

Universidad de Guadalajara

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



Evaluación de dos Vacunas contra la Enfermedad de Gumboro en Pollo de Engorda, aplicadas a 2, 7 y 14 días de edad, Empleando las Pruebas de Virus Suero Neutralización, Precipitación en Agar y Análisis Histopatológico.

Tesis Profesional

para obtener el Título de:

Médico Veterinario Zootecnista

Presenta:

Enrique Vázquez Vázquez

Guadalajara, Jal., 1987.

"EVALUACION DE DOS VACUNAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE GUMBORO EN POLLO DE ENGORDA, APLICADAS A 2, 7 y 14 DIAS DE EDAD, EMPLEANDO LAS PRUEBAS DE VIRUS SUERO NEUTRALIZACION, PRECIPITACION EN AGAR Y ANALISIS - HISTOPATOLOGICO"

T E S I S T A:

ENRIQUE VAZQUEZ VAZQUEZ.

DEDICATORIAS:

En todo trabajo escrito, por pequeño o grande que sea, el dejar constancia de agradecimiento a todas aquellas personas que directa o indirectamente contribuyeron a su realización es una costumbre impuesta por la tradición que permite a su realizador manifestar sus sentimientos de gratitud para con todos ellos.

A mi padre SALVADOR VAZQUEZ ANGEL
como muestra de respeto y cariño
a quien con su rectitud ejemplar
y calidad humana, ha dirigido mi
vida.

A mi madre MARIA VAZQUEZ CAMPOS
por su abnegación y apoyo moral
que en vida me dedicó y a quien
debo en gran parte lo que ahora
soy.

A MIS HERMANOS:

Ofelia

J. Refugio

Jorge

Ma. Engracia

Ma. del Socorro

Y

Salvador

A mi esposa MONICA GUILLERMINA
por su incondicional apoyo y
colaboración a la conclusión
de éste pequeño trabajo.

A mi hijo ENRIQUE, de quien espero
que el día de mañana tenga las
oportunidades para estudiar y desa
rollarse como ahora yo las tengo.

Para mi Amigo y Maestro M.V.Z. JAVIER RIVERA HERNANDEZ por su ayuda y apoyo profesional que ha hecho posible la culminación de este trabajo.

Al Honorable JURADO, por todas las atenciones que tan amablemente me brindaron.

A los M.V.Z. ERNESTO ZAMORA NUÑO y JUAN ANTONIO GONZALEZ MENDOZA, por su apoyo y dirección a lo largo de mi carrera.

Al DR. JOSE QUEZADA FOX, por su desinteresada ayuda.

Al SR. JUAN MANUEL PADILLA HERNANDEZ, por permitirme aplicar los conocimientos y continuar aprendiendo.

Un AGRADECIMIENTO ESPECIAL, a todas y cada una de las personas que directa o indirectamente colaboraron para mi formación.

C O N T E N I D O :

INTRODUCCION

MATERIAL

METODO

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSIONES

SUMARIO

BIBLIOGRAFIA

REPORTE DE ANOMALIAS

CUCBA

A LA TESIS:

LCUCBA01535

Autor:

Vazquez Vazquez Enrique

Tipo de Anomalía:

Errores de Origen: Sin folios

I N T R O D U C C I O N :

- I N T R O D U C C I O N -

La difícil situación económica por la que atravie-
za el país y considerando el importante papel que juega
actualmente la patología aviar, ponen a la vista el im-
pacto tremendo a que se ve sometida la industria avíco-
la, obligando tanto a los productores como al personal
especializado a buscar, ahora más que nunca, ser más e-
ficientes en la producción.

A nivel nacional se tiene la certeza, que por las
características especiales que presenta la cría de po-
llo de engorda, es uno de los renglones a los que se -
tiene que dar mayor importancia debido principalmente a
la eficiencia y velocidad para transformar proteína ve-
getal en proteína animal. (1)

Actualmente se estima que a nivel nacional se cu-
ta con una población avícola de:

REPRODUCTORAS LIGERAS:	888,000
REPRODUCTORAS PESADAS:	3'500,000
GALLINAS DE POSTURA:	78'752,000
POLLA DE REPOSICION:	27'500,000
POLLO DE ENGORDA:	38'000,000 (Producción mensual) (2)

Debido a la importancia que tiene la actividad avícola y a los efectos negativos a que se ve sometida la misma, es necesario implementar los mecanismos que permitan optimizar la producción, específicamente en pollo de engorda, manejando las alternativas con que se cuenta para contrarrestar la causa y los efectos que plantea la enfermedad de Gumboro.

Aunque la citada enfermedad forma parte de un complejo de patologías que afectan a las aves, debemos sumar a éstas la falta de uniformidad en la planeación de las granjas y una serie de fenómenos que van desde la inconsistente calidad de materias primas para la elaboración de los alimentos, hasta la escasa organización y conciencia para tomar acciones conjuntas, no sin antes observar las diferencias en la formación técnica de los responsables del manejo de muchas granjas que dejan ver entre sí, que el problema principal no es la existencia de ésta o éstas enfermedades, sino la facilidad que se les ha brindado para perpetuarse y acentuar su presencia.

Por tal motivo es necesario hacer una pequeña revisión a los diagnósticos emitidos por el Departamento de Producción Animal (Aves), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.

En los cuadros Nº. 1 y Nº. 2, se muestra una relación de los diagnósticos realizados en el Departamento de Producción Animal; aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., durante los años de 1981, 1982 y 1983. De este listado se puede adquirir una visión principalmente cualitativa de los problemas patológicos de orden común en México, permitiendo también hasta cierto punto, inferir la importancia económica de los mismos.

La enfermedad de Gumboro o Infección de la Bolsa de Fabricio (IBF), es una enfermedad altamente difundida en México y en gran número de países donde la explotación avícola se considera como industria mayor.(1)

C U A D R O N º 1

FRECUENCIA EN ORDEN DECRECIENTE DE LOS DIAGNOSTICOS
EMITIDOS EN EL DPA: A EN LOS AÑOS DE 1981, 1982 Y 1983*

1981 DIAGNOSTICO	%	1982 DIAGNOSTICO	%	1983 DIAGNOSTICO	%
Colibacilo- sis	27.5	Inf. del sa- co vitelino/ nfalitis	17.5	Inf. de la bolsa de - Fabricio	19.3
Inf. del sa co vitelino/ enfalitis	21.9	Inf. de la bolsa de Fa bricio	17.3	Colibacilo sis	18.6
Inf. de la Bolsa de Fa bricio	16.2	Enf. respi- ratoria cró nica	16.1	Enf. respi ratoria - crónica	9.5
Tifoidea a- viar	7.5	Tifoidea a- viar	11.4	Tifoidea a viar	9.2
Enf. de Ma- rek	4.6	Arizonosis	6.8	Enf. de - Newcastle	4.8
Enf. respi- ratoria cró nica	3.9	Aspergilosis	5.4	Enf. de Ma rek	4.0

Necrosis de la cabeza - del fémur	3.5	Laringotraqueitis	4.7	Inf. del <u>sa</u> co vitelino onfalitis	4.0
Enf. de New castle	2.3	Enf. de Marek	4.0	Síndrome ascítico	4.0
Raquitismo	1.4	Enf. de New castle	3.7	Bronquitis infecciosa	3.7
Coccidiosis	1.2	Raquitismo	3.3	Aspergilo- sis	3.3
Artritis <u>vi</u> ral	0.2	Encefalomie litis	0.5	Micotoxico sis	0.1
		Def. nut. - múltiple	0.5	Encefalo-- mielitis	0.1
		Reovirosis	0.5	Sinovitis infecciosa	0.1
		Intox. con warfarina	0.2	Sarna <u>esca</u> mosa	0.1
		Moniliasis	0.2	Reticuloen doteliosis	0.1
		Clamidiosis (probable)	0.2	Discondro- plasia	0.1
		Moniliasis	0.2	Moniliasis	0.1
		Diatesis - exudativa	0.2	Def. com-- plejo B	0.1
		Cólera aviar	0.2	Septicemia	0.1

Discondro- plasia	0.2	Ectoparasi tosis	0.1
Sarcospori diosis	0.2	Eritroblas tosis	0.1
Intox. me- dicamento- sa	0.2	Tenosinovi tis infec- ciosa	0.1
Acarosis - externa	0.2	Estafiloco cosis	0.1
Histomon <u>ia</u> sis	0.2		
Carcinoma ovárico	0.2		
Acuariosis	0.2		
Intox. por furázolido na	0.2		

T O T A L	100	100	100
-----------	-----	-----	-----

* SOLAMENTE DE CASOS CLINICOS EN QUE FUERON PRESENTADAS
AVES PARA SU ESTUDIO.

