



Universidad Nacional  
**SAN LUIS GONZAGA**



### **Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional**

Esta licencia es la más restrictiva de las seis licencias principales Creative Commons, permitiendo a otras solo descargar sus obras y compartirlas con otras siempre y cuando den crédito, pero no pueden cambiarlas de forma alguna ni usarlas de forma comercial.

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



UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"



**ESCUELA DE POSGRADO**

## EVALUACION DE ORIGINALIDAD

# CONSTANCIA

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud al **BORRADOR DE TESIS** cuyo título es:

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA GENERADA POR VACUNAS DERIVADAS DE CULTIVO CELULAR CONTRA LA ENFERMEDAD DE GUMBORO EN POLLOS LIBRES DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS (SPF).**

Presentado por:

**MANUEL SANTOS CRIOLLO OROZCO.**

De la **MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS** mención **SANIDAD, PRODUCCIÓN Y MEDIO AMBIENTE**

Que, se ha recibido del operador del programa informático evaluador de originalidad de la Escuela de Posgrado de la UNICA, el informe automatizado de originalidad, el mismo que concluye de la siguiente manera:

**El documento de investigación APRUEBA los criterios de originalidad con un porcentaje de similitud de 0%.**

Para dar fe, se adjunta al presente el reporte de similitud de las bases de datos de iThenticate. En Ica 17 de marzo de 2022.

**Atentamente**

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"  
ESCUELA DE POSGRADO  
  
Dr. ROBERTO H. CASTAÑEDA TERRONES  
DIRECTOR GENERAL DE LA ESCUELA DE POSGRADO



**“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA GENERADA POR  
VACUNAS DERIVADAS DE CULTIVO CELULAR CONTRA LA  
ENFERMEDAD DE GUMBORO EN POLLOS LIBRES DE PATOGENOS  
ESPECIFICOS (SPF)”**

**TESIS PRESENTADO POR:**

**MV.MANUEL SANTOS CRIOLLO OROZCO**

Para optar el grado académico de MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS  
CON MENCON EN SANIDAD, PRODUCCION ANIMAL Y MEDIO AMBIENTE

ICA – PERU

**2022**

## **DEDICATORIA**

### **A Dios**

Por haberme iluminado por el camino correcto a lo largo de mi vida, llenándome de bendiciones y escuchando mis oraciones cada día.

### **A mis padres.**

Mariela Orozco Pillihuaman, Raul benedezu Loyola, Genoveva pillihuaman Arone, Angel Orozco carrasco, por enseñarme todo lo que sé de la vida y todo lo que soy, un hombre de bien, por tus desvelos y esfuerzos que no han sido en vano, por estar ahí conmigo siempre y en todo momento aun cuando el sueño te pesara. Juntos logramos con éxito esta etapa de mi vida, superando cualquier cosa en nuestro camino. Te Amo con todo mi corazón. Que Dios te bendiga.

### **A mi Familia**

Con mucho cariño a todos mis tíos, a todos mis primos y a todas aquellas personas que siempre han estado conmigo cuando más las necesito, a ustedes que son mi familia y sé que siempre contare con su apoyo, muchas Gracias. Que Dios los Bendiga.

## **AGRADECIMIENTO**

A nuestra universidad que como institución nos da su nombre y nos permite representarla y muy especial a los docentes que se comprometen a enseñarnos y ayudarnos brindándonos sus conocimientos, tiempo, apoyo y comprensión para poder afrontar las dificultades que surgen en nuestra formación profesional.

A Manolo Fernández Díaz M.V. MSc. por su asesoramiento y permitir el desarrollo de la presente tesis.

A Karla Álvarez Fernández PhD. por sus sugerencias y asesoramiento a lo largo de la presente tesis

A la empresa Farmacológicos Veterinarios S.A.C. Por ayudarme a concluir con la presente tesis.

Al Laboratorio de inmunología, Farmacológicos Veterinarios S.A.C. por facilitarme el uso de sus instalaciones para la realización de la presente tesis.

A mis hermanos por estar siempre dándome felicidad en la vida y diversas emociones que me han causado durante todo este periodo.

De manera especial a Reyna Iacho Villa por su paciencia y compañía a lo largo de este reto.

## ÍNDICE

CARÁTULA.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
ÍNDICE .....	iv
RESUMEN .....	vi
CONTRACARÁTULA .....	viii
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I: MARCO TEORICO.....	2
1.1. Antecedentes .....	2
1.2. Bases teóricas.....	5
1.3. Marco Conceptual .....	20
CAPÍTULO II: PROBLEMA DE INVESTIGACION.....	22
2.1. Situación Problemática.....	22
2.2. Formulación del problema.....	23
2.3. Justificación e importancia de la investigación .....	23
2.4. Objetivos de la investigación.....	25
2.5 Hipótesis de la investigación .....	26
2.6. Variables de la investigación.....	27
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	28
3.1. Tipo, Nivel Y Diseño De Investigación .....	28
3.2. Población – Muestra .....	28
CAPÍTULO IV: TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN .....	28
4.1. Técnicas de recolección de Datos .....	28
4.2. Instrumento de Recolección de Datos .....	29

4.3. Técnicas de Procesamiento, Análisis e Interpretación de Resultados ...	29
CAPÍTULO V: CONSTRATACIÓN DE HIPÓTESIS .....	33
CAPÍTULO VI: PRESENTACIÓN, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	33
6.1. Presentación e Interpretación de resultados.....	33
6.2 Discusión de resultados.....	36
CONCLUSIONES.....	39
RECOMENDACIONES.....	40
FUENTES DE INFORMACIÓN .....	41
ANEXOS .....	49

## RESUMEN

La presencia del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV) en las industrias avícolas peruanas ha sido asociada a un incremento del 20 – 40 % en la mortalidad de las aves infectadas. Además, la creencia actual es que la respuesta inmunitaria humoral desempeña el papel principal en la defensa contra el virus de la bursitis infecciosa (IBDV). La presente investigación fue ejecutada para poder determinar el tipo de respuesta inmunológica producida por vacunas derivados de cultivo celular y nos permitirá descifrar su eficacia protectora contra la enfermedad del virus de Gumboro. El resultado fue analizado a través de los ensayos de ELISA Y SERONEUTRALIZACION para medir la respuesta humoral y el ensayo de ELISPOT para medir la respuesta celular, estos ensayos fueron realizados para los 3 grupos del experimento. Los resultados por la prueba ELISA y SERONUTRALIZACION nos indican que en la vacuna inactivada procedente de cultivo celular presentan una diferencia significativa entre el grupo  $P < 0.05$ , también el grupo vacunado con vacuna viva es mayor que el grupo control y para los resultados de ELISPOT también hubo diferencia significativa para vacuna inactivada ( $p < 0.05$ ) y no hubo una diferencia significativa para vacuna viva y control. Concluimos que la vacuna inactivada fue evidentemente eficaz que la vacuna viva, al poder estimular una respuesta inmunológica de base celular y humoral dando los títulos de anticuerpos más altos y células formadoras de puntos tras la vacunación.

**Palabra clave:** vacuna, cultivo celular, respuesta inmunológica, avicultura.

## ABSTRACT

The presence of infectious bursal disease virus (IBDV) Peruvian poultry industries has been associated with a 20-40% increase in mortality of infected birds. In addition, the current belief is that the humoral immune response plays the main role in the defense against IBDV. The present research was developed in order to determine the type of immune response produced by cell culture derived vaccines and will allow us to decipher their protective efficacy against IBDV. The result was analyzed through ELISA tests and SERONEUTRALIZATION assays to measure the humoral response and the ELISPOT assay to measure the cellular response, these assays were performed for the 3 groups of the experiment. Where the results for the ELISA and SERONUTRALIZATION indicate that in the inactivated vaccine from cell culture they present a significant difference between the group  $P < 0.05$ , also the group vaccinated with live vaccine is higher than the control group and for the ELISPOT results there was also significant difference for inactivated vaccine ( $p < 0.05$ ) and there was no significant difference for live vaccine and control. We conclude that the inactivated vaccine was evidently more effective than the live vaccine, being able to stimulate a cellular and humoral based immune response giving the highest antibody titers and dot-forming cells after vaccination.

**Keyword:** vaccine, cell culture, immune response, poultry.

**CONTRACARÁTULA**

**MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS (CON MENCIÓN EN SANIDAD,  
PRODUCCIÓN ANIMAL Y MEDIO AMBIENTE).**

**“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA GENERADA POR  
VACUNAS DERIVADAS DE CULTIVO CELULAR CONTRA LA  
ENFERMEDAD DE GUMBORO EN POLLOS LIBRES DE PATÓGENOS  
ESPECÍFICOS (SPF)”**

**Autor: MV. MANUEL SANTOS CRIOLLO OROZCO**

**Asesor: Dr. ALEJANDRO ALATA PIMENTEL**

## **INTRODUCCIÓN**

La Enfermedad de la Bursa o Gumboro (EIB) es un permanente peligro para las industrias del ave, se debe a los efectos en los desempeños económicos de los lotes reproductores, gallinas y pollo de carne. La EIB es destacada como el motivo fundamental de inmunosupresiones, produciendo un incremento en la sensibilidad de los animales domésticos a distintos virus contagiosos como la enfermedad de Bronquitis Infecciosa, Marek Newcastle e infección bacteriana (1).

La enfermedad de IBDV se distribuye a nivel mundial, con mayor prevalencia en las grandes zonas productoras de aves; es muy contagiosa y afecta a las aves de carne hasta las seis semanas de edad produciendo un contagio de hasta 100% y una tasa de muertes que podría variar de 20 a 40%. La presentación subclínica es la de mayor importancia, se manifiesta en animales hasta las 3 semanas de edad, y aun cuando no se observan signos claros, destacan por una fuerte inmunodepresiones que se traduce en la prevalencia de otra enfermedad. Las formas clínicas se dan en las aves de 3 semanas a más, aparece súbitamente con muerte alta a los 5 a 7 días post infestación, se diferencia por diarreas, con un desánimo observable y deshidratación, puede ver rápidas recuperaciones de los que sobreviven (2).

## **CAPÍTULO I: MARCO TEORICO**

### **1.1. Antecedentes**

#### **1.1.1. Antecedentes internacionales**

Los virus se han propagado en casi todas las aves de corral que producen los países en el mundo incluyendo los Estados Unidos, América del Norte, Latinoamérica. Las pérdidas de producción son usualmente debido a las cepas del virus de IBDV son ubicuas y típicamente causa una enfermedad subclínica con el agotamiento de los linfocitos. Solo, estos virus pueden causar tasas de crecimiento más lentas, poca eficiencia de alimentación y des uniformidad en el peso, estos problemas exacerbar las pérdidas económicas (3).

En un estudio demuestran que pollos White Leghorn SPF inoculados con el virus infeccioso de las enfermedades de las bolsas (IBDV) por vía oral en diferentes edades desde el primer día de edad, dando el resultado que todos los pollos infectados mostraron diarrea a los 3-5 días después de la infección, pero la mortalidad fue claramente relacionada con la edad en que se inyectaron las aves. Una mortalidad del 50% ocurrió dentro de los 10 días de la infección en aves que se infectaron a las 3 semanas edad, mientras que solo el 10-20% murió en grupos infectados 1 a 11 días después del nacimiento. Han demostrado que la aparición de inmunodeficiencia por IBDV está determinada en la etapa de la ontogenia. Los datos sugieren que los precursores de las células B en la bolsa son el objetivo principal del virus, mientras que las células B maduras periferizadas probablemente no sean propensos al efecto citopático del IBDV (4).

