

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS
DE GUMBORO A TRAVÉS DE LA TRANSCRIPCIÓN INVERSA-
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
COMBINADO CON ANÁLISIS DE ENZIMAS DE
RESTRICCIÓN**

ANA CARINA VILLACRÉS BARRAGÁN.

**Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del Título de
B.S. Biotecnología**

**Quito
Diciembre, 2008.**

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS
DE GUMBORO A TRAVÉS DE LA TRANSCRIPCIÓN INVERSA-
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
COMBINADO CON ANÁLISIS DE ENZIMAS DE
RESTRICCIÓN**

ANA CARINA VILLACRÉS BARRAGÁN

María de Lourdes Torres, Ph.D
Directora de Tesis y
Miembro del Comité de Tesis

Richar Rodríguez Hidalgo, Ph.D.
Co-Director de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D
Decana del Colegio de
Ciencias Biológicas y Ambientales

Quito
Diciembre 2008

© Derechos de autor
Ana Carina Villacrés Barragán.
2008

Dedicatoria

A mis padres quienes me han apoyado e impulsado cada día para ser mejor tanto a nivel profesional como personal. A mis hermanos por estar conmigo y ayudarme cuando los he necesitado. A mis amigos por estar siempre presentes y preocupados por mi bienestar y a mi novio por ser mi soporte.

Agradecimientos

Al Dr. Washington Benitez quién me dio la oportunidad de trabajar en los laboratorios de Biología Molecular del Centro Internacional de Zoonosis de la Universidad Central del Ecuador. Al Dr. Richar Rodriguez por el aporte de conocimientos y apoyo durante la realización de este trabajo, a Dafne Urresta y los demás investigadores y pasantes del centro. A mis profesores quienes me han llenado de conocimientos, en especial a Maria de Lourdes Torres. A mi padre por siempre impulsarme a ser mejor cada día y por apoyarme en el desarrollo de este trabajo, al igual que a mi madre por el amor y consejos brindados. A mis hermanos por involucrarse en mis actividades y ayudarme. A mis compañeros y amigos quienes siempre me apoyaron y me dieron siempre ánimos.

Resumen

Este proyecto buscó demostrar la presencia del virus de enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV) en tres explotaciones avícolas del centro norte del Ecuador y caracterizar a las cepas encontradas a través de la utilización de técnicas moleculares. La enfermedad de Gumboro es una infección aguda y altamente contagiosa que afecta a pollos jóvenes durante las primeras 3 y 6 semanas de vida. Las bursas de 120 aves de engorde y de 11 aves criollas sanas fueron aisladas y sometidas al procedimiento de extracción de ARN viral ácido guanidin-tiocianato-fenol-cloroformo. Diez bursas fueron sometidas a la extracción del ARN viral a través del kit comercial Nucleospin. La transcripción reversa/reacción en cadena de la polimerasa fue utilizada para la caracterización del ARN viral extraído utilizando un set de primers que amplifican un fragmento de 248pb de la región hipervariable del gen VP2. Ochenta aves de engorde (66.6%) y nueve aves criollas (81%) fueron positivas para la presencia del IBDV a través del RT/PCR. El ARN viral de los pollos analizados fue sometido a la restricción enzimática utilizando cinco enzimas diferentes *TaqI*, *DraI*, *SacI*, *StyI* y *SspI*. Todo el ARN bursal mostró el mismo patrón de RFLPs para todas las enzimas, fue cortado por las enzimas *TaqI* y *DraI* dando lugar a dos fragmentos de +/-198 y +/-50pb. Este patrón de restricción es característico de la cepa variante Delaware A. El control positivo (vacuna) fue restringido por las enzimas *TaqI*, *StyI* y *SacI* mostrando los mismos dos fragmentos de +/-198 y +/-50pb, patrón característico para la cepa Lukert. Los diferentes patrones de restricción demuestran que existe variabilidad genética entre la vacuna y las muestras experimentales. Los resultados demuestran que la técnica del RT/PCR puede ser utilizada para la rápida detección del IBDV y para la diferenciación entre cepas del virus en combinación con la restricción enzimática.

Abstract

The aim of this study was to demonstrate the presence of the infectious bursal disease virus in three farms of the north-central Ecuador and to characterize the strains found through the use of molecular techniques. Gumboro disease (IBD) is an acute and highly contagious, immunosuppressive disease that affects young chickens during their first 3 to 6 weeks of life. One hundred twenty bursas of broiler chickens and eleven creole birds were isolated and the RNA extraction procedure called Acid guanidine-thiocyanate-phenol-chloroform was performed. Ten bursas were submitted to viral RNA extraction using the commercial kit entitled "Nucleospin". Reverse transcriptase-polymerase chain reaction was used to characterize the viral RNA extracted, by using a set of primers that amplify a segment of 248pb from the hyper-variable region of the VP2 gene. Eighty broiler chickens (66.6%) and 9 creole birds (81%) were found RT/PCR positive for the presence of IBDV. The viral RNA from the chickens analyzed was enzyme restricted using five different enzymes *TaqI*, *DraI*, *SacI*, *StyI* y *SspI*. All the bursal RNA showed a similar RFLPs pattern with all the above enzymes used. When restricted by the enzymes *TaqI* and *DraI*, two segments +/-198 y +/-50 were obtained, RFLPs pattern characteristic of the variant strain Delaware A. The positive control (vaccine) was digested by the *TaqI*, *StyI* and *SacI* enzymes into two fragments of +/-198 y +/-50pb, RFLPs pattern that is characteristic for the Lukert strain. The results demonstrate that genetic variability exists between the bursal samples and the vaccine. The results also demonstrate that RT/PCR can be used to rapidly detect IBDV, and when combined with enzyme restriction, can differentiate the different strains of the virus.

Tabla de Contenido

Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Resumen	vi
Abstract	vii
Tabla de Contenido	viii
Lista de tablas y figuras.....	x
Abreviaciones.....	xii
1. Introducción.....	1
1.1. Descripción de la enfermedad	2
1.2. Etiología.....	5
1.2.1. Agente etiológico	5
1.3. Antigenicidad	8
1.4. Patogenia, Cinética y Efecto en el sistema inmunitario de las aves.....	8
1.5. Transmisión del virus de IBD	10
1.6. Manifestaciones Clínicas.....	11
1.6.1. La IBD subclínica.....	11
1.6.2. La IBD clínica.....	11
1.7. Lesiones Anatomopatológicas.....	12
1.7.1. Lesiones Macroscópicas.....	12
1.7.2. Lesiones Microscópicas	13
1.8. Diagnóstico	13
1.8.1. Diagnóstico Clínico.....	13
1.8.2. Diagnóstico histológico.....	14
1.8.3. Diagnóstico Serológico	14
1.8.4. Diagnóstico Molecular	15
1.8.4.1. Transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT/PCR).....	16
1.8.4.2. Análisis de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs).....	18
1.8.4.3. Secuenciación nucleotídica	19
1.9. Epidemiología	19
1.9.1. Incidencia y Distribución	19
1.10. Importancia Económica.....	21
2. Objetivo General	24
3. Objetivos específicos.....	24
4. Justificación.....	24
5. Área de Estudio	26
6. Materiales	27
6.1. Material Animal	27
6.2. Cepas Virales (Control Positivo RT/PCR).....	27
6.3. Extracción bolsas de Fabricio	28
6.4. Extracción Viral	28
6.5. Purificación del ARN.....	30
6.6. RT/PCR.....	30
6.7. Electroforesis:	31
6.8. RFLPs.....	32
6.9. Electroforesis.....	33
7. Metodología	34
7.1. Manejo de aves.....	34
7.2. Extracción de la Bolsa de Fabricio (BF)	35
7.3. Procesamiento de las bolsas.....	36
7.4. Extracción del ARN de las bolsas de Fabricio	37
7.5. Extracción del ARN de las vacunas	38
7.6. Extracción viral mediante kit comercial.....	38

7.7 Purificación del ARN (dsRNA)	39
7.8. Transcripción inversa/Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT/PCR).....	40
7.9. Electroforesis.....	41
7.10. Análisis con enzimas de restricción (RFLPs).....	42
8. Resultados	43
8.1. Detección viral por RT/PCR	43
8.1.1. Control positivo y negativo	43
8.1.2. Bursas correspondientes a Guayllabamba.....	44
8.1.3. Bursas correspondientes a Nanegalito.....	44
8.1.4. Bursas correspondientes a San Vicente.....	45
8.1.5. Bursas de aves criollas	45
8.2. RFLPs.....	45
8.2.1. Enzima de restricción <i>TaqI</i>	46
8.2.2. Enzima de restricción <i>DraI</i>	46
8.2.3. Enzima de restricción <i>SspI</i>	46
8.2.4. Enzima de restricción <i>SacI</i>	47
8.2.5. Enzima de restricción <i>StyI</i>	47
8.2.6. Bursas aves criollas	47
9. Discusión	48
9.1 Sacrificio de las aves	48
9.2. Procesamiento de las bursas.....	50
9.3. Extracción de ARN viral.....	50
9.4. Purificación del ARN viral.....	51
9.5. Amplificación del ARN viral a través del RT/PCR	52
9.6 Análisis de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción. RFLPs	54
9.6.1 <i>SacI</i>	55
9.6.2 <i>SspI</i>	55
9.6.3. <i>StyI</i>	56
9.6.4. <i>TaqI</i> y <i>DraI</i>	57
10. Conclusiones	61
11. Recomendaciones.....	63
12. Referencias.....	65
13. Tablas.....	72
14. Figuras.....	84

Lista de tablas y figuras

13. Tablas.72

Tabla 1. Clasificación molecular por RT/PCR-RFLPs de diferentes virus de IBDV.....	72
Tabla 2. Diagnóstico diferencial de la enfermedad infecciosa de la bursa.....	73
Tabla 3: Descripción del número de aves de engorde y aves criollas y el lugar de procedencia.....	74
Tabla 4: Vacunas contra la enfermedad infecciosa de la bursa utilizadas como controles positivos.....	75
Tabla 5. Especificaciones restricción enzimática utilizados en el estudio.....	76
Tabla 6. Aves criollas utilizadas en el estudio.....	77
Tabla 7. Aves de engorde del sector de Guayllabamba.....	78
Tabla 8. Aves de engorde del sector de Nanegalito.....	79
Tabla 9. Aves de engorde del sector de San Vicente.....	80
Tabla 10. Diferencias en el patrón de restricción entre control positivo y muestras de ARN viral de las bursas.....	81
Tabla 11. Perfil de restricción enzimática de los fragmentos de 248 pb VP2 de bolsas de Fabricio de aves de engorde de los sectores Guayllabamba, Nanegalito y San Vicente y de aves criollas.....	82
Tabla 12. Sistema de Genotipificación de cepas del IBDV por RFLPs utilizado en la Universidad de Georgia.....	83

14. Figuras.....99

Figura 1. Estructura del virión del IBDV.....	84
Figura 2. Representación esquemática de la organización genómica del IBDV.....	85
Figura 3. Distribución geográfica mundial del IBDV.....	86
Figura 4. Electroforesis de los productos amplificados a través de RT/PCR de RNA viral sin purificación de bolsas de Fabricio correspondientes al sector de Guayllabamba, Nanegalito y EG1 que corresponde al sector San Vicente.....	87
Figura 5. Electroforesis de productos amplificados a través de RT/PCR de ARN viral de bursas de aves criollas sometidos al procedimiento de extracción viral a través del kit comercial.....	88
Figura 6. Productos de RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima de restricción <i>Taq I</i> en un gel de poliacrilamida del 12%. Electroforesis de ARN viral de bursas del sector Nanegalito, Guayllabamba y bursa de ave criolla (CrBF2).....	89
Figura 7. Productos de RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima de restricción <i>Dra I</i> en un gel de poliacrilamida del 12%. Bursas del sector Nanegalito, Guayllabamba y bursa de ave criolla...	90
Figura 8. Productos de RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima de restricción <i>Ssp I</i> en un gel de poliacrilamida del 12%. Electroforesis de ARN viral de bursas del sector Nanegalito, Guayllabamba y bursa de ave criolla.....	91

Figura 9.1. Productos de RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima de restricción <i>Sac I</i> en un gel de poliacrilamida del 12%. Electroforesis de ARN viral de bursas del sector Guayllabamba, Nanegalito y bursas de aves criollas.....	92
Figura 9.2. Productos de RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima de restricción <i>Sac I</i> en un gel de poliacrilamida del 12%. Electroforesis de ARN viral de bursas del aves criollas.....	93
Figura 10. 1. Productos de RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima de restricción <i>StyI</i> en un gel de poliacrilamida del 12%. Electroforesis de ARN viral de bursas de aves criollas.....	94
Figura 10.2. Productos de RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima de restricción <i>StyI</i> en un gel de poliacrilamida del 12%. Electroforesis de ARN viral de bursas del sector Nanegalito, Guayllabamba.....	95
Figura 11.1. Electroforesis de los productos del RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima <i>TaqI</i> en un gel de poliacrilamida del 12%. Bursas criollas.....	96
Figura 11.2. Electroforesis de los productos del RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima <i>DraI</i> en un gel de poliacrilamida del 12%. Bursas criollas.....	97
Figura 11.3. Electroforesis de los productos del RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima <i>SspI</i> en un gel de poliacrilamida del 12%. Bursas criollas.....	98

Abreviaciones

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AGPC	Método de extracción viral de guanidina tiocianato fenol-cloroformo "acid-guanidium-phenol-chloroform"
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BF	Bolsa de Fabricio/Bursa de Fabricio
BSA	Suero bovino albúmico "Bovine serum albumin"
cDNA	ADN complementario "Complementary DNA"
cIBDV	Cepas clásicas del IBDV "Classic Strains of IBD virus"
CMI	Inmunidad mediada por células "Cell-mediated immunity"
DEPC	Dietil pirocarbonato
dsRNA	ARN de doble cadena "Double stranded RNA"
HMA	Ensayo de movilidad heteroduplex "heteroduplex mobility assay"
HVR	Región hipervariable "Hypervariable region"
IBD	Enfermedad infecciosa de la bursa "Infectious bursal disease"
IBDV	Virus de la enfermedad infecciosa de la bursa "Infectious bursal disease virus"
IgM	Inmunoglobulina M
ORF	Secciones abiertas de lectura "Open reading fragments"
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa "Polymerase Chain Reaction"
PI	Después de iniciada la infección "Post infection"
QC-PCR	Competitivo Cuantitativo- Reacción en Cadena de la Polimerasa "Quantitative Competitive-Polymerase Chain Reaction"
RE	Enzimas de Restricción "Restriction enzyme"
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Transcriptasa inversa
RT/PCR	Transcripción inversa/Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT/PCR- RFLPs	Transcripción inversa/Reacción en Cadena de la Polimerasa-Análisis de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción "Reverse transcription/Polymerase Chain Reaction-Restriction

	fragment length polymorphisms”
SPF	Específicos libres de patógenos
ssDNA	DNA de una sola cadena “Single Stranded DNA”
VP	Proteína viral “Viral proteína”
vvIBDV	Cepas muy virulentas del IBDV “Very virulent Straits of IBDV”

1. Introducción

En las últimas décadas, la producción, el consumo de huevos y carne de pollo, se ha incrementado a nivel mundial con el fin de satisfacer la alta demanda que existe de estos productos. La industria avícola ha aumentado su producción y ha intentado mejorar los sistemas de sanidad, de prevención y control de las infecciones con el único objetivo de mejorar la productividad, la eficiencia y la economía de este sector (Nilipour, 2006). En el Ecuador, el sector avícola constituye una actividad dinámica dentro del Sector Agropecuario del país, llegando a tener una producción masiva de carne de pollo y huevos.

En un plantel avícola, los brotes infecciosos de magnitud merecen y son sometidos a un diagnóstico riguroso con el fin de poder controlarlos y evitar pérdidas económicas. Sin embargo, brotes esporádicos en las aves no reciben la atención requerida; sino que por el contrario, son eliminadas sin ningún tipo de diagnóstico ni control. La bioseguridad es deficiente y sólo las grandes empresas avícolas parecen cumplir con las normas; mientras que, la mayoría de pequeños avicultores no las utilizan (Nilipour,2006).

En la actualidad, el veterinario realiza un diagnóstico clínico (sintomatológico y anatomopatológico) para luego utilizar las técnicas serológicas que confirmen el diagnóstico presuntivo (Odor, 1995). Dentro de este marco, en nuestro país este tipo de técnicas son las más utilizadas debido a que no requieren de grandes inversiones y tampoco requieren de personal profesional y capacitado. Adicionalmente, estas técnicas

detectan exposición al agente infeccioso, es decir anticuerpos. Por otro lado, las técnicas moleculares, de reciente advenimiento y de alta sensibilidad y especificidad, son utilizadas por países desarrollados para la detección de los organismos patógenos causantes de la enfermedad. Si bien es cierto, estas técnicas son costosas y requieren de infraestructura especializada y de personal capacitado, la información que se puede obtener es invaluable y permitirá conocer al agente causal desde su base molecular con un alto grado de certeza (Jackwood, 1995).

1.1. Descripción de la enfermedad

La enfermedad infecciosa de la bursa (IBD, por sus siglas en inglés) es una infección vírica aguda, altamente contagiosa que afecta a aves jóvenes y es causada por el virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV, por sus siglas en inglés). La IBD se caracteriza por lesiones severas en la bolsa de Fabricio (BF), cuya consecuencia principal es la inmunosupresión en etapas tempranas (Villegas, *et al.*, 2004). El síndrome fue reconocido en 1957; sin embargo, fue descrita por primera vez en 1962 por Cosgrove como una nefrosis aviar, debido al daño intenso observado a nivel de los riñones, como lesiones degenerativas tubulares. En 1970, Hitchner propone el término de “enfermedad infecciosa de la bursa” debido a la presencia de una BF agrandada con un exudado amarillento y a veces puede presentar hemorragias. Por otro lado, los primeros brotes de esta enfermedad, tuvieron lugar en el área de Gumboro, Delaware-EE.UU., por lo que también se la conoce como enfermedad de Gumboro (Lukert y Saif, 2003). Lukert *et al.* y Pizarro y *et al.*, 2001, citados por Babaahmady en el 2005, la denominaron como bursitis infecciosa debido a la gran depleción de linfocitos observada en la bursa.

La bolsa de Fabricio se encuentra ubicada dorsalmente con respecto a la cloaca en la parte caudal de la cavidad corporal y actúa como el órgano reservorio de los linfocitos B (Gallos, 2007). Debido a que cumple con un rol primordial en el sistema inmune de las aves, su estado fisiológico debe ser ideal. Las aves están expuestas constantemente a agresiones del medio ambiente (estrés, insalubridad, vacunaciones, entre las principales) lo que provoca que la estructura anatómica y fisiológica de la BF resulten afectadas (van den Berg, 1991). En el caso del virus de Gumboro, la BF es el más afectado donde los linfocitos B no pueden alcanzar su madurez, quedando el sistema inmune comprometido. La replicación viral en las células de las aves a más de la inmunosupresión, provoca retrasos en el crecimiento, disminuyen sus respuestas inmunitarias a otras vacunas y las hace más susceptibles a infecciones secundarias (Fields, 1995).

El desarrollo de la enfermedad depende de factores como:

- **Edad del ave.** Varios estudios han demostrado que la patogénesis y la respuesta inmune ante la enfermedad varía de acuerdo a la edad del animal (González, *et al.*, 2005). Mientras más precoz sea la infección, mayores serán los daños causados en la bolsa provocando un proceso de inmunosupresión permanente, como es el caso de las aves menores a las tres semanas de edad. Por otro lado, cuando las aves son infectadas tardíamente, el resultado es una inmunosupresión temporal debido a que los linfocitos de la BF generalmente han migrado a otros órganos, principalmente el bazo y la médula ósea (Bernardino, 2005); siendo los signos clínicos y la mortalidad menos evidentes en comparación con pollos jóvenes (Butcher y Miles, 1995).

- **Raza o estirpe.** Las aves reproductoras son más susceptibles en comparación con los pollos de engorde, llegando a experimentar mortalidades considerables, superiores al 60% (van den Berg, 1991). Makadiya, 2004 demuestra que las reproductoras presentan una incidencia mayor (85.29%) que las aves de engorde (78.26%). Por otro lado, se ha visto que existe una mayor mortalidad en las razas livianas de reproductoras “Light breeders” que en las reproductoras pesadas “Heavier breeders” (van den Berg, 1998).

- **Estatus inmunológico del ave contra el IBDV.** La respuesta de un ave ante el virus dependerá de la madurez del sistema inmune del animal y en especial del grado de su inmunidad pasiva (cantidad de anticuerpos maternos) (Tacken, 2003). La severidad de la enfermedad esta directamente relacionada con el número de células susceptibles presentes en la bursa y esto explica como las aves de 3 a 6 semanas son más susceptibles, tiempo en el que la BF se encuentra en su máximo desarrollo (Butcher y Miles, 1995).

- **Virulencia del virus o cepa involucrada.** El desarrollo de la enfermedad de Gumboro dependerá de la cepa involucrada (Müller, 2003). Dentro del serotipo I del IBDV se han diferenciado cepas que difieren en su antigenicidad y patogenicidad. Las **cepas clásicas virulentas** (cvIBDV, por sus siglas en Inglés) inducen a una enfermedad clínica severa en pollos mayores a las 3 semanas de edad (Banda y Villegas, 2004). Por otro lado, las **cepas variantes** se caracterizan por inducir diferentes estados de inmunosupresión, en donde la BF sufre de una atrofia rápida (depleción linfocitaria) sin presentar los cambios inflamatorios característicos de los virus clásicos. Las cepas variantes son antigénicamente diferentes a los demás virus sin dejar de pertenecer al

mismo serotipo (Butcher y Miles, 1995). Finalmente, las **cepas muy virulentas** (vvIBDV, por sus siglas en Inglés) que están antigénicamente relacionadas con las cepas clásicas (Makadiya, 2004). Son capaces de sobrepasar los niveles altos de anticuerpos maternos; de modo que, existe un mayor riesgo de infección temprana antes de que se aplique las vacunas atenuadas (Babaahmady, *et al.* 2002). Estos virus causan lesiones en la BF, timo, tonsilas cecales y bazo; además de ser responsables de hemorragias (Banda y Villegas, 2004). Por otro lado, existen **cepas atenuadas** adaptadas a cultivos celulares que no generan lesiones causadas por las cepas clásicas y virulentas.