C U A D R O N º. 2

FRECUENCIA POR EDADES DE ALGUNAS ENFERMEDADES
DIAGNOSTICADAS EN EL DPA:A DURANTE LOS AÑOS
DE 1981, 1982 Y 1983 EXPRESADA PORCENTUALMENTE

	1 9 8 1			1 9 8 2			1 9 8 3		
	0 - 4*	5 - 20	+ 20	0 - 4	5 - 20	+ 20	0 - 4	5 - 20	+ 20
Inf. de la bolsa de Fabricio	47.4	52.6	0	33.8	66.2	0	50.9	49.1	0
Enf. respiratoria crónica	5.5	72.2	22.3	50.7	42.0	7.2	33.3	66.7	0
Tifoidea Aviar	64.9	2.7	32.4	42.8	30.9	26.3	55.1	14.3	30.6
Enf. de Marek	0	63.1	36.9	0	43.7	56.3	0	44.4	55.6
Enf. de Newcastle	18.2	72.7	9.1	64.3	35.7	0	55.0	45.0	0
Aspergilosis	100	0	0	83.3	5.5	11.2	52.9	35.3	11.8

* EDAD EN SEMANAS.

La enfermedad de Gumboro (IBF) es de gran importancia económica no tan solo por la mortalidad sino por los diferentes eventos en que se ve envuelto el pollo a lo largo de su vida, ya que el agente infectante presenta gran especificidad para atacar y destruir a las células linfoides (linfocitos B de la Bolsa de Fabricio y linfocitos T del Timo), produciendo finalmente grandes daños al sistema inmunológico, que se van a reflejar en una disminución de la capacidad de las aves para reaccionar frente a las vacunas o antígenos a que sean expuestas. (5)

La enfermedad de Gumboro se presenta en dos formas:

a) La forma clínica:

Es común en aves de 3 a 6 semanas de edad, observándose una diarrea blanca, depresión, temores y generalmente aves debilitadas. Casi un 100 % de las aves afectadas pueden mostrar estos signos, sin embargo, la mortalidad es usualmente baja. La recuperación es rápida, a menudo de 5 a 7 días.

b) La forma sub-clínica:

El peligro real de la enfermedad de Gumbo radica en la presentación de ésta forma, ya que los pollitos infectados muestran pocos signos de los mencionados en la forma clínica, sin embargo, la enfermedad ocasiona gran daño al destruir el sistema inmune del ave. Esto abre la puerta a fallas en las vacunaciones y pérdidas económicas debidas a enfermedades normalmente controladas a través del uso de vacunas. (El fenómeno antes citado recibe el nombre de inmunosupresión). (6)

INMUNOSUPRESION:

El término implica una disfunción del sistema inmune (sea temporal o permanente), resultante de una lesión a ese sistema y acompañado de una susceptibilidad aumentada a las enfermedades. Ambos, los factores ambientales y los agentes infecciosos, han sido encontrados como causa de inmunosupresión en parvadas comerciales. Los factores ambientales pueden influenciar la respuesta inmune por dos mecanismos:

Primero, por toxicidad directa e inhibición de las células inmunes, como sucede con las aflatoxinas e inmunosupresión inducida por drogas y segundo por la estimulación directa de las glándulas adrenales así como aumento en la producción de corticoesteroides, como ocurre durante períodos de tensión física (temperaturas extremas, manejo, sobrepoblación, etc.).

Entre los agentes infecciosos, los virus que invaden los linfocitos son especialmente propensos para introducir la inmunosupresión. Por ejemplo, el VIBF replica en las células B, productoras de IgM y las destruye; el virus de la leucosis linfoide convierte las células B hacia células cancerosas; y la infección por el virus de la enfermedad de Marek, ya sea que mate rápidamente a las células T o las transforma en cancerosas. Actualmente la inmunosupresión inducida por el VIBF, se considera de la mayor significación entre las causas infecciosas. (4)

La Bolsa de Fabricio, una parte importante del sistema inmune, es blanco del virus de Gumboro, (BIRNAVIRUS). La bolsa infectada aumenta en tamaño y peso al principio. Esta puede aumentar al doble de su tamaño normal al pico de la infección, pero retorna rápidamente a su peso normal.

Luego ocurre una rápida degeneración hasta llegar a una fracción de su tamaño original. A éste punto se presenta un color grisáceo. Además de las lesiones de la bolsa, es común encontrar hemorragias en los músculos del muslo y la pechuga. Las aves que mueren de Gumboro, pueden presentar serio daño renal y grandes cantidades de moco en intestino. (6)

El virus de Gumboro es excretado en las heces de las aves afectadas y permanece viable en las salas de incubación por meses. Pollos susceptibles se infectan fácilmente por el consumo de alimento y agua contaminados con heces y cama. El virus se replica en los órganos linfoides incluyendo ganglios cecales, bazo y especialmente Bolsa de Fabricio, donde destruye a las células B. (4)

OBJETIVO

- O B J E T I V O -

Evaluar los resultados obtenidos en la aplicación de dos vacunas de Gumboro cepa Lukert. Una elaborada en embrión de pollo y la otra en cultivo celular, apli cadas en pollo de engorda a los 2, 7 y 14 días de edad, empleando las técnicas de virus suero neutralización, precipitación en agar y análisis histopatológico.

M A T E R I A L :

- M A T E R I A L -

INSTALACIONES:

Dos casetones con una superficie de 1500 metros cuadrados, equipados con comedero tubular y bebedero automático.

BIOLOGICO:

- a) 40,000 pollitos mixtos (comerciales), de un día de edad.
- b) Vacuna " A ", contra la enfermedad de Gumboro - (Virus Activo Modificado), cepa Lukert modificada " Cepa Suave ", originada en embriones de pollo, S.P.F.* y Cofal Negativos**, cosechada - en líquido Alantoideo, titulada y estabilizada, mezclada con penicilina como agente bacteriostático.
- c) Vacuna " B ", contra la enfermedad de Gumboro, cepa Lukert, virus originado en cultivos celulares (Monocapas de Fibroblastos de Embrión de Pollo), S.P.F.* y Cofal Negativos**.
- d) Alimento para las etapas correspondientes, producido en la planta de alimentos de la misma granja y administrado ad libitum.

LABORATORIO:

- e) 10 Sueros y 4 Bolsas de Fabricio. 4 Timos y 4 Bazos, por parvada y por muestreo.
- f) Laboratorio de Análisis Clínicos, del Departamento de Producción Animal. Fac. Med. Vet y Zoot. (UNAM).
- g) Laboratorio de Análisis Clínicos Veterinarios.

CONTABLE:

Manejo de parámetros de producción como: Mortalidad, Consumo de Alimento, Peso, Conversión, Índice de Producción y Días al Mercado.

- * LIBRES DE PIROGENOS ESPECIFICOS
- ** NEGATIVO A LEUCOSIS LINFOIDE (FIJACION DE COMPLEMENTO).

M E T O D O :

- M E T O D O -

Se recibieron los pollitos y se dividieron en dos grupos de 20,000 cada uno, alojándose en condiciones si milares, empleando equipo convencional; comedero y bebe dero de preiniciación, rodete y criadoras inicialmente, continuando con comedero tubular de 8 Kgs. y bebedero automático. Se administró alimento ad libitum elaborado en la planta de alimentos de la misma granja.