En otro estudio detallan sobre la importancia de las células T, la creencia actual es que la respuesta inmune humoral juega el papel principal en la defensa contra una de las enfermedades infecciosas de la Bursa virulenta (IBDV). En este estudio los pollos se vieron comprometidos en células T funcionales. La timectomía y el tratamiento con ciclosporina A (TxCsA), para demostrar el papel de las células T en la inmunidad protectora contra el IBDV. 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%. Estas observaciones proporcionan evidencia de que la estimulación de las células T auxiliares es necesaria para la producción de niveles de anticuerpos protectores en Pollos vacunados con iIBDV (5)

El propósito de la investigación fue que se evaluaran las respuestas del anticuerpo en pollos de aldeas en la India después de vacunarlos con una vacuna viva contra la IBD. El suero se recogió a intervalos regulares. Se midieron los anticuerpos contra el virus de la IBD, usando el método ELISA. Se observó que las vacunas con grado intermedio y La cepa invasiva intermedia causó una buena respuesta inmune en las aves. El nivel de anticuerpos en suero se encontró significativamente alta en 28 días, que disminuyó gradualmente hasta 112 días. También se observó que la cepa invasora intermedia producía una mayor cantidad de anticuerpos de la cepa intermedia de la vacuna (6).

Se realizó un estudio experimental utilizando dos vacunas intermedias más P y Q. El nivel de anticuerpos maternos (MAbs) varió de 6834.6 a 9925.60 en pollitos de un día. En aves experimentales la edad de vacunación se calculó sobre la base de los títulos de MAb y llegó a tener 17 días de edad. El título de anticuerpos de los polluelos a la edad de 1, 7 y 14 días fue 7874.21, 2449.4 y 1089.9. El título de MAb mostró una disminución constante en el título desde la edad del día hasta el día 14 de edad. La vacuna P mostró un incremento estático en el título de anticuerpo ELISA de 7 DPV; sin embargo, la vacuna que mostró un nivel bastante más alto de títulos de anticuerpos en 7 DPV en sí mismos, que siguen siendo protectores hasta el final del experimento en ambos. Las células CD4 + aumentaron a 7 DPV, disminuyeron a 14 y 21 DPV, nuevamente aumentado a 28 DPV. Las células CD8 + aumentaron a 7 DPV, disminuyeron a 14 DPV, de nuevo Incrementado a los 21 y 28 DPV. Esta disminución en las células CD4 + y CD8 + a 14 y 21 DPV es probablemente

debido al efecto inmunosupresor de las vacunas contra la IBD. Ambas vacunas proporcionaron P y Q inmunidad protectora de 7 DPV hasta el final del experimento, pero con inmunosupresión (7).

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 facultad de las aves vacunadas para desarrollar un resultado libre humoral contra diferentes antígenos, así como su capacidad para inducir protecciones en contra de los desafíos de vvIBDV (8).

### **1.1.2. Antecedentes nacionales**

Se realizó una investigación con vacunas contra el padecimiento de Gumboro en el ave de posturas comerciales. Se usaron 300 aves Isa Brown de solo un día, distribuido en 3 tratamientos, cada uno de 100 aves. Del grupo A y B han sido vacunados dos veces, a los 9 y 24 días, con cepas intermedias, y el grupo C no se vacunó. El grupo B y C los desafiaron a los 32 días, usando las cepas F 52/70 por vías oculares. Las patogenicidades de las cepas vacunales fueron evaluados al día 1, 3 y 45 a través de índices bursales, el vínculo bursal/bazos y la lesión al microscopio de la bursal, brazos y timo; asimismo, se midió el título de anticuerpo por las pruebas de ELISA indirectas. El grupo C solo tuvo muerte y algunos síntomas clínicos de Gumboro en el transcurso del análisis. El valor del índice bursal en las tres categorías se observó atrofas bursales; además, la lesión histopatológica en tres categorías se evidenció un resultado severo. A los 45 días, la categoría C presentaron mayores seroconversiones (3997), y las categorías vacunadas A y B tuvieron un título similar de anticuerpo. Se ha llegado a la conclusión que la utilización de las vacunas intermedias a los 9 y 24 días genera daños bursales con atrofas, induciendo una adecuada protección contra el Gumboro (9).

Se comparó 2 medios de aplicar la vacuna contra la enfermedad de Bursal en el pollo de carne, utilizando una vacuna con cepas intermedias-

intermedias en programas a los 7 y 17 días de vida. Se usaron 69 100 pollos de las líneas Cobb Vantres 500 de granjas comerciales, clasificados en 2 categorías iguales. La categoría A por vías de aspersión y la categoría B en las aguas de bebidas. En 29 días 50 aves de cada categoría que se llevaron a corrales experimentales para sus desafíos con las cepas estándares F52/70. Se evaluaron síntomas clínicos, lesión macroscópica y microscópica, índices bursales, y respuestas serológicas, tanto en aves desafiada y no desafiada. Síntomas leves y de poca duración de depresiones y diarreas que se observaron por un lapso de 3 días en ave desafiada de ambas categorías experimentales, demostrando protección conferidas por las vacunas. (10)

### **1.1.3. Antecedentes locales.**

No se localizaron trabajos relacionados con la enfermedad.

## **1.2. Bases teóricas**

### **1.2.1. Enfermedad infecciosa de la bursa**

#### **1.2.1.1. Historia**

Esta enfermedad se descubrió en USA en una comunidad de Gumboro y se reportó de manera oficial en pollo de engorde por Cosgrove (1962). Su primer brote fue en la zona de Gumboro, debido a que se denominó "Enfermedad de Gumboro". Cosgrove la llamó nefrosis aviar por la lesión renal que genera, siendo confundido en sus inicios con procedimientos generados por el virus de Bronquitis (11,12)

En el Perú aparece a partir de 1969 cuando se reportan los primeros casos (13).

- **Etiología**

La enfermedad es generada por el IBDV, los cuales pertenecen al parentesco Birnaviridae y al género Avibirnavirus, y tiene 2 serotipo 1 y 2. El primero es el único que produce enfermedades en las aves, y el segundo fue separado de las gallinas que no tienen enfermedades (2,14,15,16).

El término Birnavirus se propuso para la descripción del virus con dos parámetros de ARN de dos cadenas. Otro virus incluido en esta categoría es el virus de las necrosis pancreáticas infecciosas del pez, el virus X Drosophila de las moscas de las frutas y el virus Tellina del molusco bivalvo. Todos tienen 2 segmentos ARN de cadenas dobles rodeados por una proteína de las cápsides de simetrías icosaédricas (17,18).

- **Estructura viral**

El IBDV cuenta con cápsides simples sin envolturas lipídicas y tienen simetrías icosaédricas, con diámetros que varían entre 55 y 65 nm, con densidades boyantes en gradiente de cloruros de cesios entre 1,31 y 1,34 g/ml (19).

- **Proteínas virales**

Las estructuras de los genomas virales consisten en 2 segmentos. Un largo denominado segmentos A que codifican la proteína viral VP2 (41 kD), VP3 (32 kD), VP4 (28 kD) y VP5 (21 kD). Los segmentos B codifican las proteínas virales VP1 (90 kD) (Gomes, 2005). Se evidenció una proteína adicional como las proteínas VPX y se considera que tienen relaciones precursores - productos (2,14).

La proteína VP2 y VP3 es la proteína principal y estructural de las cápsides del IBDV. En el virus de los serotipos 1 constituye el 51% y 41% de la proteína viral, mientras la VP1 y la VP4 es una proteína menos correspondiente al 3% y 6% de la proteína viral (2,20).

Las proteínas VP1 son polimerasas RNA dependientes, presentes en números pequeños en viriones como polipéptidos libres, así como unidos a las proteínas de los genomas. Juegan papeles claves en los encapsulamientos de la partícula viral. Las proteínas VP2 son reconocidas como los antígenos protectivos de los hospederos debido que contienen la región antigénica responsable de las producciones de anticuerpo neutralizante y de la especialidad de los serotipos. Se ha evidenciado que estas proteínas difieren entre 3 a 4 aminoácidos entre la cepa clásica y la muy virulenta (vvIBDV) (21).

Las proteínas VP3 son antígenos de categorías no específicas que son reconocidos por anticuerpos no neutralizados, algunos del cual genera reacciones cruzadas entre el serotipo 1 y 2. Las VP3 actúan como intermediarios que interactúan con las VP2 y las VP1, las formaciones complejas VP1 – VP3 parecen ser importantes pasos en las morfogénesis de la partícula del IBDV. Las proteínas VP4 son proteasas virales envueltas en los procesos de poliproteínas. Procesan la proteína VP2, VP3 y a ellas mismas, VP4. Las proteínas VP5 tienen funciones desconocidas, aparentes tienen funciones reguladoras y juegan roles claves en las diseminaciones virales. (14).

- **Replicación viral**

En general, no es muy conocido el evento bioquímico vinculado con las replications virales del birnavirus. Los mecanismos de las síntesis de ARN no han sido determinados claramente pese que se demostró que los virus replican sus ácidos nucleicos a través de mecanismos de desplazamientos de filamentos. Las transcripciones y replications se generan después de la introducción celular con desnudamientos totales de los virus. (22)

- **Resistencia del virus**

El agente infeccioso tiene grandes estabilidades en el ambiente, también las capacidades de resistir a sustancias como éter, cloroformos, fenol, amonios cuaternarios, etc. Y variaciones de pH

de grandes entre 2 y 12. Esto hace difícil la erradicación de los agentes en galpones enfermos, donde el desinfectante a base de yodo tiene efectos bastantes importantes acerca del virus, pero, en determinadas granjas se usan mezclas de un desinfectante que puede malograr los agentes, con diversos efectos para los tractos respiratorios de las aves (23).

- **Clasificación de cepas**

El método clasificatorio más frecuente es el serológico y genético. El método serológico depende de las reacciones del anticuerpo frente a los agentes infecciosos. A través de las pruebas de virus neutralizados se identifica 2 serotipos de virus designados como 1 y 2 con la prueba de anticuerpo fluorescente y ELISA, no pudiendo diferenciarse, solo el virus del serotipo generando enfermedades en pollos y ninguno son patógenos en pavos. Las inmunizaciones contra los serotipos 2 no protegen a los de clase 1 (24).

El virus de los serotipos 1 se dividen en virus clásico y variante. La cepa de virus clásico constituye a la de patogenicidades intermedias y la de virus muy virulento. El virus de cepa variante además pertenece a los serotipos 1 y esto distingue los antígenos del virus clásico. (25)

- **Epidemiología**

Lo más probable es que el virus se haya extendido en larga dimensión en sus primeras descripciones por Cosgrove, pero, Gumboro es donde las condiciones correspondientes se reconocieron de forma inicial como algo nuevo, cuando los cambios son indetectables a clínicas. Posiblemente desde las raíces que tuvieron lugar a los cambios en las patogenicidades de los virus. (14)

De estas pequeñas ciudades y en poco tiempo el virus de Gumboro o su nuevo patotipo de virus más antiguo se extiende alrededor de todos los países que producen aves y según su alto nivel de

resistencia están presentes con su variación en toda la granja existente siendo reconocido como preocupaciones mundiales de las industrias avícolas. (26).

La enfermedad de Gumboro apareció de forma clínica en los últimos 50 años y el hecho que se desarrolle y use vacunas pensando en el control como resultados excelentes fuentes de datos. (26).

La presentación clínica al momento de su descripción en los EEUU (empezando de los años 60 y 70). Sus condiciones clínicas desaparecieron en ese instante y se hicieron subclínicas en la mayor parte de los casos (específicamente entre 1970 y 1985). (27).

Forma más virulenta se reporta después, y al mismo tiempo de forma elevadamente inmunosupresora en EE. UU (iniciando aprox. En1985) si como muy virulentas maneras en África y Europa occidental (entre 1985 y 1990). (28).

- **Transmisión**

El padecimiento de las bolsas es muy infeccioso. Las aves perjudicadas eliminan el virus hasta en 14 días post infección. (29). Las transmisiones pueden ser directas o indirectas a través de fómites. No hay evidencias de que el virus se pueda transmitir por vías transováricas (30). El virus de los campos específicamente se extiende rápidamente en 10 la parvada susceptible, debido que no es poco común que ocurran desafíos en el 80 a 90% de unas parvadas en semanas. (31).

Se puede separar el virus del *Alphitobius diaperinus*, de gusanos de las harinas, mosquito, rata e incluso de heces de perro, sin embargo, no se determinan roles de este organismo de las transmisiones (30,32). No existen pruebas que el IBDV se transmitan mediante el huevo o que haya estados portadores verdaderos en el ave que están restablecidas. (23).

