

## **Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio: Relaciones antigénicas de aislados cubanos y chilenos<sup>#</sup>**

Infectious Bursal Disease Virus: antigenic interrelationships between  
cuban and chilean isolates

**J Noda<sup>1\*</sup>, J Ulloa<sup>2</sup>, C L Perera<sup>1</sup>, G Jara<sup>2</sup>, S Cuello<sup>1</sup>, E Rodríguez<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Grupo de Virología Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Cuba.

<sup>2</sup> Instituto de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

### SUMMARY

Infectious Bursal Disease (IBD) is still affecting the poultry industry through the appearance of pathogenic and antigenic variations of the virus. This is due to its permanent evolution as a consequence of the immunological pressure caused by the intensive use of vaccines. The antigenic characterization of field viruses is essential in order to use the most appropriate vaccines to control the disease. The purpose of this study was to determine the antigenic interrelationship between cuban and chilean isolates obtained from flocks vaccinated with the IBD virus. Viral isolates were adapted to cell culture and mono-specific antisera were obtained for each isolate and for a reference strain. The interrelationship between the isolates were established by cross virus neutralization using nine cuban isolates (BD, BL, 35/95, 29/96, 118/96, BF2, BF8, BF9, y 70/98), three chilean isolates (G1, G2, y G4) and a reference strain from serotype 1 (Lukert). Both types of isolates adapted efficiently to chicken embryo fibroblast cultures. In addition, cuban isolates adapted to VERO cells and showed higher infective titers in chicken embryo fibroblasts than in this cell line. Cross virus neutralization results showed an interrelationship greater than 80% amongst cuban isolates and greater than 70% between the isolates and the reference strain. Chilean isolates G1 and G4 showed a similar result (higher than 77%). The G2 isolate had lower antigenic differences from cuban isolates BL 35/95 y 29/96 ( $\leq 69\%$ ). None of the isolates showed antigenic interrelationships lower than 30% with the serotype 1 reference strain and consequently, they do not correspond to variant strains.

*Palabras clave:* aislados virales, Enfermedad Infecciosa de la Bolsa, relaciones antigénicas.

*Key words:* virus isolates of Infectious Bursal Disease, antigenic relationships.

### INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Infecciosa de la Bolsa (EIB) es una enfermedad inmunosupresora, altamente contagiosa y de distribución mundial, producida por cepas del serotipo 1, que afecta a poblaciones de pollos jóvenes (Lukert y Saif 2003). Los estudios de caracterización del virus señalan la existencia de una gran diversidad antigénica dentro del serotipo 1, especialmente en aislados obtenidos de poblaciones de aves vacunadas y con elevados títulos de anticuerpos maternos, identificándose por seroneutralización (SN) viral cruzada seis subtipos, que se diferencian de las cepas clásicas y se describen como variantes antigénicas (Jackwood y Saif 1987, Rosenberger y col 1987, Ismail y col 1990). Su presencia se ha relacionado con quiebres en la inmunidad materna y fallas de los pro-

gramas de vacunación, por lo que la identificación de variantes del serotipo 1 es de gran importancia para establecer programas de vacunación más adecuados contra la enfermedad (Saif y col 1987, Jackwood y Jackwood 1994, Lukert y Saif 2003).

La identificación de subtipos del serotipo 1 se ha realizado en forma eficiente y específica mediante la técnica de SN viral cruzada, utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales, lo cual ha permitido detectar subtipos antigénicos en Europa, Estados Unidos y Japón (Snyder y col 1992, Hassan y Saif 1996, Yamaguchi y col 1996, Etteradossi y col 1997). Más recientemente, el uso del análisis molecular del virus con el empleo de RT-PCR, enzimas de restricción y la secuenciación de la región hipervariable del genoma que codifica la proteína VP2 ha permitido también diferenciar aislados de este virus (Jackwood y Jackwood 1994, Sapats e Ignjatovic 2001). Sin embargo, el uso de estos procedimientos genético-moleculares para clasificar los aislados ha causado algunas confusiones, principalmente por la falta de un criterio documentado para la interpretación de resultados y por una falta de correlación entre la agrupación serológica y la agrupación molecular (Lukert y Saif 2003).

Aceptado: 29.03.2005.

# Proyecto de Cooperación Científica Internacional Chile-Cuba: CONICYT/CITMA. Folio N° 2000-5-183.

\* Carretera de Tapaste y 8 Vías, Apartado 10, San José de Las Lajas, La Habana, C. P. 32700, Cuba.

