

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

**Utilización de algunas herramientas prácticas en la monitorización de la
Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio, en la empresa Agroindustrial
Proave S.A.**

Modalidad: Proyecto de Graduación

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico
de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Juan Alberto Ledezma Gutiérrez.

Campus Presbítero Benjamín Nuñez

2007

TRIBUNAL EXAMINADOR

Dr. Jorge Quirós Arce

Decano: _____

Dr. Carlos Jiménez Sánchez

Director: _____

Dra. Marcia Ramírez Marín

Tutora: _____

Dra. Alejandra Camacho Cordero

Lectora: _____

Dedicatoria

Primeramente a Dios por regalarme el don de la vida y por la dicha de unos padres tan maravillosos, así como la oportunidad de realizar mi sueño de ser médico veterinario.

A mis padres por ser un ejemplo en mi vida, por su apoyo incondicional y su ayuda para poder realizarme profesionalmente.

Agradecimientos

A mis padres, familiares y amigos por su apoyo durante estos años de estudio.

A la Dra Marcia Ramírez por su colaboración y dedicación en la dirección de este trabajo.

A todo el personal de la empresa Agroindustrial Proave por su disposición para poder llevar a cabo el estudio, al igual que a la empresa Fort Dodge y a su representante en Costa Rica Vetim S.A., en especial al Dr. Arturo Iglesias, la Dra Alejandra Camacho y al señor Luis Lara por haber creído en el proyecto y hacerlo una realidad.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

TRIBUNAL EXAMINADOR	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1.INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes.....	1
Justificación.....	3
1.2.1. Importancia.....	3
2.OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo general.....	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
3. METODOLOGÍA	6
3.1 Materiales y métodos	6
3.1.1 Evaluación de la inmunidad materna para Gumboro, transferida a la progenie.....	6
3.1.2 Obtención del índice morfométrico bursal, el índice PBF:PB y el diámetro de la bolsa de Fabricio.....	7
3.1.2.1 Diagnóstico por imágenes y PCR de las granjas seleccionadas de acuerdo a rendimientos zootécnicos históricos de la empresa.....	8
3.1.3 Grado de correlación entre la diferentes viariables, peso de la bolsa de Fabricio , peso del bazo, peso corporal, diámetro de la bolsa de Fabricio.....	9
4.RESULTADOS	10
4.1 Evaluación de la inmunidad materna para Gumboro, transferida a la progenie.....	10
4.2 Índice morfométrico bursal, índice PBF:PB y diámetro de la bolsa de Fabricio.....	11
5. CONCLUSIONES	16
6. RECOMENDACIONES	18

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
8. ANEXOS.....	23

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Programa de vacunación de la enfermedad de Gumboro para reproductoras pesadas de la empresa Avícola.....	7
Cuadro 2.	Inmunidad materna transferida a la progenie de tres lotes reproductores a las 35, 45, 53 semanas de edad.....	10
Cuadro 3.	Índice morfométrico bursal, relación PBF:PB y el diámetro de la bolsa Fabricio a los 14, 21, 28, 35 días en tres granjas de pollo de engorde.....	11
Cuadro 4.	Correlación del índice morfométrico bursal, el índice PBF:PB, diámetro de la bolsa de Fabricio en las granjas A, B, C de pollo de engorde.....	12
Cuadro 5.	Recuento y determinación del porcentaje de linfocitos mediante la técnica de procesamiento de imágenes de las bolsas de Fabricio, a los 14, 21, 28 y 35 días de edad.....	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación entre la tendencia de la integridad de la bolsa de Fabricio en la industria versus los resultados obtenidos en el presente estudio.....	14
---	-----------

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Control de peso del ave, peso de la bolsa de Fabricio y peso del bazo a los 14, 21, 28, 35 días de edad.....	23
---	-----------

RESUMEN

Con el objetivo de establecer un programa integral para la vigilancia en campo de la enfermedad de la Infección de la Bolsa de Fabricio, a partir de la inmunidad materna, transferida a la progenie, se evaluaron serológicamente tres lotes reproductores (P10B, P9B y P8) a las 35, 45 y 53 semanas de edad y sus respectivas progenies (20 pollitos) a los 3, 6, 9 y 12 días de edad, utilizando la técnica de ELISA con el ensayo comercial de IDEXX[®].

Los títulos de anticuerpos en dos lotes reproductores se encontraron dentro de lo esperado, de acuerdo al programa de vacunación y a la edad de las aves, mientras que el tercer lote presentó un título inferior a lo esperado. Los resultados serológicos de la progenie al tercer día de edad, muestran un título medio entre 3045 y 2746 con coeficientes de variación entre 30.6 a 38.3, los cuales descienden a la mitad cada tres días, por lo que al día nueve, las aves presentaron valores inferiores a 1000. El porcentaje de transferencia de anticuerpos fue superior al 50% para los lotes de 45 y 53 semanas, mientras que el valor en la progenie del lote P 10 B, con un título medio de 3045, se considera un título de inmunidad pasiva aceptable tomando en consideración la edad del lote progenitor (35 semanas).

En la obtención del índice morfométrico bursal, el índice peso de la bolsa de Fabricio: peso del bazo (PBF:PB) y el diámetro de la bolsa de Fabricio, se seleccionaron en forma aleatoria cinco pollos a los 14, 21, 28 y 35 días de edad, procedentes de tres granjas de engorde, y se determinó que para los índices peso de la bolsa de Fabricio: peso corporal (PBF:PC) y PBF:PB a los 14 y 21 días, la relación se mantiene en un promedio de 2, mientras que a los 28 días la relación es de 1 y a los 35 días esta relación se pierde. No se evidenció una variación con respecto al diámetro de la bolsa de Fabricio y su equivalencia en centímetros, cuyo promedio fue 1,3 cm.

En la técnica de procesamiento de imágenes se mantiene una integridad de las bolsas de Fabricio en las tres granjas hasta los 21 días, lo cual concuerda con los resultados zootécnicos de las parvadas estudiadas.

Por último mediante la prueba de Pearson se obtuvo el grado de correlación entre las diferentes variables peso corporal, peso de la bolsa de Fabricio, diámetro de la bolsa de Fabricio, peso del bazo (PC, PBF, DIAM, PB) y se determinó que solo existe un alto grado de correlación entre las variables PBF: DIAM en las granjas A y C, así como también en la correlación PC: PB debido a que la cantidad de datos no fue la suficiente.

ABSTRACT

With the objective of establishing an integral program for the monitoring in field, of the Infection bursal disease, from the maternal immunity, transferred to the lineage, three reproductive lots (P10B, P9B and P8) to 35 were evaluated serology, 45 and 53 weeks of age and their respective lineages (20 chicks) to the 3, 6, 9 and 12 days of age, using the technique of ELISA with the commercial test of IDEXX®.

