

## SECCIÓN 2.7.

# ENFERMEDADES AVIARES DE LA LISTA B

---

### CAPÍTULO 2.7.1.

## BURSITIS INFECCIOSA (Enfermedad de Gumboro)

### RESUMEN

*La bursitis infecciosa (BI) está causada por un virus que es miembro del género Avibirnavirus, de la familia Birnaviridae. La enfermedad clínica sólo la presentan los pollos, si bien se pueden infectar pavos, patos, gallinas de Guinea y avestruces. Únicamente se ven afectadas a nivel clínico las aves jóvenes. La enfermedad aguda y severa de las aves de 3–6 semanas de vida se asocia con una mortalidad elevada, pero es habitual una enfermedad subclínica o menos aguda en aves de 0–3 semanas de vida. Puede causar problemas secundarios debido al efecto del virus en la bolsa (bursa) de Fabricio. El virus de la BI (IBDV) provoca un descenso en la cantidad de linfocitos de la bolsa, y si esto se produce en las 2 primeras semanas de vida, puede conducir a una reducción significativa de la respuesta inmune humoral. Hay reconocidos dos serotipos del IBDV. Se denominan serotipos 1 y 2. Ambos se pueden diferenciar mediante ensayos de (cross-neutralisation) neutralización cruzada. El serotipo 1 es el único que se asocia con la enfermedad clínica y contra el que se han preparado vacunas. Existen variantes serológicas del serotipo 1 de la BI y pueden ser necesarias vacunas especiales para lograr una protección máxima. En la actualidad son frecuentes unas cepas muy virulentas del serotipo 1 clásico, que están causando una enfermedad seria en muchos países.*

*La enfermedad clínica debida a la infección con el IBDV, también conocida como enfermedad de Gumboro, normalmente, se diagnostica a partir de la combinación de los signos característicos y las lesiones post mortem. La confirmación de la enfermedad a nivel de laboratorio, o la detección de la infección subclínica, se puede llevar a cabo mediante la demostración de la respuesta inmune humoral en los pollos no vacunados o detectando en los tejidos la presencia del antígeno vírico o genoma vírico. En ausencia de tales pruebas, puede ser de ayuda el examen histológico de las bolsas.*

**Identificación del agente:** *Habitualmente, no se realiza el aislamiento vírico como procedimiento de diagnóstico rutinario. Para este fin pueden utilizarse pollos sin anticuerpos específicos, así como cultivos celulares o huevos embrionarios procedentes de fuentes carentes de anticuerpos específicos. Sin embargo, se pueden experimentar ciertas dificultades si se emplean los dos últimos sistemas, ya que el virus no se adapta con facilidad a ellos. Si se consigue, se puede confirmar la identidad del virus mediante una prueba de neutralización vírica (NV).*

*Se puede emplear una prueba de inmunodifusión en gel de agar (IGDA) para detectar el antígeno vírico en la bolsa de Fabricio. Se extrae una porción de la bolsa y después de su homogeneización, se utiliza como antígeno en una prueba enfrentándolo a un antisuero positivo conocido. Este procedimiento es particularmente útil en las fases tempranas de la infección, antes de que se desarrolle la respuesta de anticuerpos. Asimismo, se puede realizar una prueba de inmunofluorescencia empleando un antisuero de pollo específico del IBDV para detectar el*

antígeno en los tejidos bursales. También se han descrito enzimoimmunoensayos (ELISAs) de captura antigénica basados en placas recubiertas con los anticuerpos específicos del IBDV para demostrar la presencia de los antígenos del IBDV en los homogeneizados procedentes de las bolsas. Para detectar el ARN genómico del virus en la bolsa de Fabricio, se puede emplear la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) con cebadores específicos.

**Caracterización de las cepas:** Posteriormente se pueden identificar las cepas del IBDV comprobando su patogenicidad en pollos sin anticuerpos específicos, investigando su reactividad antigénica en ensayos cruzados de NV o con anticuerpos monoclonales, mediante la determinación de la secuencia de nucleótidos de los productos amplificados por la PCR derivados del genoma del IBDV, o mediante el estudio del número y tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos a partir de la digestión de los productos de la RT-PCR con endonucleasas de restricción. Se han descrito varios protocolos para cada uno de estos enfoques. Se deberían realizar las pruebas en laboratorios especializados y emplear un cuadro de cepas de referencia como controles. A pesar de que en la actualidad se comprende mejor la base molecular de la variación antigénica, todavía no se ha descrito ningún marcador validado de virulencia.

**Pruebas serológicas:** En muestras de suero pueden llevarse a cabo una prueba de IGDA, una de NV o un ELISA. Habitualmente, la infección se propaga de manera rápida entre las aves de una parvada. Por este motivo, sólo es necesario hacer las pruebas en un porcentaje pequeño del grupo para detectar la presencia de los anticuerpos. Si se encuentran reacciones positivas entre las aves no vacunadas, entonces debe asumirse que la parvada al completo está infectada.

**Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico:** Para el control de la enfermedad se dispone tanto de vacunas vivas atenuadas como de vacunas inactivadas (muertas). Recientemente, también se ha autorizado una vacuna recombinante que expresa el antígeno VP2 del IBDV. Es importante que las vacunas vivas sean estables, que no tiendan a revertir por los pases a la forma virulenta. Para ser efectiva, las vacunas inactivadas necesitan tener un contenido antigénico elevado.

Las vacunas vivas se utilizan para producir inmunidad activa en los pollos jóvenes. Un enfoque complementario a esto consiste en proporcionar a los pollos protección pasiva, vacunando a los progenitores con una combinación de vacunas vivas e inactivadas. Por tanto, es de gran importancia la vacunación efectiva del grupo de crianza.

**Vacunas vivas:** Se utilizan cepas atenuadas de los virus de la BI. Se denominan vacunas suaves, intermedias o “más que intermedias” (“calientes”). Las vacunas suaves causan un daño bursal limitado, mientras que las intermedias y las “más que intermedias” provocan una reducción linfocítica en la bolsa de Fabricio. Normalmente, ningún tipo de vacuna causa inmunosupresión si se emplea en aves de más de 14 días de vida procedentes de progenitores inmunes a la BI.

Rara vez se utilizan las vacunas suaves en los pollos de ceba (broilers), pero sí se emplean mucho para estimular a los progenitores de este tipo de pollos antes de inocular la vacuna inactivada. Las vacunas intermedias y “calientes” superan con mayor facilidad los niveles bajos de anticuerpos de origen materno (MDA). Se pueden administrar las vacunas vivas por inyección intramuscular, por rociado o en el agua de bebida. En ausencia de MDA, se administran vacunas suaves el primer día de vida. Cuando existen MDA el día 1 de vida, la vacunación se debería retrasar hasta que se reduzca el nivel de MDA en la mayor parte de la parvada. Se puede determinar el programa de vacunación mediante pruebas serológicas en las aves para detectar el momento en el que desciende el número de MDA. Más recientemente, se han desarrollado vacunas que se pueden administrar in ovo a los 18 días de incubación.

**Vacunas inactivadas:** Se utilizan para estimular unos niveles altos y uniformes de anticuerpos en los pollos progenitores de modo que la descendencia tenga niveles altos y uniformes de MDA. Las vacunas inactivadas se producen con adyuvante en emulsión oleosa y se administran mediante inyección. Se deben utilizar en aves ya sensibilizadas por una exposición primaria a la vacuna viva o al virus de campo. Esto se puede comprobar por métodos serológicos. En las aves de crianza se pueden obtener niveles elevados de MDA administrando la vacuna viva, por ejemplo, a las 8 semanas de vida, seguida de la vacuna inactivada aproximadamente a las 18 semanas de vida.

## A. INTRODUCCIÓN

La bursitis infecciosa (BI) está causada por un virus que es miembro del género *Avibirnavirus*, de la familia *Birnaviridae*. La enfermedad clínica sólo la presentan los pollos, si bien se pueden infectar pavos, patos, gallinas de Guinea y avestruces. Únicamente se ven afectadas a nivel clínico las aves jóvenes. La enfermedad aguda y severa de las aves de 3–6 semanas de vida se asocia con una mortalidad elevada, pero es habitual una enfermedad subclínica o menos aguda en aves de 0–3 semanas de vida. Puede causar problemas secundarios debido al efecto del virus en la bolsa de Fabricio. El virus de la BI (IBDV) provoca un descenso en la cantidad de linfocitos de la bolsa y si esto se produce en las 2 primeras semanas de vida, puede conducir a una reducción significativa de la respuesta inmune humoral. Se sabe que existen dos serotipos distintos de la BI. El virus del serotipo 1 causa una enfermedad clínica en pollos de menos de 10 semanas. Normalmente los pollos de más edad no muestran signos clínicos. A veces los anticuerpos se encuentran en otras especies aviares, pero no se aprecian signos de infección. Los anticuerpos del serotipo 2 se encuentran muy extendidos en los pavos y, en ocasiones, en pollos y patos. No existen pruebas de la enfermedad clínica debida a la infección por el serotipo 2 vírico (19).

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

El aislamiento y la identificación del agente proporcionan el diagnóstico más certero de la BI, pero habitualmente no se intentan con fines de diagnóstico rutinario porque el virus puede resultar difícil de aislar (22). En la práctica, el diagnóstico de laboratorio de la BI depende de la detección de anticuerpos específicos inducidos por el virus o de la detección del virus en los tejidos, utilizando métodos inmunológicos o moleculares.

