformidad en la prueba de ELISA Estándar que en la de Rango Extendido (Cuadro 3). Sin embargo se considera que el efecto de la desuniformidad sobre el lote de aves sería negativo si alguna de las muestras estuviera por debajo del mínimo permisible, para garantizar una transferencia de inmunidad pasiva adecuada de las reproductoras a la progenie (5,000-7,000), o si estos están por debajo de los niveles que indican protección contra un desafío de campo (500). Títulos por debajo de las cifras señaladas fueron obtenidos en la prueba de ELISA Estándar pero no en la de IBD-XR. Estos hallazgos permiten concluir que el nuevo Kit de ELISA es superior al convencionalmente usado. Sin embargo su introducción en los laboratorios de diagnóstico tomará tiempo porque las compañías avícolas tienen establecidas sus líneas de base de títulos de anticuerpos para vacunación o desafío de campo en función del ELISA Estándar.

CONCLUSIONES

La prueba ELISA IBD-XR detectó mayor nivel de anticuerpos contra el virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa que la prueba de ELISA Estándar en los nueve lotes analizados, demostrando tener mejor capacidad para la detección de anticuerpos contra el VEIB.

LITERATURA CITADA

1. Cosenza, H. 2000. Avances en el serodiagnóstico y detección de cepas variantes de Gumboro. XVI Congreso Centroamericano y del Caribe de Avicultura. Resumen. p 87-92.
2. IDEXX Laboratories. 1999. Infectious bursal disease virus antibody test kit extended range. Westbrook Inc. Reference Laboratory/IBD. Resumen. 25 p.
3. Jackwood, D.J. 1997. Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. *Avian Dis.* 41: 97-104
4. Lukert, P.D.; Y.M. Saif. 1997. Infectious bursal disease. En: *Disease of Poultry*. Calnek B.W.; Barnes, H.J.; Beard, C.W.; McDougald, L.R.(eds). 10th ed. Ames, Iowa State University Press. p 721-738.
5. Sayd, S. 1999. Comparación entre la Prueba ELISA Estándar y de Rango Extendido para virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa utilizando diferentes vacunas. XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura. Lima-Perú. Resumen. p 304-305.
6. Zander, D.V. 1977. Principles of disease. En: *Diseases of Poultry*. Calnek B.W.; Barnes, H.J.; Beard, C.W.; McDougald, L.R. (eds) 10th ed. Ames, Iowa State University Press. p 3-45.