1.2. Etiología

1.2.1. Agente etiológico

El virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV) pertenece al género *Avibirnavirus* dentro de la familia *Birnaviridae* (Banda y Villegas, 2004). Los pollos son la única especie conocida que exhibe los síntomas clínicos de la infección por el IBDV. Los pavos, patos y avestruces son susceptibles a la infección; sin embargo, son resistentes a la enfermedad clínica (Tacken, 2003). El IBDV carece de envoltura, es icosaédrico compuesto por 32 capsómeros y su diámetro es de 55 – 60 nm. aproximadamente, ver Figura 1. (Villegas, *et al.*, 2004). El IBDV es muy estable y resistente tanto a desinfectantes como a factores del medio ambiente. Resiste un pH entre 2 y 12, característica que lo hace resistente a los desinfectantes como al éter y al cloroformo, sobreviviendo por largos períodos de tiempo dentro del galpón, llegando a ser infeccioso hasta los cuatro meses (Butcher y Miles, 1995). Por otro lado, se ha descrito al virus de Gumboro como refractario a la desnaturalización, ya que es capaz de

ser resistente al calor; permaneciendo viable por encima de los 56°C y a la incubación a 50°C por 5 horas (Qian y Kibenge, 1993).

El genoma de los virus que pertenecen a esta familia consta de dos segmentos de ARN de doble cadena (dsRNA, por sus siglas en Inglés), denominados A y B (Giambrone, *et al.*, 1994). Una representación esquemática de la organización genómica del IBDV se muestra en la Figura 2. El segmento A (aproximadamente 3400 pares de bases [pb]) determina el tropismo hacia la bursa; mientras que, el segmento B está involucrado en la eficiencia de la replicación del virus (Müller, *et al.*, 2003). Por otro lado, el segmento A codifica dos proteínas virales estructurales, VP2 y VP3 (VP, por sus siglas en inglés) que constituyen los principales determinantes antigénicos; mientras que, el segmento B codifica dos proteínas no estructurales VP4 y VP5 (Müller, *et al.*, 1992).

El segmento A contiene dos secciones abiertas de lectura “Open reading frames” (ORFs por sus siglas en Inglés). El más grande de los ORF codifica para una poliproteína de 110kDa (pVP2-VP4-VP3) que es cortada autocatalíticamente por la proteasa viral VP4, dando a lugar a las proteínas pVP2 (también conocida como VPX, 48kDa), VP3 (32kDa) y VP4 (28kDa) (Jhala, *et al.*, 2005). Durante maduración del virus *in vivo* la pVP2 es procesada por la proteasa VP4, generando la proteína madura VP2 (40kDa).

La proteína VP2 contiene las regiones antigénicas responsables de la inducción de anticuerpos conformacionales y neutralizantes y para la especificidad del serotipo (Giambrone, *et al.*, 1994). Esta proteína altamente hidrofóbica es además un antígeno de

conformación dependiente y es el principal antígeno hospedador-protectivo del IBDV conteniendo los epítopes neutralizantes y los sitios que determinan la virulencia (Makadiya, 2004). Esta región, conocida también como la región hipervariable (HVR, por sus siglas en Inglés), es el sitio ideal para la determinación de variantes antigénicas a través de análisis de secuenciación de las diferentes cepas del IBDV. Cambios en esta región son los que generan las diferencias en las propiedades patogénicas y antigénicas de las diferentes cepas del IBDV (Muller,*et al.*, 1992). .

La proteína VP3 es considerada como un antígeno específico y solo puede ser reconocido por anticuerpos no-neutralizantes, algunos de los cuales presentan reacción cruzada con ambos serotipos I y II (van den Berg, 1998). Se sugiere que esta proteína está involucrada con el empaquetamiento o es responsable de mantener al genoma de ARN dentro de la cápside viral (Tacken, 2003).

El segundo y más corto ORF del segmento A codifica el polipéptido VP5 (17kD) el cual parece cumplir algún rol en la apoptosis y en la patogénesis viral interviniendo en la liberación y diseminación del virus; sin embargo, su función es todavía desconocida (Tiwari, *et al.*, 2002; Villegas, *et al.*, 2004).

El segmento B (2900pb) contiene un largo ORF que codifica para el polipéptido VP1 (90kDa) (Lukert, D. y Saif, Y.M., 2003), que viene a ser la polimerasa de ARN que existe tanto como proteína libre o como una proteína ligada al genoma (VPg) (Villegas, *et al.*, 2001). Esta proteína es responsable de las actividades de replicación y transcripción (Müller, *et al.*, 2003).

1.3. Antigenicidad

Se han identificado dos serotipos del IBDV. El serotipo I fue originalmente aislado de pollos, siendo patogénico para estas especies (Manté, *et al.*, 2000). Todas las cepas del IBDV son inmunosupresivas; sin embargo, a través de estudios serológicos de neutralización cruzada y de estudios de las propiedades virales se han descrito 6 subtipos antigénicos del serotipo I del IBDV de acuerdo a sus diferencias en antigenicidad y patogenicidad. Ver tabla 1 (Jackwood, *et al.*, 2001). Las cepas muy virulentas (vvIBDV), cepas clásicas virulentas, variantes antigénicas y cepas atenuadas adaptadas a cultivos celulares anteriormente descritas (Wallace, 1999)

El serotipo II fue originalmente aislado de pavos y se piensa que es un virus con un hospedador específico (Villegas, 2001). El IBDV correspondiente a este serotipo no presenta tropismo selectivo por la bursa, siendo no patogénico para pollos y pavos (Müller, *et al.*, 1992). Este serotipo no causa enfermedad ni tampoco ofrece protección contra las cepas del serotipo I que afecta a pollos.

1.4. Patogenia, Cinética y Efecto en el sistema inmunitario de las aves

El período de incubación de la enfermedad es muy corto y va entre dos a tres días (Makadiya, 2004). El virus una vez ingerido, se dirige al sistema digestivo, replicándose en primer lugar en el intestino delgado y ciegos. El antígeno viral ha sido detectado, a través de estudios de inmunofluorescencia, en macrófagos y en células linfoides del cecum a las 4 horas después de la inoculación y una hora después en

células linfoideas del duodeno y yeyuno (Lukert y Saif, 2003). La replicación del virus dependerá de la cantidad de anticuerpos maternos; de modo que, el virus será neutralizado en los intestinos si existen los anticuerpos necesarios; en caso contrario, el virus se dirigirá y se replicará en otros órganos de tipo linfoide (Sacristán, 2005). Mediante estudios histológicos se ha observado que el IBDV es transportado a través de la corriente sanguínea y células fagocíticas hacia otros órganos, alcanzado el hígado aproximadamente a las 5 horas y la BF dentro de 13 – 24 horas. La infección de la bursa es seguida de una segunda viremia masiva (Lukert, y Saif, 2003).

Altas concentraciones de antígenos virales y altos títulos de infectividad en la BF confirman que éste es el órgano blanco para las cepas patogénicas del serotipo I; mientras que en órganos como el timo y bazo, aunque presenta bajas concentraciones, no son considerados órganos blancos. La severidad de la enfermedad dependerá del número de células susceptibles presentes en la BF (Makadiya, 2004); si el virus de Gumboro llega a dañar la BF en los pollos jóvenes, este órgano no será capaz de producir el suficiente número de linfocitos, lo que consecuentemente causa una inmunosupresión (Tacken, 2003).

El IBDV utilizará a las células del sistema inmunitario para replicarse, afectando principalmente a los linfocitos B que se encuentran en división activa y que son productores de IgM, consecuentemente, la inmunidad humoral del ave será deficiente debido a la falta de producción de inmunoglobulinas (Makadiya, 2004). Esto ocasiona que las aves sean incapaces de crear una respuesta de anticuerpos a las vacunaciones o pueden presentar reacciones fuertes postvacunales haciendolas más susceptibles a enfermedades concurrentes y secundarias (Butcher y Miles, 1995). La inmunidad

mediada por células (CMI, por sus siglas en Inglés) también resulta afectada, debido a que se cree que existen alteraciones en la presentación de antígenos y en las funciones de las células cooperadoras (Lukert y Saif, 2003).

1.5. Transmisión del virus de IBD

El IBDV se transmite en forma directa a través de las heces que son eliminados por aves infectadas, siendo la forma más común de infección la vía oral. No existe transmisión vertical. Por otro lado, se transmite en forma indirecta dentro del galpón a través del alimento, el agua y la cama de viruta. (Sacristán, 2005). Además, debido a su naturaleza resistente, puede ser transmitido mecánicamente por personas, equipo y vehículos que hayan tenido contacto con granjas contaminadas con el virus (Butcher y Miles, 1995).

Otra vía de transmisión es *Alphitobus diaperinus*, conocido como el escarabajo de la cama, que actúa como vector y reservorio competente de varios patógenos y parásitos aviares (Lukert y Saif, 2003). Además, fallas en las medidas de bioseguridad hacen a las aves susceptibles al virus presente en el ambiente. Por ejemplo la reutilización de camas, la mala ventilación, las densidades excesivas de aves, el escaso período de vacío sanitario, la edad y las técnicas de vacunación inapropiadas constituyen factores que ayudan a la prevalencia del virus en las plantaciones avícolas o a la aparición de la enfermedad (Sacristán, 2005).

1.6. Manifestaciones Clínicas

La enfermedad de Gumboro se manifiesta de manera clínica, subclínica, inmunosupresiva y aguda, según la especie animal, la edad de los animales y de la cepa viral circulante (Insua, *et al.*, 2005).

1.6.1. La IBD subclínica. En este tipo de manifestación clínica, el desafío del virus aparece a temprana edad, en aves menores a las 3 semanas de edad sin sintomatología aparente y es causado por cepas variantes y cepas clásicas de menor virulencia (Banda, 2006). Se desconoce la razón del porque los pollos no presentan los signos clínicos de la enfermedad; sin embargo, los animales afectados experimentan una inmunosupresión permanente y severa debido al daño observado en la BF (atrofia), en donde las células B no pueden alcanzar su madurez (Villegas, *et al.*, 2004). En este estadio, la enfermedad no puede ser detectada por su forma subclínica debido a que las aves reducen sus respuestas inmunitarias y además, la tasa de mortalidad es relativamente baja (Villegas, *et al.*, 2001).

1.6.2. La IBD clínica. La enfermedad clásica de la bursa ataca principalmente a aves que se encuentran entre las 3 y 8 semanas de edad y es producida por cepas clásicas o por cepas de alta virulencia. En un brote común de Gumboro, las aves que se encuentren entre las 2 y 15 semanas de edad pueden presentar signos repentinos, siendo la diarrea acuosa y blanquecina y las plumas erizadas los primeros signos observados (Villegas, *et al.*, 2004). Posteriormente, las aves sufren de anorexia, depresión, temblores, respiración con el pico abierto y una severa postración y depresión seguida de la muerte (Cosgrove, 1962). Las aves se muestran inapetentes y consumen poca

agua; de modo que, se observan signos de deshidratación a nivel de las patas. Otros signos clínicos no específicos son la palidez de las crestas, picaje del ano, aumento del volumen de la zona cloacal y agrandamiento de los riñones (Villegas, *et al.*, 2004). Además, se distingue un pico de mortalidad cuarto día, luego cae rápidamente y las aves que llegan a sobrevivir, recobran su estado aparente de salud después de los cinco a siete días, aunque pueden experimentar una inmunosupresión con el riesgo de adquirir infecciones secundarias (Tacken, 2003). El desarrollo de la enfermedad clínica dependerá de la habilidad del virus para infectar y replicarse en las células de la bursa (Vervelde y Davison, 1997).

1.7. Lesiones Anatomopatológicas

1.7.1. Lesiones Macroscópicas. A través de la necropsia, las lesiones postmortem se encuentran principalmente en la bursa, estando inflamada, edematosa e hiperémica, algunas veces con un trasudado amarillento o un exudado sanguinolento que se encuentra cubriendo la superficie de la serosa aproximadamente 2 a 3 días PI (Cosgrove, 1962). Ocasionalmente, se pueden presentar hemorragias en toda la bursa (Lukert y Saif, 2003). Al tercer día PI, la BF se encuentra hiperatrofiada hasta tres veces su tamaño normal, adquiriendo un color grisáceo. Al quinto día PI recupera su tamaño, para el sexto día sufre una nueva atrofia de hasta un 70% (Tacken, 2003). Los músculos del muslo y pectorales pueden presentar hemorragias; al igual que en la mucosa de unión entre el proventrículo y la molleja, debido a que el virus interfiere con el normal funcionamiento del mecanismo de la coagulación (Fields, 1995). Las cepas vvIBDV causan daños más graves como reducción en el tamaño del timo y otras lesiones en las toncillas cecales, el bazo y la médula (Lukert y Saif, 2003).

1.7.2. Lesiones Microscópicas. El virus afecta a los órganos linfoides: bursa, timo, bazo, tonsilas cecales y glándula de Harder. En la bursa, se puede observar necrosis linfocitaria a las 36 horas PI en la región medular de los folículos (Butcher y Miles, 1995). Además, se observa edema, hiperemia e infiltración celular inflamatoria debido al agrandamiento de la BF durante los primeros días de la infección. Como consecuencia de estas alteraciones, la arquitectura folicular normal de la BF resulta afectada. En lo que respecta a otros órganos linfoides secundarios, las glándulas de Harder, las tonsilas cecales y el bazo sufren agrandamiento también se observa una necrosis y depleción linfocitaria aunque en un menor grado (Vervelde y Davison, 1997).

1.8. Diagnóstico

En la diagnosis del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa se han realizado grandes avances, lo que ha permitido la detección y la identificación de las distintas variantes del virus. Las técnicas tradicionales han sido combinadas con técnicas modernas; sin embargo, según la literatura, estas últimas son superiores en sensibilidad y especificidad (Saif, 1995). Para realizar un diagnóstico hay que considerar la historia de la parvada, los signos clínicos y las lesiones.

1.8.1. Diagnóstico Clínico

Este tipo de diagnóstico esta basado en la observación de síntomas y signos que presentan las aves, lo que permitirá la recolección de material de aves muertas o vivas, con el fin de realizar estudios de necropsia, histopatología, serología, virología y otras

pruebas (PCR, Ac monoclonales) (Di Fabio, 2000 y Butcher y Miles, 1995). En la forma clínica de la enfermedad, el virus puede ser aislado de la BF, el bazo y de otros órganos (Lukert y Saif., 2003). Cuando se trata de la forma subclínica de la enfermedad, el diagnóstico clínico se vuelve difícil debido principalmente a la falta de signos clínicos aunque el ave este inmunosuprimida (Babaahmady, *et al*, 2002). El diagnóstico clínico debe ser correlacionado con los análisis histopatológicos y serológicos de la bursa y el aislamiento del virus (Butcher y Miles, 1995).

1.8.2. Diagnóstico histológico

Consiste en el análisis de las lesiones agudas encontradas en la BF a tres o cuatro días PI. Se analizan las lesiones macroscópicas, signos de necrosis en la mayoría de folículos, hiperemia, edema, entre otros signos (Eterradossi, *et al.*, 2001). Sin embargo, en la mayoría de los casos, los signos clínicos analizados no son específicos; por lo que es necesario realizar un diagnóstico diferencial (Butcher y Miles, 1995). La atrofia de la bursa puede ser causada por otras enfermedades como Marek y hepatitis adenovírica; las lesiones hemorrágicas en tejido subcutáneo y masas musculares pueden ser consecuencia de intoxicación por sulfas o por sal, deficiencia de vitamina k y micotoxicosis (Vademecum, 2005). Además, signos de la IBD pueden ser compartidos por otras enfermedades. Ver tabla 2.

1.8.3. Diagnóstico Serológico

El diagnóstico serológico permite la detección de anticuerpos contra los antígenos virales de la enfermedad. Ensayos como la neutralización cruzada viral (NV)

o el Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas (ELISA) cumple con esta función, aunque también han sido utilizadas para la sero-tipificación de los virus (Domanska, *et al.*, 2003). La precipitación en agar gel (AGP), la inmunofluorescencia (IFA) y la inmunoperoxidasa (IPA) también han sido descritas en el diagnóstico de la enfermedad de Gumboro (Domanska, *et al.*, 2003). Este tipo de técnicas serológicas no permiten distinguir entre las cepas de IBDV, son técnicas laboriosas que requieren de mayor tiempo de manipulación y poseen sensibilidad intermedia o baja (Müller, *et al.*, 1992).

1.8.4. Diagnóstico Molecular

Existe una gran variabilidad genética en el virus de la enfermedad de Gumboro, dentro de sus propiedades antigénicas; así como también, dentro de sus propiedades patogénicas (Banda, 2006). El desarrollo de la biología molecular ha permitido, en base al estudio de los ácidos nucleicos, descubrir el virus de acuerdo a su especie, cepas o variaciones permitiendo una detección rápida y exacta (Jackwood, 2001). A pesar de que se desconoce la relación que existe entre el código genético del virus y la patogenicidad entre cepas clásicas virulentas y cepas altamente virulentas, en la actualidad se puede diferenciarlas mediante el uso de marcadores moleculares.

Las técnicas de biología molecular, como la Transcripción Reversa-Reacción en cadena de la polimerasa (RT/PCR), el análisis de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) mediante el uso de enzimas de restricción (RE, por sus siglas en inglés) y el secuenciamiento del genoma, se han convertido en herramientas muy útiles que permiten diferenciar y clasificar las cepas del IBDV (Villegas, 2001). Estas técnicas no requieren del aislamiento y propagación del virus en

cultivos celulares o en huevos embrionarios; por otro lado, el virus puede ser aislado de suspensiones virales preparadas a partir de la BF o bazo de aves con infección aguda (Villegas, 2002).

1.8.4.1. Transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT/PCR)

En la actualidad, la RT/PCR es una herramienta molecular utilizada para la diagnosis del IBDV (Müller, et al., 2003). Esta técnica se basa en la genética inversa, en la cual una hebra de ARNm es transcrita inversamente a su cADN complementario mediante la acción de la enzima polimerasa ARN-dependiente de ADN (transcriptasa inversa) (Abbas y Lichtman, 2005). Esta enzima opera en presencia de ARNm de una sola cadena; sin embargo, el genoma del IBDV está constituido por un ARN de doble cadena, por lo que es necesario separar estas dos hebras mediante altas temperaturas. La enzima transcriptasa inversa en presencia de los primers específicos o hexámeros de primers al azar y de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) empezará a sintetizar el cADN en dirección 5'→3'. Una vez formado el cADN, mediante la adición de la polimerasa de ADN y de los primers, una segunda hebra de ADN será creada a 37°C a partir del cADN para hacerla más estable y aquí es donde inicia la reacción en cadena de la polimerasa tradicional (Griffiths, *et al.*, 2000).

Para iniciar con la técnica del PCR, se debe preparar el mix de PCR que contiene el cADN, la enzima ADN polimerasa (Taq), los primers, MgCl₂ y el 10X buffer, el mismo que será sometido a ciclos repetitivos de desnaturalización, alineamiento y síntesis del ADN que permitirían la detección molecular del IBDV y la amplificación

viral de su genoma (Jackwood, 2002). El fragmento amplificado podrá ser después visualizado a través de geles de agarosa mediante coloración con bromuro de etidio o SYBR® Safe DNA Gel Stain (Lee, *et al.*, 1992).

La reacción en cadena de la polimerasa es un método simple y rápido que permite la reproducción y amplificación de secuencias de ADN o ARN. Para utilizar este método, es necesario diseñar una secuencia de oligonucleótidos (“primers”) que sea complementaria a las terminaciones de la secuencia que se va a amplificar. En el caso de la IBD, los marcadores han sido diseñados especialmente para las regiones que flanquean a la proteína VP2 y que son altamente conservadas entre las cepas del serotipo I. Por otro lado, esta región es conocida por su variabilidad genética, la misma que permite la diferenciación entre cepas del serotipo I y su clasificación (Makadiya, 2004). Sin embargo, nuevos protocolos se están utilizando para amplificar nuevas regiones del genoma del IBDV principalmente los genes VP1, VP3 y VP4 (Makadiya, 2004).

El RT/PCR es una técnica de diagnóstico que demuestra una mayor especificidad y sensibilidad en comparación con las técnicas serológicas tradicionales. Actualmente variaciones a la tradicional RT/PCR están siendo utilizadas como por ejemplo; la RT/PCR *in situ*, desarrollada para investigar estadios tempranos de la infección (Müller, *et al.*, 2003); la QC-PCR, Competitivo Cuantitativo - Reacción en Cadena de la Polimerasa, utilizado para cuantificar el ARN viral y para monitorear la síntesis de proteínas virales (Wu, *et al.*, 1997); la RT/PCR en tiempo real (RT/PCR-RT) que ha sido utilizada para identificar quasispecies mediante la detección de secuencias

donde ocurren mutaciones únicas que se saben que son responsables de la diversidad genética (Jackwood y Sommer, 2005).

1.8.4.2. Análisis de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs)

Debido a la variabilidad observada en la antigenicidad y patogenicidad del virus, los productos generados a través del ensayo del RT/PCR han sido sujetos al análisis a través de enzimas de restricción (RE, por sus siglas en Inglés) y consecuentemente a la secuenciación de nucleótidos con el fin de identificar las diferentes cepas del IBDV (Jackwood, 2002).

Una vez realizada la extracción viral, el ADN es tratado con la enzima de restricción que reconocerá, hibridizará y cortará en secuencias específicas de nucleótidos en el ADN. Cada individuo/organismo presenta una secuencia de ácidos nucleicos única, y de igual manera poseerán patrones únicos en las secuencias de restricción ya sea en su distancia, longitud y disposición (Jackwood, 1995). Es así como el polimorfismo se hace notar dentro de una población, en donde sus individuos presentan patrones de bandas distintos (Jackwood, 1995). Por otro lado, la presencia o ausencia de las secuencias específicas de restricción (4 – 8 pb) que son reconocidos y cortadas por la RE también son causa de polimorfismo. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que las diferencias en estas secuencias también pueden deberse a la ausencia del sitio de restricción por la alteración de un simple nucleótido ya sea por inserciones, deleciones u otros rearrreglos que afectan la distancia entre los sitios de restricción.

Los RFLPs tienen como ventajas que se pueden producir marcadores semi-dominantes, permitiendo la determinación de homocigocidad y heterocigocidad. Además, es un método reproducible y estable; sin embargo, es una metodología que requiere tiempo, de materiales costoso y grandes cantidades de ADN de buena calidad. Además, el RT/PCR-RFLPs es la técnica más sensible y específica en comparación a otros ensayos de diagnóstico incluyendo al AC-ELISA (Wu, *et al*, 1997). Esto se debe a la utilización de primers que poseen secuencias de bases únicas que solamente hibridarán con ácidos nucleicos del microorganismo en interés, en este caso con el IBDV (Jackwood, 1995).

