CAPÍTULO 3.3.12.

# BURSITIS INFECCIOSA
(Enfermedad de Gumboro)

## RESUMEN


***Descripción de la enfermedad:*** *El virus de la bursitis infecciosa (VBI, que pertenece al género* Avibirnavirus, *en la familia* Birnaviridae*), infecta a pollos, pavos, patos, pintadas y avestruces, pero causa enfermedad clínica solo en pollos de corta edad. La enfermedad aguda y grave, normalmente en aves de entre 3 y 6 semanas de edad, se asocia a una mortalidad alta, pero es frecuente observar infecciones menos agudas o bien subclínicas en etapas más tempranas de la vida. El VBI causa depleción linfoide en la bolsa de Fabricio, y puede tener lugar una depresión considerable de la respuesta inmunitaria humoral que favorecerá la aparición de infecciones secundarias. Se conocen dos serotipos del VBI, denominados serotipos 1 y 2. La enfermedad clínica se ha asociado solo al serotipo 1, contra el cual se preparan todas las vacunas comerciales. Para lograr una protección máxima contra ciertas variantes antigénicas del serotipo 1 del VBI pueden ser necesarias vacunas especiales. Las cepas muy virulentas del serotipo 1 del VBI son frecuentes en todo el mundo y causan una enfermedad grave.*

*La BI clínica, también denominada enfermedad de Gumboro, puede diagnosticarse a partir de una combinación de los signos clínicos característicos y de las lesiones que se hallan postmórtem. La BI subclínica se puede confirmar en el laboratorio poniendo de manifiesto una respuesta inmunitaria humoral en pollos no vacunados, o bien detectando antígenos del virus o el genoma vírico en los tejidos. En ausencia de tales pruebas, puede resultar útil un examen histológico de las bolsas.*

***Identificación del agente:*** *El aislamiento del VBI raramente se lleva a cabo en el diagnóstico de rutina. Pueden emplearse pollos negativos para anticuerpos específicos* (*SAN*), *huevos embrionados de gallinas SAN o cultivos celulares. Puede resultar difícil adaptar el VBI a estos dos últimos sistemas. La identidad del virus aislado debe confirmarse mediante neutralización vírica* (*VN*).

*En la bolsa de Fabricio pueden detectarse antígenos del virus antes de que se generen anticuerpos anti-VBI; este hecho puede resultar útil para un diagnóstico temprano. En la prueba de inmunodifusión en gel de agar* (*AGID*), *se emplea un homogenado de bolsa como antígeno contra un antisuero que se sabe que es positivo. Los enzimoinmunoanálisis* (*ELISA*) *de captura de antígeno en los que se usan placas recubiertas con anticuerpos específicos contra el VBI también permiten detectar antígenos del VBI en homogenados de bolsa. Pueden ponerse de manifiesto antígenos del VBI mediante inmunotinción de los tejidos infectados empleando un antisuero de pollo específico contra el VBI.*

*Para detectar ARN vírico puede emplearse una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa* (*RT-PCR*).

***Caracterización a nivel de cepa:*** *Las cepas del VBI pueden caracterizarse mediante fagotipificación en pollos SAN, mediante tipificación antigénica en pruebas de VN cruzada o en pruebas basadas en anticuerpos monoclonales, o bien con una secuenciación de nucleótidos de los productos obtenidos mediante la amplificación con RT-PCR derivados de ambos segmentos del genoma del VBI. Las pruebas deben realizarse en laboratorios especializados y deben incluir cepas control de referencia.*

***Pruebas serológicas:*** *Se puede llevar a cabo una AGID, una VN o una ELISA. La infección por el VBI suele diseminarse rápidamente dentro de las parvadas: para comprobar si una parvada*

*presenta anticuerpos, basta con analizar un pequeño porcentaje de los animales. Si se hallan reacciones positivas en aves no vacunadas, deberá considerarse que toda la parvada está infectada.*

***Requisitos para las vacunas:*** *existen vacunas vivas atenuadas, vacunas inactivadas (muertas), vacunas vivas recombinantes que expresan el antígeno de la cápsida (VP2) del VBI y vacunas de inmunocomplejo (Icx). Las vacunas vivas atenuadas, recombinantes e Icx se usan para inmunizar de forma activa a pollos de corta edad. Una estrategia complementaria consiste en proporcionar a los pollos de corta edad una protección pasiva vacunando a los progenitores con una combinación de vacunas vivas y muertas. Por lo tanto, resulta crucial vacunar de manera eficaz a los reproductores.*

*Las vacunas vivas atenuadas contra el VBI deben ser estables y no presentar tendencia a revertir a la virulencia. Las vacunas vivas se denominan suave, intermedia o "intermedia plus" ("caliente" o "invasiva"), en función de su capacidad de i) replicarse y causar agotamiento linfocitaria en la bolsa y ii) vencer los anticuerpos maternos residuales (MDA). Las vacunas suaves casi nunca se usan en broilers, pero sí se usan mucho para sensibilizar a los pollos reproductores antes de inocularles una vacuna inactivada. Cuando se hallan MDA con 1 día de vida, la vacunación con vacunas vivas debe retrasarse hasta que los MDA han menguado en la mayor parte de la parvada. Para establecer un buen programa, debe llevarse a cabo un análisis serológico para determinar cuándo han disminuido los MDA. Las vacunas vivas suelen administrarse mediante spray o en agua de bebida.*

*Las vacunas recombinantes e Icx permiten la administración automatizada por inyección, ya sea* in ovo *a los 18 días de incubación, o con 1 día de edad, incluso en presencia de MDA.*

*Para que las vacunas muertas sean efectivas, deben disponer de un contenido alto en antígeno. Principalmente se usan para estimular niveles altos y uniformes de anticuerpos en los pollos reproductores, y como consecuencia, en su descendencia, pero en ocasiones se usan en aves de corta edad y gran valor económico que presentan MDA. Las vacunas muertas se fabrican con un adyuvante que es una emulsión oleosa y se administran por inyección. Deben usarse en aves que ya han sido sensibilizadas con la vacuna viva o con el virus natural, algo que puede comprobarse mediante serología. Pueden obtenerse niveles altos de MDA en aves reproductoras administrándoles, por ejemplo, vacuna viva aproximadamente a las 8 semanas de edad, y vacunándolas después con vacuna inactivada más o menos a las 18 semanas.*

## A. INTRODUCCIÓN

La bursitis infecciosa (BI), también denominada enfermedad de Gumboro, está causada por un virus que es miembro del género *Avibirnavirus* (familia *Birnaviridae*). Aunque los pavos, los patos, las pintadas, los faisanes y los avestruces pueden contraer la infección, solo se observan signos clínicos en los pollos. Únicamente los pollos de menos de 10 semanas suelen presentar afectación clínica. Los pollos de más edad no suelen presentar signos clínicos

La enfermedad aguda y grave de las aves de 3–6 semanas de vida se asocia a una mortalidad alta y a signos como postración, diarrea y muerte súbita. En los exámenes postmórtem de los casos agudos de BI se observa una combinación de hemorragia muscular y proventricular, nefritis e inflamación de la bolsa, con edema o hemorragias de la bolsa en los primeros 4 días, seguidos de atrofia de la bolsa en etapas posteriores del curso de la enfermedad (para más información, consúltese el apartado B.1. *Identificación del agente*). En el diagnóstico diferencial de la BI aguda deben tenerse en cuenta otras enfermedades que puedan inducir muerte súbita en pollos de corta edad, con hemorragias o nefritis o lesiones en la bolsa. Ello incluye enfermedades infecciosas, como la enfermedad de Newcastle (EN), la anemia del pollo e infecciones por el virus de la bronquitis infecciosa con tendencias nefropatógenas. Para la identificación diferencial de la BI aguda son determinantes las lesiones de la bolsa en las primeras fases de la enfermedad.

Es habitual una enfermedad subclínica o menos aguda en aves de hasta 3 semanas de vida. Puede causar problemas secundarios debido al efecto del virus en la bolsa de Fabricio. El virus de la BI (VBI) provoca un descenso en la cantidad de linfocitos de la bolsa y, sobre todo si esto se produce en las 2 primeras semanas de vida, puede conducir a una reducción significativa de la respuesta inmunitaria humoral. Las únicas lesiones relacionadas con la BI subclínica pueden ser la atrofia de bolsa y las lesiones asociadas a infecciones secundarias. La caracterización de las alteraciones histopatológicas asociadas a la atrofia de la bolsa tendrán una importancia crucial en la identificación de la BI subclínica.

Se sabe que existen dos serotipos del virus de la bursitis infecciosa (VBI). Los virus del serotipo 1 se replican en la bolsa de Fabricio y algunos virus del serotipo 1 causan enfermedad clínica en pollos. A veces, se encuentran anticuerpos o virus en otras especies aviares, pero no se aprecian signos de infección. Se han hallado virus de serotipo 2 en el tracto respiratorio de pavos, hisopos cloacales de patos y en las bolsas de Fabricio de pollos. Los anticuerpos contra los virus del serotipo 2 están muy diseminados en pavos y, a veces, se hallan en pollos y patos. No existe ningún informe de enfermedad clínica causada por infección por virus de serotipo 2 (Eterradossi y Saif, 2013).

No se ha observado que la BI tenga potencial zoonótico alguno (Eterradossi y Saif, 2013).

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

El aislamiento y la identificación del agente proporcionan el diagnóstico más certero de la BI, pero habitualmente no se intentan con fines de diagnóstico rutinario porque el virus puede resultar difícil de aislar. En la práctica, el diagnóstico de laboratorio de la BI depende de la detección de anticuerpos específicos inducidos por el virus o de la detección del virus en los tejidos, ya sea mediante métodos inmunológicos o moleculares. Para el diagnóstico existen varios métodos, y se escogerá uno u otro en función de los objetivos (Tabla 1).

