



**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

**Facultad de Ciencias Veterinarias**

**Instituto de Patología Animal**

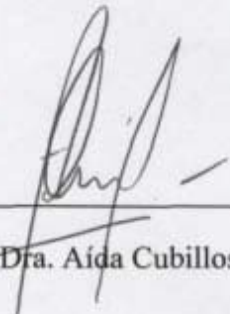
**Aislamiento, estudio de patogenicidad, serotipificación y estudio de protección  
de aislados nacionales del virus de la Bursitis infecciosa Aviar**

**Tesis de Grado presentada como parte de los  
requisitos para optar al grado de LICENCIADO EN  
MEDICINA VETERINARIA**

**Patricio Ernesto Salazar Chávez**

**Valdivia Chile 1997**

PROFESOR PATROCINANTE:



---

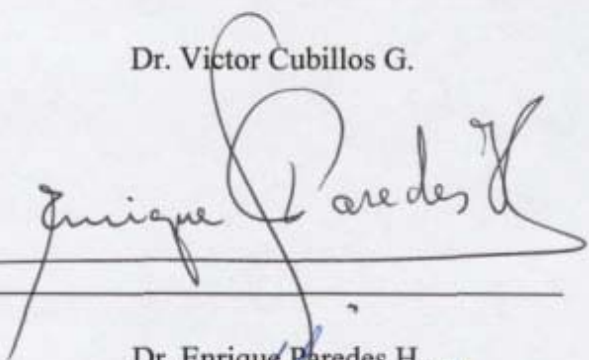
Dra. Aída Cubillos G.

PROFESOR COLABORADOR:

---

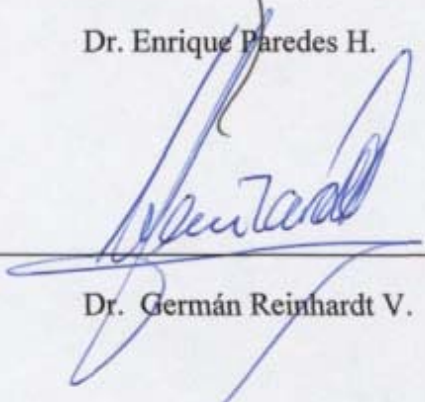
Dr. Victor Cubillos G.

PROFESORES CALIFICADORES:



---

Dr. Enrique Paredes H.



---

Dr. Germán Reinhardt V.

Fecha de Aprobación: 6 de Agosto de 1997.

***CON INFINITO AMOR Y GRATITUD,  
A MI MADRE, HERMANA, TIOS, TIAS  
Y EN FORMA ESPECIAL EN MEMORIA  
DE MI TATA ERNESTO Y MAMITA INES.***

## **INDICE**

	<b>PAGINA</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
<b>4. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>14</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>21</b>
<b>6. DISCUSION</b>	<b>42</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>53</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>65</b>

**AISLAMIENTO, ESTUDIO DE PATOGENICIDAD, SEROTIPIFICACION Y ESTUDIO DE PROTECCION DE AISLADOS NACIONALES DEL VIRUS DE LA BURSITIS INFECCIOSA AVIAR**  
**1.- RESUMEN**

Se estudió la presencia de cepas del virus de la Bursitis Infecciosa Aviar en planteles de broilers con problemas de inmunosupresión, en Chile.

Los aislados fueron obtenidos mediante pollos centinelas enviados a los planteles comerciales y luego multiplicados en huevos embrionados libres de patógenos especificados (LPE). Se evaluó la patogenicidad de las cepas, utilizando grupos de pollos LPE de 3 semanas de edad (N=15) inoculados vía oral con  $10^3$  DIE<sub>50</sub> y sacrificados 5 días post inoculación para determinar las relaciones bolsa/peso bazo); además el diámetro bursal (DB). El 10% de las muestras de bolsa de Fabricio, bazo, timo e hígado fueron sometidas a análisis histopatológico. La protección de la vacuna Bursine-2, fue determinada para cada aislado, utilizando un grupo vacunado y desafiado (N=20) y otro sólo desafiado (N=15). Además, se utilizó un grupo control sin desafío ni vacunación (N=20) y otro sólo vacunado (N=10). Las aves fueron vacunadas a las 3 semanas y 14 días más tarde fueron desafiadas vía oral (dosis  $10^3$  DZE<sub>50</sub>) y se determinó el título medio geométrico (GMT) neutralizante grupal. A las 72 hrs p.i. se determinó: Rbo, Rba, K y DB de cada grupo. Además, los aislados fueron comparados con una cepa clásica, para determinar el parentesco antigénico.

Las cepas aisladas (G-1, G-2, G-3, G-4 y G-5), provocaron mortalidad embrionaria en los días 5 y 6 post inoculación y los embriones afectados presentaron necrosis hepática, esplenomegalia, enanismo, edema mandibular y hemorragia cutánea. Las aves infectadas no mostraron signos clínicos ni mortalidad, sin embargo, los valores de los índices Rbo y K fueron significativamente ( $p<0.05$ ) menores al control sin diferencias entre aislados y el índice Rba sólo fue mayor en los aislados G-1 y G-4 ( $p<0.05$ ). El DB fue menor en los aislados respecto del control. Las lesiones microscópicas más frecuentes en la bolsa de Fabricio fueron: necrosis y depleción linfoide, hiperplasia de células reticulares, fibroplasia interfolicular y formaciones adenomatosas. En el bazo sólo las aves desafiadas con las cepas G-2 y G-3 mostraron leve depleción linfoide. En el estudio de protección vaccinal, vacuna Bursine-2 provocó disminución de Rbo y K ( $p<0.05$ ) respecto al grupo control no vacunado-no desafiado, siendo igual a los grupos vacunados-desafiados y sólo desafiados. Los grupos desafiados presentaron Rba mayores ( $p<0.05$ ) respecto al grupo control no vacunado-no desafío. El DB de los grupos vacunados-desafiados fue igual al grupo control no vacunado-no desafiado y el control sólo vacunado fue similar a los grupos sólo desafiados. A pesar de las diferencias en los GMT grupales previo al desafío, la vacuna Bursine-2 otorgó una protección  $>90\%$  en todos los grupos desafiados. El parentesco antigénico con la cepa de referencia fue un 39% para G-1, 141% para G-2 y 173% para G-4.

Los resultados permiten concluir que: las cepas aisladas corresponden al virus de la Bursitis Infecciosa Aviar debido a las lesiones producidas en embriones. Los aislados tiene alta patogenicidad ya que producen un cuadro subclínico con intenso daño en la bolsa de Fabricio. La vacuna Bursine-2 otorga una amplia protección frente al desafío con los aislados. La cepa G-1 tiene escaso parentesco antigénico con la cepa clásica utilizada.

Palabras claves: Bursitis infecciosa Aviar, patogenicidad, vacuna, protección vaccinal, serotipificación.

## ISOLATION, PATHOGENICITY STUDY, SEROTIFICATION AND PROTECTION STUDY OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS NATIONAL STRAINS.

### 2.- SUMMARY

The presence of Infectious Bursal Disease strains in broilers flocks with immunosuppression problems were studied in Chile.

The strains were isolated using sentinel birds sent to commercial flocks and then multiplied in SPF embryonated eggs of chicken. The pathogenicity of these strains were evaluated in groups of 3 week old SPF chicken (N=15), orally inoculated with  $10^3$  DIE<sub>50</sub>, and slaughtered on day 5 postinoculation. The Rbo index (bursa weight/live weight\*1000), Rba (spleen weight/live weight \*1000), and K (bursa weight/spleen weight) and bursa diameter were determined. 10% of bursa Fabricio, spleen, timo and liver samples were histopathologically analyzed. Bursine-2 vaccine protection was determined for each isolated strain using a vaccinated-challenged group (N=20) and a challenged group (N=15). Also a non vaccinated-unchallenged control group (N=20), and a control group which was only vaccinated (N=10) were used. The chickens were vaccinated at 3 weeks old and were challenged orally after 14 days (dose -  $10^3$  DIE<sub>50</sub>) determining the neutralizing groupal GMT. After 72 hrs., Rbo, Rba, K and bursal diameter for each group was determined. Furthermore, the isolates were compared with a classical strain for antigenic relationship.

The isolated strains (G-1, G-2, G-3, G-4 and G-5), produced embryonal mortality on 5 and 6 days postinoculation, and the embryo presents: necrosis in the liver, splenomegaly, dwarfism, edematous of the mandibular region and cutaneous hemorrhages. The infected chickens did not present clinical signs or mortality. However, the values of Rbo and K indexes were significantly different ( $p < 0,05$ ), lower than the controls, without differences between isolates. The Rba index was only greater in the G-1 and G-4 isolated. The bursal diameter was lower than the control in all isolates. The most frequent macroscopic lesions in the bursa of Fabricius were: necrosis and linfoide depletion, reticular cells hyperplasia, interfollicular fibroplasia and adenomatous formations. In the spleen only groups with G-2 and G-3 isolates, showed a light linfoide depletion. In the vaccine protection study, Bursine-2 produced lower Rbo and K index ( $p < 0,05$ ) than the non vaccinated-unchallenged, control group. The bursal diameter of the vaccinated-challenged groups was like the non vaccinated-unchallenged control group. The only challenged control group was similar to the challenged group. Although the differences in GMT were high before challenge, Bursine-2 provided  $> 90\%$  vaccine protection. The antigenic relationship was 39% for isolate G-1, 141% for G-2 and 173% for G-4, with respect to referent strains.

The results lead to the following conclusions: the isolated strain correspond to the Infectious Bursal Disease virus due to the embryonic lesions it produced. The isolates have a great pathogenicity since they produce sub-clinical symptoms and cause intense damage to the bursa of Fabricius. The vaccine Bursine-2 vaccine produced great protection against the challenge. The G-1 strain had little antigenic relationship with the classical strain used.

Key words: Infectious Bursal Disease, pathogenicity, vaccine, vaccinal protection, serotification.

### **3.- INTRODUCCION**

#### **3.1.-AVICULTURA E INMUNOSUPRESION**

La avicultura mundial ha crecido rápidamente gracias a los avances en genética, nutrición, patología y manejo aviar. El desarrollo de líneas de aves con mejores índices productivos, programas de alimentación al mínimo costo, y técnicas de diagnóstico rápidas, más sensibles y específicas, así como nuevas vacunas y amplios programas de inmunización, han permitido ir controlando las enfermedades infecciosas que en otros tiempos ocasionaron grandes pérdidas en la crianza intensiva.

El control de las enfermedades infectocontagiosas aviarias, se está logrando al adoptar estrictas medidas de bioseguridad y por el uso de completos programas de vacunación, asociándose el éxito productivo a una adecuada inmunidad en las parvadas; sin embargo, existen diversos factores que hacen que las aves puedan desarrollar estados inmunosupresivos, con disfunción temporal o permanente de la respuesta inmune, aumentando la susceptibilidad a las enfermedades (Dohms y Saif, 1983).

Numerosos factores presentes en los lotes, pueden hacer fracasar la inmunoprofilaxis, desarrollándose brotes explosivos con alta mortalidad o cuadros subclínicos perjudiciales para los índices productivos, con cuantiosas pérdidas económicas.

La inmunosupresión (**IS**) puede deberse a causas no infecciosas como micotoxinas, mal manejo y condiciones ambientales que inducen estrés, así como a causas infecciosas, como bacterias y virus capaces de lesionar directa o indirectamente a los órganos linfoides centrales y/o periféricos del sistema inmunológico del ave (Grieve, 1991).

En una misma parvada, pueden existir varias noxas inmunosupresivas, con el consiguiente sinergismo y dificultad para establecer el diagnóstico (Grieve, 1991).

#### **3.2.- SISTEMA INMUNOLOGICO DE LAS AVES**

La inmunidad adaptativa, depende tanto de los órganos linfoides primarios o centrales como del tejido linfoide secundario o periférico (Hodges, 1974; Sisson y Grossman, 1982; Tizard, 1988;).

Los órganos linfoides primarios, se desarrollan al inicio de la vida embrionaria a partir de uniones ectoendodérmicas, son esenciales para la diferenciación de las células linfoides, y desaparecen con el inicio de la pubertad. En las aves, estos órganos son la bolsa de Fabricio o bolsa cloacal y el timo (Tizard, 1988).

Los órganos linfoides secundarios, dependen de los órganos linfoides primarios, pero se originan del mesodermo al final de la vida embrionaria, y persisten toda la vida para responder frente a los desafíos antigénicos. En las aves corresponden al bazo, glándulas de Härder, tonsilas cecales, y tejido linfoide difuso distribuido en la mayoría de las vísceras (Ridell, 1984; Sisson y Grosman, 1982; Tizard, 1988;).

### **3.2.1.- Bolsa de Fabricio**

En el pollo, la bolsa de Fabricio es un divertículo sacular ubicado mediodorsal al proctodeo, y comunicado con éste, a través de un conducto en el extremo caudal (Sisson y Grosman, 1982).

La mucosa posee 12 a 14 pliegues longitudinales, cubiertos por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con capacidad de pinocitosis, que le permite capturar y transportar los antígenos que llegan a su superficie (Hodges, 1974; Payne y Powell, 1984; Ridell, 1984; Ossa, 1990).

En los pliegues, se encuentran alrededor de 8.000 a 12.000 folículos linfoides, rodeados por delgadas bandas de tejido conectivo. Los folículos, presentan una corteza densamente poblada por linfocitos pequeños, linfoblastos, algunas células plasmáticas y macrófagos. Además, están formados por una médula de menor densidad celular, constituida por linfocitos grandes y medianos, células reticulares, macrófagos y células plasmáticas. Entre corteza y médula, se encuentra una capa poco evidente, de células epiteliales cuboides indiferenciadas y bajo su membrana basal, se presenta una red de capilares (Hodges, 1974; Payne y Powell, 1984; Ridell, 1984; Ossa, 1990). En este órgano se desarrollan las células prebursales que formarán las diferentes poblaciones de linfocitos B, que poblarán los tejidos linfoides secundarios y producirán inmunoglobulinas específicas (Tizard, 1988).

Kuney y col. (1981 y 1982) determinaron la curva normal de desarrollo bursal en aves White Leghorn, en condiciones de mínimo estrés. Estos autores, observaron un rápido crecimiento hasta las 8 y 12 semanas de edad en machos y hembras respectivamente, y pesos bursales máximos de 3,5 gramos. Luego de un periodo de mantención del peso, describen una rápida atrofia que se inicia a las 20 semanas de vida en machos y 24 semanas en hembras.

El peso de la bolsa está altamente correlacionado con su diámetro, alcanzando un diámetro máximo de 2,1 centímetros entre las 8 y 20 semanas de edad de las aves (Kuney y Bickford, 1981).

En la bolsa de Fabricio, se diferencian células prebursales, para desarrollar distintas poblaciones de Linfocitos B que ocuparán los tejidos linfoides secundarios y producirán inmunoglobulinas específicas (Tizard, 1988).

### **3.2.2.- Timo**

El timo es un órgano par formado por 7 a 8 lóbulos separados y distribuidos entre la 3ª vertebra cervical y la tiroides, a ambos lados del cuello, ventral al nervio vago y a la vena yugular (Hodges, 1974; Sisson y Grossman, 1982).



Cada lóbulo, posee una corteza compacta formada por un gran número de linfocitos pequeños más algunos linfocitos medianos, y una médula de menor densidad celular, donde predominan células epiteliales de tipo reticular, indiferenciadas, quísticas y escamosas. Además, se pueden encontrar macrófagos, células plasmáticas y miocitos (Hodges, 1974; Ossa, 1990).

Este órgano, alcanza su máximo tamaño a las 17 semanas, y al empezar la pubertad comienza a atrofiarse, pudiendo encontrarse algunos remanentes en aves adultas (Hodges, 1974; Ridell, 1984).

En el timo, se diferencian y desarrollan los Linfocitos T, responsables de la respuesta celular y de la modulación de la respuesta humoral. Se forman linfocitos supresores, *helper*, citotóxicos, activadores de macrófagos y mediadores de la hipersensibilidad (Payne y Powell, 1984, Ossa, 1990).

### **3.2.3.- Bazo**

El bazo es un órgano de forma redondeada, ubicado a la derecha, entre el proventrículo y el estómago muscular (Sisson y Grossman, 1982). A las diez semanas pesa 2,6 grs y corresponde al 0,2 % del peso corporal, pero su tamaño máximo lo alcanzará entre los 3 y 4 meses de edad del ave, con un peso de 3,6 gramos (Payne y Powell, 1984).

Histológicamente presenta una pulpa blanca difusa, con linfocitos pequeños, medianos y grandes, rodeados por células reticulares. Estas células, forman el tejido linfoide periarterial, que envuelve las arterias centrales (manguito linfoide periarterial), y la vaina reticular periarteriolar o estructuras elipsóides, que cubren las terminaciones de las arteriolas nodulares. Además, el tejido linfoide puede formar centros germinativos o folículos secundarios, en caso de infecciones (Hodges, 1974; Cheville, 1980, Payne y Powell, 1984; Dellman, 1993).

El bazo posee también, una pulpa roja, formada por senos venosos rodeados de células reticulares y algunos macrófagos, linfocitos y células plasmáticas (Hodges, 1974; Payne y Powell, 1984; Dellman, 1993).

Las funciones de este órgano son captar los antígenos circulantes en la sangre, activar los macrófagos y desencadenar la producción de células plasmáticas específicas (Cheville, 1980).

### **3.2.4.- Tonsilas cecales**

Las tonsilas cecales se ubican en la mucosa a la entrada de ambos ciegos y presentan aspecto nodular. Están formadas por dos tipos de centros germinativos, unos encapsulados cerca de la lámina propia, y otros con encapsulamiento parcial cerca de la capa muscular. Su función se asocia con la inmunidad intestinal local (Payne y Powell, 1984).

### **3.2.5.- Glándulas de Härder**

La glándula de Harder es par y se ubican bajo la comisura ocular medial, rodeando al ducto lacrimal y al ducto nasal. Están constituidas casi exclusivamente por células plasmáticas, y producen inmunoglobulinas en el fluido lacrimal, generando inmunidad local tanto ocular como a las vías respiratorias superiores (Ridell, 1984).

### **3.2.6.- Tejido linfoide difuso**

El tejido linfoide difuso, está formado por numerosos acúmulos de linfocitos pequeños y células plasmáticas, no encapsuladas, sin hilio ni drenaje de vasos linfáticos, que se encuentran en el tejido conectivo de la mayoría de los órganos del pollo. Son importantes el tejido linfoide asociado al tracto digestivo y al aparato respiratorio, pero también, los acúmulos en el corazón, hígado, páncreas, tejido muscular y piel (Payne y Powell, 1984).

## **3.3.- EVALUACION DEL SISTEMA INMUNOLOGICO**

La inmunosupresión y la inmunocompetencia pueden ser evaluadas por métodos físicos, tales como: medición del peso, tamaño y proporción de la bolsa de Fabricio (Kuney y col., 1982) y timo. Por métodos microscópicos, utilizando pautas de evaluación histopatológicas basadas en las alteraciones de las células linfoides (Rosales y col., 1989a y b; Nunoya y col, 1992; Tanimura y col., 1995), y por el procesamiento de imágenes computacionales, el cual es mucho más objetivo que los métodos anteriores (Stewart-Brown y Trampel, 1990).

La calidad de la respuesta humoral puede determinarse conociendo los títulos serológicos postvaccinales y por la cantidad de Complemento. Por ejemplo, se puede medir la producción de anticuerpos frente a la vacuna de la Enfermedad de Newcastle, eritrocitos de oveja o la cepa 19 de *Brucella abortus* (Giambrone y col.; 1977, Perelman y Heller, 1982; Dohms y Jaeger, 1989; Tizard, 1988; Craft y col., 1990).

La funcionalidad de la respuesta celular, puede evaluarse a través de las pruebas de transformación de linfoblastos frente a sustancias mitógenas, inhibición de la migración de macrófagos, o por la reacción de hipersensibilidad retardada frente a la Tuberculina (Giambrone y col, 1977; Lukert, 1984b; Tizard, 1988; Craft y col., 1990, Nakamura y col, 1992).

También, la presencia de enfermedades como la Hepatitis a Cuerpo de Inclusión, Dermatitis Gangrenosa, Enfermedad de Newcastle, Laringotraqueitis, Criptosporidiosis y Enfermedad Respiratoria Crónica, así como disminuciones en la ganancia de peso, mala conversión alimenticia, desuniformidad de los lotes y aumento en la mortalidad, se asocian con parvadas inmunodeprimidas (Lukert y Saif, 1991; Mc Ilroy y col., 1991; Fernandez, 1995).

## **3.4.- INMUNOSUPRESION VIRAL**

Las infecciones virales pueden provocar inmunosupresión generalizada, afectando tanto a las funciones humoral, celular y macrofágica del sistema inmune (Lukert, 1984b).

Según Grieve (1991), las causas virales más importantes de inmunosupresión en aves, son la Bursitis Infecciosa Aviar , Anemia Infecciosa Aviar y la Enfermedad de Marek, y en menor grado, Difteroviruela, Reovirus y la Enfermedad de Newcastle.

La Bursitis infecciosa aviar, es motivo de permanente preocupación al ser considerada como una de las mayores amenazas para la industria avícola mundial (Morales, 1995a; Van der Sluis, 1995).

### **3. 5.- BURSITIS INFECCIOSA AVIAR (BIA)**

La Bursitis Infecciosa Aviar o Enfermedad de Gumboro, es una virosis altamente contagiosa que afecta el sistema inmunológico y en especial la bolsa de Fabricio de pollos jóvenes, entre las 3 y 6 semanas de edad. Dependiendo de la edad que posean las aves afectadas, cursa con una forma clínica u otra subclínica acompañada de inmunosupresión permanente o transitoria (Lukert y Saif, 1991).

La Oficina Internacional de Epizootias (OIE) considera a la **BIA** entre las enfermedades aviares de la lista B, donde están aquellas de importancia socioeconómica y/o para la salud pública, así como las de interés para el comercio internacional de animales y sus productos, debiendo reportarse anualmente la situación epidemiológica en cada país (Cullen, 1994).

El cuadro fue descrito por primera vez en el este de los Estados Unidos, en la región de Delaware y específicamente en la localidad de Gumboro, debido a un brote en una crianza de pollos broilers en el otoño de 1957 (Cosgrove, 1962).

#### **3.5.1.- Situación mundial actual**

En la actualidad la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo (Cullen, 1994). En Norteamérica y en Latinoamérica, predomina la forma subclínica inmunosupresiva de la enfermedad, en cambio en Asia, Europa y África, es más común la forma clínica aguda (Fernández, 1995; Wrigth, 1995).

El año 1994, 65 países informaron a la OIE su situación epidemiológica respecto a la **BIA**. Actualmente, de los 62 países que se declaran infectados, 49 (79%) señalan la presencia de casos clínicos y todos la forma inmunosupresiva, en mayor o menor grado. Respecto a la forma inmunosupresiva, sólo un 16% de los países cuantificó la prevalencia (entre un 0,1 y 40%), 55% estima su frecuencia entre muy rara y muy alta, y un 29% no precisa este parámetro. Para la formas aguda estos porcentajes fueron 24%, 49% y 27% respectivamente, y la prevalencia cuantificada varió entre 0.2 y 70%. Además el informe señala que: en 13 países se presentó sólo la forma inmunosupresiva con una prevalencia baja a muy baja . La forma subclínica junto con la clínica, se presentaron en la mayoría de los casos; en 8 países la forma clínica fue más frecuente, con una prevalencia alta o muy alta, mientras que en 27, la forma inmunosupresiva fue la más común, con una prevalencia muy baja a mediana, por último, en 17 países la forma clínica presentó una prevalencia alta a muy alta (Etteradossi, 1995).

Si bien, la forma inmunosupresiva o subclínica es la más frecuente, desde el año 1987 se ha registrado un aumento en los casos clínicos agudos, con alta mortalidad, debido a la aparición de cepas con mayor virulencia (Cullen, 1994; Eterradossi, 1995).

Según Fernández (1995), en los países de América Latina se presenta la forma clínica y subclínica de la enfermedad, y se están observando los mismos cambios ocurridos en USA, a pesar de que muchos países no reconocen oficialmente la presencia de cepas variantes como las de Delaware.

### **3. 5. 2.- Importancia económica**

Las pérdidas económicas, causadas por esta enfermedad, dependen tanto de la cantidad de aves muertas como de la cantidad de aves inmunodeprimidas y de las enfermedades que estas últimas desarrollen. También de la disminución en la tasa de crecimiento, eficiencia de conversión alimenticia, aumento de canales decomisadas, y heterogenicidad en lotes de broilers. Sin embargo, el impacto económico de la enfermedad, variará según el tipo de virus involucrado, susceptibilidad de la parvada y factores ambientales locales (Shane y col., 1994).

### **3. 5. 3.- Etiología de la enfermedad**

La Bursitis Infecciosa Aviar, es provocada por un virus perteneciente a la familia Birnaviridae, y es el único integrante de la subfamilia Avibirnavirinae. La familia fue creada a partir de 1984 para reunir además, algunos agentes patógenos de peces, moluscos e insectos (Fenner y col., 1987; Mayr y col., 1993).

El virión tiene un genoma ARN bicatenario, una cápside icosaédrica sin envoltura con 32 capsómeros, con un diámetro de 55 a 60 nm. Su densidad es de 1,75 a 1,78 g/ml (Nick y col., 1976). La cápside está formada en un 90 % por las proteínas estructurales VP2 y VP3, ambas como determinantes antigénicos. La primera determina el subtipo y la segunda el serogrupo o serotipo. El virión además, posee una ARN polimerasa o proteína VP1 y una proteasa viral o proteína VP4 (Dobos y col., 1975).

Benton y col. (1967a y b) y Petek y col. (1973), determinaron que el agente de la Bursitis es altamente contagioso, pudiendo ser transmitido por el agua y alimento. Incluso, puede permanecer activo en la cama de los pollos hasta 4 meses, debido a su alta resistencia a las condiciones ambientales y desinfectantes corrientemente utilizados.

#### **3. 5. 3. 1.- Serotipos y serotipificación**

Para el virus de la Bursitis infecciosa Aviar, se han definido los serotipos 1 y 2; el primero fue aislado desde pollos y el segundo de pavos. El serotipo 1 origina el cuadro clínico típico en los pollos, mientras que el serotipo 2 no es patógeno para las aves (Mc.Ferran y col., 1980; Jackwood y Saif, 1987). Jackwood y Saif (1987), demostraron además, la existencia de subtipos dentro del serotipo 1.

Los aislados virales caracterizados antes de 1984, han sido denominados cepas clásicas o estándares, debido a la aparición de cepas variantes o subtipos antigénicos en diferentes lugares del mundo, a partir de ese año.

