

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Estudio de la respuesta serológica al Virus de la Anemia Infecciosa
Aviar, utilizando dos vacunas comerciales en cuatro lotes de aves
reproductoras y sus respectivas progenies al día de edad.**

Modalidad: Práctica Dirigida

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico
de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Rodolfo Ramírez Rodríguez

Campus Presbítero Benjamín Núñez

2008

TRIBUNAL EXAMINADOR

Dr. Jorge Eduardo Quirós Arce.
Decano Facultad de Ciencias de la Salud.

Dr. Carlos Jiménez Sánchez.
Director Escuela de Medicina Veterinaria.
Lector

Dra. Marcia Ramírez Marín.
Tutora

Dr. Luis Nazario Araya Sánchez.
Lector

Fecha: _____

DEDICATORIA

Dedico a Dios todo poderoso el permitirme cumplir mi sueño, el ser Médico Veterinario.

A mis padres Eugenio y María del Carmen, a Nelson mi hermano, por estar conmigo durante los momentos difíciles de mi vida.

A mi segunda mamá, Doña Marta Salas, que me brindó su hospedaje, apoyo y confianza, durante el estudio de mi carrera profesional. Por siempre estaré agradecido con su hospitalidad y amor.

A Dixie y mi hija Mariangel, las cuales representan en este momento de mi vida un punto de apoyo emocional y una razón más por la cual vivir. A ellas las llevo siempre en mi pensamiento y en mi corazón.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Dra Marcia Ramírez el permitirme ser su tesimalio, mi admiración por su capacidad como profesional y persona, asimismo su destacada paciencia ante las innumerables vicisitudes que se compartieron durante el periodo de la práctica dirigida.

A los doctores Luis Nazario Araya y Carlos Jiménez, lectores del trabajo, por disponer de su tiempo para ayudarme a concluir mi formación.

A los Médicos Veterinarios encargados de las granjas donde se llevó a cabo el estudio, así como a los funcionarios de la misma.

En especial a una persona que aprecio y respeto mucho, a quien le debo mi carrera al Dr. Mauricio Jiménez, por ayudarme a superarme y lograr llevar a cabo mi sueño.

A la Escuela de Medicina Veterinaria por tener un excelente personal para nuestra formación profesional y humana.

A TODOS INFINITAS GRACIAS.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA		iii
AGRADECIMIENTO		iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS		v
ÍNDICE DE CUADROS		vii
ÍNDICE DE FIGURAS		viii
ABREVIATURAS		ix
RESUMEN		x
ABSTRACT		xi
1. INTRODUCCION		1
1.1. Antecedentes.....		1
1.2. Justificación.....		5
1.3. Objetivos.....		7
1.3.1. Objetivo General.....		7
1.3.2. Objetivos Específicos.....		7
2. METODOLOGÍA		8
2.1. Materiales y Métodos.....		8
2.1.1. Número de aves a monitorizar.....		8
2.1.2. Población de estudio.....		8
2.1.3. Aplicación de la vacuna Tad Thymo vac.....		9
2.1.4. Aplicación de la vacuna Novilis CAV P4.....		9
2.1.5. Toma de muestras de sangre en aves menores a una semana de edad.....		9

2.1.6. Toma de muestras de sangre de la vena braquial en aves mayores a cuatro semanas de cuatro semanas de edad.....	10
2.1.7. Cronograma de los muestreo realizados en los lotes reproductores pesados y en sus respectivas progenies.....	10
2.1.8. Cronograma de los muestreos realizados en los reproductores livianos y en sus progenies.....	11
2.1.9. Prueba serológica de ELISA.....	11
2.1.10. Interpretación de los resultados serológicos.....	12
2.1.11. Seguimiento zootécnico de las progenies de los lotes reproductores livianos.....	12
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
3.1. Resultados serológicos.....	13
3.2. Resultados zootécnicos.....	19
3.2.1. Granja Montserrat.....	19
3.2.2. Granja Mónica.....	22
4. CONCLUSIONES.....	26
5. RECOMENDACIONES.....	27
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
7. ANEXO.....	33

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cronograma de los muestreos realizados en los lotes reproductores pesados y en sus respectivas progenie.....	10
Cuadro 2. Cronograma de los muestreos realizados en los lotes reproductores livianos y en sus respectivas progenies.....	11
Cuadro 3. Interpretación de los resultados del ensayo de ELISA de IDEXX, para la detección de anticuerpos frente al CAV. Dilución 1:100.....	12
Cuadro 4. Resultados serológicos del lote reproductor liviano 2005-2 a las 13, 17, 26, 35 y 40 semanas de edad, y los de su correspondiente progenie al día de edad.....	13
Cuadro 5. Resultados serológicos del lote reproductor liviano 2005-4 a las 13, 17, 26, 30, 35 y 40 semanas de edad, y los de su correspondiente progenie al día de edad.....	15
Cuadro 6. Resultados serológicos del lote reproductor pesado 191 a las 16, 20, 26 y 40 semanas de edad, y la de su correspondiente progenie en la semana 26 y 40, al día de edad.....	17
Cuadro 7. Resultados serológicos del lote reproductor pesado 192 a las 16, 20, 26 y 40 semanas de edad, y la de su correspondiente progenie en la semana 26 y 40, al día de edad.....	17

ÍNDICE DE FIGURAS

GRANJA MONTSERRAT

Figura 1: Porcentaje promedio de la mortalidad semanal	19
Figura 2: Consumo de alimento acumulado por semana en cada lote.....	20
Figura 3: Ganancia de peso semanal para los dos lotes en estudio.....	20
Figura 4: Porcentaje de uniformidad semanal para cada uno de los lotes.....	21
Figura 5: Conversión alimenticia semanal para cada uno de lotes.....	22

GRANJA MÓNICA

Figura 6: Porcentaje promedio de la mortalidad semanal obtenida en granja Mónica.....	22
Figura 7: Consumo de alimento acumulado por semana.....	23
Figura 8: Ganancia de peso semanal para los lotes en estudio.....	24
Figura 9: Porcentaje de uniformidad semanal para cada lote evaluado.....	24
Figura 10: Conversión alimenticia semanal para cada lote.....	25

ABREVIATURAS

AIA – Anemia Infecciosa Aviar.

ADN – Acido Desoxiribonucleico.

ELISA – Inmuno ensayo con enzimas asociadas.

M.A.G – Ministerio de Agricultura y Ganadería.

PCR – Reacción en cadena de polimerasa.

GMT – Título medio geométrico.

CV – Coeficiente de Variación.

VAIA – Virus de Anemia Infecciosa Aviar.

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la seroconversión inducida por dos vacunas comerciales contra la Anemia Infecciosa Aviar (AIA), en cuatro lotes reproductores, dos livianos y dos pesados, hasta las cuarenta semanas de edad y en sus progenies, al día de edad. La aplicación de la vacuna Intervet se realizó vía subcutánea y la vacuna comercial Lohmann, en el agua de bebida.

Los lotes reproductores livianos (Isa Brown x Isa Brown) 2005-2 y 2005-4, fueron vacunados contra el virus de la anemia infecciosa aviar (VAIA) a las 14 semanas y monitorizados a las 13, 17, 26, 30, 35 y 40 semanas. A partir de las 26 semanas, las progenies de ambos lotes fueron muestreadas al día de edad y se dió seguimiento, por seis semanas, a los parámetros zootécnicos de mortalidad, consumo de alimento, peso y uniformidad, a las progenies correspondientes de las 30 y 40 semanas.

Los lotes pesados (Cobb x Cobb) 191 y 192, recibieron la vacuna contra el VAIA a las 17 semanas y se monitorizaron a las 16, 20, 26 y 40 semanas. Las progenies de ambos lotes correspondientes a la semana 26 y 40, fueron muestreadas al día de edad.

Al evaluar la seroconversión en los lotes reproductores livianos 2005-2 y 2005-4, se encontró que a partir de las 13 semanas de edad, ambos lotes presentan una seropositividad que se asoció al desafío natural de las aves al VAIA; la cual fue de 61% para el 2005-2 y 56% para el lote 2005-4. En ambos lotes y después de aplicarse la vacuna, los títulos de anticuerpos ascendieron y la seroconversión para el lote 2005-2 fue de un 78 a 83% y de 83 a 90% para el lote 2005-4. De las 110 muestras evaluadas de las progenies de este lote 2005-4 al día de edad, se obtuvo una seropositividad del 79%, mientras que de 115 muestras analizadas de la progenie del lote 2005-2, la positividad fue de un 65%.

En los lotes reproductores pesados también existió un desafío natural al VAIA, ya que desde la semana 16 se detectaron anticuerpos. Al igual que en los lotes livianos, esta seroconversión de las 16 semanas fue baja y muy inconsistente, oscilando entre 24 a 67%. Tres semanas después de la vacunación, la respuesta inmune se vuelve uniforme y los porcentajes de seroconversión oscilaron entre 94 a 100%, al igual que en las progenies evaluadas en estos lotes reproductores.

En cuanto a los rendimientos zootécnicos obtenidos en las granjas de levante para cada una de las progenies de reemplazo, no se lograron alcanzar los estándares establecidos por la línea genética, debido a problemas en el manejo de aves principalmente.

ABSTRACT

For the present work seroconversion induced by two commercial vaccines (Intervet: subcutaneously and Lohmann: in water) against Avian Infectious Anemia (AIA) was tested in four reproductive lots. Measurements were made at different times to these birds as well as to their progeny.

Two light breeder's flocks (Isa Brown x Isa Brown) identified as 2005-2 and 2005-4 were vaccinated at 14 weeks of age and sampled at 13, 17, 26, 30, 35 and 40 weeks of age. The progeny of both groups was sampled after hatching and during a six-week period monitored for parameters such as mortality rate, food consumption, body weight, food conversion and uniformity in size.

Additionally, two heavy breeder's flock (Cobb x Cobb), identified as 191 and 192 were given vaccine at 17 days of age and tested subsequently at 16, 20, 26 and 40 weeks of age. The progeny of both groups was tested at the time of hatching.

For both groups of light breeders, specific antibodies were detected (61% for the 2005-2 and 56% for 2005-4) before the scheduled vaccination. It is assumed that these titers are the result of a natural challenge to the virus. After vaccination at 14 weeks of age, titers started to be detectable at week 17 of age, further increasing the percentage of positive animals until it reached 90% at the time of the last testing (40 weeks of age). The progeny of these birds was positive at 1 day of age: 115 samples from lot 2005-2 and 110 from lot 2005-4 were 65% and 79% respectively.

When the heavy breeders were tested one week ahead of vaccination time, specific antibodies were also detected (24-67% of the birds). When these birds were challenged by vaccination, seroconversion was detected in 94-100% of them. Similar results were obtained with their progeny.