En Latinoamérica se han realizado estudios de identificación y caracterización de aislados del virus EIB causantes de la enfermedad clínica con mortalidad y subclínica, encontrándose cepas variantes antigénicas en México y cepas muy virulentas en Brasil y República Dominicana (DeFabio y col 1999, Cardoso y col 2000). En Colombia y Ecuador, utilizando análisis molecular, Banda y col (2003) informan la presencia de cepas variantes similar a la cepa E, mientras que en Perú y Venezuela se ha observado una mayor variabilidad con cepas clásicas y variantes del tipo GLS. En Chile, la enfermedad fue diagnosticada en 1977 (Martínez y col 1979) y se encuentra ampliamente distribuida en el país (Muñoz 1982). En 1996, en planteles con sospecha de inmunosupresión, se aislaron cinco cepas del virus (G-1, G-2, G-3, G-4 y G-5), capaces de producir cuadros subclínicos con daño severo en la bolsa de Fabricio (Salazar 1997).

En el presente trabajo se analizaron las relaciones antigénicas de aislados virales cubanos y chilenos del serotipo 1, obtenidos en situaciones epizootiológicas diferentes en la década de los 90.

## MATERIAL Y METODOS

*Adaptación a cultivos de células:* En el estudio se utilizaron nueve aislados cubanos (BD, BL, 35/95, 29/96, 118/96, BF2, BF8, BF9 y 70/98), tres aislados chilenos (G1, G2 y G4) del virus de la EIB (cuadro 1) y la cepa Lukert (SPAFAS, USA), como cepa de referencia del serotipo 1. Los aislados virales cubanos se adaptaron a cultivos de fibroblastos de embrión de pollo para realizar la prueba de SN viral cruzada y a una línea de células VERO para la obtención de las suspensiones virales utilizadas en la preparación de sueros monoespecíficos. Los aislados chilenos se adaptaron sólo a cultivos de fibroblastos de embrión de pollo. Este proceso se realizó

**Cuadro 1.** Aislados cubanos y chilenos del virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa.

Cuban and Chilean isolates of the infectious bursal diseases virus.

Aislado	País	Año
BD	Cuba	1992
BL	Cuba	1992
35/95	Cuba	1995
29/96	Cuba	1996
118/96	Cuba	1996
BF2	Cuba	1997
BF8	Cuba	1997
BF9	Cuba	1997
70/98	Cuba	1997
G1	Chile	1995
G2	Chile	1995
G4	Chile	1994

mediante pases sucesivos, hasta lograr la estabilidad del efecto citopático y un título superior a  $10^4$  DICC<sub>50</sub>/ml.

*Obtención de antisueros específicos:* La obtención de los antisueros de los aislados cubanos se realizó en cobayos jóvenes de 250-350 g de peso, mantenidos en jaulas y con alimentación *ad libitum*, en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria de Cuba, según el procedimiento descrito por Jackwood y Saif (1987) y la infección por vía intramuscular e intraperitoneal con 1 ml de cada una de las suspensiones virales con un título infectivo de  $10^4$  -  $10^6$  DICC<sub>50</sub>/ml. A los 21 días postinoculación los cobayos fueron insensibilizados y desangrados por punción cardíaca. En el caso de los aislados chilenos se realizó en pollos libres de patógenos específicos (LPE), de 8 semanas de edad, mantenidos en unidades de aislamiento con alimentación *ad libitum*, en el Instituto de Patología Animal de la Universidad Austral de Chile. Las aves fueron infectadas por vía endovenosa con dos dosis de 1 ml de un homogeneizado de membranas corioalantoideas, aplicadas con intervalos de 5 días cada una y con un título de  $10^4$  DIE<sub>50</sub>/ml. A los 15 días postinoculación, los pollos fueron insensibilizados y desangrados para obtener el suero. Los antisueros fueron inactivados a 56°C por 30 minutos, alicuotados en viales y conservados a -20°C hasta su utilización.

*Relaciones antigénicas:* Las relaciones antigénicas existentes entre los diferentes aislados y la cepa de referencia se determinaron mediante seroneutralización viral cruzada, confrontando 100 DICC<sub>50</sub> del virus con su suero homólogo y heterólogo, en diluciones logarítmicas base 2, utilizando tres réplicas por cada dilución (Bayyari y col 1996). La lectura de los títulos se realizó 48 horas posterior a la inoculación. El título neutralizante de cada antisuero frente a su cepa homóloga y heteróloga fue calculado por el método de Reed y Muench (1938). El porcentaje de relación entre las cepas se determinó según Archetti y Horsfall (1950), quienes consideran la siguiente escala de relaciones antigénicas:

- 70-100% indica que dos cepas son muy similares dentro del serotipo.
- 32-70% indica que dos cepas presentan diferencias menores dentro del serotipo.
- 10-31% indica que dos cepas muestran diferencias mayores dentro del serotipo (subtipos o variantes antigénicas).
- < 10% indica que dos cepas pertenecen a serotipos diferentes.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los aislados cubanos se adaptaron tanto a la línea de células VERO como a cultivo de FEP posterior a seis pases sucesivos, alcanzando títulos infectivos que oscilaron

entre  $10^{4.5}$  -  $10^{6.5}$  DICC<sub>50</sub>/ml y  $10^{5.5}$  -  $10^{8.6}$  DICC<sub>50</sub>/ml, respectivamente (cuadro 2). Los aislados chilenos, adaptados sólo a FEP, alcanzaron títulos que oscilaron entre  $10^{4.4}$  -  $10^{5.5}$  DICC<sub>50</sub>/ml. Los antisueros obtenidos tanto en cobayos como en pollos SPF, reaccionaron con títulos elevados frente a su cepa homóloga, en la prueba de VN, lo que corrobora los resultados de similitud de respuesta de esta especie con las de origen aviar (Jackwood y Saif, 1987).

Los resultados de la seroneutralización viral cruzada (cuadro 3) muestran una estrecha relación antigénica entre los aislados cubanos (> 80%) y entre estos con la cepa de referencia Lukert (> 69%) y los aislados chilenos G1 y G4 (> 76%). El aislado G2 presentó diferencias consideradas menores dentro del serotipo 1 de IBD, con los aislados cubanos BL, 35/95 y 29/96 (59, 65 y 69%, respectivamente). Jackwood y Saif (1987) señalan que existe similitud antigénica con valores de R  $\geq$  81%. Para reconocer a un aislado como subtipo o variante dentro del serotipo se requieren valores de R entre 10-31%, como el resultado obtenido en Estados Unidos entre las variantes A y B, que presentaron un 17 y 9% de relación con la cepa de referencia D78 (Rosales y col 1989).

**Cuadro 2.** Títulos infectivos de los aislados cubanos y chilenos y de la cepa Lukert del virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa, en células VERO y fibroblastos de embrión de pollo (FEP).

Infective titers of Chilean and Cuban isolates and Lukert's strain of the infectious bursal diseases virus in Vero cells and chicken embryo fibroblast (CEF) cells.

Muestra	DICC <sub>50</sub> /ml	
	VERO	FEP
BD	4,5	8,2
BL	4,5	8,6
35/95	6,5	7,9
29/96	6,3	7,5
118/96	6,1	7,2
BF2	5,8	6,8
BF8	4,5	5,5
BF9	6,2	7,2
70/98	6,5	8,2
G1	n.r. <sup>1</sup>	5,5
G2	n.r.	4,4
G4	n.r.	4,4
Lukert <sup>2</sup>	n.r.	4,6

<sup>1</sup> No realizado.

<sup>2</sup> Cepa del serotipo 1 del virus de la EIB (SPAFAS,USA).

**Cuadro 3.** Relaciones antigénicas entre aislados cubanos y chilenos del virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa y la cepa Lukert.

Antigenic interrelationship between Chilean and Cuban isolates of the infectious bursal diseases virus and Lukert's strain.

Aislados y cepas	Antisueros específicos											
	BL	35/95	29/96	118/96	BF2	BF8	BF-9	70/98	Lukert	G2	G4	G1
BL	100											
35/95	97	100										
29/96	99	92	100									
118/96	89	93	91	100								
BF2	98	100	88	91	100							
BF8	88	97	81	100	95	100						
BF9	89	96	88	93	93	100	100					
70/98	92	100	99	93	100	98	93	100				
Lukert *	76	95	72	96	70	87	93	83	100			
G2	59	65	69	79	71	76	70	74	74	100		
G4	92	81	77	94	81	81	90	86	100	75	100	
G1	94	84	99	96	83	93	94	99	92	70	87	100

\* Cepa de referencia del serotipo 1 del virus de la EIB (SPAFAS).

## RESUMEN

La Enfermedad Infecciosa de la Bolsa (EIB) sigue afectando la industria avícola por la aparición de variantes patogénicas y antigénicas del virus, originadas en la permanente evolución del virus producto de la presión inmunológica por el uso intensivo de vacunas. La caracterización antigénica de los virus de campo resulta esencial para la aplicación de vacunas más adecuadas en el control de la enfermedad. En este trabajo se determinaron las relaciones antigénicas de aislados cubanos y chilenos, obtenidos de poblaciones de pollos vacunados con el virus de la EIB. Los aislados virales se adaptaron a cultivos celulares y se obtuvieron antisueros monoespecíficos de cada uno de ellos y de una cepa

