



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional

Esta licencia permite a otras distribuir, combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial y, a pesar que son nuevas obras deben siempre rendir crédito y ser no comerciales, no están obligadas a licenciar sus obras derivadas bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>



UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA DE ICA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“EVALUACIÓN DE UNA VACUNA RECOMBINANTE HVT-IBDV CONTRA LA
ENFERMEDAD DE GUMBORO EN POLLOS SPF”**

TESIS

Para optar el título profesional de Médico Veterinario Zootecnista

BACHILLER

Reyna Ester LACHO VILLA

ASESOR

Dra. Alicia Nazareth IBARRA BOBER

CHINCHA -2021

DEDICATORIA

A Dios quien ha sido mi guía, fortaleza y su mano de fidelidad y amor han estado conmigo hasta el día de hoy.

A mis padres Andrés y Marcelina y a mis hermanas quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por confiar en mí y por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

A mis abuelitos Honorio y Basilia que son mis mejores amigos que con sus sabios consejos que me dieron tips para andar en el camino de la vida y enseñarme que sin Dios nada somos, por demostrarme que si se puede a no rendirme a llorar conmigo y decirme sigue tú puedes. Gracias muchas gracias.

A la memoria de mi abuelita, quien confió en mí en todo momento y desde cielo me guiaron para terminar con éxito mi tesis

A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi vida y a toda mi familia por estar siempre presentes.

Mi profundo agradecimiento a todas las autoridades y personal de mi alma Mater facultad de medicina veterinaria y zootecnia.

Al decano Juan De Dios que en paz descanse por ser más que un Docente por ser un maestro y por ser un amigo gracias Doctor.

Agradecer al laboratorio Farvet, por abrirme las puertas y permitirme realizar todo el proceso investigativo dentro de su establecimiento.

De igual manera agradecer mi asesora Dra. Alicia Ibarra y al Ing. Caballero. Mv Manuel criollo, mis principales colaboradores durante todo este proceso, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitieron el desarrollo de este trabajo. Agradezco a mis jurados Dr. Narváez, Mag. Frida Sanguineti, Mag. Violeta Enríquez, Mag. Sergio Espinoza gracias por sus enseñanzas.

Agradezco, a mis Docentes quienes con la enseñanza de sus valiosos conocimientos hicieron que pueda crecer día a día como profesional, gracias a cada uno de ustedes por su paciencia, dedicación, apoyo incondicional y amistad.

ÍNDICE	4-5
DIDICATORIO	2
AGRADECIMIENTO	3
RESUMEN	6
ABSTRACTO	7
I. INTRODUCCIÓN	8-9
II REVISIÓN IBLIOGRÁFICA	10
Antecedentes.....	10
Antecedentes internacionales.....	10-11
Antecedentes nacionales.....	12-13
Marco Teórico.....	14-26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
Lugar y fecha de ejecución.....	27
Materiales y equipos.....	27
Instalaciones.....	27
Aves experimentales.....	28
Metodología experimenta.....	28-31
Programa sanitario y manejo	32
Tratamiento experimental.....	32
Diseño experimental	32
Tamaño muestral.....	32
Análisis estadístico.....	33
Variables de estudio	33

IV. RESULTADOS	34
Signos clínicos y mortalidad.....	34-35
Índice Bursal.....	35
Relación bazo/Bursa.....	35
Peso bursal.....	35
Tamaño bursal.....	35-38
Detección viral y aislamiento viral.....	39-40
V. DISCUSION	41-42
VI. CONCLUSIONES	43
VII. RECOMENDACIONES	44
VIII. BIBLIOGRAFIA	45-48
IX. ANEXO	49-58

RESUMEN

La avicultura como industria creciente enfrenta retos y amenazan por las enfermedades infecciosas, una de estas enfermedades infecciosas es la bolsa de Fabricio–gumboro, donde se estimó la defensa otorgada de una vacuna recombinante HVT-IBDV en pollos spf que se les aplicó al primer día de edad por vía subcutánea. Se usaron 100 pollos distribuidos en dos grupos de 50. El grupo T1 (control) y T2 (grupo vacunado). A los 28 días post vacunación se efectuó el duelo experimental con la cepa VFAR (nombre asignado por el laboratorio) del virus de Gumboro. Como indicadores de protección se evaluó los signos clínicos, muerte, lesiones macroscópicas bursales, índice bursal, relación bursal/bazo, peso de bursal post desafío. Además, se evaluó la detección y aislamiento viral en el día 9, 15 y 21 días de edad mediante las pruebas de PCR convencional y cultivo celular, en aves vacunadas se detectó como positivo el día 9 (57.1 %), 15 (85.7%) y 21(100%) con respecto al grupo no vacunado resultando negativos y en el aislamiento viral el grupo vacunado como positivo con un 85.7 % al día 9 y 100% a los 15 y 21 días post vacunación con respecto al control dando negativo, además las aves del grupo T1 manifestaron 20% de muertes, así como signo clínico (diarrea y desánimo) y lesiones macroscópicas más severas que el grupo T2. Los valores del índice Bursal nos indica que hay una diferencia significativa ($p < 0.05$) a los 5,8 y 11 días pos-desafío entre grupos la relación bursa/bazo sólo mostró una diferencia significativa a los 8 días post desafío, pero no para los días 5 y 11 post desafío, para peso de bursal si hubo diferencia significativa para los días 8 y 11 post desafío y no para el día 5 post desafío. Se concluye que la vacuna recombinante HVT-IBDV al primer día de edad inducen eficientes defensas contra enfermedad de Gumboro y su diagnóstico temprano con las pruebas analizadas para la detección y aislamiento del virus vacunal.

Palabras clave. HVT-IBDV, vacuna recombinante, avicultura, protección conferida.

ABSTRACT

Poultry farming as a growing industry faces challenges and threats from infectious diseases, one of these infectious diseases is the Fabricius-gumboro pouch, where the protection conferred by a recombinant HVT-IBDV vaccine was evaluated in spf chickens applied subcutaneously on the first day of age. A total of 100 chickens were used, distributed in two groups of 50. The T1 group (control) and T2 (vaccinated group). At 28 days post-vaccination, the experimental challenge was performed with the VFAR strain (name assigned by the laboratory) of Gumboro virus. As indicators of protection, clinical signs, mortality, macroscopic bursal lesions, bursal index, bursa/spleen ratio and post-challenge bursa weight were evaluated. In addition, viral detection and isolation at day 9, 15 and 21 days of age were evaluated by conventional PCR and cell culture tests. In vaccinated birds, the virus was detected as positive at day 9 (57.1%), 15 (85.7%) and 21 (100%) with respect to the non-vaccinated group, resulting negative, and in viral isolation, the vaccinated group was positive with 85.7% at day 9 and 100% at day 21. In addition, the birds of the T1 group presented 20% mortality, as well as clinical signs (diarrhea and depression) and macroscopic lesions more severe than the T2 group. The values of the Bursal index indicate that there is a significant difference ($p < 0.05$) at 5, 8 and 11 days post-challenge between groups, the bursa/spleen ratio only showed a significant difference at 8 days post-challenge but not for days 5 and 11 post-challenge, for bursal weight there was a significant difference for days 8 and 11 post-challenge and not for day 5 post-challenge. It is concluded that the recombinant HVT-IBDV vaccine at the first day of age induces efficient protection against Gumboro disease and its early diagnosis with the tests analyzed for the detection and isolation of the vaccine virus.

Key words. HVT-IBDV, recombinant vaccine, poultry, protection conferred.

I. INTRODUCCION

La avicultura cumple un rol importante en la economía peruana y el desarrollo de los sectores se han visto condicionados por 2 apariencias de consideración, la salubridad de las producciones aviares y la inocuidad del producto avícola.

Dentro del asunto de sanidades existen los grupos de enfermedad que representa una pérdida económica para el productor, tal como la enfermedad de Gumboro, la Micoplasmosis aviar, la Bronquitis Infecciosa, la Laringotraqueítis Infecciosa Aviar, entre otros (17).

“La Enfermedad Infecciosa de la Bursa (EIB) es una amenaza permanente para la industria avícola, debido a las repercusiones en el rendimiento económico de los planteles de reproductoras y pollos de carne. La EIB es considerada como la principal causa de inmunosupresión, ocasionando un incremento en la susceptibilidad de las aves domésticas a otros agentes infecciosos como la enfermedad de Newcastle, Bronquitis Infecciosa, Marek, e infecciones bacterianas” (33, 23).

“La enfermedad es de distribución mundial, con mayor incidencia en las grandes áreas de producción avícola; es altamente contagiosa y afecta a los pollos hasta las 6 semanas de edad causando una morbilidad de hasta 100% y una mortalidad que varía de 20 a 30%”. La manera subclínica es la más fundamental, se manifiesta en aves hasta las 3 semanas de edad, y aunque no manifiestan algún signo clínico evidente, se distingue por una rígida inmunodepresión que se presenta en la repercusión de otras dolencias. El modo clínico se nota en aves mayores de 3 semanas, de presentación inesperada con muerte alta a los 5 a 7 días post infestación, y se distingue por diarrea, desánimo y deshidratación, continuo de un acelerado restablecimiento de los que sobrevivieron (21).

Los conocimientos del aspecto referente al padecimiento infeccioso de la bolsa, han retornado en incremento en los últimos años, y hoy por hoy, se conoce muy claro el aspecto molecular, antigénico, patogénico e inmunogénico de los agentes infecciosos. En cambio, a pesar de los diversos avances que se han originado en esta zona, el padecimiento sigue siendo un problema muy importante en la explotación avícola a nivel mundial. La profundización en la investigación del componente que determina la manifestación del padecimiento, y que, por consiguiente, puede alcanzar a evitarla, son de fundamental consideración para reducir la impresión que la empresa ocasiona en el sistema de productividad.

Entre la estrategia empleada para la precaución y los controles de la enfermedad infecciosa en las industrias avícolas se encuentra la bioseguridad y la inmunización; ésta última es fundamental puesto que diferentes padecimientos infecciosos tienen distribuciones mundiales, lo que obstaculiza sus controles inclusive con una medida de bioseguridad, las cuales tradicionalmente pueden dividirse en vacunas inactivadas y vacunas vivas atenuadas.