1.8.4.3. Secuenciación nucleotídica

La secuenciación de los productos amplificados en el RT/PCR permite caracterizar las cepas del IBDV, llegando a detectar mutaciones que afectan significativamente a la proteína que va a ser codificada (Etteradossi, *et al.*, 2001). Estos estudios posibilitan establecer los porcentajes de similitud entre las cepas de campo y las cepas vacunales y adicionalmente realizar estudios filogenéticos (Majó, y Dolz, 2008).

1.9. Epidemiología

1.9.1. Incidencia y Distribución

La incidencia de la enfermedad se debe a complejas interacciones entre el hospedador, el patógeno y el medio ambiente. Las infecciones causadas por el serotipo I del IBDV se encuentran distribuidas mundialmente en áreas principalmente avícolas

donde el ave está expuesta al virus durante las primeras semanas de vida sea, por exposición natural al virus de campo o por vacunación (Lukert, y Saif, 2003). La incidencia es elevada cuando las parvadas poseen bajos niveles de anticuerpos maternos. Por otro lado, la incidencia de la forma clínica se ha incrementado en la última década, causando altas tasas de mortalidad (Lukert, y Saif, 2003).

En los años 60, la enfermedad infecciosa de la bursa se distribuyó en la mayoría de las regiones de los Estados Unidos y Europa; mientras que en el Medio este, sur y oeste de África, India, Lejano este, Australia y Latinoamérica fue detectada a finales de los años 60 y principios de los 70 (Villegas, *et al.*, 2004). La IBD es actualmente un problema internacional; en 1995, la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), a través de una encuesta determinó que el 95% de los 65 países encuestados constataron casos de la IBD en sus planteles avícolas. Figura 3. (Tacken, 2003). Una década después, la situación mundial no ha cambiado; las campañas de vacunación no han sido suficientes para controlarla (Majó y Dolz, 2008).

Las cepas variantes antigénicas del IBDV parecen ser más comunes en América del Norte (Estados Unidos), Centroamérica y América del Sur (Villegas, *et al.*, 2004 y Jackwood y Sommer, 2007). Sin embargo, estas dos últimas regiones presentan desde los años noventa cepas clásicas virulentas. En el mismo período aparecieron cepas muy virulentas responsables de brotes clínicos severos en Europa, Asia, y África (Müller, *et al.*, 2003).

A pesar de que las cepas del IBDV están distribuyéndose por Latinoamérica, existe muy poca información que haya sido publicada en la literatura científica (Banda y

Villegas, 2004). Sin embargo, se conoce que la situación de la IBD es complicada debido a la presencia de diversas cepas virales: estándares, variantes antigénicas y muy virulentas (Banda, 2006). Se piensa que los virus están evolucionando de manera independiente en cada país o zona de acuerdo con las condiciones imperantes (Banda., 2006).

Desde 1997, las cepas virulentas han sido asociadas con brotes clínicos en Brasil República Dominicana, Venezuela, Uruguay y Colombia (Villegas, *et al.*, 2002; Banda, 2006). Por otro lado, las cepas variantes en Latinoamérica fueron analizadas por Villegas y Banda en el 2003, los cuales identificaron cepas variantes del tipo Delaware A y E en Perú. Además describen la presencia de cepas del tipo Delaware A o similar a la variante Delaware E en el Ecuador. En Colombia se reportó también la existencia de la variante Delaware E (Villegas, *et al.*, 2002).

En 1978, se identificó la enfermedad en el Ecuador en los Laboratorios Veterinarios del Instituto Izquieta Pérez de Quito. En el 2002, se reconocen y se confirma la presencia en el Ecuador con cepas variantes Delaware A y E (Vademecum avícola, 2005).

1.10. Importancia Económica

El impacto económico de la IBD está influenciado por la cepa del virus, la susceptibilidad, la crianza del lote, los patógenos concurrentes primarios o secundarios y factores ambientales y de manejo (Makadiya, 2004). Las pérdidas en la producción y en el tratamiento de la industria avícola de Alabama alcanzó el millón de dólares;

mientras que la suma de alrededor de cien millones de dólares en pérdidas se experimentan cada año a nivel mundial (Giambrone, *et al.*, 1999). Esto se debe a que la forma clínica de la enfermedad provoca altas tasas de mortalidad (20% en aves de 3 semanas de edad), debido al curso agudo de la enfermedad y a la inmunosupresión grave y prolongada que experimentan las aves infectadas a edades tempranas (Babaahmady, *et al.*, 2005). Por otro lado, la mayoría de las parvadas afectadas resultan antieconómicas debido a que las aves nunca alcanzan el peso adecuado, son parvadas retrasadas y disparejas y susceptibles a infecciones secundarias (van der Sluis, 2001).

1.11. Tratamiento, prevención y control

No existe un tratamiento específico disponible. Medicación antibiótica puede suministrarse si ocurren infecciones secundarias (Poultrysite, 2006). Por otro lado, debido a la naturaleza resistente del IBDV a desinfectantes y a factores del medio ambiente, el control de la infección a través de medidas sanitarias es complicado y difícil, haciendo a la vacunación una medida inevitable. El establecimiento de un programa efectivo de vacunación y de bioseguridad parecen ser las medidas más efectivas (van den Berg y Meulemans, 1991).

En el caso de las aves reproductoras, se trata de alcanzar altos, amplios y consistentes niveles de anticuerpos maternos (inmunidad pasiva) que permitan su transferencia a los pollitos bebés, los mismos se constituirán en la primera barrera de protección (van den Berg y Meulemans, 1991). Los anticuerpos maternos protegerán al pollito durante 1 a 3 semanas contra el virus, aunque se ha reportado que con la administración de vacunas emulsión-aceite la inmunidad puede extenderse hasta las 4 o

5 semanas (Müller, et al., 2003). Es importante determinar la cantidad de anticuerpos maternos, debido a que éstos pueden afectar la respuesta que generen los pollitos al programa de vacunación (McMurray, 1995).

En el caso de los pollos de engorde se trata también de alcanzar un nivel óptimo de anticuerpos, para lo cual la primera vacunación contra IBDV se realizará con una vacuna viva contra IBDV; de modo que, los pollitos puedan enfrentar desafíos con el virus de campo hasta que sus órganos del sistema inmune lleguen a ser funcionales (McMurray, 1995). El tiempo apropiado en el cual las vacunas serán aplicadas diferirá dependiendo del nivel de anticuerpos maternos, la ruta de vacunación y la virulencia del virus vacunal (Lukert, y Saif, 2003).

Finalmente está el programa de bioseguridad, el mismo que debe estar vigente todo el tiempo y cuyo único fin es el de obstaculizar la entrada o salida de agentes infecciosos de las granjas avícolas (Di Fabio, 2000). Se debe reducir la exposición de las aves al virus de campo a través de una adecuada limpieza y desinfección de los galpones y el control de tráfico de personas, vehículos y equipos en la granja. Adicionalmente, se debe esperar al menos 10 días para ingresar un nuevo lote a la granja. (Dekich, 1995).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar molecularmente al virus de Gumboro en tres explotaciones avícolas del centro norte del país e identificar si existe una variación antigénica entre la cepa viral vacunada utilizada y la cepa presente en el campo. Se extrajo el ARN viral de las bolsas, el mismo que fue sometido a las pruebas moleculares RT/PCR y RFLPs.

2. Objetivo General

- Demostrar la presencia del virus de Gumboro en 131 aves provenientes de tres explotaciones avícolas ecuatorianas del centro norte del país y caracterizar molecularmente las cepas del virus encontradas en Ecuador.

3. Objetivos específicos

- Demostrar la presencia de virus de Gumboro en tres explotaciones avícolas a través de técnicas moleculares en explotaciones avícolas ecuatorianas.
- Determinar si existen variantes del virus de Gumboro en la región centro norte con la ayuda de enzimas de restricción.

4. Justificación

El virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio o enfermedad de Gumboro causa problemas de inmunosupresión en pollos jóvenes. La enfermedad se presenta con mayor frecuencia en áreas de alta explotación avícola a nivel mundial en el que se incluye al Ecuador. Mediante el uso de la RT/PCR-RFLPs, se ha detectado que en América Latina la forma subclínica de la enfermedad es la que prevalece, al igual que en Estados Unidos, mientras que la forma virulenta es la responsable de la gran mortalidad en Europa, Asia y África. En América Latina, se ha demostrado la presencia de cepas muy virulentas en Brasil, República Dominicana, Colombia y Venezuela (Banda, 2004). La importancia del estudio de esta enfermedad es la de establecer mecanismos de detección e identificación de las variantes virales involucradas en una

determinada región geográfica con el fin de, en un futuro, sugerir programas de control eficaces de vacunación eficientes. Por otro lado, es conocido que los virus de tipo ARN son de alta mutabilidad por su estructura y forma de replicación; por lo tanto, es importante conocer cual es su estado actual en nuestro país en lo que respecta a la enfermedad y a las variantes genéticas del virus.

Las técnicas de biología molecular permiten establecer las variantes genéticas o cepas que afectan a los planteles avícolas en base al desarrollo o al uso de “primers” específicos y sensibles, descritos en la literatura, los cuales amplifican un determinado segmento del virus (gen de la proteína VP2), el mismo que es caracterizado con enzimas de restricción que identifican a las variantes. Aunque en el Ecuador han sido pocos los trabajos de investigación que se han realizado en torno a la enfermedad de la bolsa de Fabricio, la mayoría han sido enfocados al diagnóstico clínico (determinación de lesiones y síntomas), serológico y al de programas de vacunación. Por otro lado, estudios basados en la utilización de técnicas moleculares no existen en el Ecuador o no se han hecho públicos probablemente por el celo que la industria avícola tiene en dar a conocer sus hallazgos sin favorecer a otros avicultores; de modo que, si se ha llegado a conocer la cepas existentes en nuestro país, son contados los avicultores que las conocen.

En nuestro país, la utilización de técnicas moleculares se ve limitada debido a que no se cuenta con el personal capacitado para realizar estos tipos de análisis. Por otro lado, los costos en cuanto a la infraestructura, a los materiales y reactivos son muy altos. Es por esto que las técnicas de diagnóstico tradicionales clínicas y serológicas son las más utilizadas. Sin embargo, estas técnicas poseen desventajas en cuanto a su

sensibilidad y especificidad; además, mediante estos tipos de diagnóstico no es posible establecer el tipo de cepa (agente causal) que afecta a las aves; sino únicamente su exposición, es decir la presencia o ausencia de anticuerpos. Por otro lado, las técnicas moleculares permiten la detección rápida del IBDV y su caracterización. Los resultados que se pueden obtener a través de estas técnicas son muy confiables debido a su alta sensibilidad y especificidad.

A través de RT/PCR y de RFLPs, cepas variantes han sido caracterizadas en nuestro país; sin embargo, existen muy pocos estudios de caracterización del virus de Gumboro. De esta manera, es importante confirmar la presencia de estas cepas variantes responsables de la enfermedad subclínica y de grandes pérdidas económicas en otras partes del mundo. Una vez identificada la cepa presente en el centro norte del país, se podrá conocer si la cepa vacunal utilizada es la adecuada con respecto al virus de campo.

5. Área de Estudio

La realización de esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Internacional de Zoonosis de la Universidad Central del Ecuador. La recolección de bolsas de Fabricio se realizó en tres explotaciones avícolas del Ecuador ubicadas en los sectores de Guayllabamba, Nanegalito y San Vicente. Ver tabla 3.

Las aves de engorde y criollas fueron criadas en una granja experimental perteneciente a la empresa AVITALSA ubicada en el sector de San Vicente de Yaruquí, siendo sus coordenadas: S = 0.14438; W = 78.334338.

6. Materiales

6.1. Material Animal

Un total de 120 aves de engorde de raza ROSS308 y 11 aves criollas fueron utilizadas en la presente investigación. Las aves de engorde fueron obtenidas de las granjas Lilia Elena (#50), Villanova (#55) y San Vicente (#15) de la Empresa AVITALSA (Tabla 3) y transportadas a un galpón experimental donde fueron criadas hasta su sacrificio. Las aves de engorde fueron sacrificadas a los 22, 23 y 44 días de edad, respectivamente. La edad considerada como la más óptima para realizar estudios de campo se encuentra entre la segunda y tercera semana de edad, época en que los anticuerpo maternos empiezan a decaer. Esto corresponde a las edades de las granjas de Nanegalito y Guayllabamba. Las aves de San Vicente se las sacrificó a una edad más avanzada debido a que estas no formaban parte del estudio en un inicio; sin embargo, presentaban una enfermedad desconocida y se quería ver si las aves adquirieron el IBDV presente en el campo debido a su inmunosupresión. Por otro lado, las aves criollas fueron sacrificadas en conjunto sin conocer su edad.

6.2. Cepas Virales (Control Positivo RT/PCR)

A falta de aves enfermas y diagnosticadas con la enfermedad de Gumboro, se utilizaron 3 vacunas comerciales las cuales contenían al virus vivo. Estas vacunas sirvieron como controles positivos en el desarrollo de la investigación (Ver Tabla 4); sin

embargo, sólo la vacuna BIOMUNE fue utilizada y comparada con los resultados presentados en la tesis, debido a que su concentración de ADN fue mayor con respecto al resto de vacunas utilizadas.

6.3. Extracción bolsas de Fabricio

6.3.1. Reactivos

- Agua ultra estéril (GIBCO® ultrapure Distilled Water DNase, RNase Free. Invitrogen) tratada con dietil pirocarbonato 0.1% (DEPC. D5758-5ML.Sigma®)
- Etanol 75%
- Etanol absoluto (MERCK®. Cód. K35754083 608)

6.3.2. Materiales

- Tubos Falcon® 15 y 50 ml.

6.4. Extracción Viral

- Kit de extracción viral Nucleo Spin® RNA Virus 10 preparaciones

6.4.1. Reactivos

- Etanol 75% y absoluto
- Isopropanol absoluto
- 40 µg/ml Proteínasa K (Promega®. Cód. V3021)
- Agua ultra estéril tratada con dietil pirocarbonato 0.1% (DEPC. Cód. D5758-5ML. Sigma®). (GIBCO® ultrapure Distilled Water DNase, RNase Free. Invitrogen)

6.4.2. Materiales

- Tubos Falcon 15mL y 50mL.

6.4.3. Soluciones

- Acetato de sodio 2M (PANREAC QUÍMICA SAU. Cód. 131633.1210)
- Cloroformo:isopropanol (49:1)
- Fenol equilibrado en agua (Spectrum. Cód. P1060)
- *Solución D:*
 - o Agua ultra estéril tratada con dietil pirocarbonato (DEPC. D5758-5ML. Sigma®). (GIBCO® Ultrapure Distilled Water DNase, RNase Free. Invitrogen®)
 - o B- mercapto-etanol 0,0076% (GIBCO®. Cód. 21985-023)
 - o Citrato de sodio 26,4mM (M&B. LTD. Cód. S213/18/66)
 - o Guanidina tiocianato 4,23M (MP Biomedicals, Inc. Cód. 194003)

6.4.4. Equipos

- Balanza analítica
- Campana de Flujo Laminar LabConco® Purifier Class I
- Centrífuga para tubos 15ml. LW Scientific, Inc. LWS-Combo-V24
- Centrífuga tubos Eppendorf®. FORCE 1624 FORCE MICRO
- Incubadora Baño María Memmert®
- Termomixer compact Eppendorf®
- Vortex Labnet VX100

6.5. Purificación del ARN

6.5.1. Reactivos

- Agua ultra estéril tratada con pirocarbonato (DEPC)
(GIBCO® ultrapure Distilled Water DNase, RNase Free. Invitrogen®)
- Cloruro de Litio (LiCl) 8M. (FLUKA BioChemika®. Cód. 62476. 100gr.)
- Etanol 75%

6.5.2. Equipos

- Centrífuga tubos Eppendorf®. FORCE 1624 FORCE MICRO

6.6. RT/PCR

6.6.1. Reactivos

Transcripción Reversa/Síntesis de cDNA (RT) contenía por reacción:

- 3.88 µl H₂O ultra estéril tratada con dietilpirocarbonato (H₂O-DEPC)
- 2µl 5X buffer (5X First Strand Buffer. Invitrogen®. Cód. Y02321)
- 0.28 µl Dithiothreitol 0.1M (DTT. Invitrogen®. Cód. P/N Y00147)
- 1,0µl dNTPs (10mM dNTPs Set, Promega®. Cód. U151B 23118011)
- 24U Transcriptasa Reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase. Invitrogen®. Cód. 28025-013)
- 8.8U Inhibidor de RNasas (RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor. Invitrogen®. Cód. 10777-019)
- 1µl Primer GUMB-1 (Forward primer). (25pmol. Invitrogen®. Cód. 118773D09). 5' GTAACAATCACACTGTTCTCAGC 3'
- 1.50 µl Muestra (Extracto de la bolsa de Fabricio)

PCR contenía por reacción:

- 0,8µl MgCl₂ (50 mM. Invitrogen®. Part. No. Y02016b)
- 5µl 10X buffer PCR (Invitrogen®. Cód. P/N Y02028b)
- 2 U *Taq* Polimerasa (*Taq* DNA Polymerase, Recombinant. Invitrogen®. Cód. 11615-010)
- 33µl H₂O ultra estéril tratada con dietil pirocarbonato (H₂O-DEPC)
- 1µl Primer GUMB-2, (Reverse Primer) (25pmol. Invitrogen®. Cód.118773D10) 5' GATGTA ACTGGCTGGGTTATCTC 3'.

6.6.2. Materiales

- Puntas estériles con filtro
- Tubos PCR 0.2µl

6.6.3. Equipos

- Centrífuga tubos Eppendorf®. FORCE 1624 FORCE MICRO
- Termociclador TECHNE TC-412.
- Vortex Labnet VX100
- Campana de Flujo Laminar LabConco® Purifier Class I.

6.7. Electroforesis:**6.7.1. Reactivos**

- Agua ultra estéril libre (GIBCO® ultrapure Distilled Water DNase, RNase Free. Invitrogen)
- TAE Buffer 0.5X (500ml)

- 28.55 ml Ácido acético glacial (MERCCK®. Cód. K28057163 031)
- 121 g. Trizma base (Promega®. Cód. H5131)
- 50 ml EDTA 0.5M (pH=8)
- 3ul Loading buffer 2X (Bluejuice Gel Loading buffer 10X. Invitrogen®. Cód. 10816-015)
- Agarosa al 2% (UltraPure Agarose. Invitrogen®. Cód. 15510-019)
- Marcador de peso molecular (100bp DNA ladder. Invitrogen®. Cód. 10488-058).
- SYBR® Safe DNA Gel Stain (Cód. S11494, 500 µl)

6.7.2. Equipos

- Balanza analítica Mettler Toledo AB104
- Cámara de electroforesis (Gel XL ultra V-2®. Labnet International, Inc.)
- Cámara Fotográfica Canon® Power Shot G5

6.8. RFLPs

6.8.1. Restricción enzimática

Para las enzimas *SacI* y *StyI*:

- 0.5 µl Enzima de restricción
- 2 µl Buffer 10X específico para cada enzima
- 0.2 µl BSA (Promega ®. Cód. R396D 241e2416. 10mg/ml. 100X)
- 8µl muestra
- 8.3ul H₂O ultra estéril libre de RNasas y DNasas

Para las enzimas *DraI*, *TaqI*, y *SspI*:

- 0.3 µl Enzima de restricción

- 1.5 μ l Buffer 10X específico para cada enzima
- 8 μ l muestra
- 5.2 μ l/8.3 μ l H₂O ultra estéril libre de RNasas y DNasas.

Para mayores especificaciones en cuanto a la temperatura y concentraciones ver Tabla 5.

6.9. Electroforesis

- Gel de poliacrilamida
 - o Acrylamide/Bis Solution 30% w/v. (BIO-RAD®. Cód. 161-0156)
 - o TBE 5X (500mL)
 - 27 g. Tris (Invitrogen ®. Cód. 15504-020)
 - 13.75 g. Acido Bórico (Promega ®. Cód. H5003)
 - 1.810 g. EDTA (Invitrogen ®. Cód. 15576-028)
 - o Agua ultra estéril libre (GIBCO® ultrapure Distilled Water DNase, RNase Free. Invitrogen)
 - o TEMED (Tetramethylethylen endiamide) (BIO-RAD® Cód. 161-0800, 5 ml)
 - o APS (Amonium persulfate 25% w/v) (BIO-RAD® Cod. 161-0700)
- 3 μ l Loading buffer 1X (Bluejuice Gel Loading buffer 10X. Invitrogen®, Cód. 10816-015)
- Marcador de peso molecular (100bp DNA ladder. Invitrogen®).
- SYBR® Safe DNA Gel Stain

6.9.1 Equipos

- Cámara de electroforesis vertical BIORAD.
- Cámara de electroforesis vertical FisherBiotech.
- Cámara de UV. DyNA Light. Dual Intensity UV Translluminator. Labnet.
- Incubadora Baño María memmert®.
- Cámara Fotográfica Canon® Power Shot G5

7. Metodología

7.1. Manejo de aves

Para el estudio, un total de 120 aves de engorde fueron utilizadas provenientes de la granja Lilia Elena (Sector Guayllabamba, # de aves 50), Villanova (Sector Nanegalito, #50) y San Vicente (Sector Yaruquí, #15); y 11 aves criollas de traspatio obtenidas de casas cercanas a las granjas, pertenecientes a pequeños avicultores que no presentaban ningún tipo de bioseguridad. Las aves seleccionadas fueron transportadas a una granja experimental en donde fueron ubicadas en corrales diferentes dependiendo del sector del cual provenían. Ninguna de las aves presentaba signos característicos de la enfermedad.

Las aves de los sectores de Guayllabamba y Nanegalito no fueron vacunadas contra el virus de Gumboro; sin embargo si recibieron el resto del programa sanitario. En el caso de las aves del sector San Vicente, éstas si fueron vacunadas a los 8 y 21 días de edad y también recibieron todo el programa sanitario. Con el fin de aumentar la posibilidad de que las aves adquieran el virus, el galpón experimental no fue

desinfectado adecuadamente, se reutilizó la cama, no se desinfectaron los comederos y bebederos y se agruparon las aves sin tomar en cuenta su edad dentro del galpón experimental.

