



Detección serológica de antígenos del virus de influenza aviar (IA) en un plantel avícola de la VI Región de Chile

Henry González Jenkins, M.V.¹; henry.gonzalez@sag.gob.cl
Solano A. Reyes Reyes, M.V.²; solano.reyes@sag.gob.cl
José M. Torres, M.V.³; jose.torres@sag.gob.cl
Ricardo Poblete Cofré, M.V.⁴; ricardo.poblete@sag.gob.cl

Resumen

En mayo de 2002 en un plantel avícola de la VI Región, fueron detectadas, aves seropositivas a la prueba IDAG para el virus influenza aviar en exámenes rutinarios que formaban parte de requisitos de exportación. La ausencia de manifestaciones clínicas y anatomopatológicas en las aves seropositivas, y la posterior asociación de este cuadro con la aplicación de vacunas hepatitis a cuerpo de inclusión (HCI), permitió establecer la hipótesis de la utilización de una vacuna contaminada con virus influenza aviar A.

El desarrollo de pruebas experimentales en aves negativas a la influenza aviar, así como la aparición de aves seropositivas a la serie de la vacuna sospechosa, permitió probar la hipótesis antes mencionada. El laboratorio productor de la vacuna ratificó esta situación de contaminación de la vacuna HCI con un virus influenza aviar inactivado.

1. Introducción

El agente causal de la influenza aviar es un virus de la familia Orthomyxoviridae del género *Influenzavirus A*. Existen 3 géneros A, B, y C; a la fecha, todos los microorganismos altamente patógenos aislados han sido del tipo A y de los subtipos H5 y H7. Sin embargo, es posible encontrar aislados con virus influenza de los subtipos H5 y H7 de baja virulencia, los que han sido clasificados como virus influenza aviar notificables ante la [OIE](#), debido al riesgo de que se transformen en virulentos por mutación en el huésped.

Muchas especies de aves son susceptibles a la infección con virus influenza tipo A y las aves acuáticas conforman su principal reservorio; la gran mayoría de los aislados han sido de baja patogenicidad para gallinas y pavos.

¹ Encargado Regional de Protección Pecuaria, Servicio Agrícola y Ganadero, VI Región.

² Servicio Agrícola y Ganadero, Oficina Rancagua, VI Región.

³ Agrosuper.

⁴ Servicio Agrícola y Ganadero, Oficina San Vicente, VI Región.

Los virus influenza A han sido clasificados en subtipos considerando sus antígenos asociados a las proteínas hemoaglutinina (H) y neuroaminidasa (N). A la fecha se reconocen 16 subtipos H (H1-H16), y 9 subtipos N (N1-N9). En la actualidad, los virus influenza A altamente virulentos que generan la enfermedad clínicamente aguda en gallinas y pavos se asocian sólo con los subtipos H5 y H7, con la excepción de dos subtipos H10 que cumplen la definición de virus altamente virulento. El período de incubación es de 3 a 5 días y, dependiendo de la edad, tipo de aves y factores ambientales, la influenza aviar altamente patógena puede variar desde un cuadro con muertes repentinas con pocos o ningún signo claro, hasta un cuadro más característico con signos respiratorios, lacrimación excesiva, sinusitis, edema de la cabeza, cianosis de las áreas de piel desprovistas de plumas, diarrea, depresión severa e inapetencia, marcada disminución de la producción de huevos y muertes súbitas; la mortalidad puede alcanzar el 100%.

Las lesiones pueden estar ausentes en caso de muertes súbitas, congestión grave de la musculatura, deshidratación, edema subcutáneo de la cabeza y del cuello, secreciones oral y nasal, congestión grave de la conjuntiva, a veces con petequia, exudación mucosa excesiva en el lumen de la tráquea o traqueitis hemorrágica grave, petequias en el interior del esternón, en la grasa serosa y abdominal, congestión renal severa, hemorragias y degeneración de los ovarios, focos hemorrágicos en los tejidos linfoides de la mucosa intestinal.

Las lesiones en los pavos son similares a las encontradas en las gallinas, aunque pueden ser menos marcadas. Los patos infectados por el virus altamente patógeno pueden no presentar signos clínicos ni lesiones.

En este artículo se describe la detección, en pruebas de rutina, de serologías positivas al virus de la influenza aviar tipo A, en un plantel avícola de la VI Región, Comuna de Rancagua, en mayo del año 2002. Esta situación alertó el sistema de vigilancia de la enfermedad en el país. Se describen también, las acciones realizadas por el SAG durante el evento.