Por las razones antes expuestas se planteó como posible solución al problema la utilización de vacunas recombinadas contra la enfermedad, ha mejorado significativamente algunos de estos aspectos, mejorando así el bienestar de los pollos y la conveniencia del usuario. Varias vacunas basadas en HVT recombinante han sido desarrolladas y utilizadas con éxito para proteger las aves de corral contra una serie de patógenos aviarios importantes, cuyo objetivo fue evaluar La vacuna recombinante HVT-IBDV contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF capaz de proteger al desafío y detección de virus en sangre y pluma.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

2. ANTECEDENTES

2.1.1 Antecedentes internacionales

“Para estudiar la interacción entre el IBDV y el sistema inmunológico , los pollos fueron expuestos a una cepa intermedia del IBDV por vía intramuscular , y mediante Real Time PCR se analizó la expresión de un panel de citoquinas y quimioquinas aviares en duodeno , bazo y bolsa de Fabricius. . Además, nitrito esplénico. La producción de (NO) y las frecuencias de diferentes poblaciones de células mononucleares se evaluaron mediante la reacción de Griess y la citometría de flujo, respectivamente. La inoculación intramuscular (im) con IBDV promovió una sobreexpresión de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-15 y gIFN en el bazo, que se correlacionó con un aumento de la concentración plasmática de gIFN medida por ELISA , junto con un incremento de la concentración de NO en los sobrenadantes de esplenocitos en 1ppp El resultado obtenido en el presente trabajo mostraron que el IBDV de virulencia intermedia, dado im, indujo efectos similares a los descritos previamente para IBDV altamente virulento en respuestas inmunes innatas tempranas . Teniendo en cuenta que la ruta im es la ruta de elección para el suministro de vacunas de nueva generación, y que el uso de antígenos recombinantes también requiere la adición de adyuvantes para la estimulación inmune adecuada (7).

“En un estudio utilizaron un modelo en el que los pollos se vieron comprometidos en células T funcionales por neonatos. La timectomía y el tratamiento con ciclosporina A (TxCsA), para demostrar el papel de las células T en la inmunidad protectora contra el IBDV. Nosotros demostraron que las células T eran necesarias para lograr una protección completa contra el IBDV virulento. Cuando los pollos tratados con TxCsA comprometidos con células T se vacunaron con una vacuna inactivada contra el IBDV (iIBDV), el 91% no estaba protegido contra la exposición al IBDV en comparación con los pollos intactos con células T, que tenían una tasa de protección del 91%.

La vacuna iIBDV induce la neutralización de virus (VN) y anticuerpos ELISA, respectivamente, en 65 y 5% de las aves tratadas con TxCsA, y en 100 y 58% de aves intactas con células T. resultados indicaron que el anticuerpo solo no fue adecuado para inducir protección contra IBDV en pollos y que la participación de células T fue fundamental para la protección. Proponen que la incapacidad de iIBDV para proteger Los pollos TxCsA se debieron a la inmunidad de las células T comprometidas, las células T auxiliares funcionales y, muy probablemente, también las células T citotóxicas son Necesario en la protección de la vacuna iIBDV (32). Una vacuna contra el virus del herpes del pavo disponible comercialmente (vHVT-IBD) que expresa la proteína viral 2 del IBDV, y se compararon dos vacunas de IBD en vivo en pollitas comerciales por sus efectos sobre el número de células B en circulación, la capacidad de las aves vacunadas para desarrollar una respuesta inmune humoral contra diferentes antígenos, así como su capacidad para inducir protección contra el desafío de vIBDV” (30).

2.1.2. Antecedentes nacionales

Evaluaron la defensa otorgada por vacunas contra el padecimiento de Gumboro en aves de posturas comerciales. Se usaron 300 aves Isa Brown de un día de edad, divididas en 3 grupos de 100 aves cada uno. Los grupos A y B fueron inmunizados 2 veces, a los 9 y 24 días de edad,

con una cepa intermedia-intermedia (2512), y el grupo C no fue inmunizado. Los grupos B y C fueron desafiados a los 32 días de edad, usando la cepa F 52/70 por vía óptica. La patogenicidad de la cepa vacunal fue estimada los días 1, 35 y 45 de edad a través del índice bursal, la relación bursal/bazo y la lesión microscópica de bursal, bazo y timo; también, se establece el título de anticuerpo por la prueba de ELISA indirecta. Solo el grupo C manifestó muerte y signo clínico de Gumboro a lo largo de la investigación. El valor de índice bursal en los 3 grupos fue coincidente con atrofiadas bursales; igualmente, la lesión histopatológica en los 3 grupos fue severa. A los 45 días de edad, el grupo C manifestó mayores seroconversiones (3997), en tanto que los grupos inmunizados A y B manifestaron un título similar de anticuerpo. Se concluye que, si bien, el empleo de vacunas intermedias a los 9 y 24 días de edad provoca daños bursales compatibles con atrofia, incita buenas protecciones contra el padecimiento de Gumboro (19).

Se compararon 2 vías de adaptación de la vacuna contra el Padecimiento Infeccioso de la Bursa en el pollo de engorde, utilizando la vacuna con cepas intermedias-intermedias en un plan de inmunización a los 7 y 17 días de edad. Se laboró con 69 100 pollos de la línea Cobb Vantres 500 de granjas comerciales, fraccionados en 2 grupos parecidos. El Grupo A fue inmunizado por la vía aspersion y el Grupo B por la vía agua de bebida. A los 29 días de edad, 50 aves de cada grupo se trasladaron a un galpón empírico para competir con la cepa estándar F52/70. Se estimó un signo clínico, lesión macroscópica y microscópica, índices bursátiles, y respuestas serológicas, ya sea en el ave desafiada como en la no desafiada. Signo leve y de cortas duraciones de desánimo y diarrea se observaron a lo largo de 3 días en el ave desafiada de los dos grupos experimentales, lo que mostró la defensa otorgada por las vacunas (10).

En un estudio evaluaron la defensa otorgada por programas de inmunización en contra de la Enfermedad de Gumboro en polla de posturas comerciales inmunizadas con vacunas vectorizadas trivalentes (HVT + ILT + IBD), aplicadas en el primer día de edad vía óptica. Se

usaron 100 pollas de posturas divididas en 2 grupos de 50 aves, el grupo A se vacuno y el grupo B no se vacuno. A los 35 días de edad se efectuó el duelo vía óptica con cepas clásicas F 52/70 del virus de Gumboro. La defensa fue estimada a través de la muerte, signo clínico y parámetro productivo hasta el final de la investigación; de la misma manera por la lesión macroscópica y microscópica en Bursa e índice bursal, en 5 aves sacrificadas al día 35 (antes del duelo) y a los 38, 41 y 49 días de edad (post duelo). La defensa inmunizada fue evaluada a los 1, 35 y 49 días de edad a través de la prueba de ELISA (4).

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Generalidades

El nombre de Gumboro proviene del pueblo del Estado de Delaware, en Estados Unidos en el que se detalló por primera vez. Por dañar en los pollos el Sistema Inmune Primario (bolsas de Fabricio y timo) y al Sistema Inmune Secundario (tejido linfoide intestinal, tonsilas cecales, bazo y glándulas de Harder, regulador de inmunidades locales de la mucosa respiratoria) es tomado en cuenta como una de las más fundamentales infecciones creadoras de inmunosupresoras en avicultura (20).

Se le conoce con diversos apelativos como Bursitis Infecciosa, Enfermedad Bursal, Desorden infeccioso de la Bursa, Infección de la Bolsa de Fabricio, Enfermedad Infecciosa de la Bursa, Enfermedad infecciosa de la Bolsa de Fabricio, Enfermedad de Gumboro (20).

2.2.2. Etiología

La enfermedad de Gumboro es producida por el IBDV, el que integra a la familia Birnaviridae y al género Avibirnavirus, y muestra los serotipos 1 y 2. El primero es el único con capacidad de incitar enfermedades en las aves, en tanto que el segundo ha sido apartado de aves que no manifiestan el padecimiento (13).

2.2.3. Estructura del virus

Como se comentó, el serotipo 1 posee capacidades patogénicas, en tanto que el serotipo 2 no la posee, también de que no inducen protecciones cruzadas con el serotipo 1. Este serotipo 2 ha sido confirmado en pavos, sin manifestaciones de enfermedad clínica. El genoma de dsRNA está conformado por 2 segmentos denominados A y B. El segmento B es parecido entre los 2 serotipos; por lo opuesto, el segmento A distingue entre el serotipo 1 y el 2 (17).

El virus no es tapado, tiene una cobertura sencilla de simetría icosaédrica conformada por 92 capsómeros y con un diámetro que varía de 55 a 65 nm. La contextura del genoma viral se basa en 2 segmentos, el segmento más extenso es el segmento A, el que recopila las proteínas virales VP2, VP3, VP4 y VP5. El segmento más diminuto es el segmento B, este recopila a las proteínas virales VP1 (34).

2.2.4. Replicación viral

Generalmente, se da a conocer muy poco sobre el evento bioquímico vinculado con las replications virales de los birnavirus. Los mecanismos de la síntesis de ARN no se han establecido claramente, aunque se ha probado que el virus replica su ácido nucleico a través de mecanismos de desplazamientos de filamentos. Las transcripciones y replications se producen después de la inserción celular sin desvestimiento absoluto del virus (27).

2.2.5 Resistencia del virus

El agente infeccioso tiene una gran solidez en el ecosistema, así como las capacidades de resistencias a solución como éter, cloroformos, fenol, amonios cuaternarios, entre otros, y a condición de pH extremo entre 2 y 12. Esta condición obstaculiza en grandes medidas la supresión de los agentes en galpón positivo, en el que únicamente el desinfectante derivado del yodo creen tener efectos claros acerca del virus; en cambio, en alguna explotación se utiliza

combinación de desinfectante que puede arruinar los agentes, con alguna consecuencia para el tracto respiratorio del ave (12) .

