

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

**Estudio serológico y molecular de la enfermedad infecciosa de la  
bolsa de Fabricio (IBDV) en dos lotes de una progenie de  
reproductoras pesadas**

**Modalidad: Tesis de grado**

**Trabajo Final de Graduación para optar por el grado académico  
de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

**Karla Elena Esquivel Rodríguez**

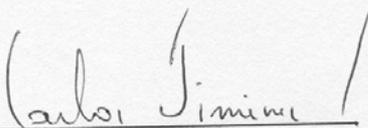
**Campus Presbítero Benjamín Núñez**

**2007**

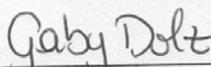
**TRIBUNAL EXAMINADOR**



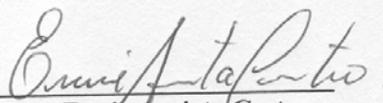
**Msc. María Antonieta Corrales Arroyo**  
**Vice decanato**



**Dr. Carlos Jiménez Sánchez**  
**Director y Tutor**



**Dra. Gaby Dözl Wiedner**  
**Lectora**



**Dra. Ennie Arrieta Castro**  
**Lectora**

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por estar siempre a mi lado apoyándome incondicionalmente, ellos han sido mi fortaleza y mi refugio, han sido mis compañeros de lucha, a ellos les dedico esta tesis con todo mi corazón.

A mis hermanos, que soportaron mis momentos de angustia; siempre estuvieron a mi lado apoyándome y dándome palabras de aliento.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar le doy gracias a Dios, por que sin él no hubiera logrado realizar ésta tesis.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Carlos Jiménez que estuvo siempre a mi lado apoyándome y dándome sus palabras de aliento en aquellos momentos difíciles, sin el este trabajo no hubiera podido realizarse.

A la Dra. Ennie Arrieta y a la Dra. Gaby Dolz por su paciencia y por estar a mi lado incondicionalmente.

A Rocío Cortes y Jorge Prendas un gran agradecimiento por compartir conmigo sus conocimientos y tener la suficiente paciencia durante el tiempo que estuve con ellos en el laboratorio.

A todas aquellas personas que de una u otra forma intervinieron en esta tesis les agradezco con todo el corazón.

## RESUMEN

La presente tesis pretendió contribuir al conocimiento de la dinámica de los anticuerpos maternos en la progenie de dos lotes de reproductoras pesadas ( un lote que se encontraba al inicio de su ciclo de postura y el otro en la etapa intermedia ), así como al entendimiento de la relación entre los niveles de anticuerpos, la vacunación y la infección en condiciones de campo con cepas del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV), mediante la identificación molecular de las cepas presentes empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

Se obtuvo un total de 252 muestras de suero, provenientes de pollos de engorde de la empresa Avícola RICURA: granjas Ay B, los cuales se evaluaron mediante la técnica inmunoenzimática (ELISA) indirecto y neutralización viral. Además, se colectó 20 muestras de bursa, que fueron procesadas mediante (PCR).

Los resultados serológicos obtenidos mediante la técnica inmunoenzimática asociada a enzimas (ELISA) y neutralización revelaron un 100% de seropositividad para los primeros días de muestreo (1,7 días) con un descenso gradual y sostenido hasta alcanzar una seronegatividad de 100% al día 28 para las aves de ambas granjas. Para el día 42 se observa un incremento en los niveles de anticuerpos con ambas técnicas.

El análisis molecular mediante PCR, reveló la presencia del gen VP2 en las muestras de vacuna, cepa variante y en tres “pooles” de muestras de bursa colectadas en el campo.

## **ABSTRACT**

The following work attempts to make a contribution to the knowledge of the dynamics of the maternal antibodies in the progeny of two lots of the broilers breeder flocks ( one of the lots was in the beginning of the cycle while the other in the intermediate stage) as in the understanding of the relationship within the levels of the antibodies, the vaccination and the infection in field conditions with IBDV strains, through the molecular identification and characterization strains using Polymerase Chain Reaction (PCR).

A total of 252 serum samples were obtained broilers from the bird-raising company RICURA: farm A and B, which were evaluated using indirect ELISA technique and viral neutralization. Besides, 20 bursa samples were collected and processed through the PCR technique.

The ELISA and neutralization serologic results revealed a seropositivity of 100% the first days ( day 1 and 7) with a gradual descent until seronegativity of 100% was reached on day 28 for both farms. On day 42 an antibodies increment was observed with both techniques.

The PCR molecular analysis revealed the presence of the VP2 gen on the vaccine, variant strain and three pool of bursa samples.

**INDICE DE ABREVIATURAS**

ARN:	Acido Ribonucleico
BGM-70:	Células de riiión de mono
CO <sub>2</sub> :	Dióxido de carbono
CY:	Coeficiente de variación
CPE:	Efecto citopático
DMEM:	Medio Esencial Mínimo Dulbeco
DMSO:	Dietil Sulfóxido
ELISA:	Inmunoensayo asociado a enzimas
Gmean:	Media geométrica
IBDV:	Virus de la Enfermedad Infecciosa de la bursa de Fabricio (Infectious bursal disease virus)
IBD:	Enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
TCDI <sub>50</sub> :	Dosis infecciosa media en cultivos celulares
VP:	Proteínas virales
NV:	Neutralización viral

## INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT .....	iv
INDICE DE ABREVIATURAS .....	v
INDICE DE CONTENIDOS .....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE CUADROS.....	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Justificación .....	3
1.2.1. Importancia .....	3
1.3. Objetivos .....	5
1.3.1. Objetivo general .....	5
1.3.2. Objetivo específico .....	5
<b>2. MARCO TEORICO.....</b>	<b>6</b>
2.1. Enfermedad infecciosa de la bursa .....	6
2.2. Etiología .....	6
2.3. Signos clínicos.....	7
2.4. Patogénesis .....	8
2.5. Transmisión.....	8
2.6. Diagnóstico.....	8
2.6.1. Diagnóstico Laboratorial.....	8
<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>10</b>
3.1. Lugar de estudio.....	10
3.2. Selección de las aves .....	10
3.3. Recolección de las muestras.....	11
3.3.1. Sangre progenie .....	11

3.3.2. Preparación de los sueros.....	11
3.4. Análisis serológico .....	12
3.4.1. Inmunoensayo asociado a enzimas (ELISA) Biochek .....	12
3.4.2. Neutralización viral .....	12
3.5. Recolecta de bolsas de Fabricio .....	13
3.6. Identificación viral y análisis molecular.....	13
3.6.1. Extracción de ácido ribonucleico (ARN) .....	13
3.6.2. Transcriptasa reversa- PCR para la detección del gen VP2 de IBD.....	14
3.6.3. Mezcla de PCR. ....	14
3.6.4. Electroforesis en gel de agarosa .....	15
3.7. Análisis de resultados .....	15
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
<b>5. DISCUSION.....</b>	<b>22</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>25</b>
<b>7. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>26</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>27</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>33</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Gráfico de títulos promedio de 126 sueros de pollos de engorde en ELISA indirecto <b>Granja A</b> .....	17
<b>Figura 2.</b>	Gráfico de títulos promedio mediante la técnica de Neutralización Viral <b>Granja A</b> .....	18
<b>Figura 3.</b>	Gráfico de títulos promedio de 126 sueros de pollos de engorde en ELISA indirecto <b>Granja B</b> .....	19
<b>Figura 4.</b>	Gráfico de títulos promedio mediante la técnica de Neutralización Viral <b>Granja B</b> .....	20
<b>Figura 5.</b>	Productos del PCR para el gen VP2 del IBDV mostrando amplicones específicos de 262 pares de bases, en A cepa vacunal (Vac) y muestras 2,3 y 7; en B cepa vacunal y variante (Var).....	21

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Ubicación geográfica de las granjas en estudio.....	10
<b>Cuadro 2.</b>	Programa de vacunación de la enfermedad de Gumboro para reproductoras pesadas de la empresa Avícola Nacional .....	11
<b>Cuadro 3.</b>	Secuencia de los primers para amplificar el gen VP2 de IBDV.....	15
<b>Cuadro 4.</b>	Comparativo de parámetros Granja A vs Granja B por prueba de ELISA indirecto .....	33
<b>Cuadro 5.</b>	Comparativo de parámetros Granja A vs Granja B por Neutralización Viral por vacuna .....	33
<b>Cuadro 6.</b>	Comparativo de parámetros Granja A vs Granja B por Neutralización Viral por variante .....	33
<b>Cuadro7.</b>	Granja A ELISA indirecto.....	33
<b>Cuadro8.</b>	NTV Vacuna Granja A .....	33
<b>Cuadro9.</b>	NTV Variante Granja A.....	33
<b>Cuadro 10.</b>	Granja B ELISA .....	33

## INTRODUCCION

### 1.1. Antecedentes

La enfermedad de Gumboro, también conocida como enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio (IBD), se observó por primera vez en granjas de pollos en el año 1957, cerca de la ciudad de Gumboro (de ahí su nombre), en el estado de Delaware, Estados Unidos. El primer informe sobre la enfermedad se publicó en 1962 (Cosgrove, 1962). El primer aislamiento viral fue realizado en huevos embrionados en 1962, lo que permitió posteriormente el desarrollo de vacunas comerciales (Winterfield & Hitchner, 1962).