7.2. Extracción de la Bolsa de Fabricio (BF)

Después de haber sacrificado al ave por el método de estrangulamiento, se procedió a aislar la BF. En primer lugar las plumas fueron retiradas en la porción superior de la cola del animal y se realizó un corte transversal en esta zona con la ayuda de una tijera de disección. El corte fue realizado teniendo cuidado de que no sea muy profundo para no dañar la bursa. La BF fue aislada con la ayuda de una pinza y tijera esterilizada en etanol y al flameo. En una caja petri, los tejidos circundantes a la bolsa fueron retirados. Una vez extraída la bolsa, ésta fue lavada con agua destilada para remover la sangre y restos de tejidos, y fue colocada en un tubo de 50 ml que contenía etanol al 70%. Un total de 5 bolsas de Fabricio, provenientes de 5 aves de un mismo lote, fueron almacenadas en cada tubo y fueron conservadas a -20°C en el laboratorio hasta su uso. El agrupamiento de las bolsas además de permitir la optimización de materiales y reactivos, se la realizó con el fin de aumentar la posibilidad del aislamiento del virus y de igual manera debido a que se piensa que aves, de un mismo grupo poblacional, pueden albergar la misma variante de cepa del virus. En el caso de las aves criollas, las bolsas de Fabricio fueron procesadas individualmente, ya que solamente se contaba con 11 aves.

Cada tubo fue identificado con el nombre de la granja de la cual proceden, fecha de recolección y la secuencia de número de bolsas de Fabricio presentes en el mismo así:

Para pollos de engorde:	Para pollos enfermos:	Para aves criollas:
Guayllabamba	San Vicente	Granja Experimental
26-Feb-08	31-Ene-08	17-Ene-08
(BF1→BF5).	(BF6→BF10)	(BF11→BF15)

Ver Tabla 6.

Para el sector de Guayllabamba, Nanegalito y San Vicente se contó con un total 10 (50 bursas), 11 (55 bursas) y 3 (15 bursas) tubos Falcon respectivamente, que contenían 5 bolsas de Fabricio cada uno. En el caso de las aves criollas, la bolsa de Fabricio de cada ave fue colocada en un tubo individual.

El procedimiento se lo realizó en condiciones asépticas, esterilizando las tijeras y pinzas en cada paso mediante un mechero de Bunsen.

7.3. Procesamiento de las bursas

Se tomó aproximadamente 0.5g de cada una de las bolsas de Fabricio, dentro del grupo de 5 bursas y que fueron aisladas y maceradas conjuntamente con la ayuda de un mortero, tratando de obtener una pasta homogénea. El macerado fue colocado en un tubo de vidrio con etanol al 75% y almacenadas a -20°C hasta el momento de extracción.

7.4. Extracción del ARN de las bolsas de Fabricio

Para el procedimiento de extracción de ARN los tubos fueron identificados utilizando la primera letra del sector donde fueron recolectadas las muestras (G→Guayllabamba; N→Nanegalito) o si eran enfermos o criollos (EG→Enfermos; Criollos → CrBF) seguido del número del grupo de bolsas de Fabricio (G1; N1; EG1; BFCr1).

Aproximadamente 0.5g del homogenizado de las bolsas fue utilizado para la extracción viral. Las muestras fueron centrifugadas a 10000g por 20 min. con el fin de eliminar el exceso de etanol. El precipitado del homogenizado de la bolsa fue sometido al procedimiento de extracción del ARN vírico descrito por Wu, 1998 y Villegas *et al.*, 2001 (método de extracción viral de guanidina tiocianato fenol-cloroformo, AGPC) con algunas modificaciones. En un tubo Falcon de 15 ml, el homogeneizado de las bolsas fue mezclado con 5ml de la solución D (4.23M de guanidina tiocianato, 26.4M de citrato de sodio, 0.0076% de *B*-mercaptoetanol) más agua con dietilpircarbonato (DEPC). La proteinasa K a 40µg/ml fue añadida, seguido de una incubación a 37°C por 30 min. y a 60°C por 30 min. Las muestras fueron centrifugadas a 10000g por 20 min. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y 5ml de fenol fueron añadidos conjuntamente con 1 ml de cloroformo:isopropanol (49:1) y 0.5ml de acetato de sodio 2M. El tubo fue colocado en hielo por 15 minutos y fue centrifugado por 10 min. a 10000g. El sobrenadante fue colocado en un nuevo tubo que contenía 1 Vol. de isopropanol y fue incubado a -20 °C por 1 hora. Las muestras fueron nuevamente centrifugadas a 10000g por 20 min. El pellet fue lavado con etanol al 75% frío para

luego ser centrifugado a 10000g por 20 min. El pellet fue resuspendido en etanol absoluto el cual fue incubado a -20°C por 30 min. El tubo fue centrifugado a 10000g por 20 minutos y después el sobrenadante fue eliminado teniendo cuidado de no remover el pellet. El pellet fue secado a temperatura ambiente por toda la noche. El pellet fue disuelto en 150 µl de agua estéril con DEPC (GIBCO® ultrapure Distilled water DNase, Rnase Free. Invitrogen).

7.5. Extracción del ARN de las vacunas

Las vacunas fueron sometidas al proceso de extracción viral. Se realizó el mismo procedimiento de extracción utilizado para las bolsas, con variaciones en las cantidades para mantener las mismas concentraciones utilizadas en el procesamiento de las bolsas. En este caso, 0.008g de la vacuna fueron pesados para ser tratados después con la solución D que contenía 1 ml de guanidina tiocianato 4.23M, 26.4M de citrato de sodio, 0.0076% de *B*-mercaptoetanol más agua con dietilpirocarbonato (DEPC). La proteinasa K fue añadida a la misma concentración 40µg/ml, seguido de una incubación a 37°C por 30 min. y a 60°C por 30 min. Las muestras fueron centrifugadas a 10000g por 20 min. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y 1ml de fenol fueron añadidos conjuntamente con 0.50 ml de cloroformo:isopropanol (49:1) y 0.25ml de acetato de sodio 2M. De aquí en adelante, el procedimiento fue el mismo descrito anteriormente.

7.6. Extracción viral mediante kit comercial

De las 11 bolsas de Fabricio correspondientes a aves criollas, solamente 10 fueron sometidas a la extracción viral; la bolsa CrBF52 no fue utilizada en la extracción

viral debido a que no se dispuso de suficiente tejido bursal. Las bursas correspondientes a aves criollas fueron sometidas a la extracción viral mediante la utilización de un kit de extracción viral Nucleo Spin® RNA Virus siguiendo las indicaciones del productor del kit.

7.7. Purificación del ARN (dsRNA)

Las muestras fueron sometidas al procedimiento de purificación de ARN expuesto por Wu, *et al.*, 1998. Del volumen total (150µl) obtenido en el procedimiento de extracción, solamente 75µl fueron sometidos al procedimiento de purificación en un tubo Eppendorf de 1.5ml; mientras que la otra mitad se la conservó a -20°C hasta la realización del RT/PCR. 200 ml de cloruro de litio (LiCl) de una solución madre 8M fue añadida al tubo que contenía los ácidos nucleicos para dar una concentración final de 2M a la solución. Las muestras fueron incubadas a 4°C por toda la noche. Después de una centrifugación a 14000g por 30 min., el sobrenadante fue recuperado y 200ml LiCl 8M fue añadido para alcanzar una concentración final de 4M en la solución. Las muestras fueron incubadas y centrifugadas nuevamente a 14000g por 30 min. El pellet obtenido fue resuspendido con etanol al 75%, se centrifugó nuevamente y el sobrenadante fue descartado. Tres volúmenes de etanol fueron añadidos al precipitado y las muestras fueron incubadas a 20°C por toda la noche. Se esperó a que se haya evaporado el etanol presente en el tubo y el pellet fue resuspendido en 50 – 100µl de agua estéril libre de nucleadas. El ARN viral obtenido de las bolsas de Fabricio de aves criollas no fueron sometidos al proceso de purificación del ARN ya que el kit comercial no lo sugiere.

7.8. Transcripción inversa/Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT/PCR)

ARN proveniente de las muestras de bolsas de Fabricio fueron transcritas inversamente a cADN y fueron amplificadas a través del RT/PCR. Un fragmento de 248pb del gen VP2 fue amplificado con el uso de primers específicos para la región. La secuencia nucleotídica para el primer GUMB-1 (forward primer) fue 5'-GTAACAATCACACTGTTCTCAGC-3' y la secuencia para el primer GUMB-2 (reverse primer) fue 5'-GATGTAAGTGGCTGGGTTATCTC-3'.

Para la realización de la prueba, el ARN fue transcrito reversamente a su cDNA en una mezcla de 10µl que contenían 3.88µl de agua libre de nucleasas (GIBCO® ultrapure Distilled water DNase, RNase Free. Invitrogen®), 2µl del 5X strand buffer (Invitrogen®), 0.28µl de DTT (Invitrogen®), 1µl de 0.1M dNTPs (Promega®), 1µl 25pmol del primer G1, 24U de la transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase. Invitrogen®), 8.8U de los inhibidores de RNAasas (RNaseOUT. Invitrogen®) y 0.75ul de la muestra (bursas extraídas, control positivo y negativo). La reacción fue realizada a 37°C por una hora.

El PCR fue realizado con un volumen de reacción total de 50 µl el cual estuvo formado por 10µl de cDNA (previamente transcrito), 5µl del 10X buffer PCR, 1µl 25pmol del primer G2 , 0.8µl 50mM de MgCl₂, 2U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen). El mix de PCR fue sometido a un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 min. con el fin de separar las hebras de ADN y después seguido de 35 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación o alineación de los primers a 55°C por

1 min., y amplificación a 72°C por 1 min.). Finalmente, se realizó la fase de elongación final de 8 min a 72°C, con el fin de asegurar que hebras simples de ADN sean totalmente extendidas, seguido de una fase de reposo de 10°C para mantener a una temperatura de almacenamiento.

7.9. Electroforesis

Una vez finalizada el RT/PCR se procedió a la separación y visualización de los productos amplificados en un gel de 2% (UltraPure Agarose. Invitrogen®). Un total de 5ul del producto amplificado de cada muestra fue mezclado con 3ul del loading buffer (2X) las cuales fueron colocados en los huecos en el gel de agarosa. Adicionalmente se colocó 2ul de un marcador de 100bp (“*DNA ladder*”). La electroforesis fue llevada a cabo a 100V por 20 minutos. Después, el gel con los productos amplificados fue coloreado en SYBR® Safe DNA Gel Stain por 30 a 40 min y después fueron visualizados en una cámara de luz ultravioleta. Un resultado positivo muestra una banda de aproximadamente 248pb. El PCR fue llevado a cabo en un termociclador TECHNE TC-412.

En el caso de que no se observó ningún producto de amplificación, tanto el procedimiento de extracción como el de amplificación fueron realizados por duplicado con el fin de confirmar los resultados obtenidos.

7.10. Análisis con enzimas de restricción (RFLPs)

Los productos de 248pb del procedimiento de RT/PCR provenientes de las bolsas de Fabricio y del control positivo (Vacuna BIOMUNE®) fueron digeridos por cada una de las enzimas *Taq I* (Invitrogen®), *SspI* (Invitrogen®), *DraI* (Invitrogen®) y *SacI* (Promega®), *StyI* (Promega®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El tiempo de digestión fue de 1 hora como mínimo; sin embargo, hubo ocasiones en que la restricción enzimática se la realizó durante la noche, dependiendo de la disponibilidad del tiempo en el laboratorio. Los fragmentos de ADN digerido fueron sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%. El gel fue corrido a 100v por 2h40 min. Posteriormente el gel fue coloreado en una solución de SYBR® Safe DNA Gel Stain por 30 – 40 minutos para luego ser observado en una cámara ultravioleta. Los tamaños de las bandas obtenidos fueron estimados a través de la comparación con el marcador de ADN de 100pb (100bp DNA Ladder. Invitrogen®) también colocado en el gel.

8. Resultados

8.1. Detección viral por RT/PCR

De un total de 24 grupos de BF, un total de 120 aves de engorde sacrificadas, que fueron sometidas al protocolo descrito por Wu., *et al.*, en 1998, 16 grupos de BF fueron positivos en la extracción viral, mostrando un producto de amplificación después de realizada la RT/PCR. De entre las granjas seleccionadas, 9 de los 10 grupos de Guayllabamba y 7 de los 11 grupos de Nanegalito fueron positivos a la presencia del virus en sus parvadas. No se encontraron casos positivos en ninguna de la muestras de Yaruqui. Con relación a las muestras obtenidas en las aves criollas, sólo se detectó una muestra positiva de entre las 11 extraídas con el protocolo de Wu, *et al.*; mientras que, de 10 muestras extraídas con el kit comercial, nueve aves resultaron positivas al virus de Gumboro (Figura 4).

8.1.1. Control positivo y negativo

El fragmento amplificado con los primers descrito por Wu, *et al.*, 1998 y Villegas, *et al.*, 2001 corresponde a aproximadamente 248bp. Este fragmento fue correlacionado con el encontrado en el control positivo que se utilizó en esta investigación. No se observó ninguna banda el control negativo (Agua pura) lo que garantizó la fiabilidad de la amplificación (Figura 4).

Los resultados fueron diferentes para cada uno de los sectores, como se describe a continuación.

8.1.2. Bursas correspondientes a Guayllabamba

El ARN viral extraído de las bolsas de Fabricio provenientes del sector de Guayllabamba fue sometido al procedimiento de purificación de ARN y de los 10 grupos de bursas solamente en cuatro (20 bolsas) fue posible detectar el fragmento de 248pb. Por otro lado, en el caso del ARN viral extraído que no fue sometido al procedimiento de purificación con LiCl, el fragmento de 248pb fue detectado en 9 grupos de bolsas de Fabricio (45 bolsas en total), lo cual corresponde al 90% de las bolsas de este sector. Los productos amplificados se pueden observar en la Figura 4.a Estos 9 grupos de BF fueron sometidos al procedimiento de restricción enzimática.

8.1.3. Bursas correspondientes a Nanegalito

El ARN viral extraído de bursas correspondientes a Nanegalito generó un producto de amplificado de 248pb. En el caso del ARN viral que fue sometido al procedimiento de purificación, en 7 grupos de bursas se detectó el fragmento (35 bolsas en total), lo cual equivale al 63.63% de bursas del sector. Los productos de ARN pueden ser observados en la Figura 4.b. Por otro lado, el ARN viral que no fue sometido al procedimiento de purificación; de los 11 grupos de bursas analizados, solamente en 4 grupos se detectó el producto amplificado (20 bolsas). Las 35 bolsas positivas para el RT/PCR fueron sometidas al procedimiento de restricción enzimática.

8.1.4. Bursas correspondientes a San Vicente

El ARN viral extraído de las bursas del sector de San Vicente fue sometido al procedimiento de purificación y a la amplificación a través del RT/PCR. En estas bursas no se encontró el virus de Gumboro debido a que no se observó una amplificación del ARN viral en las 15 aves estudiadas.

8.1.5. Bursas de aves criollas

El ARN viral extraído con el protocolo de Wu, *et al.* 1998 y Villegas, *et al.* 2001 no presentó productos de amplificación alguno, a excepción del ave, CrBF2, en donde se observó una banda de 248pb. De 10 muestras que fueron sometidas al procedimiento de extracción con el kit comercial (Viral RNA isolation Nucleo Spin. Macherey-Nagel), nueve resultaron positivas a la amplificación del ARN viral. La muestra CrBF2 fue la única muestra que presentó el fragmento de amplificación de 248pb para ambos procedimientos de extracción viral. Los productos amplificados se pueden observar en la Figura 5. Las bolsas de Fabricio que mostraron productos amplificados fueron sometidas a la digestión enzimática.

8.2. RFLPs

Todas las muestras que presentaron el fragmento de 248pb, fueron sometidas a la digestión enzimática con las enzimas *TaqI*, *DraI*, *SspI*, *SacI* y *StyI*. En la Tabla 7 se resume las diferencias de restricción que existen entre la vacuna (control) y las muestras

experimentales en relación a las diferentes enzimas. El perfil de restricción para cada una de las muestras se presenta en la Tabla 8.

8.2.1. Enzima de restricción *TaqI*

Esta enzima permitió la restricción enzimática de las muestras y se observó dos bandas de aproximadamente 198pb y otra de 50 pb. Sin embargo, no existió ninguna diferencia entre el control positivo y las muestras utilizadas en este estudio (Figura 6).

8.2.2. Enzima de restricción *DraI*

Esta enzima permitió la restricción enzimática de las muestras utilizadas en este estudio y se observó dos bandas de aproximadamente 198pb y otra de 50 pb; mientras que, el control positivo no mostró restricción alguna marcando una clara diferencia entre la cepa vacunal y otra cepa presente en el área. Esta diferencia fue observada en todas las muestras sin distinción de granja (Figura 7).

8.2.3. Enzima de restricción *SspI*

Esta enzima no mostró ningún tipo de restricción enzimática en las muestras ni el control positivo (Figura 8).

8.2.4. Enzima de restricción *SacI*

Al contrario de la enzima *DraI*, esta enzima digirió el control positivo en dos bandas de aproximadamente 198pb y otra de 50 pb. Las muestras positivas, utilizadas en este estudio, no fueron restringidas demostrando una clara diferencia entre la cepa vacunal y otra cepa presente en el área. Esta diferencia fue observada en las muestras sin distinción de granja (Figura 9.1 y 9.2).

8.2.5. Enzima de restricción *StyI*

Los productos amplificados de las muestras de bursas de las granjas al ser sometidos a la restricción enzimática no mostraron secuencia de corte para la enzima *StyI*; sin embargo, el control positivo fue restringido en dos bandas de aproximadamente 198pb y otra de 50pb (Figura 10.1 y 10.2).

8.2.6. Bursas aves criollas

El producto amplificado de 248pb fue sometido a la restricción enzimática y se observó digestión con las enzimas *TaqI* y *DraI* generando dos bandas de 198 y 50 pb; mientras que *SspI* y *SacI* no encontraron su sitio de restricción; de modo que, se observó el mismo fragmento de 248pb. La digestión enzimática del ARN viral para las enzimas *TaqI*, *DraI* y *SspI* se puede observar en la Figura 11.1- 11.3.

9. Discusión

La enfermedad de Gumboro, causada por un virus de doble cadena de ARN, es una de las enfermedades infecciosas más importantes que afecta al sector avícola industrial generando grandes pérdidas económicas. A lo largo de la historia avícola, ha sido de interés prioritario el desarrollo de herramientas de diagnóstico específicas y sensibles; así como también, la creación de vacunas efectivas que prevengan y controlen esta enfermedad. Siendo el virus de Gumboro muy resistente y capaz de permanecer en el ambiente de un galpón por meses, se ha observado que la bursitis infecciosa continua afectando la producción avícola a pesar de los grandes esfuerzos sanitarios y profilácticos. Probablemente se deba a la gran mutabilidad que presentan los virus de ARN que consecuentemente, pueden generar variantes genéticas (cepas) que dificulten su control (Giambrone, *et al.*, 1994). Además, se piensa que los virus están evolucionando de manera independiente en cada país o zona de acuerdo a las condiciones presentes (Banda, 2006)

Es importante aclarar que esta tesis tuvo como objetivo la caracterización del virus de Gumboro y no determinar la prevalencia o incidencia de la enfermedad en los planteles avícolas muestreados.

9.1 Sacrificio de las aves

En el presente estudio, las aves fueron sacrificadas a los 21, 22 y 44 días de edad. La edad considerada como la más óptima para realizar estudios de campo se encuentra

entre la segunda y tercera semana de edad, época en la cual los anticuerpos maternos presentes en el pollito comienzan a decaer (Comunicación personal, Dr. Ladman, B.). Es aquí cuando, los sistemas de vacunación son aplicados para evitar que los lotes avícolas sean susceptibles al virus de campo. Sin embargo, los pollitos en este estudio fueron muestreados antes de su vacunación, con el fin de evitar la extracción del virus vacunal, y así incrementar el éxito de esta investigación permitiendo que el virus de campo desafíe al animal. Cabe mencionar que las aves pertenecientes al sector de San Vicente fueron utilizadas en el presente estudio debido a que su sistema inmune estaba comprometido ya que presentaban una enfermedad desconocida y se pensó que existiría la posibilidad de que las aves adquirieran el virus de campo.

El ARN viral fue extraído de las bursas de las aves sacrificadas a los 21 y 22 días de edad. Con respecto a las aves de 44 días de edad, pertenecientes al sector de San Vicente, no se logró la extracción del ARN viral de sus bursas, aún cuando estas fueron vacunadas, no se observó ARN viral proveniente de la vacuna y mucho menos aún del virus de campo. Las aves fueron vacunadas a los 8 y 21 días de edad; sin embargo, para los 44 días de edad, el sistema inmune del ave ya había reaccionado contra el ARN viral presente, lo que probablemente evitó que el ARN del virus sea aislado. Al mismo tiempo, las bursas de las aves ya fueron desafiadas en un principio con el virus vacunal, y debido a la vacuna es que estas aves estuvieron protegidas sin mostrar evidencia del virus en sus bursas.

9.2. Procesamiento de las bursas

En el presente estudio, los animales seleccionados de las granjas fueron agrupados en grupos de 5 animales cuyas bursas fueron almacenadas en etanol al 70% luego de ser extraídas, facilitando el trabajo y ahorrando tiempo y recursos. Por otro lado, la agrupación tenía el objetivo de aumentar la posibilidad de aislar al virus. Por el contrario, las aves criollas al no pertenecer a un lote fueron tratados individualmente.

9.3. Extracción de ARN viral

El método de extracción viral (AGPC) desarrollado por Wu, *et al.*, 1998 y Villegas, *et al.*, 2001, una vez sometido a algunas modificaciones, permitió la extracción de ARN a partir de tejido de bolsas de Fabricio. Originalmente, Wu, *et al.* y Villegas, *et al.*, utilizaron el reactivo sarcosyl. Sin embargo, en este estudio, el sarcosyl fue reemplazado por la proteinasa K, debido a que el primer reactivo fue retirado del mercado. Se observó que la proteinasa K era indispensable para la obtención de ARN viral, ya que permite la hidrolización y disociación de la proteína VP1 del ARN viral, al mismo tiempo que mantiene el ARN intacto a través de la destrucción de ribonucleasas celulares presentes en las muestras de tejido (Wu, *et al.*, 1998) y consecuentemente la recuperación del ARN de las BF.

