

ADENOVIRUS AVIAR. DESARROLLO DE ANTICUERPOS PRECIPITANTES

ESTER T. GONZÁLEZ (1), ALEJANDRO A. SCHUDEL (2),
MARÍA E. ETCHERRIGARAY (3), JUAN E. ZABALA SUÁREZ (4).

RESUMEN

Se realizó la inoculación experimental con Adenovirus aviar (serotipo I) a pollos de 1 día de edad y adultos (11 a 24 semanas de edad). En los pollitos B.B. la respuesta de anticuerpos es más lenta (segunda semana postinoculación) comparado con la respuesta en animales de mayor edad, donde se hace evidente a la primera semana postinoculación. El título de anticuerpos es también mayor en animales adultos al igual que la proporción de animales infectados. Pollitos B.B. con anticuerpos maternos pueden ser infectados desarrollando anticuerpos más tardíamente (cuarta semana post-inoculación).

SUMMARY

"AVIAN ADENOVIRUS. PRICIPITANTS ANTIBODIES RESPONSE"

Experimental inoculation with avian Adenovirus (serotype I) was carried out in one day old chickens and in adults (eleven and twenty four weeks old). Response to antibodies is slower in B.B. chickens (second weeks post-inoculation) as compared to response in older animals where this is evident in first week post-inoculation. Not only the title of antibodies but also the proportion of infected animals is greater in adults animals. B.B. chickens with maternal antibodies may be infected developing antibodies later (fourth week post-inoculation).

(1) Becaria de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Buenos Aires. Cátedra de Virología. Facultad de C. Veterinarias. U. N. L. P.

(2) Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET. Cátedra de Virología. Facultad de C. Veterinarias. U. N. L. P.

(3) Profesor Adjunto a C/Cátedra de Virología. Facultad de C. Veterinarias. U. N. L. P.

(4) Jefe de Sección Estadística. Ministerio de Asuntos Agrarios de la Prov. de Buenos Aires.

INTRODUCCION

La infección por Adenovirus aviares se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo, sobre todo en áreas de explotación avícola comercial intensiva (2, 10, 12).

Hay varios serotipos distinguibles por seroneutralización (3, 9) y las distintas cepas se han aislado de: embriones de pollo, pollos sanos y enfermos, de cultivos de células de embrión de pollo y de otras especies aviares.

La relación entre los aislamientos de Adenovirus y presencia de determinados síntomas clínicos permanecen oscuros, pues muchas veces hay otros agentes infecciosos que complican el cuadro sintomatológico. La infección con Adenovirus aviares es en algunos casos confundida con Bronquitis Infecciosa. Es común a ambas la infección respiratoria, problemas en la calidad de los huevos y una baja en la producción de los mismos.

No todos los serotipos producen lesiones hepáticas definidas, pues muchas veces la infección cursa en for-

ma casi inaparente, y en infecciones naturales los síntomas, cuando los hay, consisten en suaves signos respiratorios, somnolencia, bajo desarrollo, jadeo y diarrea (8, 10, 12). La prueba de seroneutralización en cultivos de células es probablemente el método más sensible para detectar infecciones en pollos, pero como detecta anticuerpos específicos de tipo, existe siempre la posibilidad de que el plantel esté infectado con otro serotipo no reconocido. La prueba de doble inmunodifusión en agar (DIDA) es útil en cuanto tiene un espectro de positividad más amplio, ya que permite detectar anticuerpos específicos de grupo, pudiéndola aplicar en la cuantificación de los mismos.

El objetivo del presente trabajo es determinar la duración y variación del título de anticuerpos precipitantes en aves experimentalmente inoculadas, investigando las características de la respuesta inmune en pollos recién nacidos y adultos.

SUMMARY

MATERIAL Y METODOS

Virus: Se utilizó la cepa FCV-89, tomada como prototipo de aislamientos realizados en el país (6,11).

La propagación se realizó por inoculación en cavidad alantoidea en huevos embrionados de 9 días de edad. El líquido alantoideo del segundo y tercer pasaje se cosechó al 5º día de postinoculación, centrifugando a 3000 rpm. durante 15 minutos.