El agente causal es el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio (IBDV), un Birnavirus, de la familia Birnaviridae (Pringle, 1998). Es un virus desnudo, con simetría icosaédrica (Ozel & Gelberblom, 1985). Su cápside está formada por 32 capsómeros (Murphy et al., 1999) y su genoma está conformado por dos segmentos de ácido ribonucleico (ARN) (Hirai et al., 1974; Nick et al., 1976; Dobos et al., 1979; Jackwood et al., 1982). Existen dos serotipos del virus, los cuales se designan como 1 y 2 (Banda et al., 2001). Ambos son capaces de infectar a pollos, así como a algunas especies de aves domésticas como patos y gansos (McFerran et al., 1980). Sin embargo, solo el serotipo 1 es patógeno para los pollos (Muller et al., 1979) y se caracteriza por infectar un grupo selectivo de células del hospedero (linfocitos B), mientras que el serotipo 2 es menos específico (Elankumaran et al., 2002). Los diferentes aislamientos del virus de la enfermedad de Gumboro se han clasificado de acuerdo a su virulencia en pollos como cepas: de alta virulencia o “calientes”, de mediana virulencia o “suaves” y cepas de baja virulencia, atenuadas o “frías”. Por otra parte, en 1985, Rosenberger y Saif describieron las denominadas *variantes* del virus de la enfermedad de Gumboro, que aunque pertenecen al serotipo 1, son diferentes antigénicamente de las cepas clásicas (Brown et al., 1994; Jackwood & Jackwood, 1994).

La enfermedad tiene carácter agudo, es sumamente contagiosa y causante de inmunosupresión en pollos jóvenes; caracterizada por afectar el tejido linfoide, especialmente la bolsa de Fabricio, donde produce una disminución de las células B que se encuentran en los folículos linfoides (Lasher & Davis, 1997; Kibenge et al., 1988).

La enfermedad de Gumboro es sistémica y conlleva a inflamación de la bolsa de Fabricio, hemorragias en el músculo esquelético, pérdida de peso, diarrea y posteriormente la muerte. Las aves que se infectan durante la primera semana presentan atrofia de bursa, por lo tanto, desarrollan la enfermedad de una forma subclínica, donde se produce una fuerte inmunosupresión (Allen et al., 1972), esto provoca que agentes microbianos que forman parte de la flora microbiana normal de las aves se exacerben como ocurre con *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* y otros, así como fracaso en los sistemas de vacunación (Lukert & Saif, 2003).

La enfermedad de Gumboro ha sido controlada utilizando cepas vacunales atenuadas del virus o propiciando la transferencia de niveles altos de anticuerpos maternos a la progenie, mediante la vacunación con virus vivo atenuado e inactivado en las reproductoras (Tsukamoto et al., 1995; Giambrone & Closser, 1990). El principal problema de la vacunación en pollitos jóvenes con inmunidad pasiva, es determinar la fecha óptima de aplicación del biológico, para que no ocurra la neutralización del virus vacunal. Además, existen otros factores que pueden influir en el éxito de la vacunación, entre los que se mencionan, la aparición de cepas clásicas de alta virulencia, la aparición de cepas variantes, la elección equivocada de cepas vacunales, los niveles poco uniformes de anticuerpos maternos y la mala administración de las vacunas (Tsukamoto et al., 1995; Jackwood & Sommer, 1998).

Durante la década de los años 90 se identificó nuevas variantes antigénicas, que se pueden diferenciar de las cepas clásicas, mediante la técnica de neutralización viral o a través de técnicas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando enzimas de restricción, o bien, con la ayuda de anticuerpos monoclonales, así como también, a través de la secuenciación del genoma (Jackwood & Jackwood, 1997; Banda et al., 2001).

En la actualidad existen muchas técnicas para el diagnóstico serológico de anticuerpos contra IBDV, entre las que podemos mencionar la neutralización viral, (Giambrone et al., 2001) y la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA), ambas facilitan el monitoreo del estado inmunitario en lotes grandes, ayudando a establecer las líneas base para el programa de medicina preventiva en las granjas (Snyder et al., 1988).

La detección de cepas variantes en una región o país tiene aplicaciones prácticas, por cuanto permite orientar adecuadamente la vacunación, considerada como una herramienta clave en el control de la enfermedad (Banda et al., 2001).

## **1.2. Justificación**

### **1.2.1. Importancia**

En Costa Rica la producción de pollos de engorde representa una de las principales actividades del sector pecuario. Su importancia se explica por un lado, por el destacado lugar que ocupan las carnes blancas en la dieta de los costarricenses, por otro, al constante avance en las áreas de genética, nutrición y manejo, que implementan las empresas privadas y que se traduce en un muy buen nivel tecnológico de las granjas y por último, a la aplicación de medidas de bioseguridad e inmunoprofilaxis, que garantizan un producto de excelente calidad.

El IBDV es de gran importancia económica para la industria avícola, ya que puede provocar mortalidad elevada en aves de más de tres semanas de edad e inmunosupresión acompañada de una mayor susceptibilidad a infecciones secundarias en las aves afectadas (McIlroy et al., 1989; Banda et al., 2001).

En un estudio previo realizado en nuestro país, Jiménez (2001) procesó un total de 435 muestras individuales de bursas procedentes de aves de 9 empresas avícolas, se logrando identificar mediante la técnica de ELISA de captura, 85 muestras positivas (19.84%) al IBDV. La caracterización antigénica, mediante anticuerpos monoclonales, reveló 7 cepas clásicas y 77 cepas variantes tipo Delaware 1. En 354 muestras (80.16%) no se determinó la presencia de antígenos del Birnavirus. Las muestras positivas provenían de 5 (55.55%) empresas de las 9 participantes. En un estudio realizado por Jackwood y Jackwood (1994) se resaltó la importancia de los estudios moleculares que permiten clasificar a los virus presentes en aves de campo en diferentes grupos moleculares. En otra publicación (Jackwood y Sommer, 1998) dos cepas originarias de Costa Rica fueron clasificadas como variantes tipo Delaware 1. Mediante la secuenciación del gen viral VP2, es posible construir árboles filogenéticos que indican las relaciones existentes entre las cepas obtenidas en el campo y las cepas vacunales (Sapats e Ignjatovic, 2001), con lo cual se pueden orientar los programas de

inmunoprofilaxis. A la fecha no se ha realizado la caracterización molecular de las cepas de IBDV identificadas en Costa Rica y se desconoce por lo tanto su relación con las cepas vacunales.

Considerando lo anterior la presente tesis pretende contribuir al conocimiento de la dinámica de los anticuerpos maternos en la progenie de dos lotes de reproductoras pesadas (un lote que se encuentra al inicio de su ciclo de postura y el otro en la etapa intermedia) así como en el entendimiento de la relación entre los niveles de anticuerpos, la vacunación y la infección en condiciones de campo con cepas de IBDV, mediante la identificación molecular del gen VP2 empleando PCR.

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. General**

Determinar mediante ELISA y neutralización viral la presencia de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Gumboro (cepas clásicas y variantes) en la progenie de dos lotes de reproductoras pesadas y realizar la identificación molecular de las cepas virales asociadas a infecciones de campo.

#### **1.3.2. Específicos**

1. Establecer la dinámica del título de anticuerpos en la progenie de dos lotes de reproductoras pesadas mediante un ELISA indirecto que utiliza el antígeno viral D-78.
2. Determinar la dinámica de los anticuerpos neutralizantes en la progenie de dos lotes de reproductoras pesadas mediante la técnica de neutralización viral (VN) empleando como antígenos la cepa vacunal (Lukert) y una cepa variante aislada en Costa Rica en el año 2004.
3. Identificar molecularmente, mediante PCR, el gen VP2 del IBDV, en la cepa vacunal y una cepa variante aislada en el campo en Costa Rica.
4. Identificar molecularmente, mediante PCR el gen VP2, en cepas de IBDV circulantes actualmente en las progenes de reproductoras pesadas.

## **2. Marco Teórico**

### **2.1. Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio o enfermedad de Gumboro**

Es una enfermedad causada por un virus ARN (Hirai et al., 1974; Nick et al., 1976; Dobos et al., 1979; Jackwood et al., 1982) que presenta una distribución cosmopolita, provocando grandes pérdidas económicas (McIlroy et al., 1989; Banda et al., 2001). La severidad de los signos clínicos depende de la edad y tipo de ave, cepa viral, presencia de anticuerpos neutralizantes y de los programas de vacunación (Lukert & Saif, 2003). La enfermedad puede presentarse de forma clínica o subclínica. Su transmisión puede ser tanto directa como indirecta (Lukert & Saif, 2003). Actualmente existen gran variedad de técnicas diagnósticas para el virus de IBDV, éstas se basan en la detección de anticuerpos y antígenos virales (Jackwood & Jackwood, 1997; Banda et al., 2001).

### **2.2. Etiología**

El Birnavirus presenta una cápside icosaédrica constituida por 32 capsómeros (Ozel & Gelberblom, 1985), carece de envoltura, su diámetro varía de 55-65 nm y su genoma está conformado por dos segmentos de ácido ribonucleico ARN (A y B), (Hirai et al., 1974; Nick et al., 1976; Dobos et al., 1979; Jackwood et al., 1982) el cual codifica para cinco proteínas virales (VP1, VP2, VP3, VP4 y VP5) (Lukert & Saif, 2003). La cápside del virus se encuentra conformada por las proteínas VP2 y VP3 (Müller & Becht, 1982; Azad et al., 1985; Hudson et al., 1986; Kigenbe et al., 1997). La VP2 constituye la cápside externa y es blanco de los anticuerpos neutralizantes, sintetizados por el ave infectada o vacunada; mientras que la VP3 constituye la cápside interna y actúa en conjunto con la proteína VP1 (Lukert & Saif, 2003).