### 1. Identificación del agente

La BI clínica presenta de forma clara signos característicos y lesiones *post mortem*. El grupo de aves afectado mostrará una morbilidad muy elevada acompañada de una depresión grave en la mayoría de las aves, lo que dura unos 5–7 días. La mortalidad se eleva drásticamente durante 2 días y a continuación desciende de forma rápida durante los siguientes 2–3 días. Normalmente, muere entre el 5% y el 10% de las aves, pero la mortalidad puede alcanzar el 30–40%. Los principales signos clínicos son diarrea acuosa, plumaje erizado, apatía, anorexia, temblores y postración. Entre las lesiones *post mortem* destacan la deshidratación de los músculos con numerosas hemorragias equimóticas, el agrandamiento y decoloración anaranjada de los riñones, con la presencia de uratos en los túbulos. Las bolsas de Fabricio muestran las lesiones diagnósticas principales. Las aves que mueren en el momento más álgido del brote de la enfermedad, presentan una bolsa agrandada e inflamada con una decoloración amarilla pálida. Pueden presentar hemorragias intrafoliculares y, en algunos casos, la bolsa puede estar completamente hemorrágica con la apariencia de una cereza oscura. En muchas bolsas estarán presentes edemas de color pajizo peribursales. Es mejor realizar las pruebas de confirmación de la enfermedad clínica o de detección de la enfermedad subclínica utilizando ensayos inmunológicos, ya que el IBDV es difícil de aislar. Para el aislamiento vírico, se deberían seguir los métodos descritos más abajo. La diferenciación entre los serotipos 1 y 2 o entre los subtipos o patotipos del serotipo 1 la debería realizar un laboratorio especializado (p. ej. los Laboratorios de Referencia de la OIE para la Bursitis infecciosa [véase el Cuadro de la Parte 3 de este *Manual para animales terrestres*]).

#### a) Preparación de las muestras

Se separan las bolsas de Fabricio de forma aséptica a partir de unos cinco pollos infectados en las etapas tempranas de la enfermedad. Se cortan las bolsas con dos escalpelos, añadiendo una cantidad pequeña de caldo de peptona que contenga penicilina y estreptomina (1000/ml en cada caso) y se homogeneiza en una picadora de tejidos. El homogeneizado se centrifuga a 3.000 **g** durante 10 minutos. Se recoge el sobrenadante para utilizarlo en las investigaciones descritas más adelante. Puede que se necesite filtrar a través de un filtro de 0,22  $\mu$  para un control posterior de la contaminación bacteriana, aunque esto puede ocasionar la reducción del título vírico.

#### b) Identificación mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar

En la Sección B.2.a. se describe un protocolo para realizar la prueba de IGDA. Para detectar el antígeno en la bolsa de Fabricio mediante una prueba de IGDA, se deben extraer de forma aséptica las bolsas de aproximadamente diez pollos en la etapa aguda de la infección. Las bolsas se pican empleando dos escalpelos con un movimiento de tijeras y después las piezas pequeñas se colocan en los pocillos de una placa de IGDA enfrentándolas a sueros positivos conocidos. Se puede facilitar la liberación de los antígenos del IBDV a partir del tejido bursal infectado, realizando ciclos de congelación-descongelación del tejido picado y a continuación se puede emplear el exudado congelado-descongelado para rellenar los pocillos.

**c) Identificación mediante inmunofluorescencia**

Se preparan las secciones de bolsa con un microtomo criostático, se secan a temperatura ambiente y a continuación se fijan en acetona fría. Se aplican a las secciones antisueros específicos del IBDV con marcaje fluorescente; posteriormente se incuban a 37°C durante 1 hora en una atmósfera húmeda. Al final del periodo de incubación se lavan durante 30 minutos en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2, y se lavan con agua destilada. Las secciones se montan empleando glicerol tamponado, pH 7,6 y se examinan por microscopía ultravioleta para detectar la posible fluorescencia específica del IBDV (24).

**d) Identificación mediante enzoinmunoensayo de captura antigénica (AC-ELISA)**

Se han descrito protocolos diferentes para detectar el serotipo 1 del IBDV utilizando un enzoinmunoensayo de captura antigénica (AC-ELISA) (11, 18, 33). Brevemente, se cubren las placas ELISA con los anticuerpos específicos del IBDV. Dependiendo del protocolo AC-ELISA elegido, el anticuerpo de captura puede ser un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IBDV (MAb), o una mezcla de tales MAbs, o un suero policlonal de pollo anti-IBDV post-infección. Se ha sugerido que los AC-ELISAs que emplean anticuerpos policlonales pueden tener mayor sensibilidad. Se realizan diluciones de las muestras de los homogeneizados bursales (véase más arriba) desde la 1/10 a la 1/25 (p/v) en un tampón de dilución adecuado y se incuban en los pocillos cubiertos con anticuerpos. Al final del periodo de incubación, se eliminan los antígenos no unidos con un tampón de lavado adecuado (p. ej. PBS, pH 7,2 + Tween 20 al 0,2%). A continuación, los antígenos de captura se revelan, como en un ELISA indirecto, con un anticuerpo de detección (que debe haberse desarrollado a partir de especies animales diferentes a las de los anticuerpos de captura), seguido de un conjugado enzimático que se usa para detectar sólo el anticuerpo, seguido del sustrato enzimático. Finalmente, las densidades ópticas, que son proporcionales a la cantidad de antígenos de captura del IBDV, se leen con un lector de ELISA.

El AC-ELISA se basa en la utilización de muestras que posiblemente contienen el virus vivo, y se debería llevar a cabo sólo en instalaciones de contención adecuadas, tales como una cabina de seguridad de la clase II. Se debería considerar que todo el líquido (tampones de lavado) y residuos sólidos están contaminados por el IBDV y, antes de su eliminación, hay que descontaminarlos de forma adecuada.

Las etapas críticas en la puesta en práctica y valoración del AC-ELISA son i) la necesidad de realizar lavados a fondo entre cada una de las etapas de la reacción para mantener bajas las reacciones de fondo, ii) el requisito de incluir en cada ensayo muestras conocidas positivas y negativas como controles, y iii) la necesidad de que tanto los anticuerpos de captura como los de detección reaccionen positivamente con todas las cepas del serotipo 1 del IBDV (p. ej. ni los de captura ni los de detección deberían depender de manera acusada de la variación antigénica del IBDV que existe entre las cepas del serotipo 1).

**e) Identificación mediante técnicas moleculares**

Se han desarrollado técnicas de virología molecular que permiten identificar el IBDV más rápidamente que mediante el aislamiento vírico (7, 15, 40). El método molecular que con más frecuencia se utiliza es el de la detección del genoma del IBDV mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) (21, 40). Este método permite detectar el genoma del IBDV, cuya replicación es inestable en cultivo celular, porque no es necesario que se multiplique el virus antes de su amplificación.

La RT-PCR se realiza en tres etapas: extracción de los ácidos nucleicos a partir de la muestra estudiada, transcripción inversa (RT) del ARN del IBDV en ADNc, y amplificación del ADNc resultante mediante PCR. Las dos últimas etapas requieren que el usuario seleccione los oligonucleótidos cebadores que son secuencias cortas complementarias a la secuencia nucleotídica específica del virus. Se amplificarán zonas diferentes del genoma dependiendo de la localización a partir de la cual se han seleccionado los cebadores. El ejemplo que se indica más abajo permite la amplificación del tercio medio del gen que codifica la proteína externa de la cápsida (8, 9).

• **Extracción de los ácidos nucleicos**

El ARN monocatenario es extremadamente susceptible a la degradación por ARNasas. El genoma de ARN bicatenario (ARN2c) del IBDV resiste la degradación por ARNasas. Sin embargo, las células infectadas también contienen especies de ARN monocatenario de sentido positivo derivado del IBDV que pueden utilizarse como templado en la etapa de RT y pueden contribuir a mejorar la sensibilidad del ensayo. Así, es importante que la extracción del ARN se lleve a cabo utilizando guantes y material de laboratorio y reactivos libres de ARNasa.

El ARN del IBDV se puede extraer de tejidos infectados utilizando algunos kits comerciales de distribuidores de reactivos de biología molecular. Alternativamente, el ARN del IBDV se puede extraer añadiendo

dodecilsulfato sódico al 1% y 1 mg/ml de proteinasa K a 700 µl de suspensión vírica (p. ej. homogeneizado bursal). Se incuba 60 minutos a 37°C. Los ácidos nucleicos se obtienen utilizando un protocolo estándar de extracción con fenol/cloroformo (precaución: el fenol debe manipularse y eliminarse teniendo en cuenta que es tóxico). Los ácidos nucleicos se recogen a partir de la fase final acuosa mediante precipitación con etanol y se resuspenden en agua destilada libre de ARNasa o tampón adecuado. El ARN diluido en agua debería mantenerse congelado a una temperatura por debajo de –20°C hasta su uso.

- **Trascricpción inversa**

Se dispone comercialmente de una variedad de transcriptasas inversas. Se deben seguir las instrucciones del suministrador para preparar la mezcla de reacción de la RT. Se utiliza el cebador de la PCR “inferior” (complementario a la cadena positiva del genoma del IBDV, véase más abajo) para la trascricpción inversa, ya que esto permite la síntesis del ADNc tanto a partir de la cadena positiva del genoma ARN2c del IBDV como a partir de los ARNs monocatenarios de sentido positivo derivados del IBDV contenidos previamente en las células infectadas.

