

## EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONFERIDA POR UN PROGRAMA DE VACUNACIÓN CONTRA LA ENFERMEDAD DE GUMBORO EN POLLOS DE CARNE APLICANDO LA FÓRMULA DEVENTER

### EVALUATION OF THE LEVEL OF PROTECTION CONFERRED BY A VACCINATION SCHEME AGAINST THE INFECTIOUS BURSAL DISEASE IN BROILERS USING THE DEVENTER FORMULA

Walter Paredes V. <sup>1</sup>, Eliana Icochea D'A. <sup>1,2</sup>, Nieves Sandoval Ch. <sup>3</sup> y Alberto Manchego S. <sup>4</sup>

#### RESUMEN

El presente estudio evaluó la protección conferida por un programa de vacunación a la edad determinada por la fórmula Deventer frente a un desafío experimental con una cepa estándar del virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (EIB) en pollos de carne. Se formaron tres grupos experimentales. El grupo A vacunado a los 10 días de edad con la cepa Lukert (intermedia-suave) y a los 18 días con la cepa CE (intermedia-intermedia); el grupo B vacunado a los 21 días de edad (según la fórmula Deventer) con la cepa 228TC (intermedia-intermedia); y el grupo C no vacunado (control). A los 35 días de edad, 45 aves de cada grupo fueron desafiadas con la cepa estándar F 52/70 del virus de la EIB. La protección fue medida a través de signos clínicos, índice bursal (I.B.), lesiones macroscópicas y microscópicas, y serología. Todos los grupos presentaron signos clínicos y edema bursal hasta el día 10 post desafío. Los valores de I.B. en los tres grupos fueron compatibles con atrofia bursal y las lesiones histopatológicas fueron severas en los grupos vacunados. No se observó seroconversión a EIB hasta el final del estudio. Los resultados obtenidos indicaron que ninguno de los grupos fue protegido de la enfermedad clínica hasta los 10 días post desafío. Sin embargo, la mejor protección se observó en el grupo A en comparación al grupo B, aunque sin encontrar diferencias estadísticas.

**Palabras clave:** enfermedad infecciosa de la bursa, EIB, vacunación, fórmula Deventer, protección

#### ABSTRACT

The present study evaluated the conferred protection by a program of vaccination at an age that was determined by the Deventer formula against a challenge with a standard strain of the Infectious Bursal Disease virus (IBDV) in broiler chickens. There were three

<sup>1</sup>Laboratorio de Patología Aviar, <sup>3</sup>Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria,

<sup>4</sup>Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.

<sup>2</sup>E-mail: eliana.icochea@gmail.com

experimental groups. The group A was vaccinated at 10 days of age with a Lukert strain (intermediate-mild) and at 18 days with CE strain (intermediate-intermediate); group B vaccinated at 21 days old (according to the Deventer formula) with the 228TC strain (intermediate-intermediate); and group C were not vaccinated (control). At 35 days of age, 45 birds of each group were challenged with a standard strain F 52/70 of the IBDV. The protection was measured through clinical signs, bursal index (B.I.), gross and microscopic lesions, and serology. All groups presented clinical signs and bursal oedema until 10 days post challenge. The values of B.I. in the three groups were compatible with bursal atrophy and the histopathology lesions were severe in the vaccinated groups. Seroconversion was not observed until the end of the study. The obtained results indicated that birds in none of the experimental groups were protected against the clinical disease until 10 days post challenge. The best protection was observed in the group A in comparison group B but without statistical difference.

**Key words:** infectious bursal disease virus, IBDV, vaccination, Deventer formula, protection

## INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Infecciosa de la Bursa (EIB) o Enfermedad de Gumboro es una enfermedad viral altamente contagiosa y aguda que afecta principalmente a pollos jóvenes, y se caracteriza por un daño masivo en la bolsa de Fabricio y una severa inmunosupresión (Kulíková *et al.*, 2004). Es una enfermedad de gran importancia en la industria avícola mundial por causar grandes pérdidas económicas debido a su elevada mortalidad, retraso en el crecimiento, condena de carcasas, fallas en los programas de vacunación e incremento de la susceptibilidad a otras infecciones debido a la inmunosupresión (Genova, 2000; Phong *et al.*, 2003).

