

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**Evaluación de la respuesta inmune contra la
Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio-
Gumboro mediante la prueba de Seroneutralización
en Cultivo Celular**

DINA ESTER REYNA LÓPEZ

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2003

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**Evaluación de la respuesta inmune contra la
Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio-
Gumboro mediante la prueba de Seroneutralización
en Cultivo Celular**

TESIS

Presentada a la Honorable Junta Directiva de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la
Universidad de San Carlos de Guatemala

Por

DINA ESTER REYNA LÓPEZ

Al conferírsele el Título de

MEDICO VETERINARIO

GUATEMALA, OCTUBRE de 2003

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

| | |
|----------------|----------------------------|
| DECANO: | Dr. Mario Llerena Quan |
| SECRETARIA: | Dra. Beatriz Santizo |
| VOCAL PRIMERO: | Lic. Carlos Saavedra |
| VOCAL SEGUNDO: | Dr. Fredy González |
| VOCAL TERCERO: | Dr. Edgar Bailey |
| VOCAL CUARTO: | Bach. Juan Pablo Nájera |
| VOCAL QUINTO: | Bach. Luz Francisca García |

ASESORES

Dr. Carlos Del Águila Bernasconi
Dra. Blanca Zelaya de Romillo
Dr. Carlos Camey Rodas

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento a lo establecido por los Estatutos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a consideración de ustedes el trabajo de tesis titulado

Evaluación de la respuesta inmune contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio- Gumboro mediante la prueba de Seroneutralización en Cultivo Celular

Como requisito previo a optar al Título Profesional de

MÉDICO VETERINARIO

ACTO QUE DEDICO

A Dios: Quien me dio la sabiduría y la inteligencia para mis estudios

A mis Padres: Ubaldo y Antonieta por todo el apoyo que siempre me brindaron

A mis hermanos: Zila, Juli, Ubaldo y Clau

A mi tía: Blanqui por toda la ayuda que me dio

A mis amigos y compañeros : Vale, Mariajosé, Adria, Claudia, Roci, José, Mauricio, Oscar y Varguitas

Y a todos ustedes por estar acompañándome en este momento tan especial.

AGRADECIMIENTOS

- A: Dios por haberme permitido llegar a este día
- A: La Universidad de San Carlos de Guatemala y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por haber sido mi casa de estudios
- A: Dr. Carlos del Águila Bernasconi
Dra. Blanca de Romillo y
Dr. Carlos Camey
Por el asesoramiento brindado en la realización de la presente investigación
- A: El Centro de Capacitación Agropecuaria para Ciegos “Santa Lucía” en especial a Don Luis y a Don Carlos ya que sin su colaboración el presente estudio no se hubiera podido llevar a cabo
- A: El Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
- A: Laboratorios Lavet en especial al Dr. Del Aguila por la confianza depositada en mi y su valiosa y desinteresada colaboración
- A: Dr. Daniel Ortega quien me ayudó a la recopilación de la revisión bibliográfica

Y a todas aquellas personas y entidades que de una u otra manera contribuyeron a la elaboración de esta investigación.

INDICE

| | |
|--|----|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. HIPÓTESIS | 2 |
| III. OBJETIVOS | 3 |
| 3.1 Objetivo General | 3 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 3 |
| IV. REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| 4.1 Enfermedad Infecciosa de la bolsa de Fabricio | 4 |
| 4.2 Agente Etiológico | 4 |
| 4.3 Variabilidad Antigénica | 5 |
| 4.4 Patogenia y Epizootiología | 9 |
| 4.5 Inmunosupresión inducida por el VEIB y la Supresión a la Respuesta Humoral | 10 |
| 4.6 Transmisión, portadores, vectores | 13 |
| 4.7 Sintomatología y Lesiones Anatomopatológicas | 14 |
| 4.8 Lesiones microscópicas | 16 |
| 4.9 Diagnóstico | 17 |
| 4.9.1 A nivel de campo | 17 |
| 4.9.2 Diagnóstico de Laboratorio | 17 |
| 4.9.2.1 Aislamiento viral | 17 |
| 4.9.3 Pruebas Serológicas | 19 |
| 4.9.3.1 Inmunodifusión en Agar Gel (IDIRAG) | 19 |
| 4.9.3.2 Inmunoabsorción con Enzimas Asociadas (ELISA) | 20 |
| 4.9.3.3 Seroneutralización | 22 |
| 4.9.3.4 Cultivo Celular | 24 |
| 4.10 Prevención y Control | 29 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS | 35 |
| 5.1. Materiales | 35 |
| 5.1.1 Materiales de Laboratorio | 35 |
| 5.1.2 Materiales de Campo | 36 |
| 5.1.3 Materiales de Tipo Biológico | 36 |
| 5.2. Métodos | 37 |
| 5.2.1 Diseño del Estudio | 37 |
| 5.2.2 Procedimientos a nivel de campo | 37 |
| 5.2.3 Procedimientos a nivel de laboratorio | 37 |

| | | |
|--------------|--|----|
| 5.2.3.1 | Separación del Suero | 38 |
| 5.2.3.2 | Preparación del Cultivo Celular en Fibro- blastos de Embrión de Pollo | 38 |
| 5.2.3.3 | Prueba de Seroneutralización | 40 |
| 5.3 | Análisis de Datos | 47 |
| VI. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 48 |
| VII. | CONCLUSIONES | 56 |
| VIII. | RECOMENDACIONES | 59 |
| IX. | RESUMEN | 60 |
| | SUMMARY | 61 |
| X. | BIBLIOGRAFÍA | 63 |

I. INTRODUCCION

La Enfermedad Infecciosa de la bolsa de Fabricio-Gumboro es una enfermedad viral aguda altamente contagiosa y es considerada como una de las más importantes infecciones productora de inmunosupresión en avicultura.

Los cambios constantes de este virus son los causantes de la variación en la patogenicidad, y su penetración celular sin poder ser descubierta, es el principal problema para su control.

Estas afecciones hacen, que en este caso, los pollos de engorde vengan a ser más susceptibles a otros agentes infecciosos. Y por ser este un virus muy evolucionado se tiene que poner principal atención a cómo prevenir y controlar la enfermedad y evitar así pérdidas, capaces de causar un fuerte impacto económico en la industria avícola.

Como medida básica de control está la vacunación. Pero este procedimiento no es nada fácil, se deben considerar varios factores como el nivel de anticuerpos maternos ya que al predecir el ritmo de pérdida de dichos anticuerpos se podrá determinar el momento óptimo para la vacunación.

El objetivo de este estudio es evaluar la respuesta inmune mediante la prueba de Seroneutralización en Cultivo Celular. Midiendo la capacidad que un determinado suero tiene para neutralizar la infectividad del virus sobre dichas líneas celulares sensibles, pudiendo ser observadas por el llamado Efecto Citopático. Es entonces cuando puede ser posible que la prueba permita determinar el momento más adecuado para la vacunación.

II. HIPÓTESIS

La inmunización contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio con la vacuna producida en fibroblastos de embrión de pollo SPF Cofal y Marek negativos produce una respuesta inmune adecuada en los pollitos de engorde independientemente del nivel de anticuerpos maternos circulantes.

III. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la respuesta inmune contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio-Gumboro en pollo de engorde mediante la prueba de Seroneutralización en Cultivo Celular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la edad más adecuada para la inmunización de pollitos de engorde contra la enfermedad de la Bolsa de Fabricio a fin de que no interfiera con los anticuerpos maternos circulantes.
- Establecer un programa de inmunización adecuado para la protección de los pollos de engorde contra la enfermedad de la Bolsa de Fabricio.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio

La enfermedad de Gumboro es una enfermedad viral aguda altamente contagiosa, de pollos jóvenes que tiene como principal blanco el tejido linfoide con predilección especial por la bolsa de Fabricio. (3, 21)

El nombre de Gumboro proviene de la localidad del Estado de Delaware, en Estados Unidos donde se describió por primera vez. Por afectar en el pollo el Sistema Inmune Primario (bolsa de Fabricio y timo) y al Sistema Inmune Secundario (tejidos linfoides intestinales, tonsilas cecales, bazo y glándula de Harder, reguladora de inmunidad local de la mucosa respiratoria) es considerada como una de las más importantes infecciones productoras de inmunosupresión en avicultura. (1,3, 6,7,21)

Se le conoce con varios nombres como Bursitis Infecciosa, Enfermedad Bursal, Desorden infeccioso de la Bursa, Infección de la Bolsa de Fabricio, Enfermedad Infecciosa de la Bursa, Enfermedad infecciosa de la Bolsa de Fabricio, Enfermedad de Gumboro. (1,32)

4.2 Agente Etiológico

El Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (VEIB) es un virus pequeño que pertenece a la familia Birnaviridae (Cosgrove

1962, Dobos, et al. 1979) El virión es sin envoltura con una cubierta simple con simetría icosaédrica y diámetro que varía de 55 a 65 nm. La simetría de la cápside es descentrada con una triangulación número T= 13 y desviación a la derecha. (3,9,16)

Antes de que hubiera información adecuada acerca de las características morfológicas y fisicoquímicas se ubicaba en ocasiones en las familias Picornaviridae o Reoviridae. (2)

4.3 Variabilidad Antigénica

Se tiene la evidencia mediante la prueba de Virus Neutralización que el dsRNA del genoma del VEIB presenta dos serotipos designados 1 y 2. Ambos presentan una gran diversidad antigénica. El serotipo 2 infecta a los pollos pero no produce enfermedad (Ismail y col., 1988). En el serotipo 1 se encontraron así mismo 6 subtipos, los cuales presentan un rango de patogenicidad muy diverso para los pollos, desde virus totalmente apatógenos, hasta los muy virulentos.(Jackwood y Saif, 1987). En los últimos años se ha detectado cambios en el genoma vírico que podrían causar la variación en la patogenicidad (Eterradosi y col., 1999). Se ha identificado hasta el presente un tercer serotipo descrito por Lee y Lukert. (1,7, 8, 11,12)

Las diferentes formas patogénicas de Gumboro que existen son: los virus patógenos “clásicos” (inmunosupresión y baja mortalidad), los únicos “muy virulentos” (inmunosupresión y alta mortalidad), las “variantes antigénicas “ norteamericanas (sin mortalidad, pero con inmunosupresión severa) (21, 22).

Jackwood y Saif, 1987; Ismail y Saif, 1991; Rosenberg y Cloud, 1986; identificaron varios subtipos antigénicos del serotipo 1

usando una Virus Neutralización cruzada ya que esta prueba es la que mejor refleja la protección cruzada. La ausencia de neutralización cruzada define los dos serotipos de Gumboro, considerando que existe una neutralización cruzada reducida entre las cepas del serotipo 1, lo que ha llevado a la identificación de “subtipos o variantes antigénicas”. Las cepas muy virulentas aun pertenecen al serotipo 1 clásico (8,13).

Se han desarrollado los anticuerpos monoclonales para realizar una rápida determinación antigénica de las cepas de Gumboro. Un Anticuerpo Monoclonal es un anticuerpo producido en el laboratorio, que es específico para una pequeñísima porción de una proteína, llamada epítope, la cual estimula la biosíntesis de anticuerpos in vivo. (8,13)

Crisman et al., 1993; Oppling et al., 1991; Zinder et al., 1988; Whetzel y Jackwood en 1995 determinaron que cambios en aminoácidos ocurridos en este sitio pueden evitar que los anticuerpos se unan y así se podría reducir la neutralización del virus dependiendo del suero utilizado. En el caso de Gumboro todos los epítopes neutralizantes conocidos se localizan en el tercio central de la cápside externa de la proteína PV, debido a que la mayoría de los cambios en los aminoácidos ocurren en esta región. (8,13)

Recientemente se utiliza la Transcripción Reversa (RT) y la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (RT-PCR) para diferenciar cadenas del VEIB basado en su patogenicidad, debido a que los cambios de los aminoácidos está genéticamente codificados, también es posible detectar variaciones entre cepas de Gumboro. En la secuencia de los aminoácidos de la “VP” se han determinado lugares de mutaciones, que se han asociado a

diferencias en la antigenicidad entre cadenas del VEIB (Bayliss et al., 1990; Heine et al., 1991; Lana et al., 1992) (8,13).

Desafortunadamente las cepas variantes que están en el campo siguen sufriendo continuas mutaciones y por lo tanto modificaciones en su genoma. (6)

En la actualidad se reconoce que el virus tiene cuatro proteínas virales designadas como VP1, VP2, VP3 y VP4. Se han observado proteínas adicionales como la VPX y VP5 y se piensa que tienen una relación de precursor-producto. (Jackwood y col. y Kibenge y col.) La cápside del VEIB está hecha de proteínas VP2, y VP3. La VP2 constituye la cápside externa y es el blanco de los anticuerpos neutralizantes y protectores sintetizados por el ave infectada. (Betch et al., 1988; Fahey et al., 1989). La VP3 constituye el cápside interior y actúa en conjunto con la proteína VP1. El genoma del virus condensado dentro del virión consta de dos segmentos (A y B) de doble banda de ARN, de donde procede el nombre birnavirus, asociados con una proteína interior, VP1 la cual es la enzima responsable de la replicación viral en las células infectadas. El segmento A codifica las proteínas del cápside VP2 y VP3, junto con proteínas no estructurales que no están incorporadas dentro del virión, las proteínas VP4 y VP5 son las responsables de la maduración de las proteínas del cápside y de la liberación del virus desde la célula infectada respectivamente. El segmento B del genoma del VEIB sólo codifica la VP1 lo cual fue descrito por Eterradossi y col. en 1999. (3,7,16).