La matriz del ARN del IBDV debe desnaturalizarse antes de transferirla a la mezcla de reacción de la RT. Se añade dimetilsulfóxido de calidad para biología molecular al 20% (volumen) a una solución descongelada del ARN del IBDV. Se calienta durante 3 minutos a 92°C y se enfría en hielo; un método alternativo consiste en calentar durante 5 minutos e inmediatamente incubar la mezcla en nitrógeno líquido. Se transfiere el volumen pertinente de matriz desnaturalizada a la mezcla de reacción. Se incuba de acuerdo con las instrucciones del suministrador enzimático.

La solución del ADNc obtenida después de la etapa de RT se debería congelar a una temperatura inferior a –20°C. Un retraso en la etapa de PCR de varias semanas después de la síntesis del ADNc puede causar resultados negativos falsos en la PCR.

- **Reacción en cadena de la polimerasa**

Se dispone comercialmente de una variedad de polimerasas de ADN adecuadas para la PCR. Se deben seguir las instrucciones del fabricante para preparar la mezcla de reacción de la PCR. El par U3/L3 de cebadores de la PCR indicados más abajo se consideran útiles para amplificar el tercio medio del gen VP2 de las cepas del serotipo 1 del IBDV (8, 9).

Secuencia de nucleótidos cebadores U3 y L3 para la PCR específicos del IBDV:

Superior U3: 5'-**TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT**-GCA-TGC-GGT-ATG-TGA-GGC-TTG-GTG-AC-3'

Inferior L3: 5'-**CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC**-GAA-TTC-GAT-CCT-GTT-GCC-ACT-CTT-TC-3'

Los cebadores U3 y L3 son cebadores híbridos de 44 nucleótidos de longitud. Contienen un extremo 3' específico del IBDV (en letra itálica en la secuencia mostrada más arriba) y abarca de la posición 657 a la 676 y de de la 1193 a la 1212 del segmento A del IBDV, respectivamente (se numera como el segmento A de la cepa P2, Acc No X84034). El extremo específico del IBDV se empareja a un extremo 5' anti-IBDV (en negrita en la secuencia de más arriba) que corresponde a los cebadores universales M13 y RM13 en los cebadores U3 y L3, respectivamente. Los cebadores universales M13 y RM13 son muy utilizados en las reacciones de secuenciación del ADN, por eso los productos purificados de la PCR que resultan de la amplificación con los cebadores U3 y L3 se secuencian con facilidad. Finalmente, se incluyen en los cebadores U3 y L3 los puntos de restricción para las endonucleasas de restricción *Sph*I y *Eco*RI, respectivamente (subrayado en la secuencia de más arriba), para que si es necesario se puedan clonar los productos amplificados de la PCR con el par U3/L3 utilizando estos puntos. El par U3/L3 genera un producto de 604 pares de bases (bp), de los cuales 516 bp son específicos de la secuencia amplificada del IBDV.

Se realiza una etapa inicial de desnaturalización como recomienda el suministrador de la ADN polimerasa, seguida de 35 ciclos, en cada uno de los cuales se incluye una etapa de desnaturalización, una de templado para permitir la hibridación y una de extensión. En tales ciclos se puede utilizar una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos y una hibridación a 64°C durante 45 segundos con el par U3/L3 (la temperatura de hibridación se debe adaptar si se utilizan otros cebadores). Se deberían establecer los parámetros para la etapa de extensión de acuerdo con las recomendaciones del suministrador.

El revelado se puede llevar a cabo mediante una electroforesis de los productos de la PCR y los marcadores de peso molecular del ADN en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (precaución: el bromuro de etidio es tóxico y carcinogénico. Debería ser manipulado y eliminado de acuerdo con ello).

Para cada muestra de ADNc (puro, 10 y 100 veces diluido) se deberían realizar tres reacciones de PCR para evitar resultados negativos falsos debidos a la inhibición de la PCR en las mezclas que contienen cantidades elevadas de preparación de ADNc.

Se deberían incluir en cada PCR reacciones control positivas y negativas. Se han desarrollado protocolos que incluyen un control interno para detectar la presencia de inhibidores de la PCR (32).

Un retraso de la PCR de varias semanas después de la etapa de RT puede causar resultados negativos falsos en la PCR.

**f) Aislamiento del virus en cultivo celular**

Se inoculan con 0,5 ml de muestra, cuatro cultivos recientemente confluentes de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) (a partir de una fuente libre de patógenos específicos [SPF]) en frascos de 25 cm<sup>2</sup>. Se adsorben a 37°C durante 30–60 minutos, se lavan dos veces con solución salina balanceada de Earle y a cada frasco se le añade medio de mantenimiento. Los cultivos se incuban a 37°C, y se observan a diario para detectar posibles efectos citopáticos (ECPs). Se caracterizan por ser células refráctiles redondas y pequeñas. Si después de 6 días no hay ECPs, se elimina el medio y, a continuación, los cultivos se congelan y descongelan y el lisado resultante se inocula en cultivos frescos. Puede ser necesario repetir este procedimiento al menos tres veces. Si se observan ECPs, se debería ensayar el virus frente al antisuero del IBDV en una prueba de neutralización vírica (NV) en cultivo de tejidos (véase más abajo). Habitualmente las cepas más patógenas del IBDV no se pueden adaptar a crecer en CEF a menos que el virus se haya sometido primero a un pase seriado extensivo en embriones (véase más adelante).

**g) Aislamiento del virus en embriones**

Se inoculan 0,2 ml de muestra en el saco vitelino de cinco embriones de pollo de 6–8 días de vida sin anticuerpos específicos (SAN) y en la membrana corioalantoidea de cinco embriones de pollo SAN de 9–11 días de vida. Los embriones SAN proceden de grupos de aves que demuestran ser sero-negativos frente al IBDV. Se vigilan a diario y se eliminan los embriones muertos hasta 48 horas después de la inoculación. Los embriones que mueran después de este tiempo se examinan para detectar posibles lesiones. El serotipo 1 de la BI produce enanismo del embrión, edema subcutáneo, congestión y hemorragias subcutáneas o intracraneales. Normalmente el hígado está inflamado con congestión variable que produce un efecto moteado. En las muertes posteriores, el hígado puede estar inflamado y verdoso, con áreas de necrosis. El bazo está agrandado y los riñones inflamados y congestivos, con un efecto moteado.

Habitualmente el serotipo 1 del IBDV provoca la muerte en al menos alguno de los embriones durante el aislamiento primario.

El serotipo 2 del IBDV no induce edema o hemorragias subcutáneas en los embriones infectados, pero los embriones son de un tamaño menor y presentan una decoloración amarilla pálida.

Para preparar el virus empleado como base de propagación por embrión o para los pases sucesivos, se recogen asépticamente los embriones con lesiones o los que se sospeche que estén infectados, respectivamente. Se eliminan sus cabezas y miembros y se pica el cuerpo principal tal y como se describe en la Sección B.1.a. para la preparación de una suspensión vírica.

**h) Aislamiento del virus en pollos**

Este método se ha utilizado en el pasado pero ya no se recomienda debido al interés actual por el bienestar animal. Se administran por la vía de la gota en el ojo 0,05 ml de muestra en cinco pollos susceptibles y cinco inmunes a la BI (de 3–7 días de vida). Los pollos se sacrifican 72–80 horas después de la inoculación y se examinan sus bolsas de Fabricio. Las de los pollos infectados con el serotipo 1 virulento del IBDV aparecen amarillentas (en ocasiones hemorrágicas) e hinchadas, con estriaciones prominentes. A veces se presenta edema peribursal y, ocasionalmente, aparecen pulmones con material caseoso. Las plicas están petequiadas.

La presencia de lesiones en las bolsas de los pollos susceptibles acompañadas de la ausencia de lesiones en los pollos inmunes constituye un diagnóstico de la BI. Las bolsas de ambos grupos se pueden utilizar como antígeno en una prueba de inmunodifusión en gel de agar (IGDA), enfrentándolo a un antisuero positivo de la BI (véase Sección B.1.b).

La extensión del daño bursal puede variar considerablemente con la patogenicidad de la cepa del IBDV estudiada. Sin embargo, como las muestras sometidas al aislamiento vírico pueden variar en su contenido vírico, la extensión del daño bursal que se observa en los pollos susceptibles en la etapa de aislamiento proporciona un indicio limitado de la patogenicidad de la cepa.

Las bolsas de los pollos infectados con el serotipo 2 del IBDV no muestran ninguna lesión global.

**i) Diferenciación de cepas**

Las cepas del IBDV se pueden identificar para comprobar su patogenicidad en pollos SAN, investigando su reactividad antigénica en pruebas de NV cruzada o con MAbs, determinando la secuencia de nucleótidos de los productos de amplificación de la RT-PCR derivados del genoma del IBDV, o estudiando el número y tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos después de la digestión de los productos de la RT-PCR con endonucleasas de restricción. Se han descrito varios protocolos para cada uno de estos abordajes. Las pruebas deberían ser llevadas a cabo por laboratorios especializados e incluirse un cuadro con las cepas de referencia utilizadas como controles. A pesar de que en la actualidad se conoce mejor la base molecular de la variación antigénica, todavía no se ha descrito un marcador de virulencia validado.

• **Pruebas de patogenicidad**

Los estudios para comparar la patogenicidad de las cepas del IBDV se deben realizar en instalaciones de biocontención segura para impedir la diseminación del virus estudiado (véase el Apéndice I.1.6.1. del Capítulo I.1.6. Transporte internacional y contención en laboratorios de agentes patógenos de origen animal). Se deben emplear aves SAN con estado microbiológico conocido (lo más adecuado es utilizar pollos SPF) con el fin de evitar interferencias debidas a agentes contaminantes.