- **Patogénesis**

Los hallazgos de las infecciones por IBDV son dependientes de las patogenicidades de las cepas, el número del virus infeccioso, las edades, las líneas genéticas, las vías de inoculaciones y las presencias o ausencias de anticuerpos neutralizantes. Las gravedades de las enfermedades están vinculadas de forma directa con la cantidad de células sensibles que se presentan en las bolsas de Fabricio; en tanto, las más altas susceptibilidades de edades son entre 3 y 6 semanas, cuando las bolsas de Fabricio están en sus máximos desarrollos. (14).

Las infecciones se llevan a cabo por vía oral, sean directas o indirectas por el excremento en fómite contaminado. (28).

En un estudio secuencial de tejido originario de pollos infectados por vía oral, usando inmunofluorescencias, se ha detectado antígenos virales en macrófago y célula linfóide de los ciegos a las cuatro horas luego de las inoculaciones; luego de una hora se ha detectado virus en célula linfóide en los duodenos y yeyunos. El virus ha llegado primeramente al hígado, donde se ha detectado 5 horas luego de las inoculaciones, después el virus se extiende por los torrentes sanguíneos, en el que se distribuyen hacia otro tejido, incluso a las bolsas de Fabricio. (23).

Los períodos de incubaciones son muy cortos, de 2 a 3 días, síntomas histológicos de infecciones se detecta en las bursas a las 24 horas. Las excreciones de los virus persisten dos semanas luego de las infecciones. Aunque otros tejidos también se ven perjudicados, los órganos diana principalmente son las bursas. El virus perjudica las células B en etapas inmaduras y genera efectos citolíticos acerca de estas células en clasificación activa. (28)

- **Presentación de la enfermedad**

Los cuadros clínicos de estas son variables; pero, se observan 3 maneras de presentar esta enfermedad: (33).

- **Forma subclínica**

Consideradas subclínicas o sin síntomas, son las de mayor distribución a nivel mundial. Son caracterizadas inmunosupresión muy severa en los que las clínicas corresponden casi a la complicación o coinfección con otro agente infecciosos que expresa su patogenicidad de manera más aguda el encontrarse sistemas inmunes defectuosos en las aves (23). Otorgadas la natural insumisión del IBDV, la manifestación del virus en las granjas conforma puertas de entradas para otro agente, el cual generan un cuadro clínico severo y eleva la mortalidad. (27).

- **Forma clínica**

La llamada forma clásica de las enfermedades, su característica se da por cuadros inmunosupresores y sistemáticos leves a moderados, por lo que el efecto más relevante es la disminución de las respuestas inmunes. Finalmente, se han especificado unas terceras formas de presentaciones severas, por los 80 caracterizada por alta mortalidad en aves jóvenes, la presentación clínica deterioró rápidamente a los animales. Los principales signos característicos de esta están en la diarrea y orina con urato, que ocasionan deterioros y muertes rápidas de los animales (14, 27). Esta clase de cuadro clínico han sido descritos en distintas regiones a nivel mundial, donde estas maneras de presentación empiezan a tener una gran relevancia en los sectores avícolas (9).

- **Lesiones macroscópicas**

Las lesiones macroscópicas son visualizadas 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 de la unión del proventrículo y la molleja. (34).

El hígado se observa inflamado y con infartos periféricos (35). Los bazo pueden estar incrementando los tamaños con pequeños focos de colores grises que se distribuyen de manera uniforme en las superficies. Comparando con la cepa del IBDV de forma moderada patógeno, la muy virulenta induce perjuicios graves a la tonsila cecal, timo, bazo y médulas óseas, y mayores reducciones en los índices de peso de timo. (23).

- **Lesiones microscópicas**

Las degeneraciones y la necrosis del linfocito comienzan en la zona medular del folículo bursa tan temprano como a 1 día pi (26). Los linfocitos se sustituyen por heterófilos para el día 3 o 4 después de la infección, todos los folículos linfoides están afectados. Los edemas severos, las hiperemias y la acumulación marcada del heterófilos son evidentes, lo que causa el aumento del peso de la bolsa. Las cavidades quísticas se desarrollan en la médula folicular. (33)

Estas cavidades quísticas son causadas por necrosis y fagocitosis por heterófilos 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. (28)

- **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 Aplásica 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 fijas de la bolsa (36).

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), (37)

Varios procedimientos serológicos, ampliamente utilizados, están disponibles para detección de anticuerpos (AC) del IBDV: Soroneutralización (SN), ELISA y las pruebas de precipitaciones por agares 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 (37).

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 (36)

- **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 coccidios 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, el daño de la bursa se puede confundir con infecciones producidas por la enfermedad de Marek o anemia infecciosa. Un examen histológico de la bolsa permitirá diferenciar entre estas enfermedades (38).

### **1.2.2 Sistema inmune**

La protección de los cuerpos se deriva de complejos sistemas de un mecanismo interrelacionado de forma conjunta que puede perjudicar o proteger quizás a cualquier invasor. (39).

### **1.2.3. Sistema inmune aviar**

El sistema inmunológico de los pollos, como los mamíferos, es complejo e incluye una serie de células y factores solubles que deben funcionar para garantizar una respuesta inmunitaria protectora. Un sistema inmunológico que funcione adecuadamente es de especial importancia para las aves, ya que las parvadas comerciales de aves de corral se crían bajo condiciones intensivas de crianza. Bajo tales condiciones, las aves son vulnerables a la propagación de agentes infecciosos y brotes de enfermedades. Se debe usar una variedad de vacunas, a menudo repetidamente, para proteger las aves contra la exposición ambiental a organismos virulentos. La eficacia protectora de una vacuna depende de una respuesta inmune vigorosa contra el organismo (s) presente en la vacuna. Si los animales están

inmunodeprimidos y responden mal a una vacuna, la salud de la bandada se pone en peligro (40).

Para los agentes patógenos que ingresan al cuerpo, la primera línea de defensa es provista por mecanismos inmunes innatos como las células fago-cíticas que incluyen heterófilos y macrófagos, Complemento (41), y células asesinas naturales (NK) (42).

La inmunidad adaptativa es altamente específica para los agentes que estimularon su crecimiento mientras que la inmunidad innata o no adaptativa no es específica para este microorganismo. Las células a través de las inmunidades específicas retienen “memoria” de sus encuentros con los patógenos, aunque luego de la erradicación de estos cuerpos y la finalización. Las inmunidades adaptativas son mediadas por variedades de células, del cual la más relevante es la célula T y B y los macrófagos (40).

En las aves hay dos clases de linfocitos: la B y la T. las letras asociadas con cada clase representan sus sitios de diferenciaciones: B para las bolsas de Fabricio y T para los timos. El linfocito B se relacionan con las inmunidades mediadas por células.

#### ● **Inmunidad innata**

Los macrófagos que se encuentran dispersos extensamente en los tejidos del huésped son las primeras líneas de defensas contra un patógeno que cruzan las barreras físicas. Estas células absorben y destrozan el patógeno invasor y evitan las infecciones activas. Los macrófagos y las células dendríticas, otra célula fagocítica presente en los tejidos, responden al encuentro con el patógeno al secretar citoquinas y quimiocinas que inician un proceso inflamatorio local.

Los heterófilos y las proteínas séricas se acumulan en el sitio de la inflamación en un intento de localización y destruye el patógeno. El reconocimiento de patógenos por parte de la célula de los sistemas inmunitarios innatos, como el macrófago, el neutrófilo y la célula dendrítica, se ve impedido por la presencia de receptores tipo toll (TLR) en su superficie (43).

- **Inmunidad adaptativa: Inmunidad mediada por células (CMI)**

Las células T son las células más importantes de CMI. Muchas subpoblaciones de células T con diversas funciones han sido identificadas como centímetro. Estas subpoblaciones expresan antígenos de superficie únicos que pueden detectarse con anticuerpos monoclonales. Las moléculas de superficie CD4 y CD8 diferencian dos importantes subconjuntos funcionales de células T. El CD4 se va a expresar en las superficies del linfocito Helper T (TH), mientras que el CD8 se va a expresar en las superficies del linfocito T citotóxicos (CTL). Existe una gran variación interespecífica en las proporciones relativas de las células CD4 y CD8 circulantes (40).

- **Inmunidad humoral o mediada por anticuerpos.**

Se dirigen contra el invasor extracelular o exógeno, el cual es destruido por proteínas denominada anticuerpo (39). En éstas interviene, como piezas centrales, linfocitos B, que reconoce los antígenos mediante la inmunoglobulina presente en sus membranas. Pero, estos estímulos no son suficientes para que se inicien y desarrollen las respuestas inmunes humorales. Para ello, es indispensable que el linfocito B. reciba apoyo de citocina generada por linfocitos T colaboradores (44).

- **Inmunidad mediada por células**

Se dirigen contra el invasor intracelular o endógeno, el cual es destruido por células citotóxicas especializada (39). Las respuestas inmunes celulares cubren importantes funciones como mecanismos inmunológicos de defensa, que actúan frente al virus, así evitan la presencia y crecimiento de la célula tumoral. En ellas van a participar el linfocito T que puede ser de clase colaborativa (Tc) (44).

- **Por qué evaluar el tipo de respuesta inmune estimulado**

Por el posible mecanismo de colaboración de las células T- B en la respuesta de anticuerpos humorales, que las células T cooperen con las células en la respuesta inmune humoral.

Se presume que algunos problemas de las complejas patologías de la colectividad, que de modo directo o indirecto influye en las producciones avícolas, que se deben a aspectos parecidos. Las genéticas aviares son las que más evolucionan dentro de las genéticas animales, y pueden recomendar más adelante aspectos similares a las que se produce en el hombre, para que unas respuestas inmunes complejas entre las células T y B, estas han de ser similares en el locuss de histocompatibilidad-B (45).

#### **1.2.4. Vacuna**

Es una suspensión de microorganismo vivo, inactivados o muertos, o fracción de ellos que al momento de administrarse generan inmunidad, previniendo determinadas enfermedades contagiosas.

Es un producto biológico que estimula los sistemas inmunitarios, ocasionando respuestas y memorias inmunitarias.

##### **● Historia de la vacuna**

La vacuna inactiva y la cepa atenuada del virus de Gumboro, estuvo disponible a inicios de los 70 en EE. UU, las vacunas a virus vivo se utilizaron por primera vez, siendo compuesta con cepas que causan inmunosupresión en aves susceptibles. Luego en 1975 y 1976 se atenuó el virus que se utilizaba en la vacuna del virus vivo como las cepas PBG o las cepas Lukert de la cepa 2512 u otra con mayores capacidades de inducir protecciones con la presencia de un anticuerpo materno. (46)

La muy alta resistencia del IBDV a los agentes físicos y químicos (47) explica la persistencia del virus en el ambiente exterior, particularmente en granjas contaminadas, a pesar de la desinfección. Por lo tanto, la erradicación en los países afectados parece poco realista. La prevención de la IBDV requiere medidas de higiene y profilaxis médica. Ninguna vacuna puede resolver el problema si no se toman precauciones sanitarias importantes. Estas precauciones incluyen los métodos de cultivo 'todo en / fuera', la higiene y esterilización del local y la observancia de un 'tiempo de inactividad' (un período de descanso entre la despoblación y la repoblación)

(48). Dado lo natural muy contagiosa del padecimiento y la resistencia del virus, se deben seguir ciertos pasos esenciales en el proceso de limpieza / desinfección.

- **Tipos de vacunas usadas**

La vacuna de virus vivo atenuado y la vacuna del virus inactivado con emulsión de aceite se utilizan contra el IBDV (49). Thornton presentó los principios generales que rigen la elección y el uso de estas vacunas en 1977 (50). y siguen siendo válidos. La vacuna ideal debe ofrecer el equilibrio correcto entre eficacia e inocuidad (51); la vacuna no debe causar enfermedad ni lesiones en la bolsa, no debe ser inmunosupresora o excretada, y debe conferir inmunidad de larga duración incluso en aves con un alto nivel de inmunidad materna. Desafortunadamente, tal vacuna no existe (52).