2.2.6. Clasificación de cepas

El método de clasificación más común es el serológico y genético. El método serológico depende de la respuesta del anticuerpo frente a los agentes infecciosos. A través de la prueba de virus neutralizaciones se identifica 2 serotipos del virus que se denominan como serotipo 1 y 2, con la prueba de anticuerpo fluorescente y ELISA, no se puede diferenciar; solo el virus del serotipo 1 causa enfermedades en el pollo y nadie es patógeno en el pavo. La vacunación contra el serotipo 2 no cuida contra el serotipo 1.

Los virus del serotipo 1 se distribuyen en virus clásico y variante. La cepa del virus clásico comprende a la de patogenicidades intermedias y la de virus muy virulento (11). El virus de cepa variante además pertenece al serotipo 1 y esto difiere antigénicamente del virus clásico (5).

2.2.7. Epidemiología

Lo más factible es que las extensiones geográficas del virus causante de la enfermedad de Gumboro ya era ampliamente extendido al instante de su primera definición por parte de Cosgrove, en cambio, Gumboro es donde las condiciones correspondientes se reconocen de modo original como algo reciente o bien, cuando cambios de indetectables o subclínicas a clínicas. Posiblemente el origen que sostuvo lugares en cambios en la patogenicidad del virus (34).

De esta reducida población y en escasa década el virus de Gumboro o su nuevo prototipo de del virus más viejo se extiende a casi todo aquel país productor de aves a nivel mundial y

establecida su elevada fortaleza están presentes con su variación en toda granja existente y se le reconocen como preocupaciones mundiales de las industrias avícolas (26).

La enfermedad de Gumboro ha surgido de forma clínica en los últimos 50 años y la acción de que se ha desarrollado y usado la vacuna pensada en sus controles de cómo efecto excelentes fuentes de datos útiles (26).

La manifestación clínica al instante de su presentación en los EEUU (empezando de los años 60 y 70). Su situación clínica se perdió en ese instante y se produjo subclínico en la mayor parte de los sucesos (más o menos entre 1970 y 1985) (17).

Maneras más virulentas se comunicaron más tarde, y al mismo periodo de forma inmensamente inmunosupresor en los EEUU (iniciando en torno de 1985) si como muy virulentas formas en África y Europa occidental entre 1985 y 1990 (22).

La manera elevadamente inmunosupresora se expande de los EEUU hacia América latina en tanto que la manera elevadamente virulenta se expande de Europa occidental a Europa oriental, norte de África, medio oriente y Asia, entre el fin de los años 90 y a los 2000, la manera más virulenta de la enfermedad de Gumboro se extiende a Latinoamérica y hasta California. Hoy, aunque la manera más virulenta del padecimiento este muy fuerte presente en ciertos países o regiones, hay una preferencia total de la enfermedad de Gumboro de volver a una mayor manera subclínica autoritaria, la que no quiere mencionar que el virus ha ido dejando su patogenicidad (26).

2.2.8 Transmisión

El virus se transfiere muy rápido de un animal a otro por la vía bucal, por contacto directo, por medio de un vector inanimado, agua o alimentos contaminados con heces contagiadas; el pollo infectado excreta a los virus hasta 2 semanas post infección. Las personas y el ave silvestre además pueden servir como portador mecánico del virus (12, 36). No hay certeza de que el IBDV se propague por medio de los huevos o que existan estados de portadores verdaderos en el ave recuperada (12).

El *Alphitobius diaperinus*, tomado de locales con 8 semanas luego de unos brotes, pueden seguir siendo infecciosos para el pollo susceptible cuando se le nutre con suspensiones de tierra. No existe evidencia adicional que apoye la deducción de que el mosquito o la rata actúe como vector o reservorio del virus. Existen reportes de que los perros alimentados con pollo que había muerto de la enfermedad de Gumboro agudo, descartaron vvIBDV viable en sus heces hasta 2 días luego de la alimentación, pero no 3 días (4).

2.2.9 Patogénesis

La consecuencia de la infección por IBDV depende de la patogenicidad de la cepa, la cifra del virus infeccioso, la edad, las líneas genéticas, las vías de inoculación y la presencia o falta de anticuerpo neutralizante. La seriedad del padecimiento se encuentra de manera directa relacionado con los números de célula sensible presente en las bolsas de Fabricio; por consiguiente, las más elevadas susceptibilidades de edad son entre 3 y 6 semanas, cuando las bolsas de Fabricio se encuentran en su límite de crecimiento (34).

La infección se realiza por vía bucal, ya sea directo o indirecto por el excremento en fomite contaminado (22).

En un estudio secuencial de tejido originario del pollo infectado por vía bucal, usando inmunofluorescencias, se detecta antígenos virales en macrófago y célula linfoide de los ciegos

a las 4 horas luego de la vacunación; luego de 1 hora más se localizó el virus en célula linfoide en el duodeno y yeyuno. El virus llega primeramente al hígado, en el que se le detecta 5 horas luego de la vacunación; luego el virus se esparce por el torrente sanguíneo, en el que se reparte hacia otro tejido, incorporando las bolsas de Fabricio (12) Se identifica la célula de las bursas infectada a las 11 horas luego de las exposiciones orales. A las 16 horas post vacunación se origina una segunda y pronunciada viremia con una segunda réplica. El motivo exacto del padecimiento y mortalidad no está claro pero no aparenta relacionarse solo a la seriedad de la lesión y a los daños bursales, sino que se debe a las formaciones del complejo inmune (17).

El tiempo de incubación es muy limitado, de 2 a 3 días, signo histológico de infecciones se detecta en las bursas a las 24 horas. La evacuación del virus continúa 2 semanas posterior de la infestación. Aunque otro órgano linfoide además se ve afectado, el órgano diana fundamental es la bursa. El virus contagia a la célula B en el periodo inmaduro y produce efectos citolíticos acerca de esta célula en divisiones activas (22).

2.2.10. Presentación de la enfermedad.

El cuadro clínico de esta enfermedad es inestable; en cambio, se puede explicar 3 modos de manifestación de la enfermedad: subclínicas, clínicas y severas (21).

2.2.11 Forma Subclínica

Se considera subclínica o sin signo, es la más propagada a nivel mundial. Se distingue por cuadro de inmunosupresiones severas en las que las manifestaciones clínicas corresponden casi únicamente a la complicación o coinfección con otro agente infeccioso que expresa su patogenicidad de modo más agresivo al detectarse sistemas inmunes deficientes en el ave (12). Otorgado la índole inmunosupresora del IBDV, la aparición de los agentes en explotaciones

productivas constituye puertas de ingreso para otro agente infeccioso, lo cual puede causar un cuadro clínico severo y conducir a la muerte de grandes porcentajes de los habitantes (17).

2.2.12 Forma Clínica

La segunda forma clínica, nombrada como maneras clásicas de la enfermedad, se distingue por cuadros inmunosupresores y sistémicos leves a moderados, en el que la conclusión más fundamental son los procesos de reducción de las respuestas inmunes. Finalmente, a partir de mediados de la década de los 80 se ha expuesto un tercer modo de presentaciones severas, caracterizadas por una alta mortalidad en aves tiernas, con manifestación clínica sistémica que produce deterioros acelerados del ave. Entre el signo característico de esta forma de presentación clínica se encuentra la diarrea y orina con elevadas concentraciones de urato, que causa deterioros y mortalidad acelerada de los animales (17). Estos tipos de cuadros clínicos se han expuesto en diversas regiones a nivel mundial, en la que este modo de presentaciones comienza a coger grandes importancias en los sectores avícolas (19).

2.2.13 Lesiones macroscópicas

Las lesiones macroscópicas son apreciadas inicialmente en la bolsa de Fabricio y en la musculatura de los muslos y de la pechuga. Los túbulos renales se pueden encontrar distendidos con uratos, sin embargo, esta lesión es secundaria y debida con mayor probabilidad a la deshidratación. Ocasionalmente se detectan hemorragias en los riñones y en la mucosa del vínculo de los proventrículos y la molleja (14).

El hígado puede estar inflamado y mostrar infartos periféricos (15). El bazo puede encontrarse levemente agrandado de dimension con un pequeño foco de color gris distribuido homogéneamente en la superficie. En confrontación con la cepa del IBDV moderado patógeno, la muy virulenta induce un daño más grave a la tonsila cecal, el timo, el bazo y la médula ósea, y mayor reducción en el índice de peso del timo (12).

2.2.14. Lesiones microscópicas

El deterioro y la necrosis de los linfocitos comienzan en el área medular del folículo bursal tan temprano como a 1 día de post infección (26). Los linfocitos se sustituyen por heterofilias para el día 3 o 4 después de la infección, todos los folículos linfoides están afectados. El edema severo, la hiperemia y la acumulación marcada de heterofilias son evidentes, lo que causa el aumento del peso de la bolsa. Las cavidades quísticas se desarrollan en la médula folicular (21).

Estas cavidades quísticas son causadas por necrosis y fagocitosis por heterofilias y células plasmáticas. Durante la etapa de atrofia bursal, fibroplasia del tejido bursal se hace evidente. Además, el epitelio bursal se convierte en proliferativo, formando una estructura de tipo glandular, que consiste en el epitelio cilíndrico bursal que contiene Glóbulos de mucina. En las últimas etapas, linfocitos dispersos aparecen focos sin la capacidad de formar folículos funcionales (2).

2.2.15. Diagnóstico.

Debido a la capacidad del IBDV para inducir la inmunosupresión, puede actuar como factor predisponente de otras infecciones, tales como Dermatitis Gangrenosa, Síndrome de Anemia A-plástica Hemorrágica, Hepatitis por Corpúsculo de Inclusión y problemas respiratorios. La confirmación del diagnóstico puede ser hecha a través del uso de macerados de bolsas infectadas como antígeno (Ag) en una prueba de agar gel, contra un anti-suero positivo conocido. También se puede utilizar el examen microscópico de partes de la bolsa para la observación de lesiones típicas o la demostración de Ag a través de la inmunofluorescencia en partes fijadas de la bolsa (9).