Granzow et al. 1997 describió que en preparaciones purificadas del VEIB hay viriones icosaédricos y túbulos Tipo I con un diámetro de 60 nm y túbulos Tipo II de 24-26 nm. de diámetro. Los túbulos de Tipo II parecían contener VP4 y fueron detectados

en células infectadas y como contaminantes en las preparaciones purificadas de (16).

Trabajos de investigación recientes han reportado que la expresión del VEIB completa es a través de poli proteínas y tiene dos diferentes expresiones de báculo virus. La estructura poliproteica con la morfogénesis del virión optimiza la producción de Partículas Virales de Gumboro (VLP) las cuales fueron descritas previamente por Dybing y Jackwood en 1997 y Vakaria en 1996. (16)

Se demostró que la expresión por báculo virus tiene una construcción codificada VPX/VVVP4 y los primeros 157 aminoácidos de la VP3 que resultó de la síntesis del VPX y VP4. (16)

En cultivos de células de insectos en la expresión de la poliproteína del VEIB; se encontraron túbulos del Tipo I y II. El cápside del virus de Gumboro es formado por el procesamiento de proteínas grandes y el subsecuente ensamble con VPX /VP2 y VP3. (16)

La replicación viral ha sido revisada por Kibenge y col., pero es poco lo que se conoce acerca de los eventos bioquímicos vinculados con la replicación del Birnavirus. (3)

Lukert en 1974 describió que el virus se fija a las células de riñón de embrión de pollo en grado máximo a los 75 minutos después de inoculación. El ciclo de multiplicación en las células de embrión de pollo es de 10 a 36 horas, y el periodo latente de 4 a 6 horas. Se desconoce el sitio receptor de reconocimiento de la célula en el virus (3)

El mecanismo de la síntesis del RNA viral no se ha determinado con claridad. Se han demostrado proteínas ligadas a genoma, lo que indica que el virus replica su ácido nucleico por un mecanismo de desplazamiento de filamento. La actividad de la polimerasa de el RNA puede demostrarse sin pretratamiento del virus, lo que señala que se producen transcripción y replicación después de la penetración celular sin descubrimiento del virus. (9).

Beth informó que no se suspende la síntesis de proteínas del huésped en los fibroblastos de embrión de pollo infectados con el VEIB. (3)

Los estudios han demostrado que es un virus muy estable y puede permanecer en los alojamientos aviares aún después de la limpieza y desinfección, es resistente al éter y cloroformo, es estable a pH de 9.2, no se afecta por el pH 2 y aún es viable después de 5 horas a 56°C; se reduce su infectividad a la exposición de formalina al 0.5% por seis horas; es resistente a varios desinfectantes y sólo un complejo de yodo tiene algún efecto perjudicial. La cloramina mata al virus después de 10 minutos. El virus se inactiva si se expone a fenol o cresol en concentraciones de 1% durante una hora. Por otra parte el virus puede permanecer infeccioso en un galpón alrededor de 120 días después de haber extraído a las aves afectadas, también se ha demostrado virus infeccioso en el agua, alimento y heces obtenidos de granjas afectadas después de 50 días. (3,6)

4.4 Patogenia y Epizootiología

El género Birnavirus infecta a los pollos provocando necrosis y atrofia de la bolsa de Fabricio, además produce una depleción de

linfocitos en todos los órganos linfoides, por lo que tiene un gran efecto inmunodepresor. Si el pollo es infectado durante las primeras 2 ó 3 semanas de vida, se produce un gran efecto inmunodepresor sin signos clínicos (forma subclínica). Sin embargo si el pollo es infectado después de tres semanas, generalmente aparece una enfermedad con signos clínicos manifiestos (forma clínica), observándose bolsas hipertróficas, edematosas y/o hemorrágicas, hemorragias subcutáneas multifocales, diarreas y muertes descrito por Glisson y Kleven en 1993. En pavos la infección es siempre subclínica (28).

Los virus clásicos que inducen inmunosupresión y baja mortalidad aún son prevalentes en varias áreas por lo que se hace hincapié al estudio de las cepas con propiedades inmunosupresoras. (1, 7, 25)

4.5 Inmunosupresión inducida por el VEIB y la Supresión a la Respuesta Humoral

Ratuenschlein y Sharma presentaron en detalle la inmunosupresión que induce el VEIB y describieron que la respuesta inmune del tipo humoral representa una importante parte del sistema inmune. Las células “B”, producen los anticuerpos contra los agentes infecciosos y no infecciosos, son la población clave de la respuesta humoral. Las células que son el principal blanco para la replicación del virus de la EIB son las células “B” en división activa; esta infección determina la destrucción de las células “B” en la Bursa de Fabricio, el principal órgano productor de células “B”, en menor grado, en otros órganos tales como las tonsilas cecales y el bazo. El efecto destructivo del virus de la EIB en las células “B” produce un una reducción dramática de la habilidad de las aves infectadas con el virus para

producir anticuerpos. Esta respuesta primaria se compromete durante las primeras semanas de la infección con el virus de EIB.

Luego la Bursa de Fabricio se recobra, y la capacidad de respuesta a la síntesis de los anticuerpos retorna a niveles cercanos a los normales. (25, 29)

Además de reducir la inmunidad humoral, el virus de la EIB también compromete la respuesta inmune mediada por células en los pollos. Las células "T" son una de las más importantes poblaciones celulares requeridas para la respuesta inmune mediada por células. Fue demostrado que las Células "T" son severamente suprimidas, en su respuesta proliferativa in vitro, a células "T" mitógenas en la fase aguda de la EIB. Esto indica que la capacidad de respuesta de la célula T es reducida y la respuesta inmune mediada por células es disminuida. Las aves infectadas con el virus de la EIB pueden ser más susceptibles a otros agentes infecciosos. (25,29)

También se observó que cuando los pollos son expuestos al virus, las células "T" se acumulan en la Bursa de Fabricio. Los pollos normales tienen muy pocas Células "T" bursales. Estas células "T" intrabursales inducidas por el virus son activadas y tienen efectos citotóxicos. (25,29)

Investigaciones recientes indican que las células "T" intrabursales contribuyen a la inmunopatogénesis del virus de la EIB de dos maneras significativas. Estas controlan la replicación del virus en la fase temprana de infección. Sin embargo, las células "T" también pueden tener habilidades supresoras y pueden promover la secreción de citoquinas pro inflamatorias. Estos efectos negativos de las células "T" pueden contribuir a la

destrucción del tejido bursal y retardar la restitución de la Bursa. (25,29)

El virus de la EIB también puede modular la función innata del sistema inmune como en las células fagocíticas del grupo monocito/macrófago. Algunas de estas células fagocitan y destruyen el virus, así como apoyan a la replicación viral y sufren muerte celular. Evidencia indirecta indica que la actividad fagocítica de estas células podía estar comprometida. Por otra parte, se vio que el virus de la EIB puede activar a los macrófagos, éstos activados podrían liberar mediadores inmunes, que podrían modular otras células inmunes y alterar el sistema inmune de los pollos afectados (25,29).

El VEIB se reproduce en los linfocitos “B”, bajo presión de división activa de IgM e induce tanto a necrosis como apoptosis (muerte celular programada) de estas células, principalmente en la Bolsa de Fabricio. Primero, el órgano blanco sufre una hipertrofia mediada por inflamación (3-4 días post infección) seguida por atrofia. Simultáneamente a un deterioro temporal o más permanente de la producción de anticuerpos que causa la inmunosupresión. Este puede durar más de 4 semanas post infección con los virus más patógenos y favorece las infecciones secundarias bacterianas, parasitarias o virales así como los fracasos de la vacunación en los pollos infectados o recuperados (7,29).

Esta inmunosupresión trae como consecuencia una disminución en la respuesta de anticuerpos a otras vacunas como Newcastle y Coriza Infecciosa y los pollos infectados de manera temprana son más susceptibles a otras enfermedades como la coccidiosis, enfermedad de Marek, anemia aplásica, laringotraqueitis infecciosa, bronquitis infecciosa, enfermedad

respiratoria crónica complicada, infecciones por reovirus etc. y los pollos muestran una baja en la ganancia de peso (3, 6, 7, 24, 25)

En las parvadas susceptibles, se presenta de manera súbita y hay un índice de morbilidad alto cerca del 100%. La mortalidad suele iniciarse hacia el tercer día posterior a la infección y retroceder en un período de 5 a 7 días, así que la mortalidad efectiva puede ser insignificante, pero puede ser tan elevada como de 20 a 30%. (3,7,24)

Los brotes iniciales en una granja suelen ser los más agudos. Muchas infecciones son silenciosas, debido a la edad de las aves (menores de tres semanas), a infección con cepas de campo avirulentas, o infección en presencia de anticuerpos maternos. (3).

4.6 Transmisión, portadores, vectores

La Infección de la Bursa de Fabricio es muy contagiosa, y el virus según dijo Benton y col., es persistente en el ambiente, encontraron que se retiraron aves de galeras infectadas 54 y 122 días después observaron que eran infectantes. También se demostró que en el agua, alimento y heces tomadas de locales infectados eran infectantes después de 52 días. (3)

No hay evidencia de que el VEIB se transmita a través del huevo o que exista un estado de portador verdadero en las aves recuperadas. (3)

Howie y Thorsen aislaron VEIB de mosquitos *Aedes vexans* el cual no fue patógeno para los pollos. Okoye y Uche detectaron antígenos de VEIB en 6 de 23 muestras de tejidos de ratas

capturadas muertas en granjas avícolas que habían tenido una historia de infección con VEIB (3).

4.7 Sintomatología y Lesiones Anatomopatológicas

El periodo de incubación es muy corto y los signos clínicos de la enfermedad se manifiestan en 2 a 3 días.

Cosgrove en 1967 describió que uno de los signos más tempranos de infección es la tendencia que tienen algunas aves de picotear sus propias cloacas. Plumas sucias en la cloaca, diarrea blanquecina o acuosa, anorexia, depresión, plumas erizadas, temblores, postración intensa y finalmente la muerte. Las aves afectadas se deshidratan, y en las etapas terminales de la enfermedad, tienen temperatura subnormal. (1, 3, 6,32)

Las aves que mueren están con coloración oscura de los músculos pectorales, a menudo hay hemorragias en los músculos de los muslos y pectorales (esto se basa en los factores implicados en la coagulación de la sangre, ya que se halló tiempos de coagulación crecientes en pollos infectados y sugieren que estas coagulopatías contribuyen a las lesiones hemorrágicas observadas). Hay aumento de moco en el intestino, las alteraciones renales prominentes pueden ser consecuencia de la deshidratación intensa. Se observa distensión edematosa de la región abdominal, congestión cutánea, hemorragias petequiales y equimóticas en área de las plumas, articulaciones de las patas y región cerebral, necrosis y palidez hepática, severa congestión de los pulmones, corazón pálido y congestión y puntos necróticos en el riñón. (32)

La bolsa de Fabricio parece ser el órgano blanco primario del virus. Es importante que se comprenda la secuencia de las alteraciones cuando se examinen aves para el diagnóstico.(33)

Cheville, hizo un estudio y determinó que en el 2do. y 3er. día posterior a la infección, la bolsa tiene un trasudado amarillento gelatinoso que cubre la superficie serosa. Las estriaciones longitudinales de la superficie se vuelven prominentes, y el color blanco normal cambia a crema. El trasudado desaparece al retornar la bolsa a su tamaño normal y volverse gris durante y después del periodo de atrofia. (3)

En el 3er día posterior a la infección la bolsa comienza a agrandarse y a tener más peso debido al edema e hiperemia. Hacia el cuarto día suele tener el doble de su peso normal y entonces comienza a decrecer. Hacia el quinto día ha retornado a su peso normal, pero la bolsa continúa atrofiándose y hacia el octavo día tiene alrededor de una tercera parte de su peso original. (3)

La bolsa infectada muestra muchas veces focos necróticos y en ocasiones hemorragias petequiales o equimóticas sobre la superficie mucosa. A veces hay hemorragia extensa en la totalidad de la bolsa; en estos casos las aves pueden tener sangre en las deyecciones (3).