El sobrenadante se guardó a -20°C.

Antígeno: El líquido alantoideo del 6º pasaje de la cepa original en embrión de pollo se cosechó al 5º día post-inoculación centrifugando a 1500 rpm. durante 50 minutos. El sobrenadante se recentrifugó en Beckman L-65, rotor 30-2, a 27.500 rpm. du-

rante 90 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en líquido alantoideo concentrando el volumen original 200 veces. El antígeno así preparado se fraccionó y conservó a -20°C, controlándose en la prueba de DIDA frente a sueros patrones positivos obtenidos de animales enfermos al momento de hacer el aislamiento de la cepa original y frente a un control positivo proveniente del "Virus and Fickett'sial Registry American Type Culture Collection".

Aves. Experiencia I: Detección de anticuerpos precipitantes

Exp. I-1: 20 pollitos de 1 día, provenientes de plantales comerciales, lí-

nea AA26, con anticuerpos contra Adenovirus aviares.

Exp. I-2: 4 pollos de 24 semanas, igual origen que los anteriores. Sin anticuerpos contra Adenovirus aviares. Se inocularon los animales de ambas experiencias por vía nasal e intraperitoneal (0,2 ml) con virus FCV-89 (1×10^7 DLE 50/ml). Semanalmente se extrajo sangre de los dos lotes por punción intracardiaca (5 animales de la *Exp. I-1* y 2 animales de la *Exp. I-2*). Los sueros de cada experiencia se procesaron en forma de pool a fin de efectuar la prueba de DIDA para la detección de anticuerpos precipitantes.

Experiencia II: Titulación de anticuerpos precipitantes

Exp. II-1: 33 pollitos de 1 día, línea AA26, sin anticuerpos contra Adenovirus aviares.

Exp. II-2: 9 pollos de 11 semanas, línea AA26, sin anticuerpos contra Adenovirus aviares.

Ambos lotes se inocularon en la misma forma que en la *Experiencia I*.

Diariamente se controló el estado sanitario de los animales y semanalmente se extrajo sangre por punción intracardiaca en animales de cada lote (5 animales de la *Exp. II-1* y 3 animales de la *Exp. II-2*).

Las muestras de suero de cada experiencia fueron analizadas individualmente en la prueba de DIDA.

Para ambas experiencias la titulación de los anticuerpos precipitantes se realizó por la misma técnica (DIDA), mezclando cantidades de los correspondientes sueros positivos de cada semana, diluyendo en \log_2 con solución fisiológica.

Prueba de doble inmunodifusión en agar (DIDA)

Se utilizó agar noble DIFCO disuelto al 1% en Buffer de sodio y potasio (en solución de cloruro de sodio al 8%) ph 7,4 (13).

Se llevó a cabo la microtécnica de DIDA, sembrando un suero control positivo y un suero negativo en cada ensayo, permaneciendo en cámara húmeda a temperatura ambiente 20-22°C) hasta 72 horas postsiembra.

RESULTADOS

En los resultados obtenidos se observa que inoculando pollitos de 1 día de edad con anticuerpos maternos (*Exp. I-1*) la respuesta de anticuerpos precipitantes se detecta a partir de la cuarta semana postinoculación, manteniéndose positiva durante los 4 meses que duró la experiencia (*Cuadro Nº 1*).

En los pollitos sin anticuerpos maternos (*Exp. II-1*, *Gráfico Nº 1*) la respuesta se hace evidente a la segunda semana postinfección, alcanzando en este momento el máximo valor (título 1/8). En las siguientes semanas los valores decrecen gradualmente, notándose picos en las semanas 6, 10, 13, 14 y 15, sin alcanzar nunca el título de la segunda semana postinoculación.

La curva de proporción de positivos sigue aproximadamente la curva de titulación, existiendo en general correspondencia entre los valores alcanzados por ambas curvas. Se observó un mayor número de positivos en la 5ª y 6ª semana disminuyendo luego sensiblemente.