El aislamiento viral se efectúa en la membrana de corio-alantoide de los huevos embrionados 10 - 11 días, a partir de tejidos infectados (Bolsa y Bazo), observándose la muerte de algunos

embriones en 3-5 días. También se puede verificar el efecto citopático sobre un cultivo de células de la bolsa (después de 3-4 días de incubación) (24).

Varios procedimientos serológicos, ampliamente utilizados, están disponibles para detección de anticuerpos (AC) del IBDV: Seroneutralización (SN), ELISA y la prueba de precipitación por agar gel (AGP). El AGP es rápido, pero es una prueba solamente cualitativa. La SN y el ELISA son pruebas cuantitativas y preferibles que el AGP. ELISA es bastante sensible y disponible comercialmente, pero diferente de la prueba de SN. La ELISA no tiene la especificidad de SN y no diferencia la respuesta entre Ac para el serotipo 1 y 2 del IBDV (24).

Actualmente las técnicas moleculares, virus-neutralización y ELISA de captura con Ac monoclonales han colaborado mucho en la aclaración del diagnóstico, a través de la capacidad de detección y caracterización de las cepas implicadas en la enfermedad y por el uso de técnicas moleculares como: hibridación molecular, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) y PCR (polimerasa Chain Reaction). también que permite la comparación entre cepas de campo y vacunas clasificándolas en grupos, que por la similitud se puede elegir una cepa vacunal que mejor encaje para uso frente a una determinada cepa de campo (9).

2.2.16 Diagnóstico diferencial

Los síntomas y el examen post mortem de las lesiones patognomónicas, en particular de la bolsa de Fabricio. Las condiciones más susceptibles de ser confundidas clínicamente con IBD son coccidiosis aviar, enfermedad de Newcastle en algunas formas viscerales, síndrome de retraso en el crecimiento, anemia infecciosa del pollo, Micotoxicosis y formas nefropatogénicas de infecciosas como de Bronquitis infecciosa. En todos los casos agudos, la presencia de lesiones bursales. Permite un diagnóstico de IBD. En los casos subclínicos, una atrofia de la bursal se logra confundir con otra enfermedad como enfermedad de Marek o anemia infecciosa. Un examen histológico de la bolsa permitirá diferenciar entre estas enfermedades (34)

2.2.17 Prevención y control

El método más importante de prevención y control del padecimiento en la industria comprende la bioseguridad y la inmunización, este último considerando programas eficaces de inmunización a la reproductora y la inmunización en el instante adecuado al pollo de carne y pollita comercial (4).

Antes de conversar de inmunización se tiene que dar realce a la bioseguridad, que accede a que se disminuya la densidad del virus en el medio y con ello que se reduzca la fuerza del reto al ave. Se debe tomar en cuenta los aislamientos, aseo y desinfección de los galpones, limitación y sanitización de los trabajadores, vehículo y material, así como los controles del vector (9), pero debido a la elevada fortaleza del virus en el ecosistema y su extensa repartición, la medida de limpieza por sí sola, aunque es esencial, son frecuentemente escasos (17).

La prevención por medio de la vacuna es el fundamental procedimiento para contrarrestar la enfermedad de Gumboro (5), la vacunación se fundamenta en 2 enfoques distintos, uno se basa en defender al ave joven de la enfermedad subclínica a través de las inmunidades pasivas transmitidas por la mamá y el otro es inmunizar al ave usando la vacuna viva para prevenir las enfermedades clínicas (34).

2.2.18 Vacunas.

Es una interrupción del microorganismo vivo, inactivo o muerto, o fracción de ello que al ser administrado se produce inmunidad, previniendo el suceso de cierta enfermedad infecciosa (3).

2.2.19 Vacunas vivas

La vacuna viva es producida en el huevo embrionados SPF, en la que la cepa suele atenuar para disminuir su patogenicidad (capacidad para incitar daños en la bursal del ave libre de patógeno), cuanto más resistente la atenuación, superior es la sensibilidad a la obstrucción con

el anticuerpo materno, inferior son las capacidades de expansión y inferior es la eficiencia frente a la cepa de campos muy virulentos (4).

Para que se genere un resultado inmune en los animales, el microorganismo debe lograr desarrollarse y reproducirse en los animales al suministrar una cantidad relativa reducida del virus o de bacteria, lo cual al replicarse se amplían los números de microorganismo a cantidades suficientes como para inducir el sistema inmunológico, e impulsar respuestas inmunes protectoras (1).

2.2.20. Vacunas inactivadas

La mayor parte de la vacuna inactivada de la enfermedad de Gumboro es producida con el virus total, usando ya sean huevo embrionados, cultivo celular o en pollo cuya Bursa se recolecta unos pocos días posteriores de la vacunación con virus vivo, el virus cosechado es inactivado y después colocado en suspensiones con emulsiones oleosas que cumple con el rol de coadyuvantes (31).

La cepa inactivada propagada en Bursa o embrión induce un título de anticuerpo más alto detectado por ELISA en contraste con el título inducido por cepa de cultivos derivados de la célula (5).

2.2.21. Vacunas recombinantes.

La vacuna de ADN recombinante se encuentra conformada por un organismo vivo lo cual ha sido modificado, es decir el gen virulento ha sido eliminado y reemplazado por un gen de otro patógeno contra lo cual se ansía ser inmunizado. Este tipo de vacuna es conocida además como “carrier system” se debe a la utilización de un virus o una bacteria para dirigir o trasladar los antígenos de los cuales se desea producir inmunidad (29). Los procesos para la ejecución

de la vacuna del ADN recombinante se basan en unas amplificaciones iniciales de los genomas de los agentes infecciosos por medio de las reacciones en cadenas de la polimerasa (PCR) con los reconocimientos de los genes que codifican las proteínas inmunogénicas, después estos fragmentos se introducen dentro de un plásmido eucariota o en un virus adecuado para la locución, la réplica o los clonajes de estas proteínas en bacterias (25). Finalmente se lleva a cabo la depuración del plásmido con la proteína, la cual se inocula y genera respuestas inmunes al sostener conexión con la célula del patrón (17).

2.2.22. Cultivos celulares

En la investigación de alternativa diferente para los aislamientos y/o desarrollo del virus, el uso de cultivo celular como substratos en el sistema de productividad de biológico y proceso de aislamientos ofrecen buenas alternativas (18).

Es así como los aislamientos y cultivos del virus de influenza se constituyen en uno de los desafíos fundamentales en el laboratorio de diagnósticos y en el de las industrias biofarmacéuticas. Alternativas la constituye el cultivo primario derivado del tejido animal, dentro del cual se encuentra cultivos primarios (18), Las principales ventajas de este tipo de cultivo es su capacidad de dedicar mayores sensibilidades porque brindan toda la condición necesaria cuando se utiliza para los crecimientos in vitro de virus, principalmente a la cepa que infecta las mismas especies de las cuales son obtenidas. La desventaja es tal como los riesgos de contaminación con microorganismo adventicio, el elevado precio de mantenimientos y suplementaciones de los medios de cultivos (16).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 lugar y fecha de ejecución

La investigación fue realizada en la Granja de necropsia de la empresa FARVET SAC.

La fecha del estudio fue setiembre-octubre. Del 2019, y con un tiempo de duración de 6 semanas.

Localización geográfica y meteorológica.

Latitud	13°27'45''
Longitud	76°08'00''
Altitud	500 msnm
Temperatura min. promedio ...	19.25°C
Temperatura max. Promedio ...	26.95°C
Humedad relativa mínima. Promedio...	58.75 %
Humedad relativa Máxima. promedio ...	93.25 %

Fuente: Estación Meteorológica FONAGRO Chincha 2019

3.2 Materiales y equipo.

3.2.1. Instalaciones.

Se usó la instalación y equipo convencional de la respectiva Granja Experimental de Farvet, la misma que tiene las siguientes características:

- Longitud : 38 m
- Ancho : 10 m.
- Altura lateral : 2.30 m.
- Altura Central : 4.50 m.
- Techo de columna : a 2 aguas
- Piso de mayólica

Dentro de la granja experimental está ubicado el módulo de jaulas tipo baterías de piso donde estarán alojados los pollos SPF.

3.2.2 Aves experimentales.

De acuerdo al análisis del tamaño muestral se usaron 100 pollos SPF en 2 grupos de 50, criadas en jaulas.

3.3 metodología experimental.

Fase pre experimental:

Las aves fueron divididas randomizadamente en dos grupos donde tuvieron acceso ad libitum al agua y sus respectivos alimentos y proporcionados según su requerimiento. Todo el manejo fue común, se dividirán en dos grupos de 50 aves, T-1 grupo sin vacuna T-2 grupo vacunado con vacuna recombinante HVT-IBD.

Fase experimental:

Las aves fueron divididas randomizadamente en dos grupos donde tuvieron acceso ad libitum al agua y sus respectivos alimentos fueron proporcionados según su requerimiento. Las muestras a recolectar fueron sangre periférica y folículos de pluma de 7 aves de cada grupo a los 9,15, 21 días post vacunación, y a los 28 días post vacunación fue desafiado 20 aves por grupo contra la enfermedad de Gumboro con la cepa VFAR código designado por el laboratorio.

Vacunación:

Pollitos SPF de un día fueron vacunados por vía subcutánea con 0.2 ml en la parte posterior del cuello con una aguja 22G × 1" para administrar la vacuna respectiva.

Recolección de muestras:

Las muestras fueron recolectadas y procesadas de 7 aves de cada grupo de tratamiento en cada punto de tiempo planteado, estas muestras fueron leucocitos de sangre periférica, folículo de plumas. La toma de sangre periférica fue obtenida de la vena yugular del ave con una jeringa de 5ml con aguja de 21G x 1 1/2 “un volumen aproximado entre 2 y 3 ml al obtener la muestra en el momento se verte la sangre en un tubo de vacutainer que lleva heparina de litio y se homogeniza de forma lenta para que la sangre no se coagule para su proceso.

Los folículos de pluma, fueron tomadas debajo de las Alas (parte axilar) de 3 plumas en crecimiento por animal con una pinza y fue colocado en tubos de plástico de 2 ml que contenía DPBS un volumen de 500ul (Dulbecco’s Phosphate Buffered saline) para su análisis.