The titles of antibodies in two reproductive lots were within the awaited thing, according to the program of vaccination and at the age of the birds, whereas the third lot presented an inferior title to the awaited thing. The serology results of the lineage to the third day of age, shows an average title between 3045 and 2746 with coefficient of variation between 30,6 to 38,3, which descend to half every three days, for this reason , to day nine, the birds presented displayed inferior values to 1000. The percentage of transference of antibodies was superior to 50% for the lots of 45 and 53 weeks, while the obtained value for the lineage of lot P 10 B, with a medium title of 3045 is considered as an acceptable immunity title for the age of the progenitors (35 weeks).

In the obtaining of the bursal morfometric index, the index weight of the bursa of Fabricius: weight of spleen (PBF: PB) and the diameter bursa of Fabricius, selected in random form five chickens to the 14, 21, 28 and 35 days of age, coming from three farms of fattening, determined that for the indices weight bursa of Fabricius: corporal weight (PBF: PC) and PBF: PB to the 14 and 21 days, the relation stays in an average of 2, whereas to the 28 days the relation is of 1 and to the 35 days this relation is lost. A variation with respect to the diameter bursal of Fabricius and its equivalence in centimeters was not demonstrated , the average was 1.3 cm.

In the technique of image processing an integrity of bursa to keep in the three farms until the 21 days, which agrees with the performs of the studied poultry ones.

Finally, by the test of Pearson, it was obtained the degree of correlation between the different variables: corporal weight weight bursal of Fabricius, diameter bursal of Fabricius, weight of spleen (PC, PBF, DIAM, PB) and it has been determined that single a high degree of correlation between variables PBF: DIAM in the farms A and C, thus like also in correlation PC: PB because the amount of data was not sufficient .

Uan 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes:

La enfermedad Infecciosa de la bolsa de Fabricio (IBF) también conocida como enfermedad de Gumboro, fue descubierta en el año de 1957 en una granja en Gumboro, Delaware, Estados Unidos y el primer reporte de la enfermedad fue hecho por Cosgrove en 1962 (Mc Carty & Takeshita, 1998).

La enfermedad es causada por un virus perteneciente a la familia Birnabiridae (Lukert & Saif, 1991; Mc Ferran, 1993; Ríos, 2004). Dentro de las especies susceptibles al virus de la infección de la bolsa de Fabricio (IBDV) están las gallinas, pavos y patos (Beltrán, 1981; Luket & Saif, 1991).

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

Dentro de los signos clínicos se citan: depresión, anorexia, plumas erizadas, diarrea acuosa de color blanco, postración y temblores musculares (Mc Ferran, 1993; Banda et al., 2003).

La enfermedad de Gumboro presenta efectos perjudiciales en las parvadas tales como retraso en el crecimiento, pobres respuestas inmunológicas a vacunaciones, en especial de Marek y Bronquitis Infecciosa y la susceptibilidad incrementada a otros agentes infecciosos como al *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma gallisepticum* y *Salmonella* spp. (Philipp, 1998; Jackwood, 1999).

Hoy en día se conocen dos serotipos designados como 1 y 2. El serotipo 1 existe en la mayoría de lugares del mundo y dentro de este grupo se encuentran los virus clásicos, los cuales pueden llegar a causar hasta un 50% de mortalidad y los virus variantes, los cuales causan altos porcentajes de morbilidad. Las cepas variantes son antigénicamente diferentes de las cepas clásicas, debido a cambios en la tripleta de nucleótidos de la secuencia de aminoácidos, lo cual podría ser una razón por la que las vacunas clásicas no protegen contra cepas variantes (Paneque et al., 1999a). En contraste, los virus del serotipo 2 causan una disminución de los precursores de los linfocitos B en la bolsa de Fabricio (Saif, 1999; Baxendale, 2001).

En el diagnóstico de la enfermedad ha sido de gran utilidad el análisis histopatológico, al igual que los signos clínicos, el aislamiento del virus a partir de la bolsa de Fabricio o del bazo y por último, la detección de anticuerpos por neutralización o por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (McFerran, 1993; Sayd, 1999; Baxendale, 2001; Ríos, 2004).

En gallinas, pavos y patos se han realizado aislamientos del virus principalmente a partir de la bolsa de Fabricio y de otros tejidos como el bazo, el timo, la glándula de Harder, el hígado, los pulmones, riñones y las tonsilas cecales. Se han utilizado diferentes métodos como la neutralización cruzada, anticuerpos monoclonales, el análisis molecular, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación, para comparar aislamientos de campo y vacunales del IBDV. La mayoría de los métodos están encaminados a establecer el serotipo del virus (Grieve & Stewart-Brown, 1990; Stewart-Brown, 1997; Banda & Villegas, 2004).

La bioseguridad es una medida importante para la prevención de la enfermedad, sin embargo, debido a la alta resistencia del virus a condiciones adversas, se utiliza principalmente la vacunación como medida de control de la enfermedad (Sayd, 1999; Saif, 1999; Al-Natour et al., 2004).

El IBDV es muy resistente y puede permanecer en las galeras después de aplicar las medidas de limpieza y desinfección, por un período de cincuenta y cuatro a ciento veintidós días en presencia de material orgánico (Lukert & Hitchner, 1984), por lo que se hace indispensable la aplicación de un programa de vacunación en las siguientes parvadas para minimizar la posibilidad de que se presente la enfermedad (Philipp, 1998; Paneque et al., 1999b). El programa de vacunación en los lotes reproductores debe adecuarse a las necesidades de cada país e incluso a los de cada compañía, y en sus progenies los programas vacunales se establecen con base en la inmunidad materna transmitida, según la edad de los lotes reproductores (Philipp, 1998; Ramírez, 2005). La tendencia actual es elevar al máximo los niveles de anticuerpos circulantes en las reproductoras, con el fin de estimular la inmunidad pasiva de la progenie y reducir las vacunaciones en la descendencia (Ríos, 2004; Saif, 2006). Sin embargo, a nivel mundial, los diferentes programas vacunales no han logrado detener los continuos brotes de esta enfermedad, ya sea por la interferencia del virus vacunal con los anticuerpos maternos, o por la dificultad de determinar la edad apropiada para realizar la vacunación, y la correcta elección de la vacuna (Paneque et al., 1999b). Un ejemplo claro de lo mencionado anteriormente, se presentó en el sureste de Europa desde mediados y hasta finales de la década de los noventas, en donde datos epidemiológicos han demostrado que tanto las aves vacunadas como las no vacunadas,

presentaron la enfermedad de Gumboro con mortalidades de hasta un 50%, independientemente del programa de vacunación de las parvadas progenitoras (Zorman-Rojs et al., 2003).