Las últimas variantes de Gumboro son virus evolucionados que pueden causar o contribuir al desarrollo de una proventriculitis infecciosa. Este síndrome entérico se caracteriza por una ganancia de peso corporal reducida, mientras que también se presentan obstrucciones y existe una inmunosupresión, a veces una atrofia del timo y un proventrículo débil y aumentado en volumen. (4,7)

El bazo puede estar ligeramente aumentado de tamaño y muy a menudo tiene focos grises pequeños dispersos de manera uniforme en la superficie. De vez en cuando se observan hemorragias en la mucosa en el punto de unión del proventrículo y de la molleja. (1,3, 32)

4.8 Lesiones microscópicas

Estas lesiones se producen principalmente en las estructuras linfoides, bolsa de Fabricio, bazo, timo, glándula de Harder y tonsilas cecales. (3)

En la bolsa de Fabricio se observa degeneración y necrosis de linfocitos en el área medular de los folículos bursales. Los linfocitos son sustituidos pronto por neutrófilos, restos picnóticos de células reticuloendoteliales hiperplásicas. (3)

El bazo presenta hiperplasia de células reticuloendoteliales. El timo y las tonsilas cecales con reacción celular en los tejidos linfoides. (3)

Survashe y col., y Dohms y col., encontraron la glándula de Harder infiltrada y poblada con células plasmáticas en pollos viejos. En pollos de engorde hubo necrosis celular en la glándula. (3)

Según Helmbolt y Garner hallaron que las lesiones en riñón son inespecíficas, y las lesiones observadas son cilindros grandes de material homogéneo infiltrado con heterófilos. El hígado puede tener una infiltración perivascular ligera de monocitos.(3)

En microscopía electrónica Naqi y Millar observaron una reducción en el número y tamaño de las microvellosidades de las células epiteliales. Y hubo pérdida gradual de folículos en botón. (3)

4.9 Diagnóstico

4.9.1 A nivel de campo

Los signos clínicos son característicos de esta enfermedad, la forma de presentación rápida, morbilidad elevada, curva de mortalidad en espiga. (3)

Las alteraciones características visibles macroscópicamente de la bolsa de Fabricio. Las infecciones en pollos muy jóvenes, o pollitos con anticuerpos maternos suelen ser subclínicas y se diagnostican retrospectivamente en la necropsia con observaciones de atrofia bursal macroscópica e histológica. (3)

4.9.2 Diagnóstico de Laboratorio

4.9.2.1 Aislamiento viral

La bolsa de Fabricio y el bazo son los tejidos preferidos para el aislamiento del VEIB. Los tejidos deben macerarse en un caldo o solución salina tratados con antibióticos y centrifugarse para eliminar las partículas grandes de tejido. El sobrenadante se usa para inocular huevos embrionados o cultivos celulares. Según Hitchner la muerte de estos suele suceder de 3 a 5 días. Se producen hemorragias o edemas en los embriones. El huevo embrionado puede ser el sustrato más sensible para el aislamiento del VEIB. Las cepas variantes de VEIB difieren de los virus estándar en

que inducen esplenomegalia y necrosis hepática de embriones y producen baja mortalidad. (3,7)

El aislamiento y propagación del VEIB en cultivos celulares es también una de las técnicas. Se ha visto que el virus se replica en linfocitos "B", las células primarias derivadas de la Bolsa de Fabricio o líneas celulares continuas de origen de Células "B". (3,7)

El aislamiento de Gumboro también es posible mediante la inoculación oral, intranasal o intraocular de aves SPF de 3 a 6 semanas de edad (7).

También pueden utilizarse células BGM-70 para el aislamiento. (3)

McFerran y col., hicieron estudios con el uso de inmunofluorescencia y microscopía electrónica de embriones infectados y de cultivos celulares, la cual fue útil para la detección temprana e identificación del virus. Así como la tinción inmunofluorescente directa de los órganos afectados y su examen directo por microscopía electrónica (3).

Jackwood en 1988 utilizó las pruebas de ácido nucleico y las inmunovaloraciones con enzimas de captura de antígenos con el uso de anticuerpos monoclonales utilizado por Snyder y col., en 1988 que ayudan a detectar y diferenciar de manera directa virus en los tejidos (3).

4.9.3 Pruebas Serológicas

4.9.3.1 Inmunodifusión en Agar Gel (IDIRAG)

Esta técnica se usa para descubrir antígenos virales o para determinar la reacción cruzada de dichos antígenos y también para descubrir anticuerpos. (17,28)

La prueba se basa en que el virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa de Fabricio tiene un antígeno soluble específico de grupo, este antígeno que se usa generalmente es macerado de bursas provenientes de aves libres de patógenos que han sido inoculadas con el virus (Villegas, 1985). (1,21)

El antígeno y anticuerpo difunden uno hacia el otro en el medio del gel de agar, lo cual resulta en la formación de líneas de precipitación en la zona de equivalencia o de proporción óptima. El método es cualitativo. La desventaja de esta prueba radica en la falta de estandarización del antígeno, su baja sensibilidad y la alta concentración de reactivos necesarios para detección de casos positivos. (1,2,17,28)

4.9.3.2 Inmunoabsorción con Enzimas Asociadas (ELISA)

El método de ELISA se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) insolubilizados sobre la placa, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y por tanto, podrán fácilmente ser revelada mediante la adición del sustrato, que al actuar sobre la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante un colorímetro. La intensidad de color será proporcional a la cantidad de antiglobulina ligada a la enzima que se haya captado, a su vez será proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero que se está analizando. La interpretación de los resultados son mediciones de absorbancia (densidad óptica) de una simple dilución del suero problema, dentro de un “Lector de ELISA” (espectrofotometría). (7,26,28)

Este método está recomendado fundamentalmente para el estudio de poblaciones. Es una técnica altamente sensible y de gran especificidad, y se realiza de manera sencilla y económica. (4,22,23)

Desde que Marquardt et. al. en 1980, describió la detección de anticuerpos contra el VEIB por medio de ELISA se han hecho muchas mejoras a los ensayos. Estas pruebas están designadas para determinar el rango en el cual los anticuerpos maternos decrecen en el suero. (12)

Thayer et. al. (1987) reportó que hay una buena correlación entre ELISA y Virus Neutralización para la obtención de títulos altos de anticuerpos (7,12).

Existen estuches comerciales disponibles y por tanto pueden realizarse los estudios serológicos, éstos detectan anticuerpos para ambos Serotipos 1 y 2. Sin embargo, una respuesta inmune a variantes antigénicas del VEIB no puede ser distinguida de respuestas inmunes de otros tipos antigénicos de VEIB o del Serotipo 2. (7,12)

En el estudio hecho por Jackwood y col., en 1996 se sugiere que fragmentos de la proteína VP2 será muy útil para la identificación de los anticuerpos relacionados a los grupos del VEIB (7,12).

4.9.3.3 Seroneutralización

La neutralización es el fenómeno por el cual algunos isotipos de inmunoglobulinas como IgG, IgM e IgA son capaces de unirse a una toxina, bacteria o virus y neutralizar su actividad. (22)

Este método está considerado de referencia para cualquier estudio serológico pues el que más se correlaciona entre la respuesta “in vitro” y la respuesta “in vivo”. (22)

Este método es altamente específico y muy sensible. En la seroneutralización se avanza un paso más y se indica la capacidad que tiene un suero para neutralizar la actividad biológica del antígeno. Estas pruebas son más laboriosas, requieren de cultivos celulares, esterilidad, además de ser generalmente más lentas. Se consideran las pruebas de referencia para cualquier valoración serológica. (22)

Phillips, Jr. en 1981 hizo un estudio sobre la comparación de la determinación de Anticuerpos en líneas de precipitina y Anticuerpos de Virus Neutralización contra el virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa, este reporte describe el uso del antígeno *in vitro* en Agar Gel para determinar los anticuerpos y compara estas reacciones de las precipitinas con los títulos de anticuerpos detectados con Virus Neutralización. Se utilizaron

322 sueros de muestra y los resultados sugieren que la técnica utilizada para detectar anticuerpos con virus Neutralización contra VEIB es más sensible que la de Agar Gel, ya que un gran porcentaje de reacciones falsas-negativas ocurrieron. Sin embargo la prueba de Agar Gel es altamente específica para las precipitinas contra VEIB ya que si hubo reacciones falsas-positivas y todas las de Virus Neutralización fueron negativas.(23)

Otra comparación que hizo Weisman y Hitchner en 1978 fue detectar la respuesta serológica contra el virus de la EIB con las pruebas de Inmunodifusión en Agar Gel y la Virus Neutralización. (33)

La virus neutralización en cultivo celular resultó ser más sensible para determinar exposiciones tempranas al virus ya que muchos de los sueros que dieron negativos con la prueba de Agar Gel dieron positivos con la prueba de Virus Neutralización. (32)

En general todos los sueros de parvadas comerciales fueron libres de precipitinas, pero presentaron títulos a la Virus Neutralización y dichos títulos varían de acuerdo a las condiciones de las parvadas. (32)

Se determinó que una revacunación al agua de bebida a los 8 meses de edad no alteró los títulos de los anticuerpos. Y la inoculación del virus a pollitos con inmunidad materna a los 7 días

resultó en una buena respuesta serológica al hacer ambas pruebas. (33)

En 1985 Nicholas y colaboradores estudiaron la detección de anticuerpos contra el virus de la EIB con tres métodos serológicos. Por 5 semanas con intervalos de 5 semanas, se vacunaron aves libres de patógenos de cuatro semanas de edad, las cuales fueron muestreadas con las pruebas de ELISA, IDIRAG, y Virus Neutralización para determinar la presencia de anticuerpos. Se demostró que hubo gran relación entre los tres métodos. (19)

4.9.3.4 Cultivo Celular

Actualmente se utilizan cultivos celulares los cuales son un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *"in vitro"*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración hay diferentes tipos de cultivos: de órganos, explantes, primarios o secundarios y líneas celulares establecidas. (18)

El cultivo de tejidos se desarrolló a partir de los últimos años del Siglo XIX como una continuación de las técnicas de embriología. Wilhem Roux mantuvo en el año 1885 células de embrión de pollo en solución salina durante unos días. El zoólogo americano R.G. Harrison es considerado el

iniciador de los cultivos de tejidos animales, en 1907. Harrison fue el primer autor que empleó técnicas “*in vitro*” para el estudio de fenómenos “*in vivo*”, realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios. Pudo observar el crecimiento de los axones de los neuroblastos, y estableció que el axón se formaba por expansión a partir del cuerpo neuronal y no por fusión de una cadena de células. El cultivo se realizaba en una gota de linfa del anfibio que colgaba de un cubreobjetos sobre una cámara sellada. (18)

La primera limitación para el establecimiento de cultivos era lograr un medio nutritivo adecuado. Burrows en 1910 empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo. Este medio se reveló mucho mejor que los anteriormente probados, lo que le permitió observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel. (18)

Burrows y Carrel realizaron los primeros intentos de establecer cultivos de células de mamífero, y consiguieron mantener explantes obtenidos a partir de perros, gatos y conejillos de indias, así como en el crecimiento de tumores sólidos. Demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivo. Los medios empleados fueron plasma conjuntamente con extractos de embrión. (18)

Rous y Jones en 1916 emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para disociar las células de embriones de pollo, estableciendo el

primer cultivo celular. Uno de los mayores problemas que describen para el establecimiento de los cultivos celulares es la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación que aún hoy día se utilizan. (18)

En 1913 Carrel demostró la posibilidad de mantener en cultivo células extraídas de un embrión de pollo, durante un período de tiempo superior al de la vida de éste. Mantuvo en cultivo células de pollo durante 34 años . Gran parte del éxito en el mantenimiento de los cultivos se debió al desarrollo del denominado frasco de Carrel. (18)

Entre los años 1920 y 1940 se desarrollaron diferentes estrategias de obtención de cultivos y de mantenimiento de las condiciones estériles, pero sin grandes avances. A partir de los años 40, con el descubrimiento de los primeros antibióticos, se desarrollaron numerosas aplicaciones de entre las que se puede destacar :

1948 Earle y col., en 1948 aislaron células de la línea celular “L” y mostraron que eran capaces de formar clones en el cultivo de tejidos. Demostraron que para que una célula llegue a dividirse necesita ser alimentada con los nutrientes correctos. (18)

En 1952 Grey y col., establecen la primera línea celular continua, las actualmente bien conocidas Células HeLa . El medio empleado era extremadamente complejo y poco definido: plasma

de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano. (18)

En 1979 Rita Levi-montalcini y col., establecen que el factor de crecimiento nervioso estimula el crecimiento de los axones en tejidos de cultivo. Este trabajo les permitió obtener el Premio Nóbel en 1986. (18)

Eagle en 1955 realiza la primera investigación sistemática de los requerimientos nutritivos de las células en cultivo. Describe que las necesidades del cultivo de soluciones corporales complejas pueden ser satisfechas por tan poco como el 1% de suero de caballo dializado en un medio definido de pequeñas moléculas (aminoácidos, azúcares, ...). (18)