El virus de la EIB posee un genoma ARN de doble cadena bisegmentado y pertenece al género *Avibirnavirus*. El órgano principal del virus es la Bursa de Fabricio y afecta a las células B inmaduras, lo que da como consecuencia variados grados de inmunosupresión. La infección es de tipo subclínica cuando el virus infecta aves menores de tres semanas, y de tipo clínica cuando infecta aves entre 21 a 65 días de edad (Villegas y Banda, 2001).

La prevención y el control de la EIB incluyen un programa eficaz de bioseguridad

y la vacunación de los lotes de reproductoras y su progenie. En pollos de carne la elección del tipo de vacuna depende de los niveles de anticuerpos del lote por vacunar y la naturaleza del virus de campo (Saif, 2003). Es indispensable determinar la edad óptima de vacunación para proveer a las aves una adecuada protección. Para ello existen fórmulas matemáticas que ayudan a predecir el momento en el que los niveles de anticuerpos maternos serán los suficientemente bajos para una vacunación adecuada. La fórmula Deventer, desarrollada por de Witt (2001), determina la edad óptima de la vacunación tomando en cuenta el título de anticuerpos maternos, el tiempo de vida media de los mismos, la edad a la toma de muestra y la patogenicidad de la cepa vacunal. El principio detrás de la estimación del tiempo óptimo de vacunación involucra la medición del nivel de anticuerpos maternos en el tiempo, pues al determinarse un declive regular (escala  $\log_2$ ), se puede predecir el momento en el que los niveles de anticuerpos maternos serán los suficientemente bajos para permitir la vacunación (de Witt, 2001).

El presente estudio tuvo por objetivo evaluar la protección conferida de dos programas de vacunación contra la enfermedad de Gumboro, uno vacunado a la edad determinada por la fórmula Deventer y otro vacunado a los 10 y 18 días de edad como comúnmente se emplea en la zona de Lima.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aves

El estudio se realizó en las instalaciones experimentales del Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. Se emplearon 198 pollos de carne machos de la Línea Ross 308 provenientes de un lote de reproductoras de 57 semanas de edad. De estas aves, 18 fueron sacrificadas al primer día de edad para la medición de anticuerpos maternos.

### Vacunas IBDV y Desafío

Se usaron las vacunas comerciales Bursine 2 conteniendo la cepa Lukert de tipo intermedia-suave (Fort Dodge Animal Health); Nobilis Gumboro Broiler conteniendo la cepa 228 TC de tipo intermedia-intermedia (Intervet); y la Vi-Bursa C.E. conteniendo la cepa C.E. de tipo intermedia-intermedia (Vineland). Además, se utilizó la cepa estándar F52/70, con un título de  $10^3$  DLE<sub>50</sub>/ml, en una dosis de 50 µl/ave por vía ocular (Laboratorios Intervet, Holanda).

### Diseño Experimental

Las aves fueron distribuidas en tres grupos experimentales de 60 pollitos BB cada uno:

- Grupo A: aves vacunadas con un programa tradicional a los 10 (Bursine 2) y 18 días de edad (Vi-Bursa CE).
- Grupo B: aves vacunadas a la edad de 21 días determinado por la fórmula Deventer.
- Grupo C: no recibió vacunas contra EIB (grupo control).

Los tres grupos se criaron en ambientes totalmente separados hasta su desafío via ocular (cepa F52/70) a los 35 días de edad, en que 45 aves de cada grupo fueron trasladadas a un mismo ambiente dividido en tres corrales. Las aves restantes se mantuvieron en sus ambientes como control no desafiado.