Se empleó en ambas parvadas vacuna contra el Gumbo ro, cepa Lukert, elaborada una en embrión de pollo y la otra en cultivo celular, de diferentes laboratorios, ad ministrándose a 2, 7 y 14 días de edad en el agua de be bida. De igual manera se complementó el calendario de Gumboro con vacunas de Newcastle, Bronquitis y Viruela, diseñado para la zona.

Para determinar la efectividad de las vacunas de Gumboro, se tomaron muestras de sangre (Punción Intra cardíaca), requiriendo de 3 a 4 Ml., para obtener de 0.5 a 0.7 Ml. de suero para ser enviado al laboratorio para su análisis. (Virus Suero Neutralización y Preci pitación en Agar). De igual manera se procedió a sacri ficar 5 aves (al azar), para obtener Bolsa de Fabri cio, Timo y Bazo, mismos que fueron remitidos al labo ratorio para que le sea practicado el análisis histopa tológico.

El muestreo se realizó al 1, 7, 14, 21, 28 y 35 días de edad.

Para este trabajo se aplicaron las vacunas mencionadas (Una dosis por aplicación y por pollo), de la siguiente manera:

PRIMERA APLICACION (2º DIA)

Por cada 1000 dosis de vacuna, tres litros de agua y por cada litro de agua 2.5 Grs. de leche - en polvo.

SEGUNDA APLICACION (7º DIA)

Por cada 1000 dosis de vacuna, seis litros de agua y por cada litro de agua 2.5 Grs. de leche - en polvo.

TERCERA APLICACION (14º DIA)

Por cada 1000 dosis de vacuna, doce litros de agua y por cada litro de agua 2.5 Grs. de leche - en polvo.

Análisis de Laboratorio:

PRUEBA DE MICROSERONEUTRALIZACION EN CULTIVO CELULAR
CONTRA EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE LA BOLSA
DE FABRICIO
(METODO BETA)

PROCEDIMIENTO

El método descrito a continuación utiliza diluciones dobles seriadas del suero y una cantidad constante de virus (100 dosis infectantes para cultivo celular 50 %/ 0.05 Ml.). Se utilizan 8 sueros por placa.

1. Coloque 0.05 Ml. de virus en todas las copas de la microplaca de fondo plano para cultivo celular, exceptuando la fila 12 que será el control de células.
2. Coloque 0.05 Ml. de solución salina fosfotada (SSP) en todas las copas de la fila 12.
3. Coloque 0.05 Ml. de una muestra de suero en cada copa de la fila 1 de las hileras A a H. Este procedimiento se realiza con un microdiluidor de 0.05 Ml. que nos permite mezclar la muestra con la SSP.

- Inmediatamente que se ha hecho la primera dilución, se transfiere con el mismo microdiluidor 0.05 Ml. a la copa de la fila 2 y así sucesivamente hasta la fila 11 (1:2 a 1:2048).
4. Incubar las placas a 37°C durante 30 - 45 Min.
 5. Añadir 0.2 Ml. de fibroblastos de embrión de pollo (FEPO) (1:600 en medio de cultivo celular con 10% de suero fetal bovino), a todas las celdillas de la microplaca.
 6. Tapar la microplaca e incubar por 72 Hrs. - aproximadamente antes de proceder a la lectura de la prueba.

El título del suero se considera a la más alta dilución del mismo, capaz de neutralizar la actividad viral, que es detectada por la presencia de efectos citopáticos. Cabe recordar que al realizar la prueba, deberán incluirse sueros controles positivo y negativo, así como un control de células y de virus que nos permitan hacer las comparaciones pertinentes.

Las placas pueden ser leídas en un microscopio in
vertido buscando la presencia de efectos citopáticos,
o bien procediendo a fijar las monocapas presentes -
(una vez descartado el medio) con etanol 1% de cris-
tal violeta, observando un color azul pálido en las di
luciones donde el virus ejerció su efecto, en contras-
te con un color azul fuerte donde esta actividad es -
neutralizada por el suero (igual al control de célu--
las).

PROCEDIMIENTO DE TITULACION DEL VIRUS DE LA
ENFERMEDAD INFECCIOSA DE LA BOLSA DE FABRICIO
QUE SE UTILIZA EN LAS PRUEBAS DE VIRUS SUERO
NEUTRALIZACION

Se utiliza un virus adaptado a FEPO:

1. Prepare diluciones decimales del virus original. Por ejemplo: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ... hasta 10^{-9} ó 10^{-10} . (Estas diluciones pueden ser preparadas en tubos de ensaye).
2. En una caja para pruebas de microteste para cultivo celular, coloque 0.05 Ml. de la dilución 10^{-1} del virus original en las celdillas de la columna Nº. 1 , filas A, B, C, D y E (5 celdillas por cada dilución).
3. Ahora coloque 0.05 Ml. de la dilución 10^{-2} del virus original en las celdillas de la columna Nº. 2, filas A, B, C, D y E y así sucesivamente coloque 0.05 Ml. de cada dilución - en 5 celdillas de la columna respectiva y de las filas A, B, C, D y E (Si trabajamos con 10 diluciones ocuparemos 50 celdillas, columnas 1 a 10, filas A, B, C, D y E).

4. En la fila F de las columnas 1 a 12, agregue 0.05 Ml. del virus original sin diluir.
5. En la fila G de las columnas 1 a 12, agregue 0.05 Ml. de solución salina fosfatada (SSP).
6. A continuación agregue 0.2 Ml. de fibroblastos de embrión de pollo (1:1600 en medio de cultivo celular con un 10% de suero fetal bovino), a cada una de las celdillas con las diluciones del virus, a las celdillas con el virus original y con la SSP.
7. Tapar la microplaca e incubar por 72 horas aproximadamente en una incubadora para cultivo celular.
8. Observe la presencia de efectos citopáticos en el virus original, observando la placa en un microscopio invertido y compare con el control de células. A continuación observe la presencia de efectos citopáticos en las diferentes diluciones. Si se puede establecer una diferencia marcada entre el control de células y las celdillas que contienen virus, se procede a leer la placa y obtener el título.

9. La placa puede ser leída en el microscopio invertido, buscando efecto citopático hasta la más alta dilución (columnas 1 a 10 de las filas A, B, C, D y E), o bien, procediendo a - fijar las monocapas presentes con etanol (una vez descartado el medio) y después agregando una solución al 1% de cristal violeta que se deja por unos cuantos minutos antes de ser enjuagada para permitir la observación de la microplaca con la ayuda de una fuente de luz. En este último caso, se podrá ver que el control de células tendrá un color azul oscuro, mientras que en el caso del virus podrá verse una monocapa destruida, que se verá de color azul más claro.
10. Para obtener el título se procederá a contar el número de celdillas que presentan efectos citopáticos (o destrucción), por cada dilución y a continuación se utiliza el método de Reed y Muench para calcular el título. Obviamente el título tendrá que ser ajustado del -volumen de 0.05 Ml. a 1 Ml. De ésta manera, el título se expresará en términos de DIFEPD 50%/Ml.

Ejemplo $10^{6.4}$ DIFEPD 50%/Ml.

De ésta forma nosotros podemos obtener después -
(como se describe en la técnica de Virus Suero -
Neutralización), el factor de dilución necesario
para obtener 10^2 DIFEPD/0.05 Ml. que son necesarios
en la prueba.

CULTIVO DE FIBROBLASTO DE EMBRION DE POLLO

PROCEDIMIENTO

1. Embriones de 9 - 11 días de edad. Los huevos se desinfectan apropiadamente y se procede a romper la cáscara en el sitio de la cámara de aire. Se extrae el embrión y se coloca en una caja de Petri estéril. Remover la cabeza (decapitar), lo mismo que las extremidades.
2. El embrión se lava una o dos veces con PBS o agua destilada estéril o solución de lavado - preferiblemente.
3. Utilizando tijeras se procede a cortar el embrión, tratando de obtener un producto uniforme en tamaño, lo más pequeño posible. Una alternativa a éste método es utilizar jeringa - de 20 - 30 Ml., colocando los embriones dentro de ella y luego expulsándolos a través de la misma. Este procedimiento es efectivo y ahorra tiempo.