Por otro lado, se pudo constatar que el kit comercial es mucho más sensible, de fácil uso y de corta realización. Sin embargo, una gran desventaja de la utilización de estos kits comerciales, es que están destinados para un número específico y reducido de

muestras, haciendo su uso limitado debido al costo. Por otro lado, el protocolo utilizado en este proyecto, si bien es cierto permitió el desarrollo de habilidades en la ejecución de técnicas moleculares y es relativamente más barato, pero una gran desventaja es que consume mucho tiempo en su desarrollo incrementando el riesgo de ejecución de errores humanos.

9.4. Purificación del ARN viral

Con el fin de valorar la sensibilidad de la técnica de extracción de Wu, *et al.*, 1998 y Villegas, *et al.*, 2001, la mitad de los extractos virales obtenidos de todas las aves provenientes de lotes avícolas, fue sometida al procedimiento de purificación del ARN mediante la utilización de cloruro de Litio (LiCl). El objetivo de realizar una purificación con LiCl fue debido a que en otros estudios se ha observado que este compuesto es capaz de incrementar la cantidad de ARN extraído cuando existe un ambiente contaminado con ADN y ARN de cadena simple (Kataria, *et al.*, 1999). Además, el LiCl no precipita ADN, proteínas o carbohidratos (Barlow, *et al.*, 1963). Por otro lado, se conoce que el LiCl permite la recuperación de ARN, ya que remueve inhibidores de la translación y de la síntesis de cADN en preparaciones de ARN, aumentando la estabilidad del ARN (Barlow, *et al.*, 1963.).

En el momento de la amplificación viral, no se observó una amplia diferencia entre las muestras que fueron sometidas al procedimiento de purificación y las que no, probablemente debido a errores en la manipulación. En el sector de Nanegalito, la purificación a través del LiCl permitió la obtención de un mayor número de muestras positivas para la extracción viral con respecto a las muestras que no lo fueron,

demostrando que el LiCl permitió la obtención de mayor cantidad de ARN viral. Sin embargo, en el sector de Guayllabamba, se observó el patrón opuesto. Fue la mitad del extracto viral que no fue sometido a la purificación, el cual mostró un mayor número de muestras positivas. La diferencia no puede ser explicada categóricamente; sin embargo, se ha observado que para la recuperación de ARN viral, la concentración debe ser alta, para lograr una purificación a través de LiCl. De esta manera, la concentración del extracto viral sometido a la purificación no presentó la suficiente para permitir un aislamiento adecuado del ARN a través del LiCl. Por otro lado, no se puede descartar la posibilidad de que las concentraciones de ARN en la BF no sea de distribución homóloga; consecuentemente, pudo haber variaciones en la cantidad de ARN extraído por muestra.

9.5. Amplificación del ARN viral a través del RT/PCR

El RT/PCR fue la técnica utilizada para amplificar los extractos de ARN viral del IBDV, mediante la utilización de primers específicos, que amplificarían un producto de 248pb de la región hipervariable del gen VP2, descritos por Noguera, *et al.*, 2003. Este fragmento fue observado en 16 grupos de BF de aves provenientes de los lotes avícolas (120 aves de engorde en total). De entre ellas, 9 grupos de bolsas fueron positivas para el sector de Nanegalito y 7 para el sector de Guayllabamba. Mientras que grupos de aves provenientes de San Vicente no se detectó la presencia del virus. Del mismo modo, el virus fue amplificado de 9 de las 11 aves criollas.

Otros estudios de caracterización molecular han amplificado el mismo fragmento de 248pb; sin embargo, las aves utilizadas es éstos sufrían de la enfermedad. Por

ejemplo, Noguera, *et al.*, 2003, realizó la caracterización molecular de dos cepas venezolanas aisladas de aves de engorde que presentaban los signos característicos de la enfermedad. Por otro lado, en el 2001, Villegas, *et al.*, caracterizan nueve aislamientos virales provenientes de diferentes regiones de España y en el 2002, realiza la caracterización molecular del IBDV proveniente de bursas de los Estados Unidos y Latinoamérica. Entre los países latinoamericanos se encontraron México, República Dominicana, Perú, Venezuela, Colombia, Ecuador y Brasil. Banda, *et al.*, 2000, realizaron la caracterización molecular de siete aislamientos de campo provenientes de pollos de engorde comerciales provenientes del estado de Georgia.

Por otro lado, otros investigadores, utilizando primers distintos a los del presente estudio, han amplificado fragmentos de mayor tamaño localizados en la misma proteína VP2 así: Liu, *et al.*, 1994, amplificaron una banda de 643 pb; Wu, *et al.*, 1998, encontraron bandas de 1201pb y 1958pb; Zierenberg, *et al.*, 2001, amplificaron un fragmento de 723pb en cepas vvIBDV; Ozbey, *et al.*, 2003, amplificaron una banda de 743pb, al igual que Manté, *et al.*, 2001. Al lograr la amplificación de un fragmento de mayor tamaño, existe la posibilidad de encontrar regiones variantes que podrían identificar otro tipo de variantes que con el tiempo han sido mutadas y adaptadas a un determinado medio.

Aunque han existido otros estudios enfocados a otros fragmentos del genoma del IBDV (Lee *et al.*, 1992; Tiwari, *et al.*, 2002), éstos fueron orientados a conocer la variación de la secuencia de los genes VP1, VP2 y VP3 entre cepas clásicas y vacunales. Sin embargo, la región variable del gen VP2 ha sido considerada como el sitio ideal para determinar la variación antigénica entre cepas y es debido a esto que la

mayoría de marcadores moleculares han sido diseñados para esta región. Por otro lado, estos estudios concuerdan que la mejor opción de clasificación o determinación de variantes virales es el uso de enzimas de restricción. En el presente estudio, los productos amplificados de 248pb fueron sometidos al análisis con RFLPs.

9.6. Análisis de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción. RFLPs

El método de restricción enzimática (RFLPs) ha sido utilizado previamente para la diferenciación de las cepas del IBDV (Domanska, *et al.*, 2003; Jackwood, *et al.*, 2001; Banda, *et al.*, 2000). La mayoría de estos estudios se han enfocado al análisis del gen de la VP2 pese a que los productos de amplificación utilizados fueron de diferentes tamaños. De la misma manera, diferentes enzimas de restricción han sido utilizadas. Enzimas como *BstNI* o *EcoRII*, *StyI*, *DraI*, *SspI*, *SacI*, *Sau3AI* o *MboI*, *StuI*, *HaeIII*, *TaqI* y *BspMI* han sido usadas conjuntamente o de forma individual (Ozbey, *et al.*, 2003). Sin embargo, el uso de diferentes enzimas hace difícil la comparación entre estudios.

En el presente estudio los productos del RT/PCR de 248 pb del gen de la proteína viral VP2 fueron sometidos a la restricción enzimática con el fin de detectar variación genética entre los aislamientos del IBDV y caracterizar genéticamente a los aislados de nuestro país. Cinco enzimas, *TaqI*, *SacI*, *DraI*, *SspI* y *StyI*, fueron utilizadas y su patrón de corte fue analizado con el fin de encontrar diferencias entre ellas. El control positivo presentó diferente patrón de bandas con respecto a las bursas de Fabricio analizadas. En

la Tabla 6, se indica en resumen el comportamiento de los productos restringidos entre el control positivo (vacuna) y las muestras con las 5 enzimas utilizadas en este estudio.

9.6.1. *SacI*

Los productos de amplificación de ARN viral fueron sometidos al análisis enzimático con la enzima *Sac I*, en donde no se observó restricción enzimática. La misma enzima fue utilizada por Zierenberg, *et al.* en el 2001 en un estudio de restricción enzimática para diferenciar productos de amplificación de 723pb de cepas clásicas y virulentas aisladas de Europa y Asia. Zierenberg, *et al.*, observaron que la enzima *SacI* encontró su sitio de restricción en cepas conocidas como clásicas. En otros estudios, se refieren a la enzima *SacI*, como una enzima útil para la diferenciación entre serotipos, cuyo sitio de restricción se encuentra únicamente en cepas cIBDV (Cavanagh, 2001, Coroas, *et al.*, 2003). De acuerdo a estos reportes, se podría decir que la cepa presente en el campo no corresponde a una cepa clásica cIBDV.

9.6.2. *SspI*

En el caso de la restricción enzimática a la cual los productos de amplificación fueron sometidos con la enzima *SspI*, esta última no encontró su secuencia de corte, siendo negativa la restricción enzimática. En el control positivo tampoco se observó digestión enzimática con la enzima *SspI*. La digestión con esta enzima ha sido observada en cepas de alta virulencia (Noguera, *et al.*, 2003, Villegas, *et al.*, 2002; Villegas, *et al.*, 2004, Manté, *et al.*, 2000, Jackwood y Sommer, 1998, Müller, *et al.*,

1992). Su sitio de restricción, denominado *NgoMIV*, se encuentra en las cepas virulentas (Domanska, *et al.*, 2003).

Villegas., *et al.*, 2001 observaron que las manifestaciones clínicas virulentas de cepas vvIBDV españolas fueron positivas para la digestión enzimática para *SspI* y *TaqI*, confirmando la utilización de estas enzimas como marcadores de virulencia. Sin embargo, Jackwood y Sommer, 1998, detectaron que cepas provenientes de los Estados Unidos presentaron el sitio de restricción para esta enzima, a pesar de que su fenotipo no era virulento. Por otro lado, aislamientos virales brasileños, venezolanos y provenientes de República Dominicana, han presentado el sitio de restricción para la enzima *SspI*. En estos lugares se han detectado cepas vvIBDV (Villegas, *et al.*, 2003).

9.6.3. *StyI*

El ARN viral no fue restringido por la enzima *StyI*, mientras que el control positivo si fue restringido por esta enzima. Coroas, *et al.*, 2003 encontraron el sitio de restricción para esta enzima en cepas virulentas, al igual que Villegas, *et al.*, 2003, observaron que el patrón característico para cepas virulentas está dado por las enzimas *TaqI*, *StyI* y *SspI*. Sin embargo, la significancia clínica y patológica de las cepas que presentan el sitio de restricción para la enzima *SspI* es todavía desconocida; ya que otros estudios han demostrado que aves que no presentan los síntomas característicos causados por las cepas vvIBDV si poseen el sitio de restricción para esta enzima (Villegas, *et al.*, 2003).

9.6.4. *TaqI* y *DraI*

Por otro lado, las muestras fueron sometidas a la restricción enzimática con la enzima *TaqI*, resultando positiva para todos los productos amplificados. En el caso de la enzima *DraI*, ésta encontró su sitio de restricción en los productos amplificados de ARN bursal. Según el patrón de corte enzimático analizado de las BF, los productos amplificados resultaron positivos solamente para estas dos enzimas y negativos para las enzimas *SspI*, *SacI* y *StyI*. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Villegas, *et al.*, 2001, quienes describen que cepas variantes se caracterizan por la ausencia de digestión enzimática con las enzimas *BstNI* y *StyI* y por presentar restricción enzimática con las enzimas *TaqI* y *DraI* cuyo sitio de corte se encuentra en la región hipervariable del gen de la proteína VP2. Villegas, *et al.*, 2001, clasifican en su estudio, a aquellas cepas que posean este patrón, como cepas variantes A del virus.

Villegas, *et al* 2003 realizaron la caracterización molecular del IBDV de muestras bursales provenientes de aves de engorde provenientes del exterior de los Estados Unidos. El fragmento analizado fue también de 248pb, el mismo que fue sometido a análisis de restricción enzimática utilizando las mismas enzimas que en el presente estudio. Las cepas variantes Delaware A y E fueron detectadas en muestras provenientes del Ecuador. Villegas, *et al.*, 2003 denominaron a la cepa variante Delaware A presente en nuestro país como EC-3, debido a que mostró un 98% de similitud con esta cepa a través de estudios de secuenciación (Villegas, *et al.*, 2003). De esta manera, futuros estudios deben involucrar la secuenciación de ARN viral

proveniente de los sectores avícolas utilizados en este estudio, con el fin de confirmar si la cepa detectada corresponde a la cepa Delaware A.

La vacuna BIOMUNE, cuya cepa viral se sabía que corresponde a la cepa clásica Lukert, resultó positiva para la restricción enzimática con las enzimas *TaqI*, *SacI* y *StyI*. Este patrón de restricción coincide con el obtenido por Villegas, *et al.*, 2000 quienes realizaron la caracterización molecular de aislados virales brasileños, incluyendo cepas vacunales. El patrón obtenido también se lo comparó con el sistema de genotipificación de cepas del virus de Gumboro por RFLPs utilizado en la Universidad de Georgia (Tabla 9), en donde la cepa Lukert es restringida por las mismas enzimas que se utilizaron en este estudio.

Las enzimas a ser utilizadas en la restricción enzimática deben ser cuidadosamente escogidas, con el fin de que estas enfoquen su acción sobre cambios significantes de los nucleótidos. La técnica de los RFLPs tiene la desventaja de que el sitio de restricción puede ser alterado, sin que la proteína a ser codificada sea afectada (Etteradossi, 2001). Por otro lado, las enzimas de restricción flanquean solamente secuencias cortas de bases; de modo que, pueden existir diferencias fuera del sitio de restricción que no pueden ser detectadas por las enzimas. Además, los RFLPs no son utilizados como un ensayo para el diagnóstico rutinario debido a que se requiere de una alta calidad de ARN viral (Jackwood, 1995).

Se ha documentado que las cepas variantes son responsables únicamente de la forma subclínica de la enfermedad, la cual trae como consecuencia pérdidas económicas, ya que las aves no responden adecuadamente a los sistemas de vacunación

y a que no existe una ganancia de peso adecuada. Además, las cepas antigénicas variables del virus son capaces de atravesar las inmunidades maternal y activa generadas a través de vacunas comercialmente disponibles.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que el virus presente en un lote de aves puede ser una variante de la cepa vacunal utilizada en la inmunización de las aves (Cavanagh, 2001). Esto puede deberse a que la cepa del virus vacunal presente en el campo se encuentra ante presiones del medio y del manejo de los galpones, como es el caso de los desinfectantes, haciendo que el virus sufra cambios en su conformación genética y mute para persistir en el ambiente.

En Latinoamérica y Norteamérica se ha demostrado que las cepas variantes del IBDV son más comunes en los lotes avícolas (Giambrone, *et al.*, 1994). Jackwood y Sommer, 1999 determinaron la presencia de cepas variantes en EE.UU, Puerto Rico, Costa Rica, Guatemala; así como de cepas vvIBDV en México, El Salvador y Puerto Rico. Estudios demuestran que cepas virulentas están ganando terreno en diferentes regiones de América del Sur. Perez, R. *et al.*, 2006 lograron determinar la presencia de cepas muy virulentas en Uruguay mediante la utilización del RT-PCR. Los primers amplificaron un fragmento de 643pb dentro de la región hipervariable de la proteína VP2. Se realizó un análisis putativo de RFLPs a través de un software mediante la utilización de enzimas de restricción (*DraI*, *SacI*, *StyI*, *SspI*, *TaqI* y *MvaI*). El patrón de RFLP resultó positivo para las siguientes enzimas, *StyI*, *SspI*, *TaqI*, las cuales demostraron que corresponden a muestras muy virulentas.

Las cepas del vvIBDV presentes en el Brasil y la República Dominicana presentan diferencias que los ubican en diferentes grupos dentro de un árbol filogenético, lo cual sugiere que las cepas de vvIBDV de Latinoamérica están pasando a través de un proceso evolutivo que se ve influenciado por las medidas higiénico sanitarias del país de origen de la cepa y, probablemente con los efectos de cambio climático que se vienen dando a nivel mundial. Por ejemplo, los cambios climáticos, excesivo calor o frío, situaciones a las que las aves no están acostumbradas, las someten a estrés, llegando a alterar el funcionamiento de su BF y haciéndolas susceptibles al virus. Lo mismo puede estar sucediendo en el Ecuador y no se sabe con exactitud ya pueden ser diferentes cepas debido a que las condiciones presentes en el país son diferentes a las que encontramos en otros. Es por esto que, futuras investigaciones referentes a la caracterización y secuenciación de cepas ecuatorianas son necesarias.

10. Conclusiones

- Este trabajo de investigación realizado en planteles avícolas del centro norte del Ecuador, permitió demostrar, en 16 grupos de aves provenientes de lotes avícolas y en 9 aves criollas, la presencia del virus de Gumboro a través de la utilización del protocolo de extracción de ARN viral AGPC.
- La edad a la cual deben ser sacrificadas las aves debe encontrarse entre la segunda y tercera de edad. Es importante que las aves hayan disminuido la cantidad de sus anticuerpos maternos para que sean capaz de infectarse con el virus de campo y no deben ser vacunadas.
- La purificación de ARN viral fue utilizada con el fin de lograr recuperar la mayor cantidad de ARN viral presente en las bursas. Sin embargo, en este estudio, no se observó que el LiCl haya influenciado en la cantidad de ARN viral obtenido.
- La utilización de kit comerciales para la extracción de ARN resulta más eficiente ya que garantizan una mejor y adecuada purificación de ácidos nucleicos, ahorran tiempo y manipulación de reactivos, y brindan una mayor confiabilidad el diagnóstico molecular. Sin embargo, el método AGPC permitió el desarrollo de habilidades, así como también su uso resulta más accesible debido a su reducido costo en relación a los kits comerciales.

- Mediante el análisis con las enzimas de restricción, se encontró que el ARN viral presente en las bursas era diferente al virus vacunal utilizado en los lotes avícolas. Esto se evidenció gracias al patrón de RFLPs diferente el ARN bursal y el vacunal, logrando el objetivo principal de este estudio, la caracterización molecular del virus de Gumboro dentro de las tres explotaciones avícolas del centro norte del país.

- Las enzimas *SacI*, *TaqI* y *StyI* encontraron su sitio de restricción en la cepa vacunal, patrón de RFLPs descrito previamente como específico para la cepa Lukert. De esta manera, se logró confirmar que la cepa vacunal utilizada en el estudio correspondía a esta cepa clásica vacunal.

- Las muestras de ARN bursal, presentaron un patrón diferente, siendo positiva solamente para la restricción enzimática con las enzimas *DraI* y *TaqI*. Según este estudio en comparación con los realizados en otros países, este patrón enzimático corresponde a la cepa variante Delaware variante A (Del-A). Por lo tanto, se logró confirmar la existencia de cepas variantes en el país a través de la utilización de la restricción enzimática.

11. Recomendaciones

- Debido a que se conoce que existe variabilidad genética en el área de estudio, es importante conocer si las cepas variantes presentes en el campo corresponden a cepas vacunales de campo, cepas patógenas o si son variaciones de la cepa vacunal.

- Nuevos estudios de caracterización molecular del IBDV son necesarios en el área de estudio, así como en otras zonas del país donde existe una explotación avícola intensiva, ya que se sabe que el IBDV de campo continúa mutando y no existen estudios epidemiológicos en el país.

- Realizar estudios comparativos entre animales enfermos versus animales sanos, con el fin de caracterizar a la cepa y su patogenicidad; así como también, comparar aves ponedoras con aves de engorde.

- Se recomienda el uso de nuevos primers que logren amplificar fragmentos de mayor tamaño, con el fin de poder encontrar nueva variabilidad genética con enzimas de restricción.

- Nuevas zonas del genoma viral deben ser exploradas, tanto de segmento A como del segmento B del genoma del IBDV.

- Nuevas enzimas de restricción deben ser utilizadas, como enzimas de alta frecuencia de corte, como las enzimas *Mbol* (*Sau3AI*) y *Hae III*, con el fin de obtener un mejor agrupamiento de aislamientos virales.

- Se recomienda realizar estudios de secuenciación de las variantes obtenidas, así como también de las cepas vacunales que se utilizan en el país; con el fin de observar su grado de similitud y así poder determinar sistemas de vacunación adecuados.

- Próximos estudios deberían enfocarse en la identificación de marcadores de virulencia del IBDV que permitan elucidar los mecanismos de patogenicidad del IBDV, los cuales han sido de gran interés conocerlos desde años atrás con el objetivo de determinar programas sanitarios acordes con cada región.

12. Referencias

1. Abbas, K. y Lichtman, A. Cellular and Molecular Immunology. EE.UU: Elsevier Saunders Editorial, 2005.
2. Babaahmady, E. *et al.* “ Enfermedad de Gumboro. Histopatología de la Bursa de Fabricio en la enfermedad natural y experimental en pollos de engorde” Revista Electrónica de Veterinari REDVET. Mar. 2005: 3-. 20 Ago. 2008 <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040405.html>
3. Babaahmady, E. *et al.* “Enfermedad Infecciosa de la Bolsa: efecto inmunosupresor en pollos de engorde”. Revista Cubana de Ciencia Avícola, 26 (2002): 129-135.
4. Banda, A. “Enfermedad de Gumboro: Métodos de Diagnóstico y Situación Actual” Seminario de Patología. Georgia. AMEVEA 22-26-V-2006.
5. Barlow, J. *et al.* “A Simple Method for the Quantitative Isolation of Undegraded High Molecular Weight Ribonucleic Acid”. Biochem. Biophys. Res. Commun. 13 (1963):61-66
6. Bernardino, A. “El Panorama de la Enfermedad de Gumboro: La Experiencia Brasileña”. Manual Técnico. Programa de Monitoreo Bolsa de Fabricio. Fort Dodge. 2005
7. Butcher, G. y Miles, R. “Infectious Bursal Disease (Gumboro) in Commercial Broilers”. University of Florida. VM-84 (1995): 1-4.
8. Castañeda, L. e Infante, F. “Enfermedades Mas Comunes En Las Aves”. Universidad Autonoma De Tamaulipas Facultad De Medicina Veterinaria y Zootecnia. <http://fmvz.uat.edu.mx/aves/>
9. Cavanagh, D. “Innovation and discovery: the application of nucleic acid-based technology to avian virus detection and characterization”. Avian Pathology, 30 (2001): 581-598.
10. Coroas, L. *et al.* “Estudio por Reacción en Cadena de la Polimerasa, Análisis de Restricción y Relaciones Filogenéticas de Aislados Cubanos de la Enfermedad infecciosa de la Bolsa”. Revista Cubana de Ciencia Avícola, 27 (2003): 153-159.
11. Cosgrove, A.S. “An Apparently New Disease of Chickens: Avian Nephrosis”. Avian Diseases, 6 (1962): 385-389.