En los animales adultos sin anticuerpos contra Adenovirus aviar (*Exp. I-2* y *Exp. II-2*) la respuesta obtenida fue más rápida, siendo positiva la reacción de DIDA en la primer semana postinoculación, manteniéndose este resultado durante todo el período experimental (*Cuadro Nº 1*). En la *Experiencia II-2* (*Gráfico Nº 2*), inoculando Adenovirus aviar en animales de 88 días de edad, se observa que a los 8 días postinfección el titu-

lo de anticuerpos precipitantes alcanza un valor de 1/16 y 1/32 en la 12va. semana, para luego disminuir hasta 1/2 en la 15va. semana. Tal como se observa en el *Gráfico Nº 2*, la

casi totalidad de los individuos adultos pueden ser experimentalmente infectados, conservándose correspondencia entre títulos y proporción de positivos.

CUADRO Nº 1

Respuesta de anticuerpos precipitantes en aves de distintas edades inoculadas experimentalmente con Adenovirus aviar (serotipo I).

tiempo semanas edad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
	Exp. I-1 1 día (*)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(^o)
Exp. II-1 1 día (**)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(^o)
Exp. I-2 192 días (***)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(^o)
Exp. II-2 88 días (***)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(^o)

(*) Con anticuerpos maternos; (**) sin anticuerpos maternos; (***) animales adultos sin anticuerpos; (^o) finalización de la experiencia.

DISCUSION

En las experiencias realizadas se observa que las aves de cualquier edad son susceptibles a la infección con Adenovirus aviar. Los pollitos recién nacidos que poseen anticuerpos maternos igualmente pueden ser infectados (Exp. I-1) aunque se observa una demora en la aparición de los anticuerpos precipitantes (8).

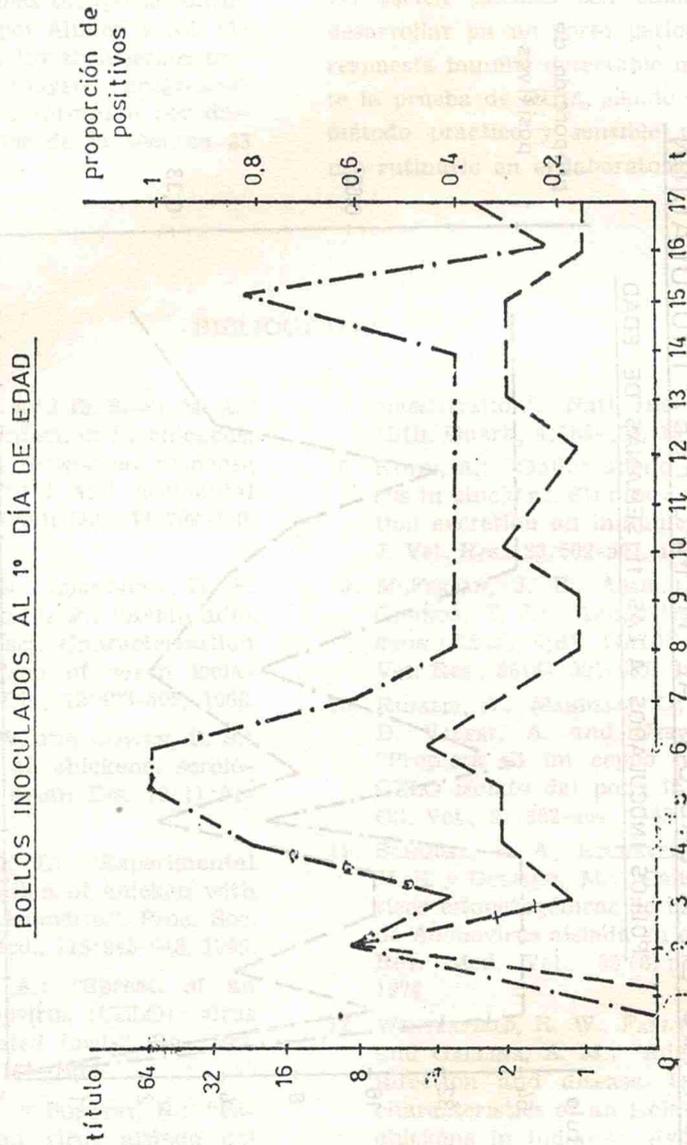
La respuesta inmune en animales adultos sin anticuerpos precipitantes (Exp. I-2 y Exp. II-2) es más rápida que en los pollitos de 1 día de edad sin anticuerpos precipitantes (Exp. II-1), observándose valores positivos a la primera semana postinoculación, mientras que en los animales pequeños la respuesta se hace evidente a la segunda semana postinoculación.