***Tabla 1.*** *Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la BI y su propósito*

| **Método** | **Propósito** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Demostrar ausencia de infección en la población | Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos | Contribuir a las políticas de erradicación | Confirmar casos clínicos | Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia | Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación |
| **Anatomopatología y detección del virus[1]** | | | | | | |
| **Examen histopatológico de las bolsas** | +[a] | – | – | +++ | +[a] | +[b] |
| **Aislamiento del virus** | +[a] | –[c] | – | +[d] | +[d] | – |
| **Caracterización del virus (fagotipificación, antigenicidad, secuenciación de nucleótidos)** | +[e] | – | – | +++ | +[e] | +[b] |
| **Detección del virus en las bolsas mediante inmunoanálisis (AGID, AC-ELISA, inmunotinción)** | +[a] | –[c] | – | +++ | + | – |
| **Detección del virus por RT-PCR** | +[a] | –[c] | +[a] | +++ | –[f] | + |
| **Detección de respuesta inmunitaria** | | | | | | |
| **AGID para detección de anticuerpos** | ++[a] | ++ | ++ | – | – | + |

1 Se recomienda utilizar una combinación de métodos de identificación del agente con la misma muestra clínica.

| **Método** | **Propósito** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Demostrar ausencia de infección en la población | Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos | Contribuir a las políticas de erradicación | Confirmar casos clínicos | Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia | Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación |
| **ELISA para detección de anticuerpos** | +++[a] | +++ | +++ | – | – | +++ |
| **Neutralización del virus** | +[g] | ++[g] | – | – | – | ++[g] |

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones;
+ = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.
AGID = prueba de inmunodifusión en gel de agar; AC-ELISA = enzimoinmunoanálisis de captura de antígeno.
RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.
[a]Si se realiza a gran escala y siempre negativa en una zona donde no se ha utilizado vacuna viva,
o para comprobar si hay BI subclínica;
[b]Podría utilizarse post-vacunación para comprobar si hay replicación de vacuna viva en la bolsa de Fabricio;
[c]No adecuada porque podría dar negativo si la infección ha tenido lugar varias semanas antes del análisis;
[d]Muy laboriosa y precisa complementarse con una caracterización del virus para diferenciar entre
vacunas vivas y cepas de campo;
[e]Podría ser necesaria si en la zona estudiada se usan vacunas vivas;
[f]No adecuada porque normalmente no diferencia entre vacunas vivas y cepas de campo;
[g]Laboriosa, pero es el método de referencia en aves distintas de las de corral, en especies no aviares o cuando se estudia un número bajo de pollos, o cuando es indispensable correlacionar la presencia de anticuerpos detectados con la protección.

## 1. Identificación del agente

La BI clínica presenta de forma clara signos característicos y lesiones post mórtem. El grupo de aves afectado mostrará una morbilidad muy elevada acompañada de un abatimiento intenso en la mayoría de las aves, lo que dura unos 5–7 días. La mortalidad se eleva drásticamente durante 2 días y a continuación desciende de forma rápida durante los siguientes 2–3 días. Normalmente, muere entre el 5% y el 10% de las aves, pero la mortalidad puede alcanzar el 30–40% o más en el caso de los VBI muy virulentos (VBImv). Los principales signos clínicos son diarrea acuosa, plumaje erizado, apatía, anorexia, temblores y postración. Entre las lesiones postmórtem destacan la deshidratación de los músculos con numerosas equimosis y el agrandamiento y cambio de color de los riñones, con uratos en los túbulos. Las bolsas de Fabricio muestran las lesiones diagnósticas principales. Las aves que mueren en el momento más álgido del brote de la enfermedad, presentan una bolsa agrandada e turgente y cambian de color, a amarillo pálido. Puede haber hemorragias intrafoliculares y, en algunos casos, la bolsa puede estar completamente hemorrágica, con el aspecto de una cereza oscura. En muchas bolsas estarán presentes edemas peribursales de color pajizo. Es mejor realizar las pruebas de confirmación de la enfermedad clínica o de detección de la enfermedad subclínica utilizando ensayos inmunológicos, ya que el VBI es difícil de aislar. Para el aislamiento vírico, se deben seguir los métodos descritos más abajo. La diferenciación entre los serotipos 1 y 2 o entre los subtipos o patotipos del serotipo 1 la debe realizar un laboratorio especializado (p. ej. los Laboratorios de Referencia de la OIE para la bursitis infecciosa [véase la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre*]).

### 1.1. Preparación de las muestras

Las bolsas de Fabricio se preparan de forma aséptica a partir de unos cinco pollos infectados en las etapas tempranas de la enfermedad. Se trocean las bolsas con dos hojas de bisturí, añadiendo una cantidad pequeña de caldo de peptona que contenga penicilina y estreptomicina (1 000 µg /ml en cada caso) y se homogeneiza en una picadora de tejidos. El homogenado se centrifuga a 3 000 ***g*** durante 10 minutos. Se recoge el sobrenadante para utilizarlo en las investigaciones descritas más adelante. Se recoge el sobrenadante para utilizarlo en las pruebas que se describen abajo. Puede que se necesite filtrar dicho sobrenadante a través de un filtro de 0,22 µ para un mayor control de la contaminación bacteriana, aunque esto puede ocasionar la reducción del título vírico.

### 1.2. Identificación mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar

En el apartado B.2.1. se describe un protocolo para realizar la prueba de la inmunodifusión en gel de agar (AGID). Para detectar el antígeno en la bolsa de Fabricio mediante una prueba de AGID, se deben extraer de forma aséptica las bolsas de aproximadamente diez pollos en la etapa aguda de la infección. Las bolsas se trocean empleando dos hojas de bisturí con un movimiento de tijeras y después los trozos pequeños se colocan en los pocillos de una placa de AGID enfrentándolas a sueros positivos conocidos. Se puede facilitar la liberación de los antígenos del VBI a partir del tejido infectado de la bolsa realizando ciclos de congelación-descongelación del tejido troceado y a continuación se puede emplear el exudado congelado-descongelado para rellenar los pocillos.

### 1.3. Identificación mediante inmunofluorescencia

Los cortes de bolsa se preparan con un microtomo criostático, se secan a temperatura ambiente y a continuación se fijan en acetona fría. Se aplican a los cortes antisueros específicos del VBI marcados con fluorescencia; posteriormente se incuban a 37°C durante 1 hora en una atmósfera húmeda. Al final del periodo de incubación se lavan durante 30 minutos en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2, y luego con agua destilada. Los cortes se montan empleando glicerol tamponado, pH 7,6 y se examinan por microscopía ultravioleta para detectar la posible fluorescencia específica del VBI (Meulemans *et al*., 1977).

### 1.4. Identificación mediante enzimoinmunoanálisis de captura de antígeno (AC-ELISA)

Desde que se Snyder *et al.* (1988) describieron el primer protocolo para la detección del serotipo 1 del VBI mediante un enzimoinmunoanálisis de captura de antígeno (AC-ELISA), se han creado muchas otras pruebas (Eterradossi y Saif, 2013). En pocas palabras, se cubren las placas ELISA con los anticuerpos específicos del VBI. Dependiendo del protocolo AC-ELISA elegido, el anticuerpo de captura de antígeno puede ser un anticuerpo monoclonal de ratón anti-VBI (MAb), o una mezcla de tales MAb, o un suero policlonal de pollo anti-VBI post-infección. Se ha sugerido que los AC-ELISA que emplean anticuerpos policlonales pueden tener mayor sensibilidad. Se realizan diluciones de las muestras de los homogenados de bolsa (véase más arriba) desde la 1/10 a la 1/25 (p/v) en un tampón de dilución adecuado y se incuban en los pocillos recubiertos con anticuerpos. Al final del periodo de incubación, se eliminan los antígenos no unidos con un tampón de lavado adecuado (p. ej. PBS, pH 7,2 + Tween 20 al 0,2%). A continuación, los antígenos de captura se revelan, como en un ELISA indirecto, con un anticuerpo de detección (que debe haberse desarrollado a partir de especies animales diferentes a las de los anticuerpos de captura), seguido de un conjugado enzimático que se una para detectar solo el anticuerpo (en algunos protocolos, el anticuerpo de detección puede conjugarse directamente con el enzima), seguido del sustrato enzimático. Finalmente, las densidades ópticas, que son proporcionales a la cantidad de antígenos de captura del VBI, se leen con un lector de ELISA.

El AC-ELISA se basa en la utilización de muestras que posiblemente contienen el virus vivo, y se debe llevar a cabo solo en instalaciones de contención adecuadas, tales como una cabina de seguridad de clase II. Se debe considerar que todos los residuos, ya sean líquidos (tampones de lavado) o sólidos, están contaminados por el VBI y, antes de su eliminación, hay que descontaminarlos de forma adecuada.

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

### 1.5. Identificación mediante técnicas moleculares

Se han desarrollado técnicas de virología molecular que permiten identificar el VBI más rápidamente que mediante el aislamiento vírico. El método molecular que con más frecuencia se utiliza es el de la detección del genoma del VBI mediante la reacción en cadena de la polimerasa con trascripción inversa (RT-PCR) (Lin *et al*., 1993; Wu *et al*., 1992). Este método permite detectar virus que no se replican en cultivo celular porque no es necesario multiplicar el virus antes de su amplificación.

La RT-PCR se realiza en tres etapas: extracción de los ácidos nucleicos a partir de la muestra estudiada, trascripción inversa (RT) del ARN del VBI en ADNc, y amplificación del ADNc resultante

mediante PCR. Las dos últimas etapas requieren que el usuario seleccione los oligonucleótidos cebadores que son secuencias cortas complementarias a la secuencia nucleotídica específica del virus. Se amplificarán zonas diferentes del genoma dependiendo de la localización a partir de la cual se han seleccionado los cebadores. El ejemplo que se indica más abajo permite la amplificación del tercio medio del gen que codifica la proteína externa VP2 de la cápsida (Eterradossi *et al*., 1998) o la amplificación del extremo 5' del gen que codifica la proteína VP1 en el segmento B del VBI (Le Nouen *et al*., 2006).

### 1.5.1. Extracción de los ácidos nucleicos

A diferencia del ARN monocatenario, el genoma de ARN bicatenario (dsARN) del VBI es resistente a la degradación por ARNasas. Sin embargo, las células infectadas también contienen especies de ARN monocatenario de polaridad positiva derivado del VBI que pueden utilizarse como molde en la etapa de RT y pueden contribuir a mejorar la sensibilidad de la prueba. Así, es importante que la extracción del ARN se lleve a cabo con guantes y material de laboratorio y reactivos libres de ARNasa.

El ARN del VBI se puede extraer de tejidos infectados utilizando algunos kits comerciales de distribuidores de reactivos de biología molecular. Alternativamente, el ARN del VBI se puede extraer añadiendo dodecilsulfato sódico al 1% (concentración final peso/volumen) y 1 mg/ml de proteinasa K a 700 µl de suspensión vírica (p. ej. homogenado bursal). Se incuba 60 minutos a 37°C. Los ácidos nucleicos se obtienen utilizando un protocolo estándar para la extracción con fenol/cloroformo (precaución: el fenol debe manipularse y eliminarse teniendo en cuenta que es tóxico). Los ácidos nucleicos se recogen a partir de la fase final acuosa mediante precipitación con etanol y se resuspenden en agua destilada libre de ARNasa o un tampón adecuado. El ARN diluido en agua debe conservarse congelado a una temperatura inferior a los –20°C hasta su uso.