4. Una vez se obtiene el producto homogenizado, se coloca en un frasco de tripsinización con una barra magnética, se agregan aproximadamente 150 Ml, de solución de lavado por cada 8 - embriones y se agita durante 5 - 10 minutos. Las células se dejan en reposo por 5 minutos y se decanta la solución de lavado, teniendo el cuidado de no remover las células.

5. Agregar el volumen apropiado de tripsina al 0.25% en solución de lavado. Las cantidades aproximadas son:

Para 8 - 10 embriones	150 Ml.
Para 11 - 20 embriones	300 Ml.
Para 21 - 30 embriones	400 Ml.

6. La suspensión es agitada durante 20 - 30 Min. a temperatura ambiente. Si se tripsiniza a temperatura de estufa (37°C), el tiempo se debe reducir a 15 minutos.

7. La suspensión se filtra a través de un embudo con gasa estéril. El producto se recibe en tu bos de centrífuga que deben contener suero fe tal bovino (5 Ml. por 50 Ml. de suspensión aproximadamente) con el objeto de suspender la acción de la tripsina.

8. Las células se sedimentan por centrifugación a 400 - 600 RPM por 5 - 10 minutos. Si se encuentran muchos glóbulos rojos, es necesario resuspender las células y centrifugar nuevamente.

9. Las células ya sedimentadas, se deben entonces suspender en medio de crecimiento. Para conocer el volumen de medio que se debe adicionar, es necesario conocer el número de células vivas presentes en la suspensión. Esto se puede conocer contando las células en una cámara cuenta glóbulos (hemocitómetro). Sin embargo, bajo condiciones de diagnóstico y para ganar tiempo, las células se pueden suspender en medio de crecimiento al 0.5 %.

INMUNODIFUSION EN AGAR (Pa de IBF)

La técnica más sencilla consiste en cortar dos pozos redondos de un diámetro de 5 mm, separados por 1 cm. aproximadamente, en una capa de agar en el fondo de una caja de Petri. Uno de los pozos se llena con la solución de antígeno, la otra con el antisuero y los reactivos difunden radialmente a partir de cada pozo. Se establece así un gradiente circular en concentración para cada uno de los reactivos, y estos gradientes terminan superponiéndose. Se producirán así proporciones óptimas para el fenómeno de precipitación en una zona de gradientes superpuestos, apareciendo en esta región una línea de precipitado opaco blanco.

Si se utilizan varias mezclas antígeno-anticuerpo, es poco probable que cada componente alcance proporciones óptimas exactamente en la misma posición. Por consiguiente, se produce una línea de precipitación distinta para cada conjunto de antígenos y anticuerpos presentes y susceptibles de interactuar. Esta prueba también permite saber si existen relaciones entre varios antígenos. Si se preparan dos pozos para antígeno, un pozo para anticuerpos, se formarán líneas de precipitación entre cada pozo de antígeno el pozo de anticuerpos.

Si la continuidad entre estas líneas es absoluta, se considera que los antígenos son idénticos. Pero si las líneas se cruzan, significa que los dos antígenos son diferentes; finalmente, si las líneas se confunden formándose un espolón, existe una identidad parcial y cada uno de los antígenos comparte con el otro ciertos determinantes antigénicos. La línea que se continúa bajo forma de espolón posee determinantes antigénicos que no existen en el otro antígeno. Esta técnica de doble difusión permite identificar la existencia de antígenos o de anticuerpos en los líquidos corporales.

HISTOPATOLOGIA

Este método es de gran importancia para el diagnóstico, además de que complementado con el de sueroneutralización, se obtiene una panorámica de gran valor. El análisis histopatológico comprende dos partes:

PRIMERO:

La recolección o toma de muestra (órgano o parte de éste), continuando con la fijación, lavado, aclaración e inclusión en parafina, procediéndose a realizar los cortes (microtomos) y coloreándose, continuando con el montado (porta y cubre objetos), quedando listo para su observación.

SEGUNDO:

Teniendo el tejido debidamente preparado, se procede a la observación e interpretación de los hallazgos, para establecer el diagnóstico (13).

Se complementó la prueba con los registros generales de producción, evaluando: Fecha de inicio de la parvada, granja, caseta, procedencia, raza, pollos iniciados, vendidos y diferencia, kilogramos de carne vendidos, porcentaje de mortalidad, consumo de alimento por pollo, consumo total de alimento por parvada, peso al mercado, conversión, índice de productividad y promedio días al mercado. (Ver registros en resultados).

R E S U L T A D O S :

R E S U L T A D O S :

Los resultados obtenidos en éste trabajo, se clasifican para su mejor comprensión en catorce gráficas y dos cuadros:

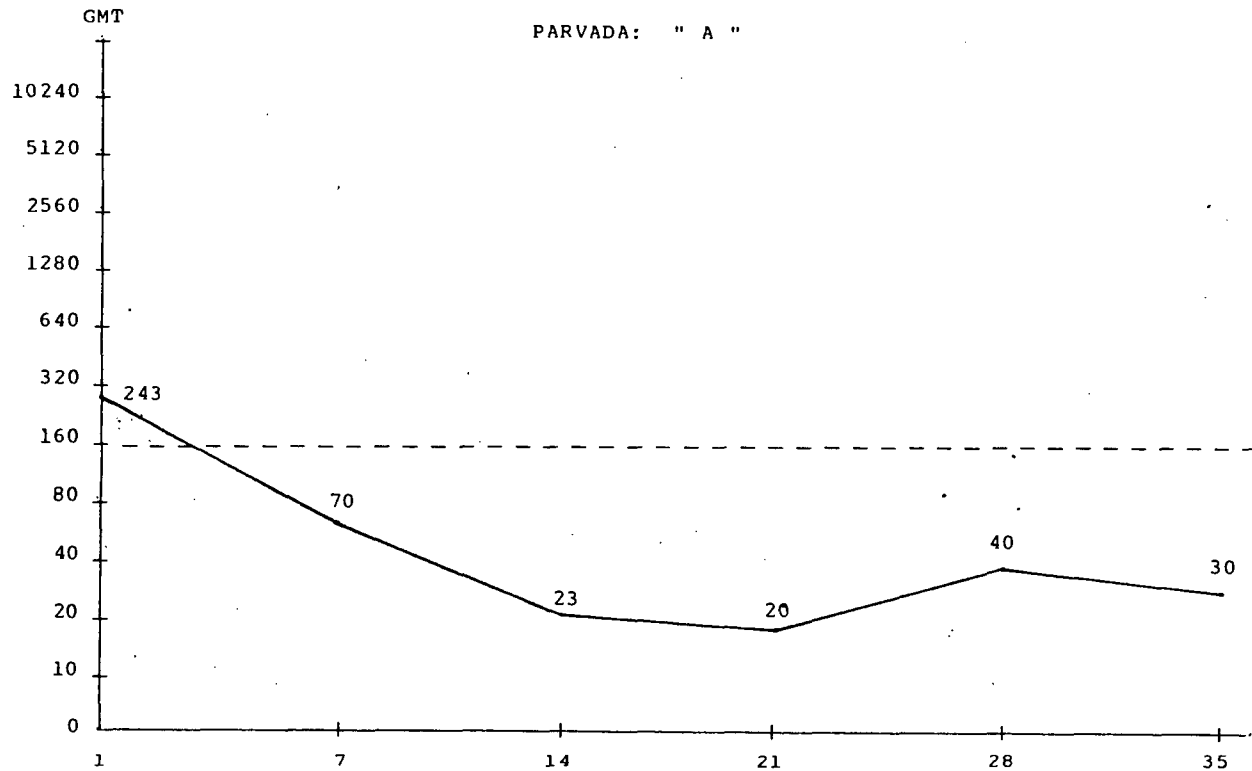
- GRAFICA: 1- GMT (Media Geométrica)
- GRAFICA: 2- GMT (Media Geométrica)
- GRAFICA: 3- VSN de IBF (1 día de edad)
- GRAFICA: 4- VSN de IBF (1 día de edad)
- GRAFICA: 5- VSN de IBF (7 días de edad)
- GRAFICA: 6- VSN de IBF (7 días de edad)
- GRAFICA: 7- VSN de IBF (14 días de edad)
- GRAFICA: 8- VSN de IBF (14 días de edad)
- GRAFICA: 9- VSN de IBF (21 días de edad)
- GRAFICA: 10- VSN de IBF (21 días de edad)
- GRAFICA: 11- VSN de IBF (28 días de edad)
- GRAFICA: 12- VSN de IBF (28 días de edad)
- GRAFICA: 13- VSN de IBF (35 días de edad)
- GRAFICA: 14- VSN de IBF (35 días de edad)

CUADRO Nº. 1 (Resultados de Pa. de IBF.)