### Fórmula Deventer

La edad de vacunación (Ev) para el grupo B se calculó utilizando la fórmula Deventer según lo descrito por de Witt (2001), y adaptada al programa comercial MS Excel 2003 (Intervet, 2004):

$$Ev = [(\log_2 T_{ave} \% - \log_2 T_{rompebarrera}) \times T^{1/2}] + Em + C_{0-4}$$

donde:

$T_{ave} \%$	=	Títulos de ELISA del lote muestreado
$T_{rompebarrera}$	=	Título rompe barrera materna (ELISA) de la vacuna a usar (125)
$T^{1/2}$	=	Tiempo de vida media (ELISA) de los anticuerpos (3.0)
Em	=	Edad de las aves al muestreo (1)
$C_{0-4}$	=	Días extra en que fue realizado el muestreo, 0 a 4 días de edad (4)

### Parámetros Evaluados

*Signos clínicos.* A diario y posterior al desafío se realizó la observación clínica de todas las aves en busca de depresión, diarrea y mortalidad. Para la evaluación del grado de diarrea se asignó las calificaciones de 0 = ausencia, 1 = leve, 2 = moderado, y 3 = severo.

*Lesiones macroscópicas.* Se buscó edema y hemorragia en las bolsas de las aves necropsiadas. Así mismo, se evaluó la presencia de atrofia bursal a través del índice bursal (I.B.): Peso de la bursa (g) / Peso corporal del ave (g) x 1000. El I.B. obtenido se clasificó como bursa normal (1.5 - 3.5), atrofia bursal (0.5 - 1.5) y severa atrofia bursal (<0.5), según lo descrito por Giambrone (1987).

*Lesiones microscópicas.* A los 4, 7 y 10 días post desafío se realizó la necropsia a 15 aves desafiadas de cada grupo para la evaluación de lesiones macroscópicas en la Bursa de Fabricio; de estas, cinco bursas de cada grupo se fijaron en formalina al 10% por 24 h. Los tejidos fueron embebidos en parafina y los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina para la evaluación histopatológica. Por otro lado, el día 10 post desafío se realizó la necropsia y evaluación de la bursa a las aves no desafiadas de cada grupo. La evaluación histopatológica se realizó de acuerdo a una calificación de 0 al 5, según lo descrito por Bautista *et al.* (2003), donde:

- 0 : Sin lesión
- 1 : Leve necrosis folicular
- 2 : Moderada depleción linfoide folicular o severa depleción de algunos folículos
- 3 : Severa depleción linfoide en más del 50% de folículos
- 4 : Pérdida de arquitectura tisular del folículo con incremento de tejido conectivo, linfocitos escasos + quistes + hiperplasia epitelial
- 5 : Pérdida total de folículos y fibroplasia

*Evaluación serológica.* El nivel de anticuerpos maternos contra EIB se midió en las 18 muestras de sangre colectadas al primer día de edad, utilizando una prueba comercial con un kit de ELISA indirecto (IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, ME). Los resultados serológicos se expresaron como promedio geométrico (PGT) con su coeficiente de variación (CV). El PGT se empleó en el cálculo de la edad de vacunación mediante la fórmula Deventer. Además, se colectaron 10 muestras de sangre (vía punción alar) en cada grupo a los 7, 14, 21, 28, 35 días (antes del desafío), y luego a los 42 y 45 días ó 7 y 10 días post desafío, respectivamente, para la medición de los títulos de anticuerpos contra el virus de EIB utilizando el kit de ELISA anterior.

### **Análisis Estadístico**

Los títulos de anticuerpos se evaluaron mediante la prueba de análisis de varianza

(ANOVA) de una sola vía. En los grupos que se evidenció diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) se realizó la prueba de Duncan. Los índices bursales y calificación de lesiones microscópicas se evaluaron estadísticamente por la prueba de Kruskal Wallis. El análisis estadístico de variables se realizó utilizando el programa SPSS for Windows, v. 11.0.