En los animales adultos (Exp. II-2) el título de anticuerpos precipitantes es más alto, como así también mayor la proporción de animales infectados comparado con los valores hallados en los pollitos inoculados al día de edad (Exp. II-1).

La diferencia en la respuesta inmune considerando la inoculación en pollitos BB y adultos, puede explicarse ya que en los animales recién nacidos existe inmadurez del aparato inmunocompetente.

A lo largo de las experiencias que se prolongaron por varios meses, no se observaron signos evidentes de enfermedad. Esto confirmaría los resultados de otros investigadores, quienes inoculando experimentalmente. Ade-

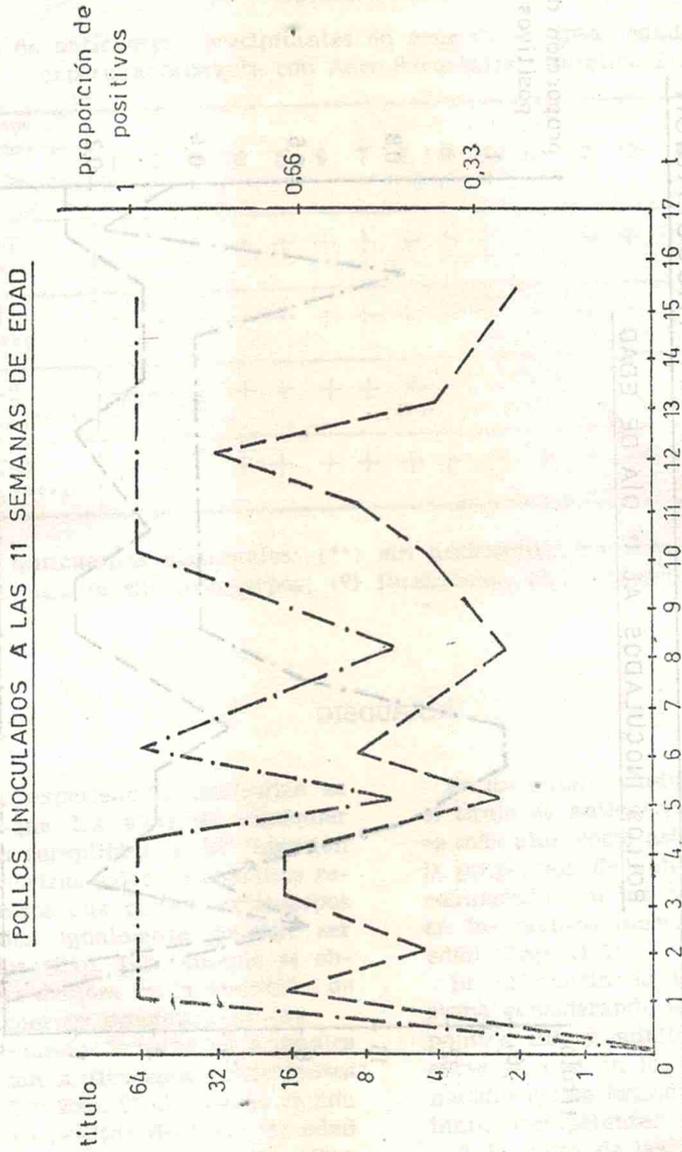
GRAFICO Nº 1
CURVAS DE VARIACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS Y PROPORCIÓN DE POSITIVOS EN RELACIÓN AL TIEMPO POST-INOCULACIÓN



t = semanas post-inoculación
 título = se toma la inversa de la dilución
 - - - = curva de variación del título en función del tiempo post-inoculación
 - · - · - = curva de variación de la proporción de positivos en relación al tiempo post-inoculación