Procesamiento de muestras.

Para el aislamiento del virus se tuvo que utilizar células CEF a una confluencia de 70% a 90% de mono capa, se aislaron leucocitos, mínimo de 1mL de sangre en un tubo de 10mL se verte 1mL de DPBS más 1mL de sangre y fue mezclada suavemente por inmersión sin generar burbujas, en otro tubo de 10mL se añadió 1ml de Histopaque más 1ml de la mezcla anterior, Centrifugar a 400g por 30 minutos con una aceleración de 1 y desaceleración de 0 a 19°C, luego fue retirado cuidadosamente el sobrenadante para poder recolectar las células que se ubican entre ambas fases, depositar las células sobre 10 ml de DPBS y centrifugar a 300g por 10 min a 18°C, eliminar el sobrenadante y añadir nuevamente 10mL de DPBS y centrifugar nuevamente a 300g por 10 min a 18°C, luego decantar y añadir 1 o 2 ml de Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) al 10% de suero fetal bovino (SFB) con antibiótico y se procedió a contar las células bajo el microscopio de Axiovert 1, y fueron colocadas sobre las células CEF previamente preparadas.

Las muestras de pluma fueron analizadas mediante PCR convencional, para este análisis se tuvo que disrumpir y homogenizar las pulpas de pluma con el equipo de TissueLyser a través de una agitación a alta velocidad en los tubos de plástico agregados con perlas de acero inoxidable logrando así la purificación de ADN, después de este proceso el ADN fue extraído con un kit comercial (ADN DNeasy, QIAGEN, Alemania), siguiendo el protocolo para virus recomendado terminado el proceso se almacenó a 4 °C hasta el momento de su uso.

El perfil térmico para el PCR convencional, fue estandarizado con una temperatura de desnaturalización de 95 °C durante cinco minutos, una fase de 35 ciclos a 94 °C durante 20 segundos, 55 °C durante 35 segundos y 72 °C durante 45 segundos y posteriormente, una fase de extensión final a una temperatura de 72 °C durante cinco minutos en este proceso de PCR se utilizó los reactivos comerciales (Taq DNA polimerasa, QIAGEN, Alemania). Terminado el proceso del PCR fue visualizada mediante electroforesis en gel de agarosa, con una concentración de 2.5% y revelado con SYBR Safe donde fue corrida a 70V durante una hora en cámara de electroforesis, por último, fue visualizado en un revelador de imagen como es el equipo de azure biosystems.

Parámetros de evaluación después del desafío.

Signos clínicos y mortalidad.

Posterior al desafío las aves fueron examinadas clínicamente durante 11 días registrándose la mortalidad, depresión, diarrea y cualquier otro signo clínico.

Evaluación de las lesiones macroscópicas.

Para la evaluación de las lesiones, fueron sacrificadas 5 aves por grupo a los 5, 8, 11, días post desafío; En todos los casos se registraron, fotografiaron las lesiones macroscópicas encontradas.

Las lesiones macroscópicas fueron evaluadas determinándose en el índice Bursal, tamaño de Bursa y la relación Bursa/bazo en cada caso.

Índice Bursal (IB).

Se determina la proporción del peso de la Bursa de Fabricio con respecto al peso corporal, el cual es empleado para determinar la presencia o no de atrofia de este órgano (36).

La fórmula es la siguiente (13):

$$\frac{\text{Peso de la bursa (grs) x 1000}}{\text{Peso corporal (grs)}}$$

El I.B. obtenido fue clasificado según lo descrito por (13).

1.5 – 3.5 = Bursa Normal

0.5 – 1.5 = Atrofia Bursal

≤ a 0.5 = Severa Atrofia Bursal

Relación Bursa/Bazo.

Es un método para evaluar el desarrollo normal de estos órganos linfoides. Una relación Bursa/Bazo > a 1 significa que la Bursa es más grande que el bazo, y < a 1 indica que la Bursa es más pequeña (17).

3.4 Programa sanitario y de manejo.

Los grupos fueron tratados con un programa sanitario, manejo y condiciones ambientales similares y adecuadas, siguiendo los protocolos que normalmente se emplean bajo las condiciones de la granja.

3.5 tratamientos experimentales

T-1: Control

T-2: Grupo vacunado con vacuna HVT-IBD.

3.6 Diseño experimental.

El estudio comprendió dos grupos de 50 aves cada uno, cada grupo tenían 6 repeticiones de 8 o 9 aves.

T 1 (control): Aves no vacunadas contra la enfermedad de Gumboro, y desafiadas a los 28 días de edad con la cepa VFAR por la vía intramuscular.

T 2 (vacunado): Aves vacunadas con la vacuna recombinante (HVT - IBD) aplicada por vía subcutánea el primer día de edad y desafiadas a los 28 días de edad con la cepa VFAR por la vía intramuscular.

3.7 Tamaño muestral:

El cálculo de tamaño de muestral para una diferencia de proporciones en dos grupos

Independientes fue:

T 1 (control) = proporción esperada de muerte en no vacunados (0.2)

T 1 (vacunado) = proporción esperada de muerte en vacunados (0.0)

Poder (0.8)

Nivel de significancia (0.05)

Tamaño mínimo de aves para cada grupo = 44

3.8 Análisis estadístico.

Los datos de lesiones macroscópicas fueron procesados y analizados estadísticamente mediante los siguientes análisis: Análisis de variancia utilizando el software estadístico SPSS 2014, Se fijará un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

3.9 Variables en estudio.

3.9.1. Variable independiente:

Vacuna HVT-IBD

3.9.2. Variable dependiente:

Lesiones macroscópicas (Índice Bursal; tamaño de Bursa; peso de Bursa; relación Bazo/ Bursa).

Presencia del virus (cultivo celular)

Detección de virus (PCR convencional)

IV. RESULTADOS.

4.1 Signos clínicos y mortalidad.

El T1 tuvo una mortalidad de 20 % hasta los 11 días post desafío, los signos clínicos se presentó en ambos grupos 48 horas post desafío como depresión y diarrea y las lesiones también T1 durante los 7 días post desafío se caracterizaron por edema, hemorragia bursal y con material caseoso en su interior.

Cuadro 01. Porcentaje de mortalidad y porcentaje de signos clínicos después del desafío con la cepa VFAR del virus de Gumboro

	GRUPO T1	GRUPO T2
MORTALIDAD	20	0
DEPRESIÓN	80	15
DIARREA	60	10

Cuadro 02. Presentación de signos clínicos por día de la Gumboro después del desafío en las aves del grupo T1 (control no vacunado).

DIAS POST DESAFIO GRUPO T1											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
MORTALIDAD	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0
DEPRESIÓN	0	3	3	2	3	2	1	2	0	0	0
DIARREA	0	0	0	4	2	2	3	1	0	0	0

Cuadro 03. Presentación de signos clínicos por día de la Gumboro después del desafío en las aves del grupo T2 (grupo vacunado).

DIAS POST DESAFIO GRUPO T2											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
MORTALIDAD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DEPRECION	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
DIARREA	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0

4.2 Índice bursal (IB).

Los índices bursales de las aves del T2 estuvieron dentro del rango de tamaño normal (entre 1.5 y 3.5). En el T1, el IB fue disminuyendo durante los días post desafío hasta valores de atrofia bursal. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre grupos a los 5, 8 ,11 días post desafío.

4.3 Relación Bursa/bazo.

Estadísticamente el día 8 post desafío (PD) tuvo una diferencia estadísticamente significativa entre grupos ($p < 0.05$) y los días 5 y 11 no hubo diferencia significativa entre los grupos.

4.4 Tamaño de Bursa.

En el tamaño de bursal se observó una diferencia estadísticamente significativa para los días 5, 8 y 11 post desafío ($p < 0.05$).

4.5 Peso bursal

El peso bursal tuvo una diferencia estadísticamente significativa para los días 8 y 11 post desafío ($p < 0.05$), pero para el día 5 post desafío no se observó diferencia significativa.

Cuadro 04. Promedio de lesiones macroscópica para los 5 días post desafío con la cepa VFAR en pollitas SPF.

	T-1	T-2	n	P valor
P. Bursa (g)	1.088 ^a	1.537 ^a	5	0.146
Tamaño Bursa(cm)	2.4 ^a	4.8 ^b	5	0.004
Índice Bursal	1.9 ^a	3.6 ^b	5	0.018
Bursa/bazo	1.62 ^a	2.12 ^a	5	0.272

T-1 = Grupo no vacunado, desafiado; T-2 = grupo vacunado con vacuna HVT-IBD, desafiado.

^{a,b} letras diferentes dentro de columnas indica diferencia estadística ($p < 0,05$).

SPF= libre de patógenos específicos

Cuadro 05. Promedio de lesiones macroscópica para los 8 días post desafío con la cepa VFAR en pollitas SPF.

	T-1	T-2	n	P valor
P. Bursa (g)	0.576 ^a	1.54 ^b	5	0.001
Tamaño Bursa(cm)	3 ^a	4.8 ^b	5	0.001
Índice Bursal	1.3 ^a	3.2 ^b	5	0.002
Bursa/bazo	0.54 ^a	1.68 ^b	5	0.001

T-1 = Grupo no vacunado, desafiado; T-2 = grupo vacunado con vacuna HVT-IBD, desafiado.

^{a,b} letras diferentes dentro de columnas indica diferencia estadística ($p < 0,05$).

SPF= libre de patógenos específicos

Cuadro 06. Promedio de lesiones macroscópica para los 11 días post desafío con la cepa VFAR en pollitas SPF.

	<i>T-1</i>	<i>T-2</i>	<i>n</i>	<i>P valor</i>
P. Bursa (g)	0.638 ^a	2.012 ^b	5	0.032
Tamaño Bursa(cm)	3.8 ^a	5.6 ^b	5	0.011
Índice Bursal	1.28 ^a	3.78 ^b	5	0.025
Bursa/bazo	0.7 ^a	1.88 ^a	5	0.061

T-1 = Grupo no vacunado, desafiado; T-2 = grupo vacunado con vacuna HVT-IBD, desafiado.