- **Vacunas de virus vivos**

Las vacunas del virus vivo son muy utilizadas. Estos están hechos de cepas de virus que se han atenuado por pasajes en serie. Dependiendo del grado de atenuación, las cepas de la vacuna causan lesiones histológicas de gravedad variable en las bolsas de los pollos SPF y se clasifican como leves, intermedias o calientes (53).

La vacuna viva funciona a 2 niveles esenciales. Primero, estimula respuestas inmunes activas contra el virus y segundo permite retrasar los establecimientos de desafíos de campos hacen que el ave más susceptible está poco disponible". (31).

Para los controles de IBD se utilizan la vacuna viva que suele ser atenuada disminuyendo sus patogenicidades, por los niveles de atenuaciones pudiendo cambiar sus clases en vacunas suaves, intermedia y fuerte. Toda vacuna viva, excepcionalmente de la vacuna alta atenuada produce daños bursales generando niveles de inmunosupresiones. (3)

La vacuna intermedia se utiliza para la vacunación de pollos de engorde y pollitas (54).

Estos también se administran a pollos en bandadas reproductoras que corren el riesgo de ser provocadas por cepas altamente patógenas a una edad temprana. Aunque las vacunas intermedias también son sensibles a la neutralización por anticuerpos pasivos, estas vacunas pueden administrarse a aves de un día por nebulización para proteger a un pollito que puede no tener un nivel suficiente de anticuerpos específicos. Otra razón para dicha vacunación temprana es lograr las replicaciones del virus de las vacunas en los pollos y la diseminación del virus dentro de la granja; esto, al menos parcialmente, proporcionaría la vacunación indirecta a los otros pollitos en un momento en que se vuelvan sensibles a la infección. En granjas de alto riesgo, generalmente se realizan dos vacunaciones. La edad de vacunación depende de los títulos de anticuerpos maternos presentes en los pollitos en la eclosión. Las vacunas se administran generalmente a través del agua potable, aunque también es posible la nebulización.

- **Vacunas inactivadas**

Esta vacuna es utilizada específicamente en reproductores para las transmisiones del anticuerpo maternal a las progenies (55). Se entiende que las vacunas inactivadas aplicadas a las 20 semanas, ayudan a dar un paso a los anticuerpos maternos adecuado a las progenies, el cual se mantienen entre 3 a 4 semanas. (56)

También se usan esencialmente para producir títulos de anticuerpos altos, uniformes y persistentes en gallinas antes de la puesta que se vacunaron con un virus vivo o se infectaron de forma natural a través de la exposición al virus en la granja (57).

### 1.3. Marco Conceptual

**Inmunidad.** Nivel de resistencia natural o adquirida que tienen determinados organismos frente a enfermedades o ataques de agentes infecciosos o tóxicos.

**Cadena de frío.** Sistemas de conservación, transporte, manejo y distribuciones de la vacuna. Estos puntos son los más importantes, dado que si no se conocen como se debe utilizar y conservar la vacuna esta se malogrará y si la aplicamos, nos darán falsas sensaciones de seguridad o que ya se cumple con la meta planteada.

**Anticuerpo.** Proteínas (inmunoglobulinas) formado por organismos en respuestas a las estimulaciones por antígenos y que tienen propiedades de unirse de manera esencial a los mismos.

**Cepa.** Conjunto de virus o bacterias derivadas de progenitores bien definido, que posee dotaciones genéticas similares y mantienen determinadas características que se conservan durante décadas seguidas.

**Citocinas.** Moléculas peptídicas generada por células de los sistemas inmunes que modifica los comportamientos de otra célula de estirpes distintos o de sí mismos.

**Clon.** Conjunto de célula que proceden de unas células por reproducciones.

**Inmunidad.** Grupo de aspectos humorales y celular que protege a los organismos frente a las agresiones por el agente infeccioso.

**Inmunidad adquirida.** Inducciones o transmisiones de estados de resistencias frente a antígenos a través de las actuaciones directas de anticuerpos o de células determinadas.

**Mortalidad.** Cantidad equivalente de muertes en una comunidad y lapso en específico.

**Patogenicidad.** Capacidad de microorganismos de causar enfermedades.

**Patógeno.** Microorganismos que en circunstancias apropiadas son capaces de generar enfermedades a los huéspedes, los cuales infectan.

**Paratopo.** Regiones variables de las moléculas de anticuerpos que se unen esencialmente con los epítomos de los antígenos determinados.

**Período de incubación.** Intervalos de tiempo entre las exposiciones a los agentes infecciosos y las apariciones de los primeros signos o síntomas de las enfermedades generadas por estos.

**Clonación.** Tecnológicamente del DNA recombinantes, manipulaciones de DNA para generar determinadas copias de genes o segmento de DNA.

**Serología.** Métodos diagnósticos de enfermedades infecciosas mediante las exploraciones de anticuerpos determinados de microorganismo en la sangre.

**Serotipo.** Subpoblaciones antigénicas diferente de especies de microorganismos infecciosos, que se distinguen de otra subpoblación mediante hallazgos serológicos. La respuesta inmunitaria frente a serotipos de microorganismo puede amparar o no, de acuerdo a los casos, frente a otros serotipos.

**Susceptible.** Falta de inmunidades frente a unos agentes infecciosos determinados, de manera que si llegasen a entrar en unión con él estarían expuestas a adquirir la enfermedad.

## **CAPÍTULO II: PROBLEMA DE INVESTIGACION**

### **2.1. Situación Problemática**

La avicultura es un sector bastante próspero a nivel nacional. En cambio, como industrias de alto crecimiento enfrentan varios desafíos y amenaza la firmeza y su futuro proyecto. Por lo general en la zona de elevadas poblaciones avícolas y con todas las cadenas que, aunque se encuentren organizadas, son elevadamente vulnerables en algún eslabón a diferentes enfermedades infecciosas alterando los ciclos productivos y poniendo en peligro la seguridad de las granjas. Una de estas enfermedades es las enfermedades infecciosas de las bolsas de Fabricio-Gumboro, la cual es causada por el virus del padecimiento de Gumboro (IBDV), un virus de RNA de dobles cadenas altamente contagioso. Este padecimiento es considerado importante, a partir del enfoque sanitario y económico ya que está asociada con una alta mortalidad, generalmente excediendo el 50% (58,59,60). Actualmente, el principal mecanismo de protección contra este virus son las vacunas, las cuales tradicionalmente pueden dividirse en vacunas inactivadas y vacunas vivas atenuadas. Pese a los programas de vacunación constantes el brote del padecimiento ha sido reportado últimamente. Siendo las causas principales:

Otra causa importante es la escasa caracterización del tipo de respuesta inmunológica generada por las vacunas. Hasta hace unos años, era sólo posible evaluar la respuesta inmunológica humoral a través de la presencia de anticuerpos circulantes, en cambio el proceso de la ciencia ha autorizado que la otra rama de la respuesta inmunológica, la respuesta celular, también pueda ser evaluada. Esta caracterización nos permitirá tener un conocimiento más amplio del mecanismo de protección de las vacunas, por lo que podremos predecir con mayor eficiencia su comportamiento en el campo y su eficacia. Además, este conocimiento podrá ser utilizado para generar parámetros de control de calidad que puedan ser evaluados durante su producción.

## **2.2. Formulación del problema**

### a) Problema general

¿Cuál será la Respuesta inmunológica de vacunas derivadas de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos libres de patógenos específicos (spf)?

### b) Problemas específico

¿Las vacunas derivado de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF estimulan la respuesta inmunológica humoral?

¿Las vacunas derivado de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF estimula la respuesta inmunológica celular?

¿Las vacunas derivadas de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF es capaz de mejorar la capacidad neutralizante de los anticuerpos?

## **2.3. Justificación e importancia de la investigación**

### Justificación

El surgimiento de variantes o nueva cepa del virus últimamente han sido la causa de falla en las vacunaciones. La transformación de la cepa altamente virulenta del virus de IBD requiere que se caracterice detalladamente la respuesta inmunológica provocada por las vacunas disponibles. Recientemente, FARVET desarrolló dos vacunas contra este virus, X (vacuna inactivada) y Y (vacuna viva atenuada). En campo, ambas vacunas han mostrado ser eficaces e inducir protección contra el IBDV, sin embargo, el mecanismo de protección no ha sido establecido.

Dado que dependiendo de la formulación de la vacuna esta puede inducir una respuesta inmunológica humoral la cual es mediada por anticuerpos y/o la respuesta inmunológica celular en la cual los linfocitos T son las células efectoras, el objetivo de este estudio es caracterizar bajo condiciones

experimentales el tipo de respuesta inmunológica generado en pollos SPF expuestos a las vacunas X y Y. Ambas vacunas fueron desarrolladas en cultivo celular y han demostrado ser efectivas en pruebas de campo.

Se demostró que las infecciones subclínicas del pollito con el virus bursal sucede cuando tiene una baja o nulas inmunidades dada por la madre, ocasionando un incremento a ser susceptibles a otros microorganismos (adenovirus, micoplasma, Colis, etc.), ocasionando importantes consecuencias como de dermatitis necróticas, colibacilosis, aerosaculitis, síndrome de malas absorciones, etc., como en la actualidad se está observando en campos, ante todo en el ave procedente de reproductores con inmunidades deficientes (61).

Se conoce que las acciones de los virus inmunosupresores bursal daña ya sea a las series T como a las B.

A los 3 días de las infecciones experimentales, el virus lo aíslan de las bolsas, timos, hígado, riñón y bazo, es decir, que se reproduce en el órgano linfoide primario, y además en la que anida célula B y T procedente del primario (62).

El virus de gumboro actúa en el bazo, importante en las formaciones de inmunoglobulina G, y teniendo influencia en las poblaciones periféricas B. Se ha reconocido en forma reciente la célula secretora en las médulas de las bolsas de Fabricio. La secreción de la célula tiene control sobre las atracciones de la célula linfoidea libre en los glóbulos rojos, para que se fije en las bolsas y se producen diferenciaciones. El virus bursal altera estas secreciones y estimula secreción supresora de la célula, que, a al mismo tiempo, eliminan la función de la B (63). Las respuestas humorales inmunes (RIH) sucede con las producciones de inmunoglobulina, por el accionar del antígeno, que es T dependiente o B dependiente.

La T dependiente además puede hacer sensible el linfocito B luego de que se ha procesado por macrófago y unido al linfocito T, en respuestas inmunitarias complejas, que necesitan colaboraciones T-B (64).

## **Importancia.**

La vacunación frente al virus de Gumboro es la principal medida con la que contamos para prevenir la morbilidad y la mortalidad del pollo. Caracterizar la respuesta inmunológica generada por estas vacunas nos permitirá descifrar su eficacia protectora contra la enfermedad. Entender la patogénesis y los mecanismos inmunológicos de protección contra el virus es importante para poder prevenir la enfermedad. Además, caracterizar la respuesta inmunológica generada por estas vacunas nos permitirá descifrar su eficacia protectora contra la enfermedad.

## **2.4. Objetivos de la investigación**

### **a). Objetivos General**

Determinar la Respuesta inmunológica de vacunas derivadas de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos libres de patógenos específicos.

### **b). Objetivos específicos**

Determinar en qué medida las vacunas derivado de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF será capaz de estimular la respuesta inmunológica humoral.

Determinar en qué medida las vacunas derivado de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF será capaz de estimular la respuesta inmunológica celular.

Determinar en qué medida Las vacunas derivado de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF será capaz de mejorar la capacidad neutralizante de los anticuerpos.

## 2.5 Hipótesis de la investigación

### a). Hipótesis general

**Ha.-** Las vacunas derivado de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF estimulan Significativamente la respuesta inmunológica.

**H0.-** Las vacunas derivado de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF no estimulan Significativamente la respuesta inmunológica.

### b). Hipótesis específica

**Ha.-** Las vacunas derivado de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF afecta significativamente la respuesta inmunológica humoral.