When the previously mentioned the poultry production parameters are analyzed, the results were below expectations. There are good indications that this observation is the result of several management problems.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La Anemia Infecciosa Aviar (AIA), es una enfermedad relativamente nueva; descrita inicialmente en Japón por Yuasa en 1979 (Toro, 1995). En Europa fue detectada en 1981 y en los Estados Unidos en 1989. Posteriormente ha sido demostrada tanto serológicamente como por aislamiento viral en varios países del mundo: Australia, Brasil, Dinamarca, Francia, Alemania, Gran Bretaña, Japón, Malasia y Nueva Zelanda (Toro, 1995; McNulty, 2001). Se caracteriza por presentar anemia, atrofia generalizada de los órganos del sistema inmunológico y la inmunosupresión concomitante. Por tal razón, la enfermedad frecuentemente está acompañada de infecciones secundarias producidas por hongos y bacterias (Spackman et al., 2002).

El agente causal es un circovirus denominado virus de la Anemia Infecciosa Aviar (VAIA), con doble hebra de ácido desoxirribonucleico (ADN), pequeño (23 a 25 nanómetros) y desnudo, lo que le confiere su resistencia a los solventes orgánicos tales como cloroformo, acetona, éter y a la mayoría de desinfectantes (Avellaneda & Villegas, 1994), así como a condiciones naturales de altas temperaturas y pH extremos, razón por la cual el virus tiene una distribución mundial (McNulty, 2001). Se conoce un solo serotipo, pero se han aislados varias cepas (GIFU-1, CUX-1, A2, CAV7 y la CAA 82) (McKenna et al., 2003). El genoma del virus de la anemia del pollo posee tres regiones de lecturas superpuestas que codifican tres polipéptidos VP1, VP2 y VP3 (Toro, 1995). VP1 es la parte de la cápside o parte interna, VP3 induce un proceso de apoptosis, o muerte celular programada de timocitos, lo que se traduce en la eliminación de estas células linfocitarias del timo en pollos infectados (Hidalgo, 1999). La función de la proteína VP2 no está aún bien definida (Hidalgo, 1999).

El virus es inactivado completamente cuando se trata con betapropiolactona al 0.4% a 4°C por 24 horas o con formaldehído, iodóforos y cloro al 5% en 2 horas a 37°C (Villegas, 2001). Se transmite tanto por la vía vertical como por la horizontal, siendo la vía vertical la de mayor importancia (van Santen et al., 2001; Owoade et al., 2004). La transmisión transovárica es la causa primaria de anemia en animales jóvenes y ocurre cuando las aves reproductoras entran a la etapa de producción sin anticuerpos contra el virus de la anemia infecciosa aviar (VAIA) (Hidalgo, 1999; Shkoda, 2004). Si estas parvadas se infectan transmitirán el virus a sus progenies durante un periodo de 3 a 6 semanas, tiempo que posiblemente es requerido por el

virus para diseminarse por toda la parvada y para que las reproductoras desarrollen anticuerpos neutralizantes que pueden disminuir la transmisión vertical (Avellaneda & Villegas, 1994).

La célula blanco del VAIA es un linfocito T, relativamente inmaduro, probablemente CD4+ y CD8+. El virus de la AIA seguramente se absorbe y penetra a la célula por métodos comunes, multiplicándose en el núcleo, en donde los antígenos virales se pueden observar usando métodos inmunoquímicos (Lucio, ca 2000). Entre los 3 a 4 días post infección, los antígenos virales pueden ser demostrados en los hemocitoblastos en la médula ósea. La pérdida de estas células precursoras se da debido a la apoptosis, provocando una disminución en sangre de eritrocitos, trombocitos y granulocitos (Miller & Schat, 2004). Los linfocitos T precursores son el segundo grupo de células en división que son susceptibles a la infección con el virus de la AIA, causando una disminución de células linfoblastoides en la corteza del timo (Miller & Schat, 2004). La razón por la cual los hemocitoblastos y los linfocitos T precursores son susceptibles a la infección con el VAIA, a diferencia de los linfocitos B precursores, aún no está claro (Miller & Schat, 2004).

Aves inmunológicamente maduras producen anticuerpos en un período de tiempo corto después de la infección con el virus de la AIA previniendo el desarrollo de lesiones, sin embargo aves adultas pueden desarrollar lesiones o viremia persistente cuando se presentan infecciones con otros agentes inmunosupresores como el virus de la enfermedad de la bolsa de Fabricio, reticuloendoteliosis y el virus de la enfermedad de Marek, provocando lesiones más pronunciadas, cuadros de anemia más severos y aumento en la mortalidad (Miller & Schat, 2004).

La infección de reproductoras adultas no afecta la producción, fertilidad e incubabilidad de los huevos (Hidalgo, 1999), sin embargo, en las progenies nacidas sin la protección adecuada, se presenta alrededor de las primeras dos semanas de vida, un aumento en la mortalidad y anemia desde el nacimiento (Miller & Schat, 2004).

La transmisión horizontal ocurre cuando los pollos sanos entran en contacto con pollos infectados verticalmente, ya que pueden eliminar el virus a través de las heces por un período de al menos siete semanas, además, la contaminación horizontal puede ocurrir con equipo y cama de los galpones infectados (Malo, 1997). Quizás la forma de contaminación horizontal más probable sea la ingesta de alimento o material contaminado con heces (Castro, 1996).

La transmisión horizontal del VAIA que se presenta después de que los anticuerpos maternos han desaparecido alrededor de las primeras tres semanas de vida, ocasiona

principalmente la forma subclínica de la enfermedad, manifestándose con una inmunodepresión transitoria y aumento en el porcentaje de mortalidad y decomisos en el matadero (McNulty, 2001).

Los signos clínicos van a depender del tipo de transmisión, virulencia de la cepa, dosis infectante, edad de las aves al momento del contacto con el virus, estado inmunológico de las mismas, presencia de otras entidades nosológicas y diferencias genéticas en cuanto al grado de susceptibilidad (Miller & Schat, 2004). El único signo específico de dicha enfermedad es la anemia aplástica temporal, la cual se produce por la destrucción de las células eritroblastoides, donde se encuentra reducción de los valores del hematocrito de un 6 a 27% a los 14 ó 15 días después de la infección (Avellaneda & Villegas, 1994). La inmunodeficiencia es ocasionada por la reducción y destrucción de los linfocitos T y particularmente del timo que conlleva una atrofia de este órgano, en pollos menores de tres semanas de edad (Ledesma et al., 2001; van Santen et al., 2004)

Las aves pueden presentar otros signos inespecíficos como retardo en el crecimiento, plumas erizadas, incrementos en la mortalidad, depresión, anorexia, altas conversiones alimenticias, crecimiento irregular, ganancia de peso reducida y presencia de otras enfermedades debido a la inmunosupresión (McNulty, 2001). Las aves afectadas presentan frecuentemente hemorragias cutáneas focales. Estas ocurren más comúnmente en las alas, pero también pueden estar presentes en la cabeza, a los lados del tórax y en el abdomen (Villegas, 2001). Estas lesiones frecuentemente desarrollan infección bacteriana secundaria con agentes oportunistas como las *E. coli*, *Staphylococcus* spp. y *Clostridium* spp. que puede resultar en una dermatitis gangrenosa (Villegas, 2001).

Las lesiones más típicas en la necropsia son la atrofia del timo y de la médula ósea, la cual puede presentar un aspecto grasoso y amarillento, producto del reemplazo del tejido hematopoyético por tejido adiposo (Rosenberger, 1999); la lesión macroscópica más frecuente en pollitos infectados con el VAIA, es la atrofia del timo por la depleción linfocitaria, a nivel cortical y los lóbulos se aprecian atróficos (Lucio, ca 2000). Otras menos comunes son la hepatomegalia, nefromegalia, esplenomegalia, focos necróticos en el hígado, corazón y las hemorragias puntiformes en la mucosa del proventrículo, tejidos subcutáneos y en la musculatura esquelética (Owoade et al., 2004). Las lesiones histopatológicas se caracterizan por atrofia linfocítica en todos los tejidos hematopoyéticos y linfoides (Yuasa, 1993). El timo y la bolsa de Fabricio muestran una atrofia severa; en la bolsa se observa atrofia de los folículos linfoides y ocasionalmente focos necróticos (Avellaneda & Villegas, 1994). Tanto en células

de la médula ósea como en células del timo, se observan cuerpos de inclusión intracelulares o manchas oscuras en el núcleo de las células afectadas que son producto de la replicación viral (Ledesma et al., 2001)

El diagnóstico definitivo se basa en los signos clínicos típicos, hallazgos de necropsia de aves afectadas, serología de la parvada de reproductoras, demostración del virus en la mayoría de las aves afectadas, la presencia de anemia y las lesiones macro y microscópicas (Miller & Schat, 2004). El diagnóstico puede ser confirmado por el aislamiento del virus en líneas celulares como la MDCC-MSB1, MDCC-JP2 y CU-1478 (derivadas de un linfoma producido por el virus de la enfermedad de Marek en el bazo o en pollos libres de patógenos específicos) y LSCC-1104B1 (derivada de tumores de leucosis linfoide) (Calnek et al., 2000). Un método de diagnóstico utilizado es la detección del antígeno viral o del ADN viral en el timo, bazo o en la médula ósea; mediante técnicas inmunoquímicas; hibridación del ADN *in situ* o con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), además del diagnóstico serológico con las pruebas de inmunoensayo con enzimas asociadas (ELISA), virus neutralización o inmunofluorescencia indirecta (Miller & Schat, 2004).

El control de la enfermedad se da evitando la enfermedad en pollitos en las primeras dos a tres semanas de vida y se logra cuando las reproductoras desarrollan inmunidad durante el periodo de crecimiento entre las 8 a las 12 semanas de edad (Avellaneda & Villegas, 1994). Uno de los sistemas iniciales para controlar la enfermedad fue llevar la cama (gallinaza) infectada con el virus de la AIA de lotes más viejos a galpones de pollitas jóvenes, para así garantizar la infección y el desarrollo de anticuerpos, sin embargo, esta práctica tiene la enorme desventaja de inducir una inmunidad poco uniforme, además de la posibilidad de transmitir conjuntamente algún otro agente patógeno (Hidalgo, 1999; Miller & Schat, 2004).

En nuestro país, al menos durante un año, esta práctica fue utilizada por las compañías avícolas antes de que se pudiera disponer de una vacuna comercial para la prevención de la enfermedad (Ramírez, 2005), sin embargo, el control más efectivo se realiza con la vacunación de los lotes reproductores a partir de las 15 semanas de edad, pero nunca antes de 6 semanas previo al inicio de la producción, con el objetivo de transmitir una adecuada inmunidad materna a las progenies (Lucio, ca 2000). La vacuna a utilizar debe de prevenir la transmisión vertical de las aves madres a la progenie y proteger a los pollos de hasta tres semanas de edad contra la transmisión horizontal (Lucio, ca 2000).

Para poder evitar la transmisión vertical, todas las aves en la parvada de reproductoras necesitan tener altos títulos de anticuerpos circulantes contra el VAIA antes del inicio del

período de producción, y que además estos niveles persistan durante todo el ciclo de producción (Miller & Schat, 2004).