Se han aislado y caracterizado cepas variantes, que inducen un cuadro clínico e histopatológico distinto al provocado por las cepas clásicas. Entre las variantes descritas están las cepas, Delaware A,D,E y G (Rosenberger y col., 1985), U-28 y 3212 (Rosales y col., 1989a y b), IN (Ismail y col., 1990), GLS y DS 326 (Snyder, 1989).

Las cepas clásicas y variantes, presentan diferencias en su patogenicidad y virulencia, por tal motivo, se han descrito los patotipos suave, moderado y muy virulento. Entre las cepas muy virulentas se encuentra, DV86 y 52/70 (Europa), y las cepas japonesas aisladas entre 1990 y 1991, Ku-98 y Y127, entre otras, causan alta mortalidad (sobre un 40%) y signos clínicos (Tanimura y col., 1994 y 1995)

La serotipificación establece el parentesco serológico, determinando la semejanza y diferencia entre los epítopes o determinantes antigénicos de los aislados. Para la **BIA**, el parentesco serológico puede determinarse a través de la seroneutralización beta cruzada (Mc Ferran y col., 1980; Jackwood y Saif, 1987; Mc Nulty y Saif, 1988; Jackwood, 1994), utilizando baterías de anticuerpos monoclonales, preparados para diferentes epítopes (Snyder y col., 1988a y b; Eterradossi y col., 1994; Snyder y col., 1994). Actualmente se han estudiado las bases moleculares de la variación antigénica, a través de la secuenciación génica de las proteínas VP2 y VP3 (Mundt y Müller, 1994; Vakharia y col., 1994).

#### **3.5.4.- Cuadro clínico**

La enfermedad clínica se presenta en aves jóvenes, especialmente entre las 4 y 10 semanas de edad, debido al rápido crecimiento de los órganos linfoides (Lukert y Saif, 1991). Sin embargo, algunos casos han sido descrito en aves, después de las 12 semanas de edad (Okoye y Uzoukwu., 1981; De Vries, 1990).

El cuadro clínico de la BIA se caracteriza porque las aves presentan diarrea muy acuosa, plumaje erizado, fotofobia, cianosis de la cresta, plumas aglutinadas en la cola, prurito y picaje cloacal, anorexia, temblores, depresión y postración severa, antes de morir (Cosgrove, 1962; Faragher, 1972).

La mortalidad asociada con la forma clínica varía entre un 3 y 5%, definido por un pick al tercer día y luego un descenso progresivo hasta el día 5 ó 7 postinfección (Cheville, 1967). Sin embargo, las cepas muy virulentas produce mortalidades sobreagudas mayores al 30% de las aves expuestas (De Vries, 1990).

La forma subclínica se presenta en el período en que existe inmunidad materna y se caracteriza porque las aves desarrollan inmunosupresión, la cual es mayor, mientras antes sea la edad de infección (Fadly y Nazerian, 1983).

### **3.5.5.- Lesiones macroscópicas y microscópicas**

Las lesiones macroscópicas indicadas en la literatura, para cepas clásicas son: deshidratación, hemorragias petequiales en músculos pectorales, piernas y en los bordes del hígado, enteritis mucosa difusa, nefrosis y uratos en los uréteres, así como una marcada inflamación de la bolsa de Fabricio (Cosgrove, 1962). Además, Hanson (1967) señala hepatitis, hemorragias en el proventrículo, corazón y en la serosa de la bolsa, así como la presencia de material caseoso en el lumen de la bolsa.

Okoye (1984), describe esplenomegalia acompañada de focos necróticos uniformemente distribuidos en el bazo. Cho y Edgar (1968), reportan atrofia de la bolsa y el bazo, acompañadas por hipertrofia del hígado. Faragher (1972), señala congestión en el timo.

Cheville (1967), señala para una cepa clásica, que las aves presentan un transudado gelatinoso y aumento progresivo del tamaño de la bolsa, debido a la inflamación y el edema, 2 a 3 días postinfección, para luego atrofiarse por completo. En cambio, las cepas variantes, no inducen un cuadro inflamatorio en la bolsa, sino más bien una rápida e intensa atrofia, pudiendo observarse además, congestión del timo (Sharma y col., 1989).

Las lesiones microscópicas, ocurren principalmente en los órganos linfoides, siendo especialmente intensas en la bolsa de Fabricio (Lukert y Saif, 1991).

En la bolsa de Fabricio, se presenta degeneración y necrosis linfoide en la médula de algunos folículos, en el primer día postinfección. Hiperplasia de las células reticulares e infiltrado heterofílico. Entre los 3 y 4 días se observa, severo edema y hemorragia en los pliegues bursales, con un intenso infiltrado heterofílico interfolicular. Además, aparecen formaciones quísticas medulares, heterófilos y células plasmáticas necróticas, así como, hiperplasia con degeneración quística epitelial y fibroplasia interfolicular (Cheville, 1967).

En el bazo, al día postinfección, se describe hiperplasia de las células reticulares alrededor del tejido linfoide periarterial. Entre los 3 y 4 días después de la infección, se observa necrosis linfoide en los centros germinativos y en la vaina periarteriolar. Sin embargo, estas lesiones presentan una recuperación rápida, apareciendo nuevos centros germinativos (Cheville, 1967).

Las tonsilas cecales y el timo, sólo muestran leves lesiones inflamatorias transitorias, mientras que las glándulas de Härder, presentan severa necrosis de las células plasmáticas. En el hígado, se describe un leve infiltrado perivascular de macrófagos (Cheville, 1967).

### **3.5.6.- Diagnóstico directo e indirecto**

En terreno, se puede hacer un prediagnóstico, considerando factores epidemiológicos como la edad de las aves afectadas, morbilidad, e intensidad y tendencia de la mortalidad, así como, los signos clínicos, además de la presencia de lesiones macro y microscópicas (Lukert, 1983).

El diagnóstico directo se realiza demostrando la presencia del virus en las aves enfermas, utilizando muestras de órganos linfoides, especialmente bolsa de Fabricio y bazo, de al menos 5 aves moribundas (Lukert, 1983), las cuales son inoculadas vía membrana corioalantoidea en huevos LPE (Villegas, 1982). Las cepas clásicas, causan mortalidad embrionaria 3 a 5 días postinoculación, y los embriones muertos presentan, congestión cutánea, hemorragias en las articulaciones digitales, hígado pálido con aspecto cocido, y bazo pálido con focos necróticos. En cambio, las cepas variantes, no provocan mortalidad, y los embriones presentan ascitis, edema cerebral, imbibición biliar hepática, esplenomegalia y focos necróticos en el hígado (Rosenberger, 1989).

Otra forma de diagnóstico, consiste en utilizar pollos LPE infectados vía ocular u oral, y reproducir el cuadro clínico y patológico característico de la enfermedad. También, se pueden usar cultivos celulares de embrión de pollo o líneas celulares comerciales, siendo frecuente el uso de fibroblastos de embrión de pollo, donde el virus produce un efecto citopático caracterizado por la formación de condensaciones citoplasmáticas que dan un aspecto de arenilla sobre la monocapa, y por el desprendimiento celular progresivo (Lukert y Saif, 1991).

De igual forma, las lesiones histopatológicas encontradas en la bolsa de Fabricio son características y definitivas si se utilizan técnicas inmunohistoquímicas como inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa. Además, actualmente es posible un diagnóstico muy rápido, con alta sensibilidad y especificidad, gracias al desarrollo de técnicas moleculares como la reacción de polimerasa en cadena (PCR) con transcriptasa reversa y endonucleasas de restricción (PCR/RT/RE) y la hibridación *in situ* (Jackwood, 1994).

La enfermedad puede ser diagnosticada en forma indirecta, a través del análisis cualitativo y cuantitativo de muestras de suero de aves convalecientes (Rosenberger, 1989), siendo la inmunodifusión en gel agar la prueba más utilizada a pesar de su baja sensibilidad, luego la prueba de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), y la seroneutralización (Etteradossi, 1995).

### **3. 5. 7.- Prevención y control**

Un programa efectivo de prevención y control para la Bursitis Infecciosa Aviar, considera estrictas medidas de bioseguridad, vacunación de las reproductoras, vacunación de las parvadas y un monitoreo permanente de la enfermedad. Además, se recomienda prevenir otras causas de inmunosupresión, así como la identificación de nuevas cepas del virus (Rosales, 1989; Hein y col., 1991; Morales, 1995a).

Las medidas de bioseguridad previenen la enfermedad, permitiendo disminuir la concentración ambiental del virus y con ello reducir la intensidad del desafío a los pollos (Morales, 1995a). Se deben considerar el aislamiento, limpieza y desinfección de los galpones, restricción y sanitización del personal, vehículos y materiales, así como el control de roedores y pájaros (Cowen, 1991). Para la vacunación de las reproductoras, existen diferentes programas, cuyo objetivo es inducir altos niveles de anticuerpos, y asegurar con ello una inmunidad materna alta y homogénea (Morales, 1995a). Después de las vacunas vivas aplicadas en la crianza, a estas aves se les administran vacunas inactivadas, antes y en algunos casos durante la postura.

Para las parvadas, también existen diferentes programas, pudiendo utilizarse vacunas vivas con cepas de patogenicidad suave, moderada, alta (vacunas calientes) o incluso con cepas variantes, si es necesario. La estrategia de vacunación, se diseña dependiendo de la inmunidad materna y del tipo e intensidad del desafío de campo (Cullen, 1994; Solvay, 1995).

El monitoreo permanente de la enfermedad, considera la evaluación de los índices productivos, el porcentaje y causas de la mortalidad, nivel de anticuerpos postvaccinal y la existencia de factores inmunosupresivos infecciosos y no infecciosos (Morales, 1995a)

### **3. 6.- BURSITIS INFECCIOSA AVIAR EN CHILE**

En nuestro país la **BIA** fue diagnosticada en 1977, y más tarde, a través de prospecciones serológicas, se demostró su amplia distribución en el país, tanto en planteles de broilers, ponedoras como en reproductoras (Martínez y col., 1979; Muñoz, 1982).

La enfermedad tiene características enzoóticas, por lo cual, se realiza vacunación en aves reproductoras, recrias de ponedoras y en broilers, a fin de disminuir y controlar la presentación de casos clínicos.

Desde al año 1977, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) autoriza el ingreso al país de vacunas vivas e inactivadas, para aplicar en reproductoras, ponedoras y broilers. Según cifras del SAG, el año 1996 se permitió el ingreso de 39.830.000 dosis vaccinales.\*

En nuestro país, los laboratorios Chemie de Chile, Agrovit, Química Holanda, Rivagro y Veterquímica, están autorizados para la importación de vacunas, generalmente de origen holandés (Intervet International), alemán (TAD Laboratories), israelí (Abic Laboratories) o estadounidense (Sanofi Animal Health; Select Laboratories; Solvay Animal Health y Vineland Laboratories Inc.).

---

\* Comunicación personal. Dr. Narcizo Díaz. SAG Central.



A pesar de la vacunación en las parvadas de broilers, frecuentemente se observan quiebres vaccinales, cuadros clínicos de Bursitis Infecciosa Aviar, e incluso enfermedades asociadas con inmunosupresión. Por tal motivo, y teniendo como hipótesis la presencia de cepas virales variantes, se propuso realizar el siguiente trabajo, teniendo como objetivos :

- Aislar posibles cepas variantes de VBIA, desde algunos planteles de broilers, en que se sospeche de inmunosupresión viral.
- Caracterizar la patogenicidad de estos aislados.
- Establecer el parentesco serológico de los aislados, frente a una cepa clásica conocida.
- Determinar el grado de protección, conferido por una vacuna de amplio uso en el país, frente al desafío con los aislados.

## **4.- MATERIAL Y METODO**

### **4.1.- MATERIAL**

#### **4.1.1.- Material biológico**

- Pollos de 3 y 5 semanas y huevos embrionados de 10 días de edad, provenientes del Plantel de Aves Libres de Patógenos Especificados (LPE) de la Universidad Austral de Chile.
- Vacuna a virus vivo Bursine-2, Solvay Animal Health, USA.
- Cepa virus Bursitis Infecciosa Aviar liofilizada, adaptada a cultivo celular, serie 901024, Spafas, USA.
- Suero Hiperinmune antiGumboro, serie GO11, Spafas, USA.
- Sueros monoespecíficos anti Marek, antiReo y anti Adenovirus, del Laboratorio de Patología Aviar. Universidad Austral de Chile.
- Suero fetal bovino, Frigosor, Osomo. Chile
- Sueros Hiperinmunes antiaislados de campo virus Bursitis Infecciosa Aviar, Laboratorio de Patología Aviar, UACH.

#### **4.1.2.- Reactivos de laboratorio**

- Cloruro de sodio y de potasio, bicarbonato y fosfato de sodio y bifosfato de potasio.
- Formalina tamponada al 10%
- Colorante para microplacas (violeta genciana y formalina)
- Tripsina 1:250, (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.)
- Agar Noble, (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.)
- Azida de Sodio (Merck)
- Polietilenglicol 6000 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.)
- Caldo Triptosa Fosfato (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.)
- Agar base (Merck)
- Antibióticos (Penicilina y Estreptomina) (Laboratorio de Chile)
- Medio 199, (Gibco Laboratories, N.Y., USA.)
- Reactivos y colorantes para técnica histológica corriente.

#### **4.1.3.- Equipos y materiales de laboratorio**

- Incubadora/Nacedera, marca Werner Schumacher, Mo VFG 1
- Unidades de Aislamiento, con aire filtrado y presión negativa (sistema FANP)
- Cámara de Bioseguridad, Haroshet, Mo CH 503, Israel
- Microscopio Invertido, Leitz Wetzlar, Alemania
- Microscopio Binocular, Leitz, Alemania
- Estufa de CO<sub>2</sub>, National, Mo 3221-14
- Balanza de Laboratorio, Sauter MM 160 ( sensibilidad 0,001 gr.)
- Balanza digital, Sartorius QT 6100B ( sensibilidad 0,01 gr.)
- Bursámetro, Solvay Animal Health, Mendota Heights, USA.
- Sistema de Filtración, Sartorius
- Centrífuga Clínica, EIC/Damon
- Balanza Ohaus, Harvard Trip Balance, AF-18072
- Microdilutor Nichirko, Oxford Benchmade
- Micrótopo horizontal
- Baño Termoregulado, Kottermann, Type 3043
- Dilutores de 50 ul, Cooke Engineering Co., Virginia, USA.
- Rotador eléctrico de dilutofes, Dynatech, USA.
- Desionizador de 4 columnas, Cole Parmer, USA.
- Botellas para cultivo celular, Nunc, Dinamarca.
- Microplacas, 96 pocillos de fondo plano, NUNC. Dinamarca
- Morteros de Marmol
- Material de vidrio (placas petri, matraces, frascos etc.)
- Material de disección (tijeras, pinzas, bisturí etc.)

#### **4.1.4.-Alimento**

- Concentrado comercial para crianza, Purina.

## **4.2.- METODOS**

### **4.2.1.- Aislamiento viral**

Para aislar las cepas desde el campo, se enviaron 30 pollos centinelas LPE de 3 semanas de edad, a cada plantel avícola que informó previamente la sospecha de problemas de inmunosupresión viral (Rosenberger y col., 1985)., por otra parte, en el Laboratorio de Patología Aviar, se mantuvieron en cámaras de aislamiento con aire filtrado y presión negativa, 10 pollos como controles para los centinelas.

Después de seis días, tanto los pollos centinelas como sus respectivos controles, fueron individualizados, pesados y sacrificados, para extraerles y pesar bolsa de Fabricio y bazo.

El aislamiento viral se realizó a partir de homogeneizado de bolsas de Fabricio atroncas de pollos centinelas, inoculando series de cinco huevos embrionados LPE de 10 días de edad, vía membrana corioalantoídea (MCA). Los huevos fueron incubados por 7 días, registrándose diariamente la mortalidad. Al final del período, los embriones vivos fueron refrigerados, y examinados junto con los embriones muertos, en busca de las lesiones macroscópicas características del virus (Rosenberger, 1989).

El sobrenadante del homogeneizado de las bolsas atroncas, fue inoculado vía oral y cloacal en pollos LPE de 3 semanas de edad para extraerles las bolsas 72 hrs. después de la inoculación, y utilizarlas como fuente de antígeno precipitante, para realizar un test de Inmunodifusión en gel agar (AGP) (Villegas, 1982).

Después de cuatro pasajes en series de cinco huevos LPE embrionados de 10 días de edad, los aislados virales fueron titulados en este mismo sustrato, para determinar la Dosis Infecciosa Embrión 50% (DIE<sub>50</sub>) a través de la fórmula de Reed y Muench (Villegas, 1982), para considerarlos como inóculos en los estudios posteriores.

A los inóculos se les realizó un chequeo bacteriológico, en caldo peptona y luego en agar sangre. Además, se realizó un estudio virológico con las membranas corioalantoídeas que presentaron lesiones macroscópicas, en el cuarto pasaje en huevos embrionados.

Las membranas afectadas, fueron homogeneizadas, y el sobrenadante fue inoculado en huevos embrionados de 10 días de edad, para cosechar las MCA a las 33, 48 y 64 hrs postinoculación, y realizarles un examen histopatológico. Además, se tomaron muestras de MCA, a las 96 hrs. posterior a la inoculación, y se realizó una inmunodifusión en gel agar (AGP) frente a antisueros monoespecíficos contra Reovirus, Adenovirus, Difteroviruela y virus de la enfermedad de Marek.

#### 4.2.2.- Estudio de patogenicidad

Se utilizaron 15 pollos LPE de 3 semanas de edad, para cada aislado de campo. Los pollos fueron inoculados vía oral con una dosis mínima de  $10^3$  DIE<sub>50</sub> / ave (Rosales y col., 1989a). Además se consideró un grupo control sin inocular, como referencia del tamaño y desarrollo de los órganos linfoides.

Las aves se mantuvieron separadas en unidades de aislamiento con 15 individuos cada una, fueron alimentadas *ad libitum* y diariamente se observó la aparición de posibles signos clínicos. Después de 5 días desde la inoculación, todos los individuos fueron pesados y sacrificados, para extraer bolsa de Fabricio y bazo *in toto* y muestras de timo e hígado (Ley y col., 1983).

La bolsa de Fabricio y el bazo de cada individuo, fueron pesados para determinar las relaciones  $R_{bo}$  (Peso de Bolsa de Fabricio / Peso vivo \*1000),  $R_{ba}$  (Peso de bazo/ Peso vivo \*1000) y K (Peso bolsa/peso bazo), y utilizarlas como criterio de patogenicidad (Alamsyah y col., 1993). Además, se midió el diámetro transversal mayor de la bolsa de Fabricio a través de un Bursámetro comercial, el cual corresponde a una regleta plástica con 8 perforaciones circulares con diámetros crecientes desde 1/8 de pulgada hasta 1 pulgada (Kuney y col., 1982).

Las muestras de hígado, timo, bolsa y bazo de cada individuo, fueron almacenadas en formalina al 10%, y al realizar la evaluación histopatológica, se tomó al azar los órganos del 20 % de los individuos de cada grupo, para procesarlos con la técnica histológica corriente; inclusión en parafina, cortes de 5 micras y tinción con hematoxilina/eosina (Ley y col., 1983).

Para la evaluación histopatológica de la Bolsa de Fabricio se realizó una descripción cualitativa, considerando las lesiones encontradas y su intensidad, según las lesiones descritas previamente por Winterfield y col., (1980) y Sharma y col., (1989).

Para la evaluación histopatológica del bazo, se consideró la Pauta de Tanimura y col., (1995):

0 = no se detectan lesiones

1 = disminución leve del número de linfocitos

2 = disminución moderada del número de linfocitos, aumento leve del número de los macrófagos en las vainas perivasculares y en la pulpa roja.

3 = disminución severa del número de linfocitos, y severo aumento de los macrófagos.

Para la evaluación histopatológica del timo, se consideró la pauta de Nakamura y col., (1992), la que define la siguiente escala de daño:

0 = no se detectan lesiones

1 = necrosis linfocitaria multifocal leve

2 = necrosis linfocitaria cortical moderada o atrofia cortical difusa leve

3 = atrofia cortical difusa moderada

4 = atrofia cortical difusa severa

En la evaluación histopatológica del hígado, se describieron las lesiones encontradas y su severidad.

#### **4.2.3 Estudio de protección**

Para el estudio de protección frente a cada aislado, se utilizaron 30 pollos LPE, mantenidos en unidades de aislamiento con sistema de aire filtrado y presión negativa. En cada grupo, 20 aves fueron inmunizadas con 0,1 ml de la vacuna Bursine-2, vía intraocular, a las 3 semanas de edad. A los 14 días post vacunación, se realizó un chequeo serológico mediante Seroneutralización, para medir inmunidad otorgada por la vacuna (Villegas, 1982). El mismo día, los pollos vacunados y los 10 restantes que permanecieron como controles sin vacunar, fueron infectados vía oral con uno de los aislados de campo, en una concentración viral no inferior a  $10^3$  DIE<sub>50</sub>/ave (USA, 1981).

Después de 3 días del desafío, todos los pollos fueron pesados y sacrificados, para realizar la necropsia respectiva (USA, 1981)

La bolsa de Fabricio y el bazo de cada individuo fueron extraídos y pesados, para calcular las relaciones morfométricas  $R_{bo}$ ,  $R_{ba}$  y  $K$ , además, se midió el diámetro transversal mayor de la bolsa de Fabricio.

El grado de protección vaccinal porcentual, considera la cantidad de individuos del grupo vacunado / desafiado cuyo  $R_{bo}$  fue mayor al valor de referencia. Este valor de referencia, se estableció en el grupo no vacunado ni desafiado, restando al valor promedio de  $R_{bo}$ , 2 desviaciones estándares. Así, las aves que presentaron un  $R_{bo}$  menor al valor de referencia, fueron consideradas no protegidas (Honegger y col., 1987 ; Odor y col., 1995).

#### **4.2.4.- Serotipificación viral**

##### **4.2.4.1.- Adaptación viral a cultivo de fibroblastos**

Para realizar la seroneutralización viral, los aislados fueron adaptados a cultivo de fibroblastos, utilizándose como solución viral original, el sobrenadante del homogenizado de las membranas corioalantoideas provenientes del cuarto pasaje en huevos embrionados. Estos sobrenadantes, previo cheque bacteriológico, fueron purificados y aclarados con filtros de celulosa con poros de 0,45  $\mu$ m.

El cultivo primario de fibroblastos, se obtuvo de embriones LPE de 10 días de edad, según la técnica descrita por Villegas (1982). Los fibroblastos, se sembraron en botellas de cultivo y fueron incubadas a 37°C por 24 hrs., utilizando un medio de crecimiento (10% suero fetal bovino, 10% de caldo triptosa fosfato y 80% de medio 199).

Cuando la monocapa cubrió completamente el fondo de la botella, se eliminó el medio de crecimiento y se agregó la solución viral original. Después de 1 hora de incubación, se eliminó el inóculo viral y se adicionó un medio de mantención (10% de caldo triptosa fosfato, 85% de medio 199 y un 5% de suero fetal bovino), para continuar la incubación por 72 hrs. más.

Diariamente, se observó la monocapa para detectar la aparición del efecto citopático (**ECP**), teniendo como control positivo una cepa comercial de virus Gumboro adaptada a fibroblastos de embrión de pollo. Al cabo de 72 hrs, el cultivo fue retirado de la estufa y agitado, hasta desprender la monocapa. En seguida el cultivo fue congelado, siendo descongelado después de unas horas, repitiéndose este ciclo 3 veces, hasta romper completamente la monocapa.

La monocapa desprendida fue centrifugada, para obtener el sobrenadante, y utilizarlo en el siguiente pasaje. Se realizaron pasajes seriados con cada uno de los aislados, hasta que se observó un claro efecto citopático del virus Gumboro.

#### **4.2.4.2.- Producción de sueros hiperinmunes**

Para la producción de sueros hiperinmunes, se utilizaron pollos LPE de 8 semanas de edad, los cuales se mantuvieron en unidades de aislamiento, hasta que los sueros fueron cosechados.

Las aves recibieron dos estímulos antigénicos endovenosos de  $10^3$  DIE<sub>50</sub>/50 µl, con el sobrenadante del homogeneizado de las membranas corioalantoídeas del cuarto pasaje en huevos embrionados, de cada aislado de campo. A las 8 semanas de edad, recibieron la primera dosis y cinco días después un segundo estímulo; transcurridos 15 días más tarde, las aves fueron sacrificadas y desangradas para obtener el suero.

Los sueros correspondientes a cada aislado de campo, fueron separados en alícuotas y congelados, para luego ser titulados a través de una seroneutralización método beta (suero diluido -virus constante), según Villegas (1982).

Los sueros que presentaron los títulos seroneutralizantes más altos, para cada aislado, fueron utilizados en la prueba de parentesco. Para realizar la seroneutralización cruzada y establecer el grado de parentesco antigénico, se utilizó la metodología descrita por Jackwood y Saif (1987).

#### **4.2.4.3.- Titulación viral**

A los aislados que fueron adaptados a cultivos de fibroblastos, se les determinó la dosis infectante cultivo celular 50% (TCID<sub>50</sub>), luego la TCID<sub>50</sub> se calculó aplicando la fórmula de Reed y Muench, según la metodología de Villegas (1982).

#### **4.2.4.4.- Seroneutralización cruzada**

Para realizar la seroneutralización cruzada, se aplicó la metodología de Mc.Ferran y col.(1980)y Jackwood y Saif (1987).

#### 4.2.4.5. - Parentesco antigénico

El grado de parentesco antigénico entre dos aislados (R), se estableció aplicando la fórmula de Archetti y Horsfall (1950) a los resultados de la seroneutralización cruzada, según la siguiente fórmula:

$$R = \sqrt{\frac{\begin{array}{l} \text{Título virus 1 con antisuero contra virus 2} \\ \times \text{Título virus 2 con antisuero contra virus 1} \end{array}}{\begin{array}{l} \text{Título virus 1 con antisuero contra virus 1} \\ \times \text{Título virus 2 con antisuero contra virus 2} \end{array}}}$$

La interpretación de los valores de parentesco antigénico para los aislados de BIA, se realizó de acuerdo a Bayyari y col, (1996b), el cual señala:

<b>PARENTESCO ANTIGENICO (%)</b>	<b>INTERPRETACION</b>
< 10	OTRO SEROTIPO
10 - 31	SUBTIPO MAYOR
32 - 70	SUBTIPO MENOR
> 71	IDENTICO

#### 4.3.- ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos entre los grupos del estudio de patogenicidad y protección vaccinal, fueron evaluados a través del test no paramétrico Kruskal-Wallis (Spiegel, 1991), determinándose las diferencias significativas por la dócima de Comparaciones múltiples de Dunn. Todos los test se realizaron a través del programa estadístico INSTAT Graphpad Software V 2.05c; Copyright 1990-1994.