**H0.-** Las vacunas derivado de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF no afecta significativamente la respuesta inmunológica humoral.

**Ha.-** Las vacunas derivado de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF afecta significativamente la respuesta inmunológica celular.

**H0.-** Las vacunas derivado de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF no afecta significativamente la respuesta inmunológica celular.

**Ha.-** Las vacunas derivado de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF mejorara significativamente la capacidad neutralizante de los anticuerpos.

**H0.-** Las vacunas derivado de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF no mejorara significativamente la capacidad neutralizante de los anticuerpos.

## 2.6. Variables de la investigación

### a) Identificación de variables.

#### Variable independiente

El uso de las vacunas derivado de cultivo celular contra la enfermedad de Gumboro en pollos SPF.

#### Variables dependientes

Inmunidad celular

Interferón-g (células productoras de puntos)

Inmunidad humoral

Títulos de anticuerpos medidos a través de la prueba de Elisa y seroneutralización.

### b). Operacionalización de variables

<b>NOMBRE DE LA VARIABLE</b>	<b>DEFINICION OPERATIVA</b>	<b>UNIDADES CATEGORIAS</b>	<b>SEGÚN SU NATURALEZA</b>	<b>SEGÚN ESCALA DE MEDICION</b>	<b>SEGÚN SU INTERRELACION</b>
vacunas CEO contra la enfermedad de Gumboro	Tipo de vacuna	Vacuna viva.  Vacuna inactiva	Cualitativa nominal	nominal	Independiente
Respuesta inmunológica	Respuesta celular	Títulos de interferón gamma	Cuantitativa continua	intervalo	dependiente
	respuesta humoral	Títulos de anticuerpos	Cuantitativa continua	Intervalo	dependiente

## **CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### **3.1. Tipo, Nivel Y Diseño De Investigación**

La investigación ejecutada es de tipo aplicada, experimental y transversal

### **3.2. Población – Muestra**

$$n = 2 (Z \text{ alfa} + Z \text{ beta})^2 \cdot s^2 / (D)^2$$

s= Desviación estándar, D= diferencia de las medias

$$n = 2(1.64+0.84)^2 220^2 / (2800-2700)^2$$

$$n=28$$

## **CAPÍTULO IV: TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN**

### **4.1. Técnicas de recolección de Datos**

Fueron evaluados mediante los indicadores de los animales distribuidos de acuerdo a la muestra estratificada.

#### **Métodos de análisis**

En este trabajo la inmunidad humoral fue evaluada mediante la técnica de ELISA la cual será complementada con el ensayo de seroneutralización y la respuesta celular será evaluada mediante la técnica de ELISPOT, técnica que cuantifica el número de células productoras de la citocina IFN- $\gamma$ .

#### **Fase pre-experimental**

Los pollos fueron sometidos a un manejo según los manuales de la empresa, por un periodo de dos días para asegurar que todos los pollos estén saludables.

#### **Fase experimental**

Las aves fueron divididas randomizadamente en tres grupos donde tendrán acceso *ad libitum* al agua y sus respectivos alimentos y serán proporcionados según su requerimiento. Todo el manejo fue común, fue dividido en tres grupos de 10 aves, T-1 grupo vacunado con vacuna inactivada (X), T-2 grupo vacunado

con vacuna viva (Y), T-3 grupo control. Las muestras de sangre fueron tomadas a los 7 días. La vacunación fue realizada a los 8 días de edad del ave por vías oculares con una vacuna viva de IBD (GUMBORO) procedente de cultivo celular, por vía subcutánea con una vacuna inactivada derivado de cultivo celular, 21 días después de la vacunación las muestras de sangre fueron tomadas para poder ser analizados por las pruebas de diagnóstico de ELISA y seroneutralización, y el bazo para poder medir la respuesta celular mediante la prueba Elizpot.

### **Programa sanitario y manejo**

Todos los tratamientos en pruebas recibieron unos programas sanitarios, manejos y condición ambiental similar y adecuadas, continuando con el protocolo que por lo normal se emplea bajo la condición de las granjas.

#### **T-1: Vacuna inactivada**

#### **T-2: Vacuna viva**

#### **T-3: control**

### **4.2. Instrumento de Recolección de Datos**

Observaciones experimentales se diferencian de la no experimental ya que elabora información en la condición de manera relativa controlada por el averiguador, por lo particular porque éste logra dirigir el o la variable. Son poderosas técnicas de investigaciones científicas. Logra usar como instrumento las hojas o fichas de registros de información.

### **4.3. Técnicas de Procesamiento, Análisis e Interpretación de Resultados**

Técnica de procesamiento de datos

#### **Ensayo de ELISA.**

Tiene que dejar que todo reactivo adquiera 18 – 26 °C antes de hacer uso. El reactivo deberá incorporarse invirtiéndolo o agitándolo de manera suave.

### **Preparación de muestras.**

Diluir las muestras 1:500 con el diluyente de la muestra antes de efectuar la prueba (por ejemplo, diluir 1ul de la muestra con 500 ul de diluyente). No diluir los controles, mezclar bien la muestra antes de añadir las a las placas tapizadas con los antígenos IBD.

El Procedimiento de la prueba se realizó siguiendo el protocolo del fabricante del kit de Elisa de laboratorio IDEXX.

### **Ensayo de seroneutralización del virus.**

Para que se detecte el anticuerpo circulante contra las Enfermedades Infecciosas de las Bolsas de Fabricio. Se preparan las células DF-1 con las Cepas del virus que se adapta las Enfermedades Infecciosas de las Bolsas de Fabricio, de tal modo que poseían 500 dosis infecciosas de cultivo de tejidos (TCID<sub>50</sub>).

Usando el micro pipeta calibradas, se agregó 20µl del virus a toda la celda de multiwell, excepto en la hilera H de las celdas N°. 7, 8, 9, 10,11 y 12, que fueron para el Control de Células y las celdas N°. 1, 2, 3, 4, 5,6 de la hilera H fueron para el control del virus.

Las diluciones se realizaron de 1:2 hasta 1:16384 para todas las muestras.

Se agrega 20µl del suero negativo en las primeras celdas de las primeras columnas, hileras A, 20ul de suero positivo de Charles River en la segunda celda de las primeras columnas, hileras A.

Se agregó 20 ul del suero en investigación a partir de la tercera celda de las primeras columnas, hileras A y se hacen los mismos procedimientos con todo el suero de las muestras en las posteriores columnas, hasta la celda N°. 12.

Para realizar la dilución se usó las micropipetas eppendorf y se inicia por las primeras celdas y se fueron atravesando a la segunda y así de manera sucesiva hasta que llegue a las a todas las celdas y se descargó el sobrante. Se incuban las multiwell de 45 a 60 minutos al aire libre.

Se agrega 90µl del cultivo celular DF-1, preparado con medio DMEN, a todas las celdas del multiwell.

Se agregó 10ul de las diluciones realizadas.

Luego se cubrieron las multiwell identificadas debidamente.

Se incubaron por 72 horas a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%

Se observa al microscopio inverso para que se determine los Efectos Citopáticos (EC) y se colorea toda la placa con soluciones de azul de Metileno al 1% y se anota la lectura en los formatos correspondientes y Se determina y tabula la Unidad Neutralizante por sueros y por grupos y se anota el resultado en los Cuadros correspondientes para los análisis de información.

### **Ensayo de ELISpot-IFN-g**

Las muestras deben ser transportadas y mantenidas en hielo.

La viabilidad de las células mononucleares recién aisladas mediante histopaque deben ser mayor al 80 % de viabilidad, en caso la viabilidad se <80% se suspende el experimento.

Se deben de incluir control negativo células cultivadas con medio de cultivo, como control positivo células cultivadas en presencia de 2.5 ug/ml de concavalina A.

### **Procedimiento.**

1. Calcular el número de pozos que serán recubiertos con el anticuerpo, luego agregar etanol a cada pozo por menos 1 minuto.
2. Agregar agua estéril a cada pozo y luego decantar, para que la membrana no se seque, procedemos agregar la solución de trabajo del anticuerpo de captura, dejarlo a 4 °C en superficie plana.
3. Retirar la placa de 4 °C y descartar la solución y agregar DPBS luego eliminar.
4. Agregar solución de bloqueo.
5. Incubar la placa a 37°C durante 2 horas.
6. Retirar la placa de la incubadora y descartar la solución de bloqueo.

7. Agregar inmediatamente el antígeno, medio de cultivo o del control positivo según el esquema de trabajo.
8. Luego agregar las células calculadas a cada pozo.
9. Incubar por 48 horas a una temperatura de 41 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.
10. Descartar las células de la placa.
11. Agregar agua fría a cada pozo y dejar reposar durante 2 a 5 minutos.
12. Descartar el agua y agregar buffer de lavado y dejar reposar 5 minutos.
13. Descartar el buffer de lavado y agregar a cada pozo de la solución de trabajo del anticuerpo de detección.
14. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
15. Agregar el buffer de lavado y dejar reposar durante 5 minutos.
16. Descartar el buffer de lavado y agregar la solución de trabajo del complejo de streptavidina –ALP.
17. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
18. Descartar y agregar DPBS, dejar reposar.
19. Agregar el cromógeno e incubar a temperatura ambiente, luego detener la reacción lavando la placa con agua destilada.
20. Secar la placa boca abajo durante 24 horas a oscuras.
21. Después llevar la placa para su lectura.

Los estudios estadísticos se realizaron usando el programa de software estadístico SPSS 24. Para estos parámetros, el logaritmo a la transformación de base 2 se realizó antes del análisis. Donde se compararon las diferencias en desarrollo de anticuerpos y células formadoras de puntos (CFP), a través de los análisis de varianzas (ANOVA) la diferencia se considera significativa en  $P < 0.05$ . Si las hipótesis eran validadas se llevó a cabo la prueba de post-hoc de Tukey para comparaciones de pares múltiples.

## **CAPÍTULO V: CONSTRATACIÓN DE HIPÓTESIS**

**H<sub>0</sub>**= Las medias de los títulos de anticuerpos circulantes y la unidad formadora de puntos de todos los grupos (tratamientos) son iguales.

**H<sub>a</sub>** = Al menos una de las medias de los títulos de anticuerpo circulante y la unidad formadora de puntos es diferente.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k = \mu$$

$$H_A: \mu_i \neq \mu_j \text{ para algún } i \neq j$$

## **CAPÍTULO VI: PRESENTACIÓN, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.**

### **6.1. Presentación e Interpretación de resultados.**

Evaluación serológica por ensayo de ELISA

Las detecciones del anticuerpo presente en los sueros contra los virus de Gumboro por ensayo de ELISA fueron evaluadas luego de las inmunizaciones. No se detectaron títulos de anticuerpo contra los virus de Gumboro en el suero pre-inmune (dato no mostrado). Se detecta los títulos del anticuerpo en el grupo T1 (aves vacunados con vacuna inactivada) 21 días después de la inmunización, dichos títulos de anticuerpos fueron altos de mayoría de las aves de este grupo dando niveles de anticuerpos con un promedio geométrico total (Gmean) de 11316 y un C.V de 11.8% para el grupo T1 y para el grupo T2 con un promedio geométrico ( Gmean) de 12 y un C.V de 241.65 y para el grupo de T3 con promedio geométrico(Gmean) de 3 y un C.V de 69.8% ( tabla 1), detectándose unas diferencias significativas entre el grupo  $P < 0.05$ , se realizó la comparación de pruebas múltiples (tukey) donde podemos afirmar con nivel de significancia de ( $p < 0.05$ ), los títulos de anticuerpos promedio es superior en

vacuna inactivada que en vacuna viva y control, además vacuna viva supera al control ( Figura 1 y Anexo 1). Toda esta información nos indica que existen marcadas producciones del anticuerpo contra el virus de Gumboro en el grupo T1. Estos resultados nos indican que la vacuna inactivada procedente de cultivo celular es capaz de producir respuestas inmunológicas de tipos humorales y podrá evitar una temprana exhibición del ave al virus de Gumboro a excepción de los grupos T2 Y T3.