### 1.5.2. Trascripción inversa

A nivel comercial, existe una gran variedad de transcriptasas inversas. Se deben seguir las instrucciones del fabricante para preparar la mezcla de reacción de la RT. Se utiliza el cebador de la PCR "inferior" (complementario a la cadena positiva del genoma del VBI, véase más abajo) para la trascripción inversa, ya que esto permite la síntesis de ADNc tanto a partir de la cadena positiva del genoma ARN2c del VBI, como a partir de los ARN monocatenarios de polaridad positiva derivados del VBI contenidos previamente en las células infectadas. Como alternativa, para preparar la síntesis del ADNc pueden utilizarse cebadores aleatorios (hexanucleótidos).

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

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

### 1.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa

A nivel comercial, existe una gran variedad de polimerasas de ADN adecuadas para la PCR. Se deben seguir las instrucciones del fabricante para preparar la mezcla de reacción de la PCR. Recientemente se han revisado los protocolos para amplificación y tipificación molecular del VBI (Wu *et al*., 2007). A modo de ejemplo, se sugiere el uso de los pares de cebadores para la PCR U3/L3 y +290/–861 que se ofrecen a continuación y que se han considerado útiles para amplificar el tercio medio del gen VP2 en el segmento A de las cepas del VBI de serotipo 1 (Eterradossi *et al*., 1998), y una región en el extremo 5' del segmento B del VBI (Le Nouen *et al*., 2006), respectivamente. Se ha demostrado que esas dos regiones son las adecuadas para los estudios de epidemiología molecular (Le Nouen *et al*., 2006). Aunque un número significativo de cepas del VBI tienen dos cambios de nucleótidos en las posiciones 35 (G–A) y 38 (T–C) del cebador U3 (incluyendo las cepas procedentes de Japón [OKYM], Hong Kong [HK46], RU [UK661] y Nigeria [N4]), se ha demostrado que el par de cebadores U3-L3 es efectivo para amplificar algunos de los virus que muestran las dos mutaciones. Esto se debe probablemente a que el extremo 3' del U3 está muy conservado. Sin embargo, al igual que

ocurre con la mayoría de las pruebas PCR, pueden existir cepas del VBI con cambios de nucleótidos en las posiciones de hibridación de los cebadores, en cuyo caso se requiere la utilización de otros cebadores para la detección óptima por RT-PCR.

La combinación de los protocolos de las RT-PCR orientadas al segmento A y al segmento B aumenta la probabilidad de detectar el serotipo 1 del VBI, en caso de estar presente; también permitirá una caracterización genética completa de las cepas del VBI detectado.

Secuencia de nucleótidos de los cebadores U3 y L3 específicos del VBI para la PCR (específicos para el gen VP2 del segmento A)**:**

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

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

Secuencia de nucleótidos de los cebadores +226 y –793 específicos del VBI para la PCR (específicos para el gen VP1 del segmento B):

Superior +290: 5'-**TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-**GAA-TTC**-***AGA-TTC-TGC-AGC-CAC-GGT-CTC-T*-3'

Inferior -861: 5'-**CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC**-CTG-CAG**-***TTG-ATG-ACT-TGA-GGT-TGA-TTT-TG*-3'

Tanto el cebador U3 como el L3 tienen 44 nucleótidos de longitud, mientras que los cebadores +290 y –861 tienen 46 y 47 nucleótidos de longitud, respectivamente. Los cuatro cebadores contienen un extremo 3' específico del VBI (en letra cursiva en la secuencia mostrada más arriba) que abarca de la posición 657 a la 676 y de la 1193 a la 1212 del segmento A del VBI en los cebadores U3 y L3, respectivamente (se numera como el segmento A de la cepa P2, Nº de acceso X84034), y de la posición 290 a la 311 y de la 861 a la 883 del segmento B del VBI en los cebadores +290 y –861, respectivamente (se numera como el segmento B de la cepa D6948, Nº de acceso AF240687). El extremo específico del VBI se empareja a un extremo 5' anti- VBI (en negrita en la secuencia de más arriba) que corresponde a los cebadores universales M13 y RM13 en los cebadores superior e inferior, respectivamente. Los cebadores universales M13 y RM13 son muy utilizados en las reacciones de secuenciación del ADN; por eso los productos purificados de la PCR que resultan de la amplificación con los pares de cebadores U3/L3 y +290/-861 se secuencian con facilidad en ambas direcciones. Finalmente, se incluyen los puntos de restricción (subrayados en las secuencias mostradas más arriba) para las siguientes endonucleasas de restricción: *Sph*I (en el cebador U3), *Eco*RI (en los cebadores L3 y +290), y *Pst* I (en el cebador –861). Estos puntos de restricción están ubicados de tal forma que, si es preciso, puedan clonarse los productos PCR derivados de la amplificación con los pares U3/L3 o +290/–861. El par U3/L3 genera un producto de 604 pares de bases (pb), de los que 516 pb son específicos de la secuencia del VBI amplificado y abarcan la región codificadora de la región hipervariable de la proteína VP2. El par +290/–861 genera un producto de 642 pb, de los que 549 pb son específicos de la secuencia amplificada del VBI. Ambos productos derivan de regiones genómicas que son adecuadas para el análisis filogenético (Eterradossi *et al*., 1998; Le Nouen *et al*.,-2006).

Se realiza una etapa inicial de desnaturalización como recomiende el proveedor de la ADN polimerasa, seguida de 35 ciclos, en cada uno de los cuales se incluye una etapa de desnaturalización, una de hibridación y una de extensión. En tales ciclos se puede utilizar una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos y una hibridación a 64°C durante 45 segundos con los pares U3/L3 y +290/–861 (la temperatura de hibridación se debe adaptar si se utilizan otros cebadores). Se deben establecer los parámetros para la etapa de extensión de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

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

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

Se deben incluir en cada PCR reacciones control positivas y negativas. Se han desarrollado protocolos que incluyen un control interno para detectar la presencia de inhibidores de la PCR (Smiley *et al*., 1999).

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

Para el diagnóstico de la BI también puede emplearse una RT-PR de un solo paso, tanto con el método convencional como con el de tiempo real.

### 1.6. Aislamiento del virus en cultivos celulares

Se inoculan 0,5 ml de muestra en cuatro cultivos recientemente confluentes de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) (a partir de una fuente libre de patógenos específicos [SPF]) en frascos de 25 $cm^2$. Se adsorben a 37°C durante 30–60 minutos, se lavan dos veces con solución salina balanceada de Earle y a cada frasco se le añade medio de mantenimiento. Los cultivos se incuban a 37°C, y se observan a diario para detectar posibles efectos citopáticos (ECP). Se caracterizan por ser células refringentes redondas y pequeñas. Si después de 6 días no hay ECP, se elimina el medio y, a continuación, los cultivos se congelan y descongelan y el lisado resultante se inocula en cultivos frescos. Puede ser necesario repetir este procedimiento al menos tres veces. Si se observan ECP, se debe comprobar si hay virus utilizando un antisuero monoespecífico contra el VBI en una prueba de neutralización vírica (VN) en cultivo de tejidos (véase el apartado B.2.2. *Pruebas de neutralización del virus*). Habitualmente, las cepas más patogénicas del VBI no se pueden adaptar a crecer en CEF a menos que el virus se haya sometido primero a un pase seriado extensivo en embriones (véase más adelante).

### 1.7. Aislamiento del virus en embriones

Se inoculan 0,2 ml de muestra en el saco vitelino de cinco embriones de pollo de 6–8-días de vida sin anticuerpos específicos (SAN) y en la membrana corioalantoidea (*American Association of Avian Pathologists*, 2008) de cinco embriones de pollo SAN de 9–11 días de vida. Los embriones SAN deben proceder de parvadas en las que se haya demostrado que son seronegativas respecto al VBI. Se observan al ovoscopio a diario y se eliminan los embriones muertos hasta 48 horas después de la inoculación. Los embriones que mueran a partir de este momento, se examinan para detectar posibles lesiones. El serotipo 1 de la BI produce enanismo, edema subcutáneo, congestión y hemorragias subcutáneas o intracraneales en el embrión. Normalmente el hígado está tumefacto con una congestión variable que produce un efecto moteado. En las muertes posteriores, el hígado puede estar tumefacto y verdoso, con zonas de necrosis. El bazo está agrandado y los riñones tumefactos y congestivos, con un efecto moteado. Si se observan lesiones, deberá comprobarse si hay virus utilizando un suero monoespecífico anti-VBI mediante una prueba de neutralización del virus presente en el embrión.

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

El serotipo 2 del VBI no induce edema ni hemorragias subcutáneas en los embriones infectados, pero los embriones son de un tamaño menor y presentan un cambio de color a amarillo pálido.

Para preparar el virus empleado como base de propagación por embrión o para los pases sucesivos, se recogen asépticamente los embriones con lesiones o los que se sospeche que estén infectados, respectivamente. Se eliminan las cabezas y extremidades y se pica el cuerpo principal tal y como se describe en el apartado B.1.1. *Preparación de la muestra* para la preparación de una suspensión vírica.

### 1.8. Aislamiento del virus en pollos

Este método se ha utilizado en el pasado pero ya no se recomienda debido a problemas relacionados con el bienestar animal. Se administran por la vía de la gota en el ojo 0,05 ml de muestra a cinco pollos susceptibles y cinco inmunes a la BI (de 3–7 días de vida). Los pollos se sacrifican por medios humanitarios 72–80 horas después de la inoculación y se examinan sus bolsas de Fabricio. Las de los pollos infectados con el serotipo 1 virulento del VBI están amarillentas (en ocasiones hemorrágicas) e

hinchadas, con estriaciones prominentes. A veces se presenta edema peribursal y, ocasionalmente, aparecen tapones con material caseoso. Las plicas presentan petequias.

La presencia de lesiones en las bolsas de los pollos susceptibles acompañadas de la ausencia de lesiones en los pollos inmunes constituye un diagnóstico de la BI. Las bolsas de ambos grupos se pueden utilizar como antígeno en una prueba de inmunodifusión en gel de agar (AGID) usando un antisuero positivo para la BI (véase el apartado B.1.2 *Identificación mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar*).