En Alemania a comienzos de 1980, se comenzó a vacunar las reproductoras con una autovacuna preparada a partir de macerados de hígado, y en 1985 se aisló el virus de la AIA el cual fue designado como Cux 1. Este virus fue utilizado sin atenuar para la preparación de la vacuna, cultivándose en embriones de pollos libres de patógenos específicos. Esta vacuna fue autorizada a usarse en 1990, aplicándose a reproductoras entre las 13 a 15 semanas de edad (Castro, 1996).

Justificación

El virus de la anemia infecciosa de las aves puede interferir con la función inmune, en especial con la respuesta mediada por los linfocitos T, favoreciendo la presentación de algunas patologías virales como la enfermedad de Marek y bacterianas como la dermatitis gangrenosa (Hidalgo, 1999).

Las pérdidas económicas debidas a la enfermedad radican en la mortalidad, costos de medicación para controlar las infecciones bacterianas oportunistas y un crecimiento inadecuado de las aves (Hagood et al., 2000). Las pérdidas van a depender de la edad y del estado inmune de las parvadas en el momento de la infección, por lo que las consecuencias van a ser mayores en pollitos muy jóvenes y sin anticuerpos maternos (Lucio, ca 2000). Asimismo, se sabe que la inmunidad materna protege completamente a las aves contra los efectos del virus de la anemia durante las primeras semanas de vida, mientras el sistema inmunológico no se vea comprometido por otras infecciones o por estrés (Rosales, 1998; Lucio, ca 2000). Los animales que sobreviven de un brote de anemia, sufren de una alta mortalidad durante el crecimiento (Muñoz, 1998). En los casos subclínicos pueden presentarse pérdidas económicas debido a las altas conversiones alimenticias y a la reducción de la ganancia diaria de peso (De Herdt et al., 2001).

En Costa Rica a partir del año 2000 y dada la ausencia de serovonversión en varios de los lotes de aves reproductoras pesadas, el Ministerio de Agricultura y Ganadería (M.A.G.), autorizó el ingreso al país de la vacuna contra el virus de la AIA; **NOBILIS® CAV P4**, de la casa comercial Intervet. Esta es una vacuna viva atenuada que contiene la cepa 26- P4, con un título de ($\geq 10^{2.3}$ DICT₅₀), la cual puede ser administrada mediante la inyección intramuscular o

subcutánea, o en punción en la membrana del ala, aplicando 0.2 ml por ave (Intervet, 1999, 2002).

En Costa Rica, en los lotes reproductores que se ha utilizado esta vacuna, se logró obtener niveles elevados y uniformes de anticuerpos necesarios para prevenir la transmisión vertical del virus a las progenies, además de la transferencia de anticuerpos maternos para evitar la transmisión horizontal del virus, eliminándose así las presentaciones clínicas y subclínicas que estaban ocurriendo en las progenies de aves provenientes de lotes reproductores no vacunados. Quizás la única desventaja de esta vacuna es su vía de aplicación, ya que la misma induce a un manejo adicional del lote reproductor, si la vacuna no se aplica en combinación con una vacuna emulsionada de la misma casa comercial (Intervet) (Ramírez, 2005).

La otra vacuna disponible en el mercado y que aún no está siendo utilizada por el sector avícola nacional, es la vacuna comercial de la casa Lohmann Animal Health; **Tad® Thymo vac**. Esta es una vacuna a virus vivo atenuado que contiene la cepa CUX-1, con un título de $10^{4.5}$ DICT₅₀, del virus de la AIA. Debido al grado de atenuación mediante pasajes en cultivo celular MSB-1, esta vacuna logra una propagación del virus vacunal dentro del lote reproductor sin ser patógena y sin perder la inmunogenicidad, siendo ésta una de las principales ventajas, ya que las aves que no reciban la dosis vacunal vía oral, la estarían recibiendo a través de las heces presentes en la cama, de aquellas aves que se inmunizaron vía oral (Cardoso, 2006).

La vacunación contra el VAIA se está realizando en nuestro país a partir de las 14 semanas en los lotes de reproductoras livianas y a las 17 semanas en las reproductoras pesadas (Ramírez, 2005).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar los niveles de anticuerpos contra el virus de AIA, inducidos por las vacunas **Tad Thymo vac** y la **Novilis CAV P4**, en cuatro lotes de aves reproductoras y sus respectivas progenies, por medio de la técnica de ELISA.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar los niveles de anticuerpos en las aves reproductoras livianas inmunizadas con la vacuna Tad Thymo vac y la Novilis CAV P4 a las 17, 26, 30, 35 y 40 semanas de edad.
- Evaluar los niveles de anticuerpos maternos al día de edad, de las progenies de los lotes reproductores livianos, a partir de las 26 semanas de edad.
- Dar seguimiento a los resultados zootécnicos durante las primeras seis semanas de vida, a cuatro lotes de pollitas de reemplazo, correspondientes a las 30 y 40 semanas de edad.
- Determinar los niveles de anticuerpos en las aves reproductoras pesadas inmunizadas con la vacuna Tad Thymo vac y la Novilis CAV P4, a las 20, 26 y 40 semanas de edad.
- Evaluar los niveles de anticuerpos maternos al día de edad, de las progenies de los lotes reproductores pesados, correspondientes a las 26 y 40 semanas de edad.

2. METODOLOGÍA

2.1 Materiales y Métodos

2.1.1 Número de aves monitorizadas.

Para establecer un programa de seguimiento a la respuesta inmune inducida por la vacunación contra la anemia infecciosa, se recomienda bajo las condiciones definidas en este estudio que el tamaño de la muestra por lote sea de 20 muestras de suero, tanto en las reproductoras como en sus progenies, para un 95% de confianza y un 15% de prevalencia (IDEXX, 2005), en cada uno de los muestreos realizados.

2.1.2 Población de estudio

Para el presente estudio se trabajó con dos lotes de aves reproductoras en cada una de las granjas seleccionadas.

- Lotes reproductores pesados de la línea genética Cobb x Cobb:

Lote 1: lote 192 (Lohmann): estuvo constituido por 24 000 hembras y 4 600 machos.

Lote 2: lote 191 (Intervet): por 23 000 hembras y 3 300 machos. De cada lote se tomaron 20 aves al azar.

Ambos lotes estuvieron ubicados dentro del Complejo de reproducción Sardinal, Puntarenas y sometidos al mismo programa de manejo y alimentación, pero en dos unidades productivas diferentes denominadas módulos. Cada módulo de producción albergó un único lote de aves bajo un estricto control de bioseguridad.

Este estudio no pudo contar con un lote de reproductor pesado sin vacunar (control sin vacuna), ya que a partir del año 2005 se evidenció la ausencia de seroconversión contra el VAIA, por desafío natural de campo, en los lotes reproductores pesados durante la fase de levante (0 a 20 semanas), esto ocasionó que a partir de las 26 semanas edad estos lotes se contaminaran en la etapa de producción, observándose problemas clínicos de alta mortalidad, bajo consumo de alimento y desuniformidad en las parvadas de pollo de engorde, además de los cuadros de dermatitis gangrenosa durante los primeros siete días de edad (Ramírez, 2005).

- Lotes reproductores livianos de la línea genética Isa Brown:

Lote 3: lote 2005-4 (Lohmann): estuvo constituido por 10 300 hembras y 1 500 machos

Lote 4: lote 2005-2 (Intervet): por 5 482 hembras y 888 machos. De cada lote se tomaron 20 aves al azar.

Estos lotes se ubicaron en San José de la Montaña, Heredia y estuvieron sometidos al mismo programa de manejo y alimentación, a pesar de estar ubicados en dos módulos de producción separados. Cada módulo albergó un único lote de aves y al igual que en los módulos anteriores, esta compañía cuenta con un estricto control de bioseguridad.

En el mismo año 2005, la serología de las aves reproductoras livianas contra el VAIA, comenzó a ser inconsistente, ocasionando inquietud en algunos clientes de las pollitas de reemplazo Isa Brown, quienes exigieron la introducción de la vacuna comercial contra la AIA, para asegurarse así la calidad de sus parvadas de reposición (Ramírez, 2005). Por consiguiente, ninguna de las dos compañías de reproductores con las cuales se trabajó, estuvo dispuesta a dejar lotes sin vacunar contra el VAIA.

2.1.3 Aplicación de la vacuna Tad Thymo vac

La vacuna estudiada Tad Thymo vac fue aplicada a los lotes reproductores 1 y 3 a las 17 y 14 semanas de edad, respectivamente. Para obtener una buena aplicación de la vacuna, se recomendó que las aves no tuvieran acceso al agua durante 2 a 3 horas previas a la vacunación, para garantizar la ingesta de la vacuna en un periodo de 2 a 3 horas máximo.

2.1.4 Aplicación de la vacuna Novilis CAV P4.

Esta vacuna fue aplicada a los lotes reproductores 2 y 4 a las 17 y 14 semanas de edad respectivamente, vía intramuscular, y la dosis por ave fue de 0.2 ml.

2.1.5 Toma de muestras de sangre en aves de menos de una semana de edad.

Se aplicó la técnica de sangrado por decapitación. Con la mano izquierda se sujetó el ave, mientras que con la derecha se procedió a realizar el corte del cuello a la mitad del mismo. La sangre se recolectó por goteo en un recipiente Eppendorf (Ramírez, 2004). Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

2.1.6 Toma de muestras de sangre de la vena braquial en aves mayores a cuatro semanas de edad.

La técnica para la extracción de sangre se realizó por punción de la vena braquial que corre entre los músculos bíceps braquial y el tríceps humeral (Ramírez, 2004). Se inmovilizaron las alas con la mano izquierda y con la derecha se efectuó la extracción de sangre, utilizando una jeringa de 3 ml con aguja de 22 x 1.5 milímetros de grosor, en forma suave para permitir el funcionamiento fisiológico de la vena (Ramírez, 2004). De cada ave se extrajeron aproximadamente 1.5- 2 ml de sangre la cual se decantó en un tubo Eppendorf y se trasladaron el mismo día al Laboratorio de Virología de la misma institución.

Tanto las muestras de sangre de los lotes reproductores como las de sus progenies, fueron almacenadas en cajitas debidamente identificadas con el número del lote, edad del mismo y el nombre de la compañía, para su análisis posterior.

2.1.7 Cuadro 1. Cronograma de los muestreos realizados en los lotes reproductores pesados y en sus respectivas progenies.