Las variables principales al comparar los resultados de los ensayos de patogenicidad son la raza, la edad y el estado inmune de los pollos desafiados, la dosis y la vía de administración del virus de desafío y la posible presencia de agentes contaminantes en el inóculo. Se ha descrito que las aves ponedoras de raza ligera son más susceptibles que los pollos de ceba pesados (39). También pueden tener lugar diferencias en el grado de susceptibilidad entre las líneas de pollos SPF. La mayor susceptibilidad a la forma aguda de la BI se presenta en pollos de entre 3 y 6 semanas de vida (22). (En la Sección C se describe la influencia del estado inmune). Es necesaria una dosis elevada de virus de desafío, tal y como se recomienda en la Sección C.1.c., para que se infecten todos los pollos inoculados a la vez, sin que sea necesaria la transmisión ave a ave del virus inoculado. Finalmente, la presencia de agentes contaminantes en el inóculo, tales como adenovirus o virus que producen anemia infecciosa en los pollos, puede modificar la severidad de la BI y los signos que se observan después del desafío (29).

Se han utilizado los términos “variante”, “clásico” y “muy virulento” para calificar a las cepas del IBDV que muestran una patogenicidad diferente. Basándose en los signos y lesiones observadas en dos líneas de pollos SPF White Leghorn durante la BI experimental aguda después de un desafío con una dosis infectiva 50% de huevo (EID<sub>50</sub>) de 10<sup>5</sup>, los IBDVs “variantes” norteamericanos inducen poco o casi ningún signo clínico y no provocan mortalidad pero causan lesiones bursales marcadas; los IBDVs “clásicos” inducen aproximadamente una mortalidad del 10–50% acompañada de lesiones y signos típicos, en tanto que los IBDVs “muy virulentos” inducen aproximadamente una mortalidad del 50–100% y lesiones y signos típicos (Etterdossi *et al.*, observación personal).

• **Pruebas de antigenicidad**

Se puede ensayar la relación antigénica entre las cepas del IBDV mediante pruebas de NV cruzada, lo que correlaciona mejor con la protección cruzada. Tales pruebas han de llevarse a cabo en huevos embrionarios SAN cuando los virus estudiados no crezcan en cultivos de CEF (p. ej. IBDV muy virulento [vvIBDV]). Las diferencias en los resultados de la prueba de NV cruzada entre las cepas del serotipo 1 del IBDV han conducido a la definición de “subtipos” del serotipo 1, algunos de los cuales son aislados de los IBDVs norteamericanos antigenicamente “variantes” (14).

Otra aproximación al estudio de la relación genética entre las cepas se basa en la utilización de MAbs de ratón que se unen a epítomos neutralizantes del IBDV. Existen en todo el mundo varios cuadros de MAbs (11, 12, 34). Se han introducido algunos de estos MAbs en kits comerciales, pero aún no se ha propuesto un cuadro unificado de MAbs. Todos los epítomos neutralizantes del IBDV caracterizados hasta la fecha se sitúan en un dominio inmunológico principal del tercio medio (de la posición 200 a la 340 de aminoácidos) de la proteína VP2 de la cápsida externa (9, 30, 37). Esta región se denomina “dominio variable de la VP2” debido al hecho de que la mayoría de los cambios observados en los aminoácidos de las cepas del IBDV se agrupan ahí. En el vVP2, existen cuatro tramos de aminoácidos de importancia crítica para la antigenicidad y se denominan picos hidrofílicos del vVP2. Son los aminoácidos de las posiciones 210 a la 225 (pico A principal), de la 249 a la 252 (pico 1 secundario), de la 281 a la 292 (pico 2 secundario) y de la 313 a la 324 (pico B principal) (2, 38). Tanto los IBDVs “muy virulentos” como los “variantes” norteamericanos exhiben en estas regiones de aminoácidos unos cambios que se correlacionan con la variación de los epítomos (8, 37). Hasta la fecha, no se ha demostrado que ningún marcador antigénico se correlacione estrictamente con la patogenicidad del IBDV.

• **Identificación molecular**

La mayoría de los esfuerzos para la identificación molecular se han centrado en la caracterización del segmento mayor del IBDV (segmento A) y, especialmente, de la región que codifica el vVP2. Se han publicado diversos protocolos sobre la caracterización basada en el empleo de endonucleasas de restricción de los productos de la RT-PCR. Estos enfoques se conocen como RT-PCR/RE o RT-PCR-RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) (16, 21, 42). La utilidad de la información que suministran depende de la identificación de enzimas que corten en los puntos de restricción que son relevantes desde el punto de vista fenotípico. Ya se han identificado algunos puntos implicados en la antigenicidad (véase más arriba), sin embargo, todavía es necesario definir y validar los sitios de restricción relacionados con la virulencia. La secuenciación de los nucleótidos de los productos de la RT-PCR, aunque es más cara que el análisis de restricción, sirve para valorar con más precisión la relación genética entre las cepas del IBDV. Experimentalmente se han demostrado algunos marcadores, mediante un enfoque genético inverso, para las cepas adaptadas al cultivo celular, que exhiben los pares de aminoácidos 279 N–284 T (20) o 253 H–284 T (25). En los virus más virulentos están presentes cuatro aminoácidos típicos (222 A, 256 I, 294 I y 299 S) (3, 8, 21). Sin embargo, todavía no se sabe si estos aminoácidos juegan un papel en la virulencia o si meramente son un indicio del origen clonal de la mayoría de los aislados vvlBDV.

## 2. Pruebas serológicas

### a) Prueba de inmunodifusión en gel de agar

La prueba de IGDA es la prueba serológica más ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos específicos en el suero, o para detectar los anticuerpos o el antígeno vírico en el tejido bursal.

Se deberían tomar las muestras de sangre en la etapa temprana de la enfermedad y repetir la toma de muestras 3 semanas más tarde. Como el virus se propaga con rapidez, sólo es necesario muestrear una pequeña proporción de la parvada. Habitualmente son suficientes 20 muestras de sangre. Para la detección del antígeno en la bolsa de Fabricio, se deben extraer de forma aséptica la bolsa de aproximadamente diez pollos en la fase aguda de infección. Las bolsas se pican con dos escalpelos realizando un movimiento de tijeras, y después las piezas pequeñas se colocan en los pocillos de una placa de IGDA enfrentándolas a un suero positivo conocido. Los ciclos de congelación-descongelación del tejido picado pueden favorecer la liberación de los antígenos a partir del tejido bursal infectado.

- **Preparación del antígeno control positivo**

Se inoculan pollos susceptibles de 3–5 semanas de vida, por la vía de la gota en el ojo, con un homogeneizado bursal clarificado al 10% (p/v) que se sepa que contiene el IBDV viable<sup>1</sup>. Las aves se sacrifican 3 días después de la inoculación y se recogen las bolsas de forma aséptica. Se eliminan las bolsas hemorrágicas y se juntan las restantes, después de pesarlas se les añade un volumen equivalente de agua destilada fría y un volumen equivalente de cloruro de metileno no diluido. La mezcla se homogeneiza a fondo en una picadora de tejidos y se centrifuga a 2000 *g* durante 30 minutos. Se recoge el sobrenadante y se distribuye en alícuotas para conservarlas a –40°C. El antígeno contiene el virus vivo y sólo se debería manipular en instalaciones adecuadas tales como las cabinas de seguridad de la clase II.

- **Preparación del antisuero control positivo**

Se inoculan pollos susceptibles de 4–5 semanas de vida, por la vía de la gota en el ojo, con 0,05 ml de un homogeneizado bursal clarificado al 10% (p/v) que se sepa que contiene el IBDV viable<sup>1</sup>. Se los extrae la sangre 28 días después de la inoculación. El suero se junta y se conserva en alícuotas a –20°C.

- **Preparación del agar**

Se disuelve cloruro sódico (80 g) y fenol (5 g) en agua destilada (1 litro) (precaución: se debería manipular y eliminar el fenol teniendo en cuenta que se tóxico). Se añade el agar (12,5 g) y se calienta hasta que se disuelva. Mientras aún está muy caliente la mezcla, se filtra a través de unas láminas de celulosa cubiertas por unas capas de gasa. El medio se distribuye en volúmenes de 20 ml en botellas de cristal y se conserva a 4°C hasta que se haya de utilizar.

- **Procedimiento de la prueba**

i) Se preparan las placas entre 24 horas y 7 días antes de ser utilizadas. El agar se disuelve en una vaporera o en un baño de agua hirviendo. Se debe evitar que el agua entre al interior de las botellas.

1 La cepa 52/70 es una cepa adecuada del IBDV (serotipo 1, patotipo clásico) que se obtiene de los Laboratorios de Referencia de la OIE (véase el Cuadro de la Parte 3 de este *Manual de animales terrestres*).



- ii) Se vierte el contenido de una botella en la cantidad necesaria de placas de Petri de plástico de 9 cm situándolas en una superficie nivelada. (Algunos laboratorios prefieren verter el gel en portas de 25 × 75 mm, y 3 mm de profundidad).