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

Las bolsas de los pollos infectados por el serotipo 2 del VBI no muestran ninguna lesión macroscópica.

## 1.9. Diferenciación de cepas

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

### 1.9.1. Pruebas de patogenicidad

Los estudios para comparar la patogenicidad de las cepas del VBI se deben realizar en instalaciones de biocontención segura para impedir la diseminación del virus estudiado (véase el Capítulo 1.1.4. *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*). Se deben emplear aves SAN con estado microbiológico conocido (lo más adecuado es utilizar pollos SPF) con el fin de evitar interferencias debidas a agentes contaminantes.

Las variables principales al comparar los resultados de los ensayos de patogenicidad son la raza, la edad y el estado inmunitario de los pollos utilizados en el desafío, la dosis y la vía de inoculación del virus de desafío y la posible presencia de agentes contaminantes en el inóculo. Se ha descrito que las aves ponedoras de raza ligera son más susceptibles que los pollos pesados para cebo (Van den Berg y Meulemans, 1991). También pueden tener lugar diferencias en el grado de susceptibilidad entre las líneas de pollos SPF. La mayor susceptibilidad a la forma aguda de la BI se presenta en pollos de entre 3 y 6 semanas de vida (Eterradossi y Saif, 2013). (En el apartado C se describe la influencia del estado inmunitario). Es necesaria una dosis alta de virus de desafío, tal y como se recomienda en el apartado C.1.3. *Vacunas vivas con vector recombinante: métodos de uso*, para que se infecten todos los pollos inoculados a la vez sin que sea necesaria la transmisión ave a ave del virus inoculado. Finalmente, la presencia de agentes contaminantes en el inóculo, tales como adenovirus o el virus de la anemia infecciosa de los pollos, puede modificar la gravedad de la BI y los signos que se observan después del desafío (Rosenberger *et al*., 1975).

Se han utilizado los términos “variante”, “clásico” y “muy virulento” para describir las cepas del VBI que muestran diferencias en la patogenicidad. Basándose en los signos y lesiones observadas en dos líneas de pollos SPF White Leghorn durante la BI experimental aguda después de un desafío con una dosis infectiva para el 50% de los embriones ($EID_{50}$) de $10^5$, los VBI “variantes” norteamericanos inducen poco o casi ningún signo clínico y no provocan mortalidad pero causan lesiones bursales marcadas; los VBI “clásicos” inducen una mortalidad de aproximadamente el 10–50% acompañada de lesiones y signos típicos, en tanto que los VBI “muy virulentos” inducen una mortalidad de aproximadamente el 50–100% y lesiones y signos típicos (Eterradossi *et al.,* observación personal).

### 1.9.2. Pruebas de antigenicidad

Se puede determinar la relación antigénica existente entre las cepas del VBI mediante pruebas de VN cruzada, que se correlacionan mejor con la protección cruzada. Tales pruebas han de llevarse a cabo en huevos embrionarios SAN cuando los virus estudiados no crezcan en cultivos de CEF (p. ej. VBI muy virulento [VBImv]). Las diferencias en los resultados de la prueba de VN cruzada entre las cepas del serotipo 1 del VBI han conducido a la definición de los "subtipos" del serotipo 1, algunos de los cuales son cepas de los VBI norteamericanos antigénicamente "variantes" (Jackwood y Saif, 1987).

Otra forma de estudio de la relación genética entre las cepas es la utilización de MAb de ratón que se unen a epítopos neutralizantes del VBI. Existen en todo el mundo varios conjuntos de MAb para utilizar en el AC-ELISA (Eterradossi *et al*., 1999; Snyder *et al*., 1992). Se han introducido algunos de estos MAb en kits comerciales, pero aún no se ha propuesto un cuadro unificado de MAb. Todos los epítopos neutralizantes del VBI caracterizados hasta la fecha se han situado en un dominio inmunológico principal del tercio medio (de la posición 200 a la 340 de aminoácidos) de la proteína VP2 de la cápsida (Eterradossi *et al*., 1998; Schnitzler *et al*., 1993; Vakharia *et al*., 1994). Esta región se denomina "dominio variable de la VP2" debido al hecho de que la mayoría de los cambios observados en los aminoácidos de las cepas del VBI se agrupan ahí. En el vVP2, existen cuatro tramos de aminoácidos de importancia crítica para la antigenicidad y se denominan picos hidrofílicos del vVP2. Son los aminoácidos de las posiciones 210 a la 225 (pico A principal), de la 249 a la 252 (pico 1 secundario), de la 281 a la 292 (pico 2 secundario) y de la 313 a la 324 (pico B principal) (Van den Berg *et al*., 1996). Según la estructura cristalina de la proteína VP2 y las partículas del VBI, los segmentos de aminoácidos previamente conocidos como "picos hidrofílicos de la VP2" corresponden a las asas de aminoácidos más expuestas en el dominio de proyección de la proteína VP2 (Coulibaly *et al.,* 2005). Tanto los VBI "muy virulentos" como los "variantes" norteamericanos exhiben en estas regiones de aminoácidos unos cambios que se correlacionan con la variación de los epítopos (Eterradossi *et al*., 1998; Vakharia *et al*., 1994). Hasta la fecha, no se ha demostrado que ningún marcador antigénico se correlacione estrictamente con la patogenicidad del VBI.

### 1.9.3. Identificación molecular

La mayoría de los esfuerzos para la identificación molecular se han centrado en la caracterización del segmento mayor del VBI (segmento A) y, especialmente, de la región que codifica el vVP2. Inicialmente, se intentó caracterizar productos de la RT-PCR mediante endonucleasas de restricción (Lin *et al.*, 1993). Estos enfoques se conocen como RT-PCR/RE o RT-PCR-RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción). La utilidad de la información que proporcionan depende de la identificación de enzimas que corten en los puntos de restricción que son relevantes desde el punto de vista fenotípico. Varios protocolos de RE o RFLP han dado lugar a la definición de un gran número de perfiles, que pueden resultar difíciles de utilizar en estudios de epidemiología molecular y de correlacionar con la antigenicidad o la patogenicidad. La secuenciación de los nucleótidos de los productos de la RT-PCR sirve para valorar con más precisión la relación genética entre las cepas del VBI. Mediante un sistema genético inverso, se ha comprobado que la adaptación de las cepas del VBI al cultivo celular depende en gran medida de los pares de aminoácidos de la VP2 279 N–284 T o 253 H–284 T (Mundt, 1999). En la mayoría de virus muy virulentos están presentes cuatro aminoácidos típicos (222 A, 256 I, 294 I y 299 S) (Brown *et al*., 1994; Lin *et al*., 1993). En varios estudios recientes se indica que, aunque la VP2 es un determinante importante de la virulencia, el segmento B también parece ser importante (Boot *et al.*, 2000; Escaffre *et al.*, 2013; Jackwood *et al.*, 2011). Se ha descrito que el segmento A y el segmento B del VBI casi siempre evolucionan conjuntamente (es decir, que los grupos más importantes del VBI, como las cepas asociadas al VBImv, se pueden identificar mediante el análisis de los dos segmentos genómicos). No obstante, se han identificado algunos virus posiblemente reagrupados. La patogenicidad del VBI posiblemente reagrupado a menudo varía respecto a lo que sería esperable por la mera caracterización de su segmento A (Le Nouen *et al.*, 2006; Jackwood *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2008). Por lo tanto, es muy recomendable la identificación molecular de las cepas de VBI basada en la secuenciación de ambos segmentos de genoma.

## 2. Pruebas serológicas

Deben tomarse muestras de sangre al principio de la enfermedad, y repetir dicha obtención 3 semanas después. Dado que el virus se disemina con rapidez, bastan con muestrear una pequeña parte de la parvada. Normalmente es suficiente con 20 muestras de sangre.

### 2.1. Prueba de inmunodifusión en gel de agar

La prueba de AGID es la prueba serológica por sí sola más utilizada para la detección de anticuerpos específicos en el suero.

#### 2.1.1. Preparación del antígeno control positivo

Se inoculan pollos susceptibles de 3–5 semanas de vida, mediante una gota por vía ocular, con un homogeneizado bursal clarificado al 10% (p/v) que se sepa que contiene el VBI viable[2]. Las aves se sacrifican por medios humanitarios 3 días después de la inoculación y se recogen las bolsas de forma aséptica. Se eliminan las bolsas hemorrágicas y se juntan las restantes, se pesan y se les añade un volumen equivalente de agua destilada fría (o de un tampón adecuado, como PBS o caldo triptosa fosfato) y un volumen equivalente de cloruro de metileno no diluido. (Precaución: el cloruro de metileno es tóxico y probablemente cancerígeno. Se debe manejar y eliminar con sumo cuidado. Una posible alternativa para evitar los riesgos para la salud que representa el cloruro de metileno es el uso de triclorotrifluoroetano, aunque es peligroso para el medioambiente y debe manipularse y desecharse teniendo en cuenta este inconveniente). La mezcla se homogeneiza a fondo en una picadora de tejidos y se centrifuga a 2 000 ***g*** durante 30 minutos. Se recoge el líquido sobrenadante y se distribuye en alícuotas para conservarlas a –40°C. El antígeno contiene el virus vivo y solo se debe manipular en instalaciones adecuadas tales como las cabinas de seguridad de la clase II. Si es preciso, el antígeno puede inactivarse antes de su distribución: se añade un ß-propiolactona al 0,3% (v/v) al sobrenadante recogido, y a continuación se vuelve a incubar a 37°C durante 2 horas. Es importante realizar la incubación en un agitador orbital o en un balanceador mecánico, de forma que cualquier parte del interior del vial que haya estado en contacto con el virus vivo lo esté también con la ß-propiolactona. Se distribuye y se guarda como se indicó más arriba. Se comprueba la eficacia del proceso de inactivación intentando separar el VBI del antígeno inactivado, con tres pases seriados en huevos embrionados SAN (véase el apartado B.1.7 *Aislamiento de virus en embriones*).

#### 2.1.2. Preparación del antisuero control positivo

Se inoculan pollos susceptibles de 4–5 semanas de vida por vía ocular con 0,05 ml de un homogenado bursal clarificado al 10% (p/v) que se sepa que contiene el VBI viable (véase la nota 2). Se les extrae la sangre 28 días después de la inoculación. Los sueros se combinan y se conservan en alícuotas a –20°C.