En 1961, Hayflick y Moorhead usaron por primera vez antibióticos para prevenir la contaminación de los cultivos de fibroblastos. Pudieron mantener estos cultivos durante unos 12 pases, pero no consiguieron establecer líneas estables. (18)

Ham en 1965 introduce el primer medio definido libre de suero capaz de mantener algunas células de mamífero en cultivo indefinidamente. (18)

Augusti-Tocco y Sato establecen en 1969 la primera línea celular estable de neuroblastoma aislando clones que establecían procesos nerviosos y que eran eléctricamente excitables. Se empiezan a establecer las primeras líneas celulares diferenciadas. (18)

Kohler y Milstein en 1975 establecen la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales. El establecimiento de la tecnología de obtención de Anticuerpos Monoclonales que les permitió ganar el Premio Nóbel. (18)

En 1982 Sato y col., publicaron trabajos en los que demuestran que las diferentes líneas celulares requieren mezclas distintas de hormonas y factores de crecimiento para crecer en medios libres de suero. (18)

En los últimos años la aplicación de la tecnología del cultivo celular ha permitido grandes avances en la comprensión de los mecanismos implicados en los procesos intracelulares e intercelulares con el establecimiento de co-cultivos. (18)

A pesar de que el primer animal del que se establecieron cultivos celulares era un anfibio, poiquilotermo, rápidamente se centró el interés en el cultivo de células de animales homeotermos, especialmente humanas, por su gran interés médico. Sin embargo en los últimos años, y especialmente motivado por el control de plagas e infecciones en agricultura y piscicultura, se ha desarrollado notablemente el establecimiento de líneas celulares de invertebrados. (18)

En el caso de los virus el fenómeno de neutralización permite a los anticuerpos evitar que el virus infecte una célula al cubrir la parte viral necesaria para el anclaje con la célula. Se puede medir la capacidad que un determinado suero tiene para neutralizar la infectividad del virus

sobre una línea celular sensible. Se añade una mezcla del virus a una concentración constante que previamente ha estado en contacto con diferentes diluciones del suero problema sobre las células. Se van observando las células sobre la que se han añadido las distintas diluciones para ver si el virus las ha infectado o no, mediante la tinción con un conjugado o por el efecto citopático. (7, 26, 28).

Es posible que la prueba permita determinar el momento más adecuado para la vacunación con virus vivo modificado. (3)

4.10. Prevención y Control

Para establecer un control efectivo de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio, se requiere de un programa completo basado en los siguientes factores:

- Disminución de la presión infectante del virus de campo, mediante programas de limpieza y desinfección y un adecuado intervalo entre lotes (periodos de reposo).
- Implementación de las medidas de Bioseguridad. (6,31,32)
- Uso de programas inmunoprolácticos en reproductoras con vacunas vivas e inactivadas para lograr uniformidad en los títulos de anticuerpos maternos a ser traspasados a la progenie. (6,31,32)

- Uso de programas inmunoproliféricos en pollitos de engorde, con el fin de ocupar y colonizar el tejido linfoide con la población vacunal. (3,6,12,24, 31,32)

Como planes profilácticos se utilizan **vacunas vivas o inactivadas**.

Las vacunas vivas, ya sean de subtipos clásicos o Delaware, se han clasificado por su patogenicidad en tres tipos:

1. Virulentas o vacunas “Calientes”, producen títulos altos; pero pueden dar lugar a formas clínicas de la enfermedad si se usan como primo vacunación.
2. Vacunas intermedias que dan lugar a una atrofia detectable de la bolsa e inmunodepresión de los animales.
3. Vacunas avirulentas o suaves que producen mínimas o no detectables alteraciones. (2,15,24)

El uso de Técnicas Biológicas Moleculares para manejar el genoma del virus de Gumboro permite nuevas oportunidades para el desarrollo de vacunas vivas mejoradas contra este virus. Aunque ninguna vacuna diseñada genéticamente ha llegado todavía al mercado, varios laboratorios tienen estas cepas en la fase de experimentación. (2)

Se tienen entonces Cepas de Gumboro que carecen de la Proteína Viral 5, que es la proteína no estructural más pequeña del Gumboro, esta cepas son muy atenuadas y dan protección a pollos SPF contra desafíos letales, lo que sólo se logra después de aplicar dosis muy altas de un virus semejante. (2)

El desarrollo de vacunas con la introducción de algunos cambios en los aminoácidos que se han encontrado en las variantes antigénicas de las cepas Delaware-E y GLS en vacunas clásicas, esto podría dar como fruto una cepa vacunal que proteja tanto contra las cepas como contra las variantes antigénicas. (2)

Las vacunas de cepas “Nuevas” que tienen como objetivo generar una cepa para una vacuna viva contra Gumboro que pueda superar los altos niveles de anticuerpos maternos, pero que no induzca inmunosupresión en las aves con bajos niveles de anticuerpos maternos. (2,15,24)

Otra línea en desarrollo es la incorporación del material genético del virus en el genoma de otros virus aviares (vectores) como el Virus de la Enfermedad de Marek, Virus Herpes de los Pavos y Virus Pox Aviar; una ventaja potencial de estos virus es que ellos pueden inducir tanto una respuesta inmune apropiada contra el vector como contra el de Gumboro. (2,7)

Las vacunas que contienen sólo una parte del virus del Gumboro son las llamadas Vacunas Sub Unidades. Es esencial que por lo menos la proteína PV2 del Gumboro esté presente, ya que esta proteína induce la respuesta inmune protectora en las aves. (2)

El grupo Fador (ABC, Hungría) demuestra que existe otra manera de vacunación mediante el uso de ADN complementario, que codifica las proteínas del Gumboro, en lugar de sus propias proteínas (2).

Y por último la vacunación “*in Ovo*” que es relativamente nueva, está técnica fue descrita por primera vez por Sharma y Burmester en 1982. En la actualidad se usa la técnica de vacunaciones *in ovo* de la Enfermedad de Marek y cepas intermedias del VEIB. (5,7, 34)

Se ha desarrollado la tecnología de esta nueva vacunación por medio de la utilización de Anticuerpos Anti -EIB en combinación con un virus vacunal de la EIB para formar una Vacuna de Complejo Inmune, es administrada en la incubadora y se ha visto que es segura y eficiente al ser administrada a aves sin inmunidad derivada materna (aves SPF) y en pollos de engorde con bajo, moderado o alto título de anticuerpos maternos. (7,34).

El VEIB es muy estable y es difícil erradicar del ambiente por lo que se deben diseñar programas de vacunación, para esto van a existir varios factores que los van a determinar, como:

El Nivel de Anticuerpos Maternales: Es importante conocer esto para determinar el momento de susceptibilidad, y por tanto el éxito del programa. Los pollitos con altos niveles de anticuerpos maternos van a ser refractarios a cualquier vacuna viva, excepto a las virulentas; por lo que no tendrán respuesta a las vacunas medias o suaves. (3,6,15,24)

Si se conoce el nivel de anticuerpos al día de edad, y al poder predecir el ritmo de pérdida de anticuerpos maternos, se podrá determinar el momento óptimo de vacunación. (3,6,15, 24)

El Tipo de Virus presente en el campo y la severidad y magnitud del desafío con el virus del campo. Ya que existen zonas con altos niveles de contaminación vírica, o bien virus de alta virulencia. (15,24)

Las Prácticas de Manejo y Trabajo. Por lo que se hace necesario establecer un estado inmune mediante un método conveniente para medir el nivel de anticuerpos contra Gumboro. (15,24)

El Estado de Vacunación de los Grupos de Progenitores que es el problema de la gran variabilidad de títulos en los pollitos de un mismo lote. (15,24)

Para nuestro medio se tienen guías y programas de vacunación sugeridos:

Pollos de Engorde

*(14)

| EDAD DÍAS | ENFERMEDAD | VACUNA | VIAS DE ADMINISTRACIÓN |
|------------------|---------------------------|---------------|-------------------------------|
| 5-7 | Newcastle | B1 ó La Sota | Ocular |
| 10-12 | Gumboro | Gumboro Vivo | Ocular |
| 21-24 | Newcastle y Bronquitis | Doble Aviar | Ocular o en agua de bebida |
| | Newcastle | La Sota | Ocular |
| | Newcastle | Emulsionada | Subcutánea |
| 25-28 | Gumboro | Gumboro Vivo | Ocular o en agua de bebida |

Ponedoras Comerciales y Reproductoras

*(14)

| EDAD SEMANAS | ENFERMEDAD | VACUNA | VIAS DE ADMINISTRACIÓN |
|-----------------------------------|------------------------|---------------|-------------------------------|
| 1 ^a | Newcastle | B1 ó LaSota | Ocular |
| 2 ^a | Gumboro | Gumboro Vivo | Ocular |
| 3 ^a -4 ^a | Newcastle | LaSota | Ocular |
| | Newcastle | Emulsionada | Subcutánea |
| 5 ^a -6 ^a | Gumboro | Gumboro vivo | Ocular o en agua de bebida |
| 7 ^a - 8 ^a | Coriza Infecciosa | Coriza | Subcutánea |
| 9 ^a - 10 ^a | NewCastle y Bronquitis | Doble Aviar | Ocular o en agua de bebida |
| | Cólera Aviar | Cólera | Subcutánea |
| 11 ^a - 12 ^a | Coriza | Coriza | Subcutánea |
| | Viruela Aviar | Viruela Aviar | Punción en ala |
| 14 ^a | Newcastle y Bronquitis | Doble Aviar | Ocular o en agua de bebida |
| | Cólera Aviar | Cólera Aviar | Subcutánea |
| 16 ^a - 17 ^a | Gumboro | Gumboro vivo | Ocular o en agua de bebida |
| | Newcastle | LaSota | Ocular |
| | Newcastle | Emulsionada | Subcutánea |

* Fuente: Trifoliar de Laboratorios Lavet (Programas de vacunación sugeridos)(14)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizará en el “Centro de Capacitación Agropecuaria para ciegos Santa Lucía”, ubicada en Palín, Escuintla. Las condiciones de la granja son: temperaturas máximas de 39°C y mínimas de 16°C con una humedad relativa de 55 a 70%. Se utilizarán cien pollitos de raza Hubbard desde los 2 hasta los 40 días de edad, a los cuales se les efectuarán inmunizaciones y sangrías, según el programa diseñado.

Se trabajará de acuerdo al sistema de manejo normal de la granja.

5.1 MATERIALES

5.1.1 Materiales de Laboratorio

- Campana de Flujo laminar
- Incubadora de Rollers
- Frascos Roller y Equipo Roller
- Micropipetas calibradas
- Microplacas de poliestireno estériles
- Incubadora de Embriones
- Microscopio Invertido
- Guantes estériles
- Pipetas Serológicas estériles
- Erlenmeyer acanalado
- Agitador magnético
- Yodo al 2%
- Pinzas, tijeras y fórceps estériles
- Hojas para Registros de Resultados
- Tripsina
- Solución Hanks

- Solución Tamponada PBS

5.1.2 Materiales de campo

- Comederos y Bebederos
- Mallas para separación de grupos
- Cama
- Concentrado para pollos de engorde
- Luz
- Gas Propano
- Jeringas 3 ml
- Frascos y tapones estériles
- Maskin Tape
- Algodón
- Alcohol
- Hielera

5.1.3 Materiales de Tipo Biológico

- Vacuna contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio Cepa Lukert
- Sueros de pollos en estudio
- Cultivo Celular de Fibroblastos de Embrión de Pollo SPF
- Cien pollitos de un día de edad
- Medio de enriquecimiento de Cultivo Celular

5.1.4 Recursos Humanos

- Médico Veterinario Infieri: responsable de la investigación
- Tres Médicos Veterinarios: Asesores
- Una Química Bióloga
- Una Química Farmacéutica
- Un Técnico de Laboratorio

- Un Auxiliar de Laboratorio
- Supervisor de Granja
- Dos encargados del manejo de los pollitos

5.1.5 Centros de Referencia

- Laboratorios “LAVET”.
- Centro de Capacitación Agropecuaria para ciegos “Santa Lucía”.
- Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC).
- Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad San Carlos de Guatemala (USAC).
- Biblioteca Universidad Autónoma de México (UNAM).
- Biblioteca Asociación Nacional de Avicultura (ANAVI).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Diseño del Estudio

La población en estudio de la presente investigación consta de un lote de 100 pollitos, los cuales serán separados de la siguiente forma:

Cuatro grupos de 25 pollitos cada uno, escogidos al azar, los cuales se empezarán a trabajar a partir del segundo día de nacimiento según al grupo al que pertenezcan hasta los 40 días.

El programa está basado en inmunización y toma de muestra de sangre de los pollos de engorde en estudio.