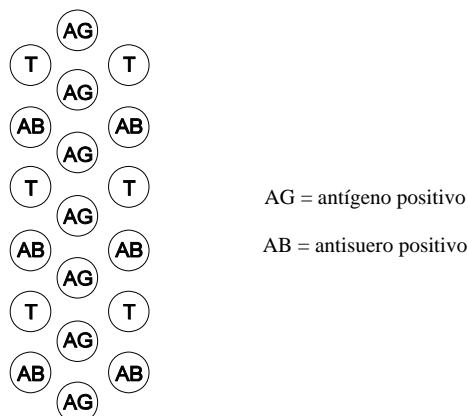


Fig. 1. Protocolo para la detección de anticuerpos

T = sueros problema

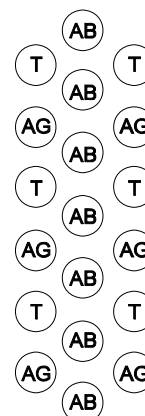


Fig. 2. Protocolo para la detección de antígenos

Notas:

1. Es preferible el modelo lineal de pocillos, aunque puede utilizarse el modelo hexagonal. Cada suero o bolsa problema se debería colocar junto a un control positivo de anticuerpo (AB) o de antígeno (AG), respectivamente.
2. Se utilizan pocillos de 3 mm de profundidad, 6 mm de diámetro y están separados 3 mm (o pocillos de cualquier otro tamaño que previamente se haya demostrado que son efectivos).

- iii) Se cubren las placas y se deja solidificar el agar y después se conservan a 4°C. Las placas vertidas se pueden conservar hasta 7 días a 4°C. (Si las placas tienen que utilizarse el mismo día que se han vertido, se las seca colocándolas abiertas pero invertidas a 37°C durante unos 30-60 minutos).
- iv) Se cortan tres filas verticales de pocillos de 6 mm de diámetro y 3 mm de separación utilizando un cortador tubular y una plantilla.
- v) Se extrae el agar de los pocillos mediante aspiración o se elimina utilizando una punta de bolígrafo con cuidado de no dañar las paredes de los pocillos.
- vi) Con una pipeta, se distribuyen 50 µl de los sueros problema en los pocillos, como se indica en la Figura 1.

O, para la detección de los antígenos del IBDV en las bolsas:

Se colocan en los pocillos pequeñas cantidades de las bolsas problema finamente picadas mediante unas pinzas de punta fina curvada, como se muestra en la Figura 2, en cantidad suficiente para llenar los pocillos. Alternativamente, puede utilizarse el exudado congelado-descongelado de los tejidos picados.

- vii) Se distribuyen 50 µl de los reactivos control positivo y negativo en los pocillos pertinentes.
- viii) Las placas se incuban entre 22°C y 37°C hasta 48 horas en una cámara húmeda para evitar que se seque el agar.
- ix) Se examinan las placas enfrentándolas a un fondo oscuro con una fuente de luz oblicua después de 24 y 48 horas.

• **Pruebas cuantitativas de inmunodifusión en gel de agar**

La prueba de IGDA se puede utilizar también para medir los niveles de anticuerpos, empleando diluciones del suero en los pocillos problema y considerando el título como la dilución mayor que produce una línea de (8) precipitación. Puede resultar muy útil para medir los anticuerpos maternos o vacunales y para decidir sobre cuál puede ser el mejor momento para la vacunación. Sin embargo, esta prueba de determinación cuantitativa de IGDA se ha reemplazado en la actualidad, en gran medida por el ELISA.

**b) Pruebas de neutralización vírica**

Las pruebas NV se llevan a cabo en cultivo celular. La prueba es más laboriosa y costosa que la prueba de IGDA, pero es más sensible para detectar anticuerpos. La sensibilidad no es necesaria para diagnósticos

rutinarios, pero puede ser útil para evaluar las respuestas de las vacunas o diferenciar entre los serotipos 1 y 2 del IBDV.

En primer lugar, se colocan 0,05 ml del virus diluido en el medio de cultivo de tejidos hasta obtener 100 DICT<sub>50</sub> (dosis infectivas 50% en cultivo de tejido) por 0.05 ml en cada pocillo de una placa de microtitulación para el cultivo de tejidos (Spearman-Kärber [1] o la Reed & Muench [27]). Los sueros problema se inactivan por calor a 56°C durante 30 minutos. Se hacen diluciones seriadas al doble de los sueros problema en los pocillos del virus diluido. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, en cada pocillo se distribuyen 0,2 ml de una suspensión de fibroblastos de embriones de pollos SPF, con una densidad celular que permita que se obtenga la confluencia de las capas después de 24 horas de incubación. Las placas se sellan e incuban a 37°C durante 4–5 días, y después se observan las monocapas al microscopio para detectar ECPs típicos. El punto final (título del suero) se expresa como el inverso de la dilución mayor del suero que no muestra ECP. Para reducir la variación de prueba a prueba y de operador a operador, se puede incluir en cada lote de pruebas un antisuero estándar de referencia<sup>2</sup>.

### c) Enzimoimmunoensayo

Los ELISAs se emplean para la detección de anticuerpos producidos frente a la BI. Para cubrir con antígeno las placas hace falta una preparación vírica purificada, o al menos semipurificada, y se necesitan destreza y técnicas especiales. En 1980 Marquardt *et al.* describieron los métodos de preparación de los reactivos y de la aplicación del ensayo (23). Se dispone de kits comerciales.

Se diluyen los sueros problema de acuerdo al protocolo establecido o a las instrucciones del kit y se distribuyen en la cantidad necesaria de pocillos. Después de la incubación bajo las condiciones adecuadas, se eliminan de las placas, y los pocillos se lavan a fondo. Se añaden a los pocillos inmunoglobulinas anti-pollo conjugadas a un enzima y, de nuevo, se incuban las placas de manera apropiada. Se vacían y vuelven a lavar antes de adicionar el sustrato que contiene un cromógeno que cambia de color en presencia del correspondiente enzima. Después de una etapa final de incubación, se para la reacción sustrato/cromógeno añadiendo una solución de parada adecuada y se cuantifican las reacciones de color midiendo la densidad óptica de cada pocillo. Para cada muestra problema se calcula la relación Muestra respecto a Positivo (S/P).

### d) Interpretación de los resultados

La prueba de IGDA es extremadamente sensible, aunque no tanto como la prueba de NV; con frecuencia, esta última da un título cuando la prueba de IGDA da un resultado negativo. Las reacciones positivas indican infección en las aves no vacunadas y sin anticuerpos maternos. A título orientativo, una reacción positiva de IGDA en un ave vacunada o un ave joven con anticuerpos maternos indica un nivel de anticuerpos protector. El ELISA proporciona resultados más rápidos que la NV o la IGDA y es menos costoso en términos de trabajo, aunque los reactivos son más caros. Los títulos de NV y IGDA se correlacionan bien, pero al ser más sensible la NV, los títulos de IGDA son proporcionalmente inferiores. La correlación entre el ELISA y la NV y entre el ELISA y la IGDA es más variable y depende de la fuente de los reactivos empleados en el ELISA. Cuando se analiza el descenso del título de los anticuerpos maternos (MDA), no es común encontrar anticuerpos de NV residuales a una edad en la que ya son negativos los resultados del ELISA. Se ha ideado una fórmula que permite utilizar los títulos del ELISA para calcular la edad óptima de vacunación (17), que puede variar dependiendo de la vacuna que se emplee. Pueden producirse reacciones positivas inespecíficas con la mayoría de los ELISAs porque, normalmente, están diseñados para controlar las respuestas de las vacunas, en cuyo caso la sensibilidad se considera más importante que la especificidad. Se debería tener esto en cuenta al utilizar la técnica ELISA para el diagnóstico. En las parvadas de pollos comerciales, no se puede excluir la posibilidad de que el antígeno ELISA del serotipo 1 también detecte los anticuerpos inducidos por la infección natural con el IBDV del serotipo 2, sin embargo, todavía no se ha demostrado que esta posible reacción cruzada interfiera con los programas de control de la BI basada en el ELISA.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

Principalmente se dispone de dos tipos de vacunas para el control de la BI. Estas son vacunas vivas atenuadas, o vacunas inactivadas y con adyuvante en emulsión oleosa (36). También se ha autorizado recientemente una vacuna viva recombinante que expresa los antígenos del IBDV.

Las directrices a seguir para la producción de las vacunas de interés veterinario se indican en el Capítulo 1.1.7. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices dadas aquí y en el Capítulo 1.1.7. son de carácter general, y pueden ser complementadas ante requerimientos regionales y nacionales.

<sup>2</sup> Se puede obtener un antisuero de referencia adecuado a partir de los Laboratorios de Referencia de la OIE (véase la Cuadro de la Parte 3 de este *Manual para animales terrestres*).

Hasta la fecha, se han producido vacunas de la BI sólo con el serotipo 1 del IBDV, aunque se ha detectado entre los pollos el virus del serotipo 2. El virus del serotipo 2 no se ha asociado con la enfermedad, pero su presencia estimulará la producción de anticuerpos. Los anticuerpos del serotipo 2 no confieren protección contra la infección por el serotipo 1, y no interfieren con la respuesta de la vacuna del tipo 1. Existen numerosas descripciones de las variantes antigénicas del virus del serotipo 1 (28). Los estudios de protección cruzada han demostrado que las vacunas inactivadas preparadas a partir del virus del serotipo 1 “clásico” requieren un alto contenido antigénico para proporcionar una protección buena contra alguna de estas variantes. Actualmente están autorizadas las vacunas de la BI que contienen tanto virus del serotipo 1 de la BI clásica como variante. Desde 1986 han emergido cepas vvIBDV con cambios antigénicos limitados si se las compara con los virus del serotipo 1 “clásico”. La inmunización activa con el virus del serotipo 1 “clásico” o con la vacuna proporciona una protección buena contra los vvIBDVs (10), sin embargo, estos últimos virus son menos susceptibles a la neutralización por los anticuerpos maternos que los virus patogénicos “clásicos” (39).