Existen dos serotipos del virus (Banda et al., 2001; Mc Ferran et al., 1980). El serotipo 1 es patogénico para pollos mientras que el serotipo 2 no lo es (Müller et al., 1979). Dentro del serotipo 1 se han identificado seis subtipos antigénicos (Sharma et al., 1989; Brown & Grieve, 1992). La evidencia clínica sugiere que el serotipo 1 clásico de IBDV predominó en todo el mundo hasta la época de los 80s (Brown & Grieve, 1992). En el año 1985 empezaron a surgir variantes del virus en la península de Delmarva, Estados Unidos, incrementado la mortalidad en parvadas vacunadas, estas nuevas cepas americanas son antigénicamente diferentes de las cepas clásicas (Snyder et al., 1988). Estas cepas variantes se diferencian de

las cepas clásicas del serotipo 1, debido a que producen una rápida atrofia de la bursa, pero con mínima inflamación. Las vacunas preparadas para las cepas clásicas no dan protección contra las cepas variantes (Lukert & Saif, 2003).

### **2.3. Signos Clínicos**

La enfermedad infecciosa de la bursa se presenta de dos formas. La primera es la enfermedad clínica en pollos susceptibles normalmente entre tres a siete semanas de edad. Las variantes más virulentas se han asociado con edema de la bursa de Fabricio que presenta un exudado gelatinoso más o menos entre los tres a cinco días después de la infección pudiendo llegar a hemorrágico (Lukert & Saif, 2003). La hipertrofia inicial de la bursa es seguida por una atrofia a los siete días después de la infección lo que resulta en una depresión de los linfocitos B, las aves infectadas son más susceptibles a infecciones por *E. coli* (Lukert & Saif, 2003). Por otro lado, existen variantes antigénicas del virus menos patógenas que son capaces de provocar una leve respuesta inflamatoria, sin atrofia de bursa (Sharma et al., 1989; Lasher & Davis, 1997).

En la forma clínica de la enfermedad, la morbilidad puede alcanzar niveles cercanos al 100%. La mortalidad puede ir del 0% hasta más del 50% con algunas cepas altamente virulentas del virus (Van den Berg & Meulemans, 1991).

Su inicio es repentino. Entre los signos visibles se pueden describir: falta de coordinación, diarrea acuosa, plumas anales sucias, picoteo del ano e inflamación de la zona cloacal. Además, se ha descrito deshidratación, postración, temblores, plumas erizadas y depresión (Lukert & Saif, 2003).

La segunda y más importante presentación de la enfermedad, es la forma subclínica, que generalmente ocurre en aves de uno a diez días de edad y cuya principal consecuencia es la inmunosupresión (Allen et al., 1972), en donde se observa inflamación inicial de la bursa y posteriormente se presenta rápidamente la atrofia de la misma (Allen et al., 1972; McIlroy et al., 1989, McIlroy et al., 1992; Sharma et al., 1989). La inmunosupresión se manifiesta con aumento en la incidencia de infecciones secundarias, niveles de anticuerpos inferiores a los esperados, atrofia de los órganos linfoides, reducción del número de linfocitos circulantes, reducción de la respuesta de transformación de linfocitos y reducción de la producción de linfocinas (Tizard, 2000). Debido a que el virus interfiere con la maduración de los linfocitos

B, deja a las aves muy susceptibles a gran variedad de agentes infecciosos como bacterias, observándose un aumento en dichas infecciones hacia la cuarta y quinta semana de edad; los efectos de la infección subclínica dependen de las prácticas de vacunación así como de la calidad del alimento, de la virulencia de la cepa y de la edad en que ocurre la infección (Tsukamoto et al., 1995; Jackwood & Sommer, 1998).

#### **2.4. Patogénesis**

El virus se replica en el citoplasma de los macrófagos y células linfoides asociadas al intestino del pollo, a partir de los cuales penetra a la circulación portal dando lugar a la viremia primaria (Lukert & Saif, 2003). El período de incubación es muy breve y los signos clínicos de la enfermedad se manifiestan dos a tres días después de la exposición al virus, pudiendo evidenciar las características histológicas de la infección en la bursa de Fabricio en un plazo de 24 horas (Müller et al., 1979). En la bursa de Fabricio se observa la presencia de células infectadas con el virus hacia las once horas después de la exposición oral con el mismo (Lukert & Saif, 2003).

#### **2.5. Transmisión**

La transmisión o diseminación de la enfermedad infecciosa de la bursa puede ser de forma directa o indirecta; la transmisión directa es a través del contacto ave-ave y la ingestión oral. Mientras que la transmisión indirecta se da a través de alimentos, agua, polvo de camas y ropas contaminadas o también por transmisión mecánica a través de insectos como el *Alphitobius diaperinus* (Lukert & Saif, 2003) debido, principalmente, a la tenacidad del virus que le permite persistir en el medio ambiente.

#### **2.6. Diagnóstico**

El diagnóstico de las infecciones con el virus de la enfermedad de Gumboro puede realizarse presuntivamente fundamentado en los hallazgos clínicos, anátomo-patológicos y epidemiológicos, sin embargo, se requiere de la ayuda del laboratorio para su confirmación.

##### **2.6.1. Diagnóstico laboratorial**

En cuanto al diagnóstico en laboratorio, se describen dos tipos de procedimientos (OIE,

2002):

- *Identificando el agente*
  - ✓ Aislamiento del virus: inoculación en huevo embrionado; sistemas de cultivos celulares (fibroblastos de embrión de pollo o células BGM-70) o animales vivos.
  - ✓ Detección del antígeno viral mediante inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa o ELISA de captura.
  - ✓ Detección del genoma viral en tejidos de animales infectados mediante amplificación enzimática (PCR) convencional y en tiempo real.
- *Pruebas serológicas*
  - ✓ ELISA
  - ✓ Neutralización viral

En la actualidad el procedimiento de inmunoensayo con enzimas asociadas (ELISA), es la prueba serológica empleada con mayor frecuencia para la evaluación de anticuerpos contra IBDV (Giambone et al., 2001). El establecimiento de perfiles serológicos tanto para las reproductoras como para su progenie a través de ELISA se puede llevar a cabo a partir de muestras de sueros (Giambone & Closser, 1990). Esta técnica posee la ventaja de ser rápida y adaptable a sistemas de computación que facilitan la interpretación de resultados (Snyder et al., 1988). El seguimiento serológico de los anticuerpos en lotes reproductores o su progenie indica el grado de inmunidad y proporciona información para el desarrollo de programas de inmunización apropiados (Tsukamoto et al., 1995; Giambone & Closser, 1990).

Durante la década de los años 90 se identificaron nuevas variantes antigénicas, que se pueden diferenciar de las cepas clásicas, mediante la técnica de neutralización viral o a través de técnicas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando enzimas de restricción, o bien, con la ayuda de anticuerpos monoclonales, así como también a través de la secuenciación del genoma (Jackwood & Jackwood, 1997; Banda et al., 2001).

La detección de cepas variantes en una región o país tiene aplicaciones prácticas, por cuanto permite orientar adecuadamente la vacunación, considerada como una herramienta clave en el control de la enfermedad (Banda et al., 2001).

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Lugar de estudio

El presente estudio se realizó en aves de la empresa **AVÍCOLA RICURA**, la cual evalúa constantemente sus parvadas y se encuentra en la mejor disposición de apoyar trabajos de investigación. Las muestras procesadas fueron recolectadas por médicos veterinarios de la empresa.

#### 3.2. Selección de las aves

La población estuvo constituida por dos lotes progenie de reproductoras pesadas. El lote 72, ubicado en la granja La Estación y el lote 78 ubicado en la granja La Candela (cuadro 1). Ambos lotes son de la raza Cobb x Cobb. Las aves provenían de madres que estaban iniciando el ciclo de postura (lote 78), las cuales poseían títulos altos de anticuerpos (Promedio geométrico en ELISA de 29.175) y de madres que se encontraban al final del ciclo de postura (lote 72), las cuales presentaban títulos medios de anticuerpos (Promedio geométrico en ELISA de 9.773)<sup>1</sup>. El programa de vacunación contra el IBDV de las reproductoras se presenta en el cuadro 2. Los pollos de engorde recibieron una sola vacuna anti IBDV, la cual se administró en aerosol a los 14 días de edad (Bursine-2<sup>®</sup>, Laboratorios FORT-DODGE, USA).

**Cuadro 1.** Ubicación geográfica de las granjas.

<b>Granja</b>	<b>Identificación cuadrícula</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>	<b>Altitud</b>	<b>Ubicación</b>
La Estación # 354	1201	9.95704	84,35791	521	Atenas, Río Grande
La Candela # 381	1204	9,99242	84,20897	928	Alajuela, El Coco

#### 3.3. Recolección de muestras

<sup>1</sup> Comunicación personal, Dra. Ennie Arrieta, Jefe Sanidad Animal, AVÍCOLA RICURA.