5.2.2 Procedimientos

De Campo

GRUPO I: 25 pollitos

- Primera sangría 2do. día de edad (intra cardiaca)
- Primera dosis Vacuna Gumboro, Cepa Lukert, vía ocular 2do. día de edad
- Segunda sangría 15 días de edad (vena ulnar)
- Segunda dosis Vacuna Gumboro Cepa Lukert vía ocular 15 días de edad
- Tercera sangría 30 días de edad (vena ulnar)
- Cuarta Sangría 40 días de edad (vena ulnar)

GRUPO II: 25 pollitos

- Primera sangría 5to. día de edad (intra cardiaca)
- Primera dosis Vacuna Gumboro, cepa Lukert, vía ocular 5to. día de edad
- Segunda sangría 20 días de edad
- Segunda dosis Vacuna Gumboro cepa Lukert vía ocular 20 días de edad
- Tercera sangría 35 días de edad
- Cuarta Sangría 40 días de edad

Nota: De aquí en adelante todas las sangrías se hacen en la vena ulnar

GRUPO III: 25 pollitos

- Primera sangría 8vo. día de edad
- Primera dosis Vacuna Gumboro, Cepa Lukert, vía ocular 8vo. día de edad
- Segunda sangría 23 días de edad
- Segunda dosis Vacuna Gumboro Cepa Lukert vía ocular 23 días de edad
- Tercera sangría 40 días de edad

GRUPO IV: 25 pollitos

- Primera sangría 12 avo. día de edad
- Primera dosis Vacuna Gumboro, Cepa Lukert, vía ocular 12 avo. día de edad
- Segunda sangría 20 días de edad
- Segunda dosis Vacuna Gumboro Cepa Lukert vía ocular 20 días de edad
- Tercera sangría 40 días de edad

De Laboratorio**□ Separación del Suero de las muestras de sangre tomada de los pollos**

Las muestras serán conservadas en refrigeración y luego bajo la campana de flujo laminar se procede a separar los sueros y con micropipetas trasladarlos a tubos estériles debidamente rotulados y sellados. Luego se

congelan a -40°C hasta efectuar su procesamiento.

□ **Preparación del Cultivo Celular**

- Se utilizarán huevos Embrionados S.P.F. de 9 días de edad.
- Identificar el embrión y desinfectar con timerosal.
- Perforar el huevo a nivel de la cámara de aire, bajo campana de flujo laminar.
- Extraer estérilmente el embrión, eliminar la cabeza y patas.
- Colocar el cuerpo de los embriones en matraz de triptinización estéril con solución tamponada PBS.
- Lavar con agitador magnético de 3 a 5 veces con PBS durante 5 minutos.
- Dejar sedimentar los tejidos y descartar el sobrenadante.
- Triptinizar los embriones con Tripsina a 37°C en baño María.
- Calcular el volumen total de tripsina multiplicando el número de embriones por 8 ml.

- Adicionar a los fragmentos de tejidos el 50% del volumen total de tripsina y agitar por 10 minutos.
- Dejar sedimentar y pasar el sobrenadante a través de un embudo con gasa estéril a un frasco de centrifuga que contenga 1 ml. de suero de bovino estéril, para inactivar la tripsina.
- Repetir el procedimiento anterior con el 50% de Tripsina restante por 10 minutos.
- Centrifugar el triptinizado de 1000 a 1500 g/min por 10 a 15 minutos en centrífuga refrigerada.
- Descartar el sobrenadante y adicionar 5 ml del Medio de Crecimiento 199 al botón de células que se obtenga en el fondo del tubo, dispersar bien las células y observar al microscopio invertido. Ajustar el pH de las suspensión de células a 7.0.
- Se realizará el recuento de células en la Cámara de Newbauer utilizando los 4 cuadrantes.
- El recuento debe ser entre 45 a 60 x 10⁴ células/ml.

Fórmula:

$$\mathbf{R.C = \frac{\text{Sumatoria de células} \times 2 \times 10,000}{\text{No. de Cuadrantes}}}$$

No. de Cuadrantes

2= Factor de Dilución
10,000 = Factor de Cámara

- Se distribuirá estérilmente en frascos Roller alícuotas standard para tener de 45 a 60×10^4 células/ml.
- Incubar a 37°C por 3 días.
- Al final del procedimiento se observará la monocapa completa de Fibroblastos de embriones de pollo al microscopio invertido; la cual quedará lista para inocular.

□ **Prueba de Seroneutralización**

- Se preparan los fibroblastos de embrión de pollo adaptados con la Cepa del virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio, de tal manera que estén presentes 100 Unidades Infectantes por Cultivo Celular 50.
- Usando la micropipeta calibrada, agregar una gota del virus $50\mu\text{l}$ a todas las celdas de la microplaca (de la 1 a la 11) excepto en la celda 12, ya que esta será el control de células.
- Agregar 50 microlitros del suero en estudio en la primera celda de la primera columna, hilera A y se hace el mismo procedimiento con cada uno de los sueros en las siguientes columnas, de la hilera B a la H.
- Para hacer las diluciones se empieza por la primera celda y se va traspasando hacia la segunda y así sucesivamente hasta llegar a la

celda No. 10 y se descarga lo que sobra. La fila 11 es para el control del virus.

- Luego se incuban las microplacas a 37°C de 30 a 45 minutos.
- Se agregan 0.2 ml del cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo que fue preparado y diluido previamente a todas las celdas de la microplaca.
- Se agrega 50 microlitros de la Solución de
- Hanks a todas las celdas de la fila No. 12, que es el control de células.
- Luego se cubren las placas con cubiertas de poliestireno estériles o con cinta estéril.
- Se incuban de 72 a 96 horas.
- Se observan al microscopio invertido para determinar el Efecto Citopático (EC).
- Determinar el índice de Seroneutralización.

En los controles se debe considerar:

1. Un suero negativo y un positivo
2. Las celdas de la fila No. 12 como control de células

3. Las celdas de la fila No. 11 como el control del virus

- Los resultados se anotan en el formato correspondiente para su posterior tabulación.

5.3 ANALISIS DE DATOS

En la presente investigación se utilizarán Series Temporales para describir el comportamiento del fenómeno. Con el método estadístico de Diferencia de Proporciones se evaluarán si existen diferencias estadísticamente significativas entre cada medición y se hará una evaluación de resultados con respecto a la anterior dentro del mismo grupo.

VI. PRESUPUESTO Y FINANCIAMIENTO

El presupuesto de la presente investigación se encuentra distribuido de la siguiente manera:

| Detalle | Costo estimado |
|-----------------------------|-----------------------|
| Viales | Q. 240.00 |
| Jeringas y Agujas | Q. 150.00 |
| Embriones de Pollo | Q.350.00 |
| Hielera , gradillas y otros | Q.150.00 |
| Combustible y lubricantes | Q.600.00 |
| Papelería y útiles | Q.350.00 |
| Imprevistos | Q.500.00 |
| TOTAL | Q. 2340.00 |

1. Instalaciones y equipo, pollitos, concentrado y personal serán proporcionados por la granja
2. Toda la cristalería, reactivos, vacuna, soluciones y equipo de laboratorio serán proporcionados por Laboratorios LAVET.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el “Centro de Capacitación Agropecuaria para Ciegos Santa Lucía”, ubicada en Palín, Escuintla. Las condiciones de la granja eran: temperaturas máximas de 39°C y mínimas de 16°C con una humedad relativa de 55 a 70%. Se utilizaron cien pollitos de raza Hubbard de 2 hasta 40 días de edad, a los cuales se les efectuaron inmunizaciones y sangrías, según el programa diseñado.

Se realizó la investigación de acuerdo al sistema de manejo normal de la granja.

5.1 MATERIALES

5.1.1 Materiales de Laboratorio

- Campana de Flujo laminar
- Incubadora de Rollers
- Frascos Roller y Equipo Roller
- Micropipetas calibradas
- Microplacas de poliestireno estériles
- Incubadora de Embriones
- Microscopio Invertido
- Guantes estériles
- Pipetas Serológicas estériles
- Erlenmeyer acanalado
- Agitador magnético
- Yodo al 2%
- Pinzas, tijeras y fórceps estériles
- Hojas para Registros de Resultados
- Tripsina
- Solución Hanks
- Solución Tamponada PBS

5.1.2 Materiales de campo

- Comederos y Bebederos
- Mallas para separación de grupos
- Cama
- Concentrado para pollos de engorde
- Luz
- Gas Propano
- Jeringas 3 ml
- Frascos y tapones estériles
- Maskin Tape
- Algodón
- Alcohol
- Hielera

5.1.3 Materiales de Tipo Biológico

- Se utilizaron Cien pollitos de un día de edad de la raza Hubbard los cuales fueron distribuidos en cuatro compartimientos de 25 pollitos cada uno.
- Se utilizó en la investigación Vacuna* contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio Cepa Lukert Lote No. Gu 010-0103 con fecha de vencimiento enero de 2005.
- Se utilizaron 190 Sueros de pollos que corresponden a las cuatro sangrias efectuadas en el estudio, para el mismo se utilizaron microplacas de Cultivo Celular de Fibroblastos de Embrión de Pollo SPF con medio de enriquecimiento de Cultivo Celular 199, Solución Salina tamponada PBS y Tripsina al 0.03 %

* LABORATORIOS LAVET

5.2. MÉTODOS

5.2.1 Diseño del Estudio

La población de la presente investigación consta de un Lote de 100 pollitos, los cuales fueron divididos en cuatro compartimientos en la granja de la siguiente manera :

Cuatro Grupos de 25 pollitos cada uno, seleccionados al azar, los cuales se vacunaron y sangraron a partir del segundo día de nacimiento según al grupo al que pertenecían.

El programa se basó en la inmunización y toma de muestra de sangre de los pollitos en estudio.

5.2.2 Procedimientos a nivel de Campo

CUADRO 1. Programa de Vacunación y Sangría realizado en “Centro de Capacitación Agropecuaria para Ciegos Santa Lucía” Palín, Escuintla. Abril-Junio 2003

| EDAD | 2 DÍAS | 5 DÍAS | 8 DÍAS | 12 DÍAS | 15 DÍAS | 20 DÍAS | 23 DIAS | 28 DIAS | 30 DIAS | 35 DÍAS | 40 DIAS |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| GRUPO I | SANGRIA | | | | SANGRIA | | | | SANGRIA | | SANGRIA |
| | VACUNA | | | | VACUNA | | | | | | |
| GRUPO II | | SANGRIA | | | | SANGRIA | | | | SANGRIA | SANGRIA |
| | | VACUNA | | | | VACUNA | | | | | |
| GRUPO III | | | SANGRIA | | | | SANGRIA | | | | SANGRIA |
| | | | VACUNA | | | | VACUNA | | | | |
| GRUPO IV | | | | SANGRIA | | | | SANGRIA | | | SANGRIA |
| | | | | VACUNA | | | | VACUNA | | | |

Primera Sangría

Primera Vacuna

Segunda Sangría

Segunda Vacuna

Tercera Sangría

Cuarta Sangría

5.2.3 Procedimientos a nivel de Laboratorio

5.2.3.1 Separación del Suero:

Las muestras se conservaron en refrigeración y fueron transportados al Laboratorio, luego bajo campana de flujo laminar se procedió a separar los sueros y con micropipetas estériles se trasladaron a tubos estériles debidamente rotulados y sellados. Se congelaron a -40°C hasta efectuar su procesamiento.

5.2.3.2 Preparación del Cultivo Celular en Fibroblastos de Embrión de Pollo

- Se utilizaron huevos embrionados S.P.F. de 9 a 11 días de edad.
- Se identificó el embrión y se desinfectó con timerosal; se perforó el huevo a nivel de la cámara de aire, bajo campana de flujo laminar.
- Se extrajo estérilmente el embrión de pollo, eliminando la cabeza y patas.
- Se colocó el cuerpo de los embriones en un matraz de triptinización estéril con solución tamponada PBS.
- Se lavaron los embriones con agitador magnético de 3 a 5 veces con PBS

durante 5 minutos y se dejó sedimentar los tejidos y se descartó el sobrenadante.

- Se calculó el volumen total de tripsina multiplicando el número de embriones por 8 ml se adicionó a los fragmentos de tejidos el 50% del volumen total de tripsina y agitó por 10 minutos, triptinizando los embriones a 37°C en baño María.
- Se dejó sedimentar y se pasó el sobrenadante a través de un embudo con gasa estéril a un frasco de centrifuga que contenía 1 ml. de suero de bovino estéril, para inactivar la tripsina.
- Se centrifugó el triptinizado de 1000 a 1500 gravedades/minuto por 10 a 15 minutos en centrífuga refrigerada.
- Se descartó el sobrenadante y adicionó 5 ml del Medio de Crecimiento 199 al botón de células que se obtuvo en el fondo del tubo, se dispersaron bien las células ajustando el pH de las suspensión de células a 7.0.
- Se realizó el recuento de células en la Cámara de Newbauer utilizando los 4 cuadrantes.

El recuento estaba entre 45 a 60 x 10⁴ células/ml.