Recientemente se han acumulado evidencias de la presencia de virus del IBDV de alta virulencia en diversas partes de América Latina. Un estudio realizado con las cepas provenientes de Brasil y República Dominicana, demostró los cambios genéticos que se asociaron a los programas vacunales practicados en esas áreas geográficas, mientras que los virus provenientes de Venezuela, se relacionaron más con los aislamientos virales europeos (Banda & Villegas, 2004).

Durante el año de 1992 en nuestro país y utilizando la técnica de anticuerpos monoclonales, se realizó un estudio para conocer la presencia de variantes antigénicas del virus de la infección de la bolsa de Fabricio. De 435 bolsas de Fabricio analizadas, 85 muestras (19.54%) resultaron positivas al virus, identificándose la variante Delaware en 77 muestras (17.70%) de seis empresas, mientras que las cepas clásicas fueron detectadas en seis muestras (1.60%) de dos empresas (Jiménez, 2005).

1.2 Justificación:

1.2.1 Importancia:

La empresa Agroindustrial Proave S.A. es una compañía que inicia sus actividades avícolas en nuestro país en el año 2000, estableciendo el programa de vacunaciones contra la enfermedad de Gumboro, sin conocer el estado inmunológico de las reproductoras y su progenie.

En los últimos tres años esta empresa ha incrementado rápidamente su producción, por lo que se ha visto en la necesidad de producir en granjas donde ya otras compañías del sector avícola habían trabajado, lo cual representa un problema sanitario debido al riesgo de contagio con el virus de la enfermedad de Gumboro, ya que el mismo puede permanecer por largo tiempo en las galeras, incluso después de haberse realizado el proceso de lavado y desinfección (Lukert & Hitchner, 1984).

El crecimiento productivo de los últimos años ha llevado a la empresa a evaluar su programa profiláctico y a introducir un plan de vigilancia para la enfermedad de la bolsa de Fabricio, donde se incluya la serología de los lotes reproductores y la de sus progenies al día de edad, además de la evaluación macroscópica de la bolsa de Fabricio y del bazo, al menos durante las primeras cuatro semanas de vida, para establecer una relación entre el peso de la bolsa de Fabricio con el peso corporal de las aves (PBF: PC). A esta relación se le conoce también como el índice morfométrico bursal (Grieve, 1991; Román, 1994). El valor porcentual obtenido de esta relación puede ser utilizado como un indicador del estado inmunológico del lote, como la relación que existe entre el peso de la bolsa de Fabricio y el peso del bazo (PBF: PB) (Ulloa et al., 1999). Otra forma aún más práctica de evaluar el tamaño de la bolsa, es midiendo el diámetro de la misma (Ulloa et al., 1999). En condiciones comerciales de producción, se utiliza con mayor frecuencia la medida del diámetro de la bolsa, ya que existe un alto grado de asociación entre el peso de la bolsa y el diámetro de la misma (Ulloa et al., 1999) y solo se requiere de un bursómetro (Ramírez, 2005). El bursómetro es una regla de plástico con ocho perforaciones de diferentes diámetros (Muñoz. R, 1998).

El programa de seguimiento a la bolsa de Fabricio y del bazo es una herramienta sencilla, económica y confiable para el análisis de los programas de vacunación, el rendimiento de las vacunas utilizadas e incluso, la detección de un desafío viral en campo (Saif, 2006).

Además de este programa de seguimiento a las bolsas, se pueden realizar los exámenes histopatológicos, clasificando las lesiones en la bolsa del 0 al 4, siendo 0 la ausencia de lesiones histológicas y el grado 4 la depleción intensa y necrosis de la región medular de los folículos

linfoides. Actualmente se puede realizar una correlación entre la clasificación histopatológica y el diámetro de la misma (Muñoz. R, 1998).

Finalmente la ejecución de manera continua de este programa, permitirá desarrollar un banco de datos de gran importancia para la empresa, que les permitirá a corto plazo, la toma correcta de decisiones y la elaboración de programas profilácticos de acuerdo sus necesidades (Lechuga, ca. 2000).

2. OBJETIVOS:

2.1 Objetivo General:

Establecer un programa integral para la vigilancia en campo de la enfermedad de Gumboro, a partir de la inmunidad materna transferida a la progenie.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Conocer la relación porcentual entre la inmunidad serológica mediante la técnica de ELISA de al menos tres lotes reproductores y los niveles de anticuerpos transferidos a la progenie para la enfermedad de Gumboro.
- 2.2.2 Establecer un programa de vigilancia en campo para la enfermedad de Gumboro, utilizando el índice morfométrico bursal, la relación PBF: PB y el diámetro de la bolsa de Fabricio.
- 2.2.3 Determinar la correlación entre los diferentes parámetros como el peso de la bolsa de Fabricio, peso del bazo, peso corporal, diámetro de la bolsa de Fabricio, a los 14, 21, 28 y 35 días de edad.

3. METODOLOGÍA

3.1 Métodos y Materiales

El presente trabajo fue realizado en la empresa Agroindustrial Proave S.A., ubicada en Ciruelas de Alajuela, la cual está dedicada a la producción de pollo de engorde. La compañía cuenta con varias granjas distribuidas en las zonas de Orotina, Esparza, Poás, San Ramón, Atenas, Naranjo, Grecia y Turrúcares, donde el 100% de las granjas son de productores integrados.

3.1.1 Evaluación de la inmunidad materna para Gumboro, transferida a la progenie.

La empresa seleccionó tres lotes reproductores entre las edades de 30 a 40, de 41 a 50 y de 51 a 60 semanas, con el fin de abarcar las tres etapas productivas en la vida de un lote reproductor (Ramírez, 2005). De cada uno de estos lotes fueron sangradas 20 aves seleccionadas en forma aleatoria (Idexx 2004).

La toma de la muestra de sangre se realizó por medio de la punción de la vena braquial, inmovilizando ambas alas del ave con la mano izquierda y con la derecha se efectuó la extracción de sangre, utilizando una jeringa de 3 centímetros cúbicos con una aguja de 22 x 1.5 milímetros de grosor. La extracción de 0.5 ml de sangre de la vena braquial, se realizó en forma suave permitiendo el funcionamiento fisiológico de la vena (Ramírez, 2005). El contenido fue depositado en tubos Eppendorf y las muestras identificadas con el número correspondiente y transportadas en una hielera al Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria, en donde se almacenaron a 4 grados celsius hasta que se realizó la técnica de ELISA; IBD de la casa comercial IDEXX.