- **Vacunas vivas: métodos de utilización**

Las vacunas vivas de la BI se preparan a partir de cepas total o parcialmente atenuadas del virus, conocidas como “suave”, “intermedia”, o “más que intermedia” (“caliente”), respectivamente.

Las vacunas suaves e intermedias se utilizan en pollos progenitores para producir una respuesta primaria previa a la vacunación cerca del momento de la puesta empleando la vacuna inactivada. Son susceptibles al efecto de los MDA por lo que se deberían administrar únicamente después de que se haya reducido la cantidad de MDA. La aplicación se realiza mediante una inyección intramuscular, por rociado o en el agua de bebida, normalmente a las 8 semanas de vida (31).

Se utilizan vacunas intermedias o más que intermedias para proteger a los pollos de ceba y a las aves ponedoras comerciales de reemplazo. También se emplea alguna de estas vacunas en pollos progenitores jóvenes si existe un riesgo elevado de infección natural con el virus virulento de la BI. Aunque las vacunas intermedias son susceptibles a la presencia de MDA, en ocasiones se administran al día de vida, en forma de rociado grosero, para proteger a cualquier pollo de la parvada que pueda o no tener únicamente niveles mínimos de MDA. A su vez, esto ayuda a establecer un reservorio del virus de la vacuna en la parvada que permite la transmisión lateral a otros pollos cuando se reduce la cantidad de MDA. Habitualmente se administran segundas y terceras aplicaciones, en especial cuando existe un riesgo elevado de exposición a las formas virulentas de la enfermedad o cuando los polluelos vacunados muestran niveles desiguales de MDA. El calendario de las aplicaciones adicionales dependerá de los títulos de anticuerpos de las aves progenitoras en el momento de la puesta de los huevos. A modo orientativo, normalmente la segunda dosis se administra a los 10-14 días de edad en el momento en el que aproximadamente el 10% de la parvada es susceptible a la BI, y la tercera dosis 7-10 días más tarde. La vía de administración es mediante rociado o en el agua de bebida. Rara vez se emplea la inyección intramuscular. Si la vacuna se suministra en el agua de bebida, se debe utilizar agua limpia con pH neutro libre de olor o sabor de cloro o metales. Se puede añadir leche en polvo desnatada en una proporción de 2 g por litro. Se debe procurar que todas las aves reciban su dosis de vacuna. Con este fin, se debería eliminar todo el agua (cortar) durante 2-3 horas antes del suministro del agua con el medicamento y se debe procurar que no permanezca agua residual en las cañerías de drenaje ni en los bebederos. Es posible dividir el agua medicamentada en dos partes, suministrándoles la segunda parte 30 minutos después de la primera.

Recientemente se ha desarrollado una tecnología para proporcionar la vacuna viva a los huevos durante el periodo de incubación. El virus de la vacuna viva se mezcla con anticuerpos de la BI y se inyecta el complejo *in ovo* a los 18 días de la incubación. Los huevos se incuban hasta la eclosión y el virus de la vacuna se libera cuando los polluelos tienen aproximadamente 7 días de vida. De esta forma, se supera el problema de los anticuerpos maternos de la BI y los polluelos están inmunizados de manera efectiva (13).

Recientemente en Europa se ha autorizado una vacuna viva recombinante que expresa el antígeno VP2 del IBDV. (Existe limitada información disponible sobre el uso de esta vacuna)

Generalmente, las vacunas vivas de la BI se consideran compatibles con otras vacunas aviares. Sin embargo, es posible que las vacunas de la BI que causan daño bursal puedan interferir con la respuesta a otras vacunas. Únicamente se deberían vacunar aves sanas. Los viales de la vacuna liofilizada se deberían mantener a temperaturas entre 2°C y 8°C hasta que se vayan a utilizar.

- **Vacunas inactivadas: métodos de utilización**

Las vacunas inactivadas de la BI se utilizan para producir niveles elevados, uniformes y de larga duración de anticuerpos en las gallinas de cría que previamente han sido tratadas con la vacuna viva o han estado expuestas al virus de campo durante la crianza (5). El programa habitual de administración de la vacuna viva comienza aproximadamente a las 8 semanas de vida. A ésta le sigue la vacuna inactivada cuando tienen 16–20 semanas de edad. La vacuna inactivada se produce en forma de emulsión de agua en aceite, y tiene que ser inyectada a cada una de las aves. Las vías preferidas son la intramuscular en el músculo de la pierna, evitando la proximidad

de las articulaciones, tendones o los vasos sanguíneos principales o bien la vía subcutánea. Se puede emplear una jeringa multidosis. Todo el equipamiento que se vaya a utilizar debería estar limpio y estéril entre parvadas y los equipos de vacunación deberían ejercer un estricto control de higiene al pasar de una parvada a otra. Se debería conservar la vacuna entre 4°C y 8°C. No se debería congelar o exponer a luz intensa o a temperaturas elevadas.

Solamente se deberían vacunar las aves sanas que estén sensibilizadas por la exposición previa al IBDV. Usándose de esta manera la vacuna debería inducir tal respuesta de anticuerpos que los pollos eclosionados a partir de estos progenitores presentarían protección pasiva contra la BI aproximadamente hasta los 30 días de vida (41). Esto abarca el periodo de mayor susceptibilidad a la enfermedad y previene el daño bursal en el momento en el que éste podría provocar inmunosupresión. Se ha demostrado que el daño bursal que se produce aproximadamente después de los 15 días de vida tiene poco efecto en la inmunocompetencia ya que en ese momento las células inmunocompetentes han migrado a los tejidos linfoides periféricos. Sin embargo, si existe una amenaza de exposición a la infección con el virus muy virulento de la IBDV, se deberían aplicar las vacunas vivas como se ha descrito anteriormente. El nivel preciso y la duración de la inmunidad conferida con las vacunas inactivadas de la BI dependerán principalmente de la concentración del antígeno presente por dosis. El objetivo de producción debería ser obtener una concentración de antígeno elevada y por tanto una vacuna muy potente.

## 1. Control del inóculo

### a) Características del inóculo

- **Vacuna viva**

Se debe demostrar que el virus del inóculo está libre de virus extraños, bacterias, micoplasmas y hongos, en particular patógenos aviarios. Esto supone la demostración de la ausencia de contaminación con otras cepas del IBDV. Para las cepas de vacuna que tengan que ser atenuadas y no inmunosupresoras, se debe demostrar que el virus del inóculo es estable, sin tendencia a revertir al estado virulento. Se puede confirmar llevando a cabo al menos cinco pases consecutivos de pollo a pollo a intervalos de 3-4 días utilizando una suspensión bursal como inóculo en pollos SPF de edad mínima recomendada para la vacunación. Se debe demostrar que se transmitió el virus. Posteriormente se realiza una comparación histológica para comprobar que no hay diferencias entre las bolsas de las aves inoculadas con el material inicial y el del pase final. Se han desarrollado técnicas para la valoración bursal (26) y de imagen.

*Prueba de inmunosupresión:* Una característica importante que debe cumplir la vacuna es que el virus no produzca en la bolsa de Fabricio un daño de tal gravedad que cause inmunosupresión en las aves susceptibles. (Pueden estar autorizadas las vacunas vivas del tipo “intermedia” y “más que intermedia” incluso aunque puedan ser capaces de causar inmunosupresión). La vacuna se administrará por inyección o por la vía de la gota en el ojo, una dosis de campo por ave, a 20 pollos SPF de 1 día de vida. A un grupo adicional de aves de la misma edad y fuente se les aloja separadamente como controles. A las dos semanas de vida, a cada ave de ambos subgrupos se le da una dosis de campo de la vacuna viva de la enfermedad de Newcastle por la vía de la gota en el ojo. Alternativamente, se puede administrar la vacuna de la BI a la edad mínima recomendada para la vacunación, y la vacuna de la enfermedad de Newcastle en el momento en el que sean máximas las lesiones bursales inducidas por la vacuna del IBDV. Dos semanas después de su administración se determina la respuesta de inhibición de la hemaglutinación (HI) de cada ave a la vacuna de la enfermedad de Newcastle y la protección frente al desafío con  $10^{5.0}$  a  $10^{6.5}$  ELD<sub>50</sub> (dosis letales 50% en embrión) de la cepa Herts 33/56 (o similar) del virus de la enfermedad de Newcastle. La vacuna de la BI no pasa la prueba si la respuesta de HI y la protección proporcionada por la vacuna de la enfermedad de Newcastle es significativamente inferior ( $<0,01$ ) en el grupo al que se le ha administrado la vacuna respecto al grupo control. En países en los que el virus de la enfermedad de Newcastle es exótico, una alternativa consiste en utilizar como antígeno de la prueba eritrocitos de oveja o antígeno de *Brucella abortus* muerta, valorando la respuesta mediante la prueba de hemaglutinación o de aglutinación del suero, respectivamente. Sin embargo, es preferible otra vacuna viva como sistema de prueba, ya que también se evalúa la inmunidad mediada por células.