## 5.- RESULTADOS

### 5.1.- AISLAMIENTO VIRAL

A partir de las bolsas de Fabricio atroficas de los pollos centinelas (LPE) enviados a planteles nacionales de Broilers, se obtuvieron cinco aislados virales, denominándose aislados G-1, G-2, G-3, G-4 y G-5.

Los Antígenos preparados en bolsa de Fabricio para cada uno de los aislados virales de campo, produjeron claras bandas de precipitación en la prueba de Inmunodifusión en Gel Agar (AGP), frente al antisuero comercial del virus de la Bursitis Infecciosa Aviar (VBIA), y no provocaron precipitación al confrontarlos con sueros contra Reovirus, Adenovirus y virus de la enfermedad de Marek.

La mortalidad embrionaria específica por pasaje y acumulada, producida por los diferentes aislados de campo del VBIA, se muestra en el Cuadro N° 1.

**Cuadro N°1**

#### **MORTALIDAD EMBRIONARIA ESPECIFICA POR PASAJE Y ACUMULADA, EN HUEVOS LPE INOCULADOS CON AISLADOS DEL VBIA .**

Aislados VBIA	NUMERO DEL PASAJE EN HUEVOS EMBRIONADOS				Mortalidad Acumulada	
	1°	2°	3°	4°	N°	%
<b>G-1</b>	0/5 <sup>1</sup>	3/5	2/5	3/5	8/20	40
<b>G-2</b>	1/5	1/5	1/5	3/5	6/20	30
<b>G-3</b>	2/4	2/5	3/5	5/5	12/19	63
<b>G-4</b>	4/5	0/5	3/5	2/5	9/20	45
<b>G-5</b>	2/3	1/5	3/5	5/5	11/18	61

<sup>1</sup>: N° embriones muertos / N° huevos inoculados.

Los aislados, excepto G-1, provocaron mortalidad embrionaria desde el primer pasaje, observándose un aumento progresivo, sin embargo, el aislado G-4 mostró una disminución en los pasajes sucesivos. La mortalidad acumulada en los cuatro pasajes varió entre los aislados, siendo mayor en G-3 y G-5 donde alcanzó un 63% y 61% respectivamente, en cambio G-1 tuvo 40%, G-4 45% y G-2 un 30% (Cuadro N° 1). La mortalidad producida por todos los aislados en los diferentes pasajes se presentó mayoritariamente en los días 5<sup>to</sup> y 6<sup>to</sup> posterior a la inoculación (Anexo 1).

Las lesiones embrionarias macroscópicas, considerando su porcentaje en los cuatro pasajes seriados, se presentan para los diferentes aislados del Virus de la Bursitis Infecciosa Aviar, en el Cuadro N° 2 (Anexo 2).

**Cuadro N° 2**

**LESIONES EMBRIONARIAS MACROSCOPICAS PRODUCIDAS POR LOS AISLADOS DEL VBIA.(%)**

<b>LESIONES EMBRIONARIAS MACROSCOPICAS</b>	<b>Aislados de campo de VBIA.(%)</b>				
	<b>G-1</b>	<b>G-2</b>	<b>G-3</b>	<b>G-4</b>	<b>G-5</b>
Enanismo	8	5	30	30	15
Edema Corporal	25	60	80	55	45
Hemorragia Cutánea	15	35	25	25	10
N.H.F.D. <sup>1</sup>	65	85	85	85	50
Imbibición Biliar	25	60	45	60	30
Esplenomegalia	40	70	35	70	30
Congestión Renal	40	40	30	50	30
Uratos Renales	10	5	0	25	10

<sup>1</sup> N.H.F.D.: Necrosis hepática focal diseminada, con aspecto moteado.

Todos los aislados fueron capaces de inducir lesiones embrionarias macroscópicas idénticas, y se presentaron tanto en los embriones muertos como en los que sobrevivieron hasta el día 7 posterior a la inoculación (Fotos 1,2 y 3). La frecuencia de presentación de las lesiones mostró diferencias entre los aislados y entre las lesiones, sin embargo aumentó con el número de pasajes (Anexo 2).

Foto 1

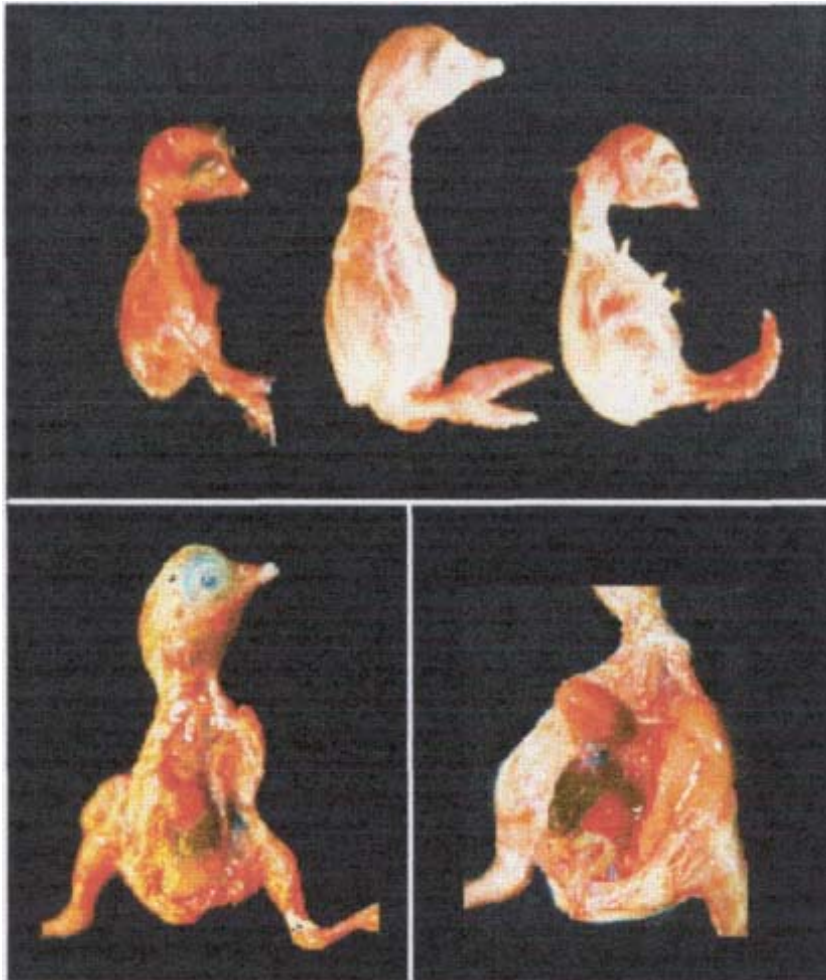


Foto 2

Foto 3

**Fotos 1,2 y 3 : LESIONES MACROSCÓPICAS PRODUCIDAS POR LOS AISLADOS DE CAMPO DEL VBIA. EN EMBRIONES DE POLLO DE 17 DÍAS DE EDAD.**

Foto 1: (izq ) Embrión de pollo con enanismo y congestión cutánea, (centro) embrión control, (der) embrión con enanismo y edema mandibular leve.

Foto 2: Embrión con intenso edema mandibular y severa necrosis hepática moteada difusa e imbibición biliar

Foto 3: Embrión con intensa esplenomegalia.

Las lesiones más frecuentes fueron : necrosis hepática focal diseminada con imbibición biliar, edema corporal y esplenomegalia, y en menor número: enanismo, hemorragia cutánea y uratos renales (Anexo 2).

Los aislados de VBIA, causaron lesiones macroscópicas focales en las membranas corioalantoideas, en algunos de los pasajes sucesivos, tal como se señala en el Cuadro N° 3.

### Cuadro N°3

#### FRECUENCIA DE LESIONES MACROSCÓPICAS EN MCA PARA LOS AISLADOS DEL VBIA, SEGUN NUMERO DE PASAJE EN HUEVOS LPE.

LESION MCA	pasajes huevos embrionado  N°	Aislados de VBIA				
		G-1	G-2	G-3	G-4	G-5
EDEMA	1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	2	1/5*	0/5	0/5	0/5	0/5
	3	1/5	0/5	1/5	1/5	2/5
	4	3/5	2/5	2/5	2/5	1/5
POX	1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	2	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5
	3	0/5	3/5	3/5	2/5	2/5
	4	4/5	3/5	2/5	2/5	2/5

\* = N° de MCA afectadas / N° huevos inoculados

Los aislados produjeron edema leve y focos puntiformes tipo lesión pox; la frecuencia de las lesiones aumentó con el número de pasajes, sin llegar a afectar al total de los huevos inoculados en el cuarto pasaje.

### 5.1.1.- Estudio microscópico de las membranas corioalantoideas

Las MCA cosechadas 33, 48 y 56 hrs. posterior a la inoculación con los diferentes aislados, presentaron trastornos microscópicos circulatorios, inflamatorios y del crecimiento celular, tal como se presenta cualitativamente en el Cuadro N° 4 y con mayor detalle en el Anexo 3.

**Cuadro N° 4**

#### **LESIONES MICROSCOPICAS EN MCA, A LAS 33, 48 Y 64 HRS POSTINOCULACIÓN CON AISLADOS DEL VBIA.**

LESIONES MICROSCOPICAS	AISLADOS DE VBIA																
	G-1			G-2			G-3			G-4			G-5				
	33	48	64	33	48	64	33	48	64	33	48	64	33	48	64		
Hiperplasia Ectodermal	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	
Hiperplasia Endodermal	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Congestión Mesodermal	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Edema Mesodermal	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Infiltrado Heterofílico	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Infiltrado Linfocitario	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+

+ : Presencia de lesión histopatológica - : Ausencia de lesión histopatológica

La presentación de las lesiones observadas en las membranas varió de acuerdo al tiempo de cosecha post inoculación, no existiendo un patrón claro de presentación e intensidad. Las lesiones microscópicas circulatorias fueron congestión y edema mesodermal, las inflamatorias, presencia de infiltrado heterofílico y linfocitario en el mesodermo, y las del crecimiento celular, hiperplasia ectodermal y endodermal. Sin embargo, ninguna de las MCA examinadas presentó cuerpos de inclusión en el ectodermo, endodermo o mesodermo (Cuadro N° 4).

### 5.1.2.- Titulación viral

Los títulos infecciosos de los diferentes inóculos virales fueron : 3,0 DIE<sub>50</sub>/100ul para los aislados G-1, G-2 y G-4, y 4,0 DIE<sub>50</sub>/100ul, para los aislados G-3 y G-5.

## 5.2.- ESTUDIO DE PATOGENICIDAD

### 5.2.1.- Evaluación Clínica y Macroscópica

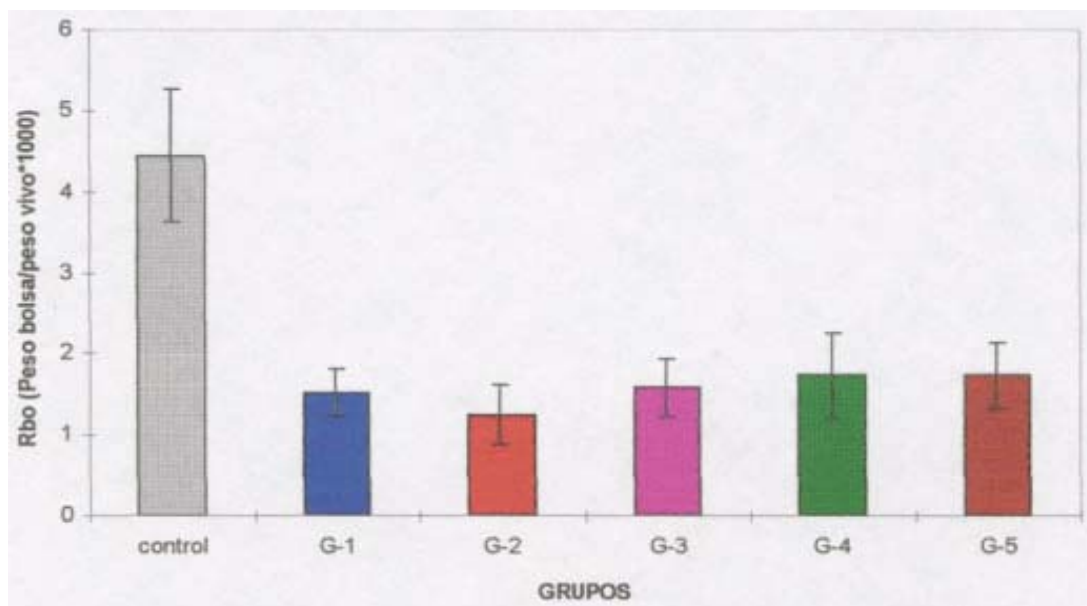
Los pollos infectados con los diferentes aislados de campo del virus de la Bursitis Infecciosa Aviar, no presentaron signos clínicos ni mortalidad. Sin embargo, en el examen macroscópico, las bolsas de Fabricio en todos los aislados mostraron atrofia sin signos de inflamación, en tanto que los bazo presentaron aumento (esplenomegalia) o disminución de tamaño (atrofia) comparado con el grupo control. Los timos e hígados no tuvieron lesiones macroscópicas al compararlos con los órganos del grupo de pollos controles.

### 5.2.2.- Evaluación Morfométrica

El análisis de los datos utilizando la prueba Kruskal-Wallis (Anexo 5) mostró diferencias significativas para los índices  $R_{bo}$ ,  $R_{ba}$  y  $K$ , al comparar el grupo control con los diferentes aislados de campo. Además, las comparaciones múltiples utilizando el test de Dunn (Anexo 6), entregan los siguientes resultados.

#### 5.2.2.1.- Índice morfométrico $R_{bo}$

Los valores del índice morfométrico  $R_{bo}$  (peso bolsa fabricio / peso vivo \* 1000) se presentan en el Gráfico N° 1 (Anexo 9 y 10), considerando el promedio y la desviación estándar para los aislados y grupo control.



**Gráfico N°1: INDICE  $R_{bo}$  PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTANDAR EN POLLOS LPE DE 26 DÍAS DE EDAD INOCULADOS CON AISLADOS DE VBIA. Y GRUPO CONTROL.**

El índice Rbo presentó un valor promedio de 4,4 con una desviación estándar de 0,82, siendo significativamente mayor ( $P < 0.05$ ), respecto a los grupos de los diferentes aislados, entre los cuales no existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

#### 5.2.2.2.- Diámetro Bursal

El grupo control presentó un valor modal 4 para el diámetro transversal de la bursa, en cambio los grupos infectados tuvieron valores menores, tal como se indica en el cuadro N°3 (Anexo 9 y 10).

**Cuadro N° 3**

#### **DIAMETRO BURSAL EN POLLOS LPE DE 26 DIAS DE EDAD, INOCULADOS CON AISLADOS VBIA Y GRUPO CONTROL.**

Diámetro Bursal Transversal	Grupo Control	AISLADOS DE VBIA				
		G-1	G-2	G-3	G-4	G-5
MODA	4*	3**	2***	3	3	3

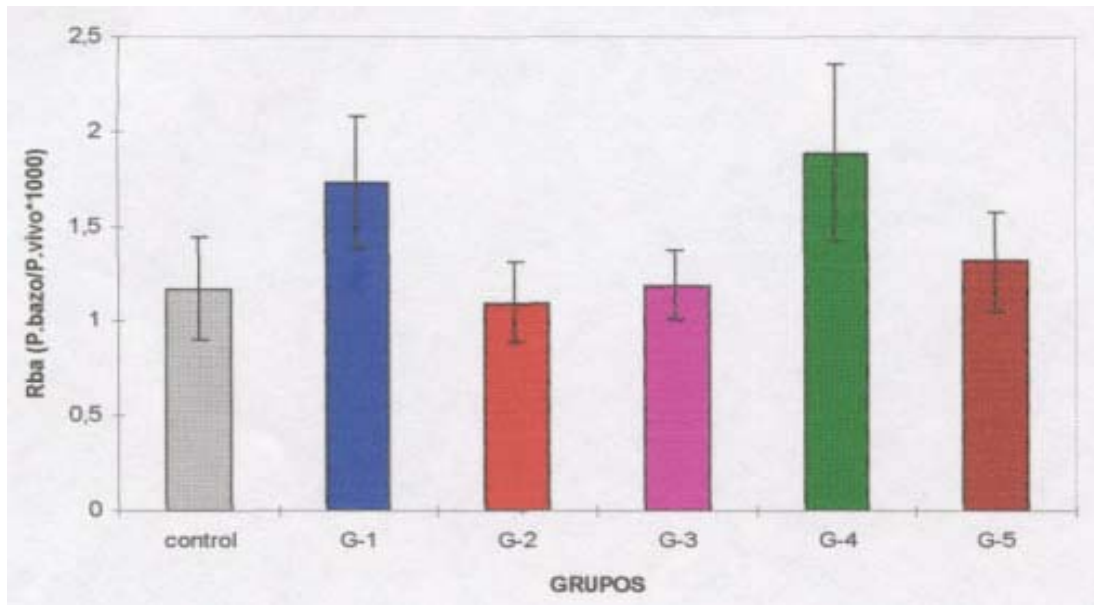
\* = corresponde a 4/8 de pulgada (1,25 cm aproximadamente)

\*\* = corresponde a 3/8 de pulgada (0,94 cm aproximadamente)

\*\*\* = corresponde a 2/8 de pulgada (0,63 cm aproximadamente)

#### 5.2.2.3.- Índice morfométrico Rba

Para este índice el grupo control presentó un valor promedio de 1,17 con una desviación estándar de 0,27, existiendo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con los aislados G-1 y G-4, los cuales presentaron valores mayores al control, sin existir diferencias significativas entre ellos. Los aislados G-2, G-3 y G-5, en tanto, no tuvieron diferencias significativas con el control ni entre ellos. El valor promedio y la desviación estándar del índice  $R_{ba}$  para cada uno de los grupos se presentan a continuación en el Gráfico 2 (Anexo 9 y 10).

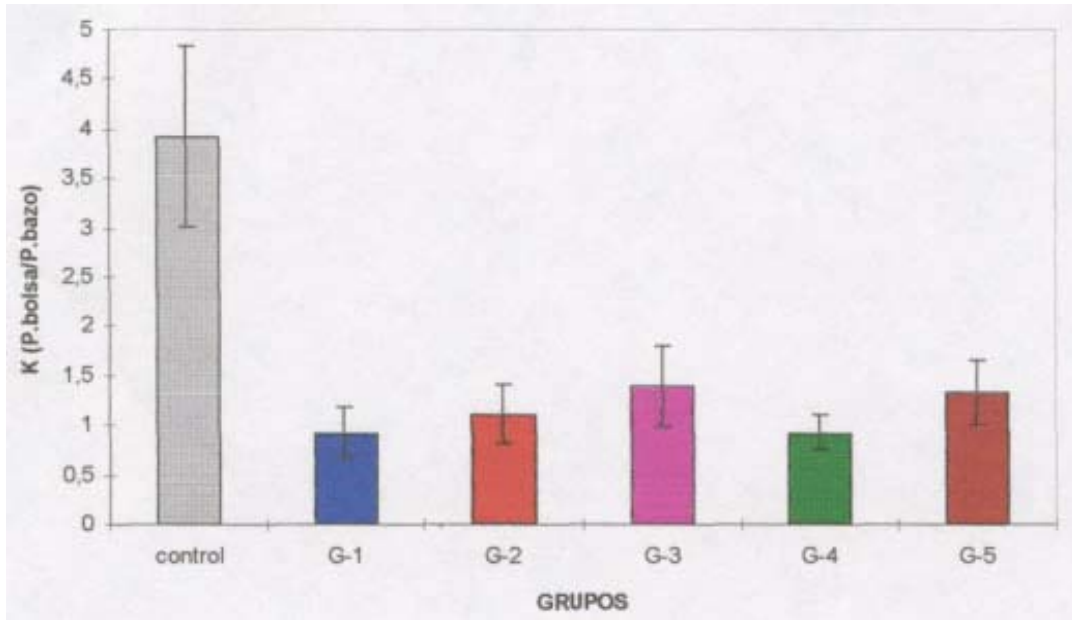


**Gráfico N° 2: INDICE Rba PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR EN POLLOS LPE DE 26 DIAS DE EDAD, INOCULADOS CON AISLADOS DE VBIA Y GRUPO CONTROL.**

#### **5.2.2.4.- Índice morfométrico K**

El índice K (peso bursa/peso vivo) presentó un valor promedio 3,92 con una desviación estándar de 0,88 en el grupo control, y las comparaciones múltiples muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) comparado con los diferentes aislados, ya que estos mostraron valores marcadamente inferiores. Sin embargo, entre los diferentes aislados no hubo diferencias, excepto entre el aislado G-3 y G-4, tal como se presenta a continuación en el Gráfico N° 3 (Anexo 9 y 10).





**Gráfico N° 3: INDICE K PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTANDAR EN POLLOS LPE DE 26 DÍAS DE EDAD, INOCULADOS CON AISLADOS DE VBIA. Y GRUPO CONTROL.**

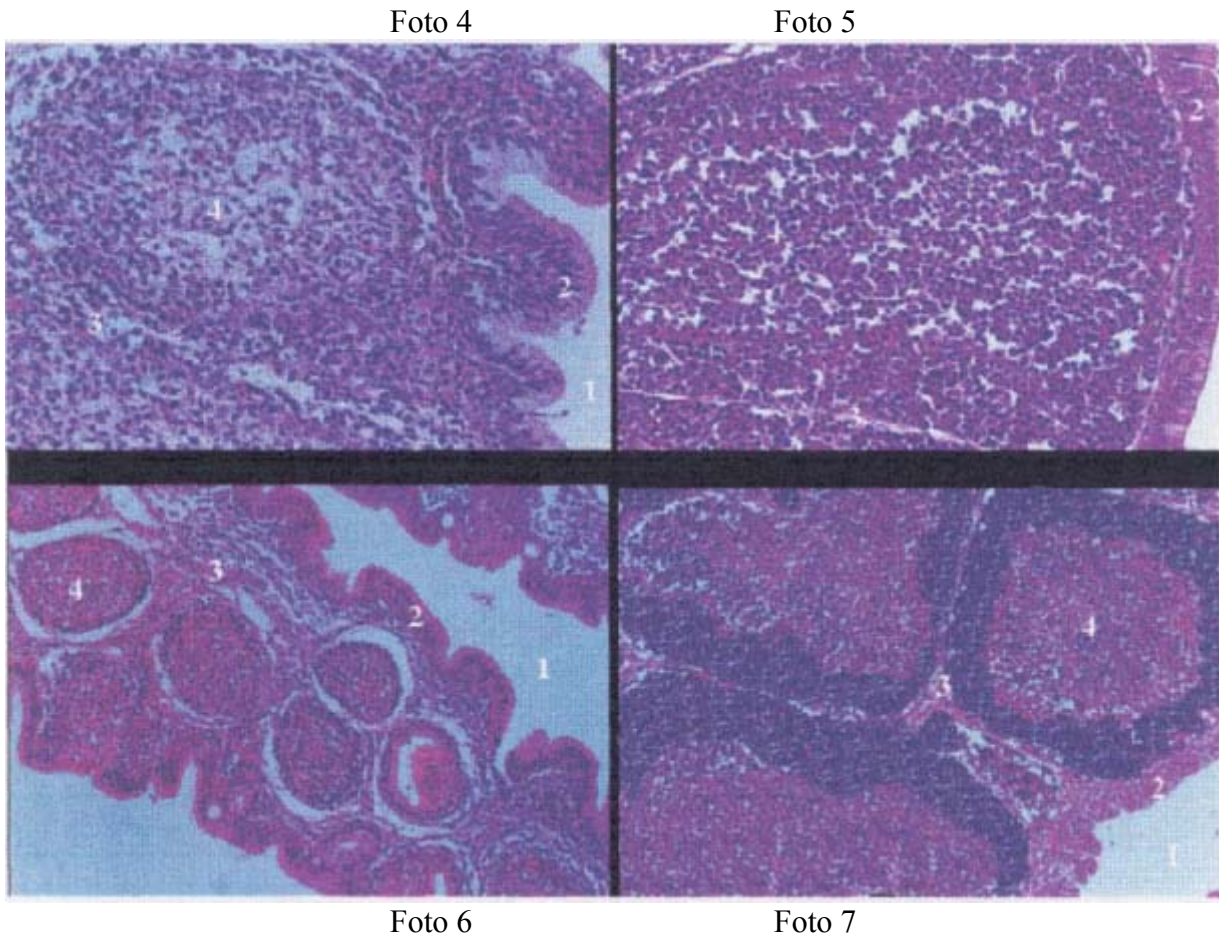
### 5.2.3.- Evaluación Histopatológica

#### 5.2.3.1.- Bolsa de Fabricio

En cuanto a la evaluación microscópica descriptiva, se aprecia que las bolsas de Fabricio presentan diferentes lesiones con distintos grados de severidad, incluso la extensión del daño histológico folicular es diferente. Así, los aislados G-3 y G-5 indujeron daño focal mientras que en los restantes se observó daño folicular difuso.

Los resultados de la evaluación microscópica descriptiva indicando sólo la intensidad de las lesiones, se presentan a continuación en el Cuadro N° 4. Las letras A, B y C corresponden a las aves examinadas en cada grupo (Anexo 10).

Las bolsas de Fabricio en los pollos del grupo control, no evidenciaron ninguna de las alteraciones microscópicas descritas anteriormente, tal como lo muestran los resultados individuales presentados en el Cuadro N° 4. Algunas de las lesiones microscópicas se muestran a continuación en las fotos 4, 5, 6 y 7.



**Fotos 4,5, 6 y 7: LESIONES MICROSCÓPICAS EN BOLSA DE FABRICIO DE POLLOS LPE DE 26 DÍAS DE EDAD PRODUCIDAS POR LOS AISLADOS DE VBIA. INFECTADOS (IZQ.) Y CONTROLES (DER).**

Foto 4: Folículo bursal con intensa depleción linfoide y plegamiento del epitelio. HE (400x).

Foto 6: Pliegue bursal con intensa atrofia y marcado plegamiento. Degeneración quística epiteliial. Folículos con intensa depleción linfoide. Fibroplasia interfollicular. HE (40x).

Foto 5: Folículo linfoide control. Escaso espacio interfollicular. Corteza y médula diferenciables. Epitelio cilíndrico. HE (400x).

Foto 7: Pliegues bursal con folículos linfoides de diferentes tamaños. Diferenciación entre corteza y médula folicular. Escaso espacio interfollicular. HE (40x).