Edad de los lotes (semanas)	Lote 1 Lote de estudio	Lote 2 Lote de referencia	Características del lote reproductor	Progenies de los lotes 1 y 2
16	Sangrado de 20 aves	Sangrado de 20 aves	Sangrado control (antes de realizar la aplicación de las vacunas contra el VAIA)	
17	Vacuna Tad-Thymo vac	Vacuna Novilis CAV P4	Aplicación de la vacuna correspondiente, en cada uno de los dos lotes reproductores.	
20	Sangrado (20 aves)	Sangrado (20 aves)	Sangrado control, tres semanas después de haberse aplicado la vacuna	
26	Sangrado	Sangrado	Etapa joven de un lote reproductor: 25- 30 semanas de edad.	Sangrado de 20 aves al día de nacimiento, en la planta de incubación
40	Sangrado	Sangrado	Etapa madura de un lote reproductor: 36- 45 semanas de edad	Sangrado de 20 aves al día de nacimiento, en la planta de incubación

2.1.8 Cuadro 2. Cronograma de los muestreos realizados en los lotes reproductores livianos y en sus progenies.

Edad de los lotes (semanas)	Lote 3 Lote de estudio	Lote 4 Lote de referencia	Características del lote reproductor	Progenies de los lotes 3 y 4
13	Sangrado de 20 aves	Sangrado de 20 aves	Sangrado control (antes de aplicar la vacuna contra la AIA)	
14	Vacuna Tad-Thymo vac	Vacuna Novilis CAV P-4	Aplicación de la vacuna correspondiente, en cada uno de los dos lotes reproductores.	
17	Sangrado (20 aves)	Sangrado (20 aves)	Sangrado control, tres semanas después de aplicarse la vacuna	
26	Sangrado	Sangrado	Etapas jóvenes de un lote reproductor: 25- 35 semanas de edad.	Al día de nacimiento en la planta de incubación
30	Sangrado	Sangrado	Etapas jóvenes de un lote reproductor: 25- 35 semanas de edad.	Al día de nacimiento en la planta de incubación
35	Sangrado	Sangrado	Etapas jóvenes de un lote reproductor: 25- 35 semanas de edad.	Al día de nacimiento en la planta de incubación
40	Sangrado	Sangrado	Etapas maduras de un lote reproductor: 36- 45 semanas de edad	Al día de nacimiento en la planta de incubación

2.1.9 Prueba serológica de ELISA.

El ensayo comercial para el virus de la AIA, conocido como Flock Chek CAV, es un análisis serológico competitivo de bloqueo, en una dilución modificada de 1: 100 o sea, 1 parte del suero del pollo y 99 partes del buffer de dilución (IDEXX, 2006). Durante la primera incubación, los anticuerpos contra el virus de la anemia del pollo (CAV) que se encuentran en la muestra, reaccionan con los antígenos virales que están fijados en el micropocillo (IDEXX, 2004). Después del lavado se agrega un conjugado de enzimas y anticuerpo monoclonal anti-CAV al pocillo. Si la muestra no contiene anticuerpos anti-CAV, el conjugado anti-CAV podrá reaccionar con el antígeno CAV (IDEXX, 2004).

Por otra parte, si la muestra contiene anticuerpos anti-CAV, los anticuerpos monoclonales conjugados con enzima quedan bloqueados e incapaces de reaccionar con el antígeno. Luego de este periodo de incubación, el conjugado que no ha reaccionado se elimina mediante un lavado y se agrega una solución de sustrato cromógeno. El sustrato se convierte, en presencia de la enzima, en un producto que reacciona y produce un color azul (IDEXX, 2004). (Anexo 1)

2.1.10 Interpretación de los resultados serológicos

El kit recomienda la lectura de los resultados a 650 nm. Los resultados se calcularon dividiendo la A(650) de la muestra por la media A(650) del control negativo, lo cual resulta en un valor S/N, valor de la muestra entre la densidad del control negativo (IDEXX, 2006). La proporción de anticuerpos a CAV es inversamente proporcional al A(650) y por lo tanto el valor S/N. La presencia de anticuerpos CAV indica la exposición previa al virus de la anemia aviar (IDEXX, 2004).

Cuadro 3. Interpretación de los resultados del ensayo de ELISA de IDEXX, para la detección de anticuerpos frente al CAV. Dilución de la muestra 1:100.

Grupo ELISA	Unidades ELISA	Relaciones S/N	Interpretación
0	< 1000	> 0.8	Negativo
1	1000-2460	0.8-0.55	Positivo (Títulos Protectores)
2	2461-5050	0.54-0.35	Positivo (Títulos Protectores)
3	5051-8660	0.34-0.2	Positivo (Títulos Protectores)
4	≥ 8661	< 0.2	Alto-Protector

(IDEXX Laboratories, 2003).

2.1.11 Seguimiento zootécnico de las progenies de los lotes reproductores livianos.

Se les dio seguimiento zootécnico a las progenies de los lotes reproductores livianos 2005-2 y 2005-4 durante las primeras seis semanas de vida, incluyendo el consumo de alimento acumulado por semana, ganancia de peso semanal, porcentaje de uniformidad de la parvada, conversión alimenticia y el porcentaje promedio de la mortalidad total (selección más mortalidad).

A la progenie de los lotes reproductores pesados 191 y 192, no se les dio seguimiento zootécnico, ya que los beneficios de aplicar la vacuna contra el virus de la AIA, están ampliamente documentados en la literatura (Schat, 2003; Ramírez, 2005). Así como en nuestro país, donde la vacunación contra el virus de la anemia infecciosa en lotes reproductores pesados, es una práctica común desde el año 2000 (Ramírez, 2005).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultados serológicos

En el Cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos en la prueba de ELISA para la vacuna de Intervet, en el lote reproductor liviano 2005-2 a las 13, 17, 26, 35 y 40 semanas de edad, y para la progenie de este lote reproductor, al día de edad.

Cuadro 4. Resultados serológicos del lote reproductor liviano 2005-2 a las 13, 17, 26, 35 y 40 semanas de edad, y los de su correspondiente progenie al día de edad.

Lote 2005-2 Vacuna Intervet											
Reproductoras livianas						Progenie del lote 2005-2 al día de edad					
Edad lote reproductor	GMT	CV	Min	Max	Grupo Elisa	GMT	CV	Min	Max	Grupo Elisa	Ubicación de la progenie
13	2320	76,4	999	8661	1						
17	3423	66,0	999	8661	2						
26	4289	56,6	999	8661	2	2141	81,0	999	8661	1	
30						2464	87,8	999	8661	2	
35	3800	64,4	999	8661	2	1264	70,2	999	5271	1	
40						2017	74,4	999	8029	1	Montserrat
	3153	74,4	999	8661	2	1994	89,8	999	8661	1	
						1457	100,4	999	8384	1	Mónica

Título Medio Geométrico = GMT

Coefficiente de Variación = CV

El título medio geométrico de 2320 que se obtuvo en la semana 13 en este grupo de aves reproductoras livianas, puede asociarse a la respuesta activa de las aves ante un desafío de campo (Lucio, ca 2000; Intervet, 2002), ya que la vacuna contra el VAIA se aplicó a las 14 semanas de edad, por consiguiente a partir de las 17 semanas y hasta las 40 semanas de edad, el incremento en los títulos medios geométricos (GMT) se asocia a la respuesta activa de las aves a la vacunación contra el VAIA. Los títulos de anticuerpos se ubican dentro del grupo 2 de la prueba de ELISA, con coeficientes de variación (CV) que van desde 56 a 74%. Estos títulos de anticuerpos se consideran “protectores” ante un posible desafío con virus de campo (IDEXX Laboratories, 2003).

Si se considera que una de las principales ventajas de aplicar una vacuna intramuscular es la seguridad de que cada ave reciba la dosis indicada (Tizard, 2004), por la vía correcta de

aplicación del antígeno (Intervet, 2002), se debió obtener coeficientes de variación entre 30 a 40% (Intervet, 2002), lo cual difiere con los resultados obtenidos.

En la semana 26 se obtiene el título más alto de anticuerpos (4289) con un coeficiente de variación de 56.6%, y a partir de la semana 35 se observa una disminución en los títulos, lo cual se considera un comportamiento normal dentro de la respuesta inmune de las aves a un antígeno (Tizard, 2004).

Al evaluar los títulos de anticuerpos para cada una de las muestras procesadas hasta las 40 semanas de edad del lote, se pudo determinar que el porcentaje de seropositividad en la semana 13 fue de 61%, o sea, de 18 muestras procesadas, 7 (38.8%) fueron negativas, (grupo "0"). Esta es una respuesta inmune baja y no uniforme que se puede asociar a un posible desafío natural de las aves al VAIA. Después de aplicarse la vacuna a las 14 semanas de edad, se detectó un ascenso de los títulos de anticuerpos a partir de la semana 17 y la uniformidad de la respuesta inmune, como lo indican los coeficientes de variación. La seropositividad fue de 83% en esta semana y se mantuvo entre 78 a 83% hasta la semana 40.

Para la progenie de este lote desde las 26 semanas de edad, los títulos de anticuerpos se ubicaron dentro del grupo 1, a excepción del resultado serológico obtenido en la progenie correspondiente a las reproductoras con 30 semanas de edad, el cual ubica la GMT dentro del grupo 2. Los coeficientes de variación en términos generales oscilaron entre un 70 a 100%, lo cual indica que a pesar de haber obtenido títulos de anticuerpos maternos protectores (IDEXX Laboratories, 2003), la inmunidad transferida no fue uniforme, ya que de 115 sueros analizados, 40 muestras estuvieron dentro del grupo "0" (35%), lo cual corresponde a una seropositividad del 65% al día de edad.

Cabe resaltar que la serología en los dos lotes de reemplazo destinados a las granjas del estudio, Montserrat y Mónica, se ubicó dentro del grupo 1 con coeficientes de variación de 74.4 y 100.4 % respectivamente. En la progenie destinada a granja Montserrat, la seropositividad fue de un 78% (4 muestras se ubicaron en el grupo 0), mientras que en las aves destinadas a granja Mónica, la seropositividad fue de un 39% (11 muestras se ubicaron en el grupo "0" del Elisa).

En el Cuadro 5 se presentan los resultados obtenidos en la prueba de ELISA para la vacuna de Lohmann, en el lote reproductor liviano 2005-4 a las 13, 17, 26, 35 y 40 semanas de edad y para la progenie de este lote reproductor, al día de edad, de las 26 a las 40 semanas.

Cuadro 5. Resultados serológicos del lote reproductor liviano 2005-4 a las 13, 17, 26, 30, 35 y 40 semanas de edad, y los de su correspondiente progenie al día de edad.

Lote 2005-4 Vacuna Lohmann											
Reproductoras livianas						Progenie del lote 2005-4 al día de edad					
Edad lote reproductor	GMT	CV	Min	Max	Grupo Elisa	GMT	CV	Min	Max	Grupo Elisa	Ubicación de la progenie
13	2643	79,1	999	8661	2						
17	4515	51,6	999	8661	2						
26	4924	51,0	999	8661	2	2717	79,2	999	8661	2	
30	8212	14,5	3374	8661	3	4080	60,2	999	8661	2	
						4301	57,9	999	8661	2	Mónica
						5971	37,9	999	8661	3	Montserrat
35	4215	58,4	999	8661	2	2649	81,5	999	8661	2	
40	4647	54,4	1018	8661	2	2280	81,7	999	8661	1	

La seroconversión que se presentó en este lote 2005-4 a las 13 semanas de edad, corresponde a la respuesta activa de las aves ante la exposición natural al VAIA de campo (Lucio, ca 2000; Intervet, 2002), ya que este lote reproductor se vacunó a las 14 semanas de edad. La GMT se ubica dentro del grupo 2 de ELISA pero con un CV de 79%, ya que de 18 sueros analizados, 10 (56%) fueron seropositivos y 8 (44%) negativos.