#### 2.1.3. Preparación del agar

Se disuelve cloruro sódico (80 g) y fenol (5 g) en agua destilada (1 litro) (precaución: se debe manipular y eliminar el fenol teniendo en cuenta que se tóxico). Se añade el agar (12,5 g) y se calienta hasta que se disuelva. Para evitar el riesgo para la salud y el medioambiente causados por el uso de fenol, se aconseja el siguiente procedimiento para la preparación del agar: cloruro sódico (80 g), dihidrogenofosfato de potasio (0,45 g), sodio hidrogenofosfato dihidrato (1,19 g), agar (10 g) y agua destilada en un volumen final de 1 litro (pH final 7,1 a 20–25°C). El contenido de esta segunda receta puede homogeneizarse calentándolo hasta 90°C mientras se agita. Cuando la mezcla está aún muy caliente, se filtra con un filtro de celulosa cubierto con varias capas de muselina y se distribuye el medio en volúmenes de 20 ml en frascos de cristal. Más tarde puede esterilizarse el medio sin fenol mediante autoclavado como máximo a 115°C durante 15 minutos. Se guardan los frascos a 4°C hasta que se haya de utilizar.

#### 2.1.4. Procedimiento analítico

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

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

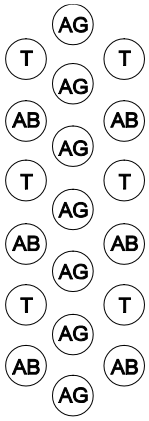
iii) Se cubren las placas y se deja solidificar el agar, y después se conservan a 4°C. Las placas llenas se pueden conservar hasta 7 días a 4°C. (Si las placas tienen que utilizarse

2 La cepa 52/70 es una cepa adecuada del VBI (serotipo 1, patotipo clásico) que se obtiene de los Laboratorios de Referencia de la OIE (véase la Tabla de la parte 4 de este *Manual Terrestre*).

el mismo día que se han llenado, se las seca destapándolas pero dejándolas invertidas a 37°C durante unos 30–60 minutos).

iv) Se cortan tres filas verticales de pocillos de 6 mm de diámetro y separados entre ellos 3 mm utilizando un cortador tubular y una plantilla.

v) Se extrae el agar de los pocillos mediante aspiración o se elimina utilizando una punta de bolígrafo con cuidado de no dañar las paredes de los pocillos.




AG = Antígeno positivo
AB = Antisuero positivo

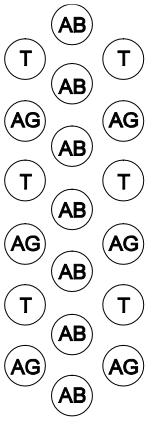



***Fig. 1.*** *Protocolo para la detección de anticuerpos*
T = sueros problema

***Fig. 2.*** *Protocolo para la detección de antígenos*
T = tejidos problema

Notas:
1. Es preferible el modelo lineal de pocillos, aunque puede utilizarse el modelo hexagonal. Cada suero o bolsa problema (T en las Fig. 1 y 2, arriba) se debe situar junto a un anticuerpo (AB) o antígeno (AG) control positivo, respectivamente.
2. Se utilizan pocillos de 3 mm de profundidad, 6 mm de diámetro y separados entre ellos 3 mm (o pocillos de cualquier otro tamaño que previamente se haya demostrado que son efectivos.

vi) Con una pipeta, se distribuyen 50 µl de los sueros problema en los pocillos, como se indica en la Figura 1.

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

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

vii) Se distribuyen 50 µl de los reactivos control positivo y negativo en los pocillos pertinentes.

viii) Las placas se incuban a 22–37°C hasta 48 horas en una cámara húmeda para evitar que se seque el agar.

ix) Se examinan las placas sobre un fondo oscuro con una fuente de luz oblicua después de 24 y 48 horas.

### 2.1.5. Pruebas cuantitativas de inmunodifusión en gel de agar

La AGID se puede utilizar también para medir los niveles de anticuerpos empleando diluciones del suero en los pocillos problema y considerando el título como la dilución mayor que produce una línea de precipitina (Cullen y Wyeth, 1975). Esto puede resultar útil para medir los anticuerpos maternos o vacunales y para decidir sobre cuál puede ser el mejor momento para la vacunación. Sin embargo, actualmente esta prueba de determinación cuantitativa por AGID se ha reemplazado en gran medida por el ELISA.

## 2.2. Pruebas de neutralización vírica

Las pruebas de VN se llevan a cabo en cultivo celular. La prueba es más laboriosa y costosa que la AGID, pero es más sensible para detectar anticuerpos. La sensibilidad no es necesaria para diagnósticos rutinarios, pero puede ser útil para evaluar las respuestas de las vacunas o diferenciar entre los serotipos 1 y 2 del VBI. En la prueba se utilizan fibroblastos de embriones de pollo SPF o

bien una línea celular continua adecuada (como QT-35, BGM-70, MA-104, Vero o DF1), junto con una cepa del VBI adaptada.

En primer lugar, se depositan 0,05 ml del virus diluido en el medio de cultivo de tejidos hasta obtener 100 $DICT_{50}$ (dosis infectivas en un 50% de los cultivos de tejido expuestos) por 0,05 ml en cada pocillo de una placa de microtitulación para el cultivo de tejidos (para conocer los métodos de titulación del virus, consúltese *American Association of Avian Pathologists*, 2008).Los sueros problema se inactivan por calor a 56°C durante 30 minutos. Se llevan a cabo diluciones a la mitad en los sueros de virus diluido. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, en cada pocillo se depositan 0,2 ml de suspensión celular, con una densidad celular que permita que se obtenga la confluencia de las capas después de 24 horas de incubación. Las placas se sellan e incuban a 37°C durante 4–5 días, y después se observan las monocapas al microscopio para comprobar si presentan el ECP característico. El punto final (título del suero) se expresa como el inverso de la dilución mayor del suero que no muestra ECP. Para reducir la variación entre ejecuciones de la prueba y entre operarios, se puede incluir en cada lote de pruebas un antisuero estándar de referencia[3] y el título de la suspensión vírica debe valorarse de nuevo en cada nuevo experimento utilizando un número suficiente de repeticiones (pocillos) por cada dilución de virus.

### 2.3. Enzimoinmunoanálisis

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

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

### 2.4. Interpretación de los resultados

La AGID es extremadamente sensible, aunque no tanto como la prueba de VN; con frecuencia, esta última da un título cuando la AGID da un resultado negativo. Las reacciones positivas indican la infección de las aves no vacunadas y sin anticuerpos maternos. A título orientativo, una reacción positiva de AGID en un ave vacunada o un ave joven con anticuerpos maternos indica un nivel de anticuerpos protector. El ELISA proporciona resultados más rápidos que la VN o la AGID y es menos costoso en términos de trabajo, aunque los reactivos son más caros. Los títulos de VN y de AGID se correlacionan bien, pero al ser más sensible la VN, los títulos de AGID son proporcionalmente inferiores. La correlación entre el ELISA y la VN y entre el ELISA y la AGID es más variable y depende de la fuente de los reactivos empleados en el ELISA, pero hay que recordar que tanto la VN como el ELISA son muy sensibles y que dependen de las variaciones intra e inter-laboratorios. Por lo tanto, resulta muy que los laboratorios que de forma rutinaria llevan a cabo ELISA o VN para la detección de VBI introduzcan en cada prueba un suero centinela positivo con un título conocido (De Wit *et al.*, 2007; Kreider *et al.*, 1991). Cuando se analiza el descenso del título de los anticuerpos maternos (MDA), es frecuente encontrar anticuerpos de VN residuales a una edad a la que los resultados del ELISA ya son negativos. Se ha ideado una fórmula que permite utilizar los títulos del ELISA para calcular la edad óptima de vacunación, que puede variar dependiendo de la vacuna que se emplee (Block *et al.*, 2007). Pueden producirse reacciones positivas inespecíficas con la mayoría de los ELISA porque, normalmente, están diseñados para controlar las respuestas de las vacunas, en cuyo caso, la sensibilidad se considera más importante que la especificidad. Esto se debe tener en cuenta al utilizar la técnica ELISA para el diagnóstico. En las parvadas de pollos comerciales, no se puede excluir la posibilidad de que el antígeno ELISA del serotipo 1 también detecte los anticuerpos inducidos por el serotipo 2 del VBI (Ashraf *et al.*, 2006), sin embargo, todavía no se ha demostrado que esta reacción cruzada interfiera con los programas de control de la BI basados en ELISA.

3 Se puede obtener un antisuero de referencia adecuado a partir de los Laboratorios de Referencia de la OIE (véase la tabla de la parte 4 de este *Manual Terrestre*).

# C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

## 1. Antecedentes

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se encuentran en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias.* Las directrices que se ofrecen a continuación y en el Capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden complementarse con los requisitos nacionales o regionales.

Las vacunas contra el VBI se han revisado recientemente (Müller *et al.*, 2012). Para el control de la BI existen cuatro tipos principales de vacunas: i) las vacunas vivas atenuadas; ii) las vacunas de inmunocomplejo; iii) las vacunas vivas con vector recombinante que expresan antígenos del VBI; y iv) las vacunas inactivadas con emulsión oleosa como adyuvante.

Hasta la fecha, se han producido vacunas de la BI solo con el serotipo 1 del VBI, aunque en aves de corral se ha detectado virus del serotipo 2. El virus del serotipo 2 no se ha asociado a la enfermedad, pero su presencia estimulará la producción de anticuerpos. Los anticuerpos contra el serotipo 2 no confieren protección contra la infección por el serotipo 1 y no interfieren con la respuesta de la vacuna del tipo 1. Existen numerosas descripciones de las variantes antigénicas del virus del serotipo 1 (Rosenberger y Cloud, 1986). Los estudios de protección cruzada han demostrado que las vacunas inactivadas preparadas a partir del virus del serotipo 1 "clásico" requieren un alto contenido antigénico para proporcionar una protección buena contra alguna de estas variantes. Actualmente, están autorizadas las vacunas de la BI que contienen o bien virus del serotipo 1 de la BI clásica o bien variante. Desde 1986, han emergido cepas VBImv con cambios antigénicos limitados si se las compara con los virus del serotipo 1 "clásico". La inmunización activa con el virus del serotipo 1 "clásico" o con la vacuna proporciona una protección buena contra los VBImv, sin embargo, estos últimos virus son menos susceptibles a la neutralización por los anticuerpos maternos que los virus patogénicos "clásicos" (Van den Berg y Meulemans, 1991).