GRAFICO Nº 2

CURVAS DE VARIACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS Y PROPORCIÓN DE POSITIVOS EN RELACIÓN AL TIEMPO POST-INOCULACIÓN



t = semanas post-inoculación

título = se toma la inversa de la dilución

— = curva de variación del título en función del tiempo post-inoculación

- - - = curva de variación de la proporción de positivos en relación al tiempo post-inoculación

novirus aviar tipo I, no lograron producir síntomas clínicos (4, 5, 7).

En las experiencias II-1 y II-2, que se prolongaron por 17 y 15 semanas respectivamente, se observó que los anticuerpos precipitantes decaen progresivamente y es de esperar que prolongándose por más tiempo se confirme lo señalado por Ahmed y col. (1) quien indicó que los anticuerpos precipitantes disminuyen progresivamente su título y terminan por desaparecer alrededor de la semana 23 postinfección.

Los resultados obtenidos nos permiten señalar la importancia del análisis de anticuerpos precipitantes para la detección de infección por Adenovirus aviare, demostrándose que tanto los animales adultos como los recién nacidos son capaces de desarrollar en un corto período una respuesta inmune detectable mediante la prueba de DIDA, siendo éste un método práctico y sensible para el uso rutinario en el laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. AHMED, A. A. and EL SI-SI, M. A.: "Celo virus infection in chickens. Clinical and serological response to experimental and accidental infection". Avian Dis., 13:709-720, 1969.
2. BURQUE, C. N., LUGINBUHL, R. E. and WILLIAMS, L. F.: "Avian adeno like viruses. Characterization and comparison of seven isolates" Avian Dis., 12:483-505, 1968.
3. CALNEK, B. W. and COWEN, B. S.: "Adenovirus of chickens: serologic groups" Avian Dis. 19(1):91-103, 1975.
4. CLEMMER, D. I.: "Experimental enteric infection of chicken with an avian Adenovirus". Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 118:943-948, 1965.
5. COOK, J. K. A.: "Spread of an avian Adenovirus (CELO) virus to uninoculated fowls". Res. Vet. Sci., 16:156-161, 1974.
6. DELAMER, M. y SONCINI, R.: "Estudios de un virus aislado del tracto respiratorio de aves de la República Argentina". Rev. Med. Vet., 55(1):9-18, 1974.
7. KAWAMURA, H., SHIMIZU, F. and TSUBAHARA, H.: "Avian adenovirus: its properties and serological classification". Natl. Inst. Anim. Hlth. Quart., 4:183-193, 1964.
8. KOHN, A.: "Gallus adeno like virus in chickens. Studies on infection excretion an immunity". Am. J. Vet. Res., 23:562-567, 1962.
9. MCFERRAN, J. B., ADAIR, B. and CONNOR, T. J.: "Adenoviral antigens (CELO, QBV, GAL)". Am. J. Vet. Res., 36(4):527-531, 1975.
10. RINALDI, A., MANDELLI, C., CESSI, D. VALERI, A. and CERVIO, C.: "Proprietá di un ceppo di virus CELO isolato dal pollo in Italy". Cli. Vet., 91:382-404, 1968.
11. SCHUDEL, A. A., ETCHEVERRIGARAY, M. E. y DELAMER, M.: "Características citopatogénicas de una cepa de Adenovirus aislada en el país". Rev. Med. Vet., 55(6):461-469, 1974.
12. WINTERFIELD, R. W., FADLY, A. M. and GALLINA, A. M.: "Adenovirus infection and disease. I: Some characteristics of an isolate from chickens in indiana". Avian Dis. 17:334-342, 1973.
13. WOERNLE, H. and BRUNNER, A.: "The use of agar gel diffusion technique in the identification of certain avian virus disease". Veterinarian, 4(1):17-28, 1966.