- **Vacuna muerta**

Las características más importantes de las vacunas muertas son la producción elevada y la buena antigenicidad. Se han empleado tanto cepas virulentas como atenuadas. Se debe demostrar que el virus del inóculo está libre de virus extraños, bacterias, micoplasmas y hongos, particularmente patógenos aviarios (35).

### b) Método de cultivo

El virus del inóculo se puede propagar en varios sistemas de cultivo, tales como fibroblastos de embrión de pollo SPF, o embriones de pollo. En algunos casos, se puede utilizar la propagación en la bolsa. La mayor parte se distribuye en alícuotas y se liofilizan en contenedores sellados.

### c) Validación como vacuna

Antes de que comience la producción de la mayor parte de la vacuna se deberían obtener los datos de eficacia. La vacuna se debería administrar a aves por la misma vía que se utilizará en el campo. Se puede administrar la vacuna viva a las aves jóvenes y valorar la respuesta mediante pruebas serológicas y por su resistencia al desafío experimental. En el caso de las vacunas muertas, la prueba se debe llevar a cabo en aves mayores que continúen hasta la puesta, utilizando el programa recomendado de vacunación, de modo que su progenie se podrá desafiar para determinar la resistencia debida a los MDA al comienzo y fin de la puesta.

- **Vacuna viva**

*Prueba de eficacia:* Se administra una dosis de campo al mínimo título recomendado a 20 pollos SPF de edad mínima de vacunación. Se inoculan grupos separados para cada una de las vías recomendadas de aplicación. Se cogen 20 pollos del mismo tiempo de eclosión como controles no inoculados. Después de 14 días, se desafían cada uno de los pollos por la vía de la gota en el ojo con aproximadamente 100 CID<sub>50</sub> (dosis infectivas 50% en pollos) de una cepa virulenta del IBDV como recomienda uno de los Laboratorios de Referencia de la OIE para la BI (véase Cuadro de la Parte 3 de este *Manual para animales terrestres*). Los pollos se observan a diario durante 10 días. Se registra el número de aves que mueren o que exhiben signos de BI. La vacuna no pasa la prueba a menos que como mínimo el 90% de los pollos vacunados sobreviva sin mostrar signos clínicos o lesiones severas en las bolsas de Fabricio al final del periodo de observación. Si más de la mitad de los controles no muestra signos de la BI, o uno o más de los pollos control no exhiben lesiones severas en la bolsa de Fabricio, la prueba no es válida. Se consideran las lesiones severas si al menos el 90% de los folículos muestran más del 75% de reducción de linfocitos. Si se comprueba que los resultados son satisfactorios, esta prueba necesita llevarse a cabo tan sólo en un lote de todos los preparados a partir de la misma porción de inóculo.

- **Vacuna muerta**

*Prueba de eficacia:* Se les administra una dosis de vacuna al menos a 20 aves SPF no estimuladas y a la edad recomendada (cerca de la puesta) mediante una de las vías recomendadas, y se mide la respuesta de anticuerpos entre 4 y 6 semanas después de la vacunación mediante una prueba de neutralización del suero con referencia a un antisuero estándar<sup>3</sup>.

Se recogen los huevos para incubarlos 5–7 semanas después de la vacunación y posteriormente se desafían 25 pollos de la progenie a las 3 semanas de vida mediante gota en el ojo con aproximadamente 100 CID<sub>50</sub> de una cepa virulenta reconocida del IBDV. También se desafían diez pollos control del mismo tiempo de eclosión pero procedentes de progenitores no vacunados. Se evalúa la protección 3-4 días después del desafío extrayendo la bolsa de Fabricio de cada una de las aves; entonces cada bolsa se somete a examen histológico o se analiza para detectar la presencia del antígeno de la BI mediante la prueba de precipitina en gel de agar. No deberían mostrar evidencias de infección por el IBDV más de tres pollos procedentes de progenitores vacunados, mientras que deberían verse afectados todos los procedentes de los no vacunados.

Se deberían repetir estos procedimientos hacia el final del periodo de puesta cuando las aves vacunadas tengan al menos 60 semanas de vida, pero en esta ocasión se debería establecer el desafío de la progenie cuando tengan 15 días.

La prueba de eficacia se debería repetir en aves estimuladas vacunadas mediante el programa recomendado. La dosis final de la vacuna muerta se administra a la edad más temprana recomendada. Se realizan pruebas con los pollos eclosionados a partir de los huevos fértiles recogidos al comienzo y final de la puesta para determinar el grado de protección frente al desafío, como se ha descrito más arriba.

Solo se necesita realizar estas pruebas una vez con un lote típico de vacuna.

## 2. Método de producción

La vacuna se debe producir en un lugar adecuado, limpio y seguro, bien separado de las instalaciones de diagnóstico y de las aves de corral comerciales.

La producción de la vacuna debería realizarse con un sistema del lote de inóculo utilizando una cepa adecuada del virus de origen e historia de pases conocida. Se deben emplear huevos SPF para todos los materiales empleados en la propagación y ensayos de la vacuna. Las vacunas vivas se preparan creciéndolas en huevos o en cultivos celulares. Las vacunas inactivadas de la BI pueden hacerse utilizando el virus virulento crecido en las

3 Véase nota a pie de página 2

bolsas de aves jóvenes o empleando cepas del IBDV atenuadas, adaptadas al laboratorio, crecidas en cultivo celular o en huevos embrionarios. Se necesita una concentración vírica elevada. Estas vacunas se fabrican en forma de emulsiones de agua en aceite. Una fórmula típica es utilizar aceite mineral al 80% en una suspensión del material bursal al 20% en agua, con los agentes emulsionantes adecuados.

### 3. Control del proceso

*Contenido antigénico:* Una vez cultivado el virus a concentración elevada, se debería ensayar su título para ser utilizado en cultivos celulares, embriones o pollos según la forma más apropiada de la cepa vírica que se esté usando. El contenido antigénico necesario para producir lotes satisfactorios de vacuna se debería basar en las determinaciones hechas en la vacuna de prueba que ha demostrado ser efectiva en los ensayos de laboratorio y de campo.

*Inactivación de las vacunas muertas:* Con frecuencia se hace con beta-propiolactona o formalina. Se debe demostrar que, bajo las condiciones de producción de la vacuna, tanto el agente inactivador como el procedimiento de inactivación producen la inactivación del virus de la vacuna y de cualquier otro potencial contaminante, p. ej. bacterias, que pueda proceder de los materiales iniciales.

Antes de la inactivación de las vacunas muertas es necesario que se consiga una suspensión homogénea y libre de partículas para asegurar que el agente inactivador podría no haber penetrado. Se debería realizar una prueba de inactivación de la vacuna en cada lote tanto del producto sin procesar después de la inactivación como del producto final. La prueba seleccionada debería ser apropiada para el virus de la vacuna que se esté utilizando y debería consistir en al menos dos pases en cultivos celulares susceptibles, embriones o pollos, con diez réplicas por pase. No se debería detectar la presencia de ningún virus o microorganismo vivo.

*Esterilidad de las vacunas muertas:* El aceite que se emplea en la vacuna debe esterilizarse por calor a 160°C durante una hora, o por filtración, y se debe demostrar que el procedimiento es efectivo. En cada lote de vacuna final se realizan pruebas apropiadas para las vacunas en emulsión de aceite como se describe, por ejemplo, en la Farmacopea Europea.

### 4. Control de lotes

#### a) Esterilidad

En el Capítulo I.1.5 se pueden encontrar las pruebas para determinar la esterilidad y ausencia de contaminación de los materiales biológicos.

#### b) Inocuidad

- **Prueba de inocuidad de la vacuna viva**

Se administran diez dosis de campo de vacuna por la vía de la gota en el ojo a 15 pollos SPF de la edad mínima recomendada para la vacunación y no mayores de 2 semanas. Se observan los pollos durante 21 días. La prueba debe repetirse si más de dos pollos mueren debido a causas no relacionadas con la vacuna. La vacuna no consigue pasar la prueba si cualquiera de los pollos muere o muestra signos de enfermedad atribuibles a la vacuna. Esta prueba se realiza en cada lote de la vacuna final.

- **Prueba de inocuidad de la vacuna muerta**

Se inoculan diez aves SPF, de 14-28 días de vida, por las vías recomendadas con el doble de la dosis de campo. Se observan las aves durante 3 semanas. No deberían desarrollar reacción sistémica o local anormal. La prueba se realiza en cada lote de la vacuna final.

#### c) Potencia

- **Prueba de potencia de la vacuna viva**

Puede llevarse a cabo una prueba de potencia (titulación del virus) en huevos o en cultivos celulares en cada serie (lote) de vacuna producida. Además, se debe utilizar el método descrito en la Sección C.1.c. "Vacuna viva (prueba de eficacia)" en cada lote representativo de todos los preparados a partir de la misma porción de inóculo.

- **Prueba de potencia de la vacuna muerta**

Se vacunan 10 pollos SPF, de aproximadamente 4 semanas de vida, con una dosis de vacuna administrada por la vía recomendada. Se alojan junto con los vacunados 10 aves adicionales control de la misma fuente y edad. Se determina la respuesta de anticuerpos de cada ave 4-6 semanas después de la vacunación en una prueba de NV con referencia a un antisuero estándar. El nivel medio de anticuerpos de las aves vacunadas no debería ser significativamente menor que el nivel conseguido en la prueba de protección. No

se deberían detectar anticuerpos en las aves control. Esta prueba debe realizarse en cada lote de vacuna final.