### 1.1. Vacunas vivas: métodos de utilización

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

Las vacunas suaves e intermedias se utilizan en pollos reproductores para producir una respuesta primaria previa a la vacunación cerca del momento de la puesta empleando la vacuna inactivada. Son susceptibles al efecto de los MDA, por lo que se deben administrar únicamente después de que se haya reducido la cantidad de MDA. La aplicación se realiza mediante una inyección intramuscular, mediante aerosoles o en el agua de bebida, normalmente a las 8 semanas de vida (Skeeles *et al.*, 1979).

Se utilizan vacunas intermedias o intermedias plus para desencadenar protección en broilers y aves ponedoras comerciales de reemplazo. También se emplea alguna de estas vacunas en pollos reproductores jóvenes si existe un riesgo alto de infección natural por el virus virulento de la BI. Aunque las vacunas intermedias son susceptibles a la presencia de MDA, en ocasiones se administran al día de vida, en forma de aerosol de gota gruesa, para proteger a cualquier pollo de la parvada que pueda tener niveles muy bajos de MDA o bien no tener. A su vez, esto ayuda a establecer un reservorio del virus de la vacuna en la parvada que permite la transmisión horizontal a otros pollos cuando se reduce la cantidad de MDA. Habitualmente se administran segundas y terceras aplicaciones, en especial cuando existe un riesgo alto de exposición a las formas virulentas de la enfermedad o cuando los polluelos vacunados presentan niveles no uniformes de MDA. El calendario de las aplicaciones adicionales dependerá de los títulos de anticuerpos de las aves reproductoras en el momento de la puesta de los huevos. A modo orientativo, normalmente la segunda dosis se administra a los 10–14 días de edad, momento en el que aproximadamente el 10% de la parvada es susceptible a la BI, y la tercera dosis 7–10 días más tarde. La vía de administración es el aerosol o el agua de bebida. Rara vez se emplea la inyección intramuscular la vía ocular. Si la vacuna se suministra en el agua de bebida. En ocasiones muy infrecuentes, se administra por inyección intramuscular o con una gota ocular. Si la vacuna se administra mediante el agua de bebida, debe usarse agua limpia con un pH neutro e inodora y sin sabor a cloro ni metales. Se puede añadir leche en polvo desnatada a razón de 2 g por litro. Se debe procurar que todas las aves reciban su dosis de vacuna. Con este fin, se debe eliminar todo el agua (cortarla) durante 2–3 horas antes de volver a suministrarla con la vacuna y se debe procurar que no quede agua residual ni en las cañerías ni en los bebederos. Es posible dividir el agua medicamentada en dos partes, suministrando la segunda parte 30 minutos después de la primera.

Las vacunas vivas contra la BI en general se consideran compatibles con otras vacunas para aves. No obstante, es posible que las vacunas contra la BI que causan daños en la bolsa de Fabricio puedan

interferir con la respuesta ante otras vacunas. Solo deben vacunarse aves sanas. Los viales de vacuna se deben conservar a temperaturas comprendidas entre los 2 y los 8°C hasta que sean utilizadas.

### 1.2. Vacunas con inmunocomplejos: formas de utilización

Para crear una vacuna contra la BI a partir de un inmunocomplejo, se mezcla un VBI vacunal infeccioso vivo con anticuerpos específicos contra el VBI. Estas vacunas se pueden administrar en la incubadora mediante inyección in ovo a los 18 días de incubación. Los huevos pasan a la nacedora y el virus vacunal supuestamente se libera cuando los polluelos tienen alrededor de 7-14 días de edad. De esta forma, el problema de los anticuerpos maternos contra la BI se resuelve y los polluelos quedan inmunizados de manera efectiva (Haddad et al., 1997). La vacuna con inmunocomplejo también se puede inyectar por vía subcutánea al día de vida en la nacedora (Ivan et al., 2005).

### 1.3. Vacunas vivas con vector recombinante: formas de utilización

Se han creado vacunas vivas recombinantes en las que se usa un vector vírico (herpesvirus de los pavos) para expresar el antígeno VP2 del VBI en pollos para ser utilizadas *in ovo* o al día de vida y actualmente están autorizadas en muchos países de todo el mundo. Se ha documentado la actividad en presencia de anticuerpos maternos contra el VBI y la compatibilidad con otras vacunas contra la enfermedad de Marek (Le Gros *et al.*, 2009, Lemiere *et al.*, 2011). Los anticuerpos anti-VBI generados por las vacunas contra el VBI recombinante vivo que expresan la proteína VP2 irán dirigidos solo a VP2 (contrariamente a lo que ocurre en el caso de los anticuerpos que se generan contra todas las proteínas del VBI, principalmente VP2 y VP3, tras la inyección de VBI vivo). Mientras que los anticuerpos neutralizantes contra la proteína VP2 se detectarán con facilidad en la prueba de la VN estándar, la detección de una respuesta humoral específica de VP2 con un ELISA puede requerir de kits específicos con una sensibilidad mayor a la habitual. Teniendo en cuenta que las aves tratadas con la vacuna contra recombinante viva el VBI carecen de anticuerpos contra VP3 y que estos sí se hallan en las aves infectadas por el VBI vivo, el uso combinado de ELISA específicos de anticuerpos antiVP2 y de ELISA específicos antiVP3 permitiría implementar una estrategia DIVA (detección de infección animales vacunados) en aves vacunadas con estas vacunas recombinantes (Müller *et al.*, 2012).

### 1.4. Vacunas inactivadas: formas de utilización

Las vacunas inactivadas contra la BI se utilizan casi siempre para producir niveles altos, uniformes y de larga duración de anticuerpos en las gallinas reproductoras que previamente han sido tratadas con la vacuna viva o han estado expuestas al virus de campo durante la cría (Müller *et al.*, 2012). El programa habitual de administración de la vacuna viva comienza aproximadamente a las 8 semanas de vida. Esta primera administración va seguida de la vacuna inactivada a las 16–20 semanas de edad. En ocasiones, se pueden usar vacunas inactivadas en programas en los que se combinan este tipo de vacunas con vacunas vivas en aves jóvenes valiosas con altos niveles de MDA y que han sido criadas en zonas con un considerable riesgo de exposición al VBI virulento. La vacuna inactivada se produce en forma de emulsión de agua en aceite, y tiene que ser inyectada a cada una de las aves. Las vías preferidas son la intramuscular en el músculo de la extremidad, evitando la proximidad de las articulaciones, tendones o los vasos sanguíneos principales o bien la vía subcutánea. Se puede emplear una jeringa multidosis. Todo el equipamiento que se vaya a utilizar debe estar limpio y esterilizarse entre parvadas, y el personal responsable de la vacunación debe pasar un estricto control de higiene entre parvadas. La vacuna se debe conservar a 2–8°C. No se debe congelar ni exponer a luz intensa o a temperaturas altas.

Solamente se deben vacunar las aves sanas que estén sensibilizadas por la exposición previa al VBI. Usándose de esta manera, la vacuna debe inducir tal respuesta de anticuerpos que los pollos eclosionados a partir de estos reproductores presenten protección pasiva contra la BI aproximadamente hasta los 30 días de vida (Wyeth y Cullen, 1979). Esto abarca el periodo de mayor susceptibilidad a la enfermedad y previene el daño bursal en el momento en el que este podría provocar inmunosupresión. Se ha demostrado que el daño bursal que se produce aproximadamente después de los 15 días de vida tiene poco efecto en la inmunocompetencia, ya que en ese momento las células inmunocompetentes han migrado a los tejidos linfoides periféricos. Sin embargo, si existe una amenaza de exposición a la infección con el virus muy virulento de la BI, se deben aplicar las vacunas vivas como se ha descrito anteriormente. El nivel preciso y la duración de la inmunidad conferida con las vacunas inactivadas de la BI dependerán principalmente de la concentración del antígeno presente por dosis. El objetivo de producción debe ser obtener una concentración de antígeno alta y, por tanto, una vacuna muy potente.

Se han descrito vacunas de subunidades, en las cuales el antígeno del VBI inactivado que se usa en la vacuna inactivada se sustituye por una VP2 recombinante que se expresa en el sistema del baculovirus, en *Escherichia coli* o bien en la levadura *Pichia pastoris* (Pitcovski *et al.,* 2003). De forma similar a lo que ocurre con las vacunas inactivadas, también deben inyectarse y dan lugar a una mejor inmunización cuando i) el contenido antigénico es alto y ii) se administran como refuerzo a aves previamente sensibilizadas con una vacuna viva (Müller *et al*., 2012).

## 2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

### 2.1. Características del inóculo

Consúltense también el Capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias* y el Capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario.*

#### 2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

i) Vacunas vivas

Las cepas víricas que se usan en las vacunas vivas contra la BI a veces se denominan "suaves", "intermedias" o "intermedias plus"/"invasivas"/"calientes" en función de su capacidad de replicarse en presencia de cantidades crecientes de anticuerpos maternos residuales contra el VBI. En concordancia con la creciente capacidad de replicación de las cepas vacunales menos atenuadas, estas cepas suelen inducir lesiones bursales vacunales más graves (lesiones microscópicas y de pequeño tamaño) y pueden presentar ciertos niveles de propiedades inmunosupresoras (consúltese el apartado C.2.1.3 *Validación como cepa vacunal*).

ii) Vacunas inactivadas

Se han documentado subtipos del serotipo 1 del VBI, y se ha comprobado que la protección frente a un subtipo determinado mediante una vacuna inactivada requiere o bien un antígeno homólogo o bien un contenido antigénico alto. Así, puede resultar útil la información relativa al subtipo de la cepa que se use como antígeno en la vacuna inactivada.

#### 2.1.2 Criterios de calidad

i) Pureza

Debe comprobarse que el inóculo vírico está libre de virus extraños, bacterias, micoplasmas y hongos, sobre todo patógenos para las aves. Ello incluye la ausencia de contaminación por otras cepas del VBI.

ii) Ausencia de reversión a la virulencia de las vacunas vivas

En el caso de las cepas vacunales que se dice que son atenuadas y que causan poca inmunosupresión, debe comprobarse que el inóculo vírico es estable y que no tiende a revertir a la virulencia. Ello puede confirmarse mediante pases secuenciales por cinco grupos de pollos SPF, a intervalos de 3–4 días empleando una suspensión de bolsa como inóculo, en pollos SPF de la edad mínima recomendada para la vacunación. Debe comprobarse que el virus se ha transmitido: si el virus que se ha sometido a los pases no se halla a un nivel determinado de pases, el pase debe repetirse administrándolo a un grupo de 10 pollos. Se realiza una comparación histológica para demostrar que no hay diferencia entre bolsas de aves inoculadas con material de pases iniciales y bolsas inoculadas con material de pases finales. Existen técnicas para la puntuación y la obtención de imágenes de las bolsas (Muskett *et al.,* 1979).