(Números en fotos 4,5,6 y 7: 1 = lumen, 2 = epitelio; 3 = espacio interfollicular; 4 = folículo linfoide)

Cuadro N° 4

**LESIONES BURSALES MICROSCÓPICAS PARA LOS AISLADOS DE VBIA Y GRUPO CONTROL, SEGÚN GRADO DE INTENSIDAD<sup>1</sup>**

LESIONES MICROSCÓPICAS BURSALES	GRUPO	AISLADOS DE VBIA				
	CONTROL	G-1	G-2	G-3	G-4	G-5
	A B C	A B C	A B C	A B C	A B C	A B C
NECROSIS LINFOIDE	0 0 0	1 0 1	2 2 2	0 0 3	0 1 0	0 0 0
DEPLESION LINFOIDE	0 0 0	3 3 3	3 3 3	3 3 3	3 3 3	3 3 3
HIPERPLASIA CELS. RETICULARES	0 0 0	3 3 3	3 3 3	3 3 3	3 3 3	3 3 3
FIBROPLASIA INTERFOLICULAR	0 0 0	1 2 2	1 2 2	1 1 1	2 2 1	1 1 0
DEGENERACIÓN QUISTICA EPITELIAL	0 0 0	0 1 0	0 1 0	0 1 0	2 1 1	0 0 0
DEGENERACIÓN QUISTICA FOLICULAR	0 0 0	0 0 0	1 0 1	1 1 0	0 0 1	0 0 0
EDEMA FOLICULAR	0 0 0	2 0 1	1 0 2	1 0 0	0 1 2	0 0 0
FORMACIÓN ADENOMATOSAS	0 0 0	1 0 1	2 3 2	1 1 1	2 1 1	2 2 2
ATROFIA PLICAL	0 0 0	3 3 3	3 3 3	3 3 3	3 3 3	3 3 3

<sup>1</sup>: Los grados de intensidad de la lesión son : 0 = ausente , 1 = leve , 2 = moderado y 3 = severo

Respecto a las diferentes lesiones histopatológicas encontradas, los resultados muestran que la depleción linfóide e hiperplasia de células reticulares medulares, acompañada por atrofia plical, fueron severas en todos los grupos inoculados. Además, la necrosis linfóide fue moderada en las bolsa de los pollos inoculados con el aislado G-2, y leve para los aislados G-1, G-3 y G-4. La fibroplasia interfolicular fue moderada en las bolsas infectadas por los aislados G-1, G-2, G-4, mientras que en los aislados G-3 y G-5 la lesión fue de carácter leve.

La degeneración quística epitelial, se presentó con intensidad leve en los cortes de las bolsas de los grupos inoculados con los aislados G1, G2, G3, mientras que en G-4 fue leve y moderado. Además, los grupos inoculados con los aislados G-2, G-3 y G-4 mostraron degeneración quística folicular de carácter leve. Por otro lado, el aislado G-2 provocó formaciones adenoides o adenomatosas epiteliales intensas, G-5 y G-4 moderadas, y los aislados G-1, G-3 fueron leves.

El epitelio de los pliegues bursales, presentó formaciones papilares severas con el aislado G-2, moderado en G-3, G-4, G-5, y leves con el aislado G-1.

### 5.2.3.2.- Bazo

Los aislados G-2 y G-3 produjeron leve disminución del número de linfocitos correspondiendo a un grado de daño 1 (leve disminución de linfocitos), en cambio en los bazos de los restantes grupos no se presentaron lesiones (grado 0).

### 5.2.3.3.- Timo

Los Timos evaluados en los diferentes grupos experimentales y en el grupo control, no evidencian alteraciones microscópicas.

### 5.2.3.4.- Hígado

La evaluación microscópica de las muestras hepáticas examinadas se presentan a continuación en el Cuadro N°5. Las letras A, B y C corresponden a los diferentes individuos examinados.

**Cuadro N° 5**

### **LESIONES HEPÁTICAS MICROSCÓPICAS PARA LOS AISLADOS DEL VBIA Y GRUPO CONTROL, SEGÚN GRADO DE INTENSIDAD<sup>3</sup>.**

LESIONES MICROSCÓPICAS	GRUPO	AISLADOS DE VBIA				
	CONTROL	G-1	G-2	G-3	G-4	G-5
	A B C	A B C	A B C	A B C	A B C	A B C
TUMEFACCION TURBIA	0 0 0	0 0 2	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
APOPTOSIS	0 0 0	0 0 0	1 1 1	0 0 0	0 0 0	0 0 0
D.E.A <sup>1</sup>	0 0 0	0 0 2	0 0 0	0 0 1	0 0 0	0 0 0
CONGESTION	0 0 0	0 0 0	0 0 0	1 1 0	0 0 0	0 0 0
H.C.K. <sup>2</sup>	0 0 0	0 0 2	0 0 0	0 0 0	1 1 0	1 1 0

<sup>1</sup> D.E.A.: disociación de la estructura arquitectónica <sup>2</sup> H.C.K.: hipertrofia de las células de Küpfer

<sup>3</sup> Intensidad de lesiones: 0 = ausente 1= leve 2= moderado 3= severo

Las lesiones hepáticas observadas no presentaron similitud entre los diferentes aislados, siendo de carácter leve a moderado. La hipertrofia de las células de Küpfer, se presentó en forma moderada en G-1, y leve en G-4 y G-5. El aislado G-1 muestra leve tumefacción turbia y moderada disociación de la estructura arquitectónica. El aislado G-2 indujo leve apoptosis, G-3 mostró leve congestión y disociación de la estructura arquitectónica.

### 5.3.- ESTUDIO DE PROTECCION

#### 5.3.1.- Medición de la respuesta vaccinal

La respuesta vaccinal inducida por la vacuna intermedia a virus vivo BURSINE-2, considerando un total de 64 sueros, 14 días después de la vacunación, presentó en la seroneutralización, un título geométrico medio igual a 243. Sin embargo, se observó una amplia variación en los títulos, tanto entre grupos como dentro de los grupos vacunados previo al desafío, tal como se señala en el Cuadro N° 6 (Anexo 4).

**Cuadro N° 6**

#### **TITULOS NEUTRALIZANTES PRODUCIDOS POR LA VACUNA BURSINE-2 EN POLLOS LPE DE 35 DÍAS , VACUNADOS VÍA ORAL A LAS 3 SEMANAS DE EDAD.**

GRUPOS VACUNADOS	TITULOS SEROLOGICOS	
	TITULO MEDIO GEOMETRICO	RANGO DE VARIACION
G-1 (N= 15)*	113	20 - 320
G-2 (N= 10)	279	20 - 1280
G-3 (N= 15)	40	20 - 320
G-4 (N= 15)	243	20 - 5120
G-5 (N= 15)	453	20 - 5120

\* = Número de sueros muestreados

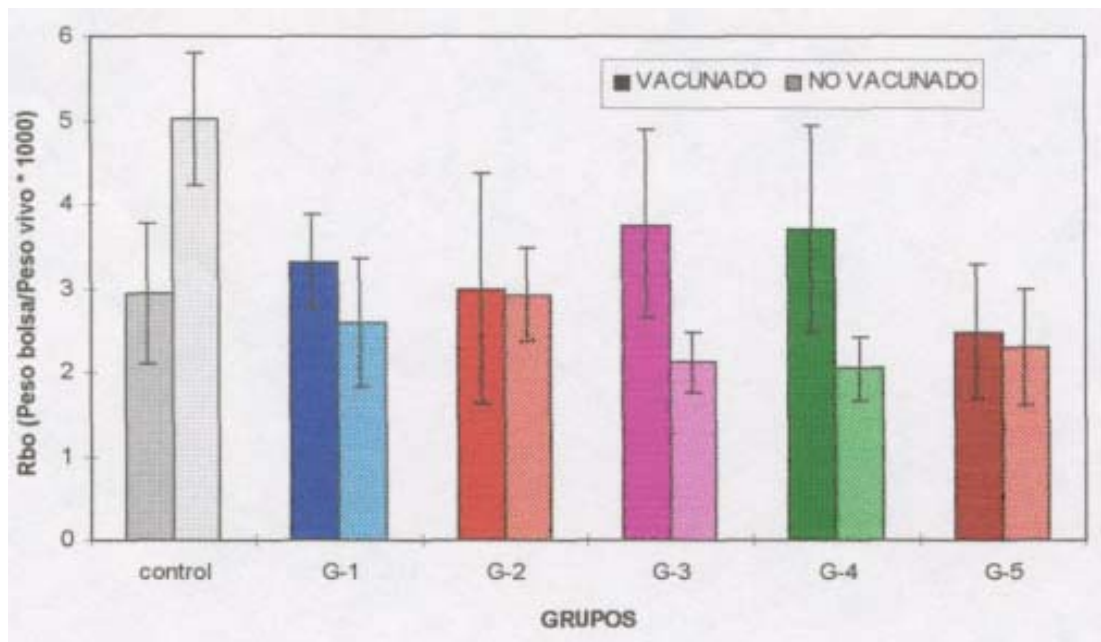
Los sueros de las aves de los grupos No vacunadas, no produjeron bandas de precipitación frente a un antígeno precipitante preparado en bolsa de Fabricio, ni fueron capaces de neutralizar un antígeno de virus Gumboro adaptado a cultivo de fibroblastos de embrión de pollo.

#### 5.3.2.- Evaluación Morfométrica

El análisis de los datos utilizando la prueba Kruskal-Wallis (Anexo 6) mostró diferencias significativas, al comparar los grupos controles (negativo y positivo) y los grupos desafiados con y sin vacuna. El análisis *a posteriori* utilizando el test de Dunn (Anexo 7) para comparaciones múltiples señaló los siguientes resultados, al considerar los siguientes contrastes: 1) control negativo v/s desafiados vacunados y no vacunados, 2) control positivo v/s desafiados vacunados y no vacunados y 3) desafiado vacunado v/s desafiado no vacunado.

### 5.3.2.1.- índice morfométrico Rbo :

EL valor promedio y la desviación estandar del índice Rbo para los diferentes grupos del estudio de Protección Vaccinal se presentan en el Gráfico 4 (Anexo 10 y 11).

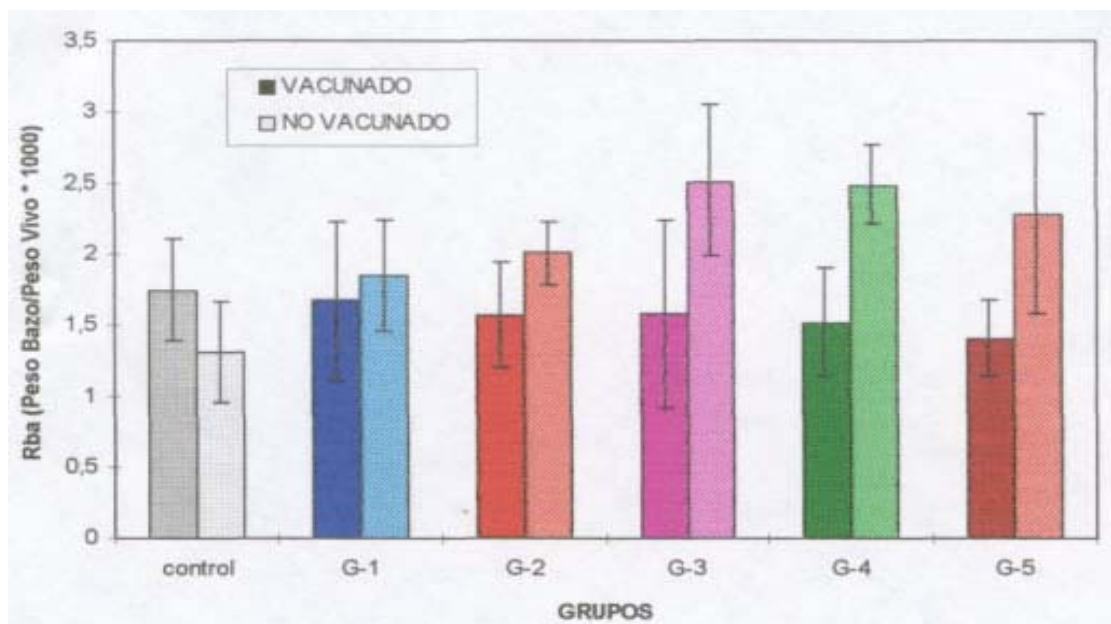


**Gráfico N° 4: INDICE RBO PROMEDIO Y DESVIACION ESTANDAR EN POLLOS LPE DE 38 DÍAS DE EDAD, DE LOS GRUPOS CONTROLES, VACUNADOS-DESAFIADOS Y SOLO DESAFIADOS CON AISLADOS DEL VBIA.**

El grupo control no vacunado presentó un índice Rbo igual a 5,02 con desviación estándar de 0,86, en tanto que el control vacunado mostró un valor de 2,93 con una desviación de 0,79, siendo esta diferencia altamente significativa ( $p < 0,01$ ). Al comparar el control positivo con los diferentes grupos desafiados vacunados y no vacunados, se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas, situación que difiere al comparar contra el control negativo. Aquí sólo el grupo vacunado/desafiado con G-3 y vacunado/desafiado con G-4 no presentan diferencias estadísticamente significativas. Al comparar los grupos desafiados con y sin vacuna, resultan diferencias estadísticamente significativas para los aislados G-3 y G-4.

### 5.3.2.2.- Índice morfométrico Rba

EL valor promedio y la desviación estandar del índice Rba para los diferentes grupos del estudio de Protección vaccinal se presentan en el Gráfico 5 (Anexo 10 y 11).



**Gráfico N° 5: INDICE RBA PROMEDIO Y DESVIACION ESTANDAR EN POLLOS LPE DE 38 DÍAS DE EDAD, PARA LOS GRUPOS CONTROLES, VACUNADOS- DESAFIADOS Y SOLO DESAFIADOS CON AISLADOS DEL VBIA.**

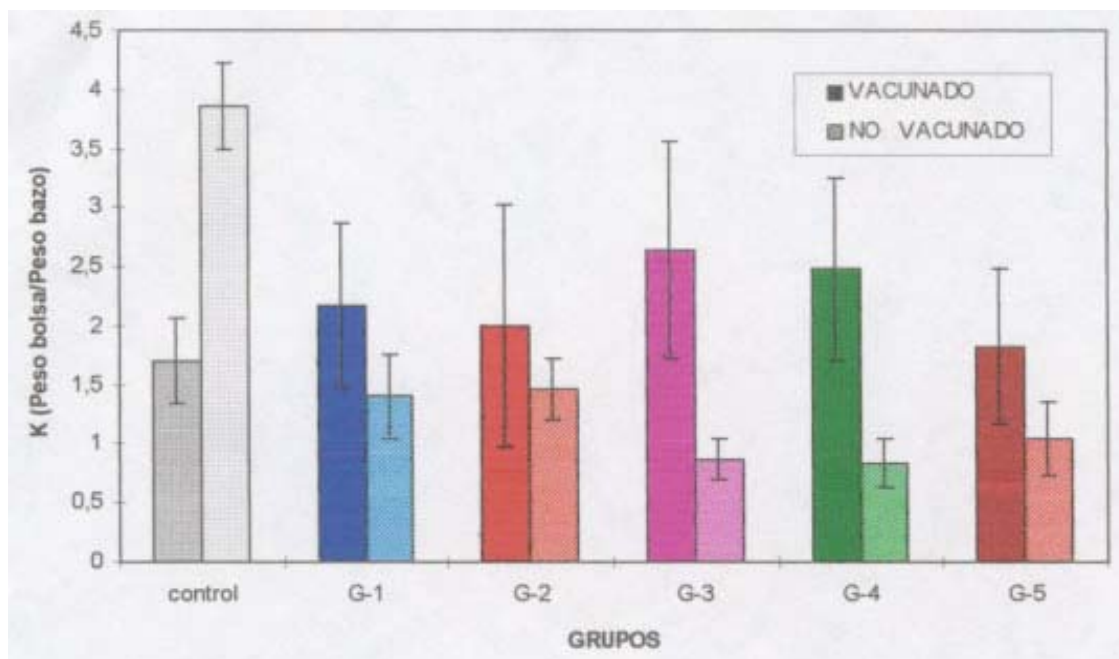
El grupo control no vacunado presentó un índice Rba (peso bazo/peso vivo \* 1000), igual a 1,32 con desviación estándar de 0,18, en tanto que el control vacunado mostró un valor de 1,74 con una desviación de 0,35, sin diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ambos.

Al comparar el control positivo con los diferentes grupos desafiados vacunados y no vacunados, se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), en tanto que con el control no vacunado, existen diferencias significativas entre el grupo desafiado con G-2, desafiado con G-3, desafiado con G-4 y desafiado con G-5, los cuales presentaron valores superiores. Al comparar los grupos desafiados con y sin vacuna, resultan diferencias significativas sólo para los aislados G-3, G-4 y G-5, ya que los grupos desafiados no vacunados presentan valores superiores a los del grupo desafiado vacunado.

### 5.3.2.3.- Índice morfométrico K

EL valor promedio y la desviación estándar del índice K (peso bolsa/peso bazo), para los diferentes grupos del estudio de protección vaccinal se presentan en el Gráfico 6 (Anexo 10 y 11).





**Gráfico N° 6: INDICE K PROMEDIO Y DESVIACION ESTANDAR EN POLLOS LPE DE 38 DÍAS DE EDAD, PARA LOS GRUPOS CONTROLES, VACUNADOS-DESAFIADOS Y SOLO DESAFIADOS CON AISLADOS DE VBIA**

El grupo control no vacunado presentó un índice K igual a 3,85 con desviación estándar de 0,74, en tanto que el control vacunado mostró un valor de 1,69 con una desviación de 0,36, siendo esta diferencia altamente significativa ( $p < 0,01$ ). Al comparar el control positivo con los diferentes grupos desafiados vacunados y no vacunados, se observa que no existen diferencias significativas, sin embargo, frente al control negativo la situación cambia, ya que sólo el grupo vacunado/desafiado con G-3, vacunado/desafiado con G-4 y vacunado /desafiado con G-5 no muestran significancia. Al comparar los grupos desafiados con y sin vacuna, resultan diferencias estadísticamente significativas para los aislados G-3, G-4 y G-5, ya que los grupos desafiados no vacunados presentan valores menores a los grupos desafiados y vacunados.

#### 5.3.2.4. -Diámetro Bursal

Los valores modales del diámetro transversal de la bolsa, para los diferentes grupos del estudio de protección se presentan en el cuadro N° 7 (Anexo 10 y 11).



Cuadro N° 7

**DIAMETRO BURSAL EN POLLOS LPE DE 38 DIAS DE EDAD, PARA LOS GRUPOS CONTROLES, VACUNADOS- DESAFIADOS Y SOLO DESAFIADOS CON AISLADOS DEL VBIA.**

GRUPOS	AISLADOS DEL VBIA.				
	G-1	G-2	G-3	G-4	G-5
DESAFIADOS VACUNADOS	4**	4	4	4	4
SOLO DESAFIADOS	3*	4	3-4	3	3
CONTROL POSITIVO 1	3				
CONTROL NEGATIVO2	4				

1= Control sólo vacunado 2= Control no vacunado no desafiado

\* = corresponde a 3/8 de pulgada ( 0.94 cm aproximadamente)

\*\* = corresponde a 4/8 de pulgada ( 1,25 cm aproximadamente)

El control negativo tiene un valor modal mayor que el control positivo, en tanto que los grupos vacunados desafiados son iguales al control negativos, los desafiados no vacunados son iguales al control positivo.

### 5.3 3.- Determinación de la Protección Vaccinal

El porcentaje de protección vaccinal de la vacuna Bursine-2, frente al desafío con los diferentes aislados de BIA, se presenta a continuación, en el Cuadro N° 8.

**Cuadro N° 8**

**PROTECCIÓN VACCINAL PORCENTUAL OTORGADA POR LA VACUNA BURSINE-2, FRENTE AL DESAFÍO CON LOS AISLADOS DEL VBIA.**

<b>CEPA DESAFIO</b>	<b>PROTECCION VACCINAL <sup>1</sup>(%)</b>
G-1	100
G-2	90
G-3	100
G-4	100
G-5	95

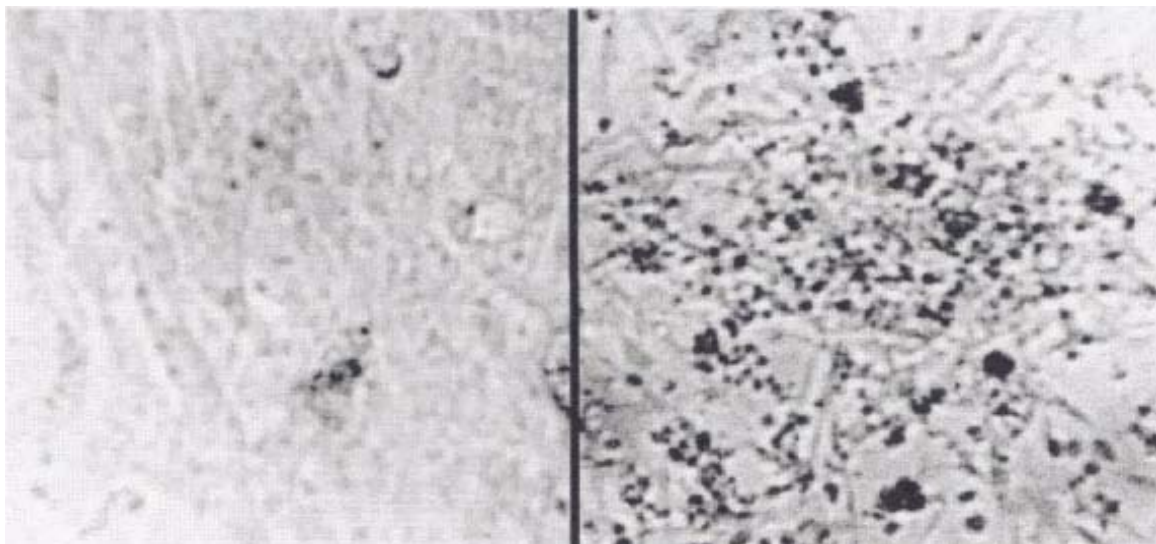
<sup>1</sup> Aves con Índice Rbo, mayor al valor (promedio menos 2 desviaciones estándares), del grupo control positivo (solo vacunado)

El porcentaje de protección vaccinal, calculado considerando el control positivo, estuvo sobre el 90% para todos los aislados de VBIA.

## **5.4 SEROTIFICACION VIRAL**

### **5.4.1 Adaptación a cultivos de fibroblastos**

Los aislados de campo G-1, G-2 y G-4 fueron adaptados a cultivo de fibroblastos, presentando un claro efecto citopático desde el pasaje número 13. En cambio, los aislados G-3 y G-5, no presentaron efecto citopático, incluso después de 18 pasajes seriados. El ECP se presentó a las 96 hrs de inoculación del cultivo, y se caracterizó porque en la monocapa se desarrollaron condensaciones o granulaciones con aspecto de arenilla y un desprendimiento celular progresivo, tal como se aprecia en la Foto 8.



**FOTO 8: EFECTO CITOPÁTICO (ECP) EN CULTIVO DE FIBROBLASTOS, 96 HRS POSTINOCULACION CON AISLADOS DEL VBIA. MONOCAPA CONTROL (IZQ.) E INFECTADA (DER).250X**

#### 5.4.2 Titulación viral

La titulación viral, fue realizada con el pasaje 18 para el aislado G-1, y con el pasaje 16 para los aislados G-2 y G-4.

Los títulos infecciosos de los diferentes aislados adaptados a fibroblastos de embrión de pollo, se muestran a continuación, en el Cuadro N° 9.

**Cuadro N° 9  
TÍTULO DE CEPAS AISLADAS Y DE REFERENCIA DEL VBIA ADAPTADAS A CULTIVO DE FIBROBLASTOS.**

CEPA	TCID <sub>50</sub> *
G-1	5,5
G-2	4,37
G-3	4,37
901024**	5,16

\* : dosis infecciosa cultivo celular 50% \*\* : aislado comercial referencia de VBIA

### 5.4.3.- Titulación de sueros hiperinmunes

Los títulos de los sueros hiperinmunes seleccionados para los virus adaptados a fibroblastos fueron : 40.950 TCID50 para G-1, y 5.120 TCID50 para G-2, G-4 y 901024.

### 5.4.4.- Seroneutralización cruzada

Los títulos medios geométricos obtenidos en la Seroneutralización-beta cruzada, aparecen indicados en el Cuadro N° 10.

**Cuadro N° 10**  
**TITULOS SERONEUTRALIZANTES CRUZADOS, ENTRE AISLADOS Y CEPA**  
**REFERENCIA DEL VBIA ADAPTADOS A CULTIVO DE FIBROBLASTOS**

VIRUS	ANTISUEROS HIPERINMUNES			
	G-1	G-2	G-4	901024*
G-1	25.600	3.840	40.960	40.960
G-2	1.920	1.920	40.960	40.960
G-4	1.280	480	6.400	7.680
901024	960	960	25.600	10.240

\* Cepa comercial (VBIA) adaptada a fibroblastos de embrión de pollo

### 5.4.5.- Parentesco serológico

Los valores del grado de relación antigénica ("R"), indican un alto parentesco entre la cepa clásica usada como referencia y los aislados G-2 y G-4. En cambio, se muestra que el aislado G-1 está escasamente emparentado con los aislados G2, G4 y con la cepa 901024 (Cuadro N° 11).

Cuadro N° 11

**RELACIÓN ANTIGÉNICA (%) ENTRE LOS AISLADOS Y CEPA REFERENCIA  
DEL VBIA**

	RELACION ANTIGENICA			
	G-1	G-2	G-4	901024
<b>G-1</b>	<u>100</u>	39	57	39
<b>G-2</b>		<u>100</u>	126	141
<b>G-4</b>			<u>100</u>	173
<b>901024*</b>				<u>100</u>

## 6.- DISCUSION

### 6.1.- AISLAMIENTO VIRAL:

El presente trabajo demuestra que las cepas aisladas desde dos planteles de broilers con antecedentes de inmunosupresión, corresponden a cepas del virus de la Bursitis Infecciosa Aviar (VBIA), tal como lo señalan los resultados obtenidos en la prueba de Inmunodifusión en gel agar (AGP) y las inoculaciones en huevos embrionados LPE (Cuadro N° 1 y 2).

Las cepas de VBIA, fueron detectadas a las 72 hrs en el extracto de bolsas de Fabricio de pollos LPE inoculados vía oral con el sobrenadante del macerado de las bolsas atóricas, extraídas de las aves centinelas provenientes de los planteles estudiados. Utilizando esta misma prueba, Hirai y col., (1972), Barra (1979), y Muñoz (1982), obtuvieron similares resultados al estudiar brotes de campo.