Tabla 1.

### Descriptivos

#### Títulos de anticuerpos ELISA

	N	Media	Coefficiente de variación (CV%)	Mínimo	Máximo
<b>vacuna inactivada</b>	10	13,47 <sup>a</sup>	11.8	13	14
<b>vacuna viva</b>	10	3,53 <sup>b</sup>	241.6	0	10
<b>Control</b>	10	,80 <sup>c</sup>	69.8	0	4

*Nota: \*abc diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05).*

### Seroneutralización.

Los títulos de anticuerpo neutralizante tras la vacunación están basados en la presencia o la ausencia del efecto citopático, en el ensayo se aprecian unas diferencias significativas entre el grupo (p<0.05), (Tabla 3). El anticuerpo presente en los sueros de las aves vacunadas con la vacuna inactivada es superior que en vacuna viva y control además vacuna viva supera al grupo control (Figura 2 y anexo 2).

Tabla 3.

### Descriptivos

#### Títulos de anticuerpos neutralizantes

	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
<b>vacuna inactivada</b>	10	9.10 <sup>a</sup>	2,025	7	12
<b>vacuna viva</b>	10	5.90 <sup>b</sup>	1,287	4	8
<b>Control</b>	10	,00 <sup>c</sup>	,000	0	0

*Nota: \*abc diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).*

### Evaluación de citosinas (interferón-g ELISPOT)

Para establecer los perfiles inmunológicos celulares se analiza la producción de interferón- $\gamma$  (ChIFN-g). Los esplendorcitos de pollos vacunados contra el IBDV y no vacunados fueron estimulados con IBDV durante 48 horas y se analizó la producción de ChIFN-g mediante el ensayo ELISPOT (Figura 3). Se encontró un número significativamente mayor de manchas utilizando esplendorcitos de pollos vacunados con vacuna inactivada contra IBD en comparación con esplendorcitos de pollos vacunados con vacuna viva y no vacunados ( $P < 0.05$ ) estadísticamente significativo entre grupos, (tabla 5) y ver entre que grupos hay significancia se realizó la prueba de comparación múltiple (tukey), (anexo 3).

Tabla 5.  
Estadística descriptiva Células formadora de puntos

	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
<b>vacuna inactivada</b>	10	51.9 <sup>a</sup>	38.2	4	104
<b>vacuna viva</b>	10	12.4 <sup>b</sup>	7.1	4	22
<b>Control</b>	10	6.8 <sup>c</sup>	8.8	,7	24

*Nota:* \*ab diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

## 6.2 Discusión de resultados.

La IBD es una de las enfermedades inmunosupresoras fundamental en el ave de producciones, siendo tomado en cuenta un problema más significativo para las industrias avícolas por la pérdida económica que origina al tener un impacto directo (muerte y bajo rendimiento productivo) e indirecto (infección secundaria y falla en las vacunaciones) (38). El virus del padecimiento de Gumboro infecta las bursas de Fabricio, uno de los principales órganos inmunitarios primario en los pollos, poblado por células B, impidiendo así su desarrollo y dificultando su funcionamiento a lo largo de las respuestas inmunitarias. No sólo la célula B, sino también los fagocitos, la célula presentadora de antígenos y el linfocito T sufre, por lo que tanto la inmunidad innata como la inmunidad adaptativa se ven gravemente suprimidas (5).

La presente investigación se ejecutó para poder determinar el tipo de respuesta inmunológica producida por vacunas derivados de cultivo celular, al caracterizar el tipo de respuesta inmunológica generada por estas vacunas nos permitirá descifrar su eficacia protectora contra la enfermedad del virus de Gumboro. La creencia actual es que la respuesta inmune humoral juega un rol importante en defensa contra la enfermedad infecciosa de Gumboro (5). En este trabajo se evaluó los sueros post inmunización mediante los ensayos de ELISA y SERONEUTRALIZACION con estos ensayos determinan la respuesta tipo humoral.

Por otro lado, se desconoce la posible implicación de la inmunidad celular, en particular la de las células T, en la protección de la vacuna contra el IBDV, el ensayo de ELISPOT es una técnica para medir la producción de de ChIFN-g para el análisis de la respuesta de las células T CD3, CD4 Y CD8. La producción de INF-g se utiliza habitualmente como marcador de la actividad de las células T en una amplia gama de especies (65,66). Una respuesta adecuada de las células T parece ser necesaria para el desarrollo de una inmunidad protectora contra la mayoría de los virus (67).

Para la interpretación del resultado del ensayo serológico de las aves vacunadas con vacunas derivadas de cultivo celular, vacuna inactivada y vacuna viva contra el IBD. La vacuna inactivada evidentemente es eficaz que la vacuna viva, dando el título de anticuerpo más altos tras las vacunaciones con las vacunas inactivadas se debieron probablemente a la mezcla con un adyuvante de esta vacuna, los resultados de títulos de anticuerpos por ELISA en nuestro estudio revelaron que se desarrollaron títulos de anticuerpos protectivos en las aves vacunadas con vacuna inactivada estos títulos son significativamente mayores en comparación con los grupos vacunados con vacuna viva y control. En cambio, para los resultados de anticuerpos neutralizantes son de manera significativa aún mayor en las aves vacunados con vacuna inactivada comparando con las aves del grupo vacunado con vacuna viva y control, además vacuna viva es mejor que el grupo control para los anticuerpos neutralizantes. Y los resultados por ELISPOT teniendo una mayor producción de células formadoras de punto para aves vacunadas con vacuna inactivada estadísticamente significativo en comparación con aves vacunadas con vacuna viva y control.

De las observaciones realizadas en esta investigación se desprende que la vacuna inactivada derivado de cultivo celular es capaz de estimular una respuesta inmunológica de base celular y humoral por tener una diferencia estadísticamente significativa. Nuestro estudio complementa que las células T son necesarias para lograr una protección completa contra el IBDV virulento (8), varias vacunas víricas inactivadas han revelado que la inmunidad mediada por células, especialmente la célula T, puede desempeñar papeles importantes en la protección (68, 69; 70). No se sabe cómo las células T citotóxicas pueden ser estimuladas por las vacunas inactivadas y mediar en la protección. Los estudios

in vitro han sugerido que las células maduras dendríticas pueden desempeñar un papel como células presentadoras de antígenos mediante la formación de complejos de sus moléculas MHC de clase I con epítomos de virus inactivados (71). Las vías alternativas independientes de TAP pueden contribuir a la capacidad de las vacunas inactivadas para estimular los CTL en ausencia de una infección activa de las células presentadoras de antígenos (72, 73)

La vacuna inactivada es capaz de dirigirse a apoyar la estimulación de las células T y células B para inducir una protección adecuada. La protección mediada por células T puede ser de especial importancia si la respuesta inmunitaria humoral no ha sido inducida eficazmente por una vacuna, como puede ser el caso de las aves vacunadas con vacuna viva que tuvieron una diferencia significativa para el ensayo en seroneutralización.

Ensayo complementario es requerido para confirmar el resultado de la presente investigación en una condición de campo.

## CONCLUSIONES

1. Concluimos que la vacuna inactivada fue evidentemente eficaz que la vacuna viva, al poder estimular una respuesta inmunológica de base celular y humoral dando los títulos de anticuerpos altos y células formadoras de puntos tras la vacunación
2. Dentro del análisis de los resultados obtenidos, se evidenciaron que los anticuerpos para la enfermedad Gumboro, tuvo una correspondencia directa, con el proceso de vacunación, ya que la variación de títulos fue significativa entre grupos.
3. Los resultados en los ensayos serológicos, seroneutralizantes y Elispot, indican que la vacuna inactivada, aplicada en pollos spf, indujo una respuesta inmunológica elevada, que la vacuna viva y control empleados en este estudio y la vacuna viva teniendo títulos de anticuerpos mayor que al grupo control.
4. Nuestros resultados muestran la eficiencia de ELISPOT-ChIFN y en la medición de la producción de ChIFN y asociada con la vacunación con vacunas de la enfermedad de Gumboro. Esta herramienta, combinada con la detección anticuerpos circulantes, puede utilizarse para medir la absorción de la vacuna después de la vacunación con diferentes tipos de vacuna contra la enfermedad de Gumboro.
5. Estos enfoques pueden ser útiles en la caracterización de vacunas de nueva generación y sus respuestas inmunes inducidas.
6. Estos hallazgos remarcan la importancia de monitorizar la eficacia de la vacunación frente a IBD. Elispot, serología y seroneutralización son herramientas muy efectivas para poder evaluar la respuesta inmunológica.

## **RECOMENDACIONES.**

1. Se sugiere efectuar un análisis en condiciones de campo para evaluar la respuesta inmunológica.
2. Realizar los mismos estudios con un plan de vacunas contra las enfermedades de Gumboro.
3. Se recomienda realizar estudios a los primeros días de edad en el pollo con el título del anticuerpo materno presente.
4. Se recomienda evaluar los diferentes tipos de adyuvantes para la vacuna inactivada contra la enfermedad de gumboro.

## FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Rosales G. Control actual de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa. En: Memorias XI Seminario Internacional de Patología Aviar. Georgia, USA. p 468-481, 2000.
2. Lukert, P. y Saif, Y. Infectious Bursal Disease. En: Diseases of Poultry. Undécima edición. Iowa State Press, 2003.
3. Jackwood, D. Epidemiology of infectious bursal disease. Impact of Subclinical Immunosuppression on Poultry Production. Symposium AAAP. Pp 19 – 21, 2006.
4. Ivanyi, J. Immunodeficiency in the chicken. Clin. Exp. Immunol, 23 (154-155), 12, 1976.
5. Rautenschlein, S., Yeh, H. y Sharma, J. M. The role of T cells in protection by an inactivated infectious bursal disease virus vaccine. Veterinary Immunology and Immunopathology, 89(3-4), 2002.159-167. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00202-7](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00202-7).
6. Baksi, S., Rao, N., y Khan, M. Evaluation of Specific Antibody Response in Backyard Chickens to Infectious Bursal Disease Live Vaccine. Veterinary Research, 3, 5, 2018.
7. Kundu, P., Narang, G., Chhabra, R., Kajal, S., Mahajan, N. K., & Kakkar, N. Immune Response Study to Live Infectious Bursal Disease Vaccines in Broiler Chickens. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2017. 6(12), 2655-2668. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.612.307>.
8. Prandini, F., Simón, 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 layer pullets. *Avian Pathology*, 2016, 45(1), 114-125.  
<https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1127891>.
9. León R., N., Icochea D., E., González V., R., y 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).
  10. Castellanos C, D., Icochea D, E., Guzmán G, J., Reyna S, P., y Perales C, R. Vacunación contra la enfermedad infecciosa de la Bursa vía aspersión y vía agua de bebida en pollos de carne. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 2012, 23(4), 484-490.
  11. Sacristán J, Sagardía J. La enfermedad de Gumboro (I): incidencia en España. *MG Mundo Ganadero* 16, 2005 (Supl.174): 25-29.
  12. Babaahmady E. Enfermedad de Gumboro. Histopatología de la Bursa de Fabricio en la enfermedad natural y experimental en pollos de engorde. *Revista Electrónica de Veterinaria redvet* 6, 2005. (Supl.3): 1-8.
  13. Castro P, X. Evaluación de Parámetros Productivos y respuesta inmune en pollos de engorde vacunados con dos programas de vacunación contra la enfermedad de Gumboro. Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario. FMV- UNMSM. Lima – Perú. 1994.
  14. Van, T. “Acute infectious bursal disease in poultry: a review”. *Avian pathol.* 29: 175- 194. 2000.
  15. Tacken, J., Van T, J., Peters, H., Thomas, M., Rottier, M., Boot, J. “Homotypic interactions of the infectious bursal disease virus proteins VP3, pVP2, VP4, and VP5: mapping of the interacting domains”. *Virology* 312: 306-319. 2003.
  16. Pous J., Chevalier, C., Ouldali, M., Navaza, J., Delmas, B., y Lepault, J. “Structure of birnavirus-like particles determined by combined electron cryomicroscopy and X-ray crystallography”. *J. Gen. Virol.* 86. 8: 2339-2346. 2005.