12. Davis, S. y Lasher, H. "History of Infectious Bursal Disease in the U.S.A: The First Two Decades". Avian Diseases. 41 (1997): 11-19.
- 13.
14. Davis, S. y Boyle, J. "Adapting the Polymerase Chain Reaction to a Double-Stranded RNA genome". Analytical Biochemistry. 189 (1990): 30-34.
15. Dekich, M. "Testing and Diagnosis. Evaluating the Immune Status of Broiler Complexes". Supplement to Poultry International. Watt Publishing Company. Georgia, USA, 1995. S-12
16. Di Fabio, J. "Diagnóstico y Control del Virus de Gumboro". Memorias del XXI Seminario Avícola Internacional AMEVEA, 2000
17. Domanska, K. *et al.* "Characterization of Polish Infectious Bursal Disease Virus Strains by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Combined with Restriction Enzyme Analysis". Bull.Vet.Inst. Pulawy., 47 (2003): 349-356.
18. Eterradosi, N., *et al.* "Herramientas para la detección y caracterización de las cepas de Gumboro". World Poultry (HO) Edición Especial. Octubre (2001): 10-11.
19. Eterradosi, N. "Progreso y perspectivas en la investigación del VEIB". World Poultry (HO) Edición Especial: Octubre (2001): 8-9.
20. Fields, D. "Establishing the questions. IBD: Issues from the field" Supplement to Poultry International. Watt Publishing Company. World Summit Conference Infectious Bursal Disease. 4 Abr. 1995: S-4-S-5
21. Gallos. "Enfermedades Comunes" Mayo, 2007. <http://www.gallos.com.ve/enfermedades-de-los-gallos-y-su-control/enfermedades-de-los-gallos-y-su-control/enfermedades-mas-comunes.html>. Diciembre, 2008.
22. Giambrone, *et al.* "IBDV Tests Helping Define Problems in Southeastern Poultry Industry". Highlights of Agricultural Research. 1999. Vol. 46. N°1. 10 Sep. 2008. <http://www.ag.auburn.edu/aaes/communications/highlights/spring99/ibd.html>.
23. Giambrone, J. "El virus de la enfermedad de Gumboro, un Viejo enemigo que nuevamente cambia su cara". World Poultry - Elsevier Especial. 14. 10 (2001) 4-13.
24. Giambrone, J., Dormitorio, T. Liu, H. "Detection Of Genetic Variations In Seotype I Isolates Of Infectious Bursal Disease Virus Using Polymerase Chain Reaction And Restriction Endonuclease Análisis" Journal of Virological Methods 48 (1994): 281-291.
25. Glick, B. "IBD and the Immune System. How the immune system responds" Supplement to Poultry International. Watt Publishing Company. Georgia, USA, 1995. S-7
26. González, R. *et al.* "Frecuencia y caracterización de lesiones anatómo-patológicas en la enfermedad de Gumboro y enfermedades secundarias asociadas en nuestras

condiciones ambientales. Estudio retrospectivo.” Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. Oct. 2005: Vol VI, N° 10. Veterinaria.org
<<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101005.html>.

27. Griffiths, J. *et al.* Genética Moderna. España: Mc Graw Hill Editorial, 2000.

28. Infectious Bursal Disease (Gumboro disease). Manual of standards Diagnostic Tests and Vaccines, 4th edition, 2000. 22 Abr. 2002. Jul. 2008
http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/ancien_manuel/a_00087.htm.

29. Jackwood, D.J. y Sommer, S.E. “Genetic Characteristics of Infectious Bursal Disease Viruses from Four Continents”. ELSEVIER. Virology. 365 (2007): 369-375.

30. Jackwood, D.J. y Sommer S.E. “Molecular Epidemiology of Infectious Bursal Disease Viruses: Distribution and Genetic Analysis of Newly Emergencing Viruses in the United States. Avian Diseases 49 (2005): 220-226.

31. Jackwood, D.J. y Sommer, S.E. “Virulent Vaccine Strains of Infectious Bursal Disease Virus Not Distinguishable from Wild-Type Viruses with the Use of a Molecular Marker”. Avian Diseases. 46 (2002): 1030-1032.

32. Jackwood, D.J. y Sommer, S.E. “Use of a Genetic Marker for Wild-Type Potentially Pathogenic Infectious Bursal Disease Viruses”. Avian Diseases. 45 (2001): 701-705.

33. Jackwood, D.J., Meir, R. y Weisman, Y. “Molecular Typing Of Infectious Bursal Disease Virus Of Israeli Field And Vaccine Strains By The Reverse Transcription/ Polymerase Chain Reaction/ Restriction Fragment Length Polymorphism Assay”. Avian Diseases 45 (2001): 223-228.

34. Jackwood, D.J. Sommer, S.E. y Knoblich, H. “Amino Acid Comparison of Infectious Bursal Disease Viruses placed in the Same or Different Molecular Groupsby RT/PCR-RFLP”. Avian Diseases. 45 (2001): 330-339.

35. Jackwood, D.J. y Sommer, S.E. “Restriction Frangment Length Polymorphisms in the VP2 Gene of Infectious Bursal DiseaseViruses from Outside the United States. Avian Diseases. 43(1999): 310-314.

36. Jackwood, D.J y Sommer, S.E. “Genetic Heterogeneity in the VP2 Gene of Infectious Bursal Disease Detected in Commercially Reared Chickens”. Avian Diseases. 42 (1998): 321-339.

37. Jackwood, D.J. y Sommer, S.E. “Restriction Frangment Length Polymorphisms in the VP2 Gene of Infectious Bursal Disease Viruses” Avian Diseases 41 (1997):627-637.

38. Jackwood, D.J. “Testing and Diagnostics. Diagnosis of IBD viruses using molecular techniques” Supplement to Poultry International. Watt Publishing Company. Georgia, USA, 1995. S-10-12

39. Jackwood, D.J. “Development and characterization of nucleic acid probes to infectious bursal disease viruses” Veterinary Microbiology, 24 (1990): 253-260

40. JJ (Sjaak) de Wit y Baxendale, W. “La Enfermedad de Gumboro”. Intervet. 2004. 24 Ago. 2008. <http://www.enfermedad-gumboro.com/>
41. Kahn, C. *et al.*, 2008. “Infectious Bursal Disease: Introduction”. The Merck Veterinary Manual. Merck & Medial. 10 Ago. 2008. <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/203100.htm>
42. Lee, L. *et al.* “Detection of infectious bursal disease virus infection using the polymerase chain reaction”. Journal of Virological Methods, 40 (1992): 243-254.
43. Liu, H. *et al.* “Detection of genetic variations in serotype I isolates of infectious bursal disease virus using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis”. Journal of Virological Methods, 48 (1994): 281-291.
44. Lukert, D. “Infectious Bursal Disease: Past, Present and Future”. Supplement to Poultry International. Watt Publishing Company. World Summit Conference Infectious Bursal Disease. 4 Abr. 1995: S-3- S-4.
45. Lukert, D. y Saif, Y.M. “Infectious Bursal Disease” Diseases of Poultry. Edición 11th. (2003): 161-179. Editor Saif, Y.M. Iowa State Press.
46. Majó, N y Dolz, R. “Diagnóstico y Situación Actual de la Enfermedad de Gumboro en España” Albéitar: publicación veterinaria independiente, 115 (2008): 12-15
47. Makadiya, N.R “Detection of infectious bursal disease virus (IBDV) from bursal tissue by RT-PCR and its comparative efficacy with conventional precipitation assays. Indian J. Poultry Sci. 41 (1) (2006): 82-84
48. Makadiya, N. “Detection of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) From Bursal Tissue by RT-PCR and its Comparative efficacy with Conventional Precipitation Essays”. Department of Veterinary Microbiology. College of Veterinary Science and Animal Husbandry. ANAND, 2004.
49. Manté, A. *et al.* “Caracterización de 5 virus de la enfermedad de Gumboro (IBD) responsables de los últimos brotes de IBD en Turquía. Medicina Veterinaria, 19 (2000): 27 - 31.
50. Manté, A. *et al.* “Caracterización de un virus de la enfermedad de Gumboro (IBD) aislado de los últimos brotes de IBD en la República Dominicana”. Medicina Veterinaria, 17 (2000): 20 -25.
51. McMurray, B. “Vaccination Strategies. Reflections from the fiels” Supplement to Poultry International. Watt Publishing Company. Georgia, USA, 1995. S-22-23
52. Mittal, D. *et al.* “Detection of Infectious Bursal Disease Virus in Field Outbreaks in Broiler Chickens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction”. International Journal of Poultry Science, 4(2005): 239-243.
53. Müller, H. *et al.* “Research on infectious bursal disease –the past, the present and the future”. Veterinary microbiology, 97 (2003): 153- 165.

54. Müller, H. *et al.* “Infectious bursal disease of poultry: antigenic structure of the virus and control”. Veterinary Microbiology, 33 (1992): 175-183.
55. Nabil, M. *et al.* “Morphometrical and Anatomopathological Survey of the Bursa of Fabricius in Broiler Chickens”. 2005. Universidad de Batna. 6 May. 2008 http://www.isah-soc.org/documents/2005/sections/10_vol_2.pdf
56. Nilipour, A. “Como Ganarle al Gumboro”. Industria Avícola Jun. 2006: 16 – 19.
57. Noda, J. *et al.*, “Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio: Relaciones Antigénicas de Aislados Cubanos y Chilenos”. Archivos de Medicina Veterinaria. 2008. Vol.37, No.2, p.173-176. 3 Sep. 2008. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2005000200013&lng=es&nrm=iso
58. Noguera, C. *et al.* “Caracterización Molecular de dos Cepas del Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa”. Veterinaria Tropical. 28 (2003): 37 – 48.
59. Odor, E. “Establishing the Questions” IBD: Laboratory Monitoring” Supplement to Poultry International. Watt Publishing Company. Georgia, USA, 1995. S-5-6
60. Ozbey, G. *et al.* “Restriction fragment length polymorphism analysis of isolates of infectious bursal disease viruses from Turkey”. Veterinary Medicine.-Czech, 48 (2003): 359-362.
61. Pattison, M. “Purification and preliminary characterisation of a pathogenic strain of infectious bursal disease virus”. Avian Pathology, 4 (1975): 175-187.
62. Pérez, R. *et al.*. “Detection of Very Virulent Strains of Infectious Bursal Disease Virus (vvIBDV) in Commercial Broilers from Uruguay”. Avian Diseases. 50 (2006): 624-631
63. Qian, B. *et al.* “Observations on polymerase chain reaction amplification of infectious bursal disease virus”. Journal of Virological Methods, 47 (1994): 237-242.
64. Quiroz, C. *et al.* “Primer Aislamiento en Venezuela del Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (Gumboro)”. Veterinaria Tropical, 9 (1984): 39-46.
65. Rautenschlein, S. Samson-Himmelstjerna, S. y Haase, C. “ A comparixon of immune responses to infection with virulent infectious bursal disease virus (IBDV) between specific-pathogen-free chickens infected at 12 and 28 days of age”. ELSEVIER. Veterinary Immunology and Immunopathology. 115 (2007): 251-260.
66. Rodríguez, E. *et al.* “Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio”. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET ®, ISSN 1695-7504, Vol. V, nº 6. 2004. <http://comunidad.veterinaria.org/articulos/articulo.cfm?articulo=06024&pag=1&area=1&buscar=&donde=1>

67. Sacristán, J.P, *et al*, “La Enfermedad de Gumboro. Incidencia en España”. Dto. Técnico Ibertec S.A. 27 Abr. 2008
http://usuarios.lycos.es/avetval/hpbimg/Archivos/28_05_26_Gumboro.pdf

68. Saif, Y.M “Testing and Diagnostics. Integrating Old and New Technologies” Supplement to Poultry International. Watt Publishing Company. Georgia, USA, 1995. S-8-10

69. Shane, S y van der Sluis. “Global Diseases update 2002: more problems to be solved” World Poultry. 18 (2002): 28-30.

70. Sharma, J.M. “IBD and the immune system. What IBD does to the Immune system” Supplement to Poultry International. Watt Publishing Company. Georgia, USA, 1995. S-7

71. Stewart, J. “Infectious Bursal Disease: Causative Agent, Diagnosis and Prevention”. Canadian Poultry Consultants Ltd. 2007. Columbia, Canada. 27 Ago. 2008
http://www.canadianpoultry.ca/new_page_2.htm

72. Tacken, M. “Molecular Interactions of the Infectious Bursal Disease Virus Proteins”. (13-11-2003) Thesis. Promotor: Prof.Dr. P.J.M. Rottier; C0-promototes: Dr. B.P.H. Peeters, Dr. H.J. Boot.

73. The Poultrysite. “Infectious Bursal Disease, IBD, Gumboro”. 5M Enterprises Limited 2000-2006. 16 Sep. 2008
<http://www.thepoultrysite.com/diseaseinfo/81/infectious-bursal-disease-ibd-gumboro>

74. Tiwari, A. *et al*. “Differentiation of infectious bursal disease viruses by restriction enzyme analysis of RT/PCR amplified VP1 gene sequences”. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 26 (2002): 47-53.

75. van den Berg, T.P. “Acute Infectious Bursal Disease in Poultry Ten Years After More Insight into Pathogenesis and Perspectives for Control” NCO-DC ACTION 97. Concerted Action EC-CHINA. 1998. Veterubart & Agrochemical Research Centre. 16 May. 2008. <http://hku.hk/ibd/4thAPPHC.doc>

76. van Den Berg, T y Meulemans, G. “Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination”. Avian Pathology, 20 (1991): 409-421.

77. van Den Berg, T.P., *et al*. “Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterisation of a highly virulent strain”. Avian Pathology, 20 (1991): 133-143.

78. van der Sluis, W. “Diferentes vías de tratamiento para aves afectadas por el virus muy virulento de la EIBV”. World Poultry-Elsevier Especial. Holanda, 2002

79. Vervelde, L. y Davison, T. F. “Comparison of the in situ changes in lymphoid cells during infection with infectious bursal disease virus in chickens of different ages”. Avian Pathology 26 (1997): 803-821.

13. Tablas.

Tabla 1. Clasificación molecular por RT/PCR-RFLPs de diferentes virus de IBDV

Grupo Molecular	Cepas	Clasificación
Grupo 1	Del-A, SVS-510 y 1084A	Variantes
Grupo 2	Del-E, MD y 89/03	
Grupo 3	IBDV-Blen, STC y 2512	
Grupo 4	228E, D78, D278, ST06, Univax-BD, Bur-Vac, Gumb, TADC, TAD F y Baxendale	Clásicas
Grupo 5	Lukert, Edgar, Bursine, BioBur, BioBurW y Avimune	
Grupo 6	Virus hipervilentos y cepas vacunales: RS593 y Webster	Clásicas Hipervirulentas

Tabla 2. Diagnóstico diferencial de la enfermedad infecciosa de la bursa

Enfermedad	Síndrome hemorrágico	Anemia infecciosa	Leucosis linfoide	Marek	Hepatitis por cuerpo de inclusión	Newcastle	Bronquitis infecciosa	Coccidiosis	Gumboro
Agente causante		Circovirus	Retrovirus	Herpervirus	Adenovirus	Paramyxovirus	Coronavirus	Parásito	Birnavirus
Atrofia de:		Timo, médula osea, y BF	Tumores nodulares → aspecto hiperatrofiado de la BF	BF a causa de tumoración difusa	Leve atrofia de la BF y de sus folículos				BF
Otros signos	Hemorragias en músculos y mucosas en proventrículo y molleja.			Parálisis de nervios periféricos	Daños más importantes en el hígado. Lesiones en hígado, bazo, y riñones	Hemorragias musculares	Lesiones renales (Nefrosis)	Diarrea repentina, depresión, con mortalidad elevada, plumas erizadas.	*Puede dar signos de hepatomegalia
Afecta a		Animales < 3 semanas	Aves > 14 – 16 semanas**	Aves > 4 a 8 semanas					**A partir de las 10 semanas no se observa cambio.
Diagnostico diferencial	No hay cambios en la bursa						Muerte precedida por signos respiratorios, No hay cambios en la bolsa	Sangre en excremento, No hay daños en BF ni hemorragias	Hemorragias musculares, bolsa edematosa y hemorrágica

Tabla 3: Descripción del número de aves de engorde y aves criollas utilizadas y el lugar de procedencia

Número de aves	Nombre de la Granja	Ubicación	Coordenadas
50*	Lilia Elena	Guayllabamba	S 0000607° W 7831201°
15*	San Vicente	Yaruquí	S 014333° W 78.334721°
55*	Villanova	Nanegalito	N 00.10607° W 078.72097°
11**			

* Corresponde al número de aves de engorde utilizadas por sector

** Corresponde al número de aves criollas

Tabla 4: Vacunas contra la enfermedad infecciosa de la bursa utilizadas como controles positivos

Nombre de la Vacuna	Tipo del Virus	Nombre de la Compañía	Etiqueta
Vacuna BIOMUNE	Virus vivo, cepa Lukert	BIOMUNE®	IOM
Vacuna Nobilis Gumboro D78	Cepa D78 Vacuna viva	Nobilis®	D78
Vacuna Volvac IBD MLV	Gumboro Intermedia cepa Lukert. Virus vivo	Volvac®	MLV

Tabla 5. Condiciones utilizadas en las pruebas con enzimas de restricción.

Enzima	Temperatura	Cantidad	Concentración	Buffer
<i>Sac I</i> (Promega®) Cód. R606A 15724433	37°C	0.5 µl	10U/ µl.	2ul Buffer 10X (Promega®. Cód. R009A 20653405)
<i>DraI</i> (Invitrogen®). Cód. 25430018	37°C	0.3 µl	10 U/µl.	2ul. Buffer 10X (Invitrogen®. Cód. Y90002)
<i>TaqI</i> (Invitrogen®). Cód. 15218-019	65°C	0.3 µl	10 U/µl	2ul. Buffer 10X (Invitrogen®. Cód. Y92500)
<i>StyI</i> (Promega®) Cód. R6481	37°C	0.5ul	10u/ul	2ul Buffer 10X (Promega®. (Cód R006A23398803)
<i>SspI</i> (Invitrogen®). Cód. 15458.011	37°C	0.3 µl	10 U/µl.	2ul. Buffer 10X (Invitrogen®.Cód. Y90007)

Tabla 6. Pollos criollos utilizados en el estudio.

Granja	Fecha	Número	Código	Edad
Pollos criollos	17/Ene/08	1	CrBF2	?
		2	CrBF32	?
		3	CrBF33	?
		4	CrBF34	?
		5	CrBF25	?
Pollos criollos	18/Ene/08	6	CrBF51	?
		7	CrBF52	?
		8	CrBF23	?
Pollos criollos	22/Ene/08	9	CrBF26	?
		10	CrBF27	?
		11	CrBF28	?

Tabla 7. Pollos de engorde del sector de Guayllabamba

Granja	Fecha	Número	Código	Etiqueta	Edad
Guayllabamba	26/feb./08	1	BF1	G6	21
			BF2		
			BF3		
			BF4		
			BF5		
Guayllabamba	26/feb./08	2	BF6	G8	21
			BF7		
			BF8		
			BF9		
			BF10		
Guayllabamba	26/feb./08	3	BF11	G7	21
			BF12		
			BF13		
			BF14		
			BF15		
Guayllabamba	26/feb./08	4	BF16	G9	21
			BF17		
			BF18		
			BF19		
			BF20		
Guayllabamba	26/feb./08	5	BF21	G10	21
			BF22		
			BF23		
			BF24		
			BF25		
Guayllabamba	28/feb./08	1	BF1	G1	21
			BF2		
			BF3		
			BF4		
			BF5		
Guayllabamba	28/feb./08	2	BF6	G2	21
			BF7		
			BF8		
			BF9		
			BF10		
Guayllabamba	28/feb./08	3	BF11	G3	21
			BF12		
			BF13		
			BF14		
			BF15		
Guayllabamba	28/feb./08	4	BF16	G4	21
			BF17		
			BF18		
			BF19		
			BF20		
Guayllabamba	28/feb./08	5	BF21	G5	21
			BF22		
			BF23		
			BF24		
			BF25		

Tabla 8. Pollos de engorde del sector Nanegalito

Granja	Fecha	Número	Código	Etiqueta	Edad
Nanegalito	14/feb./08	1	BF1	NG1	22
			BF2		
			BF3		
			BF4		
			BF5		
Nanegalito	14/feb./08	2	BF6	NG2	22
			BF7		
			BF8		
			BF9		
			BF10		
Nanegalito	14/feb./08	3	BF11	NG3	22
			BF12		
			BF13		
			BF14		
			BF15		
Nanegalito	14/feb./08	4	BF16	NG4	22
			BF17		
			BF18		
			BF19		
			BF20		
Nanegalito	14/feb./08	5	BF21	NG5	22
			BF22		
			BF23		
			BF24		
			BF25		
Nanegalito	14/feb./08	6	BF26	NG6	22
			BF27		
			BF28		
			BF29		
			BF30		
Nanegalito	14/feb./08*	1	BF1	NG7	22
			BF2		
			BF3		
			BF4		
			BF5		
Nanegalito	14/feb./08*	2	BF6	NG8	22
			BF7		
			BF8		
			BF9		
			BF10		
Nanegalito	14/feb./08*	3	BF11	NG9	22
			BF12		
			BF13		
			BF14		
			BF15		
Nanegalito	14/feb./08*	4	BF16	NG10	22
			BF17		
			BF18		
			BF19		
			BF20		
Nanegalito	14/feb./08*	5	BF21	NG11	22
			BF22		
			BF23		
			BF24		
			BF25		

Tabla 9. Pollos de engorde del sector de San Vicente

Granja	Fecha	Número	Código	Etiqueta	Edad
San Vicente	31/ene./08	1	1	EG1	44
			2		
			3		
			4		
			5		
San Vicente	31/ene./08	2	6	EG2	44
			7		
			8		
			9		
			10		
San Vicente	31/ene./08	3	11	EG3	44
			12		
			13		
			14		
			15		

Tabla 10. Diferencias en el patrón de restricción entre vacuna (control positivo) y muestras de ARN viral de las bursas.

Enzima	Vacuna	Muestras experimentales
<i>TaqI</i>	+	+
<i>DraI</i>	-	+
<i>SspI</i>	-	-
<i>SacI</i>	+	-
<i>StyI</i>	+	-

+ = equivalente a aquellas muestras que presentaron restricción en dos fragmentos de +/-198 y +/-50bp
- = no se observó digestión enzimática

Tabla 11. Perfil de restricción enzimática de los fragmentos de 248 pb VP2 de bolsas de Fabricio de aves de engorde de los sectores Guayllabamba, Nanegalito y San Vicente; y de aves criollas.