A partir de la semana 17 y hasta la semana 40 de edad, el título de anticuerpos en este lote de aves se ubica dentro del grupo 2 y 3 de ELISA, con coeficientes de variación entre 14 a 58%., los cuales pueden considerarse como “protectores” ante un posible desafío con virus de campo (IDEXX Laboratories, 2003).

Al evaluar los títulos de anticuerpos para cada una de las muestras procesadas hasta las 40 semanas de edad del lote, se pudo determinar que el porcentaje de seropositividad ascendió a partir de la semana 17 a 89%, o sea, únicamente dos muestras fueron negativas. Para las semanas 26, 30, 35 y 40, los porcentajes de positividad fueron de 83, 100, 89 y 100% respectivamente, sin embargo el incremento en los CV principalmente en los dos últimos muestreos, no fueron los esperados, ya que el virus vacunal difunde a través de las heces contaminando la cama de las galeras (Cardoso, 2006) y por lo tanto, si alguna ave no recibió la dosis correcta durante el proceso de la vacunación a las 14 semanas, existe la posibilidad de

que entre en contacto con el agente al ingerir cama contaminada (Rosenberger, 1999; Fernández, 2006; Lozano, 2006), además, al existir un desafío previo contra el VAIA, la vacuna utilizada a las 14 semanas puede ser considerada como el segundo estímulo antigénico para este lote de aves y por lo tanto, la respuesta serológica se esperaba alta (grupos 3 y 4) y estable, al menos hasta las 40 semanas de edad del lote (Tizard, 2004).

Para la progenie de este lote a partir de las 26 semanas de edad, los títulos de anticuerpos se ubican principalmente dentro del grupo 2 a excepción del resultado serológico obtenido en una de las progenes correspondiente a las 30 semanas del lote reproductor, el cual ubica la GMT dentro del grupo 3. Los CV de las progenes oscilaron desde 38% para las progenes de las 30 semanas, hasta un 81% para las correspondientes a la semana 35 y 40. Del total de 110 muestras estudiadas para estas progenes, la seropositividad fue de un 79%. Cabe resaltar que de las 23 muestras negativas, 13 (56%) corresponden a las progenes de las semanas 35 y 40, indicando que conforme se aumenta la edad en las reproductoras, puede aumentar el número de sueros negativos en la progenie, resultado que discrepa de la información que genera la casa comercial para la vacuna (Lohmann Animal Health, 2005).

En la progenie destinada a granja Mónica, la seropositividad fue de 89% y de un 95% para las aves destinadas a granja Montserrat.

Al observar la falta de uniformidad en los títulos de anticuerpos y la baja seroconversión obtenida en los lotes livianos 2005-2 y 2005-4 (61 y 56% respectivamente) a las 13 semanas de edad, son un claro indicio de que ambos lotes estuvieron expuestos a un desafío natural de campo del VAIA, antes de aplicarse la vacuna a las 14 semanas de edad. Después de la vacunación, ambos lotes presentan un incremento en los porcentajes de seroconversión, la cual fue de 78 a 83% en el lote 2005-2 y de 83 a 100% en el lote 2005-4. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Cardona et al. (2000), en el estudio comparativo sobre la seroconversión contra el virus de la anemia infecciosa en tres líneas de pollos libres de patógenos (White Leghorn), después de un brote natural, con valores de seropositividad desde 26 a 94% y que después de aplicar la vacuna comercial de Intervet, ascendieron entre 75 a 100%.

La seropositividad en las progenes de ambos lotes entre las 26 y 40 semanas, fue de un 79% para las aves provenientes del lote 2005-4 y un 65% para las descendientes del lote 2005-2.

En los Cuadros 6 y 7 se presentan los resultados serológicos obtenidos en los lotes de reproductoras pesadas (191 y 192), inmunizados con la vacuna de Intervet y Lohmann respectivamente, a partir de las 16 a 40 semanas de edad y la de sus respectivas progenies a las 26 y 40 semanas de edad del lote reproductor.

Cuadro 6. Resultados serológicos del lote reproductor pesado 191 a las 16, 20, 26 y 40 semanas de edad, y la de su correspondiente progenie en la semana 26 y 40, al día de edad.

Lote 191										
Vacuna Intervet										
Reproductoras Pesadas						Progenie del lote 191				
						al día de edad				
Edad lote reproductor	GMT	CV	Mín	Máx	Grupo Elisa	GMT	CV	Mín	Max	Grupo Elisa
16	1522	117,1	999	8661	1					
20	7906	12,8	4976	8661	3					
26	4237	54,5	999	8661	2	2373	75,6	999	8661	1
40	5804	40,5	999	8661	3	2179	78,2	999	8661	1

Cuadro 7. Resultados serológicos del lote reproductor pesado 192 a las 16, 20, 26 y 40 semanas de edad, y la de su correspondiente progenie en la semana 26 y 40, al día de edad.

Lote 192										
Vacuna Lohmann										
Reproductoras Pesadas						Progenie del lote 192				
						al día de edad				
Edad lote reproductor	GMT	CV	Mín	Máx	Grupo Elisa	GMT	CV	Mín	Max	Grupo Elisa
16	4140	59,3	999	8661	2					
20	7170	24,9	1000	8661	3					
26	8469	7,7	5788	8661	3	4417	54,5	999	8661	2
40	8129	15,0	3231	8661	3	4088	57,5	1319	8661	2

La seroconversión que se presenta en ambos lotes reproductores pesados en la semana 16, corresponde a la respuesta activa de las aves ante la exposición natural al virus de la anemia infecciosa (Intervet, 2002; Lucio, ca 2000); ya que la vacunación en estos lotes se realizó hasta las 17 semanas de edad, lo cual explica los coeficientes de variación de 117.1 y

59.3% en el lote 191 y 192 respectivamente, además, en el lote 191 de 17 muestras analizadas a las 16 semanas, únicamente 4 fueron positivas (24%), mientras que en el lote 192 a la misma semana, se reportaron 12 muestras positivas (67%).

En el lote 191 a partir de la semana 20 y con tres semanas posvacunación, la respuesta serológica se ubica en el grupo 3 y 2, con coeficientes de variación que van desde 12.8% a las 20 semanas, hasta 40.5 % a las 40 semanas de edad, en donde solo se detectó un suero negativo en las semanas 26 y 40 (3.7%) de 54 sueros analizados. La uniformidad de esta respuesta inmune y los coeficientes de variación bajos, reafirman que los resultados obtenidos son la respuesta de las aves a la vacunación (Tizard, 2004).

Las dos progenies evaluadas de este lote 191 se ubicaron dentro del grupo 1 del ELISA, con coeficientes de variación superiores al 70%. En la progenie de las 26 semanas se detectó un suero negativo, o sea, en esta progenie la seropositividad al día de edad fue de 94%, y en la progenie de las 40 semanas de 67%, ya que se reportaron 6 sueros negativos (33%) al día de edad.

En el lote 192, la GMT de las 16 semanas ubica la respuesta serológica dentro del grupo 2 con un CV de 59.3%. La seropositividad en este lote fue de 67%, ya que solo se reportaron 6 sueros negativos (33%) de las 18 muestras evaluadas. Este resultado fue similar al obtenido en el lote 191 antes de aplicar la vacuna contra el VAIA a la 17 semana de edad. En los siguientes tres muestreos, después de la vacunación, la GMT se ubica dentro del grupo 3 con coeficientes de variación bajos, de 24.9 y 15%, y una seroconversión del 100% durante las semanas del estudio, al igual que en las progenies de este lote reproductor.

Los resultados obtenidos en la progenie de este lote 192, coincide con lo reportado por las casas comerciales de los biológicos (Ríos, 2007; Salen, 2007), sin importar cual haya sido la vía de aplicación de la vacuna en los lotes reproductores. La casa comercial Lohmann asegura que al difundirse el virus vacunal horizontalmente, se permite la reinfección temprana de las aves, lo cual asegura la protección de las parvadas contra un desafío de campo (Lohmann Animal Health, 2005).

Al comparar la respuesta inmune en los lotes reproductores pesados 191 y 192 a las 16 semanas de edad, ambos lotes estuvieron expuestos a un desafío de campo contra el VAIA, como lo indica la GMT y los CV obtenidos en ambos lotes en la semana 16. A partir de semana 20, tres semanas posvacunación, se presenta un incremento en los títulos de anticuerpos y la seroconversión en ambos lotes oscila entre 94 a 100% en las aves

reproductoras y en sus progenies, entre 67 a 100%. Estos resultados difieren con los reportados en el estudio de Cardona et al. (2000), ya que la seroconversión obtenida en los lotes reproductores pesados del presente estudio, es superior, incluso si se compara con la obtenida principalmente en el lote reproductor liviano 2005-2.

3.2 Resultados zootécnicos

La seropositividad contra el VAIA transferida a las progenies principalmente a las pollas de reemplazo al día de edad, puede oscilar entre 30 a 90% dependiendo de la edad de las reproductoras y de la vacuna comercial utilizada (Lohmann Animal Health, 2005; Ramírez, 2005). Si se considera que la inmunidad materna desciende entre la segunda y tercera semana de edad ((McNulty, 2001), las aves pueden quedar desprotegidas contra un eventual desafío de campo, ya que el VAIA se ha extendido por todo el mundo (Girón, 2006). Los parámetros de mortalidad, peso y uniformidad de los lotes, son los principales parámetros que deben de vigilarse ante cualquier proceso infeccioso que sufran las aves, por eso se realizó un seguimiento zootécnico a las progenies de los lotes reproductores livianos 2005-2 y 2005-4, alojados en las granjas Montserrat y Mónica, durante las primeras seis semanas de vida.

3.2.1 Granja Montserrat

Las aves de reemplazo provenientes de los lotes 2005-2 y 2005-4, ingresaron a la granja Montserrat con un peso promedio de 35.73 g, siendo el peso ideal de 36 g al día de edad (Zamora, 2007).

En la Figura 1 se presenta el porcentaje promedio de la mortalidad semanal que se obtuvo en la granja durante las primeras seis semanas, en cada uno de los lotes de reemplazo.

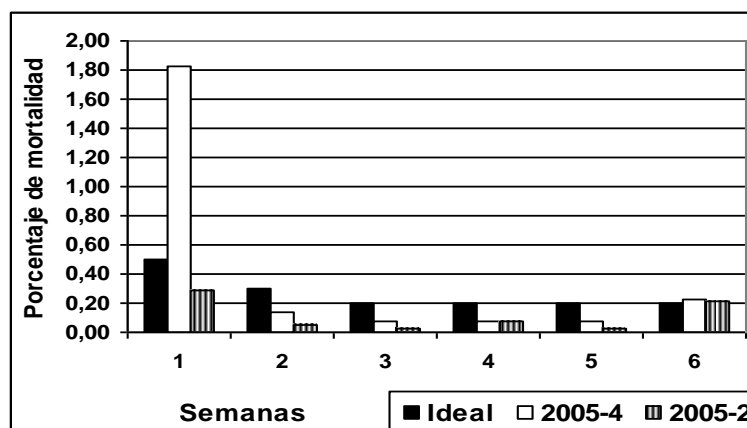


Figura 1. Porcentaje promedio de la mortalidad semanal.