CUADRO Nº. 2 (Resultados Histopatológicos)

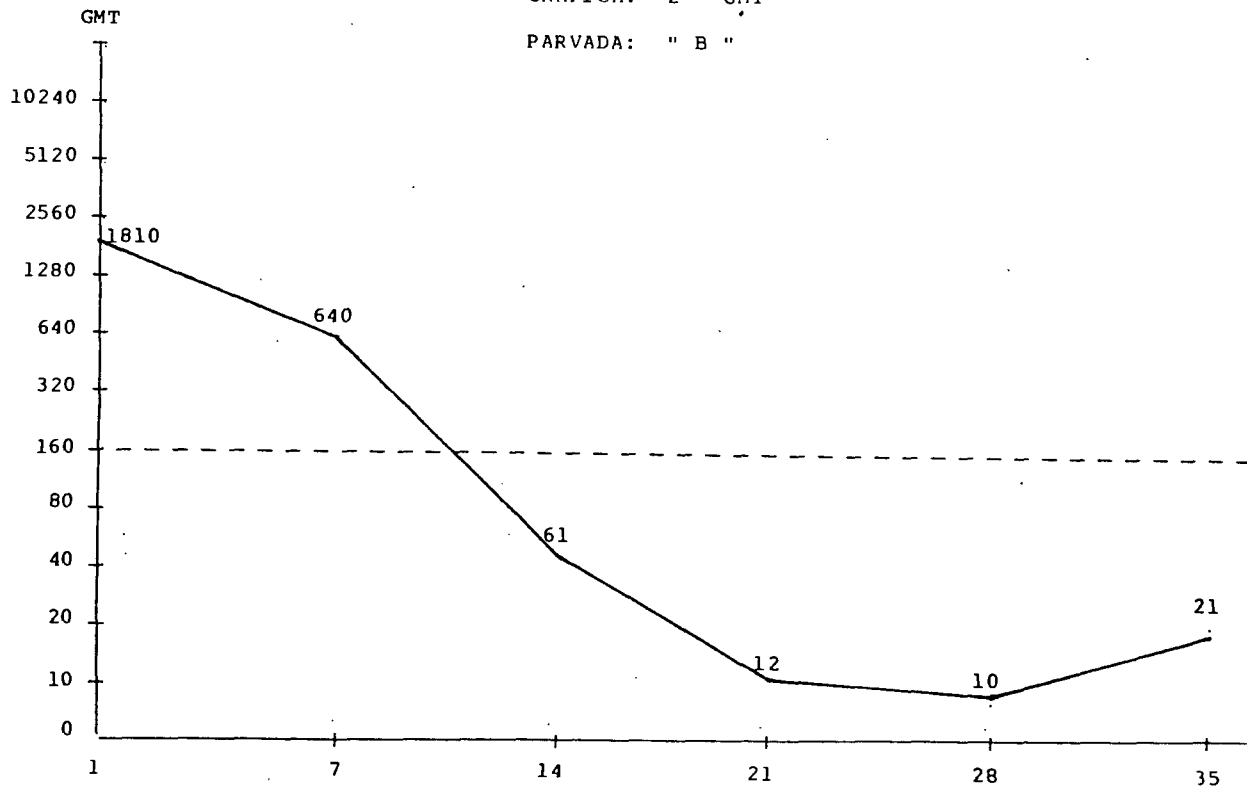
GRAFICA: 1 - GMT

PARVADA: " A "



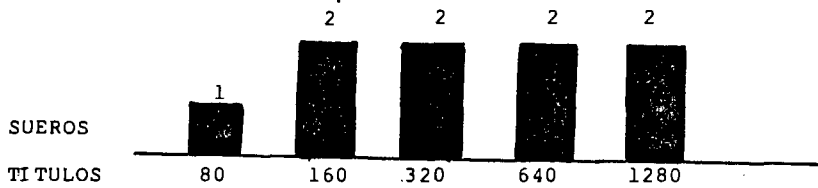
GRAFICA: 2 - GMT

PARVADA: " B "



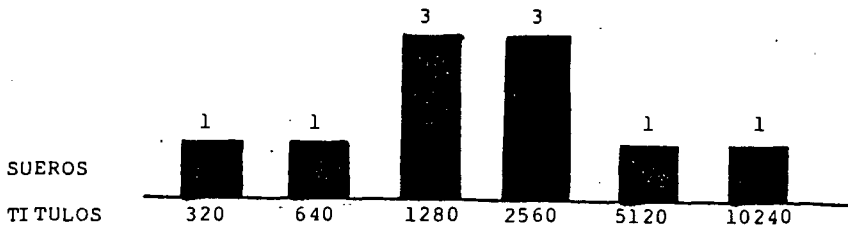
GRAFICA: 3 (VSN de IBF)

PARVADA: "A" EDAD: 1 DIA



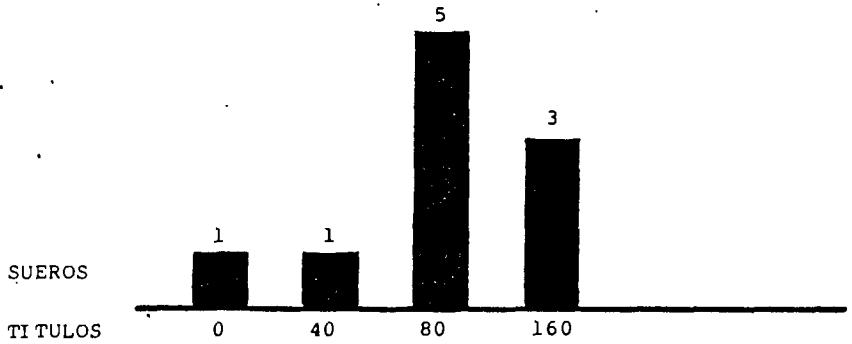
GRAFICA: 4 (VSN de IBF)

PARVADA: "B" EDAD: 1 DIA



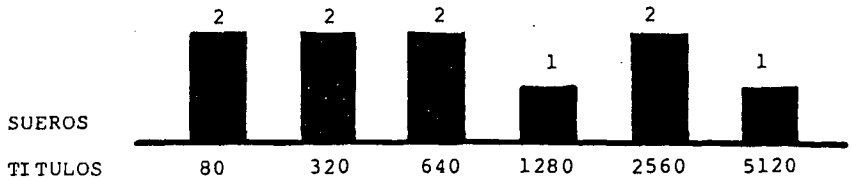
GRAFICA: 5 (VSN de IBF)

PARVADA: "A" EDAD: 7 DIAS



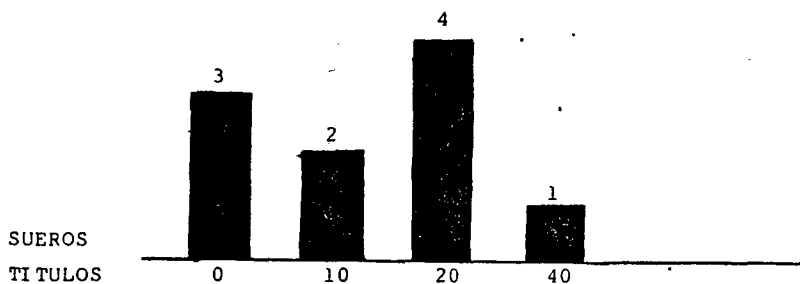
GRAFICA: 6 (VSN de IBF)