El aislamiento se confirmó a través de la inoculación en huevos LPE embrionados, ya que las infecciones virales experimentales producen muerte, lesiones externas e internas, acompañadas de lesiones en la membrana corioalantoidea, que permiten la diferenciación viral (Serme, 1989). Así, las cepas estudiadas produjeron mortalidad embrionaria en los días 5 y 6 posterior a la inoculación, siendo la frecuencia de presentación en el primer pasaje de los aislados entre un 0 y 80% (Cuadro N°1 y Anexo 1). La mortalidad embrionaria observada fue tardía, lo cual difiere con lo señalado en la literatura para cepas clásicas, ya que diversos autores describen su aparición entre los días 2 y 5 postinoculación (Hitchner, 1970; Cho, 1979; Lukert y Saif, 1991). Así mismo, Lucio y col.,(1971), Meulemans y col., (1974), Rosales y col., (1989a), Tsukamoto y col., (1992), Hassan y col.,(1996), y Yamaguchi y col., (1996), observaron mortalidad desde el día 3 postinoculación, incluso en algunos casos de un 100%, al utilizar aislados de campo. Por otra parte, ya Leyk en 1971 y Martínez y Casanova, en 1979, señalaron mortalidades desde el 4° día en el primer pasaje, con 90% y 19% respectivamente. Barra (1979) observó un 100% de mortalidad en el primer pasaje en los días 4 y 5 postinoculación del extracto de bolsas de aves clínicamente enfermas. Rosenberger y col., (1985) señalan que las cepas variantes de Delaware (A, D, E, y G), producen escasa o ninguna mortalidad embrionaria.

La manifestación más tardía de la mortalidad, puede deberse a un bajo título infeccioso en el momento de la inoculación, por menor patogenicidad de los aislados o por una baja adaptación de los mismos al tejido embrionario. Esto último se demuestra por el aumento progresivo de la mortalidad hasta llegar al 100%, con la consiguiente adaptación de los aislados al sustrato embrionario tal como ha sido observado por Winterfield y col.,(1972) y explicado por Joklik y col. (1980) debido a la selección progresiva de mutantes que pueden multiplicarse mejor en las células utilizadas para el aislamiento que en los tejidos infectados originalmente. Sin embargo, el momento de la presentación de la mortalidad se mantuvo en los pasajes sucesivos, lo cual parece ser una característica propia y distintiva de estos aislados de campo.

En relación a las cepas variantes, Rosenberger y col.,(1985) señalan que éstas producen escasa mortalidad y en forma tardía.

Las lesiones macroscópicas observadas en los embriones inoculados con los diferentes aislados de campo (Cuadro N°2, fotos 1,2 y 3), corresponden con lo descrito por otros autores, los que señalan como lesiones más frecuentes en embriones muertos tardíamente: hígado con necrosis moteada y color verde debido a la imbibición biliar, esplenomegalia, edema mandibular, palidez del corazón, congestión cutánea y congestión renal (Hitchner, 1970; Lucio y col, 1971; Meulemans y col., 1974; Barra, 1979; Cho, 1979; Martínez y Casanova, 1979; Rosales y col, 1989a; Lukert y Saif, 1991; Perera y col., 1993; Wyeth, 1995; Hassan, y col., 1996; Yamaguchi y col.,1996). Por otro lado, Leyk (1971) indica enanismo embrionario; Martínez y Casanova (1979) comunican la existencia de congestión pulmonar, palidez y focos necróticos en el corazón; Barra (1979) reconoce focos necróticos en el bazo, necrosis renal y líquido alantoideo color verdoso en embriones con lesión hepática, además, Lukert y Saif (1991) describen la presencia de uratos renales. Estas últimas lesiones no se presentaron en los embriones inoculados con los aislados nacionales estudiados, lo cual puede explicarse por el escaso número de pasajes que se realizaron en huevos embrionados, con lo cual la adaptación del virus puede aún ser incompleta o bien debido a bajo título viral. Sin embargo, en la literatura no se indican los títulos virales inoculados ni el número del pasaje en el cual se observaron las lesiones, con lo cual no se puede corroborar lo antes dicho. Por otro parte, respecto a las variantes de Delaware (A,D,E y G), Rosenberger y col.,(1985) señalan que estas cepas producen marcada necrosis hepática y esplenomegalia en los embriones de pollo.

Si bien en la literatura consultada no se señala la frecuencia de presentación de las lesiones embrionarias, los resultados (Cuadro N°2 y Anexo 2) muestran que el edema cutáneo y la imbibición biliar asociados a la afección hepática necrotizante, y la esplenomegalia indicativa de septicemia embrionaria, son las lesiones más importantes a considerar en los aislamientos del VBIA o bien son las que primero aparecen en un proceso de adaptación al sustrato embrionario. La afinidad del virus por el tejido hepático podría deberse a la intensa actividad celular observada en éste órgano, por su rol hematopoyético en el embrión de pollo.

La literatura sobre comparaciones del efecto de cepas variantes y clásicas en embriones es muy escasa, sin embargo, Rosenberger y col. (1985) señalan que las variantes de Delaware producen poca mortalidad y los embriones presentan esplenomegalia y necrosis hepática. Sin embargo, es necesaria mayor información comparativa ya que habitualmente las lesiones descritas son similares en cepas clásicas y variantes .

En esta investigación, las MCA de los huevos inoculados presentaron lesiones tipo pox de aspecto puntiforme focal y color blanco, especialmente en el 3er y 4° pasaje en huevos embrionados (Cuadro N° 3). Al respecto, Joklik y col. (1980), definen estas lesiones como áreas que pueden ser de color blanco opacas o rojas, visibles macroscópicamente y que corresponden a zonas de destrucción, migración y/o proliferación celular, o bien a edema y hemorragia (áreas rojas), asociados a infecciones virales. Así mismo, Fahey y Crawley (1954) y Petek y Mandelli (1968), describen puntos opacos en las MCA de huevos inoculados con VBIA, en tanto que, Giambrone y

col., (1977) indican la existencia de placas con inmunofluorescencia positiva a VBIA. Más tarde, Barra, (1979), describe la aparición de puntillado blanco en las membranas corioalantoideas, al inocular muestras originales de bolsa de Fabricio, obtenidas desde aves clínicamente enfermas en uno de los primeros brotes registrados en el país. De igual manera, Christopher (1982), menciona que una cepa de VBIA patógena para patos, produjo lesiones pox en MCA. Sin embargo, en contraposición a lo descrito en el ensayo, Lukert y Saif (1991), señalan que el virus de la Bursitis Infecciosa Aviar no produce dichas lesiones, con lo cual, lo observado puede significar una contaminación con otro virus.

La posible contaminación secundaria a la que se hace mención, podría explicarse debido a la estrecha relación existente entre la bolsa de Fabricio y la cloaca (Sisson y Grossman, 1982), con lo cual es posible el paso de agentes infecciosos que ingresan vía tracto digestivo. En tal sentido, Pattison y col. (1975) señalan que los agentes contaminantes más frecuentes de encontrar en la bolsa son: Reovirus, virus Leucosis, Adenovirus y el virus de la enfermedad de Marek, todos los cuales son capaces de producir lesiones pox en la membrana corioalantoidea (Calnek y col., 1991), así como atrofia bursal e inmunosupresión (Ridell, 1984; Morales, 1995b; Talavera y col., 1995), por tal motivo es de vital importancia descartar la presencia de algunos de estos virus.

Los adenovirus y reovirus pueden ser diagnosticados a través de la detección de los cuerpos de inclusión (CI) que producen en las células afectadas de la membrana corioalantoidea. Así, los Adenovirus producen CI intranucleares eosinofílicos Cowdry tipo A, en cambio los Reovirus desarrollan CI intracitoplasmáticos, ubicados en las células mesenquimáticas. En relación a lo anterior, el estudio histopatológico realizado en las MCA, a las 33, 48 y 64 horas postinoculación con los aislados estudiados (Cuadro N° 4), no reveló la existencia de cuerpos de inclusión en el ectodermo, mesodermo ni endodermo de los cortes examinados. No obstante, la evaluación histopatológica de estas mismas membranas mostró la presencia de trastornos del crecimiento celular como la hiperplasia del ectodermo y endodermo, alteraciones circulatorias como la congestión y edema mesodermal y lesiones inflamatorias como son el infiltrado de heterófilos y Mucositas. Respecto a estos hallazgos microscópicos, Lucero, (1991) señala similares lesiones en MCA asociadas a daño viral, así mismo, Mayr y col., (1993) señalan que los virus producen degeneración vacuolar, necrosis, cuerpos de inclusión e hiperplasia en el ectodermo y endodermo, por otra parte, en el mesodermo causan infiltración de fibroblastos, heterófilos, linfocitos, eosinófilos y eritrocitos.

No obstante la pureza de los inocules utilizados en el ensayo, queda demostrada porque éstos no produjeron bandas de precipitación al ser confrontados contra sueros mono-específicos para Reovirus, Adenovirus y el virus de la enfermedad de Marek. Así mismo, el chequeo serológico realizado al homogenizado de las MCA, cosechadas 96 horas post inoculación fue negativo frente a esta misma batería de sueros.



## 6.2.- ESTUDIO DE PATOGENICIDAD

Martínez y Casanova (1979), señalan que la primera cepa de BIA aislada en Chile, produjo un cuadro clínico con mortalidad de 2 a 3%, hemorragias pectorales, hígados pálidos, nefromegalia, bolsas de Fabricio hiperémicas, edematosas y con contenido mucoso. Así mismo, Barra (1979), al realizar un estudio experimental con la cepa 6541, aislada en uno de estos primeros brotes, reprodujo un cuadro clínico típico, con abatimiento de las aves, tumefacción, edema y luego atrofia bursal, hemorragias en músculo y timo. Estas primeras descripciones, coinciden con las caracterizaciones que numerosos autores han comunicado para cepas clásicas del VBIA (Cosgrove, 1962; Helmboldt y Garner, 1964; Cheville, 1967; Henry, 1980a y b; Hirai y col., 1979; Okoye y Uzoukwu, 1981; Ley y col., 1983).

Desde entonces, la enfermedad ha tenido carácter enzoótico en nuestro país, no habiendo sido demostrada a la fecha la existencia de cepas con alta virulencia, como las descritas en Japón (Tsukamoto y col., 1995), ni cepas variantes como las reportadas en Delaware (Rosenberger y col., 1985). Por otro lado, en Latinoamérica sólo hay presunciones de la existencia de cepas variantes, sin haber sido aún demostradas (Fernandez, 1995; Morales, 1995a).

Los aislados en estudio, obtenidos a través de pollos centinelas desde planteles con inmunosupresión, fueron incapaces de producir signos clínicos y mortalidad al ser inoculados experimentalmente en pollos LPE. Además, en el examen postmortem sólo se encontraron bursas atroncas sin signos inflamatorios y algunos bazos de mayor tamaño, respecto a los controles.

Estos hallazgos coinciden con lo señalado por Rosales y col.(1989a,b), los cuales al estudiar la patogenicidad de dos cepas variantes (3212 y U-28), tampoco observaron signos clínicos ni mortalidad, sino más bien un cuadro subclínico con intensa atrofia bursal. Así mismo, Rosenberger y col., (1985 y 1987) describen una situación similar al caracterizar las cepas variantes de Delaware (A,D,E,G). De igual forma, Alamsyah y col. (1992 y 1993), caracterizan 3 cepas del serotipo 1 (posibles variantes) aisladas en Washington, las cuales no produjeron mortalidad ni signología (WA-994, WA-678, WA-770). Estos resultados coinciden, además con Banda y Valladares, (1996) los cuales evaluaron la virulencia de 3 aislados mexicanos, posibles variantes (aislados H,G,P), sin observar mortalidad ni signología clínica.

Los resultados de la evaluación morfométrica (Gráfico 1, 2 y 3 y Cuadro N°3), demuestran que las cepas aisladas son capaces de producir un intenso daño en la bolsa de Fabricio, el cual se asocia con esplenomegalia en los aislados G-1 y G-4, estableciéndose además una correspondencia entre el diámetro bursal, la evaluación histopatológica y los índices morfométricos Rbo y K.

La asociación entre la atrofia bursal y la esplenomegalia, expresada a través del índice morfométrico K, ha sido también comunicada por Botero y Uribe, (1992), asociándose con cepas que producen cuadros subclínicos. A pesar de que su presentación no es un signo patognomónico, Fernandez (1995), señala que la presencia de esplenomegalia es indicio de inmunosupresión, ya que

ha observado que la bolsa es de un tamaño mayor al bazo durante los primeros 35 días. Así mismo, el mayor peso de la bolsa respecto al bazo, ha sido también comunicado por otros autores, al utilizar aves LPE y aves comerciales no inmunosuprimidas (Glick, 1959; Dieter y Breitenbach, 1969). Por otro lado, Hirai y col. (1979), observaron deplesión linfoide en la bolsa de Fabricio, y bazo de mayor tamaño a menor edad de infección. Así mismo, los autores Henry y col. (1980b), Moradian y col.(1990) y Perera y col. (1993), también observaron atrofia de la bolsa de Fabricio e incluso atrofia de timo con hipertrofia del bazo. Montgomery y col. (1986), observaron que la cepa Edgar produjo atrofia bursal y esplenomegalia, sin afectar el índice morfométrico de timo. En tanto, Yamaguchi y col.(1996), describen que dos cepas con alta virulencia (cepas OKYM y TKSM), produjeron atrofia bursal y esplenomegalia 4 días post inoculación.

Respecto de las cepas variantes, Sharma y col.(1989), señalan que la variante A produce mayor atrofia de la bolsa, en especial 3 y 5 días post inoculación, comparada con la cepa clásica IM. De igual forma, Rosales y col.,(1989a y b) informan que las variantes VarA y U-28 produjeron atrofia bursal intensa (55%) a los 5 días postinoulación, siendo mayor a la observada con la cepa clásica Edgar. Los mismos autores, describen atrofia bursal de un 75% respecto al control, 7 días postinoculación con las cepas variantes 1312 y U28, sin observar variación en la relación morfométrica del bazo, a pesar de que observó esplenomegalia en infecciones con las cepas variantes Del-A y U-28, menores a la producida por la cepa clásica Edgar . En relación con los resultados del ensayo, Ismail y col. (1990), señalan también, que la variante IN produce intensa atrofia a los 5 (50%) y 10 días post inoculación (70%); por otra parte, Tsai y Saif (1992), observaron marcada atrofia bursal y esplenomegalia, 5 y 10 días postinoculación con las variantes IN y VarE. Hassan y col.(1996) señalan que la variante IN produce atrofia bursal desde el día 4 pi., y la cepa clásica STC y SAL al día 8 pi., sin esplenomegalia; en controversia con Bayyari y col.(1996b), quienes observaron que la cepa variante IBDV-s977, produjo intensa atrofia bursal acompañado con esplenomegalia

Si bien la esplenomegalia ha sido asociada a infecciones con cepas clásicas, también se presenta con cepas variantes, y su ausencia puede estar asociada al tiempo postinfección en que se mida, lo cual señala que esta reacción es temporal. Sin embargo, podría estar ausente en infecciones con algunas variantes, sin estar clara aún la razón de este hecho.

### **6.2.1.- Lesiones microscópicas**

Resulta discutible el hecho de haber examinado 3 muestras por cada grupo desafiado, ya que idealmente debiera haber sido considerado todo el grupo, lo cual no ocurrió por motivos presupuestarios. Sin embargo, al individualizar las aves con examen microscópico, es posible establecer cierta relación teniendo como referencia los valores individuales del índice Rbo. Ya que el objetivo era corroborar dicho índice y pesquisar diferencias respecto de las lesiones microscópicas descritas para cepas clásicas.

Las lesiones histológicas se presentaron con mayor intensidad y cantidad en la bolsa, debido a que este virus alcanza los títulos más altos en éste órgano y en el bazo (Winterfield, 1969; Skeeles y col., 1979).

### 6.2.1.1.- Bolsa de Fabricio

Barra (1979), al caracterizar las lesiones microscópicas producidas por uno de los primeros aislados en el país, señala que la bolsa presenta: necrosis y depleción linfocítica, inflamación aguda con edema, hiperemia, infiltración de heterófilos y hemorragia, en forma intensa entre los días 3 y 5 post inoculación, y luego formación de quistes, repoblamiento linfocítico, aparición de fibroplasia a partir del día 8. Estos hallazgos coinciden con la numerosa bibliografía existente para las diferentes cepas clásicas de virus BIA (Helmboldt y Garner.,1964; Winterfield, 1969; Káuffer y Weiss, 1976; Henry y col., 1980a y b; Ley y col., 1983; Morandian y col.,1990; Nunoya y col., 1992; Perera, y col.,1993; Tanimura y col., 1994 y 1995; Yamaguchi y col., 1996). De todas estas descripciones, resulta de interés la aparición de marcada infiltración con heterófilos acompañada de otros hallazgos típicos de la inflamación aguda.

Al respecto, Vargas, (1995) señala que los cuadros agudos presentan: necrosis, inflamación y edema, mientras que en casos sobreagudos describe: atrofia, inflamación en diferentes grados, necrosis leve, algunos quistes y fibroplasia y, en casos crónicos: fibrosis, formación de quistes y regeneración linfocítica. Comparado con las lesiones producidas por los aislados de campo en estudio, se puede deducir que estos últimos produjeron un cuadro intenso con rápida destrucción de elementos linfocíticos bursales, sin embargo no se encontraron células inflamatorias agudas ni edema o hemorragia (Cuadro N°4, Fotos 4,5,6,7), llamando la atención además, la existencia de lesiones de cuadros crónicos como la aparición de estructuras adenoides, fibroplasia y quistes epiteliales, las cuales confirman la marcada intensidad del daño producido por dichos aislados en la bolsa.

Los hallazgos microscópicos (Cuadro N° 4) corresponden con lo señalado en la literatura para las cepas variantes de VBIA, ya que Rosenberger y col.(1985), informan que las variantes de Delaware (A, D, E,y G) producen marcada y rápida atrofia bursal al cabo de 72hrs post inoculación, con una respuesta inflamatoria mínima. Además, Ismail y col. (1990), señalan necrosis y depleción linfocítica, con atrofia de pliegues, sin respuesta inflamatoria (infiltración celular). Sharma y col.. (1989 y 1992), señalan que la variante VarA, produjo mayor necrosis y depleción linfocítica con atrofia plical que la cepa clásica JM, 3 días post inoculación, y repoblamiento linfocítico desde el día 7 post inoculación; en adelante y hasta el día 25 post inoculación, ambas cepas produjeron atrofia plical, degeneración quística y repoblamiento linfocítico. Sin embargo, sólo la cepa clásica IM presentó signos inflamatorios caracterizados por infiltración de heterófilos, edema de pliegues, muscular y serosa, a los días 3 y 5 post inoculación. Por otro lado, Hassan y col.(1996) señalan que al día 2 post inoculación, la cepa variante IN produce moderada a severa necrosis y marcada linfocitólisis con intensa infiltración de heterófilos, mientras que la cepa clásica STC induce moderada necrosis multifocal y linfocitólisis con escasos heterófilos; sin embargo a los 4 días pi., los heterófilos son más abundante en el caso de la cepa clásica. Al respecto, debe recordarse que en las aves, la respuesta inflamatoria y el tiempo en que aparecen y desaparecen las células inflamatorias, depende de la irritación y su duración, y de si hay necrosis de tejidos; así, las primeras células en aparecer son los heterófilos y se mantienen hasta las 48 hrs (Ridell, 1984).

### **6.2.1.2.- Bazo**

En relación al bazo, los aislados G-1 y G-4 produjeron esplenomegalia sin lesiones microscópicas, en tanto que G-2 y G-3 mostraron leves disminución de linfocitos, sin observarse cambios macroscópicos respecto al grupo control (Gráfico N°2), la falta de lesiones esplénicas en los dos últimos aislados no es categórico y podría explicarse por el menor número de muestras examinadas.

La depleción linfoide observada, también ha sido informado por otros autores, sin embargo asociada con otras lesiones. Así, Barra (1979) indica que una cepa aislada en el país produjo necrosis con depleción linfoide, degeneración fibrinoide de las paredes de arteriales y marcada hemorragia, entre los 2 y 4 días post inoculación, con recuperación progresiva hasta el día 8 post inoculación. De igual forma, Morandian y col., (1990) observaron leve a moderada depleción linfoide en la pulpa blanca y Tanimura y col., (1995), observaron severa depleción linfoide en los centros germinativos y tejido linfoide difuso, con aumento de los heterófilos y macrófagos, así como hipertrofia de células reticulares, en el caso de cepas muy virulentas.

### **6.2.1.3.- Timo**

Los diferentes aislados no produjeron lesiones macro ni microscópicas, la cual ha sido comunicado también por Ley y col. (1983). Por otro lado Sharma y col. (1992), observaron multiplicación viral sin encontrar lesiones. Sin embargo, Giambrone y col. (1977), describen intensa depleción de linfocitos corticales a los 4 días post inoculación, y Barra (1979) describe la aparición de necrosis y depleción linfoide cortical intensa y moderada congestión al día 3 post inoculación, con recuperación en el día 8 post inoculación. Henry y col. (1980a y b), describió a su vez, en casos leves, hipermia e infiltración de heterófilos y en casos severos atrofia y necrosis de los timocitos corticales. Así mismo, Sharma y col. (1989 y 1992), observaron moderada necrosis linfoide cortical multifocal hasta día 7 post inoculación y repoblamiento al día 10 pi., con la cepa clásica (IM) y no con la variante (VarA). Además, Nakamura y col. (1992), describen leve atrofia cortical, en pollos infectados con una cepa japonesa de alta virulencia (cepa 90-11). Tanimura y col. (1995), describen atrofia de timo entre los días 3 y 10 post inoculación, con necrosis cortical e hipertrofia de células reticulares y aumento de macrófagos en el parenquima y cápsula, asociado a la infección de cepas con alta virulencia (Ehime/91 y DV86).

### **6.2.1.4.- Hígado**

Macroscópicamente, los aislados de campo no produjeron lesiones hepáticas, sin embargo, Henry y col., (1980a y b), han reportado hipertrofia y palidez hepática en aves gnotobióticas, desde el tercero al quinto día postinfección con virus BIA. A nivel microscópico, la situación cambia, ya que se observaron diferentes lesiones con carácter leve a moderado, pero sin constituir un patrón que pueda asociarlas a la infección experimental (Cuadro N°5). Contrario a lo observado en los resultados del ensayo, Ley y col., (1983), describen sinusoides distendidos con aumento de heterófilos y macrófagos, 3 días post inoculación, y necrosis hepática multifocal con focos linfoides ectópicos, 10 días post inoculación, Nunoya y col. (1992), informan degeneración grasa, necrosis focal y dilatación sinusoidal con presencia de heterófilos y macrófagos.

### 6.3.- ESTUDIO DE PROTECCION

#### 6.3.1.- Inmunogenicidad vaccinal

La respuesta humoral de la vacuna Bursine-2 fue variable, ya que se presentaron GMT que variaron entre 40 y 453, dependiendo del grupo de aves inmunizada (Cuadro N° 6). Al respecto, otros autores señalan similares variaciones; Rosales y col. (1989b), informan GMT entre 256 y 337 obtenidos 3 semanas después de la aplicación de una vacuna intermedia; Mazariegos y col. (1990), comunican que las cepas vaccinales intermedias más patógenas inducen GMT más altos, y al medir la respuesta inmune a las 4 semanas postvacunación, observaron GMT entre 170 - 850, según la vacuna. Jackwood y col. (1985), en tanto, estudiaron la inmunogenicidad de cuatro vacunas vivas del serotipo 1 y observaron GMT entre 8 y 418, 14 días postvacunación. Giambrone y Clay, (1986), por su parte, evaluaron la inmunogenicidad de 4 vacunas vivas comerciales y señalan que las más virulentas produjeron GMT mayores. En relación a la inmunogenicidad de las vacunas vivas, Toscano y col. (1996), señalan que es proporcional a la patogenicidad de la cepa vaccinal, encontrando títulos de 805 para la cepa más virulenta y 243 y 278 en las menos, 14 días después de la vacunación.

En relación a los títulos protectivos, Lucio y Hitcher, (1979a y b) señalan que títulos menores a 100 GMT no son protectivos, entre 100 y 600 TMG otorgan un 40% de protección y sobre 600 TMG tiene un 100%. Por otra parte, Lukert (1983), señala que sueros con GMT >500 de anticuerpos neutralizantes, protegen al 100% de las aves desafiadas con VBIA. Así mismo, . Sin embargo, Winterfield y Thacker (1978), consideran que un suero positivo al AGP posee un título neutralizante también protector; según Hafez (1989), un suero positivo al AGP equivale a un título neutralizante de 64, en tanto que, Kibenge y Dhillon (1987), señalan que los sueros neutralizantes positivos deben tener un título mayor de 80

#### 6.3.2.- Patogenicidad vaccinal

Las vacunas vivas utilizadas para el control de la VBIA, pueden ser clasificadas de acuerdo a su patogenicidad en: 1ª generación: con escasa patogenicidad, producen daño en el sistema inmune y generan bajos niveles de anticuerpos; 2ª generación (vacunas moderadas): no producen inmunosupresión y son incapaces de romper altos títulos de inmunidad materna; 3ª generación (vacunas intermedias): no son inmunosupresivas y pueden atravesar altos títulos de inmunidad materna; 4ª generación (vacunas calientes): producen inmunosupresión y pueden cruzar altos títulos de inmunidad materna (Hafez, 1989). Además, Giambrone y Clay (1986), señala que dentro de las vacunas intermedias comerciales se observa una amplia variación de su patogenicidad.

En relación a lo anterior, los resultados muestran que la vacuna Bursine-2 produjo daño moderado en la bolsa de Fabricio, el cual se expresa a través de los índices Rbo y K (Gráfico 4 , Anexo 10 y 11). Así, Guitet y col. (1994), informan que las vacunas intermedias producen daño temporal en la bolsa con diferencias significativas en el índice Rbo. Incluso, mencionan que las cepas utilizadas como vacunas no debieran producir una atrofia sobre el 50% respecto al control negativo. Hein y Franz (1996), señalan que las vacunas intermedias comerciales provocan intenso daño bursal en aves LPE, sin embargo en aves comerciales, el daño disminuye por la presencia de anticuerpos

maternales. De igual forma, Rosales y col. (1989b), observaron que la vacuna intermedia utilizada provocó una atrofia bursal de un 25%, respecto al control no vacunado ni desafiado. Los resultados obtenidos concuerdan además, con lo señalado por Honegger y col. (1987), los cuales estudiaron diferentes vacunas vivas y observaron que producían disminución en el índice morfométrico bursal. Mazariegos y col. (1990), estudiaron vacunas intermedias con patogenicidad alta, media y baja, según los signos clínicos y lesiones que producían en aves susceptibles, y observaron que todas, causaron disminución en la relación morfométrica bursal, aplicando la dosis recomendada por el fabricante. De igual forma, Tsukamoto y col. (1995), estudiaron la eficacia de tres vacunas vivas frente al desafío con una cepa japonesa muy virulenta, y observaron que todas inducían daño en la bolsa expresado por las lesiones histológicas y por la disminución en el índice morfométrico bursal, sin embargo, la vacuna intermedia otorgó un 100% de protección frente a la cepa desafío.