La mortalidad de las aves provenientes del lote 2005-4 durante la primera semana de vida, fue de 1.83 % a causa de un proceso de deshidratación por un error cometido en el manejo de este grupo de aves, mientras que las pollitas descendientes del lote 2005-2, mantuvieron los porcentajes de mortalidad mejores que de los ideales de la línea genética (Isa Brown, 2005), por lo tanto en los dos grupos de aves se descartó la posibilidad de que haya existido un problema clínico o subclínico que causara un incremento en los porcentajes de mortalidad.

En la Figura 2 se presenta el consumo de alimento acumulado por semana en cada lote.

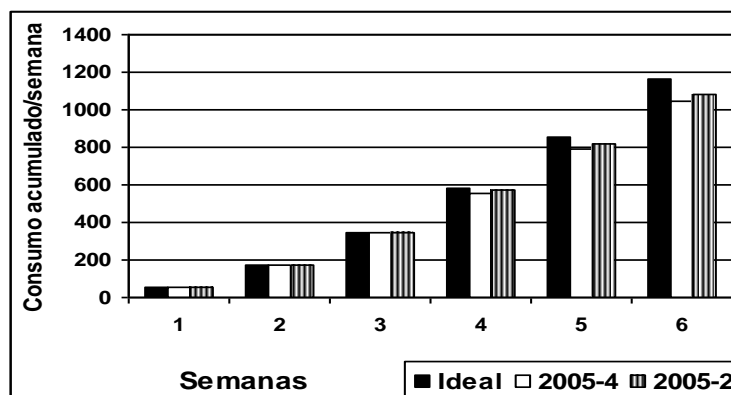


Figura 2. Consumo de alimento acumulado por semana en cada lote.

El consumo de alimento en ambos lotes fue igual al ideal durante la primera semana de edad, mientras que en las siguientes cinco semanas se presentó un consumo inferior al ideal. Al cierre de la sexta semana el lote de pollitas del lote 2005-2 quedó con 85g abajo del estándar y las del lote 2005-4 con 119g., por lo tanto, ambos grupos de aves no alcanzaron los estándares esperados.

En la Figura 3 se presenta la ganancia de peso semanal que se obtuvo en la granja durante las primeras seis semanas.

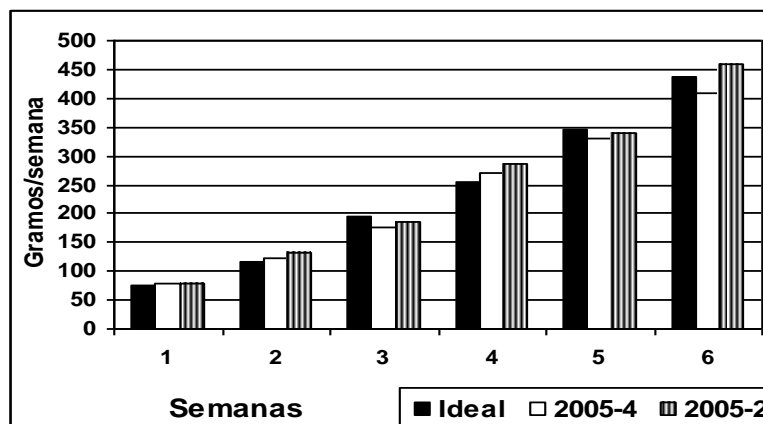


Figura 3. Ganancia de peso semanal para los dos lotes en estudio.

La ganancia de peso en ambos lotes durante las primeras dos semanas de vida fue superior al ideal y en las semanas subsiguientes el peso presentó valores fluctuantes, pero al cierre de la sexta semana el lote 2005-2 estuvo 24.32 g arriba del ideal, mientras que el lote 2005-4 le faltaron 25.85 g para alcanzar el ideal establecido.

La ganancia de peso está directamente relacionada al consumo de alimento que las aves tengan (North, 1990; Vaca, 2003) y ambos lotes presentaron un bajo consumo de alimento a partir de la segunda semana de vida, lo cual se refleja de inmediato en la poca ganancia de peso en la segunda semana. El bajo consumo de alimento en un lote de pollitas de reemplazo puede estar relacionado con la densidad de aves por metro cuadrado, calidad del despique, la temperatura de las galeras y la ventilación de las mismas (North, 1990). En esta granja el bajo consumo se asoció principalmente a las altas temperaturas de la zona de la Guácima.

En la Figura 4 se presenta el porcentaje de uniformidad semanal en las seis primeras semanas de vida.

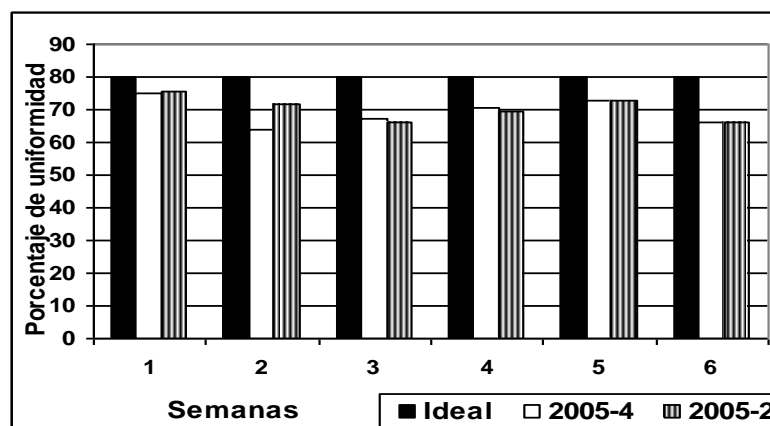


Figura 4. Porcentaje de uniformidad semanal para cada uno de los lotes.

En cuanto a la uniformidad, ambos lotes no lograron superar el ideal de uniformidad (80%) esperados durante las seis semanas del estudio, incluso ambos lotes cerraron a la sexta semana con 10 puntos debajo de lo esperado. La uniformidad de un lote está relacionada con la ganancia de peso y ambos parámetros son los mejores indicadores de que las aves están satisfaciendo sus necesidades corporales (Vaca, 2003).

En la Figura 5 se presenta la conversión alimenticia semanal que se obtuvo en cada uno de los lotes.

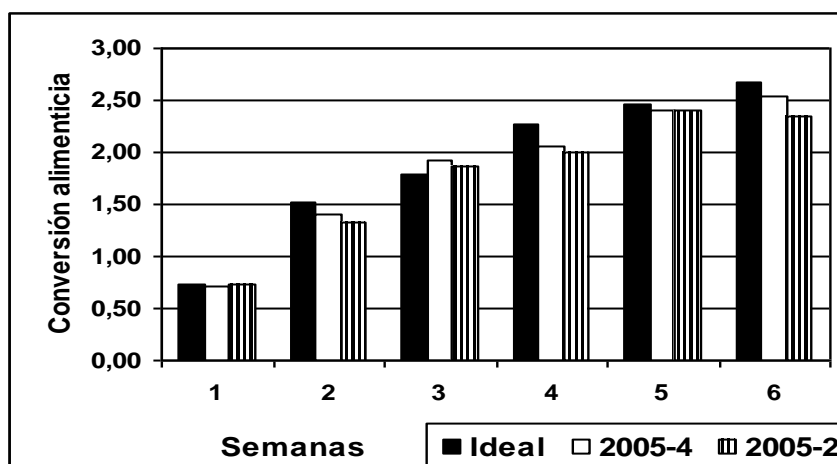


Figura 5. Conversión alimenticia semanal para cada uno de los lotes.

Durante las seis semanas del estudio ambos lotes presentaron conversiones alimenticias inferiores al ideal esperado. La conversión alimenticia representa la relación que existe entre lo que el ave consume de alimento y la ganancia de peso (North, 1990). En el caso de granja Montserrat, las aves de ambos grupos (2005-2 y 2005-4) consumieron menos alimento del esperado, no alcanzaron el peso ideal y por lo tanto, la conversión alimenticia se mantuvo debajo del esperado durante las seis primeras semanas.

3.2.2 Granja Mónica

Las aves de reemplazo provenientes de los lotes 2005-2 y 2005-4, ingresaron a la granja Mónica con un peso promedio de 33.94 g y 39.52 g respectivamente.

En la Figura 6 se presenta la mortalidad semanal que se obtuvo en la granja Mónica

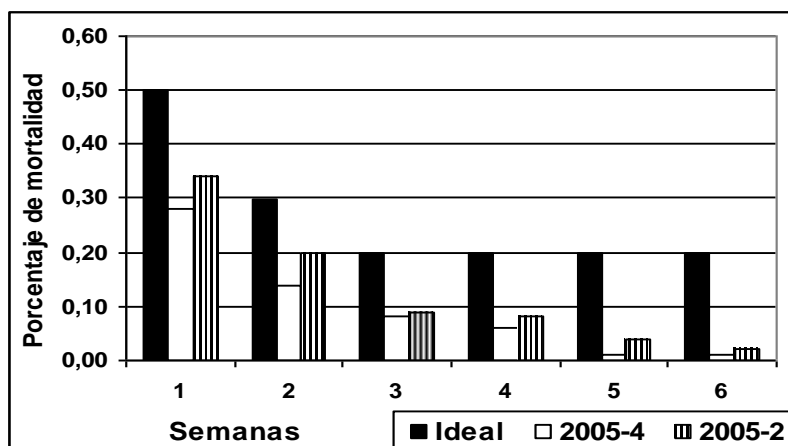


Figura 6. Porcentaje promedio de la mortalidad semanal obtenida en la granja Mónica.

La mortalidad para ambos lotes durante las seis semanas se mantuvo por debajo del esperado. El lote 2005-2 terminó con una mortalidad acumulada a favor de 0.83% y el lote 2005-4 con 1.02%, con respecto al ideal de la línea a las seis semanas. La baja mortalidad en ambos lotes fue el indicador para asegurar que ambos grupos de aves en la granja Mónica, no estuvieron expuestos a ninguna falla en el manejo, problemas asociados a la calidad del alimento o bien, o a un desafío infeccioso (North, 1990; Jordan et al., 2001).

En la Figura 7 se presenta el consumo de alimento acumulado por semanal, en cada uno de los lotes durante las seis semanas.