### **3.3.1. Sangre de la progenie**

El período de sangrado abarca desde el día 1 hasta el día 42 de edad, se realizó un muestreo cada semana (1, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días). Las muestras de sangre se tomaron de 140 aves (20 aves por día de sangrado) del lote 72 y 140 del lote 78. Se utilizó viales (Eppendorf, 1.5 ml), jeringas de 3 ml, agujas de 1" x 18", hielera y bolsas refrigerantes. La punción se realizó a nivel cardíaco y en la vena cutánea ulnar (Cambell, 1995). La sangre se depositó en los viales Eppendorf, los cuales se ubicaron en una hielera con refrigerantes y posteriormente se transportaron al Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional. Se utilizaron solo 18 sueros de los 20 recolectados, con el fin de maximizar el uso del kit de la casa comercial (Biochek, 2006).

### **3.3.2. Preparación de los sueros**

Una vez en el laboratorio, se procedió a separar los sueros mediante centrifugación (Eppendorf Fit) por 5 minutos a 12000 revoluciones por minuto. El suero se almacenó en tubos Eppendorf a -20°C hasta su análisis. Previo al procesamiento de las muestras, se procedió a descongelarlas y posteriormente, se dejaron a temperatura ambiente por 20 minutos.

### **3.4. Análisis serológico**

Se llevó a cabo mediante dos pruebas serológicas: ELISA indirecto y neutralización viral.

#### **3.4.1. Inmunoensayo asociado a enzimas (ELISA) de BIOCHEK**

Los sueros fueron procesados mediante la técnica de ELISA, empleando el ensayo comercial Biochek, siguiendo las instrucciones del fabricante (Biochek, 2006). Esta prueba utiliza el antígeno viral D-78.

La lectura de los resultados se realizó en un espectrofotómetro Multiskan II y el cálculo de los títulos geométricos promedios (Gmean) y de los coeficientes de variación (CV), así como los reportes de los mismos fueron elaborados con el programa de cómputo por el fabricante (Biochek, 2006).

### **3.4.2. Neutralización viral (NV)**

Se llevó a cabo según la técnica descrita por Villegas (2000) en placas de microtítulo. Como antígeno se utilizó una cepa clásica vacunal (cepa Lukert) y una cepa de campo aislada en un estudio realizado anteriormente (Lindhahl, 2004). Ambos antígenos se emplearon a razón de 100TCDI<sub>50</sub>. El suero fue inactivado por 30 minutos a 56°C y posteriormente se realizaron diluciones en medio de cultivo celular y en logaritmo de base 2, en volúmenes de 50  $\mu$ l. Seguidamente se agregó el antígeno, también en volúmenes de 50  $\mu$ l, se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se adicionó 100  $\mu$ l de una suspensión de células de riñón de mono BGM-70 (Tsai y Saif, 1992). Finalmente las microplacas fueron llevadas a incubación a 37°C por 5 días en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. La lectura se realizó mediante observación microscópica. Se incluyeron controles de sueros positivos y negativos, antígeno y células.

Para la interpretación de la prueba de NV se observó la presencia de efecto citopático (CPE) en los diferentes pocillos de cada microplaca. Se revisó los sueros controles positivo y negativo, los pocillos de control de células y los de control de citotoxicidad de los sueros problema y luego se procedió a la lectura de los pocillos correspondientes a cada dilución sérica. El título se expresó como el inverso de aquella dilución a la cual se inhibió la presentación del CPE.

### **3.5. Recolecta de bolsas de Fabricio**

Se recolectó un total de 30 muestras de bursa, 18 días después de la vacunación, aproximadamente a los 30 días de edad del lote en estudio. El material fue depositado en tubos cónicos conteniendo 5-6 ml de Medio Esencial Mínimo Dulbecco (DMEM), mantenido a una temperatura de 4°C, para ser transportado al Laboratorio de Virología, donde se almacenó congelado a -70°C hasta su estudio mediante PCR.

### **3.6. Identificación viral y análisis molecular**

La identificación viral en tejido bursal se realizó mediante una modificación de la técnica de reacción en cadena por la polimerasa (PCR) descrita por Moscoso (2001) tal y

como se describe en el apartado 3.6.2. La identificación molecular del gen VP2 también incluyó a la cepa vacunal y una variante aislada previamente (Lindhal, 2004).

### **3.6.1. Extracción de ácido ribonucleico (ARN)**

El ARN se extrajo de todas las muestras de bolsa de Fabricio recolectadas y de las dos cepas virales empleadas en NV. Primero se procedió a clasificar las muestras de acuerdo a lote y edad de recolección, para posteriormente realizar pools de las mismas (cada tubo contenía entre 3-5 bursas). Se preparó 8 pools de muestras de bursa, más la cepa vacunal y la cepa de campo aislada en un estudio anterior; resultando en un total de 10 muestras a procesar.

Con fin de obtener el ARN viral, el tejido bursal fue expuesto a una solución conteniendo 1% de SDS y proteinasa K (10 mg/ml), en viales Eppendorf de 1.5 ml. Esta mezcla se agitó en el vortex y se incubó por 45 minutos a 60°C. Posteriormente, se centrifugó el preparado y a 250 ul del sobrenadante se agregó 750 ul de Trizol LS frío (Gibco BRL # 10296-028), se agitó en el vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se agregó 200 ul de cloroformo frío y se agitó en el vortex. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se procedió a centrifugar a 12.000 r.p.m. a 4°C durante 15 minutos. La fase superior acuosa se transfirió a un tubo limpio conteniendo 5 ul de acarreador (Polyacril carrier, MRC # PC 152) y el ARN se precipitó con 500 ul alcohol isopropílico, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, se centrifugó a 12.000 r.p.m. a 4°C por 10 minutos y el sobrenadante se decantó. El precipitado conteniendo el ARN se lavó con 1 ml de etanol frío al 75 %, se incubó a temperatura ambiente durante 2-4 minutos, luego se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos. Finalmente, el ARN se resuspendió en 25 ul de DMSO al 90% en agua bidestilada tratada con dietilpirocarbonato (0.1% diethyl pirocarbonate, Sigma) y se conservó a -70°C hasta su análisis.

### **3.6.2. Transcriptasa reversa -PCR para la detección del gen VP2 de IBDV**

Se amplificó el gen VP2 del IBDV empleando primers específicos (Cuadro 3). A cada tubo de PCR conteniendo 5 ul de ARN extraído se añadió 1 ul de Primer F (20 pmol/ul) para el VP2 y 5 ul de agua libre de ARNasas (dH<sub>2</sub>O). El ARN se desnaturalizó al colocarlo a 98°C

5 minutos; y se mantuvo en hielo hasta realizar la retrotranscripción. Para la misma se preparó una mezcla que cada tubo contenía 4 ul de 5x buffer pH 8.3 (Fermentas), 2 ul dNTP mix a 10 mMol (Fermentas), 0.5 ul de inhibidor de ribonucleasas (Fermentas) y 1.5 ul de dH<sub>2</sub>O (Fermentas). Este se incubó a 37°C por 5 minutos, se le añadió 1 ul de enzima retrotranscriptasa (Fermentas RevertAid MMul V 200 U/ul). La reacción se realizó en el termociclador (Perkin Elmer GENE Amp PCR System 2400) con las siguientes temperaturas: 50°C 60 minutos, 95°C 5 minutos y 4°C por tiempo indefinido. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su posterior análisis.

### 3.6.3. Mezcla de PCR

A la mezcla para PCR: 25 ul Mmix (Master Mix, Promega), 0.5 ul Primer (20 pmol/ul) y 19.5 ul de dH<sub>2</sub>O; se le agregó 5 ul de la muestra de cADN del paso anterior. La reacción se realizó en un termociclador (Perkin Elmer GENE Amp PCR System 2400) y el ciclo fue 94°C por 30 segundos, 50°C 30 segundos, 70°C 60 segundos, que se repitió 35 veces, luego una extensión final a 70°C por 7 minutos y 4°C por tiempo indefinido

### 3.6.4 Electroforesis en gel de agarosa

Para el análisis de los productos de PCR se prepararon geles de agarosa al 2% (0.6 g en 30 ml buffer TBE 1%) más 1ul Bromuro de Etidio (Et Br) y se colocó 10 ul de muestra del producto de PCR y 3 ul de tampón de muestra. La separación se realizó a 80V por 30-45 minutos. Las bandas de productos (262 bp) se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con una cámara Polaroid.

### Cuadro 3. Secuencia de los primers para amplificar el gen VP2 de IBDV

Primer F	GAT GTR AYT GGC TGG GTT ATC TC-3`	Y= C/T
Primer R	GTR ACR ATC ACA CTG TTC TCA GC-3`	R= A/G

Fuente: Villegas P., 2000.

### 3.7. Análisis de los resultados

Para el estudio realizado por la prueba de ELISA indirecto, se consideró el coeficiente de variación (CV) y el título geométrico medio (Gmean). El coeficiente de variación es la expresión estadística del rango entre el mayor y el menor de los títulos, expresado como porcentaje del título promedio, es un indicador de la dispersión de los títulos y por ende de la uniformidad de la respuesta inmune humoral.

$$\% \text{ CV} = \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Valor promedio Título}} \times 100$$

Los niveles de títulos se expresaron por el título geométrico promedio (Gmean), el cual indica la intensidad de la respuesta serológica y es la mejor representación del título de la parvada (Quesada, 2000). Los resultados de la neutralización viral fueron analizados considerando el promedio de las muestras examinadas por día, así como el Gmean y la desviación estándar.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con una cámara Polaroid. Las bandas obtenidas se confrontaron con marcadores de peso molecular de 100 a 1400 pares de bases (Fermentas®) considerando específicos aquellos productos de 262 pares de bases.