#### 2.1.3. Validación como cepa vacunal

i) Vacuna viva

La validación de una cepa de VBI como vacuna viva requiere de la evaluación de su inocuidad, su potencial inmunosupresor, su ausencia de potencial para revertir a la virulencia y su inmunogenicidad.

La inocuidad se puede comprobar de varias formas. En algunos países se recomienda vacunar a los pollos SPF de la edad mínima recomendada para la vacunación empleando

una dosis alta (normalmente de diez vez la recomendada) de la vacuna a su nivel mínimo de pases atenuantes, y a continuación comprobar la ausencia de signos y de lesiones bursales habitualmente moderadas y transitorias tras esta vacunación. No se ha documentado la inocuidad de las vacunas contra el VBI en especies no de destino.

El potencial inmunosupresor es una característica importante a evaluar; de hecho, el virus vacunal no debe producir daños en la bolsa de Fabricio como los que causa la inmunosupresión en las aves susceptibles. Las vacunas vivas de tipo "intermedio" o "intermedio plus" pueden autorizarse incluso a pesar de poder causar inmunosupresión. Un posible protocolo para la evaluación experimental de la inmunosupresión es el siguiente: se administra vacuna contra la BI por inyección o gota ocular, a razón de una dosis de campo por ave, a un total de 10 pollos SPF, de un día de edad. Se utilizan dos grupos más de 10 aves cada uno y de la misma edad y procedencia a modo de controles. A las 2 semanas de edad, todas las aves, tanto del grupo vacunado contra el VBI como del grupo control, reciben una dosis de campo de vacuna viva contra la enfermedad de Newcastle (EN) por gota ocular. Como alternativa, la vacuna contra el VBI se puede administrar a la edad mínima recomendada para la vacunación, y la vacuna contra la EN en el momento en el que las lesiones bursales inducidas por la vacuna contra el VBI sean máximas. La respuesta de inhibición de la hemaglutinación (HI) de cada ave frente a la vacuna contra la EN se mide 2 semanas después de la administración de la vacuna contra la EN, y la protección se mide tras un desafío con $10^{5,0}$ a $10^{6,5}$ $DLE_{50}$ (dosis letales en el 50% de los embriones expuestos) de cepa Herts 33/56 (o similar) del virus de la EN (VEN) (el segundo grupo control, que se ha mantenido sin vacunación contra el VBI y sin vacunación contra el VEN, se usa en esta fase para validar la gravedad del desafío con el VEN). La vacuna contra la BI no superará la prueba si la HI y la protección conferida por la vacuna contra la EN son significativamente menores en el grupo al que se administrado la vacuna contra la BI que en el grupo control. En los países en los que el VEN es un virus exótico, una alternativa es usar eritrocitos de oveja o antígeno de *Brucella abortus* inactivado como antígeno problema, midiendo la respuesta a partir de la prueba de la hemaglutinación o de la aglutinación en suero, respectivamente. No obstante, el sistema de análisis preferible es otra vacuna viva porque también evalúa la inmunidad celular.

La ausencia de potencial para revertir a la virulencia en la cepa vacunal puede evaluarse como se ha descrito en el apartado C.2.1.2.ii *Ausencia de reversión a la virulencia en vacunas vivas.*

**a) Inmunogenicidad**

Esta vacuna debe administrarse a las aves del mismo modo que se administrará en condiciones de campo. La vacuna viva puede administrarse a aves jóvenes y la respuesta puede medirse mediante pruebas serológicas y por la resistencia al desafío experimental: se administra una dosis vacunal del título mínimo recomendado a un total de 20 pollos SPF de la edad mínima de vacunación. A cada grupo se administra por una de las vías de administración recomendadas. Se dejan 20 pollos del mismo lote como controles no inoculados. Pasados 14 días, se somete a desafío a los pollos mediante una gota ocular que contenga aproximadamente 100 $DIP_{50}$ (dosis infectivas en el 50% de los pollos expuestos) de una cepa virulenta de VBI según recomienda uno de los Laboratorios de Referencia de la OIE para la BI[4]. Los pollos deben observarse a diario durante 10 días. Se registra el número de aves que muere o que presenta signos de BI. Se lleva a cabo un examen histológico de las bolsas de los pollos supervivientes a día 10. La vacuna no superará la prueba a no ser que al menos un 90% de los pollos vacunados sobreviva sin presentar signos clínicos ni lesiones graves en las bolsas de Fabricio al final del periodo de observación. Si hay más de la mitad de los controles que no presenta signos de BI, o si uno o más de los pollos control no presenta lesiones graves de la bolsa de Fabricio, o si mueren aves control o inoculadas por causas no atribuibles a la prueba, la prueba resultará no válida. Las lesiones se consideran graves si al menos un 90% de los folículos presenta una disminución linfocitaria de más del 75%, o si al menos un 51% de los folículos bursales presenta una puntuación histopatológica de 3 o más según la Farmacopea Europea (2014).

ii) Vacuna inactivada

Para validar una vacuna inactivada contra el VBI, se precisa la evaluación de su inocuidad y su inmunogenicidad.

4 Véase la tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre*.

Debe comprobarse la inocuidad de la vacuna inactivada para cada vía de administración recomendada y con un lote de vacuna cuya actividad sea al menos la máxima actividad de los futuros lotes comerciales. Se administra una dosis unitaria o doble de la vacuna a pollos SAN o SPF para asegurar la actividad máxima. En los pollos vacunados se comprueba a diario y durante 14 días si presentan signos clínicos. La vacuna supera la prueba si no se observan signos y si ninguna muerte puede atribuirse a la vacuna. La prueba resulta no válida si aparecen muertes inespecíficas.

La eficacia de las vacunas inactivadas contra la BI debe evaluarse en aves de edad avanzada que sigan poniendo, empleando un programa de vacunación recomendado, de tal forma que su descendencia pueda someterse a desafío para determinar la resistencia debida a los MDA al principio y al final de la puesta.

Se administra a un mínimo de 20 aves SPF no sensibilizadas una dosis de vacuna a la edad recomendada (cerca del inicio de la puesta) y al menos por una de las vías de administración recomendadas; un procedimiento alternativo y también recomendado es comprobar una dosis de vacuna por las vías recomendadas indicadas en la ficha técnica, empleando 20 aves SPF no sensibilizadas por cada vía. La respuesta humoral se mide a las 4-6 semanas tras la vacunación mediante neutralización en suero con respecto a un antisuero estándar[5].

Se recogen huevos para incubar 5-7 semanas después de la vacunación, y a continuación se expone a 25 pollos descendientes y de 3 semanas de edad a una gota ocular que contenga alrededor de 100 $DIP_{50}$ de una cepa virulenta reconocida del VBI. También se expone a diez pollos control de la misma raza pero descendientes de progenitores no vacunados. La protección se comprueba 3-4 días después del desafío extrayendo la bolsa de Fabricio de cada ave; cada bolsa se somete a un examen histológico o se analiza para comprobar si presenta antígeno de BI mediante la prueba de la precipitina en gel de agar. No pueden presentar signos de infección por BI más de tres de los pollos descendientes de progenitores vacunados, mientras que sí deben estar afectados todos los descendientes de los no vacunados.

Estos procedimientos se pueden repetir hacia el final del ciclo de puesta, cuando las aves vacunadas tienen alrededor de 60 semanas de edad, pero, en esta ocasión, la descendencia debe desafiarse cuando tenga 15 días de vida.

Si la vacuna inactivada va destinada a la revacunación tras una vacunación previa inicial, la prueba de eficacia debe repetirse en aves sensibilizadas vacunadas según el programa recomendado. La dosis final de vacuna muerta se administra a la edad mínima recomendada. Se analizan pollos nacidos de huevos fértiles recogidos al principio y al final de la puesta para comprobar la protección contra el desafío, como se ha descrito arriba.

## 2.2. Métodos de fabricación

### 2.2.1. Procedimiento

El virus del inóculo puede propagarse en distintos sistemas de cultivo, como fibroblastos de embrión de pollo SPF, o embriones de pollo. En algunos casos, puede optarse por la propagación en bolsa de Fabricio. El producto sin envasar se distribuye en alícuotas y se liofiliza en recipientes sellados. Se ha defendido que las vacunas de origen bursal son mejores inmunógenos que las de cultivo tisular. En estudios controlados, se ha llegado a la conclusión de que ambos tipos de virus, una vez incluidos en una masa antigénica similar en vacunas inactivadas, desencadenan respuestas inmunitarias similares; por lo tanto, sería deseable la estandarización de la masa antigénica de las vacunas inactivadas (Maas *et al.*, 2004).

La vacuna debe fabricarse en instalaciones adecuadas, limpias y seguras, bien separadas de las instalaciones de diagnóstico y de aves de corral comerciales.

La producción de la vacuna debe realizarse a partir de un sistema de lotes de siembra en el que se emplee una cepa adecuada de virus de origen e historial de pases conocidos. Las vacunas vivas se preparan por cultivo en huevos o cultivos celulares. Las vacunas inactivadas contra la BI pueden fabricarse empleando virus virulento cultivado en las bolsas de aves

5 Véase la nota 2 a pie de página.

jóvenes, o empleando cepas atenuadas, adaptadas al laboratorio, del VBI cultivadas en cultivo celular o huevos embrionados. Se precisa una concentración vírica alta. Las vacunas inactivadas se pueden preparar como distintos tipos de emulsiones. Una formulación clásica agua-en-aceite consiste en usar un 80% de aceite mineral y un 20% de suspensión de material bursal en agua, con agentes emulsificantes adecuados, aunque también existen vacunas preparadas como emulsiones dobles o microemulsiones.

### 2.2.2. Requisitos para los ingredientes

i) Ingredientes de origen animal

En todos los ingredientes de origen animal, incluido el suero y las células, debe comprobarse si hay bacterias, virus, hongos o micoplasmas viables. Los ingredientes de origen animal deben proceder de países con riesgo insignificante de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET).

Siempre que se usen huevos para propagar o analizar vacunas, estos debe ser SPF.

ii) Conservantes

Al envasar vacuna en recipientes multidosis, puede ser necesario utilizar un conservante. Deberá comprobarse la concentración del mismo en el producto final y su eficacia hasta el final del periodo de validez. Deberá utilizarse un conservante adecuado ya establecido para tales fines.