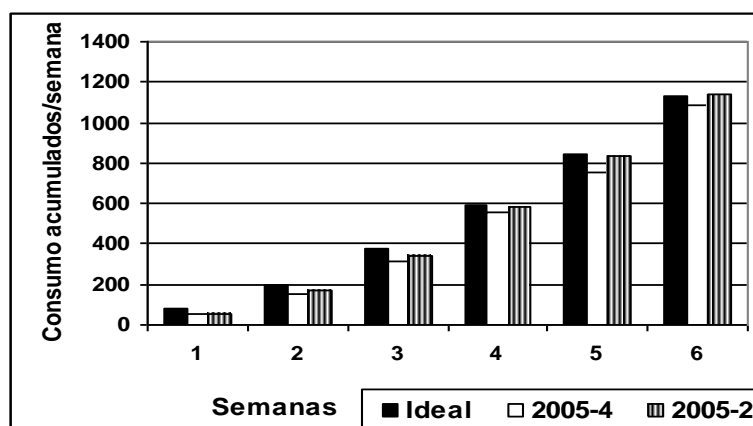


Figura 7. Consumo de alimento acumulado por semana.

Ambos lotes no lograron superar el ideal de consumo semanal durante las primeras cinco semanas. A la sexta semana el lote 2005-4 quedó con un consumo inferior a lo esperado de 50.17g, mientras que el lote 2005-2 tuvo un consumo superior al ideal de 9.8g. En el caso de esta granja el bajo consumo de alimento estuvo asociado al manejo del despique, el cual se realizó a los 10 días de edad. La casa comercial de la Isa Brown, recomienda un único despique de las aves a las 7 u 8 semanas para evitar precisamente el bajo consumo de alimento de las aves y el efecto negativo que este manejo ocasiona sobre el consumo de alimento y por lo tanto, sobre el peso corporal del ave (López, 2007).

En la Figura 8 se presenta la ganancia de peso semanal en cada uno de los lotes.

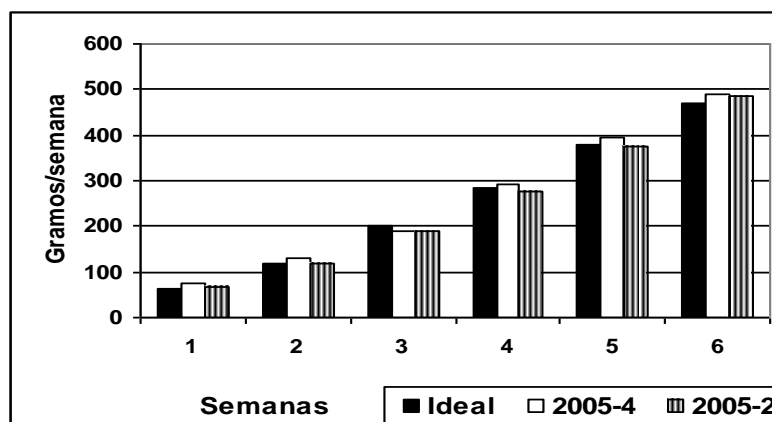


Figura 8. Ganancia de peso semanal para los lotes en estudio.

La ganancia de peso de ambos lotes fue irregular, manteniéndose el lote 2005-4 en las últimas tres semanas arriba del ideal, a pesar de que su consumo de alimento fue inferior al esperado. En la sexta semana este lote cerró con + 17.58 g. y el lote 2005-2 con + 15.99 g, sobre el esperado. La ganancia de peso en ambos grupos de aves fue mejor que el consumo de alimento, lo cual significa que las aves convirtieron bien el alimento consumido.

En la Figura 9 se presenta el porcentaje de uniformidad semanal.

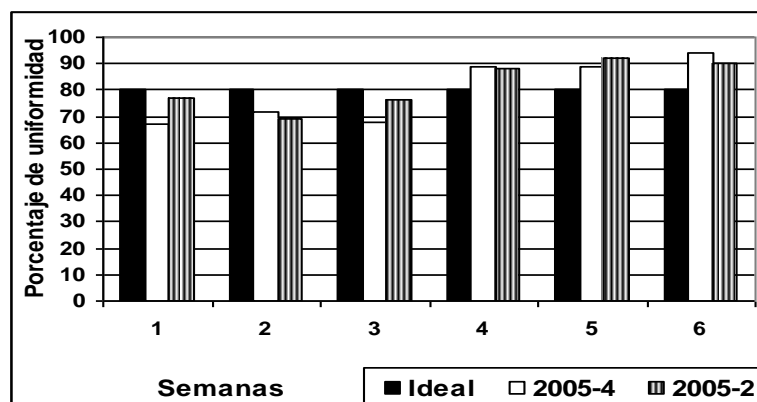


Figura 9. Porcentaje de uniformidad semanal para cada lote evaluado.

En las tres primeras semanas ambos lotes no lograron superar el ideal, sin embargo, a partir de la cuarta semana los dos superan el 80 % de uniformidad. Este resultado es congruente con la ganancia de peso que presentaron las aves principalmente después de la cuarta semana de edad.

En la Figura 10 se presenta la conversión alimenticia semanal que se obtuvo en la granja Mónica.

Los valores de la conversión alimenticia durante las seis semanas fueron inferiores a lo esperado por la línea genética. Este resultado está directamente relacionado con el consumo de alimento y el peso obtenido por las aves semanalmente (North, 1990).

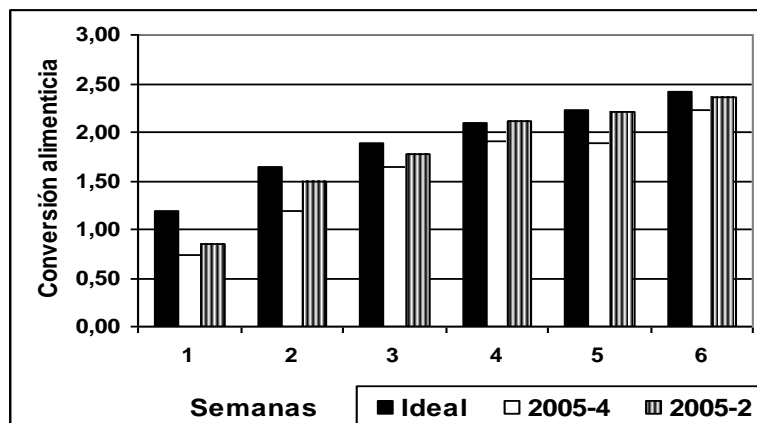


Figura 10. Conversión alimenticia semanal para cada lote.

En términos generales, los resultados zootécnicos que se obtuvieron en las progenies de los lotes reproductores livianos, 2005-2 y 2005-4 durante las primeras seis semanas de vida, fueron muy semejantes. Los parámetros de consumo de alimento, peso, conversión alimenticia y uniformidad, no superaron los ideales de la línea genética por fallas en el manejo de las aves, procesos de deshidratación, despique y altas temperaturas ambientales. Los índices de mortalidad semanal se mantuvieron por debajo de lo esperado a pesar del problema presentado en las aves del lote 2005-4 durante la primera semana de vida en granja Montserrat.

4. CONCLUSIONES

- 4.1 En los cuatro lotes reproductores se evidenció la exposición natural de las aves al VAIA antes de realizarse la vacunación, a las 14 semanas en las reproductoras livianas y a las 17 semanas en las reproductoras pesadas.
- 4.2 En los lotes reproductores livianos 2005-2 y 2005-4, tres semanas después de la vacunación, los porcentajes de seroconversión fueron de 78 a 100% hasta las 40 semanas del estudio.
- 4.3 En los lotes reproductores pesados (191 y 192), la seropositividad tres semanas después de aplicarse la vacuna, fue de 94 a 100%, al igual que en las progenies evaluadas de estos lotes.
- 4.4 La seropositividad detectada en las pollitas de reemplazo del lote 2005-4 con la vacuna de Lohmann al día de edad, fue más alta (79%) que la reportada en la progenie del lote 2005-2 con la vacuna Intervet (65%).
- 4.5 Los títulos medios de anticuerpos inducidos por las vacunas comerciales Intervet y Lohmann en las aves reproductoras livianas y pesadas, se ubicaron dentro de los grupos 1, 2 y 3 para el ensayo comercial de ELISA (IDEXX Laboratories, 2003), por lo que puede concluirse que ambas vacunas indujeron títulos positivos y protectores.
- 4.6 Los títulos medios de la inmunidad transferida tanto a las progenies de reemplazo (pollitas comerciales) como al pollo de engorde, se ubicaron dentro de los grupos de títulos de ELISA 1 y 2, por lo que puede concluirse que fueron títulos de anticuerpos positivos y protectores (IDEXX Laboratories, 2003).
- 4.7 Los títulos medios obtenidos en los lotes reproductores livianos, difieren con los obtenidos en las aves reproductoras pesadas, para ambas vacunas en estudio.
- 4.8 Los resultados zootécnicos de consumo de alimento acumulado por semana, ganancia de peso y el porcentaje de uniformidad para los dos grupos de aves en estudio, tanto en granja Montserrat como en granja Mónica, no alcanzaron los ideales de la línea genética establecidos. Estos resultados se asociaron a un efecto de manejo de las aves y a la temperatura ambiental.

5. RECOMENDACIONES

- 5.1. Realizar un nuevo estudio tanto en las reproductoras pesadas como en las livianas, para verificar nuevamente los resultados obtenidos con ambas vacunas comerciales y dar un seguimiento serológico hasta las 60 semanas de vida.
- 5.2. Verificar los títulos de anticuerpos y el porcentaje de positividad, tanto en las progenies de reemplazo como las de engorde, al menos tres veces al año
- 5.3. Realizar un nuevo estudio serológico en parvadas de engorde evaluando la inmunidad materna y la serología presente en las aves a la edad del beneficio
- 5.4. Las compañías productoras de aves deben de establecer un control periódico para el manejo de los biológicos, de tal forma que aseguren la cadena de frío en el manejo de las vacunas.
- 5.5. Si la vacuna de Intervet para el control de la AIA se aplica vía subcutánea o intramuscular, debe de verificarse siempre la preparación de la misma, antes de ser aplicada a las aves reproductoras.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Avellaneda, G. E., & P. Villegas. 1994. Anemia infecciosa aviar. *Avic. Prof.* 11: 162-164.

Calnek, B.W., B. Lucio-Martines, C. Cardona, R. W. Harris, K.A. Schat, & C. Buscaglia. 2000. Comparative susceptibility of Marek's disease cell lines to chicken infectious anemia virus. *Avian Dis.* 44: 114-124.

Cardona, C., B. Lucio, P. O'Connell, J.jagne, & K. A. Schat. 2000. Humoral immune responses to chicken infectious anemia virus in three strains of chickens in a close flock. *Avian.Dis.* 44: 661-667.

Cardoso, B. 2006. Entrevista con la Dra. Beatriz Cardoso. Gerente de Servicios Técnicos. Lohmann Animal Health International. San Antonio de Belén, Heredia, C.R. May. 26.

Castro, J. 1996. Anemia infecciosa de los pollos, prevención y situación actual. p. 57-60. *In VII Jornada Avícola Nacional.* Mar. 22-23. Aceca, San Antonio de Belén, Heredia, C.R.