PARVADA: "B" EDAD: 7 DIAS



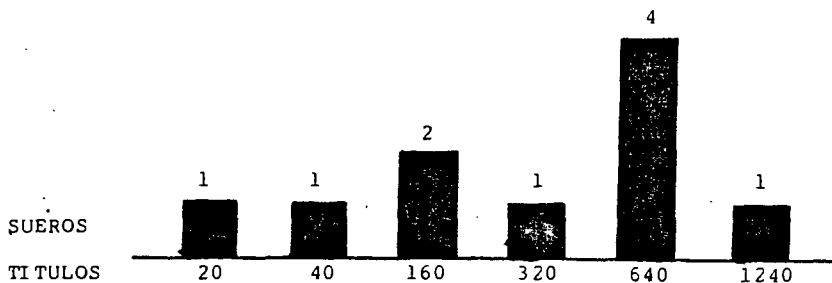
GRAFICA: 7 (VSN de IBF)

PARVADA: "A" EDAD: 14 DIAS



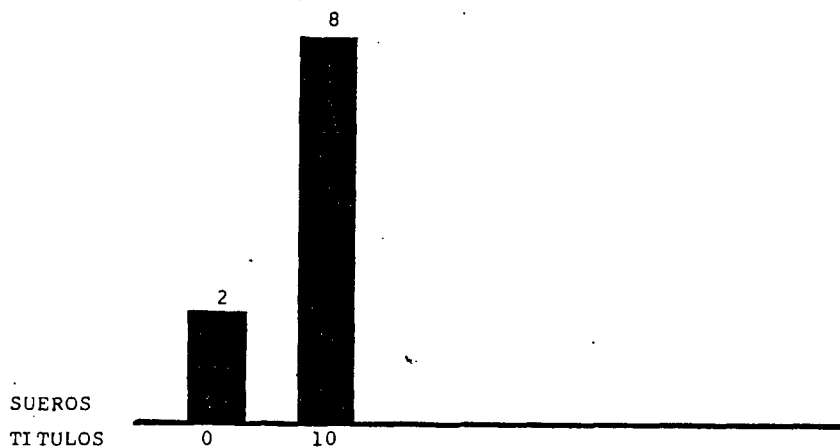
GRAFICA: 8 (VSN de IBF)

PARVADA: "B" EDAD: 14 DIAS



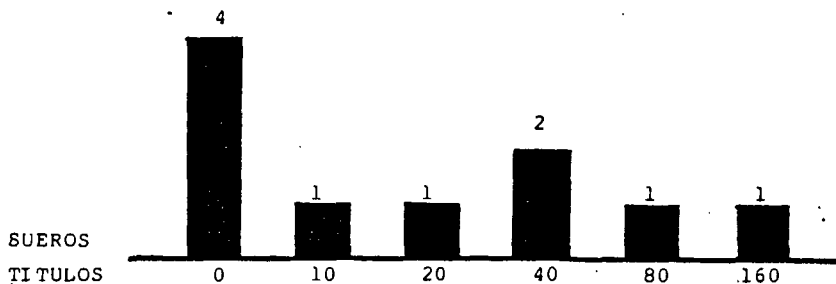
GRAFICA: 9 (VSN de IBF)

PARVADA: "A" EDAD: 21 DIAS



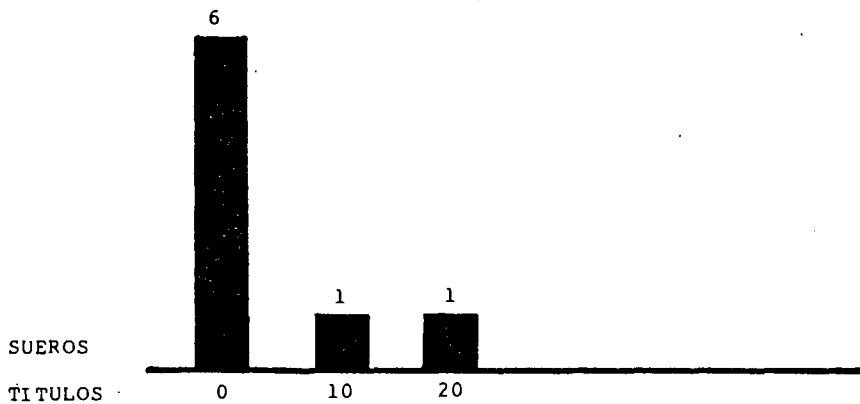
GRAFICA:10 (VSN de IBF)

PARVADA: "B" EDAD: 21 DIAS



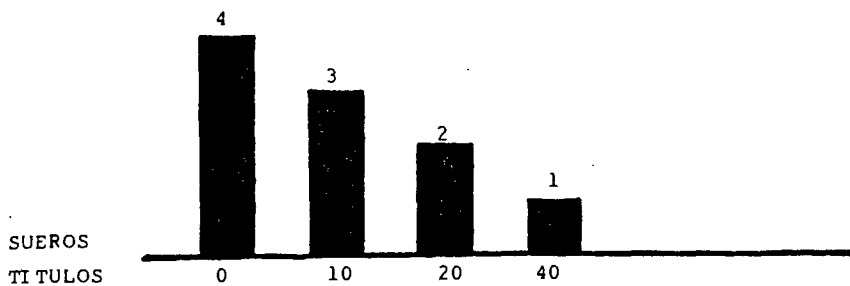
GRAFICA:11 (VSN de IBF)

PARVADA:"A" EDAD:28 DIAS



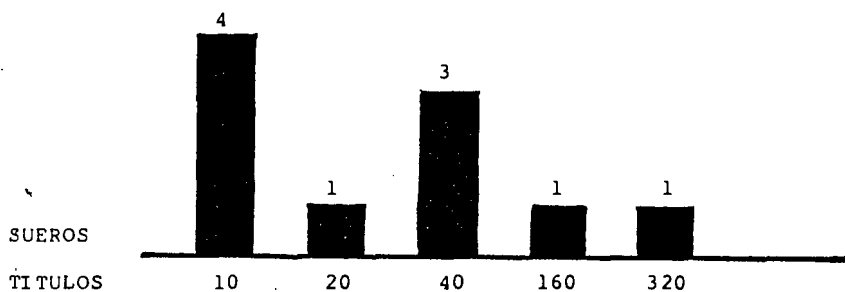
GRAFICA:12 (VSN de IBF)

PARVADA:"B" EDAD:28 DIAS



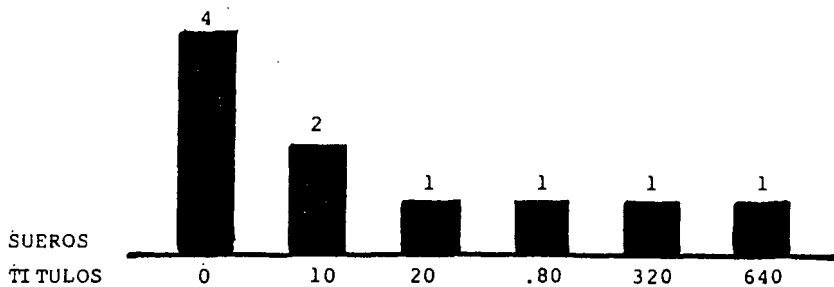
GRAFICA:13 (VSN de IBF)

PARVADA:"A" EDAD:35 DIAS



GRAFICA:14 (VSN de IBF)

PARVADA:"B" EDAD:35 DIAS



RESULTADOS DE PRECIPITACION EN AGAR DE
INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO
(PRUEBA SEROLOGICA)

EDAD	CASETA " A " (Pa de IBF)	CASETA " B " (Pa de IBF)
1 DIA	POSITIVOS 0/9 SUEROS	POSITIVOS 5/10 SUEROS
7 DIAS	POSITIVOS 0/10 SUEROS	POSITIVOS 1/10 SUEROS
14 DIAS	POSITIVOS 0/10 SUEROS	POSITIVOS 0/10 SUEROS
21 DIAS	POSITIVOS 0/10 SUEROS	POSITIVOS 0/10 SUEROS
28 DIAS	POSITIVOS 0/10 SUEROS	POSITIVOS 0/10 SUEROS
35 DIAS	POSITIVOS 0/10 SUEROS	POSITIVOS 1/10 SUEROS

RESULTADOS HISTOPATOLOGICOS

EDAD	C A S E T A " A " VACUNA " A " (EMBRION DE POLLO)	C A S E T A " B " VACUNA " B " (CULTIVO CELULAR)
7 Días	No se observaron lesiones de IBF.	No se observaron lesiones de IBF.
14 Días	No se observaron lesiones de IBF.	No se observaron lesiones de IBF.
21 Días	La mayor parte de los cortes son normales; solamente en uno se notan lesiones moderadas en un brote de infección de la Bolsa en su fase reparativa, en Bolsa de Fabricio.	No se observaron lesiones de IBF.
28 Días	Algunas Bolsas de Fabricio son normales y otras muestran lesiones crónicas de infección de la Bolsa de Fabricio.	No se observaron lesiones de IBF.
35 Días	Bolsas de Fabricio.- Se notan tres tipos de cambios: en unas no hay lesiones, en otras hay lesiones en fase subaguda y las últimas con lesiones de curso crónico.	No se observaron lesiones de IBF.