El plantel comprometido se caracteriza por estar formado por líneas de abuelas broilers y presentar dos pabellones: el de la línea macho, con 1.496 aves y el de la línea hembra con 4.961 ejemplares, lo que totalizaba 6.457 aves.

Las fueron importadas desde Estados Unidos y Escocia y cumplieron con todas las exigencias sanitarias estipuladas por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG); entre ellas, la cuarentena oficial que incluyó todas las pruebas de laboratorio pertinentes, como inmunodifusión (IDAG) para influenza aviar, la que dio resultados negativos.

El tipo de producción de la empresa a la que pertenece el plantel avícola de referencia es de tipo piramidal, es decir, la única entrada de aves al sistema es a través de cuarentenas controladas por el SAG; además, presenta altos niveles de bioseguridad, en especial en sus líneas genéticas.

2. Objetivos

Descripción de una investigación epidemiológica de campo destinada a conocer los factores que determinaron la detección serológica de los virus influenza aviar tipo A en un plantel avícola de la VI Región, Comuna de Rancagua, en mayo del año 2002.

3. Actividades desarrolladas

Frente a la detección serológica de aves seropositivas a la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG) se dispuso la realización de las siguientes acciones:

- Observación clínica y muestreo serológico de todos los sectores con aves del plantel.
- Observación clínica semanal y seguimiento serológico de sectores con aves seropositivas se realizó mediante controles mensuales por 3 meses
- Inocularon aves susceptibles de 4 semanas de edad con la vacuna HCI serie MDO 1242 en el Laboratorio Oficial del SAG (Laboratorio Pecuario de Lo Aguirre).
- Envío de muestras de la serie sospechosa de vacuna contra hepatitis a cuerpo de inclusión al laboratorio Southeast Poultry Research Laboratory (SEPRL), del USDA, Athens, Georgia, Estados Unidos, las que fueron analizadas mediante la técnica RT-PCR y al Veterinary Laboratory Agency (VLA) Weybridge, del Reino Unido, a fin de analizar la presencia de anticuerpos contra la influenza A subtipo H5.

4. Resultados

Durante todo el episodio no fue observada, signología clínica ni aumento de las tasas de mortalidad. En general los parámetros bioproductivos correspondientes a esta etapa de desarrollo, fueron superiores a los estándares para la raza.

El estudio serológico inicial evidenció seropositividad en los sectores 3 y 4 negatividad en los restantes (cuadro 1).

Cuadro 1
Resultados del muestreo serológico IDAG, de mayo, en las aves de los diferentes sectores del plantel

Sectores avícolas	Muestreo de las aves de los sectores		
	N° de muestras	Negativos	Positivos
1	0	-	-
2	60	60	0
3	100	83	17
4	140	124	16
5	40	40	0
6	60	60	0
7	40	40	0
TOTAL	440	407	33

El análisis de datos permitió establecer una asociación directa con sectores donde se había utilizado una vacuna hepatitis a cuerpo de inclusión (HCI) de la serie MOD 1242, la que había

sido aplicada a las 10 y 18 semanas de edad de las aves. El cuadro 2 muestra el plan de vacunación y la serie de vacuna utilizada.

Cuadro 2
Plan de vacunación HCI según sectores avícolas y series de vacunas HCI utilizadas en el plantel con aves seropositivas al virus influenza aviar A.

Sectores Avícolas	Vacunación hepatitis cuerpos de inclusión (HCI)		Series vacuna HCI
	10 semanas de edad	18 semanas de edad	
1	Sin vacunación	Sin vacunación	-
2	Sin vacunación	Sin vacunación	-
3	Con vacunación	Con vacunación	MDO 1242
4	Con vacunación	Con vacunación	MDO 1242
5	Con vacunación	Con vacunación	MDO 1244
6	Con vacunación	Con vacunación	MDO 1244
7	Con vacunación	Con vacunación	MDO 1244

Se observa que el sector avícola 2, que no registró vacunación HCI, mostró resultados negativos a la prueba IDAG y que en los sectores 3 y 4, en los cuales se utilizó la serie MDO 1232 de la vacuna HCI presentaron reacciones positivas (17 y 16, respectivamente).