## **RESULTADOS**

La presente tesis pretendió contribuir al conocimiento de la dinámica de los anticuerpos maternos en la progenie de dos lotes de reproductoras pesadas así como en el entendimiento de la relación entre los niveles de anticuerpos, la vacunación y la infección en condiciones de campo con cepas de IBDV, mediante la identificación molecular del gen VP2 empleando PCR. Se obtuvo un total de 252 muestras de suero, provenientes de pollos de engorde de la empresa Avícola RICURA: granja la Estación (A) y granja la Candela (B), los cuales se evaluaron mediante la técnica de ELISA indirecto y neutralización viral. Además, se colectó 10 muestras de bursa, que fueron procesadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del gen VP2.

### **Granja La Estación (A)**

Se evaluó 126 muestras de suero recolectadas cada 7 días a partir del día primero de edad (1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 días).

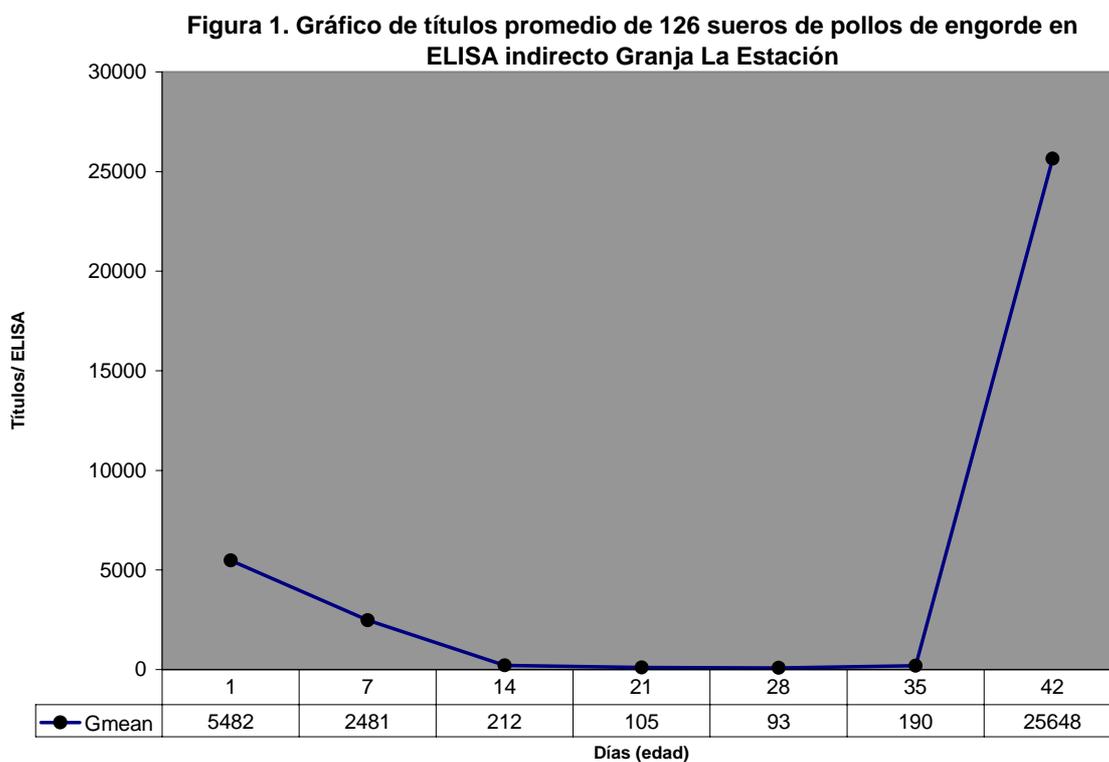
#### **ELISA**

Los dos primeros muestreos realizados el día 1 y el día 7 de edad revelaron una seropositividad de un 100% en el título de anticuerpos maternos contra el virus de la enfermedad infecciosa de la bursa de Fabricio (IBDV) utilizando la técnica de ELISA indirecto. El título promedio al día 1 fue de 5931 y la media geométrica (gmean) fue de 5482 (Figura 1).

Al día 7 de edad se produce un descenso en el título de anticuerpos pero manteniéndose dentro del rango de positivos. Se obtuvo un título promedio de 2787 y un gmean de 2481, con un coeficiente de variación de 49 (Figura 1).

El día 14 de edad se produce una drástica caída en los títulos; encontrándose un 33% de muestras positivas, un 44% de muestras negativas y un 22% de sospechosas. El título medio obtenido es de 354, con una media geométrica de 212, lo cual hace que el coeficiente de variación para esta fecha sea relativamente alto, demostrando una no uniformidad en el título de anticuerpos (Figura 1).

Los resultados obtenidos durante los días 21 y 28 de edad muestran títulos inferiores a la línea de corte que coinciden con un 100 % de negatividad. El título promedio para el día 21 es de 116 y el gmean es de 105, con un coeficiente de variación de 50. El día 28 se obtuvo un promedio de 114 en el título de anticuerpos y un gmean de 93, con un coeficiente de variación de 74 (Figura 1). El día 35 se determinó un 72% de las muestras negativas, pero empieza a observarse un ascenso en la curva de anticuerpos, un 22% de las muestras son positivas y un 6% corresponde a muestras sospechosas. Finalmente, al día 42 se observa nuevamente una seropositividad de un 100%, que posiblemente refleja la respuesta a la vacuna aplicada a los 14 días de edad.

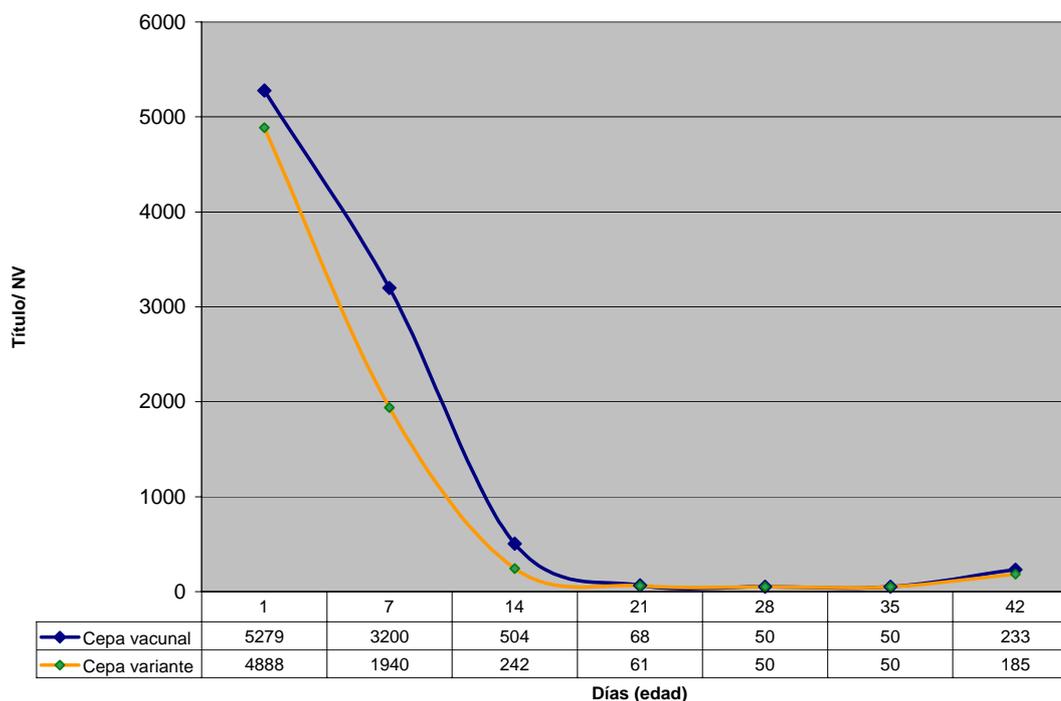


### Neutralización Viral

Mediante la técnica de neutralización para los dos primeros muestreos se obtuvo títulos altos pero por debajo de los obtenidos mediante el ELISA, la media geométrica

(gmean) para el día 1 fue de 5279, utilizando la cepa vacunal y 4887 para la cepa variante (Figura 2). Para el día 7 se obtuvo un título promedio de 4222, el gmean fue de 3200 para la vacuna y un título promedio de 2978 y un gmean de 1940 para la variante. (Figura 2). A los 14 días los anticuerpos descienden paulatinamente observándose para la cepa vacunal un promedio de título de 636 y un gmean de 504, mientras que para la cepa variante se observó un promedio de 330 con una media geométrica de 242. A los 21 días los sueros reflejan un promedio de 78 y un gmean de 68 frente al antígeno vacunal, mientras que para la variante se obtuvo un promedio de 67 con un gmean de 61. Para los días 28 y 35 días se obtiene un título inferior a 100 (Figura 2). A los 42 días se observa un incremento en el título de anticuerpos neutralizantes con un valor promedio de 372 y una media geométrica de 233 para la cepa vacunal y para la cepa variante un título promedio de 380 con una media de 185 (Figura 2).