Fórmula:

$$\mathbf{R.C = \frac{\text{Sumatoria de células} \times 2 \times 10,000}{\text{No. de Cuadrantes}}}$$

2= Factor de Dilución

10,000 = Factor de Cámara

- Se distribuyó la suspensión estérilmente en frascos Roller en alícuotas standard para mantener la concentración de 45 a 60 x 10⁴ células/ml y se incubó a 37°C por 3 días.
- Al final del procedimiento se observó la monocapa completa de Fibroblastos de Embriones de pollo al microscopio invertido; la cual quedó lista para inocular.

5.2.3.3. Prueba de Seroneutralización

- Para la detección de anticuerpos circulantes contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio.
- Se prepararon los fibroblastos de embrión de pollo con la Cepa del virus adaptado de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio, de tal manera que poseía 100 Unidades Infectantes 50 de Cultivo Celular (UI₅₀ C.C).

- Usando la micropipeta calibrada, se agregó 50µl del virus a todas las celdas de la Microplaca (de la No.1 a la No.11) excepto en la celda No. 12, ya que esta fue el Control de Células.
- Se agregó 50µl del suero en estudio en la primera celda de la primera columna, hilera A, y se hizo el mismo procedimiento con cada uno de los sueros en las siguientes columnas, de la hilera B a la H.
- Para hacer las diluciones se utilizó la micropipeta octapette y se inicio por la primera celda y se fue traspasando a la segunda y así sucesivamente hasta llegar a la celda No. 10 y se descargó el sobrante. La fila No. 11 fue el Control del Virus.
- Se incubaron las microplacas de 30 a 45 minutos a medio ambiente.
- Se agregó 90µl del cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo, preparado con en Medio 199, a todas las celdas de la microplaca.

- Se agregó 50 microlitros de la suspensión de células a todas las celdas de la fila No. 12, que fue el Control de Células.
- Luego se cubrieron las microplacas con la tapa de poliestireno estéril y se identificaron debidamente. Se incubaron 72 horas a 37°C
- Se observaron al microscopio invertido para determinar el Efecto Citopático (EC) y se colorearon todas las placas con solución de azul de Metileno al 1% y se anotaron las lecturas en el formato correspondiente (Anexo 1)
- Se determinaron y tabularon las Unidades Neutralizantes por suero y por grupo y se anotaron los resultados en el Cuadro correspondiente para el análisis de datos.

CUADRO 2. Resultados de la Prueba de Seroneutralización en Microplaca. Por sangría y edad de los pollos. Granja “Santa Lucía”. Abril-Junio 2003.

GRUPO 1

| SUERO NO. | 1ª. SANGRIA 2 DÍAS DE EDAD | 2ª. SANGRIA 15 DÍAS DE EDAD | 3ª. SANGRIA 30 DÍAS DE EDAD | 4ª. SANGRIA 40 DÍAS DE EDAD |
|------------------|---|--|--|--|
| 1 | 0 | 200 | 6400 | 6400 |
| 2 | 0 | 200 | 3200 | 6400 |
| 3 | 200 | 0 | 3200 | 6400 |
| 4 | 400 | 0 | 800 | 6400 |
| 5 | 400 | 0 | 1600 | 6400 |
| 6 | 800 | 0 | 6400 | 6400 |
| 7 | 400 | 0 | 6400 | 6400 |
| 8 | 400 | 200 | 400 | 6400 |
| 9 | 200 | 800 | 400 | 6400 |
| 10 | 400 U.N.* | 800 | 3200 | 6400 |
| 11 | N.E.** | 1600 | 400 | 6400 |
| 12 | N.E. | 800 | 800 | 6400 |
| 13 | N.E. | 1600 | 800 | 6400 |
| 14 | N.E. | 800 | 400 | 6400 |
| 15 | N.E. | 400 U.N. | 800 U.N. | 6400 U.N. |

*UNIDADES NEUTRALIZANTES

**NO EFECTUADO

CUADRO 3. Resultados de la Prueba de Seroneutralización en Microplaca. Por sangría y edad de los pollos. Granja “Santa Lucía”. Abril-Junio 2003.

GRUPO 2

| SUERO No. | 1ª. SANGRIA 5 DIAS DE EDAD | 2ª. SANGRIA 20 DIAS DE EDAD | 3ª. SANGRIA 35 DIAS DE EDAD | 4ª. SANGRIA 40 DIAS DE EDAD |
|------------------|---|--|--|--|
| 1 | 0 | 800 | 200 | 6400 |
| 2 | 200 | 200 | 1600 | 6400 |
| 3 | 400 | 400 | 400 | 6400 |
| 4 | 800 | 400 | 800 | 6400 |
| 5 | 400 | 0 | 6400 | 6400 |
| 6 | 200 | 200 | 6400 | 6400 |
| 7 | 400 | 200 | 6400 | 6400 |
| 8 | 400 | 400 | 6400 | 6400 |
| 9 | 200 | 200 | 6400 | 6400 |
| 10 | 400 U.N.* | 400 | 6400 | 6400 |
| 11 | N.E.** | 200 | 6400 | 6400 |
| 12 | N.E. | 200 | 6400 | 6400 |
| 13 | N.E. | 800 | 6400 | 6400 |
| 14 | N.E. | 400 | 6400 | 6400 |
| 15 | N.E. | 200 U.N. | 6400 U.N. | 6400 U.N. |

*UNIDADES NEUTRALIZANTES

**NO EFECTUADO

CUADRO 4. Resultados de la Prueba de Seroneutralización en Microplaca. Por sangría y edad de los pollos. Granja “Santa Lucía”. Abril-Junio 2003.

Grupo 3

| SUERO No. | 1ª. SANGRIA 8 DIAS DE EDAD | 2ª. SANGRIA 23 DIAS DE EDAD | 3ª. SANGRIA 40 DIAS DE EDAD |
|------------------|---|--|--|
| 1 | 400 | 200 | 6400 |
| 2 | 400 | 400 | 6400 |
| 3 | 200 | 200 | 6400 |
| 4 | 800 | 800 | 6400 |
| 5 | 0 | 1600 | 6400 |
| 6 | 800 | 1600 | 6400 |
| 7 | 800 | 800 | 6400 |
| 8 | 800 | 800 | 6400 |
| 9 | 800 | 800 | 6400 |
| 10 | 400 U.N*. | 800 | 6400 |
| 11 | N.E.** | 400 | 6400 |
| 12 | N.E. | 800 | 6400 |
| 13 | N.E. | 800 | 6400 |
| 14 | N.E. | 400 | 6400 |
| 15 | N.E. | 1600 U.N. | 6400 U.N. |

*UNIDADES NEUTRALIZANTES

**NO EFECTUADO

CUADRO 5. Resultados de la Prueba de Seroneutralización en Microplaca. Por sangría y edad de los pollos. Granja “Santa Lucía”. Abril-Junio 2003

GRUPO 4

| SUERO No. | 1ª. SANGRIA 12 DIAS DE EDAD | 2ª. SANGRIA 28 DIAS DE EDAD | 3ª. SANGRIA 40 DIAS DE EDAD |
|------------------|--|--|--|
| 1 | 1600 | 1600 | 6400 |
| 2 | 1600 | 6400 | 6400 |
| 3 | 800 | 1600 | 6400 |
| 4 | 400 | 3200 | 6400 |
| 5 | 800 | 800 | 6400 |
| 6 | 0 | 800 | 6400 |
| 7 | 0 | 200 | 6400 |
| 8 | 0 | 400 | 6400 |
| 9 | 0 | 200 | 6400 |
| 10 | 200 U.N*. | 200 | 6400 |
| 11 | N.E.** | 200 | 6400 |
| 12 | N.E. | 6400 | 6400 |
| 13 | N.E. | 6400 | 6400 |
| 14 | N.E. | 6400 | 6400 |
| 15 | N.E. | 6400 U.N. | 6400 U.N. |

*UNIDADES NEUTRALIZANTES

**NO EFECTUADO

5.3 ANALISIS DE DATOS

Para obtener los resultados de la presente investigación se utilizaron Series Temporales, para describir el comportamiento del fenómeno obtenidos de cuadros con los porcentajes de aparición de las **Unidades Neutralizantes por Grupo**, en donde los porcentajes finales describen la protección de los Anticuerpos contra la Enfermedad de Gumboro.

Con el método estadístico de Diferencia de Proporciones se evaluaron si existen diferencias estadísticamente significativas entre cada medición y se hizo una evaluación de resultados con respecto a la anterior dentro del mismo grupo. Para esto se utilizaron la siguientes fórmulas:

$$P1 = X/N \qquad p2 = Y/M$$

En donde X= No. De muestras que presentaron Anticuerpos en la sangría del grupo correspondiente.

N= No. total de muestras en la sangría

Y= No. De muestras que presentaron Anticuerpos en la sangría del grupo correspondiente.

M= No. total de muestras en la sangría

$$Z_o = \frac{p1 - p2}{\sqrt{\frac{(P)(1-P)}{Y} + \frac{(P)(1-P)}{M}}}$$

Zo= Me dice si el resultado es estadísticamente significativo.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación se realizó con pollos de engorde de la raza Hubbard de dos hasta 40 días de edad, que es la edad de sacrificio de los pollos según el sistema de la granja. Se trabajó por Grupos de la siguiente manera:

GRUPO I: 25 pollitos

- Primera sangría 2do. día de edad (intra cardiaca)
- Primera dosis Vacuna Gumboro, Cepa Lukert, vía ocular 2do. día de edad
- Segunda sangría 15 días de edad (vena ulnar)
- Segunda dosis Vacuna Gumboro Cepa Lukert vía ocular 15 días de edad
- Tercera sangría 30 días de edad (vena ulnar)
- Cuarta Sangría 40 días de edad (vena ulnar)

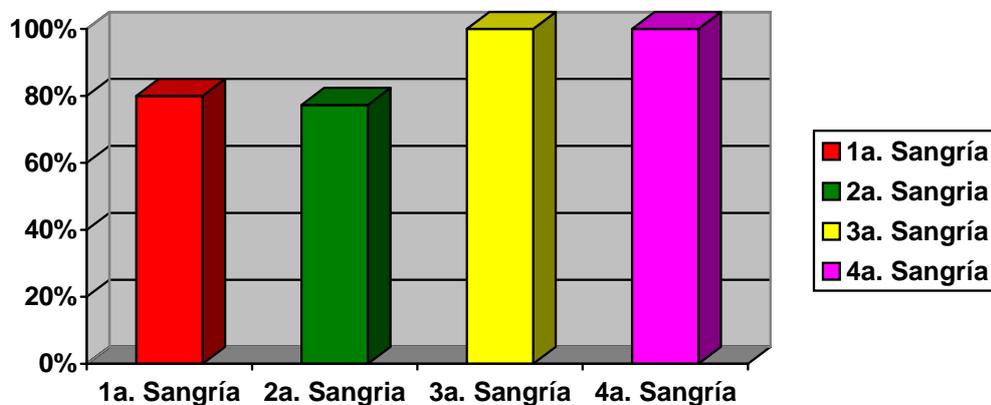
CUADRO 6. Porcentajes de resultados de los Títulos de Unidades Neutralizantes contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio. Granja Santa Lucía. Palín, Escuintla. Agosto 2003

Grupo 1

| Unidades Neutralizantes | 1ª. Sangría | 2ª. Sangría | 3ª. Sangría | 4ª. Sangría |
|-------------------------|-------------|----------------|--------------|--------------|
| 0 | 20 % | 33.30 % | 0 % | 0 % |
| 200 | 20 % | 20 % | ----- | ----- |
| 400 | 50 % | 6.66 % | 26.66 % | ----- |
| 800 | 10 % | 26.66 % | 26.66 % | ----- |
| 1600 | ----- | 20 % | 6.66 % | ----- |
| 3200 | ----- | 20 % | 20 % | ----- |
| 6400 | ----- | ----- | 20 % | 100 % |
| Protección | 80 % | 77.33 % | 100 % | 100 % |

GRÁFICA 1. Resultados Porcentajes de los Títulos de Unidades Neutralizantes Contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio. Granja Santa Lucía. Agosto 2003.