Los sectores avícolas 5, 6, y 7, que fueron vacunados con al con la serie MDO 1244 de la vacuna HCI, no evidenciaron reacciones positivas a la prueba IDAG en dicho período.

La tasa de seropositividad general fue de 7,5 por cada 100 individuos, y la de seropositividad específica estandarizada de los sectores con aves reaccionantes es de 7,1 por cada 100 aves en el sector 3, y de 6,7 por cada 100 individuos en el sector 4.

Las aves no vacunadas, así como las que se les aplicaron vacunas HCI de la serie MDO 1244, registran una tasa de 0 por cada 100 individuos.

Estos resultados fundamentaron la hipótesis de que dicha serie podría estar contaminada con virus influenza aviar inactivado, tal como se muestra en las tablas 2.

En Junio se realizó una segunda prueba de seguimiento a las aves en los diferentes sectores del plantel cuyos resultados se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3
Resultados del muestreo serológico IDAG, de junio, en las aves de los diferentes sectores del plantel avícola con seropositividad al virus influenza aviar según series de vacunas HCI utilizadas.

Sectores avícolas	Series vacuna HCI	Muestreo de las aves de los sectores		
		N° de muestras	Negativos	Positivos
1	Sin vacunación	0	-	-
2	Sin vacunación	251	251	0
3	MDO 1242	232	191	41
4	MDO 1242	301	294	7
5	MDO 1244	168	168	0
6	MDO 1244	252	251	1
7	MDO 1244	168	168	0
TOTAL	-	1372	1323	49

El sector 2 que no fue vacunado evidenció resultados negativos a la prueba IDAG.

El sector 3 que fue vacunado con la serie MDO 1242 de la vacuna HCI muestra, al igual que el sector 4, reacciones positivas a la prueba IDAG en junio. En el sector 3 se observan 41 reacciones positivas en 232 muestras y en el sector 4, 7 reacciones positivas en 301 muestras.

En los sectores avícolas 5, 6 y 7 que registran vacunación HCI con serie MDO 1244, se observó una reacción positiva a la prueba IDAG en el mes de junio (1 muestra positiva de 252 aves muestreadas).

La tasa de seropositividad general es de 3,6% y la de seropositividad específica estandarizada de los sectores con aves reaccionantes es de 15,4% en el sector 3 y de 2,6% en el sector 4.

Las aves no vacunadas registran una tasa de 0% y los sectores con vacuna HCI serie MDO 1244, registran una tasa estandarizada de 0,5%.

El sector avícola 1 no fue muestreado.

En el cuadro 4, se muestran los resultados observados en el muestreo del mes de julio.

Cuadro 4
Resultados del muestreo serológico IDAG, de julio, de las aves
de los diferentes sectores del plantel avícola

Sectores avícolas	Series vacuna HCI	Muestreo de las aves de los sectores		
		N° de muestras	Negativos	Positivos
1	Sin vacunación	0	-	-
2	Sin vacunación	84	84	0
3	MDO 1242	64	56	8
4	MDO 1242	58	55	3
5	MDO 1244	56	56	0
6	MDO 1244	84	84	0
7	MDO 1244	56	56	0
TOTAL	-	402	391	11

El sector 2, que no registra vacunación HCI, muestra resultados negativos a la prueba IDAG. El sector avícola 1 no fue muestreado.

El sector 3, que fue vacunado con la serie MDO 1242 de la vacuna HCI , evidenció ,al igual que el sector 4, reacciones positivas a la prueba IDAG . En el sector 3 se observan 8 reacciones positivas en 64 muestras, y en el sector 4, 3 reacciones positivas sobre 58 muestras.

Los sectores avícolas 5, 6, y 7, que fueron vacunados con la serie MDO 1244, no evidenciaron reacciones positivas a la prueba IDAG en julio.

La tasa de seropositividad general es de 2,8% y la de seropositividad específica estandarizada de los sectores con aves reaccionantes es de 13% en el sector 3 , y de 4,9% en el sector 4.

Estudio de inocuidad y seroconversión

Debido a la sospecha de contaminación con antígeno influenza aviar que afectaba al producto vacuna inactivada hepatitis a cuerpo de inclusión, Serie N° MDO 1242, el laboratorio oficial del SAG llevó a cabo un estudio de inocuidad y seroconversión. Se utilizaron aves susceptibles de 4 semanas de edad, IDAG negativos a IA, a razón de 10 aves por cada muestra de biológico a analizar. Los cuadros 5 a 7 muestran los resultados de este estudio.