Para establecer una relación porcentual entre la inmunidad serológica del lote reproductor y la inmunidad transferida a la progenie para cada una de las etapas productivas citadas, fueron seleccionados e identificados 40 huevos fértiles producidos el mismo día en que se sangró el lote reproductor, para su envío a la planta de incubación. Tres semanas después de la toma de las muestras, los pollitos correspondientes fueron transportados a las granjas de engorde seleccionadas, ubicándolos en una determinada sección, por cada lote reproductor en estudio. Estos pollitos fueron sangrados a partir del día tres, seis, nueve y doce de edad (Ramírez, 2005). Las muestras de sangre se depositaron en tubos Eppendorff y se transportaron en una hielera al laboratorio de la empresa Chaso del Valle, en donde se realizó posteriormente la prueba de IBD de ELISA.

El programa de vacunación contra el IBVD de las reproductoras se presenta en el Cuadro 1. Los pollos de engorde recibieron una sola vacuna anti IBVD, la cual se administró en aerosol a los 10 días de edad (Bursine 2[®], Laboratorio FORT DODGE, USA).

Cuadro 1. Programa de vacunación levante de la enfermedad de Gumboro para reproductoras pesadas de la empresa Avícola.

Vacuna	Edad días	Edad semanas	Vía de administración	Marca
Gumboro	21	3	Agua	Bursine 2, Fort Dodge
Gumboro	42	6	Spray	Univac Plus, Fort Dodge
Triple	84	12	Intramuscular	Breedervac III plus, Intervet
Triple	126	18	Intramuscular	Breedervac III plus, Intervet

Breedervac III plus . Contiene cepas IBVD "Standard" y variantes Delaware A & E y GLS-5.

3.1.2 Obtención del índice morfométrico bursal, el índice PBF: PB y el diámetro de la bolsa de Fabricio.

La empresa seleccionó tres granjas de pollos de engorde que históricamente habían presentado resultados zootécnicos aceptables, según los propios parámetros productivos de la compañía y de cada una de las granjas seleccionadas se tomaron cinco aves en forma aleatoria a los 14, 21, 28, y 35 días de edad. A cada ave se le determinó su peso corporal (PC) utilizando una báscula granataria de la casa comercial Fisher Scientific, la cual tiene un rango de 0.5 a 200 gramos (Román, 1994; Grieve & Stewart-Brown, 1994; Ulloa et al., 1999). Posteriormente se procedió al sacrificio del ave para extraer la bolsa de Fabricio y el bazo. Los órganos, en forma individual, fueron pesados (PBF y PB) en la báscula granataria y se procedió a obtener el diámetro de la bolsa de Fabricio utilizando el bursómetro de Fort Dodge. Los datos obtenidos se anotaron en una ficha (Anexo 1).

Por último, las bolsas de Fabricio se dividieron a la mitad, una parte se congeló y la otra se fijó en una solución de formalina bufferada al 12%. Las muestras fueron remitidas al laboratorio de la compañía Fort Dodge en Ohio, Estados Unidos, para el estudio correspondiente de proceso de imágenes y PCR (Grieve & Stewart-Brown, 1994; Ulloa et al., 1999; Banda & Villegas, 2004).

Para la obtención del índice morfométrico bursal y la relación PBF: PB, se consideró las fórmulas descritas por Grieve (1991):

$$\text{PBF: PC} = \frac{\text{Peso de la bolsa de Fabricio (gramos)} \times 1000}{\text{Peso corporal del ave (gramos)}}$$

$$\text{PBF: PB} = \frac{\text{Peso de la bolsa de Fabricio (gramos)}}{\text{Peso del bazo (gramos)}}$$

3.1.2.1 Diagnóstico por imágenes y PCR de las granjas seleccionadas de acuerdo a rendimientos zootécnicos históricos de la empresa.

El análisis mediante procesamiento de imágenes (IPA, por sus siglas en inglés), es una tecnología desarrollada por Fort Dodge Animal Health (Overland Park, Kansas), que permite el recuento y la determinación del porcentaje de linfocitos presentes en la bolsa de Fabricio. A partir de un corte histológico de la bolsa, las imágenes son captadas por una cámara óptica acoplada a un microscopio y digitalizadas por medio de un programa específico de cómputo (e-Bursa®). El conteo de los linfocitos es una información de gran valor que permite cuantificar la acción tanto de un virus vacunal como de campo sobre la bolsa de Fabricio (Muñoz. R, 1998).

La técnica de PCR consiste en amplificar una secuencia de 743 pares de bases en la región hipervariable de la proteína viral 2 (VP2), luego enzimas de restricción específicas “buscan” secuencias específicas de nucleótidos y cortan el ADN (Jackwood, 2006).

Además se incluyeron los resultados zootécnicos obtenidos en las tres granjas del estudio para poder establecer una relación entre los resultados de laboratorio y los rendimientos productivos de las parvadas. Los resultados productivos al final del ciclo se utilizaron como una herramienta más a la hora de la interpretación de los resultados de laboratorio. Estos rendimientos fueron evaluados a través del Índice Productivo de Eficiencia (IPE) el cual se obtiene de la siguiente fórmula:

$$(100 * \% \text{ de mortalidad} * 100) * 100 * \text{peso promedio/edad/conversión}$$

3.1.3 Por último se obtuvo el grado de correlación entre las diferentes variables; peso de la bolsa de Fabricio, peso del bazo, peso corporal, diámetro de la bolsa de Fabricio, a través de la prueba de Pearson, por medio de la siguiente fórmula según Milton (2001):

$$p = \frac{\text{Cov}(X,Y)}{\sqrt{(\text{Var X})(\text{Var Y})}}$$

Cov X y Y = Covarianza de X, Y

$\sqrt{(\text{Var X}) (\text{Var Y})}$ = Raíz cuadrada de varianza de X por varianza de Y.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de la inmunidad materna para Gumboro, transferida a la progenie.

En el Cuadro 2 se presenta los resultados serológicos de los lotes reproductores seleccionados, abarcando las tres etapas productivas en la vida de un lote y sus respectivas progenies.

Cuadro 2. Inmunidad materna transferida a la progenie de tres lotes reproductores a las 35, 45 y 53 semanas de edad.