de referencia. Las relaciones se establecieron por virusneutralización cruzada utilizando nueve aislados cubanos (BD, BL, 35/95, 29/96, 118/96, BF2, BF8, BF9 y 70/98), tres chilenos (G1, G2 y G4) y una cepa de referencia del serotipo 1 (Lukert). Los aislados cubanos y chilenos se adaptaron eficientemente a cultivos de fibroblastos de embrión de pollo (con excepción de BF3 y G3). Además, los aislados cubanos se adaptaron a células VERO, presentando mayores títulos infectivos en fibroblastos de embrión de pollo que en esta línea celular. Los resultados de la seroneutralización cruzada mostraron entre los aislados cubanos una relación mayor a un 80% y entre éstos y la cepa de referencia mayor de un 70%, de igual modo con los aislados chilenos G1 y G4 (mayor de 77%). El aislado G2 presentó

diferencias antigénicas consideradas menores con los aislados cubanos BL, 35/95 y 29/96 ( $\leq 69\%$ ). Ninguno de los aislados mostró relaciones antigénicas inferiores al 30% con la cepa de referencia del serotipo 1, por lo tanto no corresponden a cepas variantes.

## REFERENCIAS

- Archetti I, F L Horsfall. 1950. Persistent antigenic variation of influenza viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J Exp Med* 92: 441-462.
- Banda A, P Villegas, J El-Attrache. 2003. Molecular characterization of infectious bursal disease virus from commercial poultry in the United States and Latin America. *Avian Dis* 47:87-95.
- Bayyari J R, J D Story, J N Beasley, J K Skeeles. 1996. Pathogenicity studies of an Arkansas variant of IBD virus. *Avian Dis* 40: 516-532.
- Cardoso M, R Fernández, E Montiel, G Rivallan, N Eterradosi. 2000. Gumboro threat to Latin American Poultry. *Int Poultry Prod* 8: 7-8.
- DeFabio J, A G Castro, Y Gardin, L Rossini, D Toquin, N Eterradosi. 1999. Very virulent IBD spreads to South America. *World Poultry* 5: 88-89.
- Eterradosi N, C Arnauld, D Toquin, G Rivallan. 1997. Limited antigenic variation among recent IBDV isolates from France. *Arch Virol* 143: 1627-1636.
- Hassan M K, Y M Saif. 1996. Influence of host system on the pathogenicity, immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 40: 553-561.
- Ismail N M, Y M Saif, W L Wigle, G B Havenstein, C Jackson. 1990. Infectious bursal disease virus variant from commercial leghorn pullets. *Avian Dis* 34: 141-145.
- Jackwood D H, Y M Saif. 1987. Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis* 31: 766-770.
- Jackwood D J, R J Jackwood. 1994. Infectious bursal disease viruses: molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype 1 viruses. *Avian Dis* 38: 531-537.
- Lukert P D, Saif Y M. 2003. Infectious bursal disease. In: Saif I M, H J Barnes, J R Glisson, A M Fadly, L R McDougald, D E Swayne (eds.). *Diseases of Poultry*. 11, ed. pp. 161-179. Iowa State Press, Ames, Iowa, USA.
- Martínez I, A Casanova, P Cancino, A Paredes. 1979. Prevalencia de Bursitis Infecciosa Aviar en plantales de reproducción en la zona central de Chile. *Arch Med Vet* 11: 100-104.
- Muñoz C. 1982. Prospección serológica del virus de la Bursitis Infecciosa en *Gallus domesticus*. *Tesis de Grado*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Reed L J, H Muench. 1938. A simple method for estimating fifty per cent endpoints. *Am. J Hyg* 27: 493-496.
- Rosales A G, P Villegas, P D Lukert, O J Fletcher, M A Mohamed, J Brown. 1989. Pathogenicity of recent isolates of IBDV in SPF chickens: protection conferred by an intermediate vaccine strain. *Avian Dis* 33: 729-734.
- Rosenberger J K, S S Cloud, A Metz. 1987. Use of infectious bursal disease virus variant vaccines in broilers and broiler breeders. In: Proc. 36th West Poultry Diseases Conference, Davis, CA, pp. 105-109.
- Saif Y M, D H Jackwood, M W Jackwood, D J Jackwood. 1987. Relatedness of IBD vaccine strains and field strains. In: Proc. of 36th West Poultry Diseases Conference, Davis, CA, pp. 110-111.
- Salazar P E. 1997. Aislamiento, estudio de patogenicidad, serotipificación y estudio de protección de aislados nacionales del virus de la bursitis infecciosa aviar. *Tesis de Grado*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Sapats S. and J Ignjatovic. 2001. Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolates in Australia. *Archiv Virol* 145: 773-785.
- Snyder D B, V N Vakharia, P K Savage. 1992. Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variant define the epidemiology of infectious bursal disease virus. *Archiv Virol*. 127: 89-101.
- Yamaguchi T, T Kondo, Y Inoshima, M Ogawa, M Miyoshi, T Yanai, T Masegi, H Fukushi, K Hirai. 1996. *In vitro* attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus: some characteristics of attenuated strains. *Avian Dis* 40: 501-509.