**Figura 2. Gráfico de títulos promedio mediante la técnica de Neutralización viral Granja La Estación**

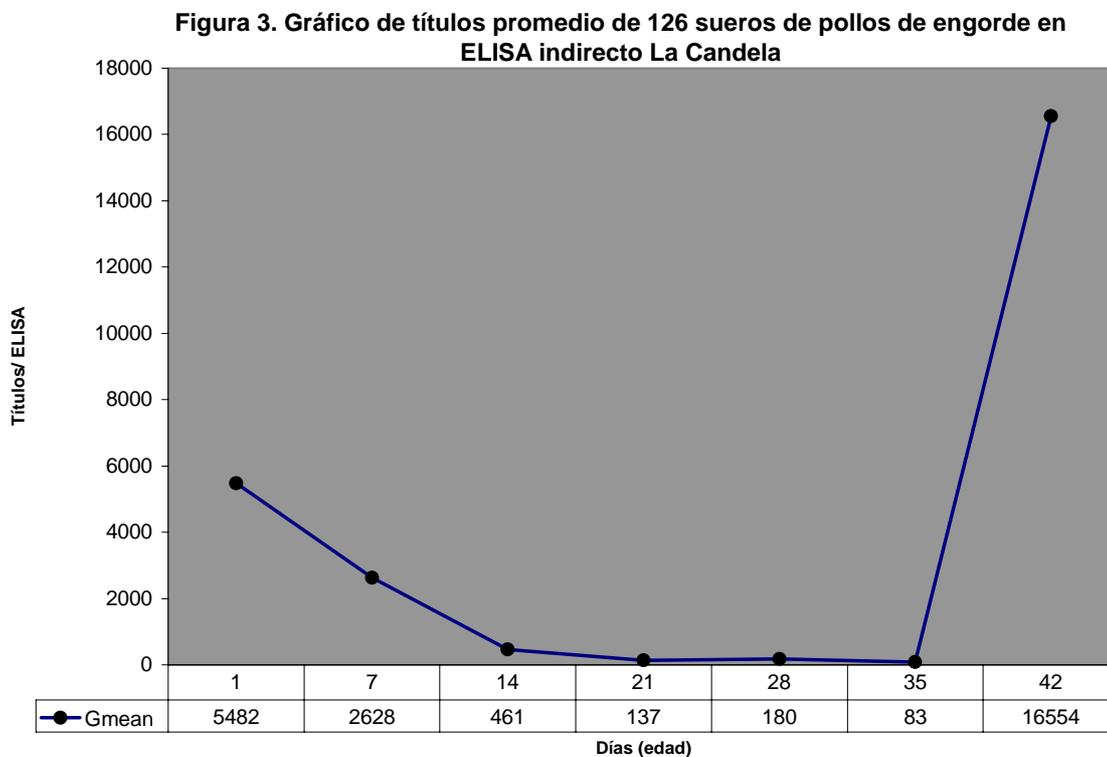


### Granja La Candela (B)

Se evaluó 126 muestras de suero recolectadas cada 7 días a partir del primer día de edad (1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 días).

#### ELISA

Los resultados de los dos primeros muestreos indicaron una seropositividad del 100%. Al día 1 de edad se obtuvo un promedio de 9570 en el título de anticuerpos maternos contra IBDV y un gmean de 5482 con un coeficiente de variación de 37 (Figura 3). A los siete días se obtuvo un promedio de título de 3173 con una media geométrica (gmean) de 2628 y un coeficiente de variación (CV) de un 74%. Al día 14, se observó un 66% de positividad, un 22% de negatividad y un 11% correspondió a muestras sospechosas. El título promedio fue de 553, con un gmean de 461 y un CV de 64% (Figura 3). Para el día 21 se observó que la mayoría de las muestras son negativas (83%) mientras que el restante 17% correspondió a muestras sospechosas. El promedio del título fue de 156, el gmean de 137 y el CV de un 51% (Figura 3).

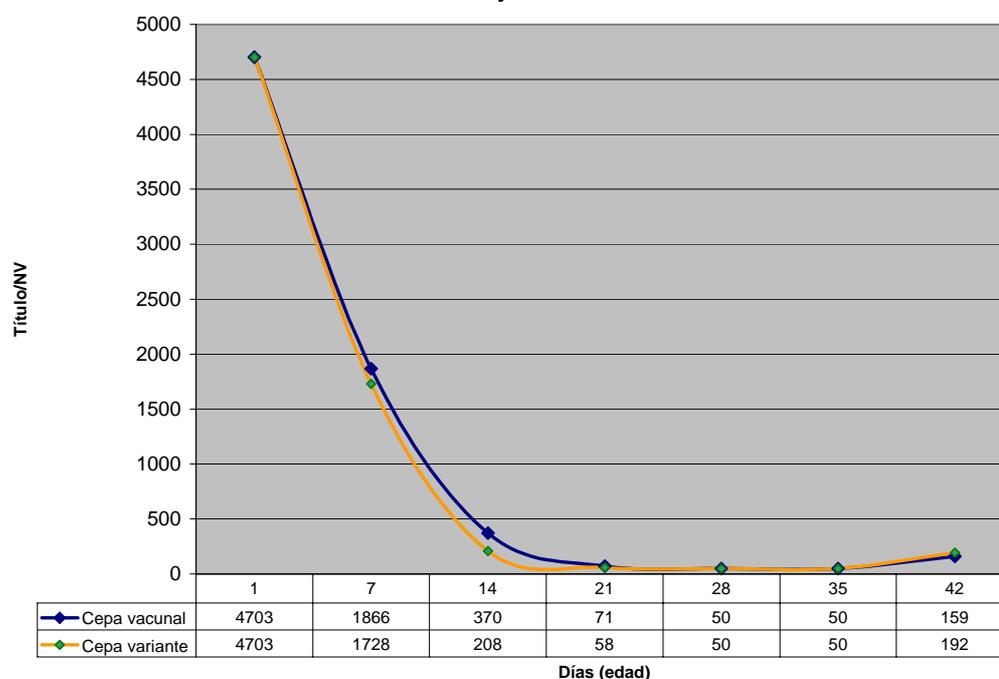


Los días 28 y 35 días reflejan un seronegatividad del 95%. El promedio del título obtenido para el día 28 fue de 206, el gmean de 180 y el CV de 56. Mientras que al día 35 el promedio fue de 96, la media geométrica de 83 y el CV de 83%. Al día 42 la curva de anticuerpos vuelve ascender alcanzando una seropositividad del 100%, lo cual posiblemente refleja la respuesta a la vacuna aplicada a los 14 días de edad. El título promedio para esa edad fue de 17095, con una gmean de 16554 y un coeficiente de variación de 24 (Figura 3).

### Neutralización viral

Para el día 1 de edad se obtuvo un título promedio de 5511 y una media geométrica (gmean) de 4703 para la cepa vacunal mientras que para la cepa variante se obtuvo un promedio del título de 5955 y gmean de 4703, es decir muy similar a los resultados de la cepa vacunal (Figura 4). Al día 7 se observó un promedio del título de 2356 y 1866 de gmean contra la cepa vacunal, mientras que para la cepa variante los valores fueron un título promedio de 2000 y una gmean de 1728.

**Figura 4. Gráfico de títulos promedio mediante la técnica de neutralización viral Granja La Candela**



Al día 14 el título promedio frente a la vacuna fue de 370 en tanto que frente a la cepa variante el título fue de 208 (Figura 4). A los 28 y 35 días no se detectó presencia de anticuerpos neutralizantes. Finalmente al día 42 se observó la presencia de anticuerpos neutralizantes pero con un título relativamente bajos para ambas cepas (Figura 4).

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Del total de muestras evaluadas mediante la técnica de PCR, solo 5 dieron positivas (vacuna, variante y las muestras 2, 3 y 7) en las cuales se constató la amplificación del gen VP2 con un amplicón de 262 pares de bases (Figura 5).