^{a,b} letras diferentes dentro de columnas indica diferencia estadística ($p < 0,05$).

SPF= libre de patógenos específicos

4.4 Detección viral y aislamiento viral.

Se evaluó la detección y el aislamiento del virus vacunal de la vacuna recombinante HVT-IBD, por medio de la técnica de PCR convencional se evaluó y por medio del cultivo celular el aislamiento del virus vacunal.

Detección viral. La detección del virus en los tratamientos evaluados y el grupo control, comparado mediante PCR convencional fueron los siguientes.

Cuadro 07. El porcentaje de detección viral de los dos grupos evaluados a 9, 15 y 21 días post vacunación.

Días post vacunación	Grupos	Muestras	Positivo (%)	Negativo (%)
9 días	vacunado	7	57.1	42.8
	control	7	0	100
15 días	Vacunado	7	85.7	14.3
	Control	7	0	100
21 días	Vacunado	7	100	0
	control	7	0	100

Aislamiento viral. El aislamiento del virus vacunal en los tratamientos evaluados y el grupo control, comparados mediante aislamiento en cultivo celular fueron los siguientes.

Cuadro 07. Porcentaje de aislamiento del virus vacunal de los dos grupos evaluados a los 9, 15 y 21 días post vacunación.

Días post vacunación	Grupos	muestras	Positivo (%)	Negativo (%)
9 días	Vacunado	7	85.7	14.2
	Control	7	0	100
15 días	Vacunado	7	100	0
	Control	7	0	100
21 días	Vacunado	7	100	0
	Control	7	0	100

V. DISCUSIÓN

La vacunación en las aves contra la enfermedad es muy importante para la prevención de la enfermedad, sin embargo, en el campo es difícil lograr una protección del 100% de las aves, porque algunas de las causas muy frecuentes son debidas al manejo de la vacuna en campo y a la administración masiva de la vacuna vía agua de bebida la cual en las mejores condiciones alcanza solamente al 80% de las aves (13, 35). En el presente estudio se evaluó la vacuna recombinante HVT-IBD contra la enfermedad de Gumboro donde solo aves del grupo control presentaron mortalidad a partir del cuarto día hasta el sexto día acumulando una mortalidad 20 %, mientras tanto en los estudios reportados (19), tuvieron una mortalidad del 33.3 % esto pudo haber sido que fueron aves comerciales. Además los dos grupos presentaron signos clínicos compatibles con la enfermedad posterior al desafío: sin embargo, los signos fueron severos en el grupo control y leves en el grupo vacunado, especialmente cuadros de depresión y diarrea, similares a los reportados por (18, 5).

En el tamaño de bursa se observó una diferencia estadísticamente significativa para los días 5, 8 y 11 post desafío ($p < 0.05$) y en cuanto al índice bursal de las aves del grupo vacunado estuvieron dentro del rango de tamaño normal (entre 1.5 y 3.5) y en el grupo no vacunado, el IB fue disminuyendo durante los días post desafío hasta valores de atrofia bursal, este resultado se asemeja a la investigación de (4), donde el índice bursal del grupo vacunado se mantuvo dentro de los rangos normales (> 1.5).

En cuanto a la relación Bursa/bazo estadísticamente el día 8 post desafío (PD) tuvo una diferencia estadísticamente significativa entre grupos ($p < 0.05$) y los días 5 y 11 no hubo diferencia significativa entre los grupos. Este resultado evidencia que la vacuna usada indujo protección y adecuada en las aves vacunadas, tal y como ha sido reportado (30).

La acumulación de HVT en la pulpa de las plumas es una característica interesante que permite medir la absorción de la vacuna en pollos de forma mínimamente invasiva. La carga de ADN de HVT fue detectada desde los 9 días con 42.8 % positivos incrementado el porcentaje de

positividad transcurrido los días post vacunación. Biarneres (2013), tuvo resultados positivos en cuanto a detección en pulpa de pluma en PCR en tiempo a partir de las 2 semanas de edad. Puedo ser por que no muestrearon aves de menor edad. En cuanto al aislamiento viral se tuvo como 85% de positivos a los 9 días esto podría deberse que la vacuna ya estaría diseminada a nivel sistémico para su protección posterior

Se conoce que el órgano diana de una vacuna recombinante como la usada en este estudio no es la Bursa ni los linfocitos B inmaduros, pues el virus vector es un herpes virus al que se le insertó el gen que codifica la VP2 del virus de Gumboro. La patogenia y patrón de replicación viral es de los herpes virus y, en consecuencia, no se produce daño tisular atribuible a la vacunación como si se observa con las vacunas vivas que contienen el virus completo y ocasionan daño bursal de moderado a severo. Por ello, las aves del grupo vacunado no presentaron lesiones significativas, ni atrofia bursal post desafío. Este comportamiento concuerda con hallazgos previos (30).

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados, discusión y condiciones del trabajo se concluye:

1. La vacuna recombinante HVT-IBDV tuvo una protección al 100% al desafío contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF en comparación al grupo no vacunado que tuvo un 20% de mortalidad
2. La vacuna recombinante **HVT-IBDV** contra la enfermedad de Gumboro en pollos **SPF** afectó significativamente el peso de la Bursa los días 8 y 11 días post desafío.
3. La vacuna recombinante **HVT-IBDV** contra la enfermedad de Gumboro en pollos **SPF**, afectó significativamente el tamaño de la Bursa a los días 5, 8 y 11 días post desafío.
4. La vacuna recombinante **HVT-IBDV** contra la enfermedad de Gumboro en pollos **SPF** afectó significativamente el índice Bursal a los 5, 8 y 11 días post desafío.
5. La vacuna recombinante **HVT-IBDV** contra la enfermedad de Gumboro en pollos **SPF** afectó significativamente en relación bazo/ bursal solo en el día 8 post desafío.
6. La evaluación del aislamiento celular se puede utilizar como una prueba de análisis ya que se obtuvo resultados favorables.
7. Se obtuvo resultados positivos en cuanto a la detección viral en PCR convencional comparado con el grupo no vacunado.

VII. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados y discusión de la investigación se recomienda lo siguiente.

1. El uso de la vacuna Recombinante HVT-IBDV para protección de la enfermedad de Gumboro.
2. Realizar pruebas de detección viral en plumas específicas para cada explotación para poder monitorear la vacuna o desafío en los lotes y poder establecer un programa de vacunación adecuado para cada condición en particular.
3. Realizar otras investigaciones para evaluar la inmunidad humoral si se relaciona con el aislamiento viral.
4. Realizar otras investigaciones para evaluar la inmunidad humoral si se relaciona con la detección viral.
5. Realizar otra investigación para medir y evaluar la respuesta inmunidad celular.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrtomeat. Distintos tipos de vacunas. Revista Veterinaria Argentina ». 2014.
2. Albano, F. F., Pérez, D. R., & Hernández, L. M. caracterización genética y estudios comparativos del gen vp1 del virus de la enfermedad infecciosa de la Bursa. 2012. 47(5) :58(7).
3. Amarilla, F. Clasificación de las vacunas. 2016. 6.
4. Avalos, N. J. L. Evaluación de la protección de una vacuna vectorizada contra la Enfermedad de Gumboro bajo condiciones controladas en pollitas de postura comercial. 2017.
5. Banda, A., Villegas, P., & El-Attrache, J. Molecular Characterization of Infectious Bursal Disease Virus from Commercial Poultry in the United States and Latin America. Avian Diseases. 2003.47 (1), 87.-95.
6. Birmingham, M., & Quesenberry, P. J. 2011.
7. Carballeda, J. M., Zoth, S. C., Gómez, E., Gravisaco, M. J., & Berinstein, A. Activation of the immune response against Infectious Bursal Disease Virus after intramuscular inoculation of an intermediate strain. Immunobiology. 2011. 216(9), 1028-1033.
8. Carina, V. Caracterización molecular del virus de la enfermedad de Gumboro a través de la transcripción en reversa-reacción en cadena de la polimerasa combinado con análisis de enzimas de restricción. 2010. 14.
9. Carlos Alberto Friguetto Kneipp. II Simpósio de Sanidad Avícola Doença de Gumboro no Brasil. 2000.
10. Castellanos C, D., Icochea D, E., Guzmán G, J., Reyna S, P., & Perales C, R. Vacunación contra la enfermedad infecciosa de la bursa vía aspersion y vía agua de bebida en pollos de carne. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2012. 23(4), 484-490.
11. Elshall, N., Sedeek, M., Elbadawy, M., Hussein, E., & Awad, A. Phylogenetic Characterization of Infectious Bursal Disease (IBD) Viruses Isolated From Field Outbreaks in Chickens From

- Behera And Alexandria Governorates, Egypt. Alexandria Journal of Veterinary Sciences. 2018. 56(1), 153. <https://doi.org/10.5455/ajvs.284794>.
12. Enterradossi, N., Y. M. saif. Infectious Bursal disease. 2009.
 13. Giambone JJ. Broiler vaccination-additional protection is often needed. In: Summit on infectious bursal disease. International Poultry Symposium. Georgia, USA.1995. p 17-20.
 14. Grandía G., R., Alfonso M., A., González N., B. O. caracterización de un brote de la enfermedad de Gumboro en una granja avícola de la Habana. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2014.25(2). <https://doi.org/10.15381/rivep.v25i2.8507>
 15. Hy-Line International. enfermedad infecciosa de la Bolsa de Fabricio (Ibd, Gumboro). 2017.
 16. Initiative for Vaccine Research World Health Organization. Use of Cell Lines for the Production of Influenza Virus Vaccines: An Appraisal of Technical, manufacturing, and Regulatory Considerations Geneva, Switzerland. 2007.
 17. Jaimes-Olaya, J. A., Espejo, D. C. Á., Correa, J. J.,Alfonso, V. J. V. Aspectos determinantes en la presentación de la enfermedad infecciosa de la bursa, 12. 2009.
 18. Le Ru A, Jacob D, Transfiguracion J, Ansorge S, Henry O, Kamen AA. Scalable production of influenza virus in HEK-293 cells for efficient vaccine Manufacturing. Vaccine.2010.28.3661–3671
 19. León R., N., Icochea D., E., González V., R., & Perales C., R. nivel de protección de una vacuna intermedia contra la enfermedad de Gumboro en aves de postura. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.2012.23 (4). <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i4.965>
 20. López, dina Reyna Ester. Evaluación de la respuesta inmune contra la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio-Gumboro mediante la prueba de Seroneutralización en Cultivo Celular. 2003.81.
 21. Lukert, P. D. (2001). enfermedad infecciosa de la Bolsa de Fabricio.2001. 27.
 22. Mahgoub, H. A. An overview of infectious bursal disease. Archives of Virology.2012. 157(11), 2047-2057. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1377-9>