## **RESULTADOS**

El lote de pollos utilizado en este estudio, presentó un adecuado nivel y uniformidad de títulos de anticuerpos al virus de la EIB al primer día de edad, con un PGT de 6534 y un CV de 20.8%. Estos valores se emplearon en la fórmula Deventer, para determinar la edad óptima de vacunación contra la EIB, que fue a los 21 días de edad.

Las aves desafiadas presentaron depresión y diarrea pero sin mortalidad en los días posteriores al desafío (PD) en los tres grupos. La proporción de aves con depresión varió entre 30 y 40% en el día 2 PD, y entre 15 a 20% en el día 4 PD. La diarrea se observó a partir del tercer día PD en un alto porcentaje (>70%) de las aves desafiadas, la que fue incrementándose durante los días posteriores, presentándose diarreas más severas en el grupo C (Cuadro 1).

El edema fue la principal lesión macroscópica observada en la bursa. Además, se observó la presencia de un trasudado amarillento gelatinoso que cubría la bursa. El 20% de las aves del grupo control presentó edema de la bursa a los 4 días PD, no así en los grupos vacunados. Sin embargo, a los 7 días PD, los signos de edema se observaron en el 60.0, 13.3 y 53.3% de las aves de los grupos A, B y C, respectivamente, y a los 10 días PD se incrementó considerablemente en las aves de los 3 grupos, afectando al 66.7, 92.9 y 86.7% de las aves en los grupos A, B y C, respectivamente. No se observó hemorragias a nivel de bursa en ninguna de las aves desafiadas.

Cuadro 1. Frecuencia (%) y severidad<sup>1</sup> de diarrea en pollos de carne desafiados con la cepa F52/70 a los 35 días de edad

Grupo <sup>2</sup>	3 días		4 días		5 días		7 días		10 días	
	%	Grado	%	Grado	%	Grado	%	Grado	%	Grado
A	73.3	1.2	84.4	1.4	83.3	1.3	93.3	1.8	73.3	1.1
B	82.2	1.4	88.9	1.5	83.3	1.4	80.0	1.1	92.9	1.8
C	88.9	1.7	97.8	1.7	86.7	1.7	100.0	2.1	93.3	1.5

<sup>1</sup> 0 = Sin diarrea, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = severo

<sup>2</sup> Grupo A: Vacunado a los 10 (Bursine 2) y 18 (Vi-Bursa CE) días de edad; Grupo B: vacunado a los 21 días (Nobilis Gumboro Broiler) aplicando la fórmula Deventer; Grupo C: sin vacunación

Cuadro 2. Índice bursal promedio en pollos de carne desafiados con la cepa F52/70 a los 35 días de edad

Grupo <sup>1</sup>	Días post desafío (edad en días)				Grupo sin desafiar
	0 (35)	4 (39)	7 (42)	10 (45)	45 días de edad
A	2.64	1.80	1.76	1.23	1.63
B	1.80	1.85	1.54	1.31	1.61
C	2.01	1.89	1.57	1.35	1.45

<sup>1</sup> Grupo A: Vacunado a los 10 (Bursine 2) y 18 (Vi-Bursa CE) días de edad; Grupo B: vacunado a los 21 días (Nobilis Gumboro Broiler) aplicando la fórmula Deventer; Grupo C: sin vacunación

Cuadro 3. Grados<sup>1</sup> de lesiones histopatológicas en la bursa de pollos de carne desafiados con la cepa F52/70 a los 35 días de edad

Grupo <sup>2</sup>	Días post desafío				Sin desafío <sup>3</sup>
	0	4	7	10	
A	1.8	3.0	4.0	3.4 <sup>ab</sup>	2.0
B	2.0	3.0	3.2	3.2 <sup>a</sup>	2.0
C	2.0	2.8	4.2	4.2 <sup>b</sup>	2.6

<sup>1</sup> 0: Sin lesión, 1: Leve necrosis folicular, 2: Moderada depleción linfoide folicular o severa depleción de algunos folículos, 3: Severa depleción linfoide en más del 50% de folículos, 4: Pérdida de arquitectura tisular del folículo con incremento de tejido conectivo. Linfocitos escasos + quistes + hiperplasia epitelial, 5: Pérdida total de folículos y fibroplasia (Bautista *et al.*, 2003)