De Herdt, P., G. Van den Bosch, R. Ducatelle, E. Uyttebroek, & C. Schrier. 2001. Epidemiology and significance of chicken infectious anemia virus infectious in broilers and broiler parents under nonvaccinated European circumstances. *Avian Dis.* 45: 706-708.

Fernández, C. N. 2006. Enfermedades víricas generalizadas. 2a ed. Real Escuela de Avicultura, España

Girón-Solsona, J. 2006. Enfermedades víricas generalizadas. P.181-185. *In Higiene y patología aviar.* 2ª ed. Real Escuela de Avicultura, Barcelona, España.

Hagood, L. T., T. F. Kelly, J. C. Wright, & F. J. Hoerr. 2000. Evaluation of chicken infectious anemia virus and associated risk factors with disease and production losses in broilers. *Avian Dis.* 44: 803-808.

Hidalgo, H. 1999. Anemia infecciosa de los pollos. *Avic. Prof.* 17: 8-9.

IDEXX, Laboratory.Inc. 2003 Virus de la anemia aviar. [en línea] *Bol.Técnico* 1-4. www.idexx.com (Consulta: 1 jul. 2005).

IDEXX, Laboratory.Inc. 2004. ELISA technical guide. p. 37-39. *In Poultry & livestock catalog and ELISA technical guide.* IDEXX, Maine, U.S.

IDEXX, Laboratory.Inc. 2005. Vigilancia de poblaciones vacunadas mediante la interpretación y análisis de los resultados serológicos (muestreo y tamaño de la muestra) [en línea]. <http://al.idexx.com/produccion/boletin/noticiasmuestreo.jsp> (Consulta: 25 jul. 2005).

IDEXX, Laboratory.Inc. 2006. Kit de test de anticuerpos del virus de anemia en el pollo. IDEXX, Maine, E.E.U.U.

Intervet. ca 1999. Novilis ® CAV P4 [en línea] http://www.Intervet.cl/productos/novilis_cav_p4/020_detalle_de_productos.asp (Consulta: 26 jul. 2005).

Intervet. 2002. Vacuna a virus activo contra la anemia aviar. Intervet, México.

ISA Brawn. 2005. Guía de manejo ponedoras. ISA grupo.

Jordan, F., M. Pattison, D, Alexander & T, Faragher. 2001. *Poultry diseases.* 5th ed. Saunders, London.

- Ledesma, N., T. Fehervari, M. T. Casaubon, E. Lucio, & F. Ratz. 2001. Chicken infectious anemia in México : virus identification and serology survey. *Avian Dis.* 45: 778-796.
- Lohmann Animal Health. 2005. THYMOVAC [en línea] <http://www.lahinternational.com/pdf/brochure-THYMOVAC.pdf>. LohmannAnimalhealth (Consulta 3 nov. 2007).
- López, G. 2007. Entrevista con Dr. Gregorio López. Gerente área de México y Centro América. Isa. Hendrix Genetics Company. Ontario, Canadá. Nov. 01.
- Lucio, B. ca 2000. Efectos de la anemia infecciosa sobre la producción [en línea] IASA, México. [http://www.nutek.com mx/iasa](http://www.nutek.com.mx/iasa) (Consulta: 10 mar. 2005).
- Lozano, F. 2006. Consideraciones en la producción contra el CAV. *Avic. Prof.* 24:12-13.
- Malo, A. 1997. Actualidades en el uso de la vacuna viva atenuada contra la anemia infecciosa de los pollos. p. 197-198. *In XV Congreso Latinoamericano de Avicultura.* Set. 23-26. Quintana Roo, Méx.
- McKenna, G. F., D. Todd, B. J. Borghmans, M. D. Welsh, & B. M. Adair. 2003. Immunopathologic investigations with an attenuated chicken anemia virus in day-old chicken. *Avian Dis.* 47: 1339-1345.
- McNulty, M. S. 2001. Circoviridae. p. 352-355. *In F., Jordan, (ed). Poultry diseases.* Saunders, London.
- Miller, M. M., & K. A. Schat. 2004. Chicken infectious anemia virus: an example of ultimate host- parasite relationship. *Avian Dis.* 48: 734-745.
- Muñoz, R. 1998. Infección subclínica de anemia en la progenie de reproductoras pesadas parcialmente protegidas. p. 98-100. *In XV Congreso Centroamericano y del Caribe de Avicultura.* Nov. 4-6. Intervet, San José, C.R.

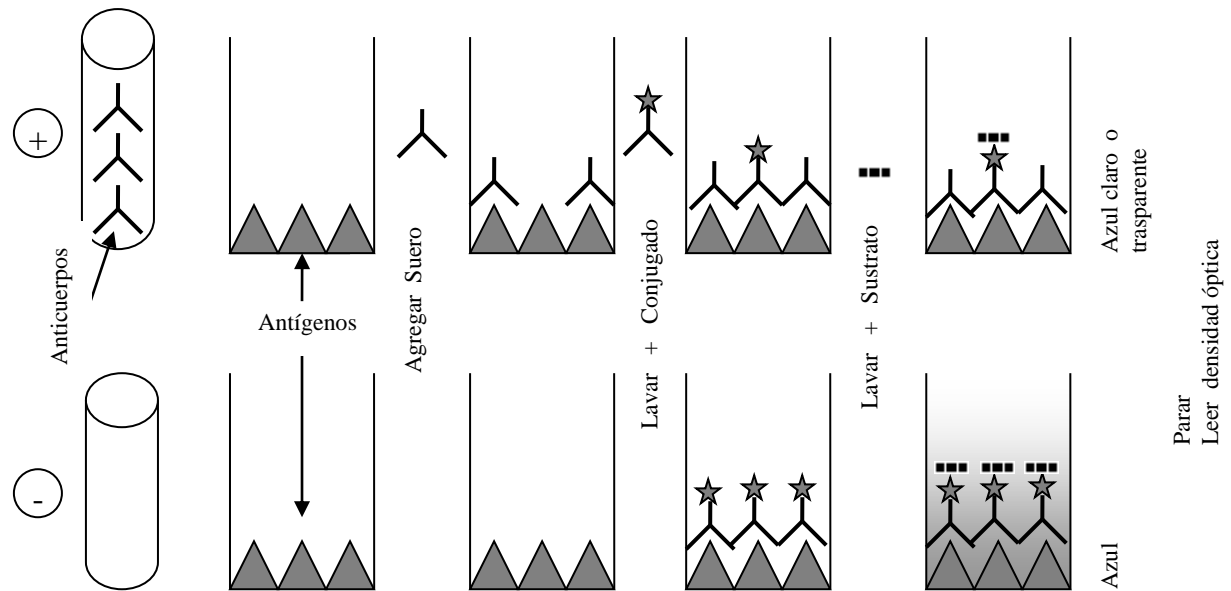
- Muñoz, R. 2007. Entrevista con Dr. Ricardo Muñoz. Médico Veterinario responsable de la asesoría técnica para Latinoamérica. IDEXX. Universidad Nacional, Heredia, C.R. Mar. 19.
- North, M. 1990. Commercial chicken production manual. 4th ed. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Owoade, A. A., D. O. Oluwayelu, O. A. Fagbohun, W. Ammerlaan, M. N. Mulders, & C.P.Muller. 2004. Serologic evidence of chicken infectious anemia in commercial chicken flocks in southwest Nigeria. *Avian Dis.* 48: 202-205.
- Ramírez, M. M. 2004. Técnicas de necropsia : material didáctico. M. Ramírez. Lab de Patología Aviar de la Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional. Heredia, C.R.
- Ramírez, M.M. 2005. Entrevista con Dra. Marcia Ramírez. Encargada de la Cátedra de Patología Aviar de la Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional. Heredia, C.R. Nov.4.
- Ríos, F. 2007. Entrevista con el Dr. Francisco Ríos. Director Técnico para México y Centroamérica. Intervet. San Antonio de Belén, Heredia, C.R. May.10.
- Rosales, A.G. 1998. Inmunosupresión causada por enfermedades virales, estrés, manejo, y nutrición. p. 356-364. *In IX Seminario Internacional de Patología Aviar.* May. 25-29 University of Georgia College of Veterinary Medicine, Georgia. E.E.U.U.
- Rosemberger, J. 1999. Agente de la anemia infecciosa de los pollos (CAA). Vineland Laboratories, New Jersey, E.E.U.U.
- Salem, M. 2007. Entrevista con el Dr. Mariano Salem. Director Técnico para Latinoamérica. Lohmann Animal Health. San Antonio de Belén, Heredia, C.R. Oct.15.

- Shkoda, D. 2004. Chicken infectious anemia in young broiler in Israel [en línea]. *Israel J. Vet. Med.* 59: 78-82. <http://www.isruma.org/article/59-4-4.htm> (Consulta: 20, jun. 2005).
- Spackman, E., S. S. Cloud, C. R. Pope, & J. K. Rosemberger. 2002. Comparison of a putative second serotype of chicken infectious anemia virus with a prototypical isolate I. *Pathogenesis. Avian Dis.* 46: 945-955.
- Tizard, I. 2004. Macrophagos and the later stages of inflammation. p.20. *In Veterinary Immunology*. 7^a.ed. Saunders, Philadelphia.
- Toro, H. 1995. Consideraciones generales y locales sobre anemia infecciosa aviar [en línea]. *Tecno Vet, Chile*. <http://bellota.sisibuchile.cl/tecnovet/CDA/tecnovet-articulo/0,1409,SCID%253D9325%2526ISID%253D428,00.htm> (Consulta: 10 mar. 2005).
- Vaca, L. 2003. *Producción Avícola*. 2a reimpresión. Universidad Estatal A Distancia. C.R.
- Van Santen, V. L., L. LI, F. J. Hoerr, & H. Lauerman. 2001. Genetic characterization of chicken anemia virus from comercial broiler chicken in Alabama. *Avian Dis.* 45: 373-388.
- Van Santen, V. L., K. S. Joiner, C. Murria, N. Petrenko, F.J. Hoerr, & H. Toro. 2004. Patogenesis of chicken anemia virus : comparison of the oral and the intramuscular routes of infection. *Avian Dis.* 48: 494-504.
- Villegas, P. 2001. Control de la enfermedad infecciosa de la bolsa y de la anemia infecciosa aviar [CD-ROM] p. 1-8. *In XVII Congreso Latinoamericano de Avicultura*. Oct. 9-12, Intervet, Guatemala (Consulta: 20 Jun. 2005).
- Yuasa, N. 1993. Chicken anemia agent. p. 169-175. *In* J.B., Ferran, (ed). *Virus infections of birds*. Elsevier, London, U. K.
- Zamora, R. 2007. Entrevista con Dra. Rebeca Zamora. Médica Veterinaria responsable de granja Roble Alto. San José de la Montaña, Heredia, C.R. Abr.16.

7. ANEXO

ANEXO 1

Diagrama de pasos en el ELISA de bloqueo



(IDEXX Laboratories, 2004).