Muestras	Enzima de Restricción			
	<i>TaqI</i>	<i>DraI</i>	<i>SspI</i>	<i>SacI</i>
IOM	+	-	-	+
NG1	+	+	-	-
NG2	+	+	-	-
NG3	+	+	-	-
NG5	+	+	-	-
NG9	+	+	-	-
NG10	+	+	-	-
NG11	+	+	-	-
G1p	+	+	-	-
G2p	+	+	-	-
G3p	+	+	-	-
G4p	+	+	-	-
G5p	+	+	-	-
G6p	+	+	-	-
G7p	+	+	-	-
G9p	+	+	-	-
G10p	+	+	-	-
CrBF2	+	+	-	-
CrBF26	+	+	-	-
CrBF27	+	+	-	-
CrBF28	+	+	-	-
CrBF33	+	+	-	-
CrBF34	+	+	-	-
CrBF35	+	+	-	-
CrBF51	+	+	-	-
CrBF53	+	+	-	-

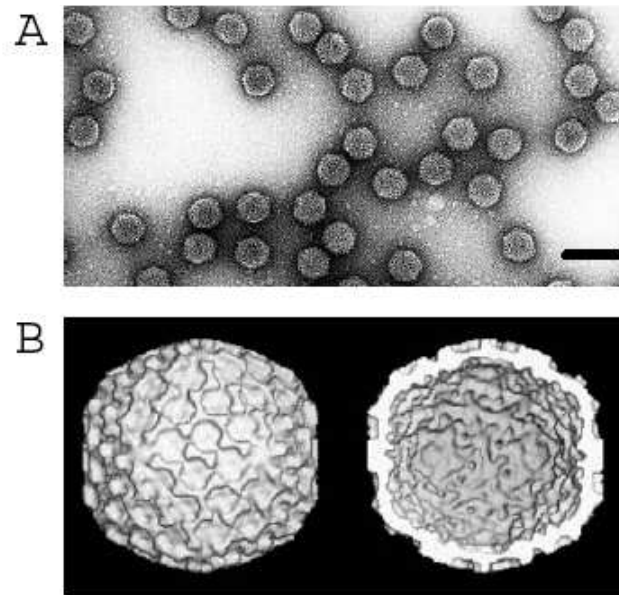
+/- indican la presencia/ausencia del sitio de restricción específico. Los sitios de restricción fueron 2, uno de 198 pb y el segundo de 48

Tabla 12. Sistema de Genotipificación de cepas del virus de Gumboro por RFLPs utilizado en la Universidad de Georgia.

Cepa de Gumboro	DraI	SacI	TaqI	StyI	BstNI	SspI
Variante Delaware A	+		+			
Variante Delaware E		+	+			
Cepa estándar de desafío STC		+		+	+	
CU-1		+			+	
Lukert		+	+	+		
PBG-98		+	+		+	
Variante GLS		+				
SAL 1		+	+		+	
Edgar, 52/70		+		+		
849 VB (alta virulencia)		+	+	+		+
UK661, Brown (alta virulencia)			+	+		+

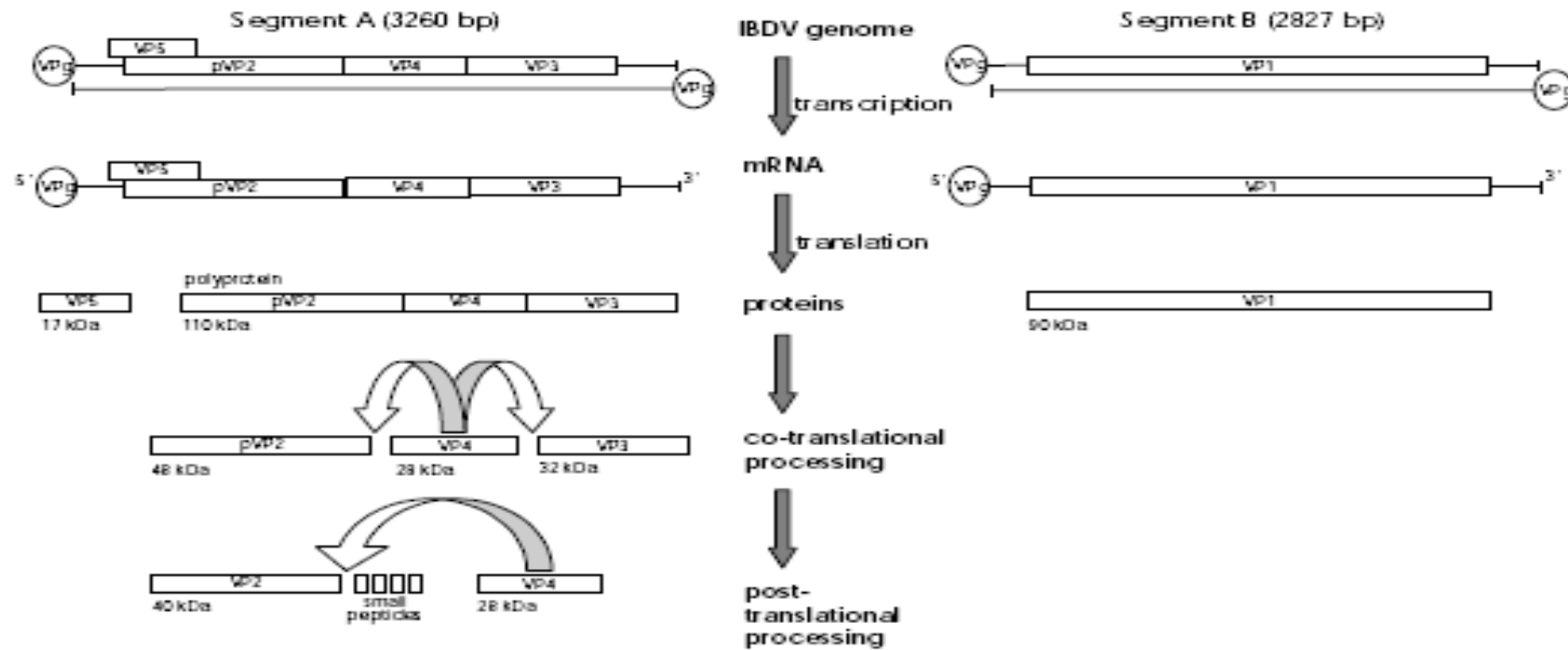
14. Figuras.

Figura 1. Estructura del virión del IBDV. A. Microscopia electrónica de viriones purificados del IBDV; bar, 100 nm. B. Mapa tridimensional de la cápside del IBDV.



(Tacken, 2003)

Figura 2. Representación esquemática de la organización genómica del IBDV. La organización de genes para cada uno de los segmentos A y B son mostrados. VPg hace referencia a la forma de VP1 que se encuentra ligado al genoma y que se encuentra covalentemente unida al extremo 5' del RNA. La masa molecular para cada una de las proteínas se muestra en kDa.



(Tacken, 2003)

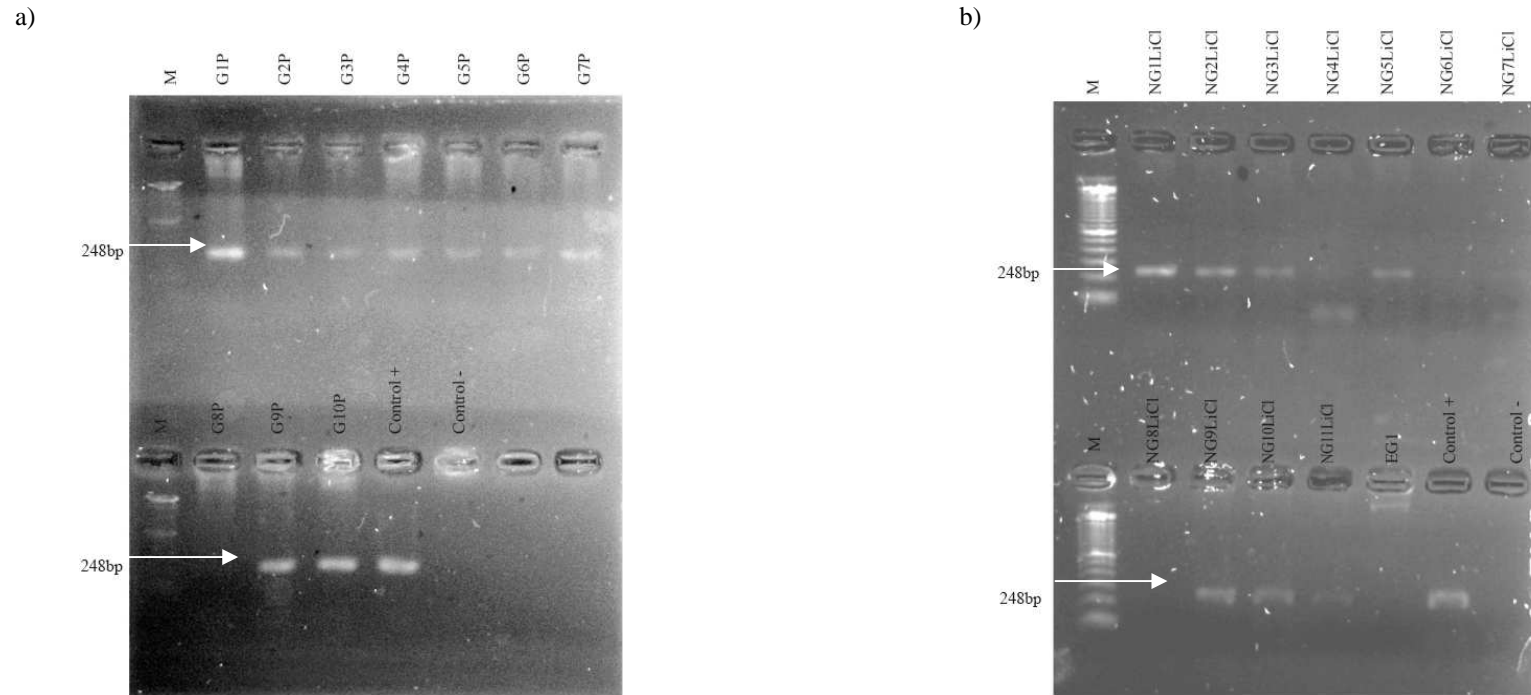


Figura 4. a) Electroforesis de los productos amplificados a través de RT/PCR de RNA viral sin purificación de bolsas de Fabricio correspondientes al sector de Guayllabamba (G1p-G10p). b) Fragmentos amplificados de RNA viral purificado correspondientes a bursas de aves del sector de Nanegalito (NG1LiCl – NG11LiCl) y EG1 que corresponde al sector San Vicente. Los controles positivos y negativos también se muestran en el gel de agarosa de 2%. Marcador 100pb (M). Control + (Vacuna BIOMUNE).

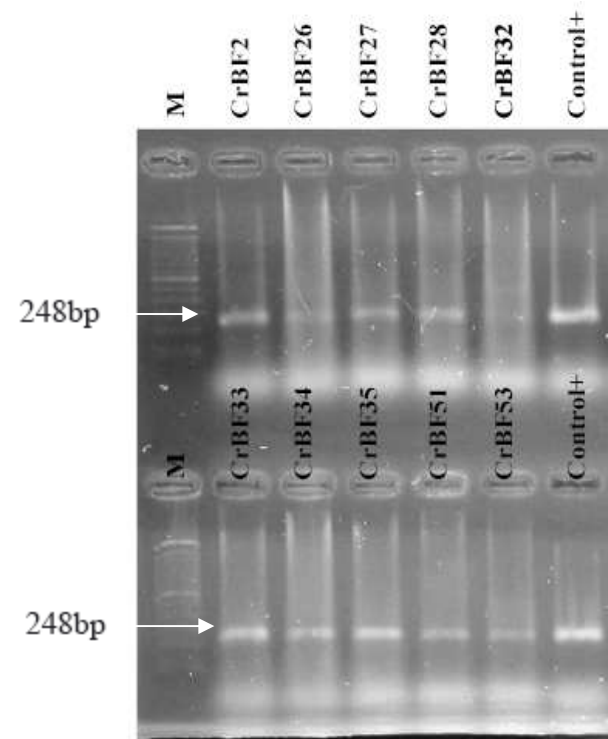


Figura 5. Electroforesis de productos amplificados a través de RT/PCR de ARN viral de bursas de aves criollas (CrBF2, CrBF26-CrBF28, CrBF32-CrBF35, CrBF51, CrBF53) sometidos al procedimiento de extracción viral a través del kit comercial Viral RNA isolation Nucleo Spin. Macherey-Nagel. Marcador 100pb (M). Control + (Vacuna BIOMUNE).

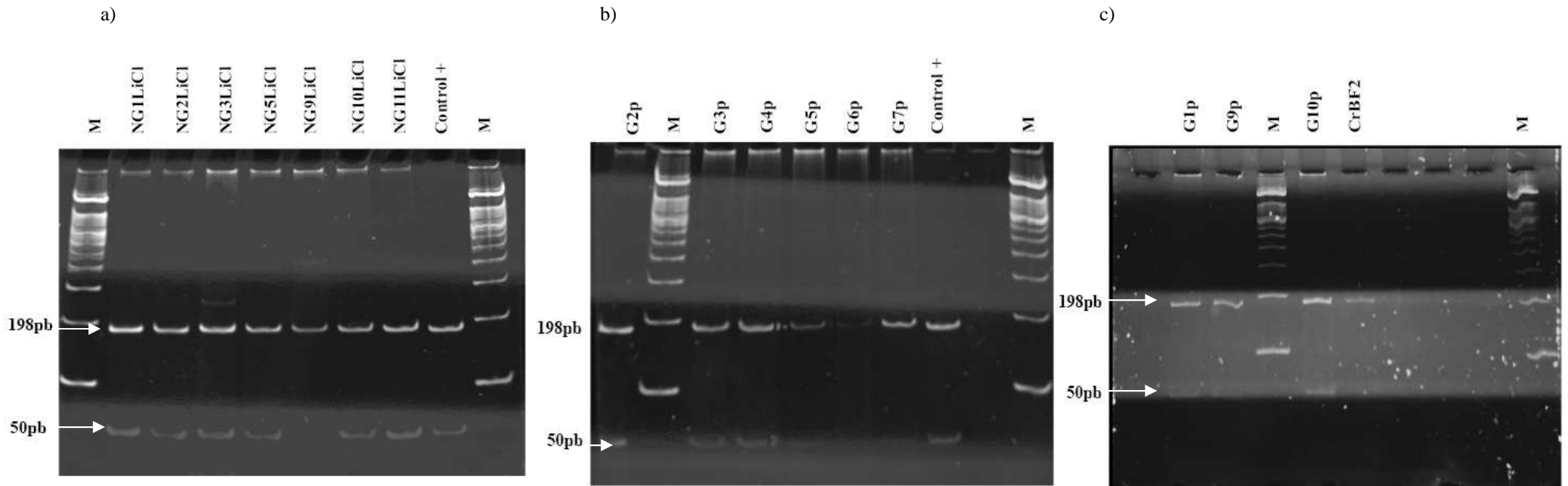


Figura 6. Productos de RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima de restricción *Taq I* en un gel de poliacrilamida del 12%. Electroforesis de ARN viral de bursas del sector a) Nanegalito (NG1, NG2, NG3, NG5, NG9, NG10, NG11) b) Guayllabamba (G2p, G3p, G4p, G5p, G6p, G7p), c) Guayllabamba (G1p, G9p, G10) y bursa de ave criolla (CrBF2). Marcador 100 pb (M). Control + (Vacuna BIOMUNE).

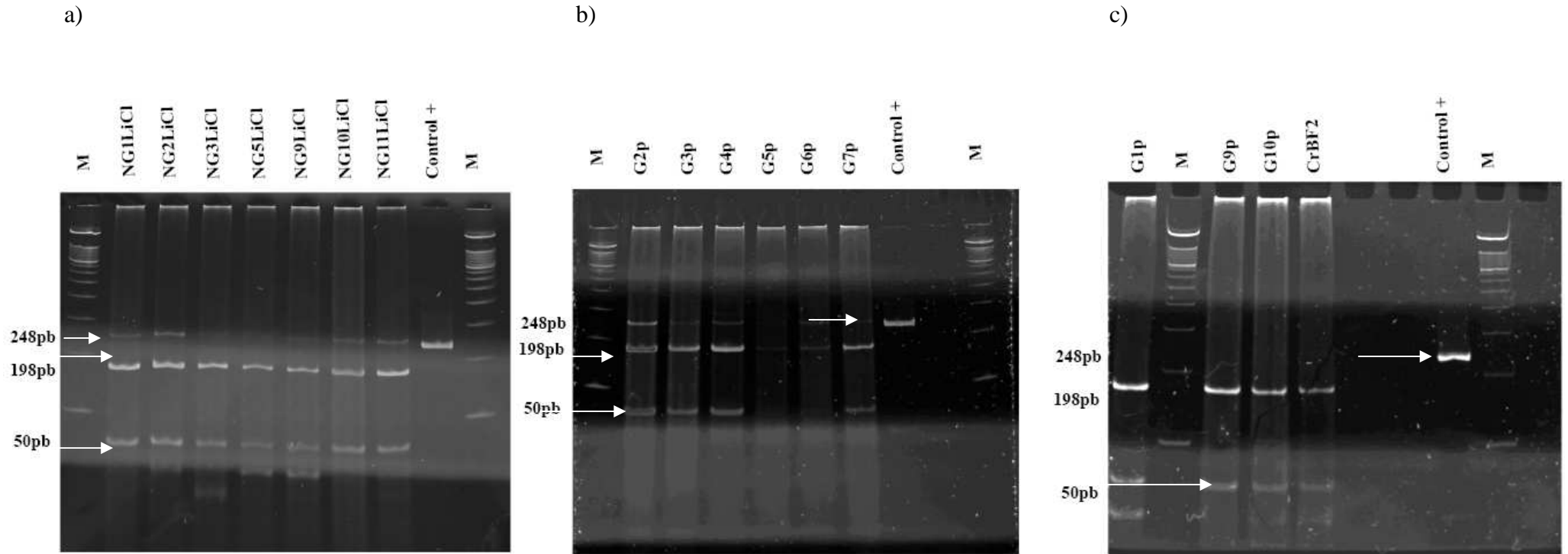


Figura 7. Productos de RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima de restricción *Dra I* en un gel de poliacrilamida del 12%. Electroforesis de ARN viral de bursas del sector a) Nanegalito (NG1, NG2, NG3, NG5, NG9, NG10, NG11) b) Guayllabamba (G2p, G3p, G4p, G5p, G6p, G7p), c) Guayllabamba (G1p, G9p, G10p) y bursa de ave criolla (CrBF2). Marcador 100 pb (M). Control + (Vacuna BIOMUNE).

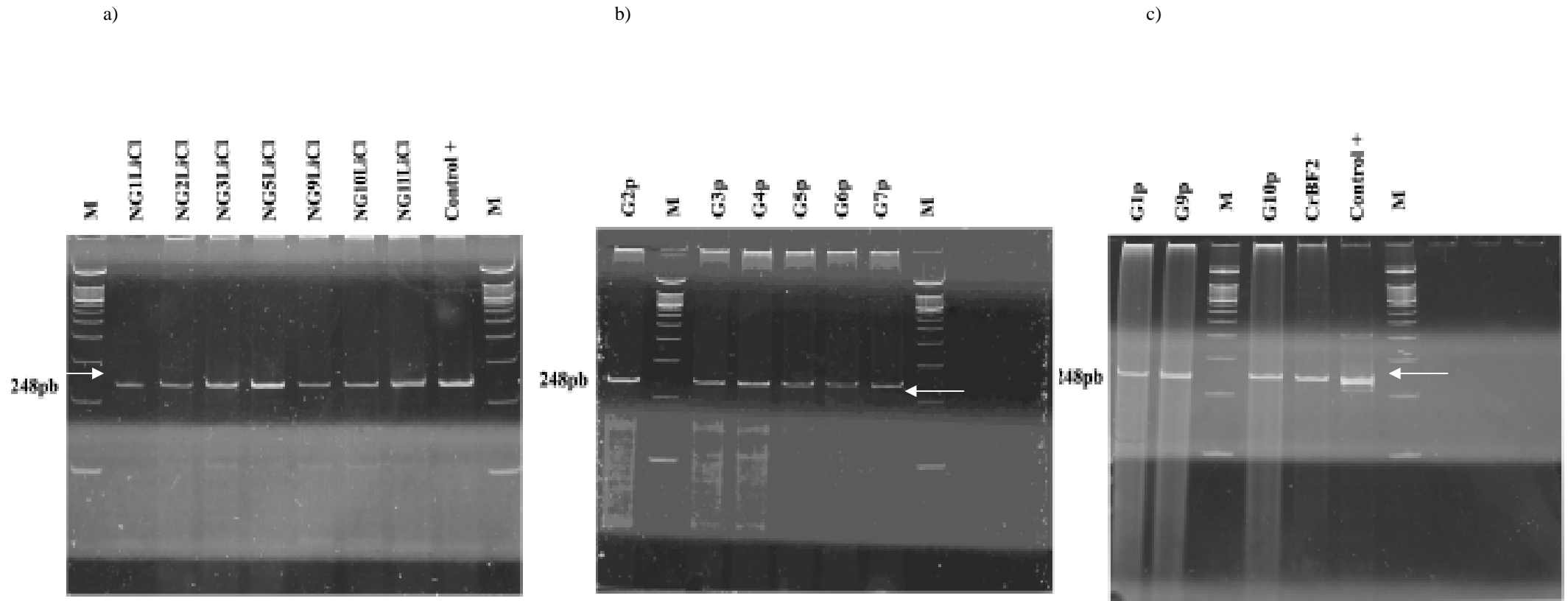


Figura 8. Productos de RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima de restricción *Ssp I* en un gel de poliacrilamida del 12%. Electroforesis de ARN viral de bursas del sector a) Nanegalito (NG1, NG2, NG3, NG5, NG9, NG10, NG11) b) Guayllabamba (G2p, G3p, G4p, G5p, G6p, G7p), c) Guayllabamba (G1p, G9p, G10p) y bursa de ave criolla (CrBF2). Marcador 100 pb (M). Control + (Vacuna BIOMUNE).