17. Ashraf S. Studies on Infectious Bursal Disease Virus. Tesis de doctor of philosophy. Ohio-U.S.A: The Ohio State University. 1-118p. 2005.
18. Etteradossi N, Saif Y. Infectious Bursal Disease. En: Saif Y (ed). Diseases of poultry. 13th ed. USA: Iowa State Press. p 219-246. 2013.
19. Ozel, M. and Gelderblom, H. "Capsid symmetry of viruses of the proposed birnavirus group". Arch. Virol. 84: 149-161. 1985.
20. Yehuda, H.; M. Goldway. Transfer of antibodies elicited by baculovirus-derived VP2 of a very virulent bursal disease virus strain to progeny of commercial breeder chickens. Avian Pathology N° 29. Pp 13 – 19. 2000.
21. Maas, R. Efficacy of inactivated infectious bursal disease (IBD) vaccines: comparison of serology with protection of progeny chickens against IBD virus strains of varying virulence. Avian Pathology N° 30. Pp 345 – 354. 2001.
22. Patton, J. T. Segmented Double-stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology. Horizon Scientific Press. 2008.
23. Etteradossi, N., & Y. M. Saif. Infectious Bursal disease. 2009.
24. 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, 56(1), 153. 2018.
25. 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, 47(1), 87-95. 2003.
26. Paniagua, M., Cazaban, C., Alva, B., Lozano, F., & Attrache, J. el. Enfermedad de Gumboro especial. 2014.
27. Jaimes, Espejo, D. C. Á., Correa, J. J., y Alfonso, V. J. V. Aspectos determinantes en la presentación de la enfermedad infecciosa de la bursa, 12. 2009.

28. Mahgoub, H. An overview of infectious bursal disease. *Archives of Virology*, 157(11), 2047-2057. 2012.
29. Biarnés, M. Enfermedades víricas generalizadas. *Higiene y Patología Aviar*. Capítulo 10. Real Escuela de Avicultura. Segunda Edición. Pp 161 – 170. 2006.
30. Villegas, P. Control de la enfermedad infecciosa de la bolsa y de la anemia infecciosa aviar. Congreso LA Avicultura Guatemala. 2001.
31. Cookson, K. Uso del Análisis Computarizado de imágenes para establecer la ventana de infección y el tiempo apropiado para la vacunación con virus activo contra la infección de la bolsa de Fabricio. Primer Taller de Gumboro. Trujillo – Perú. 2003.
32. Pagés, A.; D. Torrents. Abril. Dogs as potential carriers of infectious bursal disease. *Avian Pathology*. 33(2). Pp 205 – 209. 2004.
33. Lukert, P. D. Enfermedad infecciosa de la bolsa de fabricio, 27. 2001.
34. 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. 2014.
35. Hy-Line International. Enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio (ibd, Gumboro). 2017.
36. Carlos F. II Simpósio de Sanidade Avícola doença de gumboro no brasil. 2000.
37. OIE. Manual de la OIE sobre animales terrestres Bursitis infecciosa. 2008.
38. T.P. Van T. N. Eterradosi, Toquin, D., & G. Meulemans. Infectious bursal disease (Gumboro disease). 2000.
39. Tizard, I. *Inmunología Veterinaria*. México D.F., México: McGraw-Hill Interamericana Editores S. A. 2002.
40. Sharma, J.M. The avian immune system. In: *Diseases of Poultry*, 11th Ed. Saif et al., eds. Iowa State Press. Pp5-16. 2003.

41. Koppenheffer, T. L. Complement. In J. Sharma (ed.), *Avian Immunology*, vol 2. Academic Press. *Handbook of Vertebrate Immunology*. 1998.
42. Gobel, T. W., B. Kaspers, and M. Stangassinger. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *Int Immunol* 13:757–62. 2001.
43. Fukui, A., N. Inoue, M. Matsumoto, M. Nomura, K. Yamada, Y. Matsuda, K. Toyoshima, and T. Seya. Molecular cloning and functional characterization of chicken toll-like receptors. A single chicken toll covers multiple molecular patterns. *J Biol Chem* 276:47143–9. 2001.
44. Peña, J., Molina, I. & González, L. *Introducción a la Inmunología*. 2012. [http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php?option=com\\_content&view=article&id=52%3Aintroduccion](http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php?option=com_content&view=article&id=52%3Aintroduccion).
45. Tizard, I. R. *Inmunología veterinaria*. Elsevier Health Sciences. 2018.
46. Castro-Pozo X. Evaluación de parámetros productivos y respuesta inmune en pollos de engorde vacunados con dos programas de vacunación contra la enfermedad de Gumboro. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Univ Nacional Mayor de San Marcos. 25 p. Benton W.J., Cover M.S., Rosenberger J.K. & Lake R.S. Physicochemical properties of the infectious bursal agent (IBA). *Avian Dis.*, 11, 430-438. 1967, 1994.
47. Maris P. Désinfection des bâtiments: le vide sanitaire en aviculture. *Point vét.*, 18, 635-639. 1986.
48. Thiry G., Paami G., Nordgren R. & Colau D. Evaluation of safety and efficacy of vaccination of chickens with live recombinant fowlpox expressing infectious bursal disease virus antigens, in *Proc. First International Symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anaemia* (E. Kaleta, ed.), 21-24 June, Rauschholzhausen, Germany. World Veterinary Poultry Association, Giessen, 336-339. 1994.
49. Thornton D.H. y Pattison M. Comparison of vaccines against infectious bursal disease. *J. comp. Pathol.*, 85, 597-610. 1975.

50. Gough R.E., Drury S.E., Cox W.J., Johnson C.T. & Courtenay A.E. Isolation and identification of birnaviruses from ostriches (*Struthio camelus*). *Vet. Rec.*, 142 (5), 115-116. 1998.
51. McFerran J.B. Infectious bursal disease. In *Vims infections of birds* (J.B. McFerran & M.S. McNulty, eds). Elsevier Science, Amsterdam, 213-228. 1993.
52. OIE. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 4th Ed. OIE, Paris (in press). 2000.
53. Mazariegos L.A., Lukert P.D. & Brown J. Pathogenicity and immunosuppressive properties of infectious bursal disease 'intermediate' strains. *Avian Dis.*, 34, 203-208. 1990.
54. Corley, M. Evaluation of the immune response and detection of infectious bursal disease viruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay after in ovo vaccination of commercial broilers. *Avian Diseases* N° 46. Pp 803 – 809. 2002.
55. Eidson, C. Comparison of inactivated and live infectious bursal disease virus vaccines in white Leghorn breeder flock. *Poultry Science* Vol 59 N° 12. Pp 2708 – 2716. 1980.
56. Cullen G.A. y Wyeth P.J. Response of growing chickens to an inactivated IBD antigen in oil emulsion. *Vet. Rec.*, 99, 418. 1976.
57. Avellaneda G, Villegas P. Enfermedad infecciosa de la bolsa (Gumboro). *Avic Prof* 12: 190-200. 1995.
58. Egaña SCL. Estudio serológico de exposición a agentes infecciosos en fardela negra (*Puffinus griseus*, Gmelin 1789) provenientes de una colonia reproductiva en Isla Guafo, Chile. Tesis de Médico Veterinario. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile. 44 p. 2010.
59. Alfonso A, Noda J. Análisis retrospectivo del comportamiento epizootológico de la enfermedad de Gumboro en Cuba. *redvet* 13(10). 2012.

60. Rosenberger J.K., Klopp S., Eckroade R.J. Y Krauss W.C. The role of the infectious bursal agent and several adenoviruses in the hemorrhagic-aplastic-anaemia syndrome and gangrenous dermatitis. *Avian Dis.*, 19,717-729, 1975.
61. W. BAXENDALE. XV Simposium, Rama espaliola W.P.S.A. Barcelona. 1977.
62. B. Glick. Atlanta Symposium on Bursal Infectious Disease. 1977.
63. Closas, A. S. G. Respuesta inmune de las aves y sus alteraciones. 1983.
64. Karlsson AC, Martin JN, Younger SR, Bredt BM, Epling L, Ronquillo R, et al. Comparison of the ELISPOT and cytokine flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells. *J Immunol Methods*;283(1-2):141–53. 2003.
65. Paillot R, Daly JM, Juillard V, Minke JM, Hannant D, Kydd JH. Equine interferon gamma synthesis in lymphocytes after in vivo infection and in vitro stimulation with EHV-1. *Vaccine* 2005;23(36):4541–51
66. Zinkernagel, R.M., 1996. Immunology taught by viruses. *Science* 271, 173–178. S. Rautenschlein et al. / *Veterinary Immunology and Immunopathology* 89 (2002) 159–167.
67. Christensen, J.P., Doherty, P.C., Branum, K.C., Riberdy, J.M., Profound protection against respiratory challenge with a lethal H7N7 influenza A virus by increasing the magnitude of CD8(β) T-cell memory. *J. Virol.* 74, 11690–11696. 2000.
68. Hedge, N.R., Srikumaran, S. Reverse immunogenetic and polyepitopic approaches for the induction of cell-mediated immunity against bovine viral pathogens. *Anim. Health Res. Rev.* 1, 103–118. 2000.
69. Woodland, D.L. Usherwood, E.J., Liu, L., Flano, E., Kim, I.J., Blackman, M.A., Vaccination against murine gamma-herpesvirus infection. *Viral Immunol.* 14, 217–226. 2001.
70. Subklewe, M., Chahroudi, A., Schmaljohn, A., Kurilla, M.G., Bhardwaj, N., Steinman, R.M. Induction of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-

- lymphocyte responses using dendritic cells pulsed with EBNA-3A peptides or UV-inactivated, recombinant EBNA-3A vaccinia virus. *Blood* 94, 1372–1381. 1999.
71. Liu, T., Zhou, X., Abdel-Motal, U.M., Ljunggren, H.G., Jondal, M. MHC class I presentation of live and heat-inactivated Sendai virus antigen in T2Kb cells depends on an intracellular compartment with endosomal characteristics. *Scand. J. Immunol.* 45, 527–533. 1997.
72. Snyder, H.L., Bacik, I., Bennink, J.R., Kearns, G., Behrens, T.W., Bachi, T., Orłowski, M., Yewdell, J.W. Two novel routes of transporter associated with antigen processing (TAP)-independent major histocompatibility complex class I antigen processing. *J. Exp. Med.* 186, 1087–1098. 1997.

# ANEXOS

Imagen 1.