"Granja Abilag"

REGISTRO PARA POLLO DE ENGORDA

J. LACA

ELEVÉ LOTE 11 (9,200)
ELEVÉ LOTE 14 (10,000)

NOMBRE DE I FECHA DE INICIACION 21/06/56/56 FAMILIAR EXISTENTE 20,000 ELEVÉ _____
 CATEG. DE "A" FORMA DE DEWITTS FEDE PROMEDIO DESGASTO 31.7 MORTALIDAD AL DESGASTO _____ ELEVÉ _____
 PROCEDENCIA DE LOS POLLOS DEWITTS NOMB. DE LLEGADA 2000 VACIADO 20/56 FAMILIAR EN GRANJA _____ TOTAL _____

SE	MORTALIDAD										TOTAL SEMANA	TOTAL COMULADO	%	%	EMPEÑO AL PRINCIPIO DE SEMANA	CONSUMO K.G.												TOTAL SILBOS	TOTAL SEMANAL	CONSUMO SEMANAL POR AVE	CONSUMO SEMANAL POR 100	PESO POR AVE	CONVERSIÓN
	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V						S	D	L	M														
1	19	31	24	27	26	36	26	203	203	1.4	1.01	1.01	20,000	1	1	2	1	3	3	3	3220	3220	126	161	126	161	115	109	1095	1473			
2	25	24	23	18	29	30	29	176	379	0.6	1.55	1.89	19,171	3	3	5	3	3	5	3	5750	8970	280	280	406	494	253	254	1900	1717			
3	25	31	27	26	30	32	25	199	578	1.0	1.00	1.89	14,621	2	5	4	5	4	5	6	8510	17480	392	436	798	661	429	451	1900	1941			
4	25	42	41	53	49	50	30	305	883	0.8	1.99	4.43	19,422	6	4	7	6	7	6	7	9890	27370	416	509	1214	1396	640	703	1990	1986			
5	28	31	66	53	63	60	52	435	1321	1.0	2.17	6.60	19,194	2	4	7	9	8	9	9	11110	38480	663	901	1936	1977	920	1401	2101	2194			
6	29	13	12	68	40	67	79	494	1815	0.8	2.77	9.57	18,619	4	7	2	9	2	7	4	12,650	51,130	826	617	2765	2,694	1280	1959	2,360	2,313			
7	29	19	20	20	23	29	31	573	2388	1.6	2.51	11.97	18,162	5	1	1	10	5	9	12	14030	65100	910	111	3,615	3,925	1,630	2,649	2,270	2,077			
8	16	23	35	16	10	32	490	2878	2.1	2.45	14.97	17,612	9	11	10	10	11	8	11	16,100	81,200	1,019	914	4,704	4,584	2,080	1,905	2,300	2,270				
9	41	52	49	48	49	46	48	385	3213	0.6	1.65	16.07	17,122	8	4	4	-	-	6	-	5000	86,200	1,225	255	5,927	4,639	2,450	1,871	2,470	2,993			
10	(A)	66	65	61	-	-	-	162	3475	1.30	17.31	17,321	3	-	3	-	1	-	-	-	1010	87,210	1470	870	1,399	4,124	2,850	1,822	2,596	2,634			
										B.D.			16,525																				

Fecha	Granja	Estado	Procedencia	Número de pollos			Micromasa	Gr. pollo vuelido				
				Incluidos	Excluidos	Vendidos						
20/56	I	"A"	DEWITTS	20,000	16,525	3,475	-	31,444				
Consumo de alimento por pollo				Consumo de alimento por persona				Peso	Conversion	T.P. Ind. Prod.	Días al momento	Costo por pollo.
5.521				87.930				1921	2.765	93.10	62.5	-

CALENDARIO DE VACUNACION

EDAD	FECHA	TIPO DE VACUNA	VIA DE APLICACION	MOEDA
1/2	22-V-56	GUARDIA	ORAL	FARM
1/0	27-V-56	GUARDIA	ORAL	FARM
1/3	30-V-56	GUARDIA	ORAL	FARM
2/0	3-V-56	GUARDIA	ORAL	FARM
3/1	11-VI-56	GUARDIA	ORAL	FARM
4/4	21-VI-56	GUARDIA	ORAL	FARM

FINGERES { Pico + + +
 OJOS { + + +
 ESPELA { + + +

D I S C U S I O N :

- D I S C U S I O N -

La discusión se basa en los puntos que a juicio particular se consideran de mayor importancia, de acuerdo con los efectos, que para el tema se estima, tienen mayor trascendencia:

- 1º REPRODUCTORAS
- 2º POLLITO
- 3º CONTROL DE LA ENFERMEDAD

REPRODUCTORAS:

Es importante considerar los calendarios de vacunación y las edades de las madres del pollito que se recibe en las granjas.

Recientemente se ha hecho común la práctica de vacunar a las reproductoras contra Gumboro, utilizando una dosis de vacuna inactivada, aplicada a las 18 - 20 semanas de edad. Previamente estas aves son "Preinmunizadas", con una y hasta tres dosis de vacuna contra la infección de la Bolsa de Fabricio.

Como resultado de éste sistema de vacunación es de esperarse que las gallinas y su progenie, presenten títulos altos de anticuerpos contra el virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio, los cuales van declinando paulatinamente en relación inversa a la edad. Es decir, a mayor edad de las aves, menores títulos.

Si se toma en cuenta ésta premisa y además se considera que comunmente una parvada de pollitos que se recibe en las granjas, proviene de varias " claves " (lotes) de reproductoras y que además éstas pueden tener diferentes edades, es factible suponer que los pollitos nacerán con títulos de anticuerpos contra la Infección de la Bolsa de Fabricio variables; dando como resultado que aquellos hijos de reproductoras juvenes (30 - 40 semanas), presentaran títulos más altos que aquellos hijos de reproductoras de mayor (42 - 60 semanas) edad.

Los programas de inmunización para reproductoras se han modificado dramáticamente durante la presente década. En particular, se ha tenido un gran incremento en el desarrollo y utilización de las vacunas muertas o inactivadas. Sin embargo, recientemente han aparecido algunas controversias sobre su uso. Algunos productores consideran - ahora que los títulos altos de anticuerpos maternos generados por las vacunas inactivadas, pueden afectar negativamente al desarrollo de la inmunidad inducida por vacunaciones tempranas a la progenie contra la enfermedad de Newcastle, Bronquitis Infecciosa e Infección de la Bolsa de Fabricio (9).

De acuerdo con los resultados obtenidos (Gráficas: 1 y 2 - GMT), observamos que los títulos maternos rebasan la línea punteada 1:160 considerada para la aplicación de la vacuna.

Esto es, a un día de edad encontramos el título - 243 para la Gráfica: 1 - GMT y en igual fecha el de - 1810 para la Gráfica: 2 - GMT, complementaria a la - prueba, por lo que se debe considerar que los títulos señalados " aparentemente " pueden proteger el posible desafío a que se pudiera enfrentar el pollito. (Ver - los resultados de las Gráficas: 1 y 2 GMT) . .