<sup>2</sup> Grupo A: Vacunado a los 10 (Bursine 2) y 18 (Vi-Bursa CE) días de edad; Grupo B: vacunado a los 21 días (Nobilis Gumboro Broiler) aplicando la fórmula Deventer; Grupo C: sin vacunación

<sup>3</sup> A los 45 días de edad

<sup>a,b</sup> Superíndices con letras diferentes, dentro de columnas, indican promedios estadísticamente diferentes (p<0.05)

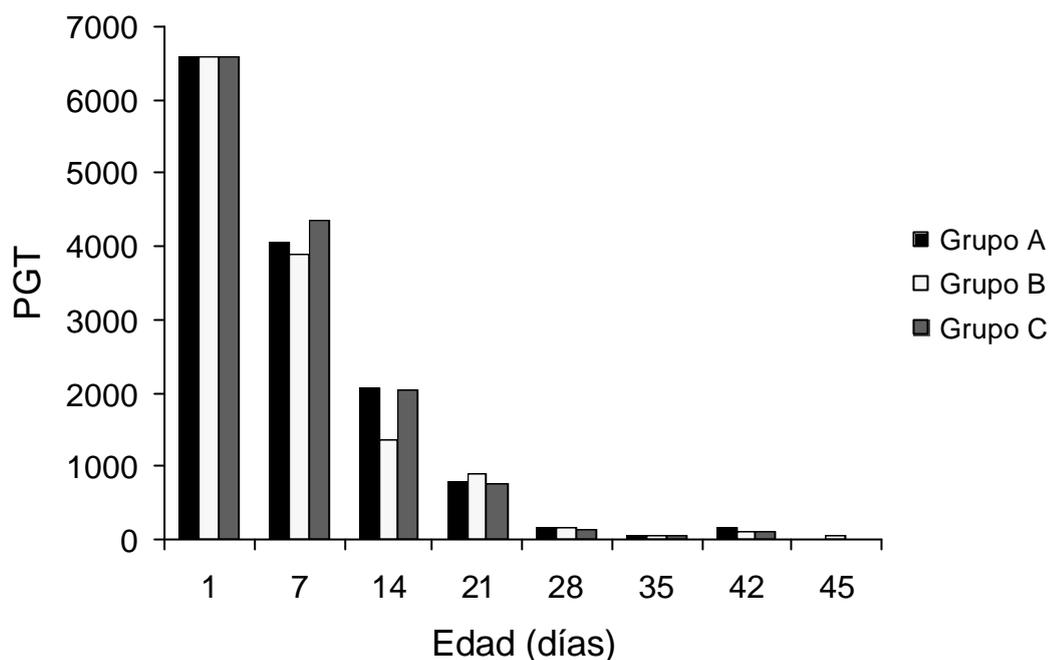


Figura 1. Títulos de anticuerpos (PGT) por ELISA en aves desafiadas con la cepa F52/70 a los 35 días de edad

El valor promedio del I.B. se mantuvo dentro de los rangos de bursa normal en los tres grupos hasta los 7 días PD, siendo el grupo B (vacunado con la Fórmula Deventer) el que presentó los I.B más bajos. Sin embargo, las aves de los tres grupos presentaron valores compatibles con atrofia bursal no severa a los 10 días PD (1.23, 1.31 y 1.35 para los grupos A, B y C, respectivamente), pero sin diferencia significativa entre grupos. El I.B. de las aves no desafiadas siempre se mantuvo dentro de los rangos normales debido a su estricto aislamiento.

Los aves presentaron lesiones microscópicas en la bursa no mayores al grado 2 previo al desafío; sin embargo, se evidenció en todos los grupos un incremento gradual en la severidad de las lesiones microscópicas entre el 4° al 10° día PD. La diferencia del grado de lesiones entre los grupos B y C en el día 7 PD fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ , Cuadro 3).