23. M. Biarnés, A. Blanco, Q. Camprubí y R. Jove.(2013). Monitorización de la vacunación frente a la enfermedad de Marek mediante PCR en tiempo real a partir de pulpa de la pluma.
24. Montiel. Interacciones entre agentes inmunosupresores: Anemia Infecciosa Aviar, Gumboro y Marek. En: II Seminario Internacional AMEVEA PERÚ. Lima: Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Aves.2004.
25. OIE. Manual de la OIE sobre animales terrestres Bursitis infecciosa.2008.
26. OIE. 1.01.08_Principios_producción_vacunas_veterin.pdf. 2015.
27. Paniagua, M., Cazaban, C., alva, B., Lozano, F., & Attrache, J. el. Enfermedad de Gumboro especial. 2014.
28. Patton, J. T. Segmented Double-stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology. Horizon Scientific Press. 2008.
29. Pedro Villegas. Control de la enfermedad infecciosa de la bolsa (Gumboro) Universidad de Georgia Facultad de Medicina Veterinaria Centro de Diagnóstico e Investigación Aviar Athens, Georgia. 2018.
30. Perozo, F., Villegas, P., Fernandez, R., Cruz, J., & Pritchard, N. Efficacy of Single Dose Recombinant Herpesvirus of Turkey Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) Vaccination Against a Variant IBDV Strain. Avian Diseases.2009. 53(4), 624-628. <https://doi.org/10.1637/8687-31009RESNOTE.1>
31. Prandini, F., Simon, B., Jung, A., Pöppel, M., Lemiere, S., & Rautenschlein, S. Comparison of infectious bursal disease live vaccines and a HVT-IBD vector vaccine and their effects on the immune system of commercial. 2016.
32. Preciado, M. M. G. Vacunas veterinarias. 2016.54.
33. Rautenschlein, S., Kraemer, C., Vanmarcke, J. Protective Efficacy of Intermediate and Intermediate Plus Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) Vaccines against Very Virulent IBDV in Commercial Broilers. Avian Diseases.2005.49 (2), 231-237.

34. Rosales G. Control actual de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa. En: Memorias XI Seminario Internacional de Patología Aviar. Georgia, USA.2000. p 468-481.
35. T.P. van den Berg. N. Etteradossi, Toquin, D., & G. Meulemans. Infectious bursal disease (Gumboro disease).2000.
36. van den Wijngaard JK, Avakian A, Craig W, Eid H. La vacunación in ovo contra la EIB sobrepasa el enfoque convencional. World Poultry.2001.14: 13-15.
37. Vidal, K. Evaluación de dos vacunas comerciales contra la infección. 2006.

IX. ANEXOS

Cuadro 01. Análisis estadístico del día 5 post desafío de peso Bursa, tamaño Bursa, índice Bursal, relación Bazo/Bursa.

		Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
PESO BURSA 5	Entre grupos	,506	1	,506	2,591	,146
	Dentro de grupos	1,563	8	,195		
	Total	2,069	9			
TAMANO BURSA 5	Entre grupos	1,600	1	1,600	16,000	,004
	Dentro de grupos	,800	8	,100		
	Total	2,400	9			
INDICE BURSAL 5	Entre grupos	7,225	1	7,225	8,705	,018
	Dentro de grupos	6,640	8	,830		
	Total	13,865	9			
BURSA/BAZO 5	Entre grupos	,625	1	,625	1,390	,272
	Dentro de grupos	3,596	8	,450		
	Total	4,221	9			

Cuadro 02. Análisis estadístico del día 8 post desafío de peso Bursa, tamaño Bursa, índice Bursal, relación Bazo/Bursa.

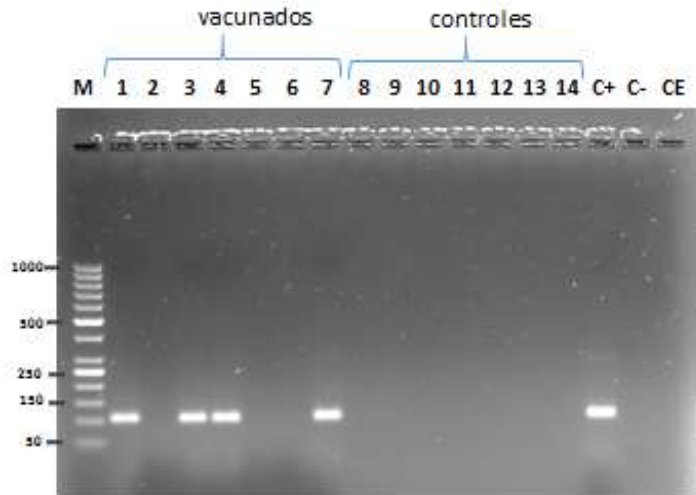
		Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
PESO BURSA 8	Entre grupos	2,323	1	2,323	24,810	,001
	Dentro de grupos	,749	8	,094		
	Total	3,072	9			
TAMAÑO BURSA 8	Entre grupos	8,100	1	8,100	23,143	,001
	Dentro de grupos	2,800	8	,350		
	Total	10,900	9			
INDICE BURSAL8	Entre grupos	9,025	1	9,025	22,147	,002
	Dentro de grupos	3,260	8	,408		
	Total	12,285	9			
BURSA/BAZO 8	Entre grupos	3,249	1	3,249	26,522	,001
	Dentro de grupos	,980	8	,122		
	Total	4,229	9			

Cuadro 03. Análisis estadístico del día 11 post desafío de peso Bursa, tamaño Bursa, índice Bursal, relación Bazo/Bursa.

		Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
PESO BURSA 11	Entre grupos	4,720	1	4,720	6,762	,032
	Dentro de grupos	5,584	8	,698		
	Total	10,304	9			
TAMAÑO BURSA 11	Entre grupos	8,100	1	8,100	10,800	,011
	Dentro de grupos	6,000	8	,750		
	Total	14,100	9			
INDICE BURSAL 11	Entre grupos	15,625	1	15,625	7,605	,025
	Dentro de grupos	16,436	8	2,055		
	Total	32,061	9			
BURSA/BAZO11	Entre grupos	3,481	1	3,481	4,762	,061
	Dentro de grupos	5,848	8	,731		
	Total	9,329	9			

**Imágenes de la detección viral en pluma mediante PCR
Convencional.**

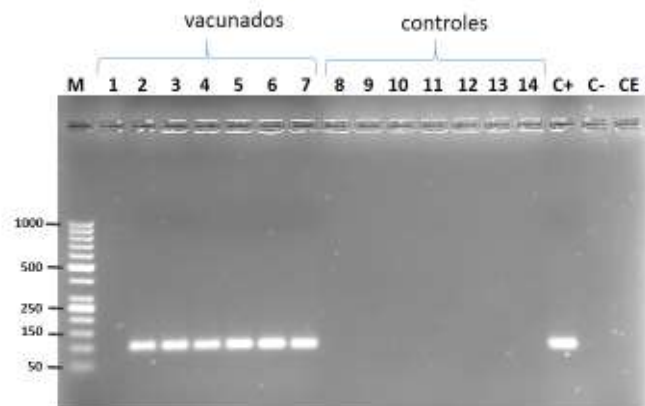
PRUEBA 1: HVT-IBD 9 días post vacunación



Leyenda

M: Marcador de peso molecular : GeneRuler 50 bp DNA Ladder
 1-7: Aves vacunadas
 8-14: Aves controles
 C+: Control positivo PCR
 C-: Control negativo PCR
 CE: Control de extracción

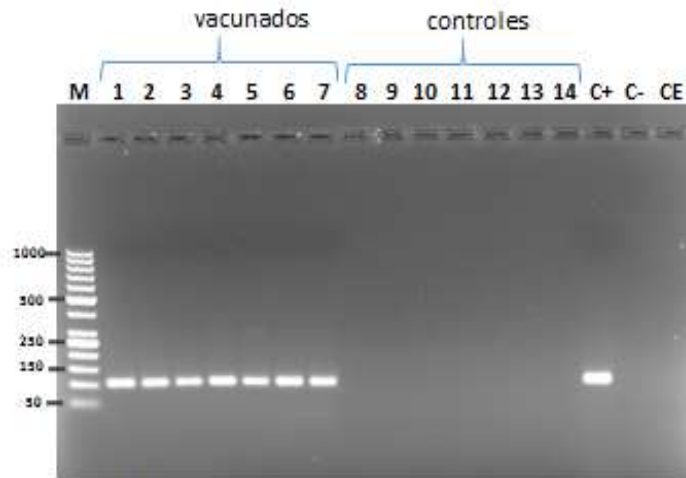
PRUEBA 2: HVT-IBD 15 días post vacunación



Leyenda

M: Marcador de peso molecular : GeneRuler 50 bp DNA Ladder
 1-7: Aves vacunadas
 8-14: Aves controles
 C+: Control positivo PCR
 C-: Control negativo PCR
 CE: Control de extracción