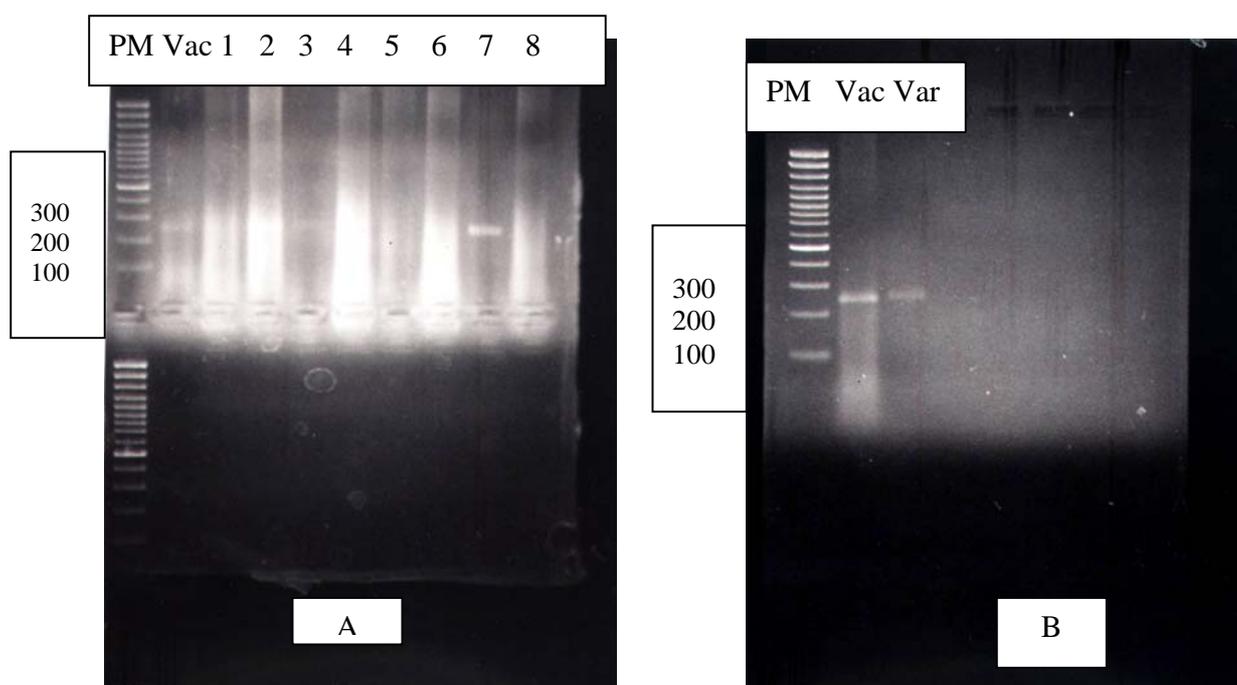


Figura 5. Productos del PCR para el gen VP2 del IBDV mostrando amplicones específicos de 262 pares de bases, en A cepa vacunal (Vac) y muestras 2, 3 y 7; en B cepa vacunal y variante (Var).

## DISCUSION

El monitoreo de la situación del virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio a nivel de granjas proporciona información que puede usarse para perfeccionar y adoptar los programas de control y prevención con el fin de minimizar el impacto económico de la enfermedad.

Los resultados obtenidos mediante las técnicas ELISA y neutralización viral en pollos de ambas granjas (La Candela y La Estación) mostraron un comportamiento muy similar en la curva de anticuerpos maternos, iniciando con títulos altos el primer día de edad (títulos por encima 1:4500), los cuales descienden paulatinamente y constatándose a los 28-35 días de edad, una ventana de susceptibilidad a la infección con el virus de la enfermedad de Gumboro. En estudios experimentales se ha demostrado que, una vez que los títulos caen por debajo de 1:100 mediante la técnica de neutralización viral, los pollitos son 100% susceptibles a la infección y los títulos de 1:100 a 1:600 dan una protección de alrededor de un 40% (Lukert & Saif, 2003).

La curva de anticuerpos maternos que se obtuvo a través de ambas pruebas (ELISA y NT) revela que no existen grandes diferencias en las aves progenie a pesar de encontrarse las madres en distintas etapas del período de postura (una iniciando la etapa de postura y la otra finalizando), lo cual se contrapone a lo observado por Malay et al. (1998), quien señala que la concentración de anticuerpos en las aves progenie es directamente proporcional al título de anticuerpos de las madres.

Mediante la prueba serológica de neutralización viral, utilizando dos cepas de IBDV distintas (una vacunal y una cepa variante de campo aislada en Costa Rica en un estudio anterior), se observó diferencias mínimas e insignificativas en los sueros analizados, lo cual

puede atribuirse en parte al uso de la vacuna cuádruple (Breedervac PLUS<sup>®</sup>) en las madres, biológico que contiene cepas IBDV “Standard” y variantes GLS, Delaware A y E. Esto hace que los pollitos presenten una inmunidad pasiva contra cepas clásicas y las variantes conocidas del virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio.

La diferencia más marcada entre los resultados de ambas pruebas serológicas se presenta a los 42 días de edad, donde los títulos de anticuerpos muestran un ligero aumento (títulos 1: 150) mediante la técnica de NV, mientras que mediante la técnica de ELISA se logra obtener títulos por encima de 1:16000. Esto se puede deber a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero y a la susceptibilidad de la prueba de captar los anticuerpos neutralizantes del virus. Es importante tener presente que la técnica de ELISA detecta anticuerpos contra todos los antígenos del virus, mientras que la prueba de neutralización viral solo anticuerpos neutralizantes contra VP2. También puede deberse a la forma de aplicar la vacuna en las aves, a los 14 días de edad en forma de aerosol (gota gruesa), lo cual eventualmente podría demorar la aparición de anticuerpos neutralizantes. Es importante realizar estudios en un futuro para evaluar la forma de aplicación de la vacuna en función a la eficiencia de la misma.

En general, los resultados obtenidos muestran semejanza con los publicados por Alam et al. (2002) y revelan una respuesta inmune humoral post-vacunación satisfactoria en pollos de engorde aplicando la vacuna entre los 14 y los 21 días de edad, lo cual se atribuye a un mayor descenso de la barrera inmunológica, es decir que a medida que disminuye el nivel de inmunidad pasiva, se favorece un aumento en la respuesta serológica a la vacunación y logrando obtener un pico en el título de anticuerpos.

Mediante la técnica de PCR se determinó la presencia del gen VP2 en la cepa de campo (variante), la cepa vacunal (Bursine 2) y tres muestras de campo (pooles), lo cual indica la presencia del virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio. Del total de 30 muestras de bolsas recolectadas solo 12 resultaron positivas, representando un 40% de la muestra original. Es importante realizar investigaciones en un futuro para determinar si las cepas presentes son variantes, para que eventualmente se vacunen los pollitos contra las mismas.

## **CONCLUSIONES**

1. Se determinó que no existe diferencia en el título de anticuerpos maternos mediante la técnica de ELISA en ambas granjas a pesar de que las aves se encontraban en distintas etapas de postura.
2. Mediante la técnica de neutralización viral no se logró una diferencia significativa entre ambas cepas utilizadas (cepa vacunal y cepa variante) en el título de anticuerpos maternos.
3. Se ratifica que el descenso gradual de los anticuerpos maternos están en gran dependencia del título de anticuerpos al nacer y del tiempo transcurrido desde el nacimiento de las aves.
4. Se determinó que el día 14 es el día más adecuado para vacunar contra la enfermedad de infecciosa de la bolsa de Fabricio.
5. Se comprobó la presencia del gen VP2 en la cepa vacunal, la cepa de campo aislada y tres muestras de pooles de bursas, lo cual indica la presencia del virus en las granjas en estudio.

## RECOMENDACIONES

- Investigar la respuesta inmunológica mediante la técnica de neutralización viral en función de la ruta aplicación de la vacuna.
- Secuenciar el gen VP2 para poder establecer las relaciones entre cepas de las cepas de campo y la cepa vacunal, para determinar el grado de protección.
- Analizar el impacto de las infecciones a nivel de campo (sintomatología) en broiler.
- Si se establecieran diferencias considerar incluir variantes en vacunas de pollos.

### Bibliografía

- Ahmed, Z. & S. Akhter. 2003. Role of maternal antibodies in protection against infectious bursal disease in commercial broilers. *Int. J. of Poultry Science*. 2: 251-255.
- Alam, J., M. M. Rahman, B. K. Sil, M. S. R. Khan, Giasuddin & M. S. K. Sarker. 2002. Effect of maternally derived antibody on vaccination against infectious bursal disease (Gumboro) with live vaccine in broiler. *Int. Journal of Poultry Science* 1:98-101.
- Allen W. H., J. T. Faragher, & G. A. Cullen. 1972. Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease. *Vet Rec*. 31: 511-512.
- Azad, A. A., Barrett, S. A. & Fahey, K. J. 1985. The characterization and molecular cloning of the double stranded dsRNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus. *Virology*. 13, 35-44.
- Banda, A., P. Villegas, E. El-Attrache, & C. Estévez. 2001. Molecular characterization of seven field isolates of infectious bursal disease virus obtained from commercial broiler chickens. *Avian Dis*. 45: 620-630.
- Biochek Laboratorio. 2006. Infectious Bursal Disease Antibody Test Kit: ELISA. [en línea]. Biochek laboratorio, Gouda, Holanda. <http://www.Biochek.com>. (consulta: 20 enero 2006).
- Brown, B. S. & Grieve, D. 1992. The antigenic and pathogenic diversity of the IBD virus. *World poult*. 8 (7), 41.
- Brown, M. D., Green, P., & Skinner, M. A. 1994. VP2 sequences of recent European “very virulent” isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of “classical” strain. *J. Gen. Virol*. 75, 403-410.

- Cambell, T. W. 1995. Avian Hematology. Avian Hematology and Cytology, 2da ed. Iowa Status University Press, Iowa.
- Cao-Yongchang, Bi-YingZuo, Zhu-Jimei, Y. C. Cao, Y. Z. Bi & J. M. Zhu. 1995. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of immunological efficiency of chicks against IBD. Chinese J. Vet. Med., 21: 9-10.
- Cosgrove, A. S. 1962. An apparently new disease of chickens avian nephrosis. Avian Dis. 6:385-389.
- Dobos, P., Hill, B. J., Hallet, R., Kells, D. T., Betch, H., & Teninges, D. 1979. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double stranded RNA genomes. J. Virol. 32, 593-605.
- Elankumaran, S., R. A. Heckert, & L. Moura. 2002. Pathogenesis and tissue distribution of a variant strain of infectious bursal disease virus in commercial broiler chickens. Avian Dis. 46:169-176.
- Giambrone, J. J., & J. Closser. 1990. Efficacy of live vaccines against serologic subtypes of infectious bursal disease virus. Avian Dis. 34: 7-11.
- Giambrone, J. J., T. Dormitorio, & T. Brown. 2001. Safety and efficacy of in ovo administration of infectious bursal disease viral vaccines. Avian Dis. 45: 144-148.
- Grieve, D. 1992. Medición de la inmunidad. Páginas 1-18 en III Seminario Latinoamericano de Sanidad Avícola. Solvay. Colombia.
- Hirai, K. Shimakura, S., Kaeamoto, E., Taguchi, F., Kim, S. T., & Chang, C. N. 1974. The immunodepressive effect of infectious bursal disease virus in chickens. Avian Dis. 18, 50-57.