Al día de edad, el PGT de anticuerpos maternos contra la IBDV fue de 6534, con un coeficiente de variación (CV) de 20.8%. Posteriormente, el PGT descendió gradualmente hasta el final del experimento (45 días de edad) en los tres grupos, sin encontrar diferencia significativa entre grupos (Fig. 1).

## DISCUSIÓN

La vacunación contra la EIB en reproductoras y su progenie sigue siendo el método de prevención y control más usado en la avicultura. Sin embargo, las vacunas vivas aplicadas en aves jóvenes pueden ser neutralizadas por los anticuerpos maternos, siendo necesario estimar el momento en que los niveles de anticuerpos maternos serán lo suficientemente bajos para permitir una eficiente vacunación (de Witt, 2001). En este contexto, la fórmula Deventer es utilizada como una herramienta para determinar la

edad óptima de vacunación, es decir, antes de un posible desafío en condiciones de campo. En el presente estudio se determinó que el momento óptimo sería los 21 días de edad.

La depresión y diarrea fueron los signos clínicos observados después del desafío, especialmente en el grupo control. Porcentajes similares de signos clínicos fueron descritos en aves desafiadas con la cepa F 52/70 por Pérez *et al.* (2008), aunque inferiores a otros reportes que señalan la ocurrencia de diarreas acuosas y blanquecinas (Lukert y Saif, 2003). En el presente estudio, no se observó mortalidad después del desafío en ninguno de los grupos experimentales. La patogenicidad de las cepas de EIB es variable, algunas cepas ocasionan un proceso subclínico mientras que otras producen alta mortalidad (Yamaguchi *et al.*, 1996). La cepa de desafío utilizada en este experimento fue una cepa patógena; sin embargo, produjo enfermedad clínica sin mortalidad debido a que las aves utilizadas fueron de tipo comercial. Por otro lado, este estudio fue hecho bajo condiciones experimentales y en ausencia de factores de estrés adicionales como ocurre con los brotes de enfermedad clínica por exposición natural en campo. Existen resultados similares obtenidos con aves comerciales en condiciones experimentales (Ahmed *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2008).

Las lesiones macroscópicas observadas en bursa después del desafío evidenciaron el edema característico (Lasher y Shane, 1994; Lukert y Saif, 2003). Se encontró una mejor protección, en relación a edema bursal, en las aves del grupo A versus los grupos B y C. Es posible que, ante las condiciones de crianza experimental, los anticuerpos maternos permanecieran elevados hasta más allá de los 21 días de edad ocasionando neutralización del virus vacunal y menor protección en el grupo B. Ha sido señalado que se observa edema entre los 2 a 3 días post infección en brotes naturales de campo con el virus de EIB (Morales, 1993); sin embargo, en el presente estudio se observó edema hasta los 10 días PD, debido posiblemente a la

recirculación y pasaje viral entre las aves desafiadas. Los valores del I.B. y la ausencia de lesiones macroscópicas previas al desafío a los 35 días de edad evidenciaron el estado normal de las bursas en los tres grupos experimentales, en tanto que los valores de I.B. compatibles con atrofia bursal en todos los grupos a los 10 días PD fueron compatibles con otros reportes (Rautenschlein *et al.*, 2003).

La evaluación histopatológica de la bursas a los 35 días mostró lesiones de grado 2 equivalentes a moderada depleción en los tres grupos experimentales. Las lesiones observadas antes del desafío sugieren daño bursal temprano producido probablemente por replicación del virus vacunal en los grupos A y B (Gallardo, 1999; Toscano *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2008). Las lesiones en el grupo control podrían atribuirse a una diseminación mecánica del virus, debido a que en principio el virus de Gumboro es ubicuo y, además, esto ocurre con frecuencia en condiciones de crianza abierta. El incremento en el grado de lesiones en los tres grupos, llegando al máximo a los 10 días PD, especialmente en el grupo C (4.2), pero también en los grupos A (3.4) y B (3.2), evidencia un daño severo ocasionado por la replicación activa del virus de desafío en la bursa de las aves de todos los grupos, y que ningún programa de vacunación protege completamente a las bursas de este efecto (García-García *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2008).