PRUEBA 3: HVT-IBD 21 días post vacunación



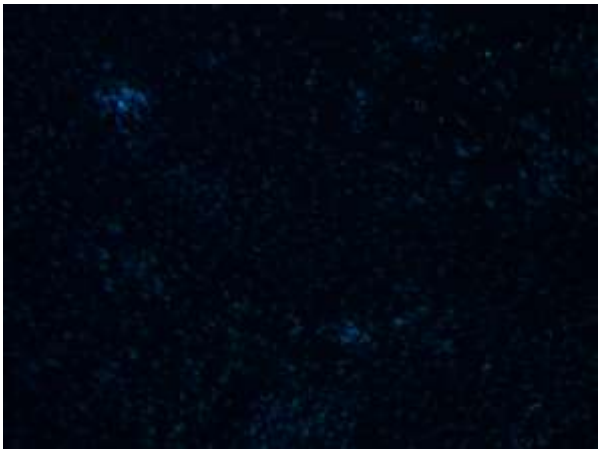
Leyenda

M: Marcador de peso molecular : GeneRuler 50 bp DNA Ladder
1-7: Aves vacunadas
8-14: Aves controles

C+: Control positivo PCR
C-: Control negativo PCR
CE: Control de extracción

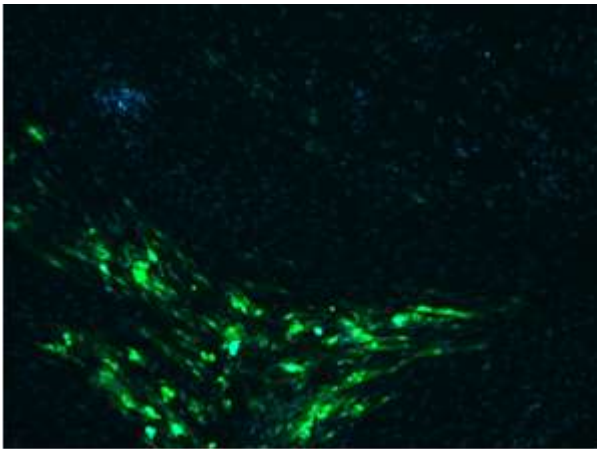
Análisis de la proteína VP2 expresada in vitro por CEF infectados con Rhvt-ibd aislado de la sangre periférica de aves vacunadas (CEF=fibroblasto embrión de pollo).

Campo claro

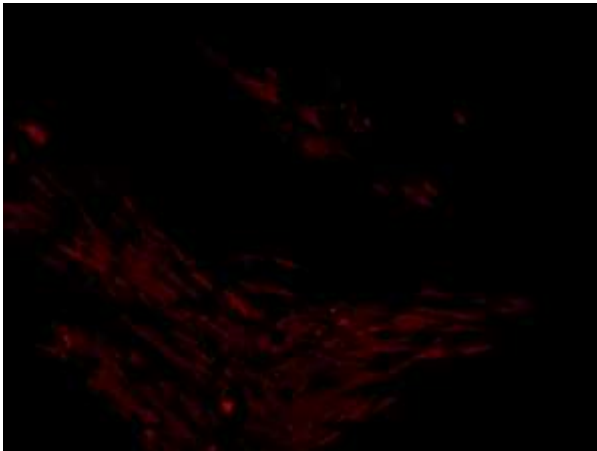


campo oscuro

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) positiva frente a la proteína VP2 del virus de gumboro sobre la línea celular CEF.



Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) positiva frente al virus de HVT sobre la línea celular CEF

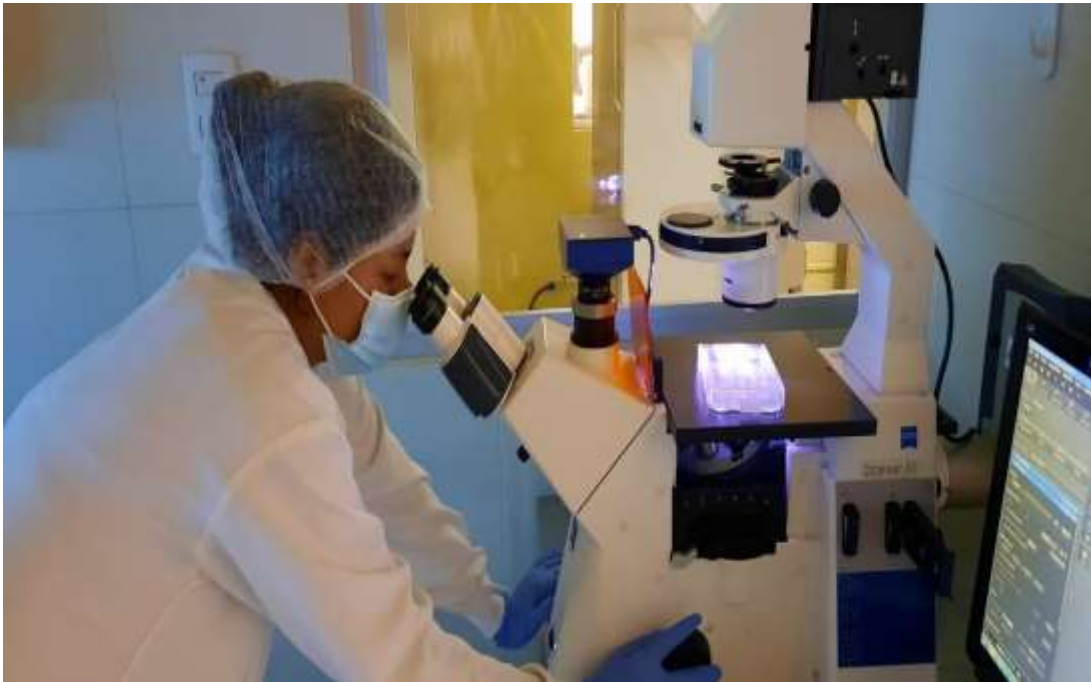


Actividades realizadas durante el experimento.

Fotos de actividades realizadas la parte de aislamiento viral en cultivo celular.



Fotos de lo realizado el PCR convencional.

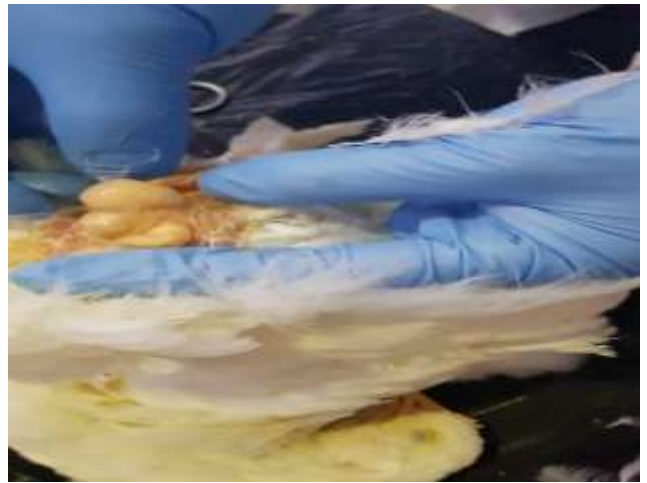
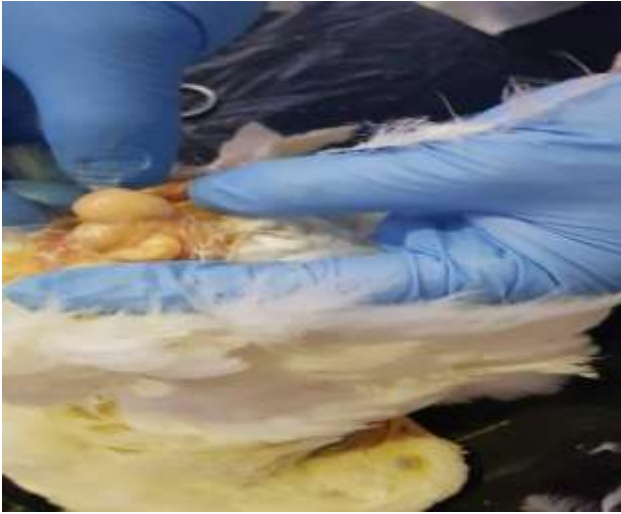




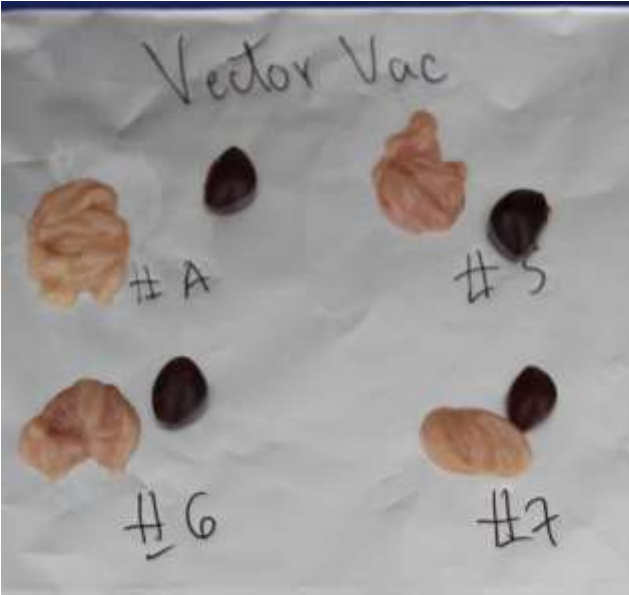
Toma de muestra de sangre de la vena yugular y necropsia de aves.



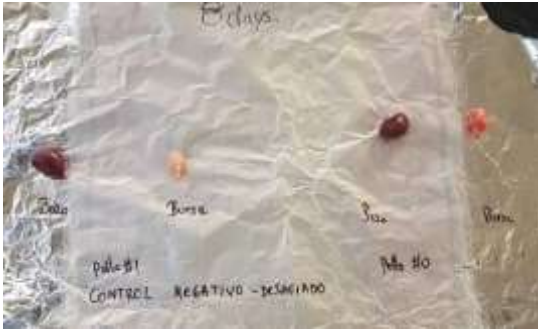
. Lesiones bursales macroscópicas



Bursa y bazo a la necropsia 5 días post desafío del grupo T1 control desafiado y T2 vacuna vectorvac HVT-IBD



Bursa y bazo a la necropsia 8 días post desafío del grupo T1 control desafiado y T2 vacuna vectorvac HVT-IBD



Bursa y bazo a la necropsia 11 días post desafío del grupo T1 control desafiado y T2 vacuna vectorvac HVT-IBD