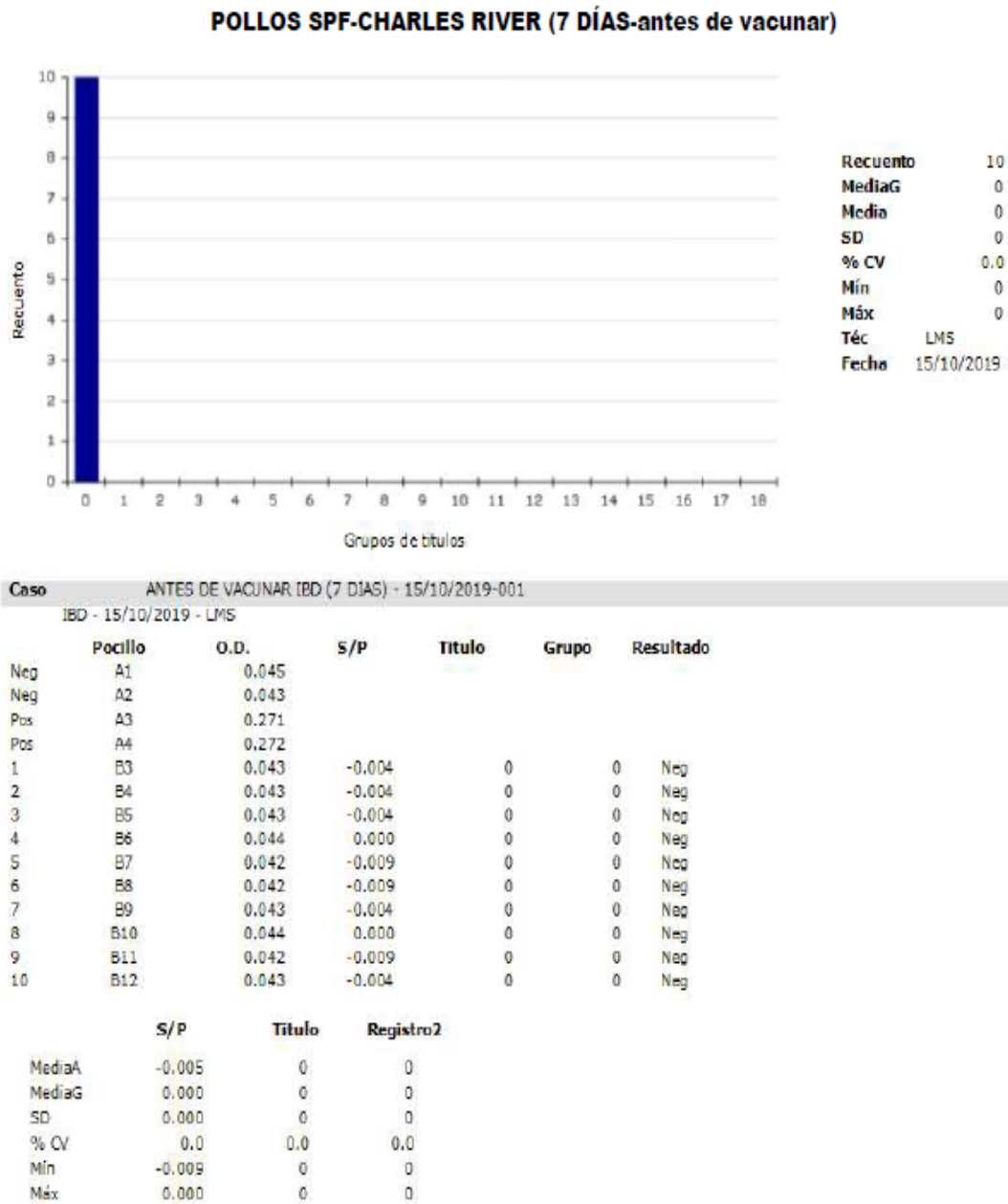


Imagen del resultado de la prueba de ELISA de los pollos spf antes de iniciar el experimento, donde podemos observar que no presentan títulos de anticuerpos.

## Anexo 1.

### Prueba post hoc.

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: TitulosdeanticuerposELISA

HSD Tukey

(I) GRUPOS	(J) GRUPOS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
vacuna inactivada	vacuna viva	9,940*	,913	,000	7,68	12,20
	control	12,670*	,913	,000	10,41	14,93
vacuna viva	vacuna inactivada	-9,940*	,913	,000	-12,20	-7,68
	control	2,730*	,913	,016	,47	4,99
control	vacuna inactivada	-12,670*	,913	,000	-14,93	-10,41
	vacuna viva	-2,730*	,913	,016	-4,99	-,47

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

#### Títulos de anticuerpos ELISA

HSD Tukey<sup>a</sup>

GRUPOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Control	10	,80		
vacuna viva	10		3,53	
vacuna inactivada	10			13,47
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Figura 1.  
Títulos de anticuerpos de la prueba ELISA.

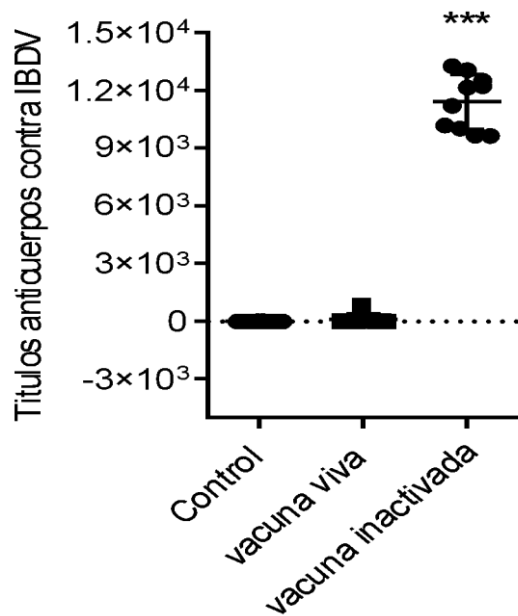


Figura 1. Ensayo de la prueba ELISA utilizando sueros de aves del experimento. La grafica representa los títulos de anticuerpos de cada grupo.

## Anexo 2.

### PRUEBA POST HOC.

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: titulosdeanticuerposneutralizantes

HSD Tukey

(I) GRUPOS	(J) GRUPOS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
vacuna inactivada	vacuna viva	3,200*	,619	,000	1,66	4,74
	control	9,100*	,619	,000	7,56	10,64
vacuna viva	vacuna inactivada	-3,200*	,619	,000	-4,74	-1,66
	control	5,900*	,619	,000	4,36	7,44
control	vacuna inactivada	-9,100*	,619	,000	-10,64	-7,56
	vacuna viva	-5,900*	,619	,000	-7,44	-4,36

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Títulos d anticuerpos neutralizantes  
HSD Tukey<sup>a</sup>

GRUPOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Control	10	,00		
vacuna viva	10		5,90	
vacuna inactivada	10			9,10
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Figura 2.

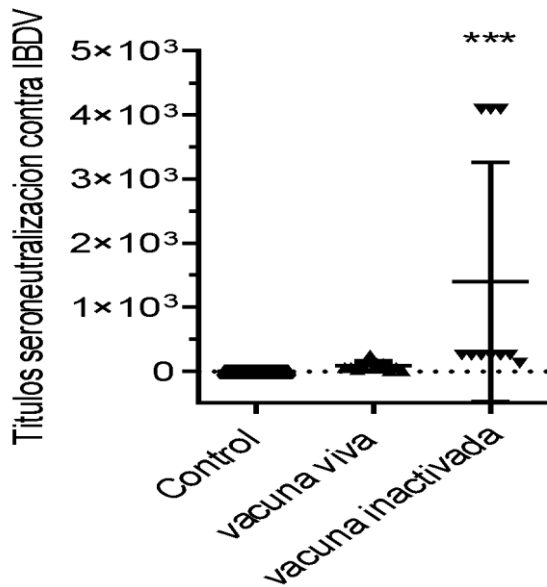
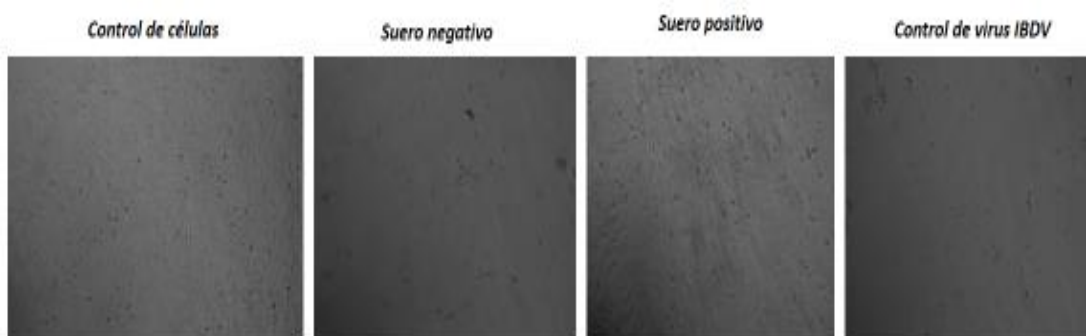


Figura 2. Ensayo de seroneutralización en células DF-1 infectadas con una TCID<sub>50</sub> (dosis infecciosa de cultivo de tejidos) de 500 de virus de Gumboro utilizando sueros de aves del experimento. La figura representa títulos de los grupos.

Imagen 2.



Nótese la presencia del efecto citopático en las muestras de suero negativo y del virus con desprendimiento del mono capa celular tras 72 horas post infección y la ausencia del efecto citopático en control de células y sueros positivo provenientes de pollos inmunizados con vacunas provenientes de cultivo celular.

### Anexo 3.

#### PRUEBA POST HOC.

##### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: celulasformadoradepuntos

HSD Tukey

(I) GRUPOS	(J) GRUPOS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
vacuna inactivada	vacuna viva	39,55500*	13,29038	,024	5,0336	74,0764
	control	45,11000*	13,29038	,011	10,5886	79,6314
vacuna viva	vacuna inactivada	-39,55500*	13,29038	,024	-74,0764	-5,0336
	control	5,55500	13,29038	,909	-28,9664	40,0764
control	vacuna inactivada	-45,11000*	13,29038	,011	-79,6314	-10,5886
	vacuna viva	-5,55500	13,29038	,909	-40,0764	28,9664

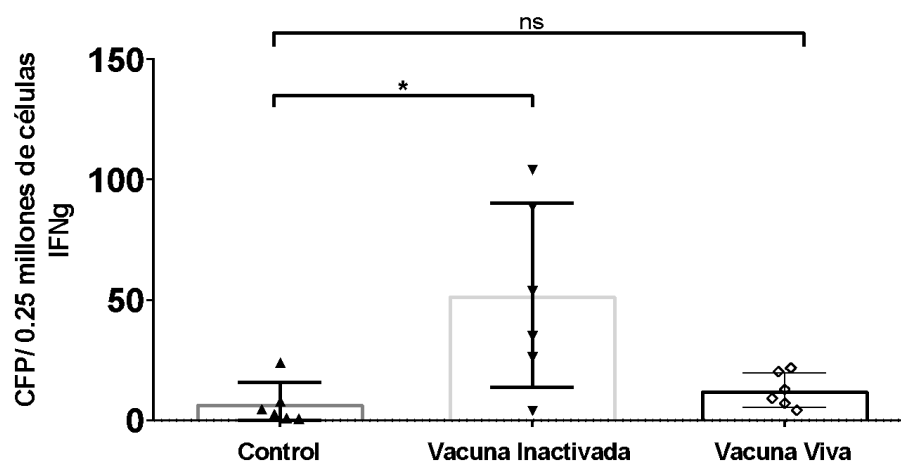
\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

*Células formadoras de puntos*  
*HSD Tukey<sup>a</sup>*

<i>GRUPOS</i>	<i>N</i>	<i>Subconjunto para alfa = 0.05</i>	
		<i>1</i>	<i>2</i>
<i>Control</i>	<i>6</i>	<i>6,8350</i>	
<i>vacuna viva</i>	<i>6</i>	<i>12,3900</i>	
<i>vacuna inactivada</i>	<i>6</i>		<i>51,9450</i>
<i>Sig.</i>		<i>,909</i>	<i>1,000</i>

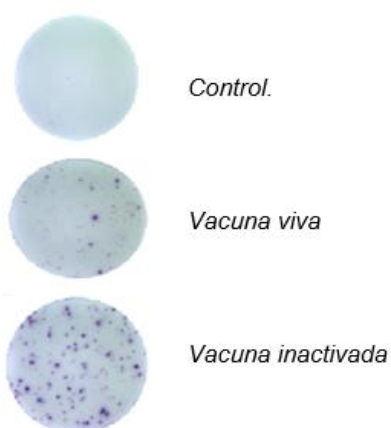
*Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.*

Figura 3.



Recuento de manchas inmunoenzimáticas secretoras de ChIFN- $\gamma$  procedentes de pollos vacunados con vacunas derivadas de cultivo celular contra IBDV o de control. \* $P < 0,05$ ; diferencia significativa para vacuna inactivada.

Imagen 3.



Ensayo de manchas inmunoenzimáticas (ELISPOT) de detección de células T secretoras de interferón (IFN)- $\gamma$ . Células mononucleares de esplenocitos de bazo de los pollos con vacunas contra IBDV se añadieron por triplicado a pocillos recubiertos de anticuerpos IFN- $\gamma$  (ChIFN- $\gamma$ ) y se estimularon durante 48 horas con antígeno.