Los niveles de anticuerpos maternos (TPG = 6535, CV=20.8%) en los tres grupos experimentales fueron elevados y mostraron además, una muy buena uniformidad en el lote. Los títulos de anticuerpos fueron declinando de manera gradual hasta el final del experimento (45 días de edad), por lo que se puede afirmar la ausencia de seroconversión en este periodo. En los grupos vacunados, la ausencia de seroconversión coincidió también con la aparición del mayor porcentaje de lesiones macroscópicas (edema en bursa) a los 45 días, lo que sugiere una replicación tardía del virus de desafío que

no dio tiempo para la formación de anticuerpos protectivos. Se conoce que la seroconversión se produce cuando finaliza la fase clínica de cualquier enfermedad de curso agudo y esto no ocurrió en el presente estudio.

Recientemente, estudios realizados por Rautenschlein *et al.* (2005) sugieren que la protección contra el virus de desafío puede estar mediada por una “bursectomía” viral inducida por el virus vacunal y que en pollos con presencia de anticuerpos maternos, la seroconversión al virus de la EIB puede retrasarse pero no suprimirse; así mismo, que la protección contra el virus de desafío se debe a la falta de células blanco (células B) ocasionada por el virus vacunal, impidiendo de esa forma la replicación del virus de desafío. Kim *et al.* (1999) demostraron que la replicación del virus de la EIB se acompaña de una infiltración de células T en los sitios de replicación viral. Posteriormente, determinaron que el virus induce la presencia de células T CD4+ y T CD8+ activas que son capaces de expresar citoquinas (Kim *et al.*, 2000). Estos estudios sugieren que existe una respuesta mediada por células T intrabursales que puede ser importante en los mecanismos de remoción viral y la recuperación de la infección a largo plazo, variables que no han sido medidas en este trabajo, pero que sugieren que este mecanismo estaría involucrado en la protección al desafío de las aves en ausencia de seroconversión.

En la evaluación de la protección de los programas de vacunación contra Gumboro no se debe tener en consideración solamente las lesiones patológicas o la evaluación serológica, sino que es indispensable usar principalmente el criterio de evaluación de parámetros productivos, porque en ellos se refleja notoriamente la ventaja de la vacunación. Por ello, teniendo en cuenta este criterio, en el presente estudio se obtuvo la mejor protección con el programa tradicional que con la vacunación aplicando la fórmula Deventer. Probablemente en crianzas bajo condiciones de campo, el método Deventer

sea más efectivo, por lo que sería recomendable una evaluación similar pero bajo condiciones de campo.

## CONCLUSIONES

- ? Ninguno de los grupos vacunados fue protegido del edema ni de la atrofia bursal inducidos por la cepa de desafío.
- ? El edema bursal observado hasta los 10 días post desafío evidencia una replicación tardía del virus que no permitió detectar seroconversión en ninguno de los grupos.
- ? Los grupos vacunados mostraron un mejor comportamiento productivo que el grupo no vacunado.
- ? La mejor protección ocurrió en el grupo vacunado con el programa tradicional en comparación al grupo vacunado aplicando la fórmula Deventer, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

## LITERATURA CITADA

1. **Ahmed Z, Inayat S, Naeem K, Malik S. 2003.** Comparative immune response pattern of commercial infectious bursal disease vaccines against field isolates in Pakistan. *Int J Poultry Sci* 2(6): 449-453.
2. **Bautista D, Elankumaran S, Heckert R. 2003.** Effect of a variant infectious bursal disease virus (e/del) on *Salmonella typhimurium* infection in commercial broiler chickens. *Avian Dis* 48: 361-369.
3. **de Witt JJ. 2001.** Gumboro Disease: estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula. 3<sup>rd</sup> Meeting of Cost Action 839. Pulawy, Poland.
4. **Gallardo W. 1999.** Evaluación serológica e histopatológica de pollos broilers vacunados contra la enfermedad