REPRODUCTORAS							PROGENIE						
Lote	Raza	Edad Sm	GMT	CV	Valor Máx	Valor Mín	Edad Días	GMT	CV	Valor Máx	Valor Mín.	Grupo ELISA	Porcentaje transferencia
P10 B	Cobb	35	2738	35	5087	1341	3	3045	30.6	5362	1618	3 y 4	111
							6	1656	49	3808	273	3	
							9	972	57	2678	366	1	
							12	422	62.9	1469	120	1	
P9B	Avian	45	4685	23.6	7215	2718	3	2754	38.3	5835	1126	3	58.78
							6	1356	60.2	3975	91	2	
							9	782	44.4	1848	298	1	
							12	574	69.7	1909	120	1	
P8	Cobb	53	3563	46	9238	581	3	2746	31.2	5443	1473	3	77.06
							6	1388	43.1	2927	425	2	
							9	826	54.5	2018	103	1	
							12	400	78.8	1862	89	0	

Con respecto a los lotes reproductores, el título medio geométrico (GMT) y el coeficiente de variación (CV) que se obtuvieron en los lotes P 9B y P 8, se encuentran dentro de lo esperado de acuerdo al programa de vacunación y a la edad de las aves. Sin embargo, el lote P10 B de 35 semanas presentó una GMT inferior a lo esperado, si se considera que a las 35 semanas de edad, la respuesta inmune inducida por las vacunas oleosas debe de estar en valores superiores a 4000 (Pérez et al., 1998). Este resultado puede interpretarse como un error de muestreo. El incremento en el CV del lote P 8 de 53 semanas está relacionado con la edad de las aves (Thayer, 1990).

Los resultados serológicos de la progenie muestran que el GMT de anticuerpos maternos al tercer día están dentro del perfil de grupo 3 y descienden al grupo 1 al día 9 (menos de 1000) en las progenies de los tres lotes reproductores, lo cual concuerda con el estudio realizado por Al-Natour et al. (2004). Según Villegas (1990), los perfiles de grupo superiores a 3 en la enfermedad de Gumboro, son títulos de anticuerpos indicativos de protección y en el presente estudio los anticuerpos protectores desaparecen a partir del día 6 de edad. Además, si se correlaciona el GMT de la inmunidad materna con el título de virus neutralización (VN), éste

correspondería a 1:20, o sea, los pollitos son susceptibles a la infección del IBVD ya que en estudios realizados por Lukert & Saif (2003), demostraron que una vez que los títulos caen por debajo de 1:100 mediante la técnica de neutralización viral, los pollitos son 100% susceptibles a la infección y los títulos de 1:100 a 1:600 dan una protección de alrededor de un 40%.

También se observa que los valores del GMT van disminuyendo aproximadamente a la mitad cada tres días, sin embargo los CV a partir del día 6 superan el 40%, lo cual no concuerda con lo reportado por Thayer (1990), en donde los coeficientes a esperar no deben de superar el 35%.

El porcentaje de transferencia de anticuerpos fue superior al 50% para los lotes de 45 y 53 semanas, lo cual se encuentra dentro de lo esperado (Pérez et al., 1998). El valor obtenido en la progenie del lote P 10 B, con un título medio obtenido de 3045 se considera como un título de inmunidad pasiva aceptable tomando en consideración la edad del lote (35 semanas).

4.2 Índice morfométrico bursal, índice PBF: PB y diámetro de la bolsa de Fabricio.

En el Cuadro 3 se presentan los resultados obtenidos en el estudio del índice morfométrico bursal, la relación PBF: PB y el diámetro de la bolsa de Fabricio a diferentes edades en tres granjas de engorde.

Cuadro 3. Índice morfométrico bursal, relación PBF: PB y el diámetro de la bolsa de Fabricio a los 14, 21, 28, 35 días en tres granjas de pollo de engorde.

Edad	PBF: PC	DIAMETRO	Cm	PBF:BAZO
14 días	2,11	4,60	1,18	2,16
21 días	2,02	5,27	1,29	2,40
28 días	1,73	5,4	1,64	1,32
35 días	0,67	4,27	1,36	0,52

En este estudio se determinó que el PBF a los 14 y 21 días no presenta un peso proporcional al desarrollo corporal del ave, mientras que a los 28 días si existe una relación entre el PBF con el PC del ave. A los 35 días, esta relación se pierde al existir una regresión natural de la bolsa (Huapaya, 1994; Ulloa, 1999), además de ser el momento en el cual la línea genética Cobb, acelera el desarrollo corporal (Cobb, Guía de Manejo de Pollo de Engorde, 2005).

Con relación al PBF: PB, los resultados indican que a los 14 y 21 días, que la bolsa de Fabricio posee el doble del tamaño con respecto al bazo, y a los 28 días el tamaño del bazo y de la bolsa son similares, mientras a los 35 días esta relación se pierde. Esto resultados son concordantes con los estudios realizados por Ulloa et al. (1999).

Por último, utilizando la tabla de Lechuga (2000 c.a) no se observó variación con respecto al diámetro de la bolsa de Fabricio al utilizar el bursómetro y su equivalencia en centímetros, en donde se mantuvo con un promedio de 1,3 cm.

En el Cuadro 4 se presentan los datos obtenidos en la correlación del índice morfométrico bursal, el índice PBF:PB y el diámetro de la bolsa a los 14, 21, 28 y 35 días en la granja A, B, C de pollo de engorde seleccionada para el estudio.

Cuadro 4. Correlación del índice morfométrico bursal, el índice PBF:PB, diámetro de la bolsa de Fabricio en las granjas A, B, C de pollo de engorde.

Variables asociadas	Granja A	Granja B	Granja C
Peso corporal-Peso bolsa Fabricio (PC:PBF)	0,71	0,27	0,24
Peso bolsa Fabricio-diámetro (PBF:DIAM)	0,64	0,17	0,93
Peso corporal-Peso bazo (PC:PB)	0,86	0,83	0,83
Peso corporal-diámetro (PC:DIAM)	0,20	-0,67	0,4
Peso Bazo-diámetro (PB:DIAM)	0,08	-0,43	0,53
Peso bolsa Fabricio-Peso bazo (PBF:PB)	0,59	0,57	0,45

Los coeficientes de correlación obtenidos en el presente estudio indican que solo existe un alto grado de correlación mayor a 0,63 según Milton (2001); entre las variables PBF: DIAM en las granjas A y C, así como también en la correlación PC: PB, lo cual es concordante con los datos obtenidos por Perozo et al. (2006). El resto de las variable presentaron una pobre correlación. Estos resultados difieren a los reportados por Hernández (1998), donde se obtuvieron coeficientes de correlación altos (0.8) entre el peso vivo y el peso de los órganos linfoides (bolsa de Fabricio y bazo) y entre el peso de la bolsa de Fabricio y el peso del bazo. Al igual que Perozo et al. (2006) quien encontró un alto grado de asociación entre las variables, luego de analizar 144 aves de la raza Ross. Quizás esta diferencia con los resultados obtenidos en el presente estudio se deba al tamaño de la muestra analizada (60).