- Haddad, E.E., Whitfill, C.E.; Avakian, A. P.; Rick, C. A.; Andrews, P.D.; Thoma, J.A. & Wakenell, P.S. 1997. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Dis.* 41:882-889.
- Jackwood, D. J., & S. E. Sommer. 1998. Genetic heterogeneity in the VP2 gene of infectious disease viruses detected in commercial reared chickens. *Avian Dis.* 42: 321-329.
- Jackwood, D. J., & R. J. Jackwood. 1994. Infectious bursal disease viruses: molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype 1 viruses. *Avian Dis.* 38: 531-537.
- Jackwood, D.J., & R. J. Jackwood. 1997. Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. *Avian Dis.* 41: 97-104.
- Jackwood, D. J., Saif, Y. M., & Hughes, J. H. 1982. Characteristic and serologic studies of two serotypes of infectious bursal diseases virus in turkey. *Avian Dis.* 26,871-882.
- Jiménez, C. 2001. Bursitis Infecciosa Aviar: características y detección de variantes en Costa Rica. *Rev. Inv. Vet.* 1: 79-81.
- Kigenbe, F. S. B., A. S. Dhillon, & R. G. Russell. 1988. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* 69: 1757-1775.
- Kigenbe, F. S. B., Qian, B., Cleghorn, J. R., & Martin, C. K. 1997. Infectious bursal disease virus polyprotein processing does not involve cellular proteases. *Arch. Virol.* 142, 2401-2419.
- Lasher, H. N., & V. S. Davis. 1997. History of infectious bursal disease in the U.S.A. The first two decades. *Avian Dis.* 41: 11-19.
- Lindahl, J. 2004. Infectious Bronchitis Virus and Infectious Bursal Disease Virus; a study performed at the Universidad Nacional of Costa Rica. Degree project. Swedish University, Alemania.

- Lukert, P. D., & Y. M. Saif. 2003. Infectious Bursal Disease. Pages 161-179 IN: Disease of Poultry. 11<sup>th</sup>. M. J. Barnes and J. R. Glisson. Mosby-Wolfe.
- Malay Mitra, H. M. Bhattacharyya, R. Duttagupta, A. K. Pramanik, G. P. Sen & M. Mitra. 1998. Studies on maternally derived antibody level of different viral diseases in broilers. *Indian Vet. J.*, 75: 495-497.
- McFerran, J.B., M. S. McFerran, E. R. Mckillop, & T. J. Conner. 1980. Isolation and serological studies with infectious bursal disease virus from fowl, turkey and ducks: demonstration of a second serotype. *Avian Pathol.*, 9: 384-392.
- Mcllroy, S. G., E. A. Goodall, & R. M. McCracken. 1989. Economic effects of subclinical infectious bursal diseases on broiler production. *Avian Pathology*, 18: 465-480.
- Mcllroy, S., E. Goodall; D. Bruce; R. Mc Cracken & Mc Nulty. 1992. The cost benefit of vaccinating broiler flocks against subclinical infectious bursal disease. *Avian Pathol.* 21: 65-76.
- Moscoso, H. 2001. IBDV RT-PCR [en línea]. Molecular Diagnostic Lab. University of Georgia. <http://hmoscoso@uga.edu>. (consulta: 03 marzo 2006).
- Muller, H., C. Scholtissek, & H. Becht. 1979. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J. Virol.* 31: 584-589.
- Müller, H., & H. Becht. 1982. Biosynthesis of virus-specific proteins in cell infected with infectious bursal disease virus and signification as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *J. Virol.* 44, 384-392.
- Murphy, F. A. E. P. J. Gibbs, M. K. Horzinek & M. J. Studdert. *Veterinary Virology*. 3er Edition. 1999. Academic Press.

- Ozel, M., & H. Gelberblom. 1985. Capside symmetry of viruses of the proposed birnavirus group. *Arch. Virol.* 84: 149-161.
- Pringle, C.R. 1998. The universal system of virus taxonomy of the International Committee on Virus Taxonomy (ICTV), including new proposals ratified since publication of sixth ICTV report in 1995. *Arch. Virol.* 194: 203-210.
- Quesada, H.G. 2004. Determinación de los principales agentes infecciosos que pueden ocasionar problemas clínicos respiratorios en ponedoras comerciales en etapa de levante. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional, Costa Rica.
- Sapats S. and J Ignjatovic. 2001. Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolates in Australia. *Arch. Virol* 145: 773-785
- Sharma, J. M., J. E. Dohms, & A. L. Metz. 1989. Comparative pathogenesis of serotype I and variant serotype I isolates of infectious bursal disease virus pathogen free on chickens. *Avian Dis.* 33:112-124.
- Snyder, D. B., D. B. Lana, P. K. Savage, F. S. Yancey, S. A. Mengel, & W. W. Marquard. 1988. Differentiation of bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies. Evidence of major antigenic shift in recent field isolates. *Avian Dis.* 32: 535-539.
- Tizard, I. R. 2000. *Veterinary Immunology: an introduction*. 6<sup>th</sup> ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Tsai H. J; Saif Y. M. 1992. Effect of cell-culture passage on the pathogenicity and immunogenicity of two variant strains of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* Apr-Jun; 36 (2): 412-22.

- Tsukamoto, K., N. Tanimura, S. I. Kakita, K. Ota, M. Mase, K. Imai, & H. Hihara. 1995. Efficacy of three live vaccines against highly virulent infectious bursal disease virus in chickens with or without maternal antibodies. *Avian Dis.* 39: 218-229.
- Van Den Berg, T. P. & G. Meulemans. 1991. Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with the live vaccination. *Avian Pathol.*, 20:409-421.
- Van den Berg, A. J., & G. Meulemans. 1991. Acute infectious bursal disease in poultry: Isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Pathol.* 20:133-143.
- Villegas, P. 2000. Laboratory Manual. Avian Virus Diseases. AVMD 8050, University of Georgia. Pág. 259-263.
- Winterfield. R. W. & S. B. Hitchner. 1962. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am. J. Vet. Res.* 23:1273-1277

## ANEXOS

COMPARATIVO DE PARAMETROS GRANJAS LA ESTACIÓN VS LA CANDELA POR PRUEBA ELISA INDIRECTO

DÍA GRANJA	1		7		14		21		28		35		42	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
PROMEDIO	5931	9570	2787	3173	354	553	116	156	114	206	1058	96	25670	17095
GMEAN	5482	5482	2481	2628	212	461	105	137	93	180	190	83	25648	16554
DESV EST	2248	3810	1360	2297	310	353	58	80	84	115	2486	63	4868	4150
CV %	38	37	49	74	86	64	50	51	74	56	235	83	19	24

A La Estación

B La Candela

COMPARATIVO DE PARAMETROS GRANJAS LA ESTACIÓN VS LA CANDELA POR NEUTRALIZACIÓN VIRAL POR VACUNA

DÍA GRANJA	1		7		14		21		28		35		42	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
PROMEDIO	5867	5511	4222	2356	636	589	78	78	50	50	50	50	372	194
GMEAN	5279	4703	3200	1866	504	370	68	71	50	50	50	50	233	159
DESV EST	2955	3210	3555	1746	420	532	49	39	0	0	0	0	399	125

A La Estación

B La Candela

COMPARATIVO DE PARAMETROS GRANJAS LA ESTACIÓN VS LA CANDELA POR NEUTRALIZACIÓN VIRAL POR VARIANTE

DÍA GRANJA	1		7		14		21		28		35		42	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
PROMEDIO	6222	5956	2978	2000	331	264	67	64	50	50	50	50	381	233
GMEAN	4888	4703	1940	1728	242	208	61	58	50	50	50	50	185	192
DESV EST	4103	4136	3050	1036	420	190	49	38	0	0	0	0	399	132

A La Estación

B La Candela

La estación ELISA

DÍA GRANJA	1	7	14	21	28	35	42
PROMEDIO	5931	2787	354	116	114	1058	25670
GMEAN	5482	2481	212	105	93	190	25648
DESV EST	2248	1360	310	58	84	2486	4868
CV %	38	49	86	50	74	235	19

NTV VACUNA ESTACION

DÍA GRANJA	1	7	14	21	28	35	42
PROMEDIO	5867	4222	636	78	50	50	372
GMEAN	5279	3200	504	68	50	50	233
DESV EST	2955	3555	420	49	0	0	399

NTV VARIANTE ESTACION

DÍA GRANJA	1	7	14	21	28	35	42
PROMEDIO	6222	2978	331	67	50	50	381
GMEAN	4888	1940	242	61	50	50	185
DESV EST	4103	3050	420	49	0	0	399