**d) Estabilidad**

Se deberían conseguir evidencias en tres lotes de vacuna que demuestren que la vacuna pasa la prueba de potencia de lotes 3 meses más allá del periodo de validez solicitado.

**e) Conservantes**

Normalmente es necesario un conservante para la vacuna en los contenedores multidosis. Se debería comprobar la concentración del conservante en la vacuna final y su persistencia a lo largo del periodo de validez. Para tales propósitos se debería utilizar un conservante previamente establecido.

**f) Precauciones (riesgos)**

Las vacunas en emulsión de aceite causan lesiones graves al vacunador si se inyecta accidentalmente en la mano o en otros tejidos. En el caso de que una persona sufra tal accidente, debería ir de inmediato al hospital y llevar consigo a la vez el paquete de la vacuna. Cada paquete y botella de vacuna se debería rotular de forma clara con una advertencia de las consecuencias serias que entraña la lesión accidental. El médico que atienda a la víctima debería tratar tal herida considerándola como "herida por inyección de grasa".

**5. Pruebas sobre el producto final**

**a) Inocuidad**

Véase Sección C.4.b.

**b) Potencia**

Véase Sección C.4.c.

**REFERENCIAS**

1. AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN PATHOLOGY (1989). Chapter 43. *En: Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, Third Edition. Kendall/Hunt Publishing, Dubuque, Iowa, EE.UU.
2. AZAD A.A, JAGADISH M.N., BROWN M.A. & HUDSON P.J. (1987). Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology*, **161**, 145–152.
3. BROWN M.D., GREEN P. & SKINNER M.A. (1994). VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of classical strains. *J. Gen. Virol.*, **75**, 675–680.
4. CULLEN G.A. & WYETH P.J. (1975). Quantitation of antibodies to infectious bursal disease. *Vet. Rec.*, **97**, 315.
5. CULLEN G.A. & WYETH P.J. (1976). Response of growing chickens to an inactivated IBD antigen in oil emulsion. *Vet Rec.*, **99**, 418.
6. DARTEIL R., BUBLOT M., LAPLACE E., BOUQUET J.F., AUDONNET J.C. & RIVIÈRE M. (1995). Herpes virus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induces protection against an IBDV virulent challenge in chickens. *Virology*, **211**, 4781–4790.
7. DAVIS V. & BOYLE J.A. (1990). Random cDNA probes to infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, **34**, 329–335.
8. ETERRADOSSI N., ARNAULD C., TEKAIA F., TOQUIN D., LE COQ H., RIVALLAN G., GUITTET M., DOMENECH J., VAN DEN BERG T.P. & SKINNER M.A. (1999). Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate. *Avian Pathol.*, **28**, 36–46.
9. ETERRADOSSI N., ARNAULD C., TOQUIN D. & RIVALLAN G. (1998). Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch. Virol.*, **143**, 1627–1636.

10. ETERRADOSSI N., PICAULT J.P., DROUIN P., GUITTET M., L'HOSPITALIER R. & BENNEJEAN G. (1992). Pathogenicity and preliminary antigenic characterization of six infectious bursal disease virus strains isolated in France from acute outbreaks. *J. Vet. Med. [B]*, **39**, 683–691.
11. ETERRADOSSI N., RIVALLAN G., TOQUIN D. & GUITTET M. (1997). Limited antigenic variation among recent infectious bursal disease virus isolates from France. *Arch. Virol.*, **142**, 2079–2087.
12. FAHEY K.J., MCWATERS P., BROWN M.A., ERNY K., MURPHY V.J. & HEWISH D.R. (1991). Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. *Avian Dis.*, **35**, 365–373.
13. HADDAD E.E., WHITFILL C.E., AVAKIAN A.P., RICKS C.A., ANDREWS P.D., THOMA J.A. & WAKENELL P.S. (1997). Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Dis.*, **41**, 882–889.
14. JACKWOOD D.H. & SAIF Y.M. (1987). Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.*, **31**, 766–770.
15. JACKWOOD D.J. (1990). Development and characterization of nucleic acid probes to infectious bursal disease viruses. *Vet. Microbiol.*, **24**, 253–260.
16. JACKWOOD D.J. & JACKWOOD R.J. (1997). Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. *Avian Dis.*, **41**, 97–104.
17. KOUWENHOVEN B. & VAN DER BOS J. (1993). Control of very virulent infectious bursal disease (Gumboro disease) in the Netherlands with so called 'hot' vaccines. Proceedings of the 42nd Western Poultry Disease Conference, Sacramento, California, EE.UU., 37–39.
18. KWANG M.J., LU Y.S., LEE L.H., LIN D.F., LIAO Y.K. LEE C. & LEE Y.L. (1987). Detection of infectious bursal disease viral antigen prepared from the cloacal bursa by ELISA. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.*, **13**, 265–269.
19. LASHER H.N. & SHANE S.M. (1994). Infectious bursal disease. *World's Poult. Sci.*, **50**, 133–166.
20. LIM B.L., CAO Y., YU T. & MO C.W. (1999). Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284. *J. Virol.*, **73**, 2854–2862.
21. LIN Z., KATO A., OTAKI Y., NAKAMURA T., SASMAZ E. & UEDA S. (1993). Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis.*, **37**, 315–323.
22. LUKERT P.D. & SAIF Y.M. (1997). Infectious bursal disease. *En: Diseases of Poultry*, Tenth Edition, Calnek B.W., ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, EE.UU., 721–738.
23. MARQUARDT W.W., JOHNSON R.B., ODENWALD W.F. & SCHLOTTHOKEN B.A. (1980). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, **24**, 375–385.
24. MEULEMANS G., ANTOINE O. & HALEN P. (1977). Application de l'immunofluorescence au diagnostic de la Maladie de Gumboro. *OIE Bull.*, **88**, 225–229.
25. MUNDT E. (1999). Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *J. Gen. Virol.*, **80**, 2067–2076.
26. MUSKETT J.C., HOPKINS I.G., EDWARDS K.R. & THORNTON D.H. (1979). Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: Efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. *Vet. Rec.*, **104**, 332–334.
27. REED L.J. & MUENCH H. (1938). A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.*, **27**, 493–497.
28. ROSENBERGER J.K. & CLOUD S.S. (1986). Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **189**, 357.
29. ROSENBERGER J.K., KLOPP S., ECKROADE R.J. & KRAUSS W.C. (1975). The role of the infectious bursal agent and several adenoviruses in the hemorrhagic-aplastic anaemia syndrome and gangrenous dermatitis. *Avian Dis.*, **19**, 717–729.



30. SCHNITZLER D., BERNSTEIN F., MÜLLER H. & BECHT H. (1993). The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.*, **74**, 1563–1571.
31. SKEELES J.K., LUKERT P.D., FLETCHER O.J. & LEONARD J.D. (1979). Immunisation studies with a cell-culture adapted infectious bursal virus. *Avian Dis.*, **23**, 456–465.
32. SMILEY J.R., SOMMER S.E. & JACKWOOD D.J. (1999). Development of a ssRNA internal control reagent for an infectious bursal disease virus reverse transcription / polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism diagnostic assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 497–504.
33. SNYDER D.B., LANA D.P., SAVAGE P.K., YANCEY F.S., MENGEL S.A. & MARQUARDT W.W. (1988). Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: Evidence for a major antigenic shift in recent field isolates. *Avian Dis.*, **32**, 535–539.
34. SNYDER D.B., VAKHARIA V.N. & SAVAGE P.K. (1992). Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. *Arch. Virol.*, **127**, 89–101.
35. THORNTON D.H. & MUSKETT J.C. (1982). Quality control methods for inactivated infectious bursal disease vaccines. *Dev. Biol. Stand.*, **51**, 235–241.
36. THORNTON D.H. & PATTISON M. (1975). Comparison of vaccines against infectious bursal disease. *J. Comp. Pathol.*, **85**, 597–610.
37. VAKHARIA V.N., HE J., AHAMED B. & SNYDER D.B. (1994). Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res.*, **31**, 265–273.
38. VAN DEN BERG T.P., GONZE M., MORALES D. & MEULEMANS G. (1996). Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain. *Avian Pathol.*, **25**, 751–768.
39. VAN DEN BERG T.P. & MEULEMANS G. (1991). Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. *Avian Pathol.*, **20**, 409–421.
40. WU C.C., LIN T.L., ZHANG H.G., DAVIS V.S. & BOYLE J.A. (1992). Molecular detection of infectious bursal disease virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **36**, 221–226.
41. WYETH P.J. & CULLEN G.A. (1979). The use of an inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccine in commercial broiler parent chickens. *Vet. Rec.*, **104**, 188–193.
42. ZIERENBERG K., RAUE R., & MULLER H. (2001). Rapid identification of very virulent strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis. *Avian Pathol.*, **30**, 55–62.

#### REVISIONES RECIENTES

- A. ETERRADOSSI N. (2001). Major advances in infectious bursal disease virus (IBDV) research since the first International IBDV/CIAV Symposium (Rauischolzhausen, Alemania, 1994). Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anaemia, Kaleta E. & Heffels-Redmann U., eds. Rauischholzhausen, Alemania, 16–20 June 2001, 6–23.
- B. VAN DEN BERG T.P. (2000). Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol.*, **29**, 175–194.

\*

\* \*

**NB:** Existen laboratorios de referencia de la OIE para la Bursitis infecciosa (Enfermedad de Gumboro) (véase Cuadro de la Parte 3 de este *Manual de animales terrestres* o consúltese la página Web de la OIE para conseguir la relación más actualizada: [www.oie.int](http://www.oie.int)).