En el Cuadro 5 se presentan los resultados en la técnica de proceso de imágenes de las bolsas de Fabricio a los 14, 21, 28 y 35 días de edad y los resultados zootécnicos obtenidos para cada una de las tres granjas al finalizar el ciclo productivo.

Cuadro 5. Recuento y determinación del porcentaje de linfocitos mediante la técnica de procesamiento de imágenes de las bolsas de Fabricio, a los 14, 21, 28 y 35 días de edad.

Granja	Edad	Prom. %	1	2	3	4	5	Peso Kilos promedio	Mortalidad %	CA	IPE
A	14	31	30	31	30	32	33	2.110	4.40	1.912	244
A	21	31	31	28	33	33	32				
A	28	35	32	37	36	36	36				
A	35	22	<i>22</i>	<i>23</i>	<i>22</i>	<i>22</i>	<i>22</i>				
B	14	30	27	29	31	34	31				
B	21	34	34	34	34	34	35				
B	28	21	<i>21</i>	<i>21</i>	<i>21</i>	<i>23</i>	<i>23</i>				
B	35	28	30	<i>24</i>	36	29	<i>25</i>	2.133	3.68	1.927	249
C	14	37	36	37	38	36	39				
C	21	35	37	36	34	36	36				
C	28	25	28	<i>24</i>	26	<i>24</i>	<i>24</i>				
C	35	20	<i>20</i>	<i>22</i>	<i>22</i>	<i>20</i>	<i>19</i>	2.049	4.20	1.808	223

Negro = Bolsas completamente intactas (>35% linfocitos).

Gris = Bolsas con depresión significativa (<26% linfocitos).

De acuerdo a los resultados del Cuadro 5, en la granja A se determinó que la población linfoide se encuentra intacta hasta los 28 días. A los 35 días se encontró daño en 5/5 bolsas por lo que probablemente hubo desafío alrededor del día 30 de edad. La granja B posee una población linfoide que se encuentra intacta hasta los 21 días, a los 28 días se reportan 5/5 bolsas afectadas y a los 35 días, hay 3/5 bolsas que muestran una recuperación. La granja C mantiene su población linfoide intacta hasta los 21 días, a los 28 días se encontraron daños en 3/5 bolsas y a los 35 días el total de los linfocitos presenta depresión significativa. Se considera que la protección contra un desafío temprano del virus de IBF, es eficiente cuando aproximadamente el 90% de las bolsas de Fabricio no presentan lesiones significativas a los 21 días de edad (Tamayo, 2006). Sin embargo debe tenerse en cuenta que la inmunosupresión en las aves es un síndrome clínico, con una depresión linfoide y que dicha condición puede ser inducida por diferentes factores que se pueden clasificar de la siguiente manera: a) agentes no infecciosos: drogas,

antibióticos, temperatura ambiental, estrés en general, micotoxinas. b) agentes infecciosos: virus como el de las enfermedades de Marek, Reovirus, Anemia infecciosa aviar, Newcastle y toxinas bacterianas (Perozo et al., 2006).

Los resultados zootécnicos medidos a través del IPE en cada una de las tres granjas, indican que los resultados estuvieron dentro de los estándares productivos esperados por la compañía Agroindustrial Proave S.A., cuyo índice IPE esperado es de 230 (Campos, 2006).

En la Figura 1 se presenta los resultados obtenidos en cuanto a la integridad de la bolsa de Fabricio de este estudio y la tendencia en la industria latinoamericana, según la información suministrada por Ford Dodge.

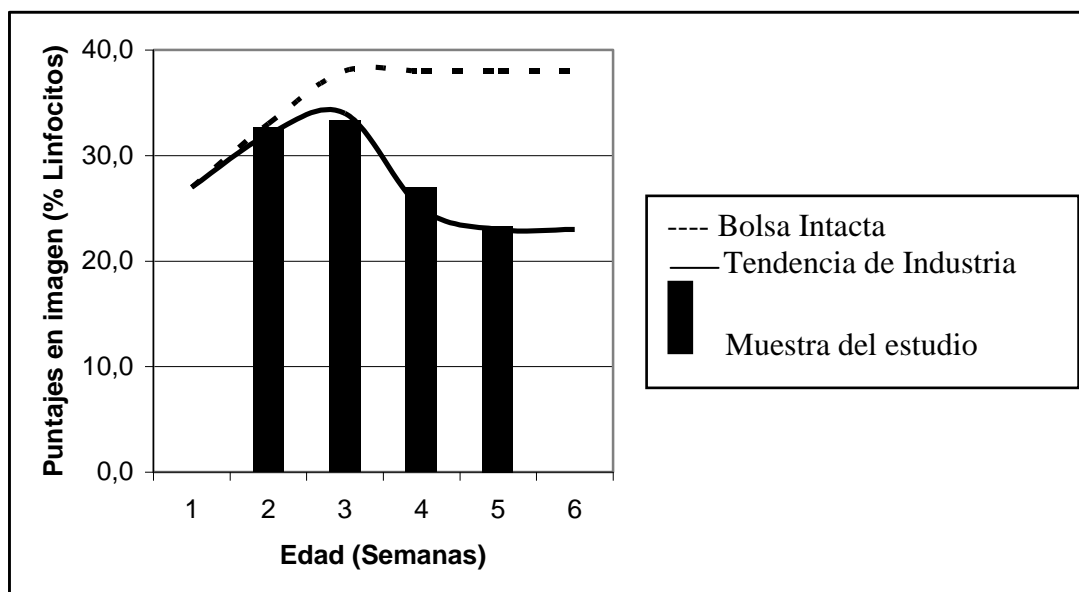


Figura 1. Comparación entre la tendencia de la integridad de la bolsa de Fabricio en la industria versus los resultados obtenidos en el presente estudio.

Mediante miles de bolsas de Fabricio analizadas por la compañía Fort Dodge en distintas empresas de América Latina, se obtuvo un ideal del recuento y determinación del porcentaje de linfocitos mediante la técnica de procesamiento de imágenes del virus vacunal (Bursine 2), en donde se espera que a los 21 días de edad las bolsas de Fabricio se encuentren íntegras y que se hayan regenerado por completo ante un desafío vacunal. Se espera que este comportamiento continúe hasta los 28 días y luego a los 35 días, es normal observar algunas bolsas (pocas) con depleción linfocitaria significativa. Actualmente se está observando un cambio en cuanto a la edad de desafío por el IBD que se está presentando en la cuarta semana, o sea, hay un desafío tardío (Flamenco, 2007).

Como se puede observar, los resultados obtenidos en este estudio se encuentran por encima del promedio de la industria.