- de Gumboro a los doce días de edad. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 63 p.
5. **García-García J, Gay M, Suárez A, Escamilla J, Aranda M, Soto E, Sarfati D, Morales A, Lozano B. 2002.** Caracterización de un aislamiento mexicano de un virus de Gumboro. En: XXVII Convención Anual. Puerto Vallarta, México: Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas.
  6. **Genova K. 2000.** Influence of infectious bursal disease virus strains on the avian immune system. *Exp Pathol Parasitol* 4: 27-29.
  7. **Giambrone J. 1987.** Evaluación y relaciones morfométricas en la enfermedad infecciosa de la bursa como método de diagnóstico. Georgia, USA: The American of Avian Pathology. p 24-38.
  8. **Intervet. 2004.** Enfermedad de Gumboro. [Internet] Disponible en: <http://www.enfermedad-gumboro.com>
  9. **Kim IJ, Gagic M, Sharma J. 1999.** Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 43: 401-413.
  10. **Kim IJ, You S, Kim H, Yeh H, Sharma J. 2000.** Characteristics of bursal T lymphocytes induced by infectious bursal disease virus. *J Virol* 74: 8884-8892.
  11. **Kulíková L, Jurajda V, Juranová R. 2004.** Effects of infectious bursal disease vaccination strains on the immune system of Leghorn chicks. *Acta Vet Br* 73: 205-209.
  12. **Lasher HN, Shane SM. 1994.** Infectious bursal disease. *World Poultry Sci J* 50(2): 133-158.
  13. **Lukert PD, Saif VM. 2003.** Infectious bursal disease. In: Saif VM (ed). *Diseases of poultry*. 11<sup>th</sup> ed. USA: Iowa State Press. p 161-179.
  14. **Morales O. 1993.** La enfermedad de Gumboro. *Mundo Avícola* 2(8): 21-24.
  15. **Pérez C, Alba M, Icochea E. 2008.** Evaluación de dos programas de vacunación con la cepa 2512 de la enfermedad de Gumboro frente a la infección experimental con la cepa F52/70. *Rev Inv Vet, Perú* 19:54-61.
  16. **Phong S, Hair-Bejo M, Omar A, Aini I. 2003.** Sequence analysis of Malasian infectious bursal disease virus isolated and use of reverse transcriptase nested polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay for detection of VP2 hypervariable region. *Avian Dis* 47: 154-162.
  17. **Rautenschlein S, Yeh H, Sharma J. 2003.** Comparative immunopathogenesis of mild, intermediate, and virulent strains of classic infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 47: 66-78.
  18. **Rautenschlein S, Kraemer Ch, Vanmarcke J, Montiel E. 2005.** Protective efficacy of intermediate and intermediate plus infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines against very virulent IBDV in commercial broilers. *Avian Dis* 49: 231-237.
  19. **Saif Y. 2003.** Vacunas y vacunación contra la enfermedad de Gumboro. *Mundo Avícola y Porcino* 43: 7-8.
  20. **Toscano A, Jiménez A, Rodríguez E, Gómez y Chapa J. 2002.** Determinación del daño a la bolsa de Fabricio causada por la aplicación de vacunas a virus vivo con cepas intermedias, así como la protección al desafío. En: XVII Convención Anual Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Puerto Vallarta, México.
  21. **Villegas P, Banda A. 2001.** Control de la enfermedad infecciosa de la bolsa y de la anemia infecciosa aviar. En: XVII Congreso Latinoamericano de Avicultura. Guatemala.
  22. **Yamaguchi T, Kondo T, Inoshima Y, Ogawa M, Miyoshi M, Yanai T, Masegi T, Fukushi H, Hirai K. 1996.** *In vitro* attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus: Some characteristics of attenuated strains. *Avian Dis* 40: 501-509.