Se señala en las Gráficas mencionadas que de acuerdo con los títulos, " aparentemente " se mantienen niveles que deben proteger a los pollitos. Esto es en lo general y de acuerdo a la media geométrica resultante en cada Gráfica, no siendo posible que la parvada sufra una infección a muy temprana edad. Pero si observamos las Gráficas: 3 y 4 VSN de IBF, de un día de edad, tanto en la parvada " A " como en la " B ", encontramos - que el resultado individual indica que hay niveles de anticuerpos de 1:80 hasta 1:1280 para la parvada " A " y de 1:1320 hasta 1:10740 para la parvada " B ", por lo que calculando en porcentaje correspondería a un 33 % la cantidad de pollos que pudieran quedar expuestos al desafío de campo.

POLLITO:

Reflexionando sobre lo anteriormente apuntado, queda claro que no siempre es posible recibir pollito de un día de edad con títulos maternos altos, obligando esto a considerar la aplicación de vacunas a temprana edad, ya que dicha cantidad de aves presenta títulos muy bajos.

Aunque por otro lado, se menciona que si se vacuna el pollito a muy temprana edad y si hay presencia de títulos altos, la acción del antígeno (vacuna), será neutralizada por los anticuerpos y cuando estos se catabolizan, el pollito queda expuesto a sufrir la infección.

Para el presente trabajo, dicha neutralización no se observa, debido a que las Gráficas: 1 y 2 - GMT, no demuestran ningún repunte de títulos que pudiera indicar que el pollito se haya desafiado con el virus de campo.

CONTROL DE LA ENFERMEDAD:

Para diseñar un programa adecuado de control de la Infección de la Bolsa de Fabricio, es necesario tener en cuenta algunos factores, como sigue:

- a) Edad y Estado Inmunológico de la Parvada.
- b) Tipo de Vacuna a Utilizar.
- c) Análisis de Laboratorio Adecuados.

Estado Inmunológico de las Aves:

Al iniciar los intentos de control de la enfermedad, se observó que cuando las reproductoras transmitían anticuerpos a la progenie, éstos anticuerpos maternos disminuían la posibilidad de establecer una infección a temprana edad, resultando una " Protección Parcial " - contra el efecto inmunosupresor causado por el virus.

En el caso contrario, cuando la progenie carecía de anticuerpos maternos, el efecto inmunosupresor se observa frecuentemente.

El nivel de anticuerpos maternos determina la edad más apropiada en la cual se debe vacunar el lote de aves. Si los niveles de anticuerpos son altos durante la primera semana de vida, se considera que la vacunación debe realizarse cuando los niveles de anticuerpos hayan disminuído considerablemente. Altos niveles de anticuerpos maternos o bien protegen contra la infección (10, 11) o modifican la presentación de la enfermedad haciendola más benigna (12).

Uno de los problemas que existen para tomar la decisión, es la presentación de Títulos de Anticuerpos Variables. Algunas aves pueden presentar títulos altos, mientras que otras presentan títulos bajos o negativos (5). Lo anteriormente citado señala que bajo estas condiciones, resultaría inoperante aplicar una sola vacuna a la parvada.

De acuerdo con los resultados de Virus Suero Neutralización de Gumboro, en anteriores parvadas, se tomó la decisión de trabajar un calendario de vacunación a 2,7 y 14 días de edad (presente trabajo), con la finalidad de tener el virus vacunal presente en el momento en que la inmunidad ha disminuído suficientemente en cada pollo para que pueda permitir una respuesta activa (8).

De tal forma que los pollos que nacieron con títu
los bajos se inmunicen con la primera vacuna (Segundo
día), los que nacieron con títulos medios se inmunicen
con la segunda aplicación (Séptimo día) y los pollos
que nacieron con títulos altos se inmunicen con la ter
cér aplicación (14 días).

C O N C L U S I O N E S :

- C O N C L U S I O N -

En base a los resultados obtenidos se concluye que:

- 1.- La vacuna " B " (Vacuna contra la enfermedad de Gumboro, elaborada en cultivo celular) fue superior a la vacuna " A " (Vacuna contra la enfermedad de Gumboro Suave , elaborada en embrión de pollo), ya que en la parvada " A ", en la cual se aplicó la vacuna " A ", fue positiva a la Infección de la Bolsa de Fabricio.
- 2.- Se pudo comprobar que el calendario múltiple (tres vacunas), aplicado a 2, 7, y 14 días, es conveniente manejarlo, ya que no siempre se pueden obtener títulos maternos parejos. Además de que no se observa choque (Catabolismo), antígeno-anticuerpo, por la aplicación de vacunas a temprana edad.
- 3.- De igual manera los resultados de productividad (mortalidad, conversión, índice de productividad, días al mercado, etc.), fueron mejores en la parvada " B " (negativa a la Infección de la Bolsa de Fabricio), que en la " A ".

4.- Es de importancia seguir haciendo estudios para encontrar mejores sistemas de inmunización de reproductoras, para obtener títulos maternos más uniformes que permitan manejar con mayor facilidad la mencionada enfermedad.

5.- Hacer uso más frecuente de los análisis de Laboratorio, ya que son la única herramienta que puede conducirnos hacia resultados mejores.

S U M A R I O :

- S U M A R I O -

Se realizó la evaluación de dos vacunas contra la enfermedad de Gumboro, aplicándose las mencionadas a 2, 7 y 14 días, evaluándose los resultados a través de análisis serológicos (virus suero neutralización y precipitación en agar), así como del análisis histopatológico.

Se recolectaron Bolsas de Fabricio, Timo y Bazo a los 7, 14, 21, 28 y 35 días, así como también sueros, utilizando la punción intercardíaca a los 1, 7, 14, 21, 28 y 35 días, enviándose al Laboratorio de Análisis Clínicos para su diagnóstico.

Se obtuvieron resultados que indican que la vacuna " A ", fue positiva, presentandose la enfermedad de Gumboro a la tercer semana de edad.

Se obtuvieron también resultados en cuanto a la mortalidad, conversión, índice de productividad, promedio de peso y días al mercado.

B I B L I O G R A F I A :

- B I B L I O G R A F I A -

- 1.- Lukert, P.D. Convención Aneca, Puerto Vallarta, 1985.
- 2.- Unión Nacional de Avicultores, Sección Engordadores (Comunicación Telefónica), Octubre 1986.
- 3.- Angel Mosqueda Taylor., Producción Animal: Aves Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (U.N.A.M.) Análisis y Perspectivas de la Patología Aviar en México. Avirama 4-15 Diciembre 1984.
- 4.- NAQI, S.A. Ph.D. The Immune System and Its Suppression by Infectious Bursal Disease Virus. Vireland Update No. 17, Marzo 1986.
- 5.- Villegas, P. Enfermedad Infecciosa de la Bolsa (Gumboro) Avicultura Andina 2: 222-262, 1978.
- 6.- Salsbury Laboratories, Inc. Boletín Informativo (Familia Bursine). Septiembre 1986.
- 7.- Glick, Bruce, 1979, Avian Dis. 23: 282-289.

- 8.- Lukert, P.D. Control de la Enfermedad de la Bolsa de Fabricio., Dpto. Microbiología Veterinaria (Universidad de Georgia), 1986.
- 9.- J.J. Giambrone, Ph.D. (Vineland, Update) Pros y Contras de las Vacunas Inactivadas para las Pollas Reproductoras. Septiembre 1986. .
- 10.- Snedeker, C., F.K. Wills e I.M. Moulthrop. Some Estudios on The Infectious Bursal Agent. Avian Dis. 11: 519-528. 1967.
- 11.- Wyeth, P.J. y G.A. Cullen. Maternally Derived Antibody. Efect on Susceptibility of Chicks to Infectious Bursal Disease. Avian Pathol: 5:253-260. 1976.
- 12.- Hitchner, S.B. Persistence of Parenteral Infectious Bursal Disease Antibody and its Effect on Susceptibility of Young Chicks. Avian Dis. 15: 894-900. 1971.
- 13.- Thomas S. Lesson y C. Roland Lesson. Histología Segunda Edición. Introducción, Preparación e Interpretación de los Cortes. Páginas 8-11.