Cuadro 5
Fechas de las inoculaciones.

Muestra	Fecha inoculación (julio, 2002)	Sangría 1° (julio, 2002)	Sangría 2° (agosto, 2002)	Sangría 3° (agosto, 2002)
1	04	25	01	08
2	04	25	01	08
3	05	26	02	09

Cuadro 6
Resultados de la seroconversión.

Muestra	1° Sangría (21 días)	2° Sangría (28 días)	3° Sangría (35 días)
1	* 0/9 IDAG Positivos	0/9 IDAG Positivos	4/9 IDAG Positivos
2	0/10 IDAG Positivos	4/10 IDAG Positivos	6/10 IDAG Positivos
3	0/10 IDAG Positivos	1/10 IDAG Positivos	3/10 IDAG Positivos

* Ave muerta en la sangría.

Cuadro 7
Resultados del estudio de inocuidad.

Muestra	Síntomas clínicos*	Lesiones anatomopatológicas**
1	S.S.C.	S.L.M.A.
2	S.S.C.	S.L.M.A.
3	S.S.C.	S.L.M.A.

* S.S.C.: sin síntomas clínicos.

** S.L.M.A: sin lesiones macroscópicas aparentes.

Resultados de los estudios en los laboratorios de referencia

- El informe del Southeast Poultry Research Laboratory (SEPRL), USDA, Athens, Georgia, Estados Unidos, señala que se analizaron, contra HIC, muestras de una alícuota de dos diferentes frascos de un mismo lote de vacuna, mediante la técnica RT-PCR. La vacuna fue inicialmente centrifugada para separar la fase oleosa de la acuosa. La fase acuosa fue usada para extraer y purificar RNA residual en la vacuna. Ambas muestras fueron analizadas mediante el test RT-PCR usando primers específicos de virus influenza H5 y ambas fueron positivas con un umbral de ciclos de entre 37-38.

El RNA fue también amplificado usando diferentes primers específicos de influenza para intentar y ordenar el RNA viral en la vacuna. Un producto PCR fue obtenido con gen no estructural y preliminarmente la secuencia analizada muestra un alta similitud de secuencias con el aislado mexicano /95 de H5N2.

La misma técnica fue utilizada para purificar RNA de vacunas comerciales H5N2 y las muestras analizadas fueron positivas para H5 por la técnica RT-PCR con un umbral de ciclos entre 33 y 34. Esto demuestra que la técnica puede identificar RNA residual en vacunas comerciales de influenza. El mayor umbral de ciclos del RT-PCR para la vacuna HIC sugiere que el virus influenza está menos presente en esta vacuna.

El SEPRL concluyó que, probablemente, un virus influenza H5 contaminó la vacuna comercial que fue analizada.

- El VLA (Weybridge, Reino Unido), utilizó cinco pollos SPF de 2 a 3 semanas de edad, los inoculó subcutáneamente con la vacuna HCl; los controles correspondieron a cinco aves no inoculadas en la misma sala. Después de dos semanas, a todas las aves se les extrajo muestras de sangre para analizar la presencia de anticuerpos contra la influenza A subtipo H5. La respuesta de anticuerpos detectables fue baja sólo en algunas aves pero no en todas las vacunadas, por otra parte todas las aves no vacunadas dieron títulos IH negativos ($<2^1$) con el antígeno. Luego, las aves vacunadas fueron reinoculadas y sangradas dos semanas después (cuadro 8).

Cuadro 8
Resultados de la reinoculación de las aves.

Tratamiento		Presangrado	15 días post 1° inoculación	14 días post 2° inoculación
Control no vacunado		<1	<1	<1
		<1	<1	<1
		<1	<1	<1
		<1	<1	<1
		<1	<1	<1
Vacuna HCl	Ave N° 1	<1	<1	4
	Ave N° 2	<1	<1	4
	Ave N° 3	<1	5	6
	Ave N° 4	<1	<1	<1
	Ave N° 5	<1	<1	<1

El VLA también analizó otros tres frascos de vacuna del mismo lote; en todas las aves inoculadas con esta vacuna hubo seroconversión en niveles bajos.