GRUPO 1



Para este Grupo se obtuvo una protección ascendente, ya que en la primera sangría se obtuvo títulos de hasta 800 Unidades Neutralizantes que significó un 80% de presencia de anticuerpos contra la enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio sin tener una vacunación previa. Para la segunda sangría los títulos subieron a 1600 Unidades Neutralizantes que significó una protección del 77.3% tomando en cuenta que el mismo día de la sangría se efectuó la primovacunación. Y ya para la tercera y cuarta sangría se obtuvieron los títulos de 6400 Unidades Neutralizantes que significaron una protección del 100%. Para dichas sangrías ya se contaba con un refuerzo de la vacuna lo que nos confirma al ascenso de los títulos de anticuerpos Neutralizantes. Con la Prueba Estadística utilizando la Diferencia de Proporciones se determinó que no hubo diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la evaluación en la medición dentro del mismo Grupo. **(CUADRO 6. GRAFICA 1)**

GRUPO II: 25 pollitos

- Primera sangría 5to. día de edad (intra cardíaca)
- Primera dosis Vacuna Gumboro, cepa Lukert, vía ocular 5to. día de edad
- Segunda sangría 20 días de edad
- Segunda dosis Vacuna Gumboro cepa Lukert vía ocular 20 días de edad
- Tercera sangría 35 días de edad
- Cuarta Sangría 40 días de edad

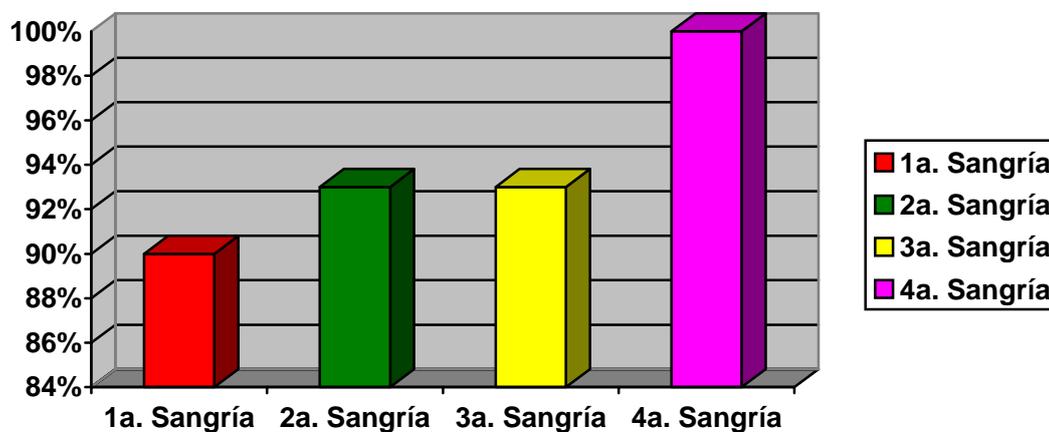
CUADRO 7. Porcentajes de resultados de los Títulos de Unidades Neutralizantes contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio. Granja Santa Lucía. Palín, Escuintla. Agosto 2003

GRUPO 2

| Unidades Neutralizantes | 1ª. Sangría | 2ª. Sangría | 3ª. Sangría | 4ª. Sangría |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 0 | 10% | 7% | 7% | 0% |
| 200 | 30% | 47% | 6.6% | ----- |
| 400 | 50% | 33% | 6.6% | ----- |
| 800 | 10% | 13% | 6.6% | ----- |
| 1600 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 3200 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 6400 | ----- | ----- | ----- | 100% |
| Protección | 90% | 93% | 93% | 100% |

GRÁFICA No. 2 Resultados Porcentajes de los Títulos de Unidades Neutralizantes Contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio. Granja Santa Lucía. Agosto 2003.

GRUPO 2



La evaluación dentro del mismo grupo y las mediciones de Anticuerpos Neutralizantes contra la EIBF revelaron que no hubo diferencia estadísticamente significativa, ya que el porcentaje de protección desde la primera sangría fue de un 90% con un título máximo de 800 Unidades Neutralizantes y para la segunda sangría fue de un 93% con un título también de 800 Unidades Neutralizantes y de igual forma se comportó para la tercera sangría con un 93% y fue hasta en la cuarta sangría en donde se dio un 100% de protección de todos los sueros con títulos de 6400 Unidades Neutralizantes o más.

(CUADRO 7, GRAFICA 2)

GRUPO III: 25 pollitos

- Primera sangría 8vo. día de edad
- Primera dosis Vacuna Gumboro, Cepa Lukert, vía ocular 8vo. día de edad
- Segunda sangría 23 días de edad
- Segunda dosis Vacuna Gumboro Cepa Lukert vía ocular 23 días de edad
- Tercera sangría 40 días de edad

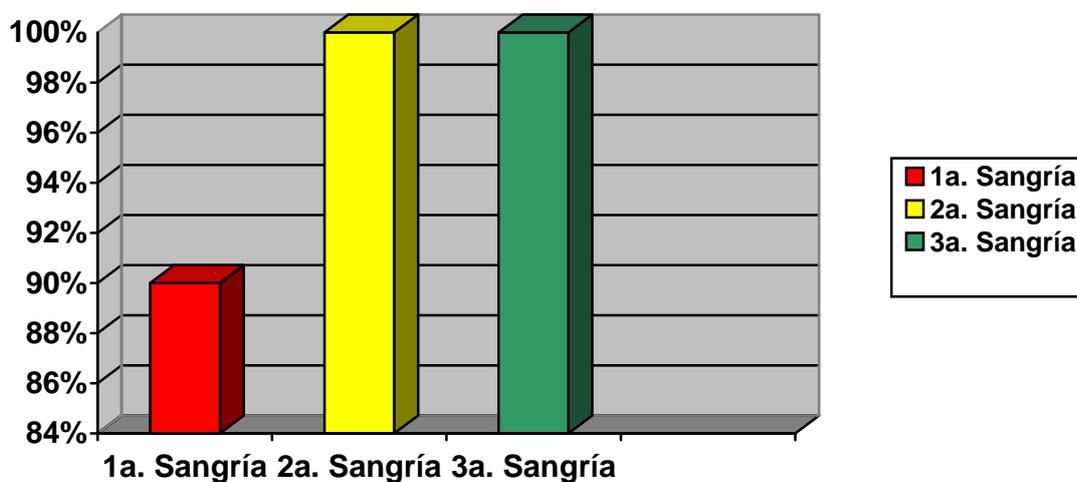
CUADRO 8. Porcentajes de resultados de los Títulos de Unidades Neutralizantes contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio. Granja Santa Lucía. Palín, Escuintla. Agosto 2003

Grupo 3

| UNIDADES NEUTRALIZANTES | 1ª. Sangría | 2ª. Sangría | 3ª. Sangría |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|
| 0 | 10% | 0.00% | ----- |
| 200 | 10% | 13% | ----- |
| 400 | 30% | 20.00% | ----- |
| 800 | 50% | 46.66% | ----- |
| 1600 | ----- | 20.00% | ----- |
| 3200 | ----- | ----- | ----- |
| 6400 | ----- | ----- | 100% |
| Protección | 90% | 100% | 100% |

GRÁFICA 3. Resultados Porcentajes de los Títulos de Unidades Neutralizantes Contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio. Granja Santa Lucia. Agosto 2003.

GRUPO 3



En este Grupo se demostró que las diferencias no fueron estadísticamente significativas ya que este Grupo mantuvo títulos altos en las tres sangrías. En la primera sangría se obtuvo una del 90% sin previa vacunación, con títulos de anticuerpos circulantes maternos de hasta 800 Unidades Neutralizantes contra la EIBF. Para la segunda y tercera sangría se obtuvo el 100% de protección de Anticuerpos Neutralizantes post-vacunales de 6400 Unidades Neutralizantes o más en todas las muestras. **(CUADRO 8 GRAFICA 3)**

GRUPO IV: 25 pollitos

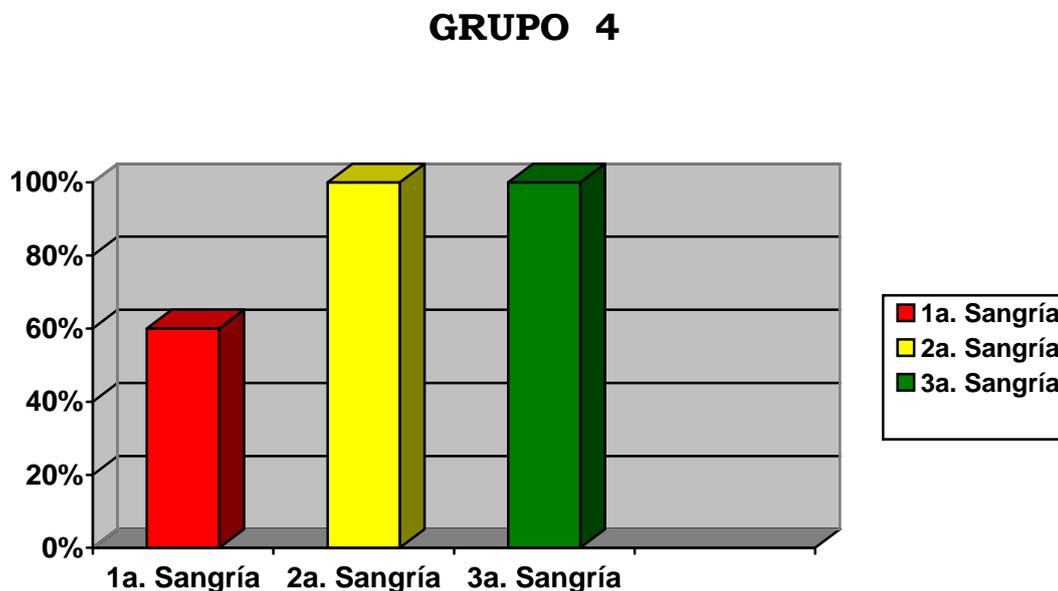
- Primera sangría 12 avo. día de edad
- Primera dosis Vacuna Gumboro, Cepa Lukert, vía ocular 12 avo. día de edad
- Segunda sangría 20 días de edad
- Segunda dosis Vacuna Gumboro Cepa Lukert vía ocular 20 días de edad
- Tercera sangría 40 días de edad

CUADRO 9. Porcentajes de resultados de los Títulos de Unidades Neutralizantes contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio. Granja Santa Lucía. Palín, Escuintla. Agosto 2003

Grupo 4

| UNIDADES NEUTRALIZANTES | 1ª. Sangría | 2ª. Sangría | 3ª. Sangría |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|
| 0 | 40% | 0.00% | 0% |
| 200 | 10% | 27% | ----- |
| 400 | 10% | 6.60% | ----- |
| 800 | 20% | 13.30% | ----- |
| 1600 | 20% | 13.30% | ----- |
| 3200 | ----- | 6.60% | ----- |
| 6400 | ----- | 33.30% | 100% |
| Protección | 60% | 100% | 100% |

GRÁFICA 4. Resultados Porcentajes de los Títulos de Unidades Neutralizantes Contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio. Granja Santa Lucía. Agosto 2003.



Este Grupo fue el único que presentó diferencia estadísticamente significativa en la evaluación y medición de la protección, ya que en la primera sangría tenían un 60% de protección considerando que eran pollos de 12 días de edad sin ninguna inmunización previa con títulos máximos de 1600 Unidades Neutralizantes de anticuerpos circulantes maternos. Para la segunda sangría ya se había obtenido el 100% de protección y títulos de 6400 Unidades Neutralizantes de anticuerpos post-vacunales. La tercera sangría reveló niveles altos de anticuerpos post-vacunales con títulos de 6400 Unidades Neutralizantes o más en el 100% de las muestras con una protección del 100%. **(CUADRO 9, GRÁFICA 4)**

VII. CONCLUSIONES

“La inmunización contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio con la vacuna producida en fibroblastos de embrión de pollo SPF Cofal y Marek negativos produce una respuesta inmune adecuada en los pollitos de engorde independientemente del nivel de anticuerpos maternos circulantes”

1. En el **Grupo 1** no se observó diferencia estadísticamente significativa en el nivel de anticuerpos circulantes entre sangría y sangría de los pollitos a los que se aplicó la primera vacuna de Gumboro a los 2 días de edad (**Cuadro 6, Gráfica 1**). Los Resultados indican que la respuesta a la vacuna fue Satisfactoria y que la primera dosis de la vacuna tuvo la capacidad de traspasar la barrera de anticuerpos maternas.

| <u>Virus EIBF</u> | Títulos de Anticuerpos maternos (Sero Neutralización) |
|------------------------|---|
| Vacunas suaves | <1:64 |
| Vacunas intermedias | ≤ 1:100 a ≥ 1:150 |
| Virus Campo virulentos | >1:256 |

(Smith)

2. En el Segundo Grupo el comportamiento de los pollos fue similar, el aumento en los títulos de anticuerpos neutralizantes post-vacunales indica que no hay interferencia entre la Inmunización contra Gumboro y la presencia de anticuerpos maternos. En la inmunización a los 5 días de edad se asegura que los Títulos de anticuerpos iniciales se mantengan, por lo que no se observó una diferencia estadísticamente significativa.
3. En el Tercer Grupo la detección de los títulos fue alto desde el principio, aunque no había vacuna previa a la primera sangría. Los títulos de anticuerpos neutralizantes post-vacunales fueron más uniformes, debido a que la vida media de los anticuerpos maternos se encuentra entre los 3 y 5 días; lo cual confirma que no hubo interferencia a la Respuesta Inmune de la vacuna, ya que con los títulos del grupo se alcanzó una protección del 100%.
4. Para el último Grupo sí hubo diferencia estadísticamente significativa en la primera sangría ya que la presencia de anticuerpos maternos fue de un 60% comparado con los anticuerpos post-vacunales detectados en las dos siguientes sangrías que fueron de un 100%; esto debido a que la primera sangría se realizó a los 12 días de edad que es el tiempo en que el descenso de anticuerpos maternos esta en su límite inferior.
5. Los pollos de engorde se deben vacunar antes del día en que estos se vuelven susceptibles a la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio y así tratar de ganarle tiempo al virus residente.