### **6.3.3.- Protección vaccinal**

La vacuna intermedia Bursine-2 ha sido ampliamente estudiada, frente al desafío con diferentes cepas de VBIA en todo el mundo. Su protección ha sido demostrada frente a cepas clásicas (6948/V1768; STC; CS88; 849VB; 73688; IM) y variantes (IN; U28; MISSISSIPPI; Del-E; Del-A; Del-G; Del-D), lo cual se explica por su naturaleza de vacuna viva no clonada y por ser producida en embrión de pollo (Solvay, 1995). Al respecto, Rosales y col. (1989b), observaron protección con una vacuna intermedia, frente al desafío con dos cepas variantes (U-28 y Del-A). Honegger y col. (1987), estudiaron diferentes vacunas vivas frente al desafío con la variante Del-A, y observaron que la protección varió entre 10 y 80% dependiendo de la vacuna. Giambrone y Closser (1989), al estudiar la eficacia de tres vacunas vivas (clonada clásica, clonada variante y no clonada clásica) y señalan que ninguna otorgó una buena protección (>80%) frente al desafío contra las variantes Del-E y Mississippi y la cepa clásica APHIS.

Frente al desafío con los aislados de campo, la vacuna Bursine-2 resultó muy protectora (Cuadro N° 8). Al respecto, Odor y col. (1995), consideran aves no protegidas a aquellas que tienen un índice Rbo menor a 2DS del promedio del grupo control, y señalan que una vacuna produce inmunidad baja si protege un 20% de las aves, inmunidad media entre 21% y 50% y buena protección si es mayor al 50%. Sin embargo, los índices morfométricos Rbo y K de las aves vacunadas-desafiadas, alcanzaron valores menores que en el control no vacunado no desafiado, lo que se explica por el tipo de vacuna utilizada. Al respecto, Honegger y col. (1987), señalan que el daño producido por las vacunas vivas es un problema al realizar los estudios de protección vaccinal frente al desafío viral, y que se puede eliminar utilizando un grupo control vacunado desafiado y un control sólo vacunado.

## **6.4.- SEROTIPIFICACION VIRAL**

### **6.4.1.- Adaptación a Fibroblastos de embrión de pollo**

Sólo los aislados G-1, G-2 y G-4 pudieron ser adaptados a cultivos de fibroblastos, ya que presentaron un claro efecto citopático (ECP) a las 96 hrs postinoculación, a partir del pasaje N° 13. Al respecto, Lukert y Saif (1991), señalan que algunas cepas virulentas de BIA pueden ser muy difíciles de adaptar en cultivos primarios de embrión de pollo, a pesar de que se multipliquen en embriones y linfocitos derivados de la bolsa. Sin embargo, generalmente son necesarios varios pasajes ciegos antes de ver un claro ECP (Rosales, 1989a; Tsai y Saif, 1992). En este sentido, Rosales, y col. (1989a), no observaron ECP después de 4 pasajes seriados con dos cepas variantes asociadas a cuadros subclínicos. De igual forma, Hassan y col. (1996) no observaron adaptación a cultivo de fibroblastos con la cepa variante IN después de 6 pasajes seriados. Sin embargo, Rosenberger y col. (1985), señalan que la cepa variante Del-E pudo ser adaptada a cultivo de fibroblastos de embrión de pollo, sin indicar el número de pasajes, y Bayyari y col. (1996a y b), adaptaron la cepa variante IBVD-s977 en cultivo de fibroblastos después de 8 pasajes ciegos. Al respecto, Hein y col. (1991), señalan la dificultad para multiplicar las cepas variantes a cultivo celulares o embriones de pollos, debido a que estas cepas han perdido algunos epítopes, respecto a las cepas standard.

El efecto citopático producido por los aislados que pudieron ser adaptados a cultivo de fibroblastos (Fotos 8 y 9), corresponde con lo indicado por otros investigadores. Jackwood y Saif, (1987) señalan que el efecto citopático incluye redondeamiento celular, formación de granulaciones y finalmente desprendimiento de la superficie del cultivo. Así mismo, Wyeth (1995), comunica que el ECP de VBIA en fibroblastos, se caracteriza por la formación de pequeñas células redondas refractarias y Cho (1979), señala la formación de agregados de células refractarias pequeñas con formación de áreas de necrosis y desprendimiento celular, entre el 3° y 4° día postinoculación. A su vez, Kibenge y col., (1987), no señalan diferencia en el efecto citopático producido por cepas clásicas y variantes adaptadas a fibroblastos.

### **6.4.2.- Parentesco serológico**

El cuadro N° 8, muestra los resultados de la prueba de seroneutralización cruzada entre los aislados G1, G2, G-4 y la cepa clásica comercial de referencia. Se observa una estrecha relación entre las cepas G-2 y G-4 respecto del patrón de referencia, en tanto que la cepa G-1 presenta una relación menor de un 39%. Esta diversidad antigénica ha sido demostrada dentro del serotipo 1 por Jackwood y col.,(1985) y Me Nulty y Saif (1988). Para las cepas variantes 3212 y U-28, Rosales y col. (1987a), describen 12 % y 17% respectivamente de parentesco antigénico con la cepa Lukert, en cambio Bayyari y col. (1996b) observó un parentesco de un 51% entre la variante s977 aislada en Arkansas y la cepa Lukert. De acuerdo al criterio de este último autor, el aislado G-1 corresponde a un subtipo menor del virus de la Bursitis Infecciosa (Cuadro N°11)

A pesar de que la seroneutralización viral con sueros policlonales permite diferenciar entre serotipos (Ture y col., 1993), son necesarias pruebas adicionales más sensibles como el ELISA con anticuerpos monoclonales (Alamsyah y col., 1993), anticuerpos monoespecíficos preparados contra la proteína viral VP2 (Ture y col., 1993) o bien pruebas moleculares como el PCR/RT/RE. Jackwood y col.(1996).

En Latinoamérica no hay informes que demuestren la presencia de cepas variantes del virus de la Bursitis Infecciosa Aviar, sin embargo, se supone su existencia (Morales, 1995a; Fernandez, 1995). En Chile, este trabajo constituye parte del primer intento por demostrar su presencia. Sin embargo, se debe considerar que la demostración categórica de la existencia de cepas variantes exige el análisis de los aislados sospechosos a través de pruebas moleculares. Al respecto, los resultados obtenidos en los ensayos permiten apoyar la hipótesis de que los aislados obtenidos desde planteles con problemas de inmunosupresión corresponden a cepas variantes del virus BIA, sin embargo, la certeza se obtuvo al realizar un análisis molecular a través de la técnica PCR/TR/RE (Jackwood y col., 1996), en el laboratorio de virología del Dr. Jackwood en la Universidad de Ohio, USA (Datos no publicados).\*\*

Sin lugar a dudas que la demostración de la presencia de estas cepas permitirá corregir las estrategias de control para la enfermedad de Gumboro, a la vez que contribuirá a disminuir una de las causas más importantes de inmunosupresión; generalmente evidenciada por la aparición de otras enfermedades oportunistas que ocasionan grandes pérdidas económicas.

A partir de los resultados, se puede concluir que:

- Las cepas aisladas corresponden al Virus de la Bursitis Infecciosa Aviar.
- Las cepas aisladas poseen alta patogenicidad, ya que producen cuadros subclínicos con intenso daño en la Bolsa de Fabricio.
- La vacuna Bursine-2 otorga una adecuada protección frente al desafío con todos los aislados, sin embargo produce un daño moderado sobre la bolsa de Fabricio.
- La cepa G-1 corresponde a un subtipo o variante antigénica debido a su escaso parentesco con la cepa clásica de referencia.

---

-\* Comunicación personal. Dra. Aída Cubillos G. 1997.



## 7.- BIBLIOGRAFIA

- ALAMSYAH, E., A. S. DHILLON, J. EVERMAN. 1992. Pathology and characterization of IBD viruses isolates from Washington chickens. In: 41<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, California.
- ALAMSYAH, E., A. SINGH, J. F. EVERMAN. 1993. Comparative pathogenicity and serogrouping of three Washington isolates of Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis.* 37: 655-659.
- ARCHETTI, Y., F. L. HORSFALL. 1950. Persistence antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J.Exp.Med.* 92: 441-462.
- BANDA ,C. A., C. J. C., VALLADARES. 1996. Evaluación de la Patogenicidad de tres aislados de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio en México.En: Memorias de la XXI convención anual de la asociación de especialistas en ciencias avícolas - proceeding of the 45th Western Poultry Disease Conference, May 1-5. Cancun.
- BARRA, M. 1979. Diagnóstico de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio (Enfermedad de Gumboro): Aislamiento y caracterización del agente causal. Tesis M.V. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias.
- BAYYARI, G. R., J. D. STORY, J. N. BEASLY, J. K. SKEELES. 1996a Pathogenicity studies of an Arkansas variant infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 40: 516-532.
- BAYYARI, G. R., J. D. STORY, J. N. BEASLY, J. K. SKEELES. 1996b. Antigenic characterization of an Arkansas isolate of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 40: 588-599.
- BENTON, W. J., M. S.COVER, J. K. ROSENBERGER, R. S., LAKE. 1967a. Physicochemical properties of the infectious bursal disease agent (IBA). *Avian Dis.* 11: 438-445.
- BENTON, W. J., M. S. COVER, J. K. ROSENBERGER. 1967b. Studies of transmission of the infectious bursal disease agent of chicken. *Avian Dis.* 11: 430-437.
- BOTERO, A., A. J. URIBE. 1992. Relación Bolsa-Bazo en el diagnóstico de la Enfermedad de Gumboro relacionado con la prueba de Elisa. En: Proceeding AMEVEA Colombia.
- CALNEK, B. W., H. J. BARNES, C. W. BEARD, W. M. REÍD, H.W. YODER 1991. Disease of Poultry. 9<sup>th</sup>ed.. Iowa State University Press. Ames. Iowa.

- COSGROVE, A. S. 1962. An apparently new disease of chickens Avian nephrosis. *Avian Dis.* 6: 385-389.
- COWEN, B. S. 1991. Immunization against infectious bursal disease virus. En: IV Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar. Chile.
- CRAFT, D. W., J. BROWN, P. D. LUKERT. 1990. Efects of standard and variant strains of Infectious Bursal Disease Virus on infections of chicken. *Am.J. Vet.Res.* 51:1192-1197
- CULLEN, G. A. 1994. Bursitis Infecciosa (Enfermedad de Gumboro). Documento de la 62ª sesión general de la Oficina Internacional de Epizootia. París, 16- 20. Mayo.
- CHEVILLE, N. F. 1967. Studies on the Pathogenesis of Gumboro Disease in the bursa of fabricius, spleen, and thymus of the chicken. *Am.J.Path.* 51: 527-551. 1967.
- CHEVILLE, N. F. 1980. Patología Celular. 1ª ed. Acribia. Zaragoza.
- CHO, Y, S. A. EDGAR. 1968. The Infectious Bursal Agent and pathology of the disease. *Poult. Sci.* 47 : 1661-1968.
- CHO, B. R. 1979. Growth of infectious bursal disease virus with plaque formation in chick fibroblast cell cultures. *Avian Dis.* 23: 209-218.
- CHRISTOPHER, K. L. 1982. Experimental infection of Infectious Bursal Disease virus to developing duck embryos. *Acta et.Beogr.* 32: 27-30.
- DELLMAN, H. D. 1993. Textbook of Veterinary Histology. 4<sup>th</sup> Edition. Lea & Febirger, Philadelphia.
- DE VRIES, T. S. 1990. Gumboro Disease in the Netherlands. In: Proceeding of the 39<sup>th</sup> Wester Poultry Disease Conference. California.
- DIETER, M. P., R. P. BREITENBACH. 1969. The growth of chicken lymphoid organs, testes, and adrenals in relation to the oxidation state and concentration of adrenal and lymphoid organ vitamin C. *Avian Dis.* 6: 1463-1469.
- DOBOS, P., B. J. HILL, R. HALLET, P. BECHT. 1975. Biophysical and biochemical characterization of fixe animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.* 32: 593-605.
- DOHMS, J. E, J. S. JAEGER. 1989. The effect of Infectious Bursal Disease Virus infection on local and systemic antibody responses following infection of 3 week-old broiler chickens. *Avian Dis.* 31: 632-639.

- DOHMS, J. E., Y. M. SAIF. 1983. Critería for evaluating immunosuppression. *Avian Dis.* 28: 305-310.
- ETERRADOSSLN, D. TOQUIN, G. ADAM, J. P. PICAULT, P. DROUIN, M. GUITTET, G. BENNEJEAN. 1994. Monoclonal antibody typing of recent isolates of Infectious Bursal Disease virus from France. In : International Symposium on Infectious Bursal Disease and chicken Infectious Anemia. Rauschholzhausen, Germany, 21-24 June.
- ETERRADOSSI, N. 1995. Adelantos en materia de diagnóstico y profilaxis de la enfermedad de Gumboro en aves de corral. Documento de la 63ª sesión general de la Oficina Internacional de Epizootia. París, 16- 20 Mayo.
- FADLY, A. M., K. NAZERIAN. 1983. Pathogenesis of Infectious Bursal Disease in chickens infected with virus at various age. *Avian Dis.* 27: 714-723.
- FAHEY, J. E., CRAWLEY, J. F. 1954. Studies on chronic respiratory disease of chickens. II isolation of a virus. *Can. J. Comp.Med.* 18:13-21.
- FARAGHER, J.T. 1972. Infectious Bursal Disease of Chickens. *Vet.Bull.* 54: 425-436.
- FENNER, F., P. A. BACHMANN, E. P. J. GIBBS, F. A. MURPHY, M. J. STUDDERT, D.O. WHITE 1987. *Veterinary Virology*. Academic Press. London.
- FERNANDEZ, R. J. 1995. Clinical evaluation of IBD in Latin America countries. En: Meeting of Infectious Bursal Disease, April.
- GIAMBRONE, J. J., D. L. EWERT, C. S. EIDSON. 1977. Effect of infectious bursal disease virus on the immunological responsiveness of the chicken. *Poultry Sci.* 56: 1591-1594.
- GIAMBRONE, J. J., R. P. CLAY. 1986. Evaluation of the immunogenicity, stability, pathogenicity, and immunodepressive potential of four commercial live Infectios Bursal Disease Virus vaccines. *Poult. Sci.* 65: 1287-1290.
- GIAMBRONE, J. J., J. CLOSSER. 1989. Efficacy of live vaccines against serologic subtypes of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 33: 7-11.
- GLICK, B. 1959. Growth of the Bursa of Fabricius and its relationship to the adrenal gland in the White Pekin Duck, White Leghorn, Outbred and In bred New Hampshire. *Avian Dis.* 15 : 130-139.
- GRIEVE, D. B. 1991. Las causas y evaluación de la inmunosupresión. XII Congreso Latinoamericano de Avicultura, Ecuador.

- GUITET, M., N. ETERRADOSI, H. LECOQ, J.P. PICAULT. 1994. Quality control of Infectious Disease vaccines. In: International Symposium on Infectious Bursal Disease and chicken Infectious Anemia. Rauschholzhausen, Germany, 21-24 June.
- HAFEZ, H. M. 1989. Infectious Bursal Disease (Gumboro Disease). En: Primer Seminario Internacional de Producción y Patología Aviar, Valdivia, Chile.
- HANSON, B. S. 1967. Post mortem lesion diagnostic of certain poultry disease. *Vet. Rec.* 80: 109-119.
- HASSAN, M. K., M. Q., AL-NATOUR, L. A. WARD, Y. M. SAIF. 1996. Pathogenicity, attenuation, and immunogenicity of infectious bursal disease virus. *AvianDis.*40: 567-571.
- HEIN, R. G., G. FRANZ. 1996. Effect of live intermediate infectious bursal disease vaccines. En: Memorias de la XXI convención anual de la asociación de especialistas en ciencias avícolas - proceeding of the 45th Western Poultry Disease Conference, May 1-5. Cancun.
- HEIN, R. G., D. LUTTICKEN, P. VAN DER MAREL. 1991. Estudios de cepas del virus de Gumboro: consecuencias sobre la estrategia de vacunación. *Avicultura Profesional.* 9: 94-96.
- HELMBOLDT, C. F., E. GARNER. 1964. Experimentally induced Gumboro Disease (IBA). *Avian Dis.* 8: 561-575.
- HENRY, W. C., R. N. BREWER, S. A. EDGAR. 1980a. Studies on Infectious Bursal Disease in chickens. 2. Scoring microscopic lesions in the Bursa of Fabricius, Thymus, Spleen, and Kidney in gnotobiotic and battery reared White Leghorns experimentally infected with Infectious Bursal Disease Virus. *Poult.Sci.* 59 : 1006-1017.
- HENRY, W. C., R. N. BREWER, S. A. EDGAR. 1980b. Effect of Infectious Bursal Disease on Gnotobiotic and battery raised white leghorns. *Poult.Sci.* 59 : 506-515.
- HIRAI, K., S. SHIKAMURA, M. HIROSE. 1972. Immunodifusion reaction to avian Infectious Bursal Disease. *Avian Dis.* 16: 961-964.
- HIRAI, K., K. KUNIHIRO, S. SHIKAMURA. 1979. Characterization of immunosuppression in chickens by Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis.* 23: 950-965.
- HITCHNER, S. B. 1970. Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs. *Poult.Sci.* 49:511-516.
- HODGES, R. D. 1974. The histology of the fowl. Academic Press. London.

- HONEGGER, K. A., S. L. KILLIAN, S. KLOPP. 1987. Ability of various live IBD vaccines to protect against variant IBD challenge. In: 36<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, California.
- ISMAIL, N. M., Y. M. SAIF, W. L. WIGLE, G. B. HAVENSTEIN, C. JACKSON. 1990. Infectious Bursal Disease virus variant from commercial leghorn pullets. *Avian Dis.* 34 : 141-145.
- JACKWOOD, D. H., Y. M. SAIF, P. D. MOORHEAD. 1985. Immunogenicity and antigenicity of Infectious Bursal Disease Virus serotype I and II in chickens. *Avian Dis.* 29: 1184-1194.
- JACKWOOD, D. H., Y. M. SAIF. 1987. Antigenic diversity of Infectious Bursal Disease viruses. *Avian Dis.* 33 : 766-770.
- JACKWOOD, D. J. 1994. Diagnosis and differentiation of Infectious Bursal Disease virus antigenic serotypes and subtypes. In: International Symposium on Infectious Bursal Disease and chicken Infectious Anemia. Rauischholzhausen, Germany, 21-24 , June.
- JACKWOOD, D. J., G. HANES, S. HEINS MILLER. 1996. Infectious Bursal Disease viral RNA amplification using RT/PCR from bursa tissue following Phenol: Chloroform inactivation of the virus. *Avian Dis.* 40:457-460.
- JOKLIK, W. K., H. P. WILLET, D. B. AMOS. 1980. Zinsser Microbiology. 17<sup>th</sup>ed. Appleton Century Crofts. New York.
- KÄUFER, L, E. WEISS. 1976. Electron-microscope studies on the pathogenesis of infectious bursal disease after intrabursal application of the causal virus. *Avian Dis.* 20: 483-495.
- KIBENGE, F. S. B., A. S. DHILLON, R. G. RUSELL. 1987. Growth of serotype I and II and variant strains of infectious bursal disease virus in Vero cell. *Avian Dis.* 32: 298-303.
- KIBENGE, F. S. B., A. S. DHILLON. 1987. Serological studies with infectious bursal disease serotype I and variant viruses. In: 36<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, California.
- KUNEY, D.R., A. A. BICKFORD, D. D. BELL R. A. ERNST. 1981. The significance of bursal size follow up studies and futher interpretation of a survey in White Leghorn chickens. In: World Poultry Disease Conference. California.
- KUNEY, D. R., A. A. BICKFORD. 1981. Significance of bursal size survey. In: World Poultry Disease Conference. California.
- KUNEY, D. R., A. A. BICKFORD, D. V. ZANDER. 1982. Comparision of the development of the bursa of fabricio in SPF and commercial white leghorn chickens. In: World Poultry Disease Conference. California.

- LEY, D. H., R. YAMAMOTO, A. A. BICKFORD. 1983. The pathogenesis of Infectious Bursal Disease : Serologic, Histopathologic and Clinical Chemical observations. *Avian Dis.* 24: 1060-1085.
- LEYK, W. 1971. Makro- und mikroskopische Veränderungen des Hühnerembryos nach experimenteller Infektion mit dem Erreger der infektiösen Bursitis der Junghennen (Gumboro-Krankheit). Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades bei der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität zu Giessen.
- LUCERO, M. 1991. Estudio de contaminación de un plantel experimental de aves SPF. Tesis M.V. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias.
- LUCIO, B., A. ANTILLON, P. FERNANDEZ. 1971. Identification of the Infectious Bursal Disease virus in Mexico. *Avian Dis.* 15: 241-248.
- LUCIO, B., S. B. HITCHNER. 1979a. Immunossuppression and active response induced by Infectious Bursal Disease Virus in chickens with passive antibodies. *Avian Dis.* 24: 189-196.
- LUCIO, B., S. B. HITCHNER. 1979b. Infectious Bursal Disease emulsified vaccine: effect upon neutralizing-antibody levels in the dam and subsequent protection of the progeny. *Avian Dis.* 23: 466-478.
- LUKERT, P. D. 1983. Enfermedad Infecciosa de Fabricio (Enfermedad de Gumboro). En: V Seminario Internacional de Patología Aviar. Athens. Georgia.
- LUKERT, P. D. 1984a. Control de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio. En: I Seminario internacional Producción y Patología Aviar, Valdivia. Chile.
- LUKERT, P. D. 1984 b. Avian viral immunossuppression. En: I seminario Internacional de Producción y Patología Aviar. Chile.
- LUKERT, P. D., Y. M. SAIF. 1991. Infectious Bursal Disease. In Disease of Poultry, 9<sup>th</sup> ed. B.W. CALNEK, H.J. BARNES, C.W. BEARD, W.M. REID y H.W. YODER, Jr., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- MARTINEZ, I, P. CASANOVA. 1979. Virus de la Bursitis Infecciosa Aviar aislamiento y patogenicidad. *Arch. Med. Vet.* 11: 105-108.
- MARTINEZ, I, A. CASANOVA, P. CANCINO, A. PAREDES. 1979. Prevalencia de Bursitis Infecciosa Aviar en planteles de reproducción en la zona central de Chile. *Arch. Med. Vet.* 11: 100-104.
- MAYR, R., A. BECKMANN, B. BIBRACK, G. WITTMANN. 1993. Virologische Arbeitsmethoden. Band 1. Gustav Fisher Verlag-Stuttgart.

- MAZARIEGOS, L. A., P. D LUKERT, J. BROWN. 1990. Pathogenicity and immunosuppressive properties of Infectious Bursal Disease intermediate strains. *Avian Dis.* 34: 203-208.
- McFERRAN, J. B., M. S. McNULTY, E. R. Mc KILLOP, T. J. CONNOR, R. M. Mc CRACKEN, D. S. COLLINS G. M. ALLAN. 1980. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. *Avian Path.* 9: 395-404.
- McILROY, S. G., E. A GOODALL, D. W.BRUCE, R. M. McCRACKEN, M. S. McNULTY. 1991. The cost benefit of vaccinating broiler flocks against subclinical infectious bursal disease. *Avian Path.* 14: 273-281.
- McNULTY, M. S. Y. M. SAIF. 1988. Antigenic relationship of nonserotype I turkey infectious bursal disease viruses from the United States and United Kingdom. *Avian Dis.* 32: 374-375.
- MEULEMANS, G., H. VINDEVOGEL, P. HALEN, P. SCHYNS. 1974. Maladie de Gumboro I. Isolement, identification et incidence du virus en Belgique. *Ann.Méd. Vét.* 118: 264-271.
- MONTGOMERY, R. D., VILLEGAS, P., DAWE D. L., J. BROWN. 1986. A Comparison between the effect of an avian Reovirus and Infectious Bursal Disease Virus on selected aspects of the immune system of the chicken. *Avian Dis.* 30: 298-308.
- MORADIAN, A., J. THORSEN, R. J. JULIAN. 1990. Single and combined Infections of Specific-Pathogens-Free chickens with Infectious Bursal Disease Virus and intestinal isolate of Reovirus. *Avian Dis.* 34:63-72.
- MORALES, O. E. 1995a. Actualidades en el Control de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa. En: II Seminario Técnico Avícola, Bolivia.
- MORALES, O. E. 1995b. Inmunosupresión en la Enfermedad de Marek. En: XIV Congreso Latinoamericano de Avicultura, 10-13 de Octubre, Santiago, Chile.
- MUNDT, E., MULLER, H. 1994. Complete nucleotide sequences from different virulent and apathogenic IBDV strains - comparison of the 5' and 3' untranslated genomic regions. In: International Symposium on Infectious Bursal Disease and chicken Infectious Anemia. Rauschholzhausen, Germany, 21-24 June.
- MUÑOZ, C. 1982. Prospección serológica del virus de la Bursitis miedosas en *Gallus domesticus*. Tesis M. V. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias.
- NAKAMURA, T., Y. OTAKI, T. NUNOYA. 1992. Immunossuppressive effect of a highly virulent Infectious Bursal Disease Virus isolated in Japan. *Avian Dis.* 36: 891-896.

- NICK, H., D. CURSIEFEN, H. BECHT. 1976. Structural and growth characterization of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 18: 227-234.
- NUNOYA, T., Y. OTAKI, M. TAJIMA, M. HIRAGA, T., SAITO. 1992. Occurrence of Acute Infectious Bursal Disease with High Mortality in Japan and Pathogenicity of field in Specific Pathogen-Free Chickens. *Avian Dis.* 36: 597-607.
- ODOR, E. M., J. K. ROSENBERGER, S. S. CLOUD, M. SALEM. 1995. Infectious Bursal Disease laboratory monitoring. In Meeting of IBD, April 3-6, Athens, Georgia.
- OKOYE, J. O. A. 1984. Infectious Bursal Disease of chickens. *Vet. Bull.* 54: 425-436.
- OKOYE, J. O. A., M. UZOUKWU. 1981. An outbreak of infectious bursal disease among between 16 and 20 weeks old. *Avian Dis* 25: 1034-1038.
- OSSA, J. 1990. Bases de Inmunología Aviar. Publicaciones Politécnico. Colombiano. Medellín.
- PAYNE, L. N., P. C. POWELL. 1984. The Lymphoid System. In: The Physiology and Biochemistry of the Fowl. vol. 5. Edited by B.M. Freeman. Academic Press, London. pp. 277-321.
- PATTISSON, M. ALEXANDER, D. J., HARKNESS, J.W. 1975. Purification and preliminary characterisation of a pathogenic strain of infectious bursal disease. *Avian Path.* 4: 175-187.
- PERELMAN, B., E. H. HELLER. 1982 The effect of Infectious Bursal Disease virus on the immune system of Turkeys. *Avian Dis.* 27: 66-76.
- PERERA, C. L., ALFONSO, P., NODA, J, NUÑEZ, A., V. ESPINOZA. 1993. Estudio de la patogenicidad de una cepa de bursitis infecciosa aviar. *Rev. Salud Animal.* 15: 251-258.
- PETEK, M., MANDELLI, G. 1968. Proprietá biologuche di un reovirus isolato da un focolaoi di malattia Gumboro. *Atti Soc. ital. Sci. Vet.* 22: 875-879.
- PETEK, M., P. N. D'APRILE, F. CANCELLOTTI. 1973. Biological and physicochemical properties of the infectious bursal disease virus. *Avian Path.* 2: 135-152.
- RIDELL, 1984. Avian Histopathology. 1 ed. American Association of the Avian Pathologist. Pennsylvania.
- ROSALES, A. G., P. VILLEGAS, P. D. LUKERT, O. J. FLETCHER, M. A. MOHAMED, J. BROWN. 1989a. Isolation, identification and pathogenicity of two field strains of Infectious Bursal Virus. *Avian Dis.* 33: 35-41.