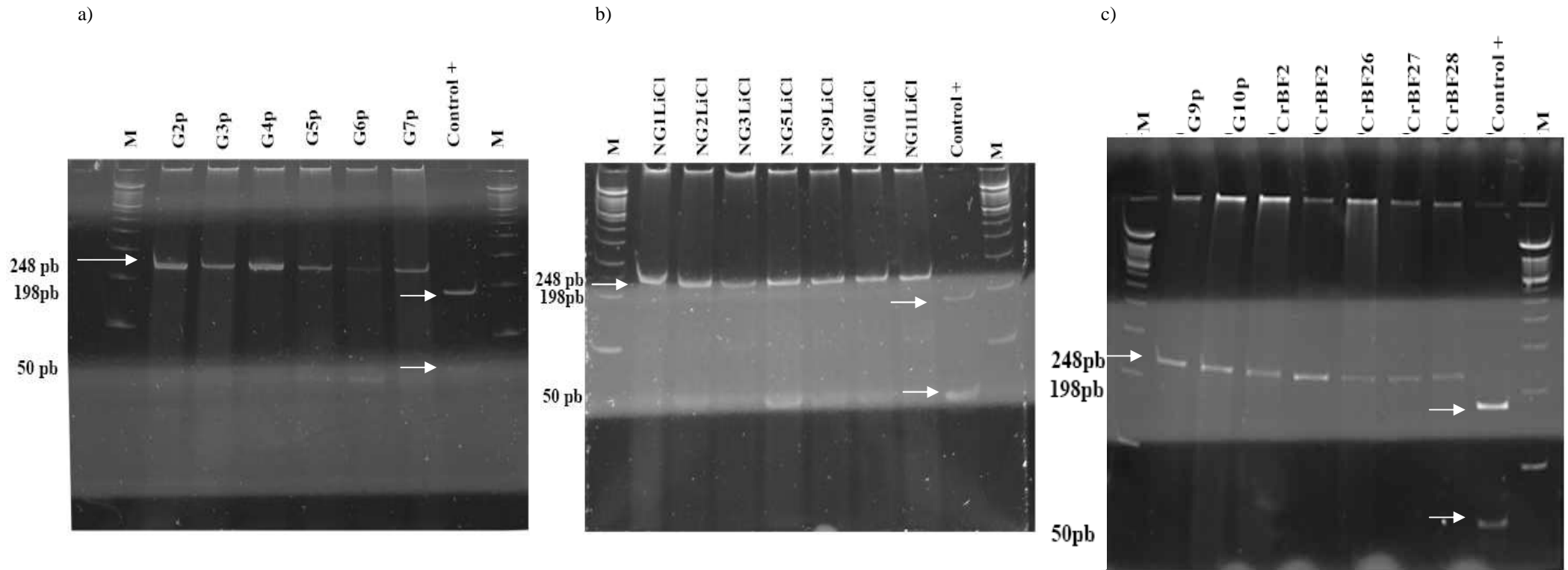


Figura 9.1. Productos de RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima de restricción *Sac I* en un gel de poliacrilamida del 12%. Electroforesis de ARN viral de bursas del sector a) Guayllabamba (G1p, G2p, G3p, G4p, G5p, G6p, G7p), b) Nanegalito (NG1, NG2, NG3, NG5, NG9, NG10, NG11), c) Guayllabamba (G9p, G10p) y bursas de aves criollas (CrBF2, CrBF26, CrBF27, CrBF28). Control + (Vacuna BIOMUNE).

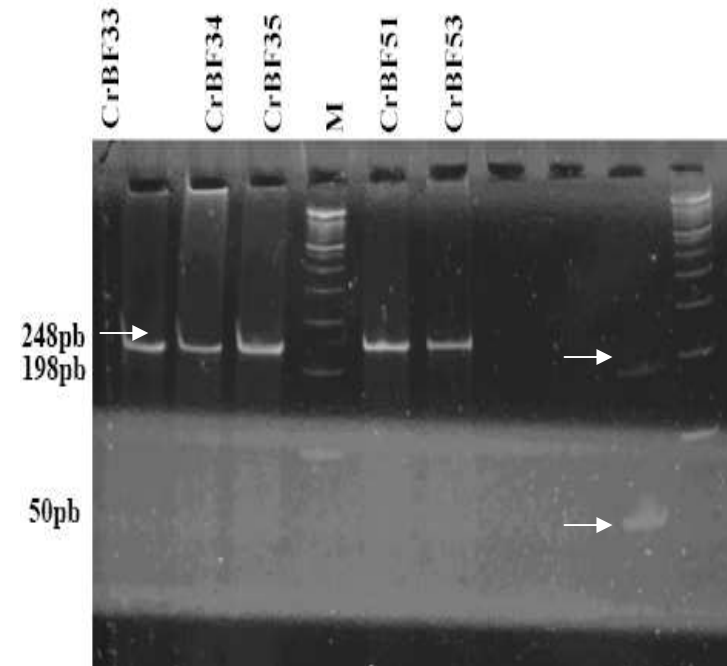
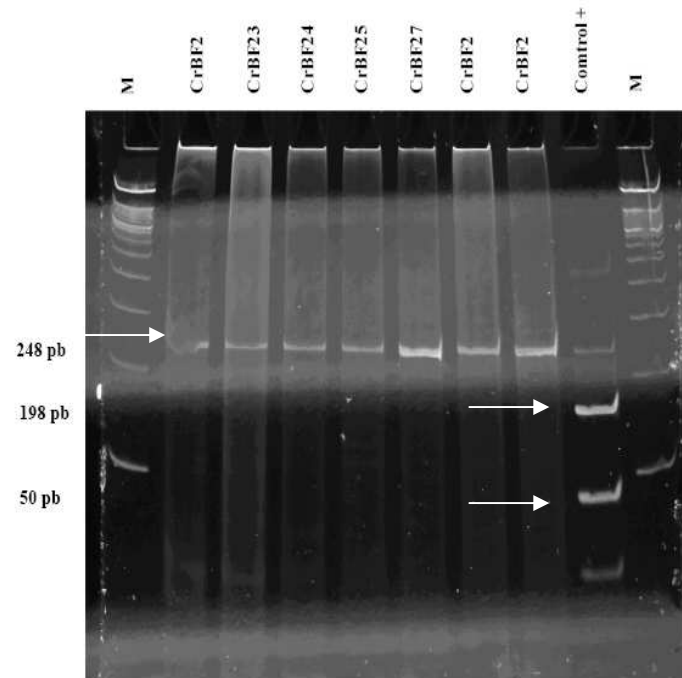


Figura 9.2. Productos de RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima de restricción *Sac I* en un gel de poliacrilamida del 12%. Electroforesis de ARN viral de bursas del aves criollas (CrBF33, CrBF34, CrBF35, CrBF51, CrBF53). Marcador 100 pb (M). Control + (Vacuna BIOMUNE).

a)



b)

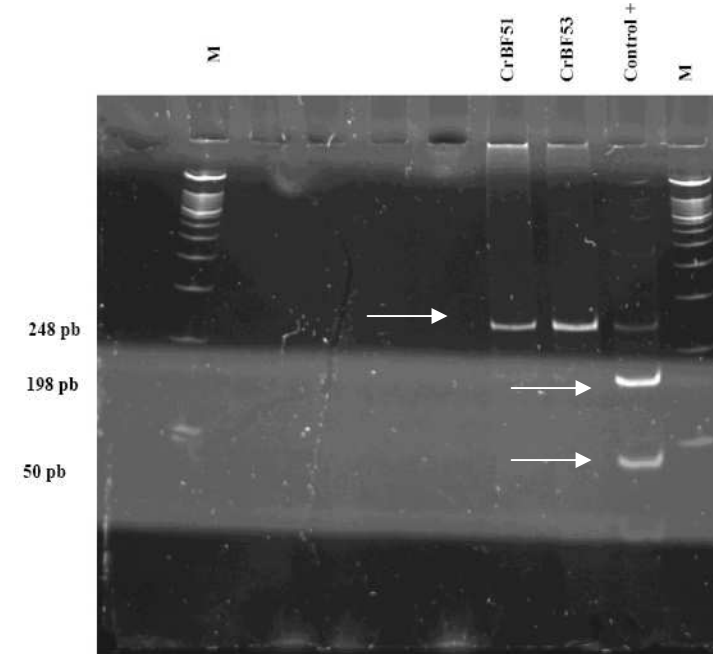


Figura 10. 1. Productos de RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima de restricción *StyI* en un gel de poliacrilamida del 12%. Electroforesis de ARN viral de bursas de a) aves criollas (CrBF2, CrBF23, CrBF24, CrBF25) b) CrBF51, CrBF53. Marcador 100 pb (M). Control + (Vacuna BIOMUNE).

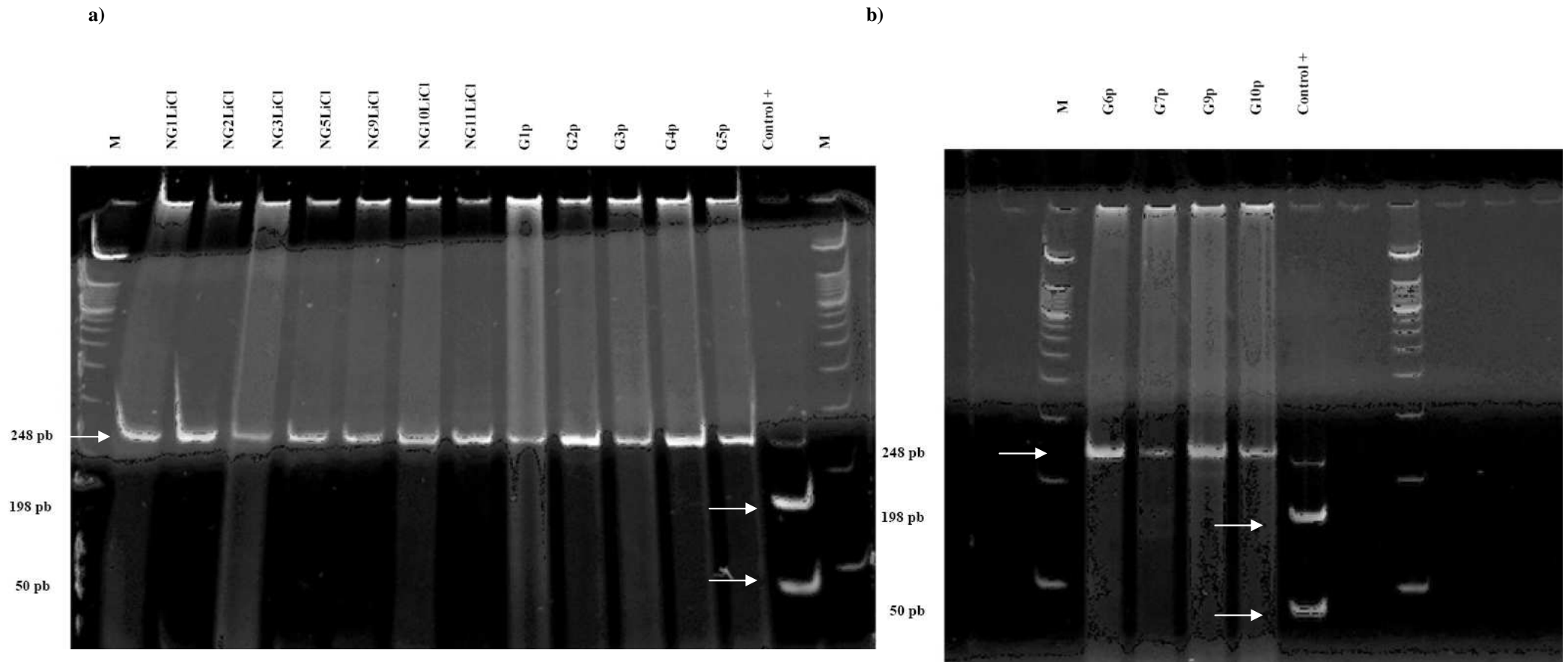


Figura 10.2. Productos de RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima de restricción *StyI* en un gel de poliacrilamida del 12%. Electroforesis de ARN viral de bursas del sector a) Nanegalito (NG1LiCl, NG2LiCl, NG3LiCl, NG5LiCl, NG10LiCl, NG11LiCl) y Guayllabamba (G1p, G2p, G3p, G4p, G5p). b) Guayllabamba (G6p, G7p, G9p, G10p) Marcador 100 pb (M). Control + (Vacuna BIOMUNE).

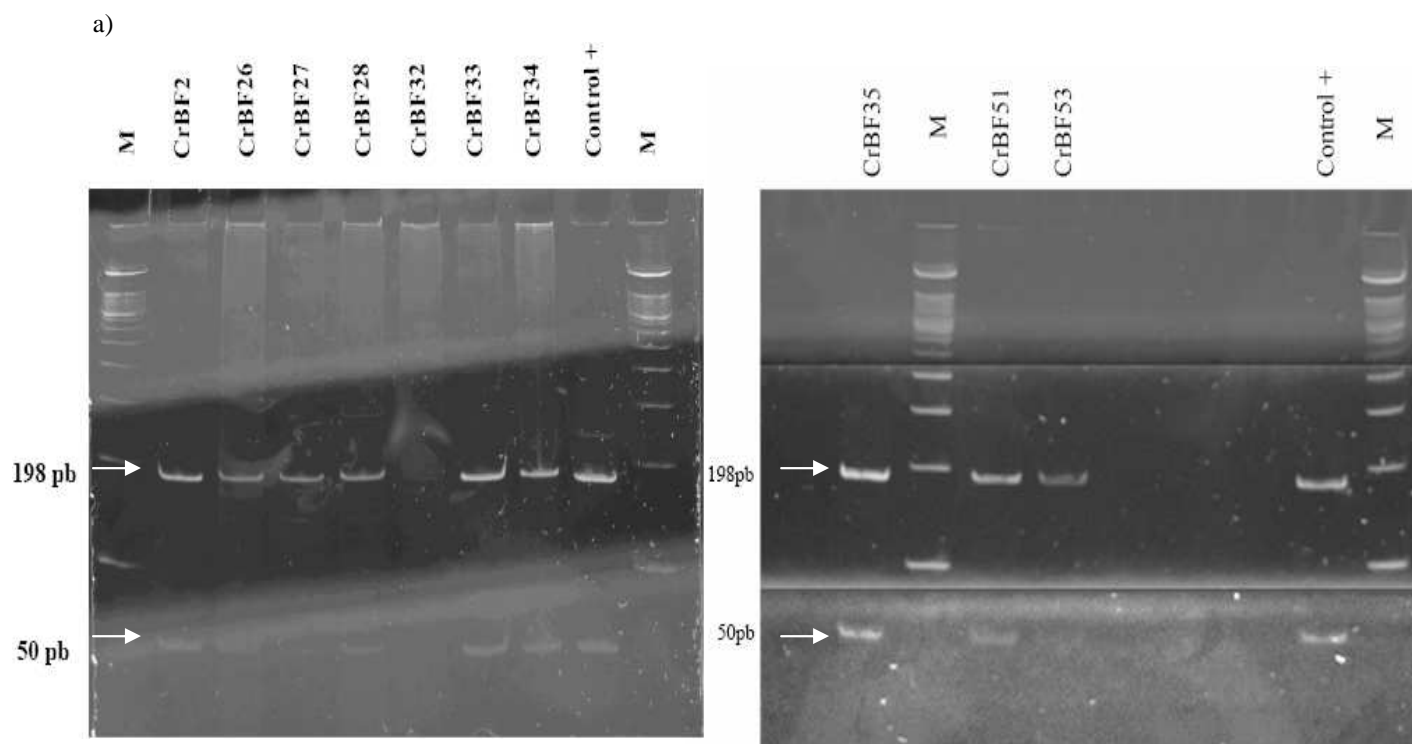


Figura 11.1. Electroforesis de los productos del RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima *TaqI* en un gel de poliacrilamida del 12%. a) Bursas criollas (CrBF2, CrBF26, CrBF27, CrBF28, CrBF32, CrBF33, CrBF34). b) Bursas criollas (CrBF35, CrBF51, CrBF53). Marcador 100 pb (M). Control + (Vacuna BIOMUNE).

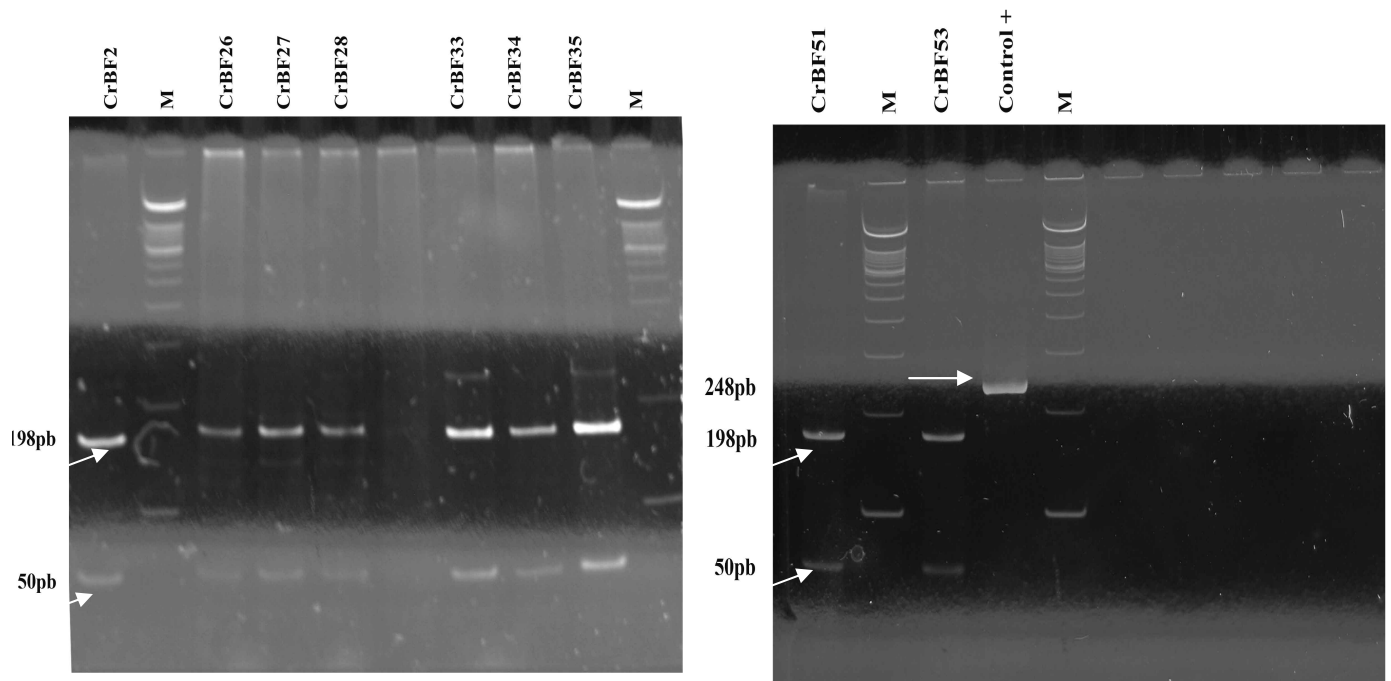


Figura 11.2. Electroforesis de los productos del RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima *Dral* en un gel de poliacrilamida del 12%. a) Bursas criollas (CrBF2, CrBF26, CrBF27, CrBF28, CrBF33, CrBF34). b) Bursas criollas (CrBF51, CrBF53). Marcador 100 pb (M). Control + (Vacuna BIOMUNE).

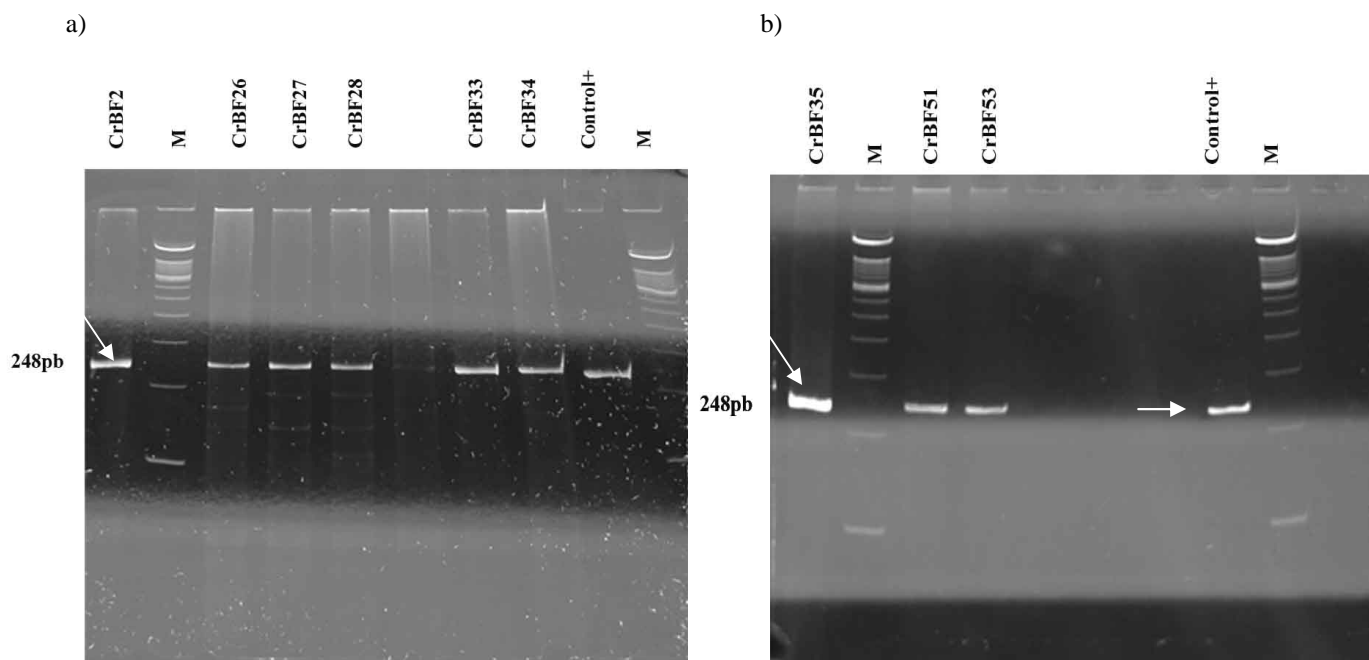


Figura 11.3. Electroforesis de los productos del RT/PCR después de la digestión enzimática con la enzima *SspI* en un gel de poliacrilamida del 12%. a) Bursas criollas (CrBF2, CrBF26, CrBF27, CrBF28, CrBF33, CrBF34). b) Bursas criollas (CrBF35, CrBF51, CrBF53). Marcador 100 pb (M). Control + (Vacuna BIOMUNE).