Como análisis complementario a las bolsas de Fabricio que presentaron depleción linfocitaria, la compañía Fort Dodge realizó la prueba de PCR, en donde se determinó que los virus aislados pertenecen al grupo molecular 6, al cual pertenecen algunas cepas vacunales según Jackwood (2006) tales como la RS593, Hipra Gumboro-GM97, Bursavac y vacunas multivalentes como la Univax plus y la Primevac 3.

5. CONCLUSIONES

- En el estudio serológico realizado mediante la técnica de ELISA, se determinó que para las progenies de los tres lotes reproductores a las edades de 35, 45 y 53 semanas de edad, la inmunidad materna es aceptable hasta los 6 días de edad.
- El porcentaje de transferencia para los lotes de 35, 45 y 53 semanas de edad, estuvo sobre el 50%.
- En el estudio del índice morfométrico bursal en las tres granjas de pollo de engorde, se determinó que el peso corporal es el doble del peso de la bolsa de Fabricio a los 14 y 21 días, mientras que a los 28 días la relación es de uno a uno y a los 35 días esta relación se pierde.
- En la relación peso de la bolsa de Fabricio y peso del bazo, el comportamiento es igual a lo reportado en la relación PBF:PC.
- Con respecto al diámetro de la bolsa de Fabricio éste se mantiene estable hasta los 35 días de edad.
- El estudio del índice morfométrico bursal (BFC:PC), el diámetro de la bolsa de Fabricio y la relación PBF:PB, al menos en este trabajo, son herramientas de campo que pueden ser utilizadas por la compañía para la toma de decisiones.
- Al realizar el estudio de la correlación entre las diferentes variables, se demostró que solo existe un alto grado de correlación entre las variables PBF:DIAM en la granja A y C y para la variable PC:PB, en las tres granjas de engorde.
- En el estudio del procesamiento de imágenes existe una integridad total de la bolsa de Fabricio inclusive hasta los 35 días de edad en la granja A, mientras que para la granja B y C, la integridad se mantiene hasta los 21 días.

- A pesar de que en la identificación viral realizada mediante la técnica de RFLP en las bolsas de Fabricio de las tres granjas, indica que hay circulando un virus de Gumboro del grupo molecular 6, dentro del cual se encuentran además de virus vacunales, virus altamente virulentos, sin embargo los rendimientos zootécnicos, el estado sanitario de las parvadas y el análisis de procesamiento de imágenes, demuestran que no existen indicios de la enfermedad y que la vacuna utilizada en las parvadas de engorde, se relaciona antigénicamente con el grupo molecular 6.

6. RECOMENDACIONES

- Con base a los estudios de ELISA realizados en la progenie de tres lotes reproductores en la empresa Agroindustrial Proave, S.A., la vacunación en campo contra el virus de la enfermedad de Gumboro, debe de realizarse a partir del sexto día de edad.
- Desarrollar más estudios semejantes al presente para obtener mayor cantidad de datos y un panorama más claro de la situación real de la infección de la bolsa de Fabricio en la compañía, con el objeto de determinar si las vacunas actualmente utilizadas confieren protección o no contra los serotipos virales circulantes.
- Continuar monitorizando granjas con el fin de crear un banco de datos que facilite aún más el análisis de la información.
- Siendo el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio un virus RNA es propenso a cambios por diferentes mecanismos (Saif, 1999), por lo que es muy importante monitorizar constantemente la población viral entre las parvadas.
- Establecer un protocolo de vigilancia permanente mediante el uso de la técnica de procesamiento de imágenes y PCR en las parvadas de pollos de engorde del sector industrial, con el fin de caracterizar serotipos virales circulantes.
- De acuerdo al conocimiento de la epizootia de la enfermedad de la infección de la bolsa de Fabricio, elaborar programas profilácticos de acuerdo a las necesidades de cada empresa avícola.
- Realizar pruebas a nivel de laboratorio de desafío viral, para corroborar si la transferencia de inmunidad a las progenies, es la adecuada para el desafío viral al cual están expuestas las parvadas de engorde.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Natour, M., L.A. Ward, Y.M. Saif, B. Stewart-Brown, & L. D. Keck. 2004. Effect of different levels of maternally derived antibodies on protection against infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 48: 177-182.
- Banda, A., & P. Villegas. 2004. Genetic characterization of very virulent infectious bursal disease viruses from Latin America. *Avian Dis.* 48: 540-549.
- Banda, A., P. Villegas, & J. El-Attrache. 2003. Molecular characterization of infectious bursal disease virus from commercial poultry in the United States and Latin America. *Avian Dis.* 47: 87-95.
- Baxendale, W. 2001. Birnaviridae. pp. 319-323. *In* F. Jordan, M. Pattison, D. Alexander & T. Faragher (eds.). *Poultry diseases*. 5th. ed. W. B. Saunders, London.
- Beltrán, J. 1981. El diagnóstico de la infección de la bolsa de Fabricio: bursómetro y anticuerpos precipitantes. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Campos, M.A. 2006. Entrevista con el Ing. Marco Antonio Campos. Gerente de Producción de la empresa Agroindustrial Proave, Ciruelas, Alajuela; C.R.7 de set.
- Fernández, R. 1995. Enfermedad de Gumboro: actualidades, programas de vacunación. pp. 30. *In* VI Jornada Avícola Nacional. mar. 29-31. Asociación Costarricense de Especialistas en Ciencias Avícolas, Costa Rica.
- Flamenco, V. vflamenco@ .2007. Solicitud [en línea]. *In* juanlg7@hotmail.com. Mensaje archivado en: <http://www.hotmail.com> (Consulta: 29 oct.2007).
- Grieve, D., & B. Stewart-Brown. 1990. A new technique for infectious bursal disease evaluation. pp. 76-79. *In* XI Congreso de Avicultura Centroamericano y del Caribe. oct. 24-27. Asociación de Avicultores de Puerto Rico, Puerto Rico.
- Grieve, D.B. 1991. Inmunología aviar y aplicaciones prácticas. pp.1-16. *In* XII Congreso Latinoamericano de Avicultura. set 12-16. Asociación Ecuatoriana de Avicultura, Quito, Ecuador.
- Grieve, D., & B. Stewart-Brown. 1994. Evaluación de la vacunación con virus vivo de la bolsa de Fabricio, en parvadas consecutivas dentro del mismo galpón .pp. 32-37. *In* V Jornada Avícola Nacional .mar. 24-25. Asociación Costarricense de Especialistas en Ciencias Avícolas, Costa Rica.
- Hernandez, M.1998. Caracterización del desarrollo de la bolsa de Fabricio, timo y bazo en aves tipo Leghorn, libres de patógenos específicos (LPE). Tesis, M.V, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