6. La Prueba de Seroneutralización en Cultivo Celular es una prueba altamente específica y sensible y es la prueba que da más correlación entre la respuesta “in vitro” y la respuesta “in vivo”. Además se puede medir mediante la observación directa del Efecto Citopático del virus en las células.

7. De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación se determinó que el Programa de Vacunación de **Grupo 3** de pollos de engorde vacunados a los 8 a 10 días y revacunados de 23 a 25 días de edad fue el que dio una mejor medición de Anticuerpos Neutralizantes contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Las Granjas de reproductoras pesadas en nuestro país tienen programas adecuados de inmunización contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio, por lo tanto hay buena transferencia de anticuerpos maternos a la progenie, razón por la cual no es conveniente vacunar a los pollitos en la primera semana de edad, para evitar la interferencia de los anticuerpos con la vacuna.

2. En base a los resultados obtenidos se concluyó que el **Grupo 3** de pollos vacunados con el Programa de 8 a 10 días (1era. Dosis) y 23 a 25 días de edad (2da. Dosis) fue el que dio una mejor protección contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio, por lo que se recomienda que sea el programa más indicado a utilizar en las Granjas de Pollo de Engorde en nuestro país.

3. Es necesario que el personal encargado de la aplicación de las vacunas en cada granja tengan una capacitación adecuada principalmente en los siguientes aspectos:
 - ✓ Cadena de Frío
 - ✓ Manejo de la vacuna
 - ✓ Aplicación de la vacuna
 - ✓ Registros en la Granja
 - ✓ Medidas de Bioseguridad

IX. RESUMEN

La Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio-Gumboro (EIBF) es una enfermedad viral aguda altamente contagiosa, que afecta a las aves y tiene efecto inmunodepresor, lo cual predispone a las aves a sufrir infecciones del tracto respiratorio, gastrointestinal y reproductivo.

En la presente investigación se determinó la edad más adecuada para la inmunización de pollos de engorde contra la EIBF, en la que no interfiera con los anticuerpos circulantes maternos.

Para esto se vacunaron 100 pollitos de engorde de la raza Hubbard de diferentes edades de los cuales se colectaron 190 muestras los cuales se dividieron en 4 Grupos y fueron vacunados contra la EIBF, vacuna Cepa Lukert por vía ocular: El **Grupo 1** representó a los pollitos inmunizados al 2do. y al 15avo. días de edad; el **Grupo 2**, a pollitos de 5 y 20 días de edad; el **Grupo 3**, a pollitos de 8 y 23 días de edad y el **Grupo 4** a pollitos de 12 y 28 días de edad. A todos los Grupos se procedió a hacerles mediciones de los niveles de Anticuerpos Neutralizantes circulantes por medio del método de Seroneutralización en Microplaca.

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que el Programa de Vacunación aplicado al **Grupo 3** de pollos de engorde vacunados al 8vo. y 10mo. día y revacunados del 23 al 25 días de edad fue en el que se obtuvo una mejor respuesta a la medición de Anticuerpos Neutralizantes circulantes post-vacunales contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio.

Se determinó que la Prueba de Seroneutralización en Cultivo Celular en microplaca es altamente sensible y específica y que proporciona una mejor correlación entre la Respuesta “in vitro” y la respuesta “in vivo”.

En base a lo anterior se recomienda el Programa de Vacunación: 1ª dosis a los 8 a 10 días de edad y la 2ª dosis a los 23 a 25 días de edad, que es el más indicado para utilizar en las granjas de pollo de engorde en nuestro país.

SUMMARY

The Infectious Bursal Disease (IBD) is a viral, acute and highly contagious disease that affects birds and has an immunodepressor effect, which predisposes the birds to suffer infections of the respiratory, gastrointestinal and reproductive tracts.

The present investigation established the more appropriate age for the immunization of broiler chick against IBD, with the goal to establish the age in which the vaccination does not interfere with the circulating maternal antibody.

It was vaccinated 100 broilers of Hubbard breed of different ages and was taken 190 samples, they were divided in 4 groups and immunized against Gumboro with Lukert strain, and applied ocularly.

Group 1 represented the immunized chicken on the 2nd, and 15th day after hatching, **Group 2** represented chicken on the 5th and 20th day after hatching, **Group 3** represented chicken vaccinated on the 8th and 23rd day after hatching, and the **Group 4** represented chicken vaccinated on the 12th and 28th day after hatching.

With all the groups we proceeded to measure the levels of Neutralizing Antibodies in the blood stream using Seroneutralization in Microtiter.

According to the results obtained, it was determined that the vaccination program given to the **Group 3** of broilers, on the 8th and 10th day, and with a booster between the 23rd to 25th day after hatching, was the one in which was obtained the best response in the measurement of Neutralizing Antibodies in the blood stream against IBD.

It was determined that Seroneutralization in Cell Culture method is highly sensitive and specific, and provides a better correlation between the result “in vitro” and “in vivo”.

On the basis of the above results the following Vaccination Program is recommended:

First doses at the age between 8 to 10 days after hatching, and the booster between 23 to 25 days after hatching, which is the most indicated program to use in broiler farms in our country.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. AROCHA HERNÁNDEZ, C. 1987. Determinación de la transferencia de anticuerpos contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio a la progenie de reproductoras pesadas por los métodos de Inmunoabsorción con Enzima Asociadas (ELISA) y de Inmunodifusión Radial en Gelosa (IDIRAG). Tesis. Med. Vet. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 62p.
2. BOOT, H.; ID-LEYSTAD. 2001. Las nuevas vacunas desarrolladas contra Gumboro. World Poultry. Revista de producción, procesamiento y comercialización. (Japón) [Especial: Gumboro 2]: 18-19.
3. CALNEK, B.W. 1995. Enfermedades de las aves. Trad. Por. Jorge Merigo Jane. México, D.F. El manual moderno. p. 797-810.
4. CONGRESO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA. XVII (5, 2001, Guatemala). 2001. Studies investigating the potential association between IBDV and Infectious Proventriculitis. Ed. by Kalen C. Cookson. Guatemala, Guatemala, Múltiples gráficos. p. 426-428.
5. ----- . XVII (12, 2001, Guatemala). 2001. In ovo vaccination against Marek´s and Gumboro diseases. Ed. by Jagdev Sharma. Guatemala, Guatemala, Múltiples gráficos. p. 75-77.
6. ----- . XVII (15, 2001, Guatemala). 2001. Control de la enfermedad Infecciosa de la Bolsa y de la Anemia Infecciosa Aviar. Ed. por Pedro Villegas. Guatemala, Guatemala, Múltiples gráficos. p. 90-97.
7. ETERRADOSI, N. 2001. Progreso y perspectivas en la investigación del VEIB. World Poultry. Revista de producción, procesamiento y comercialización. (Japón) [Especial:Gumboro]: 8-9.
8. -----.; TOQUIN,D.; RIVALLAN, G. 2001. Herramientas para la detección y caracterización de las cepas de Gumboro. World Poultry. . Revista de producción, procesamiento y comercialización. (Japón) [Especial:Gumboro]: 10-12.

9. GIAMBRONE, J. 2001. El virus de la enfermedad de Gumboro un viejo enemigo que nuevamente cambia su cara. World Poultry. . Revista de producción, procesamiento y comercialización. (Japón) [Especial:Gumboro]: 4-6.
10. ISMAIL, N.; SAIF, Y.M. 1990. Differentiation between antibodies to serotypes 1 and 2 Infectious Bursal disease virus in chicken sera. Avian Diseases. (EE.UU.) 34:1002-1004.
11. JACKWOOD, J. 2001. Infectious Bursal disease. The Ohio State University. 10 p . Tomado de internet: <http://www.oardc.chio-state.edu/ibvd/>
12. JACKWOOD, D.J.; HERDERSON, K.; JACKWOOD, R.J. 1996. Enzymed-Linked Inmunosorbent Assay-Based detection of antibodies to antigenic subtypes of Infectious Bursal disease viruses of chickens. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. (EE.UU.) 3(4): 456-463.
13. -----.; JACKWOOD, R.J.; SOMMER, S.E. 1997. Identification and comparison of point mutations associated in classic and variant Infectious Bursal disease viruses. Elsevier Virus Research. (EE.UU.) 49:131-137.
14. LABORATORIOS LAVET. 2000. Biológicos para aves. Síntomas de las principales enfermedades. Programa de Vacunación sugeridos. Guatemala, Lavet. Trifoliar.
15. LOON, A. VAN. 2001. Una experiencia de campo en una vacunación contra Gumboro con diferentes razas de ponedoras. World Poultry. Revista de Producción, procesamiento y comercialización. (Japón) [Especial:Gumboro 2]: 30-32.
16. MARTINEZ-TORRECUADRA, J. et al. 2000. Different Architectures in the assembly of Infectious Bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. Madrid, España, Academic Press. p. 322-331.
17. MOHANTY, S.; DUTTA, S. 1988. Virología veterinaria. Trad. por Fernando Colchero. México, D.F., Interamericana. p. 39-46; 285-286.

- 18.** MOLINA, Y. 2002. Técnicas de estudio de líneas celulares. EE.UU. 6p. Tomado de Internet:
<http://www.geocities.com/RainForest/Andes/3026/historia.htm>
- 19.** NICHOLAS, R. *et al.* 1985. Detection of antibodies against Infectious Bursal disease virus: a comparison of three serological methods. *Research in Veterinary Science* (EE.UU) 38: 198-192.
- 20.** ÖPPLING, V.; MÜLLER, H.; BECHT, H. 1990. Heterogeneity of the antigenic site responsible for the induction of neutralizing antibodies in Infectious Bursal Disease Virus. *Archives of Virology* (Austria) 119: 211-223.
- 21.** PADGET MONCADA, H. 1989. Edad adecuada de vacunación contra la enfermedad Infecciosa de la Bursa de Fabricio en pollitas de reposición. Tesis. Med. Vet. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 75p.
- 22.** PFIZER. 2002. Enfermedad de Gumboro. 1p. Tomado de internet:
<http://www.pfizersanidadanimal.com.ar>
- 23.** PHILLIPS, W. 1981. Comparison of Precipitin Antibodies and Virus-Neutralizing Antibodies to Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Diseases* (EE.UU) 25 (4): 1093-1097.
- 24.** PIZARRO, M.; MORALES, J.; GONZÁLEZ, M. 2001. Enfermedad de Gumboro: vacunas y programas vacunales. 5p. Tomado de internet:
<http://www.redvya.com.veterinarios>.
- 25.** RAUTENSCHLEIN, S; SHARMA, J.M. 2001. Inmunosupresión inducida por el VEIB. Supresión de la respuesta humoral. *World Poultry. Revista de producción, procesamiento y comercialización.* (Japón) [Especial:Gumboro 2]: 16-17.
- 26.** SÁNCHEZ-VIZCAINO, J.M. 2001. Curso de introducción a la inmunología ¿Qué papel tienen las inmunoglobulinas en la respuesta inmune? 6p. Tomado de internet:
<http://www.inmunoglobulinas.com.ar>

- 27.** SMITH, J. 2002. Control de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa: Estrategias de vacunación. Trad. por Alejandro Banda. Georgia, EEUU. p. 44-53.
- 28.** TIZARD, I. 1996. Inmunología veterinaria. Trad. por Martha Araiza. 5 ed. México, D.F., McGraw-Hill. p. 233-252.
- 29.** VAINIO, O.; IMHOF, B.A. 1995. The immunology and developmental biology of the chicken. *Immunology Today*, (EE.UU) 16 (8):365-370.
- 30.** VILLEGAS, P. s.f. Laboratory Manual Avian Virus Disease. Georgia, EEUU. p. 11; 36-37.
- 31.** VILSON, A. et al. 2001. La experiencia brasileña con el vvVEIB. *World Poultry. Revista de producción, procesamiento y comercialización.* (Japón) [Especial:Gumboro 2]: 20-22.
- 32.** VISION VETERINARIA. 2000. Inoculación de la vacuna de IBD (Cepa 2512). Perú. 3p. Tomado de internet:
<http://www.visionveterinaria.com>
- 33.** WEISMAN, J.; HITCHNER, S. 1978. Virus-Neutralization versus Agar-Gel Precipitin tests for detecting serological response to Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Diseases* (EE.UU.) 22 (4):189-192.
- 34.** WIJNGAARD, J. VAN DEN. 2001. La vacunación In-ovo contra la EIB sobrepasa el enfoque convencional. *World Poultry. Revista de producción, procesamiento y comercialización.* (Japón) [Especial:Gumboro 2]:13-15.