- ROSALES, A. G., P. VILLEGAS, P. D. LUKERT, O. J. FLETCHER, M. A. MOHAMED, J. BROWN. 1989b. Pathogenicity of recent isolates of Infectious Bursal Disease Virus in specific pathogen free chickens: Protection conferred by an intermediate vaccine strain. *Avian Dis.* 33: 729-734.
- ROSALES, A. G., 1989. Control de la Enfermedad de Gumboro y sus variantes. *Avicultura Profesional.* Julio. 70-72
- ROSENBERGER, J. K., S. CLOUD, J. GELB, E. ODOR, J. E. DONMS. 1985. Sentinel bird survey of Delmarva broiler flocks. Proc. 20<sup>th</sup> Nat. Meet Poulth. Health Condemn.
- ROSENBERGER, J. K., S. CLOUD, A. METZ. 1987. Use of Infectious Bursal Disease Virus variant vaccines in broilers and broilers breeders. In: In: 36<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, California.
- ROSENBERGER, J. K. 1989. Infectious Bursal Disease En: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. 3<sup>a</sup> Ed. H.G. PARDRASE, C.H. DOMERMUTH, and J.E. PEARSON, Eds, American Association of Avian Pathologist, Kennett Square, Pa.
- SENNE, D. A. 1989. Virus propagation in embryonating eggs. In: A Laboratory Manual for de Isolation and Identification of Avian Pathogens. 3<sup>th</sup> edition. American Association of Avian Pathologists. pp. 176-181.
- SHANE, S. M., H. N. LASHER, K. W. PAXTON. 1994. Economic impact of Infectious Bursal Disease. In: International Symposium on Infectious Bursal Disease and chicken Infectious Anemia. Rauschholzhausen, Germany, 21-24 June.
- SHARMA, J. M., J. E. DOHMS, A. L. METZ. 1989. Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of Infectious Bursal Disease Virus and their effect on humoral an cellular immune competence of specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis.* 33: 112-124.
- SHARMA, J. M., J. E. DOHMS, M. WALSER, D. B SNYDER. 1992. Presence of lesions without virus replication in the thymus of chickens exposed to Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis.* 37: 741-748.
- SISSON, S., J. D. GROSSMAN. 1982. Anatomía de los animales domésticos. 5<sup>a</sup> ed., Salvat. Barcelona.
- SKEELES, J. K., P. D. LUKERT, O. P. FLETCHER, J. D. LEONARD. 1979. Immunization studies with a cell culture adapted Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis.* 23: 456-465.

- SNYDER, D. B., D. P., LANA, P. K. SAVAGE, F. S. YANCEY, S. A. MENGEL, W. W. MARQUART. 1988a. Differentiation of infectious bursal disease virus directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies : evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. *Avian Dis.* 32: 535-539.
- SNYDER, D. B., D. P., LANA, B. R. CHO, W. W. MARQUART. 1988b. Group and strain specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. *Avian Dis.* 32: 527-534.
- SNYDER, D. B. 1989. IBDV variants. *Poultry International*. June.
- SNYDER, D.B., P.K. SAVAGE, S.A. MENGEL, V.N. VAKHARIA and D.LÜTTICKEN. 1994. Molecular epidemiology of infectious bursal disease virus in the United State. In: International Symposium on Infectious Bursal Disease and chicken Infectious Anemia. Rauschholzhausen, Germany, 21-24 June.
- SOLVAY ANIMAL HEALTH, INC. 1995. Libro resumen de trabajos de investigación sobre la vacuna Bursine-2. Minnessota.
- SPIEGEL, M.R., 1991. Estadística. 2de. Mc Graw Hill Madrid. España.
- STEWART-BROWN, B., D. W. TRAMPEL. 1990. Quantitating lymphocyte depletion of thymus and bursa using an image processing technique. In: 39<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, California, pp. 105-107.
- TALAVERA, B. R. ROSADIO, E. ICOCHEA, R. VALDIVIA, P. YI. 1995. Evidencias histopatológicas de inmunosupresión en pollos broilers con cuadros de hepatopatías. En: XIV Congreso Latinoamericano de Avicultura, 10-13 de Octubre. Santiago. Chile.
- TANIMURA, N, K. TSUKAMOTO, K. NAKAMURA, M. NARITA, N. YUASA. 1994. Pathological changes in SPF chickens experimentally inoculated with European and Japanese highly virulent strains of Infectious Bursal Disease Virus. In: International Symposium on Infectious Bursal Disease and chicken Infectious Anemia. Rauschholzhausen, Germany, 21-24 June.
- TANIMURA, N., K. TSUKAMOTO, K. NAKAMURA, M. NARITA, M. MAEDA. 1995. Association between pathogenicity of Infectious Bursal Disease Virus and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry. *Avian Dis.* 39: 9-20.
- TIZARD, I. 1988. Inmunología Veterinaria. 2<sup>a</sup> edición. Nueva editorial Interamericana. México.

- TOSCANO, C. A., B. J. CHAPA, D. E. LUCIO. 1996. Evaluación de daño, regeneración y protección de la bolsa de Fabricio, causada por la aplicación de vacunas a virus vivo contra la Bursitis Infecciosa Aviar. En: Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación de especialistas en ciencias avícolas. Proceeding of the 45th Western Poultry Disease Conference. May. 1-5. Cancún.
- TSAI, H. J., Y. M. SAIF. 1992. Effect of cell culture passage on the pathogenicity of two variant strains of Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis.* 33: 415-422.
- TSUKAMOTO, K., N. TAMMURA, H. HIHARA, J. SHIRA, K. IMAI, K. NAKAMURA, M. MAEDA. 1992. Isolation of virulent Infectious Bursal Disease Virus from field outbreaks with high mortality in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 54: 153-155.
- TSUKAMOTO, K., N. TANIMURA, S. KAKITA, K. OTA, M. MASE, K. IMAI, H. HIHARA. 1995. Efficacy of three live vaccine against highly virulent Infectious Bursal Disease Virus in chickens with or without maternal antibodies. *Avian Dis.* 39: 218-229.
- TURE, O., H. J. TSAI, Y.M. SAIF. 1993. Studies on antigenic relatedness of classic and variant strains of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 37: 647-654.
- USA, 1981. Code of Federal Regulations (CFR). Texto perteneciente a los Archivos del Ministerio de Agricultura de los EE.UU.
- VAKHARIA, V. N., D. B. SNYDER, D. LÜTTICKEN. 1994. Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. In: International Symposium on Infectious Bursal Disease and chicken Infectious Anemia. Rauschholzhausen, Germany, 21-24 June.
- VAN DER SLUIS, W. 1995. Infectious Bursal Disease Virus: Destructor of the immune system. In: Gumboro Special, Supplement World Poultry.
- VARGAS, G. D. 1995. Evaluación y clasificación de la Bolsa de Fabricio, mediante un sistema histopatológico. *Acontecer Avícola* 3: 34-42.
- VILLEGAS, P. 1982. Técnicas en Virología, Histopatología y Micoplasmas aviáres. Universidad de Georgia, Centro de Educación Continua, Facultad de Medicina Veterinaria.
- WINTERFIELD, R. W. 1969. Immunity response to the Infectious Bursal Agent. *Avian Dis.* 13: 548-557.
- WINTERFIELD, R. W., A. M. FADLY, A. BICKFORD. 1972. Infectivity and distribution of Infectious Bursal Disease Virus in the chicken persistence of the virus and lesions. *Avian Dis.* 16: 622-632.

- WINTERFIELD, R. W., H. L. THACKER. 1978. Immune response and pathogenicity of different strains of Infectious Bursal Disease Virus applied as vaccines. *Avian Dis.* 22: 722-731.
- WINTERFIELD, R. W., A. S. DHILLON, H. L. THACKER, L. J ALBY. 1980. Immune response of White Leghorn chicks from vaccination with different strains of Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis.* 24: 179-189.
- WRIGTH, C. 1995. La cumbre de Gumboro. *Industria Avícola*, Julio.
- WYETH, P. J. 1995. Infectious Bursal Disease. In: Manual of Standard for test and vaccines. OIE. Paris.
- YAMAGUCHI, T., T. KONDO, Y. INOSHEVIA, M. OGAWA, M. MIYOSHI, T. YANAI, T. MASEGI, H. FUKUSffl, K. HIRAI, 1996. In vitro attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus: some characteristics of attenuated strains. *Avian Dis.* 40: 501-509.

**8.- ANEXOS**

## ANEXO 1

**Mortalidad embrionaria en pasajes sucesivos en huevos libres de patógenos especificados (LPE), inoculados con aislados de campo del virus de la Bursitis Infecciosa Aviar (VBIA).**

N° PASAJE	AISLADOS VBIA	DIAS POSTINOCULACION							MORTALIDAD ACUMULADA
		1	2	3	4	5	6	7	
1	G-1	-	-	-	-	-	-	-	0/5**
	G-2	-	-	-	-	-	1	-	1/5
	G-3	1*	-	-	-	1	1	-	2/4
	G-4	-	-	-	-	3	1	-	4/5
	G-5	2	-	-	-	1	1	-	2/3
2	G-1	-	-	-	-	3	-	-	3/5
	G-2	-	-	-	-	-	1	-	1/5
	G-3	-	-	-	-	1	1	-	2/5
	G-4	-	-	-	-	-	-	-	0/5
	G-5	-	-	-	-	-	1	-	1/5
3	G-1	-	-	-	-	2	-	-	2/5
	G-2	-	-	-	-	-	1	-	1/5
	G-3	-	-	-	-	2	1	-	3/5
	G-4	-	-	-	-	1	2	-	3/5
	G-5	-	-	-	2	1	-	-	3/5
4	G-1	-	-	-	-	1	2	-	3/5
	G-2	-	-	-	-	1	1	1	3/5
	G-3	-	-	-	2	1	2	-	5/5
	G-4	-	-	-	-	1	1	-	2/5
	G-5	-	-	-	1	2	1	1	5/5

\* = Mortalidad embrionaria inespecífica.

\*\* = N° de huevos afectados / N° de huevos inoculados.

## ANEXO 2

### Lesiones embrionarias por pasaje y acumuladas para los aislados de campo de Virus Bursitis Infecciosa Aviar (VBIA).

PASAJE H.E. N°	LESIONES EMBRIONARIAS	Aislados de campo de VBIA.					FRECUENCIA ACUMULADA
		G-1	G-2	G-3	G-4	G-5	
1	Enanismo	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/25
	Edema Corporal	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5	20/25
	Congestión Cutánea	0/5	3/5	0/5	0/5	0/5	3/25
	N.H.F.D.*	1/5	5/5	0/5	5/5	5/5	21/25
	Imbibición Biliar	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/25
	Esplecnomegalia	1/5	2/5	0/5	0/5	0/5	3/25
	Congestión Renal	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/25
	Uratos renales	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/25
2	Enanismo	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5	2/25
	Edema Corporal	1/5	3/5	3/5	2/5	0/5	9/25
	Congestión Cutánea	1/5	1/5	1/5	0/5	0/5	3/25
	N.H.F.D.	4/5	5/5	5/5	5/5	0/5	19/25
	Imbibición Biliar	0/5	5/5	5/5	5/5	2/5	17/25
	Esplecnomegalia	3/5	4/5	3/5	5/5	2/5	17/25
	Congestión Renal	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/25
	Uratos renales	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	2/25
3	Enanismo	4/5	1/5	5/5	5/5	3/5	18/25
	Edema Corporal	2/5	2/5	5/5	4/5	1/5	14/25
	Congestión Cutánea	2/5	1/5	1/5	3/5	2/5	9/25
	N.H.F.D.	3/5	2/5	4/5	2/5	2/5	13/25
	Imbibición Biliar	3/5	4/5	4/5	4/5	2/5	17/25
	Esplecnomegalia	0/5	3/5	1/5	4/5	0/5	8/25
	Congestión Renal	4/5	3/5	3/5	5/5	2/5	17/25
	Uratos renales	2/5	1/5	0/5	3/5	2/5	8/25
4	Enanismo	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/25
	Edema Corporal	2/5	2/5	3/5	0/5	3/5	10/25
	Congestión Cutánea	0/5	2/5	3/5	2/5	0/5	7/25
	N.H.F.D.	5/5	5/5	3/5	5/5	3/5	21/25
	Imbibición Biliar	3/5	3/5	0/5	3/5	2/5	11/25
	Esplecnomegalia	4/5	5/5	3/5	5/5	4/5	21/25
	Congestión Renal	4/5	5/5	3/5	5/5	4/5	21/25
	Uratos renales	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/25

\*N.H.F.D.: Necrosis hepática focal diseminada, con aspecto moteado.

### ANEXO 3

**Lesiones microscópicas en membrana corioalantoidea (MCA) a las 33,48 y 64 hrs.post inoculación con aislados de campo del virus de la Bursitis Infecciosa Aviar (VBIA), según grado de intensidad.**

LESIONES  MICROSCOPICA	GRADO DE INTENSIDAD DE LAS LESIONES 1														
	33 HRS					48 HRS					64 HRS				
	G-1	G-2	G-3	G-4	G-5	G-1	G-2	G-3	G-4	G-5	G-1	G-2	G-3	G-4	G-5
HIPERPLASIA ECTODERMAL	0	0	0	0	2	3	2	0	2	1	2	3	0	2	3
HIPERPLASIA ENDODERMAL	0	0	1	0	2	1	0	2	0	0	2	2	0	0	2
EDEMA MESODERMAL	0	2	2	0	2	0	2	0	3	2	0	0	2	0	0
CONGESTIÓN MESODERMAL	0	0	0	0	0	1	2	2	0	2	3	2	1	3	2
INFILTRADO HETEROFÍLICO	0	0	2	1	2	1	2	2	2	0	0	0	1	1	3
INFILTRADO LINFOCITARIO	1	3	1	0	0	0	0	1	0	0	3	3	2	1	1

**1 GRADO DE INTENSIDAD : 0 = AUSENTE, 1=LEVE, 2 = MODERADO, 3 = INTENSO**



## ANEXO 4

**Títulos serológicos neutralizantes individuales y grupales previo al desafío, 14 días postvacunación con BURSINE-2 <sup>1</sup>.**

<b>GRUPOS VACUNADOS Y DESAFIADOS</b>				
<b>G-1</b>	<b>G-2</b>	<b>G-3</b>	<b>G-4</b>	<b>G-5</b>
80	320	80	80	80
320	1280	80	80	80
80	1280	80	320	320
80	80	80	320	320
320	1280	20	320	320
20	320	20	20	20
320	80	20	80	80
20	320	20	80	80
80	20	20	320	320
80	320	20	5120	5120
320		80	320	320
320		80	320	320
320		80	5120	5120
80		20	80	80
80		320	1280	1280
<b>Título medio geométrico (TMG) grupal</b>				
<b>113</b>	<b>279</b>	<b>40</b>	<b>243</b>	<b>453</b>

<sup>1</sup> SOLVAY ANIMAL HEALTH, INC. USA.

## ANEXO 5

**Resultados de la prueba Kruskal-Wallis, para los índices Rbo, Rba y K, en el estudio de Patogenicidad.**

**Indice Rbo (Peso Bolsa Fabricio/Peso vivo \* 1000)**

<b>GRUPO</b>	<b>N</b>	<b>SUMA DE RANGOS</b>	<b>PROMEDIO DE RANGOS</b>	<b>H CALCULADO</b>
CONTROL	15	1245	83	47,425
AISLADO G-1	15	526	35,067	47,425
G-2	15	313	20,867	47,425
G-3	15	599	39,967	47,425
G-4	15	709	47,3	47,425
G-5	15	702	46,8	47,425

H TABULADO = 11,07 g.l.=5 p=0.05

**Indice Rba (Peso Bazo/Peso vivo \* 1000)**

<b>GRUPO</b>	<b>N</b>	<b>SUMA DE RANGOS</b>	<b>PROMEDIO DE RANGOS</b>	<b>H CALCULADO</b>
CONTROL	15	444,5	29,633	48,168
AISLADO G-1	15	1008.0	67,2	48,168
G-2	15	383,0	25,533	48,168
G-3	15	497,0	33,133	48,168
G-4	15	1133,5	75,567	48,168
G-5	15	629,0	41,933	48,168

H TABULADO = 11,07 g.l.=5 p=0.05

**Indice K (Peso Bolsa Fabricio/Peso Bazo)**

<b>GRUPO</b>	<b>N</b>	<b>SUMA DE RANGOS</b>	<b>PROMEDIO DE RANGOS</b>	<b>H CALCULADO</b>
CONTROL	15	1244	82,933	53,357
AISLADO G-1	15	378	25,2	53,357
G-2	15	557	37,133	53,357
G-3	15	786	52,4	53,357
G-4	15	360	24	53,357
G-5	15	770	51,333	53,357

H TABULADO = 11,07 g.l.=5 p=0.05

## ANEXO 6

### Resultados de la prueba de Comparaciones Múltiples de Dunn para los índices Rbo, Rba y K, en el estudio de patogenicidad.

(SOLO SE INCLUYEN LOS CONTRASTES CON DIFERENCIAS ESTADISTICAS SIGNIFICATIVAS (P<0.05))

#### Indice Rbo (Peso Bolsa Fabricio/Peso vivo \* 1000)

COMPARACIONES	DIFERENCIA PROMEDIO	P
CONTROL V/S aislado G-1	47,933	<0,001
CONTROL v/s aislado G-2	62,133	<0,001
CONTROL v/s aislado G-3	43,033	<0,001
CONTROL v/s aislado G-4	35,700	<0,01
CONTROL v/s aislado G-5	36,200	<0,01

#### Indice Rba (Peso Bazo Fabricio/Peso vivo \* 1000)

COMPARACIONES	DIFERENCIA PROMEDIO	P
CONTROL V/S aislado G-1	-37,567	<0,01
CONTROL v/s aislado G-4	-45,933	<0,001
aislado G-1 v/s aislado G-2	41,667	<0,001
aislado G-1 v/s aislado G-3	34,067	<0,01
aislado G-2 v/s aislado G-4	-50,033	<0,001
aislado G-3 v/s aislado G-4	-42,433	<0,001
aislado G-4 v/s aislado G-5	33,633	<0,001

#### Indice K (Peso Bolsa Fabricio/Peso Bazo)

COMPARACIONES	DIFERENCIA PROMEDIO	P
CONTROL V/S aislado G-1	57,733	<0,001
CONTROL v/s aislado G-2	45,800	<0,001
CONTROL v/s aislado G-3	30,533	<0,05
CONTROL v/s aislado G-4	58,933	<0,001
CONTROL v/s aislado G-5	31,600	<0,05
aislado G-3 v/s aislado G-4	28,400	<0,05

## ANEXO 7

**Resultados de la prueba Kruskal-Wallis, para los índices Rbo, Rba y K,  
en el estudio de protección vaccinal.**

**Indice Rbo (Peso Bolsa Fabricio/Peso vivo \* 1000)**

GRUPO	N	SUMA DE RANGOS	PROMEDIO DE RANGOS	H CALCULADO
CONTROL NEGATIVO	20	824,50	82,450	112,17
CONTROL POSITIVO	10	3191,5	159,580	112,17
VACUNADO/DESAFIADO G-1	20	2060,0	103,000	112,17
SOLO DESAFIADO G-1	10	694,0	69,400	112,17
VACUNADO/DESAFIADO G-2	20	1654,5	82,725	112,17
SOLO DESAFIADO G-2	10	835,5	83,550	112,17
VACUNADO/DESAFIADO G-3	20	2371,0	118,550	112,17
SOLO DESAFIADO G-3	10	389,0	38,900	112,17
VACUNADO/DESAFIADO G-4	20	2251,0	112,550	112,17
SOLO DESAFIADO G-4	10	339,0	33,900	112,17
VACUNADO/DESAFIADO G-5	20	1180,5	59,025	112,17
SOLO DESAFIADO G-5	10	499,5	49,950	112,17

H TABULADO = 26,75    g.l.= 11    p = 0.05

(CONTINUACION ANEXO 7)

**Indice Rba (Peso Bazo/Peso vivo \* 1000)**

<b>GRUPO</b>	<b>N</b>	<b>SUMA DE RANGOS</b>	<b>PROMEDIO DE RANGOS</b>	<b>H CALCULADO</b>
CONTROL NEGATIVO	20	968,500	48,425	74,014
CONTROL POSITIVO	10	1008,500	100,850	74,014
VACUNADO/DESAFIADO G-1	20	1690,000	84,500	74,014
SOLO DESAFIADO G-1	10	1106,500	110,650	74,014
VACUNADO/DESAFIADO G-2	20	1662,000	83,100	74,014
SOLO DESAFIADO G-2	10	1305,000	130,500	74,014
VACUNADO/DESAFIADO G-3	20	1430,500	71,525	74,014
SOLO DESAFIADO G-3	10	1532,000	153,200	74,014
VACUNADO/DESAFIADO G-4	20	1463,500	73,175	74,014
SOLO DESAFIADO G-4	10	1617,500	161,750	74,014
VACUNADO/DESAFIADO G-5	20	1168,500	58,425	74,014
SOLO DESAFIADO G-5	10	1337,500	133,75	74,014

H TABULADO = 26,75 g.l.= 11 p = 0.05

(CONTINUACION ANEXO 7)

**Indice K (Peso Bolsa Fabricio/Peso Bazo)**

<b>GRUPO</b>	<b>N</b>	<b>SUMA DE RANGOS</b>	<b>PROMEDIO DE RANGOS</b>	<b>H CALCULADO</b>
CONTROL NEGATIVO	20	3240,5	74,250	112,17
CONTROL POSITIVO	10	742,5	162,03	112,17
VACUNADO/DESAFIADO G-1	20	1945,0	97,250	112,17
SOLO DESAFIADO G-1	10	553,0	55,3	112,17
VACUNADO/DESAFIADO G-2	20	1654,5	82,725	112,17
SOLO DESAFIADO G-2	10	605,5	60,550	112,17
VACUNADO/DESAFIADO G-3	20	2369,0	118,45	112,17
SOLO DESAFIADO G-3	10	188,0	18,800	112,17
VACUNADO/DESAFIADO G-4	20	2255,0	112,75	112,17
SOLO DESAFIADO G-4	10	167,5	16,750	112,17
VACUNADO/DESAFIADO G-5	20	2255,0	112,75	112,17
SOLO DESAFIADO G-5	10	314,5	31,450	112,17

H TABULADO = 26,75 g.l.= 11 p = 0.05

## ANEXO 8

### Resultados de la prueba de Comparaciones Múltiples de Dunn, para los índices Rbo, en el estudio de protección vaccinal.