- Huayapa, J. 1994. Evolución de la Bursa de Fabricio en pollos broilers: Estudio anatomohistológico. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Veterinarias, Lima, Perú.
- Idexx Laboratories, Inc. 2004. Vigilancia de poblaciones vacunadas mediante la interpretación y análisis de los resultados serológicos (muestreo y tamaño de la muestra) [en línea]. Idexx, USA. http://al.idexx.com/produccion/boletin/noticias_muestreo.jsp.(Consulta: 29 de set. 2005).
- Jackwood, D. 1999. Biotecnología de la infección bursal. pp. 30-33. *In XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura.* set. 21-24. Asociación Peruana de Avicultura, Perú.
- Jackwood, D. 2006. Avances en el diagnóstico molecular de la enfermedad de Gumboro. pp. 47-55. *El libro blanco de la enfermedad de Gumboro.* Hipra, España.
- Jiménez, C. 2005. Entrevista con el Dr. Carlos Jiménez. Profesor de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional, Heredia; C. R. 10 de ago.
- Lechuga, M.ca. 2000. Técnicas para la evaluación del tamaño de la bolsa de Fabricio y su relación con el estado de salud de la parvada. Fort Dodge animal health, México.
- Lukert, P & B. Hitchner. 1984. Infectious bursal disease. pp. 566-575. *In M. S. Hofsad (ed.), J. Barnes, W. Calnek, M. Reid & W. Yoder. Diseases of Poultry.*The Iowa State University Press , Iowa, United States.
- Lukert, P.D & Y.M.B.Saif. 2003. InfectiousBursal Disease. Pages 161-179 *IN: Disease of Poultry. 11th.*M. J. Barnes and J. R. Glisson. Mosby-Wolfe.
- Milton, S. 2001. Estadística para biología y ciencias de la salud. 3 th. ed. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid.
- Mc Carty, J., & K. Takeshita. 1998. 1995-1997. Protección contra la enfermedad infecciosa de la bolsa estudio basado en desafío de la progenie. pp. 10-18. *In 15 Congreso Centroamericano y del Caribe de Avicultura.* nov. 4-6. Asociación Costarricense de Especialistas en Ciencias Avícolas, Costa Rica.
- Mc Ferran, J.B. 1993. Infectious bursal disease. pp. 213-225. *In J.B. Mc Ferran and M.S. Mc Nulty, (eds.). Virus infections of birds.* Elsevier. Science Publishers, Netherlands.
- Muñoz , R. 1998.Utilización de análisis de imágenes computarizadas para medir Gumboro. Fort Dodge Animal Health. Overland Park,USA. Boletín técnico.
- Paneque, M., Y. González, J. L. Maestre, C. A. Sariol, D. Contreras, & I. Sánchez. 1999 a. Caracterización molecular de aislamientos cubanos del virus de la enfermedad de Gumboro. pp. 283-287. *In XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura.* set. 21-24. Asociación Peruana de Avicultura, Perú.

- Paneque, M., Y. González, J. L. Maestre, C. A. Sariol, D. Contreras, I. Sánchez, & D. Leyva . 1999 b. Vacuna experimental de ADN contra el virus de la bursitis infecciosa. pp. 278-282. *In XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura.* set. 21-24. Asociación Peruana de Avicultura, Perú.
- Peréz. N, C.Wu, T – Long Lin & R.Keirs.1998. Efecto de diferentes niveles de anticuerpos maternos del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa sobre la protección de sus progenies contra diferentes cepas del IBDV. *Veterinaria Tropical* . 23: 147-167.
- Perozo. F, J. Nava, Y. Mavárez, E. Arenas, P. Serje & M. Briceño.2006.Caracterización morfométrica de los órganos linfoides en pollos de engorde de la línea Ross criados bajo condiciones de campo en el estado Zulia, Venezuela [en línea]. http://C:/SciELO/serial/rc/v14n3/body/art_05.htm. (Consulta: 24 ago.2007).
- Philipp, H. 1998. Nuevos aspectos profilácticos contra el virus de Gumboro en los pollitos. pp. 109-111. *In 15 Congreso Centroamericano y del Caribe de Avicultura.* nov. 4-6. Asociación Costarricense de Especialistas en Ciencias Avícolas, Costa Rica.
- Ramírez, M. 2005. Entrevista con la Dra. Marcia Ramírez. Profesora de Patología Aviar de la Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional, Heredia; C. R. 23 de jun.
- Ríos, F. 2004. Control y seguimiento de la infección de la bolsa de Fabricio en aves comerciales. pp. 13-17. *In 10º Jornada Avícola Nacional.* mayo. 20-21. Asociación de Profesionales para la Promoción de las Ciencias Avícolas, Costa Rica.
- Román, T. 1994. Uso de la relación peso de la bolsa de Fabricio: peso corporal (PBF: PC) en pollo de engorde .pp. 22-27. *In V Jornada Avícola Nacional.* mar. 24-25. Asociación Costarricense de Especialistas en Ciencias Avícolas, Costa Rica.
- Saif, Y. M. 1999.Control y prevención de la enfermedad infecciosa de la bursa. pp. 37-38. *In XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura.* set. 21-24. Asociación Peruana de Avicultura, Perú.
- Sayd, S. 1999. Comparación entre la prueba de ELISA estandar y de rango extendido para virus de la enfermedad infecciosa de la bursa utilizando diferentes vacunas. pp.304-305. *In XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura.* set. 21-24. Asociación Peruana de Avicultura, Perú.
- Stewart- Brown, B. 1997. Análisis molecular de la infección de la bolsa de Fabricio. Interpretación práctica. pp. 33 . *In XV Congreso Latinoamericano de Avicultura* . set. 23-26. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, México.
- Tamayo, M. 2007. Entrevista con la Dra.Maritza Tamayo.Consultora técnica para Fort Dodge, Hotal Cariari,C.R. 27 de feb
- Thayer,S. 1990.Interpretación de los resultados de Laboratorio.pp.281-296. *In VII Seminario Internacional de Patología Aviar.*ago. 27-31.Athens, Georgia, USA.

Ulloa, J., R. Wehner, & V. Cubillos. 1999. Caracterización del desarrollo de la bolsa de Fabricio, timo y bazo en pollos broilers comerciales. pp. 313-318. *In XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura*. set. 21-24. Asociación Peruana de Avicultura, Perú.

Zorman-Rojs, O., D. Barlic-Maganja, D. Mitevski, W. Lübke, & E. Mundt. 2003. Very virulent infectious bursal disease virus in southeastern Europe. *Avian Dis.* 47: 186-192.