Por otra parte, este laboratorio analizó lotes de la citada vacuna de HCl, señalando que fue amplificada, por RT-PCR, una región de 244 pares de bases de un virus H5, reportando que la secuencia de nucleótidos de esta amplificación estaba muy relacionada con un virus H5 aislado en Bélgica en 1999 y también con un virus H5 aislado en Italia en 1998. Indican también que este hallazgo de H5 es muy distante a todas las cepas de Norteamérica examinadas a la fecha. El sitio de clivaje era indicativo de un virus de baja patogenicidad, aunque no muy típico.

5. Conclusiones

1. En un plantel avícola de la VI Región de Chile, conformado por 7 sectores, se detectaron en pruebas para certificación de exportación, resultados seropositivos a la prueba IDAG para influenza aviar en mayo de 2002.
2. El primer hecho epidemiológico significativo de este evento, es que no se observaron resultados clínicos, ni anátomo-patológicos derivados de una interacción agente viral influenza aviar altamente patógeno en aves susceptibles.
3. De la información recolectada en campo se determinó que estos resultados serológicos se presentaron en aves mayores de 11 semanas de edad. La tasa de seropositividad específica estandarizada fue de: 7,1 y 6,7% en los sectores 3 y 4; Por contraste la tasa de seropositividad específica en el resto de los sectores avícolas fue prácticamente equivalente a 0 por cada 100 individuos muestreados.
4. Considerando la particularidad de la respuesta serológica de las aves de los sectores 3 y 4 se estimó la existencia de un factor específico de riesgo asociado a dichas aves. Del análisis de los factores antes mencionados se pudo observar que los grupos de aves sometidos a muestreo serológico para la prueba IDAG de influenza aviar sólo se diferenciaban respecto del factor vacunaciones HCI. Es decir, el resto de los factores eran comunes a todos los sectores avícolas.
5. En Los sectores avícolas seropositivos 3 y 4 fue utilizada la serie MDO 1242 de una vacuna contra la Hepatitis a cuerpo de Inclusión, que los diferencia de los sectores 5, 6 y 7; vacunados con otra serie MDO 1244, Ello, junto a la evidencia de ausencia de manifestaciones de enfermedad, y a que estas vacunas habían pasado por los respectivos controles de calidad en la Unidad de Control de Biológicos del SAG, se estableció la hipótesis que la infección de IA en el plantel de la VI Región se debió al uso de una vacuna importada HCI contaminada con virus influenza aviar inactivado.
6. La tasa de seropositividad general es de 3,9% y la tasa de seropositividad específica estandarizada de los sectores con aves reaccionantes fue de 15% en el sector 3 y de 6,4% en el sector 4.
7. Las aves no vacunadas registran una tasa de 0% y los sectores con vacuna HCI serie MDO 1244 registran una tasa similar, con la excepción del sector 6 que registra una tasa de seropositividad específica estandarizada de 0,3 por cada 100 aves.
8. Se inocularon aves susceptibles de 4 semanas de edad con la vacuna HCI serie MDO 1242 en el Laboratorio Oficial del SAG (Laboratorio Pecuario de Lo Aguirre). Los resultados demostraron que 5/29 y 13/29 aves muestreadas 28 y 35 días post vacunación respectivamente fueran seropositivas. También esta prueba demostró ausencia de signos clínicos y de lesiones en las aves.
9. Las vacunas HCI sospechosas fueron analizadas en los laboratorios SEPRL (USA) y VLA, Weybridge (UK). Los resultados en el primer caso permitieron determinar la existencia de un virus influenza aviar A subtipo H5, y el estudio de la secuenciación del genoma viral determinó una alta similitud con un aislado mexicano H5N2. Concluye este laboratorio en que un virus influenza aviar H5 probablemente contaminó la vacuna HCI comercial. El VLA concluye en la presencia de anticuerpos contra el virus influenza aviar A subtipo H5.

10. La investigación realizada por el laboratorio comercial por su parte, permitió establecer que el material genético compatible con el subtipo H5 N2 de IA presente en la vacuna de HCI, fue una acción deliberada ocasionada por personal que, en el momento de producirse el lote en cuestión, estaba próximo a ser separado de la empresa. Este accidente, se circunscribe a un lote pequeño que no ocasionó ningún problema, debido a que se trataba de una vacuna inactivada, de la cual se mostró su total inocuidad.
11. Por esta serie de pruebas de laboratorio, nacionales y en laboratorios de referencia internacionales, se confirmó la hipótesis epidemiológica de un contaminante viral IA inactivado en la vacuna comercial HCI.