( SOLO SE INCLUYEN LOS CONTRASTES CON DIFERENCIAS ESTADISTICAS SIGNIFICATIVAS (P<0.05))

COMPARACIONES	DIFERENCIA PROMEDIO	P
<b>CONTROL NEGATIVO VERSUS:</b> CONTROL POSITIVO	-77,125	<0.01
<b>CONTROL POSTIVO VERSUS:</b> VACUNADO/DESAFIADO G-1	56.575	<0.05
SOLO DESAFIADO G-1	90.175	<0.001
VACUNADO/DESAFIADO G-2	76.850	<0.001
SOLO DESAFIADO G-2	76.025	<0.05
SOLO DESAFIADO G-3	120.68	<0.001
SOLO DESAFIADO G-4	125.68	<0.001
VACUNADO/DESAFIADO G-5	100.55	<0.001
SOLO DESAFIADO G-5	109.63	<0.001
<b>VACUNADO/DESAFIADO G-1 VERSUS:</b> VACUNADO/DESAFIADO G-4	69.100	<0.05
<b>VACUNADO/DESAFIADO G-3 VERSUS:</b> VACUNADO/DESAFIADO G-4	79.650	<0.01
SOLO DESAFIADO G-4	84.650	<0.01
VACUNADO/DESAFIADO G-5	59.525	<0.05
SOLO DESAFIADO G-5	68.600	<0.05
<b>SOLO DESAFIADO G-3 VERSUS:</b> VACUNADO/DESAFIADO G-4	-73.650	<0.05
<b>VACUNADO/DESAFIADO G-4 VERSUS:</b> SOLO DESAFIADO G-4	78.650	<0.01

(CONTINUACION ANEXO 8)

**Resultados de la prueba de Comparaciones Múltiples de Dunn, para el índice Rba, en el estudio de protección vaccinal.**

( SOLO SE INCLUYEN LOS CONTRASTES CON DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS SIGNIFICATIVAS (P<0.05) )

<b>COMPARACIONES</b>	<b>DIFERENCIA PROMEDIO</b>	<b>P</b>
<b>CONTROL NEGATIVO VERSUS:</b>		
SOLO DESAFIADO G-2	-82.075	<0.01
VACUNADO/DESAFIADO G-4	-24.750	<0.001
VACUNADO/DESAFIADO G-5	-113.33	<0.001
SOLO DESAFIADO G-5	-85.325	<0.01
<b>VACUNADO/DESAFIADO G-1 VERSUS:</b>		
SOLO DESAFIADO G-3	-68.700	<0.05
SOLO DESAFIADO G-4	-77.250	<0.01
<b>VACUNADO/DESAFIADO G-2 VERSUS:</b>		
SOLO DESAFIADO G-3	-70.100	<0.05
SOLO DESAFIADO G-4	-78.650	<0.01
<b>SOLO DESAFIADO G-2 VERSUS:</b>		
VACUNADO/DESAFIADO G-5	72.075	<0.05
<b>VACUNADO/DESAFIADO G-3 VERSUS:</b>		
SOLO DESAFIADO G-3	-81.675	<0.01
SOLO DESAFIADO G-4	-90.225	<0.001
<b>SOLO DESAFIADO G-3 VERSUS:</b>		
VACUNADO/DESAFIADO G-4	80.025	<0.01
VACUNADO/DESAFIADO G-5	94.775	<0.001
<b>VACUNADO/DESAFIADO G-4 VERSUS:</b>		
SOLO DESAFIADO G-4	-88.575	<0.001
<b>SOLO DESAFIADO G-4 VERSUS:</b>		
VACUNADO/DESAFIADO G-5	103.33	<0.001
<b>VACUNADO/DESAFIADO G-5 VERSUS:</b>		
SOLO DESAFIADO G-5	-75.325	<0.05



(CONTINUACIÓN ANEXO 8)

**Resultados de la prueba de Comparaciones Múltiples de Dunn, para el índice K, en el estudio de protección vaccinal.**

( SOLO SE INCLUYEN LOS CONTRASTES CON DIFERENCIAS ESTADISTICAS SIGNIFICATIVAS (P<0.05) )

<b>COMPARACIONES</b>	<b>DIFERENCIA PROMEDIO</b>	<b>P</b>
<b>CONTROL POSITIVO VERSUS:</b> CONTROL NEGATIVO	-87,775	<0.001
<b>CONTROL NEGATIVO VERSUS:</b> VACUNADO/DESAFIADO G-1 SOLO DESAFIADO G-1 VACUNADO/DESAFIADO G-2 SOLO DESAFIADO G-2 SOLO DESAFIADO G-3 SOLO DESAFIADO G-4 SOLO DESAFIADO G-5	64.775 106.73 79.300 101.48 143.23 145.28 130.58	<0.01 <0.001 <0.001 <0.001 <0.001 <0.001 <0.001
<b>VACUNADO/DESAFIADO G-1 VERSUS:</b> SOLO DESAFIADO G-3 SOLO DESAFIADO G-4	78.450 80.500	<0.01 <0.01
<b>VACUNADO/DESAFIADO G-3 VERSUS:</b> SOLO DESAFIADO G-3 SOLO DESAFIADO G-4 SOLO DESAFIADO G-5	99.650 101.70 87.00	<0.001 <0.001 <0.01
<b>SOLO DESAFIADO G-3 VERSUS:</b> VACUNADO/DESAFIADO G-4 VACUNADO/DESAFIADO G-5	-93.950 -93.950	<0.001 <0.001
<b>VACUNADO/DESAFIADO G-4 VERSUS:</b> SOLO DESAFIADO G-4	96.00	<0.01
<b>SOLO DESAFIADO G-4 VERSUS:</b> VACUNADO/DESAFIADO G-5	-96.000	<0.001
<b>VACUNADO/DESAFIADO G-5 VERSUS:</b> SOLO DESAFIADO G-5	81.300	<0.01

## ANEXO 9

### EVALUACION MORFOMETRICA EN LOS GRUPOS DEL ESTUDIO DE PATOGENICIDAD

CEPAS POR GRUPO	VARIABLES MORFOMETRICAS			
	$R_{bo}^2$ (X+DS)	DIAMETRO BURSAL <sup>1</sup> (moda)	$R_{ba}^3$ (X+DS)	K (X+DS)
G-1	1.53 ± 0.29	3	1.73 ± 0.35	0.93 ± 0.26
G-2	1.25 ± 0.36	2	1.1 ± 0.21	1.11 ± 0.3
G-3	1.58 ± 0.36	3	1.19 ± 0.18	1.39 ± 0.41
G-4	1.73 ± 0.53	3	1.89 ± 0.47	0.93 ± 0.18
G-5	1.73 ± 0.4	3	1.32 ± 0.26	1.33 ± 0.33
<b>CONTROL</b>	<b>4.4 ± 0.82</b>	<b>4</b>	<b>1.17 ± 0.27</b>	<b>3.92 ± 0.91</b>

<sup>1</sup> Diametro Bursal: cada unidad corresponde a 3 mm aproximadamente

<sup>2</sup> Rbo = relación (Peso de la Bolsa / Peso vivo \* 1000)

<sup>3</sup> Rba = relación (Peso del Bazo / Peso vivo \* 1000)

<sup>4</sup> K = Peso bolsa / Peso bazo

<sup>5</sup> letras diferentes indican diferencia significativa (< 0,05)

## ANEXO 10

### Resultados individuales del estudio de patogenicidad.

<b>GRUPO CONTROL</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1	188	0.22	1.00	4	5.32	1.19	4.46
2 A	172	0.27	0.87	4	5.08	1.58	3.21
3	173	0.22	0.58	3	3.35	1.25	2.67
4	196	0.23	0.73	4	3.74	1.19	3.15
5	179	0.17	0.63	3	3.54	0.97	3.66
6	167	0.20	0.75	3	4.02	1.06	3.77
7	174	0.15	0.84	4	4.81	0.85	5.66
8	156	0.16	0.72	3	4.63	1.05	4.41
9	192	0.24	1.01	4	5.26	1.27	4.14
10	187	0.22	0.96	4	5.26	1.17	4.51
11 B	182	0.16	0.60	3	3.27	0.90	3.63
12	190	0.27	1.10	4	5.78	1.43	4.04
13	164	0.18	0.79	4	4.79	1.10	4.34
14 C	174	0.31	0.66	4	3.79	1.78	2.13
15	188	0.15	0.74	4	3.91	0.77	5.07

<b>GRUPO EXPERIMENTAL AISLADO G-I</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1 A	149	0.27	0.23	3	1.51	1.83	0.82
2	186	0.26	0.32	3	1.71	1.37	1.25
3	217	0.43	0.28	3	1.33	1.96	0.67
4	181	0.27	0.28	3	1.62	1.48	1.09
5	178	0.33	0.23	3	1.28	1.86	0.69
6	163	0.23	0.31	3	1.88	1.44	1.31
7 B	160	0.26	0.25	3	1.54	1.60	0.96
8	184	0.42	0.21	2	1.12	2.26	0.50
9	153	0.25	0.24	3	1.57	1.60	0.98
10	154	0.23	0.25	3	1.60	1.51	1.06
11	177	0.28	0.39	3	2.18	1.57	1.38
12	183	0.35	0.28	3	1.54	1.89	0.82
13	160	0.17	0.17	3	1.03	1.06	0.97
14 C	163	0.31	0.22	3	1.33	1.93	0.69
15	158	0.38	0.27	3	1.74	2.44	0.72

LETRAS (A,B,C) CORRESPONDEN A INDIVIDUOS CON EXAMEN HISTOPATOLOGICO

(CONTINUACION ANEXO 10)

<b>GRUPO EXPERIMENTAL AISLADO G-2</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1 A	120	0.09	0.13	2	1.08	0.77	1.41
2	134	0.16	0.24	3	1.81	1.20	1.50
3	145	0.16	0.20	2	1.41	1.09	1.29
4	153	0.18	0.13	2	0.84	1.18	0.72
5	117	0.13	0.12	2	1.03	1.10	0.94
6	114	0.11	0.12	2	1.04	0.96	1.08
7	157	0.23	0.21	3	1.33	1.43	0.93
8	128	0.12	0.10	2	0.82	0.97	0.84
9	137	0.21	0.23	3	1.69	1.53	1.10
10	120	0.16	0.17	2	1.40	1.35	1.04
11 B	145	0.13	0.14	2	0.97	0.90	1.07
12 C	131	0.14	0.09	2	0.70	1.07	0.66
13	162	0.17	0.30	3	1.85	1.05	1.76
14	127	0.18	0.15	2	1.16	1.23	0.94
15	150	0.15	0.20	2	1.31	0.97	1.34

<b>GRUPO EXPERIMENTAL AISLADO G-3</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1	168	0.22	0.31	3	1.83	1.33	1.37
2	160	0.22	0.22	3	1.36	1.38	0.98
3 A	189	0.24	0.19	3	0.99	1.25	0.80
4	133	0.17	0.29	3	2.17	1.26	1.71
5 B	179	0.23	0.24	3	1.36	1.26	1.08
6	141	0.17	0.18	3	1.30	1.23	1.06
7	218	0.28	0.35	3	1.62	1.28	1.27
8 C	165	0.19	0.30	3	1.82	1.13	1.63
9	130	0.16	0.30	3	2.34	1.20	1.95
10	141	0.13	0.23	3	1.63	0.89	1.84
11	205	0.24	0.29	3	1.40	1.19	1.18
12	176	0.26	0.29	3	1.63	1.49	1.10
13	155	0.20	0.25	3	1.62	1.29	1.26
14	208	0.19	0.26	3	1.25	0.93	1.35
15	166	0.14	0.31	3	1.88	0.82	2.29

LETRAS (A,B,C) CORRESPONDEN A INDIVIDUOS CON EXAMEN HISTOPATOLOGICO

(CONTINUACION ANEXO 10)

<b>GRUPO EXPERIMENTAL AISLADO G-4</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1 A	172	0.27	0.18	2	1.04	1.56	0.67
2	189	0.41	0.36	3	1.89	2.16	0.88
3	163	0.43	0.43	3	2.63	2.63	1
4	166	0.35	0.40	3	2.43	2.13	1.14
5 B	167	0.24	0.30	3	1.80	1.42	1.27
6	179	0.31	0.29	3	1.64	1.73	0.95
7	192	0.43	0.29	3	1.53	2.21	0.69
8	172	0.27	0.22	2	1.30	1.58	0.82
9	179	0.37	0.26	3	1.44	2.04	0.70
10 C	189	0.35	0.32	3	1.68	1.83	0.92
11	171	0.30	0.25	3	1.46	1.75	0.83
12	158	0.25	0.26	3	1.65	1.57	1.05
13	164	0.29	0.33	3	2.01	1.74	1.15
14	146	0.28	0.25	3	1.73	1.94	0.89
15	155	0.32	0.30	3	1.91	2.08	0.92

<b>GRUPO EXPERIMENTAL AISLADO G-5</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1 A	153	0.23	0.34	3	2.20	1.47	1.49
2	209	0.28	0.33	3	1.58	1.34	1.18
3	189	0.26	0.35	3	1.85	1.35	1.37
4	211	0.28	0.43	3	2.04	1.30	1.56
5 B	177	0.21	0.29	3	1.65	1.16	1.42
6	186	0.30	0.49	3	2.62	1.62	1.61
7	191	0.21	0.23	3	1.22	1.10	1.11
8	161	0.28	0.22	3	1.34	1.71	0.78
9	162	0.25	0.27	3	1.64	1.52	1.08
10 C	160	0.27	0.28	3	1.75	1.71	1.03
11	160	0.16	0.16	3	0.98	0.97	1.01
12	203	0.23	0.36	3	1.75	1.15	1.52
13	195	0.29	0.31	3	1.56	1.48	1.06
14	173	0.18	0.34	3	1.95	1.05	1.86
15	152	0.14	0.26	3	1.68	0.89	1.90

LETRAS (A,B,C) CORRESPONDEN A INDIVIDUOS CON EXAMEN HISTOPATOLOGICO

**ANEXO 11**  
**EVALUACIÓN MORFOMÉTRICA EN LOS GRUPOS DEL ESTUDIO DE PROTECCIÓN VACCINAL.**

CEPAS POR GRUPO		VARIABLES MORFOMETRICAS			
		$R_{bo}^2$ ( X + DS )	DIAMETRO BURSAL <sup>1</sup> ( X + DS )	$R_{ba}^3$ ( X + DS )	K ( X + DS )
G-1	V	3.31 ± 0.57	3	1.67 ± 0.56	2.17 ± 0.69
	N	2.6 ± 0.83	3	1.85 ± 0.41	1.40 ± 0.37
G-2	V	3.0 ± 1.37	4	1.57 ± 0.37	2.0 ± 1.03
	N	2.92 ± 0.59	3	2.01 ± 0.24	1.46 ± 0.26
G-3	V	3.76 ± 1.12	4	1.58 ± 0.66	2.64 ± 0.92
	N	2.12 ± 0.37	3	2.52 ± 0.57	0.87 ± 0.18
G-4	V	3.70 ± 1.24	4	1.52 ± 0.39	2.48 ± 0.77
	N	2.04 ± 0.41	3	2.49 ± 0.30	0.83 ± 0.21
G-5	V	2.48 ± 0.80	4	1.4 ± 0.27	1.82 ± 0.66
	N	2.30 ± 0.75	4	2.28 ± 0.73	1.04 ± 0.31
C	SV	<b>2.94 ± 0.84</b>		<b>1.75 ± 0.36</b>	<b>1.7 ± 0.37</b>
	NN	<b>5.02 ± 0.88</b>	4	<b>1.31 ± 0.19</b>	<b>3.86 ± 0.74</b>

V: Grupo Experimental (Desafiado - Vacunado)

N: Grupo Experimental (Desafiado - NO Vacunado)

SV: Grupo Control (Solo Vacunado)

NN: Grupo Control (No vacunado-No desafiado)

<sup>1</sup>: Diámetro Bursal: cada unidad corresponde a 3mm aproximadamente

<sup>2</sup>: Rbo = relación (Peso de la Bolsa / Peso vivo \* 1000)

<sup>3</sup>: Rba = relación (Peso del Bazo / Peso vivo \* 1000)

<sup>4</sup>: letras diferentes indican diferencia significativa (< 0,05)

**ANEXO 12**

**Resultados individuales del estudio de protección vaccinal**

<b>GRUPO CONTROL NEGATIVO</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1	302	0.35	1.47	4	4.87	1.16	4.20
2	236	0.27	1.36	4	5.76	1.14	5.02
3	295	0.40	1.49	4	5.05	1.36	3.73
4	286	0.41	1.25	4	4.37	1.43	3.05
5	299	0.36	1.30	4	4.35	1.20	3.61
6	245	0.32	1.30	4	5.31	1.31	4.06
7	306	0.42	1.46	4	4.77	1.37	3.48
8	328	0.50	1.62	4	4.94	1.52	3.24
9	262	0.34	1.50	4	5.73	1.30	4.41
10	290	0.47	1.75	4	6.03	1.62	3.72
11	283	0.39	1.29	4	4.56	1.38	3.31
12	332	0.57	1.91	5	5.75	1.72	3.35
13	295	0.30	1.57	5	5.32	1.02	5.23
14	269	0.36	1.95	5	7.25	1.34	5.42
15	336	0.37	1.11	4	3.30	1.10	3.00
16	311	0.38	1.34	4	4.31	1.22	3.53
17	326	0.49	1.49	4	4.57	1.50	3.04
18	289	0.41	1.59	4	5.50	1.42	3.88
19	288	0.31	1.42	4	4.93	1.08	4.58
20	271	0.30	0.99	4	3.65	1.11	3.30

<b>GRUPO CONTROL POSITIVO</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1	257	0.29	0.56	3	2.18	1.13	1.93
2	352	0.53	0.67	3	1.90	1.51	1.26
3	294	0.6	1.11	4	3.78	2.04	1.85
4	245	0.47	0.67	3	2.73	1.92	1.43
5	255	0.46	0.66	3	2.59	1.80	1.43
6	267	0.3	0.6	3	2.25	1.12	2.00
7	240	0.5	0.71	4	2.96	2.08	1.42
8	320	0.63	1.36	4	4.25	1.97	2.16
9	264	0.50	1.1	4	4.17	1.89	2.20
10	241	0.48	0.62	3	2.57	1.99	1.29

(CONTINUACION ANEXO 12)

<b>GRUPO VACUNADO Y DESAFIADO CON AISLADO G-I</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1	290	0.39	1.04	4	3.59	1.34	2.67
2	249	0.41	0.66	3	2.65	1.65	1.61
3	286	0.36	0.98	4	3.43	1.26	2.72
4	259	0.40	1.02	4	3.94	1.54	2.55
5	310	0.38	0.93	4	3.00	1.23	2.45
6	207	0.26	0.81	4	3.91	1.26	3.12
7	200	0.45	0.73	4	2.65	2.25	1.62
8	191	0.38	0.43	3	2.25	1.99	1.13
9	163	0.16	0.43	3	2.64	0.98	2.69
10	184	0.26	0.64	3	3.48	1.41	2.46
11	280	0.29	0.87	4	3.11	1.04	3.00
12	310	0.49	1.09	4	3.52	1.58	2.22
13	210	0.69	0.93	4	4.43	3.29	1.35
14	265	0.49	1.08	4	4.08	1.85	2.20
15	217	0.45	0.72	3	3.32	2.07	1.60
16	301	0.60	0.73	3	2.43	1.99	1.22
17	252	0.61	0.71	4	2.82	2.42	1.16
18	183	0.31	0.57	3	3.11	1.69	1.84
19	156	0.15	0.52	3	3.33	0.96	3.47
20	147	0.22	0.53	3	3.61	1.50	2.41

<b>GRUPO SOLO DESAFIADO CON AISLADO G-I</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1	172	0.27	0.44	3	2.56	1.57	1.63
2	164	0.29	0.52	3	3.17	1.77	1.79
3	192	0.37	0.49	3	2.55	1.93	1.32
4	215	0.55	0.60	3	2.79	2.56	1.09
5	153	0.16	0.15	2	0.98	1.05	0.94
6	194	0.38	0.45	3	2.32	1.96	1.18
7	226	0.41	0.70	3	3.10	1.81	1.71
8	168	0.32	0.27	3	1.61	1.90	0.84
9	194	0.45	0.75	4	3.87	2.32	1.67
10	278	0.46	0.86	4	3.09	1.65	1.87



(CONTINUACION ANEXO 12)

<b>GRUPO VACUNADO Y DESAFIADO CON AISLADO G-2</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1	420	0.60	2.00	5	4.76	1.43	3.33
2	341	0.49	0.56	3	1.64	1.44	1.14
3	383	0.57	0.40	3	1.04	1.49	0.70
4	452	0.69	0.69	3	1.53	1.53	1.00
5	365	0.48	0.66	3	1.81	1.32	1.38
6	419	0.74	1.37	4	3.27	1.77	1.85
7	466	0.68	2.60	5	5.58	1.46	3.82
8	402	0.56	1.60	4	3.98	1.39	2.86
9	392	0.56	1.59	4	4.06	1.43	2.84
10	396	1.04	1.27	4	3.21	2.63	1.22
11	351	0.63	0.94	4	2.68	1.79	1.49
12	418	0.65	1.20	4	2.87	1.56	1.85
13	395	0.41	1.27	4	3.22	1.04	3.10
14	443	0.70	1.44	4	3.25	1.58	2.06
15	373	0.57	2.21	5	5.92	1.53	3.88
16	472	0.67	0.43	3	0.91	1.42	0.64
17	387	0.45	1.19	4	3.07	1.16	2.64
18	444	0.93	0.94	4	2.12	2.09	1.01
19	344	0.75	0.86	4	2.50	2.18	1.15
20	438	0.52	1.1	4	2.51	1.19	2.12

<b>GRUPO SOLO DESAFIADO CON AISLADO G-2</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1	371	0.77	1.26	4	3.40	2.08	1.64
2	370	0.54	0.88	4	2.38	1.46	1.63
3	361	0.64	0.81	4	2.24	1.77	1.27
4	354	0.80	0.72	4	2.03	2.26	0.90
5	479	0.95	1.46	4	3.05	1.98	1.54
6	419	0.93	1.35	4	3.22	2.22	1.45
7	395	0.86	1.44	4	3.65	2.18	1.67
8	378	0.79	1.29	4	3.41	2.09	1.63
9	378	0.77	0.92	4	2.43	2.04	1.19
10	364	0.73	1.25	4	3.43	2.01	1.71

(CONTINUACION ANEXO 12)

<b>GRUPO VACUNADO Y DESAFIADO CON AISLADO G-3</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1	228	0.43	0.85	4	3.73	1.89	1.98
2	200	0.23	0.71	4	3.55	1.15	3.09
3	255	0.33	1.08	4	4.24	1.29	3.27
4	272	0.57	1.98	5	7.28	2.10	3.47
5	228	0.29	0.55	3	2.41	1.27	1.90
6	219	0.85	0.51	4	2.33	3.88	0.60
7	211	0.24	0.73	4	3.46	1.14	3.04
8	198	0.34	0.86	4	4.34	1.72	2.53
9	208	0.24	0.87	4	4.18	1.15	3.63
10	196	0.45	0.61	4	3.11	2.30	1.36
11	174	0.25	0.58	4	3.33	1.44	2.32
12	174	0.24	0.67	4	3.85	1.38	2.79
13	203	0.40	1.06	4	5.22	1.97	2.65
14	262	0.28	0.67	4	2.56	1.07	2.39
15	224	0.28	0.70	4	3.13	1.25	2.50
16	180	0.22	0.77	4	4.28	1.22	3.50
17	195	0.31	0.52	3	2.67	1.59	1.68
18	210	0.29	0.92	4	4.38	1.38	3.17
19	263	0.43	0.90	4	3.42	1.63	2.09
20	206	0.16	0.76	4	3.69	0.78	4.75

<b>GRUPO SOLO DESAFIADO CON AISLADO G-3</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1	250	0.71	0.42	3	1.68	2.84	0.59
2	250	0.56	0.61	4	2.44	2.24	1.09
3	308	0.50	0.51	3	1.66	1.62	1.02
4	239	0.82	0.49	3	2.05	3.43	0.60
5	296	0.64	0.71	4	2.40	2.16	1.11
6	229	0.69	0.60	4	2.62	3.01	0.87
7	254	0.67	0.49	3	1.93	2.64	0.73
8	299	0.57	0.51	3	1.71	1.91	0.89
9	260	0.79	0.66	4	2.54	3.04	0.84
10	304	0.70	0.65	4	2.14	2.30	0.93

(CONTINUACION ANEXO 12)

<b>GRUPO VACUNADO Y DESAFIADO CON AISLADO G-4</b>							
<b>NUMERO O POLLO</b>	<b>PESO vrvo (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1	272	0.30	1.18	4	4.34	1.10	3.93
2	207	0.24	0.64	3	3.09	1.16	2.67
3	259	0.29	0.74	3	2.86	1.12	2.55
4	250	0.39	0.93	3	3.72	1.56	2.38
5	275	0.52	1.47	4	5.35	1.89	2.83
6	238	0.43	1.01	4	4.24	1.81	2.35
7	229	0.38	0.93	4	4.06	1.66	2.45
8	283	0.60	1.64	4	5.80	2.12	2.73
9	248	0.57	1.30	4	5.24	2.30	2.28
10	225	0.36	0.75	3	3.33	1.60	2.08
11	281	0.36	1.51	4	5.37	1.28	4.19
12	253	0.31	0.60	3	2.37	1.23	1.94
13	293	0.43	1.43	4	4.88	1.47	3.33
14	279	0.50	0.59	3	2.11	1.79	1.18
15	299	0.63	1.33	4	4.45	2.11	2.11
16	248	0.33	0.48	3	1.94	1.33	1.45
17	199	0.27	0.69	3	3.47	1.36	2.56
18	255	0.42	0.62	4	2.43	1.65	1.48
19	242	0.24	0.78	4	3.22	0.99	3.25
20	216	0.21	0.39	3	1.81	0.97	1.86

<b>GRUPO SOLO DESAFIADO CON AISLADO G-4</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1	229	0.60	0.30	3	1.31	2.62	0.50
2	230	0.54	0.61	4	2.65	2.35	1.13
3	232	0.49	0.48	3	2.07	2.11	0.98
4	256	0.59	0.63	3	2.46	2.30	1.07
5	222	0.55	0.40	3	1.80	2.48	0.73
6	273	0.69	0.60	4	2.20	2.53	0.87
7	270	0.64	0.41	3	1.52	2.37	0.64
8	225	0.57	0.47	3	2.09	2.53	0.81
9	287	0.93	0.57	3	1.99	3.24	0.61
10	250	0.60	0.58	3	2.32	2.40	0.97

(CONTINUACION ANEXO 12)

<b>GRUPO VACUNADO Y DESAFIADO CON AISLADO G-5</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1	318	0.47	0.71	3	2.23	1.48	1.51
2	347	0.40	1.42	4	4.09	1.15	3.55
3	305	0.38	0.41	3	1.34	1.25	1.08
4	356	0.66	1.01	4	2.84	1.85	1.53
5	355	0.63	0.80	4	2.25	1.77	1.27
6	384	0.45	0.86	4	2.24	1.17	1.91
7	321	0.40	0.80	4	2.49	1.25	2.00
8	379	0.60	0.82	4	2.16	1.58	1.37
9	368	0.41	0.86	4	2.34	1.11	2.10
10	351	0.41	0.40	3	1.14	1.17	0.98
11	293	0.33	0.45	3	1.54	1.13	1.36
12	283	0.54	0.44	3	1.55	1.91	0.81
13	424	0.49	0.93	4	2.19	1.16	1.90
14	337	0.49	0.99	4	2.94	1.45	2.02
15	383	0.47	1.31	4	3.42	1.23	2.79
16	375	0.41	0.84	4	2.24	1.09	2.05
17	340	0.44	1.04	4	3.06	1.29	2.36
18	338	0.53	0.78	3	2.31	1.57	1.47
19	311	0.49	1.22	4	3.92	1.58	2.49
20	350	0.63	1.13	4	3.23	1.80	1.79

<b>GRUPO SOLO DESAFIADO CON AISLADO G-5</b>							
<b>NUMERO POLLO</b>	<b>PESO VIVO (grs)</b>	<b>PESO BAZO (grs)</b>	<b>PESO BOLSA (grs)</b>	<b>diámetro bolsa</b>	<b>Rbo</b>	<b>Rba</b>	<b>K</b>
1	300	0.55	0.64	4	2.13	1.83	1.16
2	326	0.45	0.75	4	2.30	1.38	1.67
3	293	0.83	0.78	3	2.66	2.83	0.94
4	340	0.80	0.60	3	1.76	2.35	0.75
5	281	1.03	0.67	3	2.38	3.67	0.65
6	339	0.58	0.62	3	1.83	1.71	1.07
7	334	0.80	1.05	4	3.14	2.40	1.31
8	353	0.58	0.47	3	1.33	1.64	0.81
9	338	0.64	0.55	3	1.63	1.89	0.86
10	340	1.06	1.29	4	3.79	3.12	1.22

GRACIAS....

A mí madre, hermana, tíos y tías, por su incondicional apoyo y amor.

A mí patrocinante Dra. Aída Cubillos G., por haberme permitido realizar esta tesis y por haber confiado en mí.

A mí amigo Víctor Díaz, con quién compartí muchas horas de trabajo, gracias por tu amistad.

A mis amigos y colegas Dres. Ricardo Ildefonso y Marcelo Gómez, con quienes compartí tantas aventuras, gracias por su apoyo y amistad.

A mi Amor, Paolita, por su incondicional apoyo.

Del mismo modo, deseo agradecer a las muchas otras personas que siempre estuvieron dispuestas a colaborar en forma desinteresada. Para todos ellos expreso mi gratitud a través de este trabajo de tesis.