### 2.2.3. Controles durante el proceso

i) Contenido antigénico

Tras haber cultivado el virus a concentraciones altas, debe comprobarse el título del mismo empleando cultivos celulares, embriones o pollos según corresponda a la cepa vírica que se está utilizando. El contenido antigénico necesario para producir lotes satisfactorios de la vacuna se basará en las determinaciones que se realicen en la vacuna problema que haya demostrado ser inocua y efectiva en estudios de laboratorio y de campo.

ii) Inactivación de las vacunas inactivadas

A menudo se realiza con ß-propiolactona o con formalina. Se debe comprobar que, en las condiciones de fabricación de la vacuna, el agente inactivante y el procedimiento de inactivación inactivan el virus vacunal y todo posible contaminante, como por ejemplo bacterias, que puedan proceder de los materiales de partida.

Antes de la inactivación, debe procurarse la obtención de una suspensión homogénea libre de partículas que no puedan ser penetradas por el agente inactivante. Debe llevarse a cabo una prueba de inactivación de la vacuna en cada lote de producto sin envasar y de producto final. Un sistema alternativo consiste en comprobar la inactivación de la recolección final o previa al envasado, pero no de ambas. La prueba escogida debe ser adecuada para el virus vacunal que se use y debe consistir al menos en dos pases en cultivos celulares, embriones o pollos susceptibles, con diez réplicas por pase. No puede haber ningún signo de presencia de virus o cualquier otro microorganismo vivo.

iii) Esterilidad de las vacunas inactivadas

El aceite que se usa en la vacuna debe esterilizarse por calentamiento a 160°C durante 1 hora, o por filtración, y debe demostrarse que el procedimiento es efectivo. Se llevan a cabo pruebas adecuadas para las vacunas con emulsión oleosa en cada lote de vacuna final, como se describe, por ejemplo, en la Farmacopea Europea (2014) o en la parte 113.26 del título 9 del *Código de Reglamentos Federales* (*9-CFR*).

### 2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Identidad

La identidad de una vacuna viva contra la BI puede confirmarse a nivel de lote incubando una dilución adecuada de la vacuna con un antisuero anti-VBI monoespecífico que neutralice el serotipo 1 del VBI, e inoculando a continuación esta mezcla a huevos SAN o SPF susceptible o a cultivos celulares susceptibles. La vacuna neutralizada no puede presentar infectividad alguna.

La identidad de una vacuna inactivada contra la BI puede confirmarse a nivel de lote administrándola a pollos SAN o SPF, y demostrando que la vacuna induce anticuerpos que neutralizan el serotipo 1 del VBI. En algunos casos, esta prueba puede combinarse con la prueba de potencia con el fin de reducir el número de animales que se usan en los experimentos.

ii) Esterilidad y ausencia de agentes extraños

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos por bacterias, hongos, micoplasmas o agentes extraños se describen en el Capítulo 2.3.4 *Requisitos mínimos para la producción y el control de calidad de las vacunas.*

iii) Inocuidad

**a) Pruebas de inocuidad en vacunas vivas**

Se administran diez dosis de campo de la vacuna mediante gota ocular a un total de 15 pollos SPF de la edad mínima recomendada para la vacunación y de no más de 2 semanas. Estos pollos se observan durante 21 días. Si mueren más de dos pollos debido a causas no relacionadas con la vacuna, la prueba debe repetirse. La vacuna no superará la prueba si algún pollo muere o presenta signos de enfermedad debido a la vacuna. Esta prueba se realiza en cada lote de vacuna final, a no ser que los controles realizados en fases previas de la producción complementados con la implementación de unas BPF garanticen la seguridad de todo el proceso. Pueden emplearse otras pruebas, como se describe en las partes 113.212(d)(1) y 113.331(d)(2) del *9-CFR.*

**b) Agentes extraños en vacunas inactivadas**

Se inocula a un total de 21 aves SPF, de 14–18 días de vida, y por las vías recomendadas, la dosis recomendada o el doble de la dosis de campo. Las aves se observan durante 3 semanas. No deben presentar ninguna reacción anómala, ni local ni sistémica. No deben generar anticuerpos contra ningún agente patógeno aviar excepto contra el antígeno vacunal. Esta prueba se lleva a cabo en todos los lotes de vacuna final, a no ser que los controles realizados en fases previas de la producción complementados con la implementación de unas BPF garanticen la seguridad de todo el proceso.

iv) Vacuna viva residual en vacunas inactivadas

El proceso que se describe en el apartado C.2.2.3 *Controles durante el proceso* se puede llevar a cabo en cada lote de producto final.

v) Potencia

**a) Prueba de potencia en vacuna viva**

Debe llevarse a cabo una prueba de potencia (titulación del virus) en huevos o cultivos celulares para cada serie (lote) de vacuna producida.

Además, debe emplearse el método que se describe en el apartado C.2.1.3.i.a *Inmunogenicidad* y deben obtenerse resultados satisfactorios en un lote representativo de todos los lotes preparados a partir del mismo lote de siembra.

**b) Prueba de potencia en vacuna inactivada**

Se vacuna a un total de diez pollos SPF, de unas 4 semanas de edad, con una dosis de vacuna por la vía de administración recomendada. Se alojan diez aves más a modo de control, de la misma procedencia y edad, junto a las vacunadas. La respuesta humoral de cada ave se determina 4-6 semanas después de la vacunación con una VN respecto a un antisuero estándar. El nivel medio de anticuerpos de las aves vacunadas no debe ser significativamente inferior al registrado en la prueba de protección (véase el apartado C.2.1.3.ii.a *Inmunogenicidad*). En las aves control no deben detectarse anticuerpos. Esta prueba debe realizarse en todos los lotes de vacuna final. Como alternativa, puede realizarse una prueba de potencia mediante vacunación y desafío (parte 113.212(d)(2) del *9-CFR*).

## 2.3. Requisitos para la autorización/registro/licencia

### 2.3.1. Proceso de fabricación

Para el registro de la vacuna, deben presentarse a las autoridades responsable todos los datos relevantes relativos a la fabricación de la vacuna y a las pruebas de control de calidad (véase el apartado C.2.1 *Características del inóculo* y el apartado C.2.2 *Métodos de fabricación*). Esta información debe extraerse de tres lotes consecutivos de vacuna de un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

### 2.3.2. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies animales de destino y no de destino

Las vacunas vivas atenuadas contra la BI con la máxima capacidad de replicación y potencial para inducir disminución linfoide en la bolsa suelen autorizarse para su uso en animales con títulos altos de anticuerpos maternos contra el VBI y en explotaciones que se caracterizan por una presión infecciosa alta de virus altamente patógenos. Esta información debe indicarse cuando resulte pertinente en las instrucciones de uso de la vacuna.

Hasta ahora no se ha documentado ninguna interacción entre las vacunas vivas contra la BI y especies aviares no de destino. Toda información relativa a algún efecto negativo en una especie animal no de destino deberá indicarse en las instrucciones de uso.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas y aspectos medioambientales

Antes de otorgar la licencia para el uso de una vacuna viva atenuada contra la BI, es indispensable determinar el potencial de la misma de revertir a la virulencia (véase el apartado C.2.1.2.ii., arriba).

El aspecto medioambiental a tener en cuenta en el proceso de licencia es conocer qué cepas del VBI circulan en la zona en la que se utilizará la vacuna en cuestión, puesto que este dato puede ayudar i) a escoger las vacunas adecuadas para controlar estas cepas y ii) a decidir si está o no justificado introducir una cepa vacunal viva atenuada contra el VBI posiblemente muy distinta de las cepas locales de VBI.

iii) Precauciones (peligros)

En caso de auto-inyección accidental en las manos u otros tejidos, las vacunas en emulsión oleosa causan lesiones graves al personal responsable de la administración. En caso de que tenga lugar tal accidente, la persona deberá acudir a un hospital y llevarse la vacuna para mostrarla a un médico. Todos los frascos y envases de las vacunas deben incluir una clara advertencia de las graves consecuencias que tendrá una auto-inyección. Este tipo de heridas deben tratarse de urgencia como si se tratara de “heridas de pistola lubricante”.

### 2.3.3. Requisitos de eficacia

Las pruebas, modelos de desafío y criterios que se empleen para determinar la eficacia de las vacunas contra la BI se describen en los apartados C.2.1.3.i *Vacuna viva* y C.2.1.3.ii. *Vacuna inactivada*. Al determinar la eficacia en un modelo de desafío con VBI, es aconsejable que el virus de desafío escogido sea representativo de las cepas de VBI contemporáneas que circulen en la zona en la que se utilizará la vacuna en cuestión.

### 2.3.4. Vacunas que permiten una estrategia DIVA

De entre las vacunas actualmente comercializadas, las vacunas vivas con vector recombinante que expresan la proteína VP2 del VBI, y las vacunas de subunidades que contienen la proteína VP2 como único antígeno del VBI, pueden utilizarse en una estrategia DIVA. De hecho, los pollos vacunados con este tipo de vacunas solo generarán anticuerpos anti-VP2, mientras que las aves infectadas por el VBI presentarán una respuesta humoral más amplia dirigida contra todos los antígenos del VBI, incluida la proteína VP3 (ribonucleoproteína del VBI). Por lo tanto, dependiendo de si se hallan solo anticuerpos anti-VP2 o si se hallan anticuerpos anti-VP2 y anti-VP3, teóricamente sería posible diferenciar entre aves que han recibido este tipo de vacunas y aves que han contraído la infección. No obstante, la implementación de la estrategia DIVA requeriría de ELISA que permitieran la detección diferencial de estos dos tipos de anticuerpos. Aunque los ELISA comerciales pueden presentar una sensibilidad diferente a

estos distintos tipos de anticuerpos, en la literatura científica todavía no se ha publicado una validación de las pruebas comerciales para tal fin.

### 2.3.5. Duración de la inmunidad

Como se ha explicado anteriormente (véase el apartado C.2.1.3.ii. *vacuna inactivada*), llevar a cabo dos veces la evaluación de la eficacia de las vacunas inactivadas en aves reproductoras, antes del inicio de la puesta y más adelante, al final del ciclo de puesta, puede ayudar a determinar si es necesario implementar vacunación de refuerzo durante el ciclo para lograr una larga protección de la descendencia.

### 2.3.6. Estabilidad

Deben proporcionarse pruebas de tres lotes de vacuna que indiquen que la vacuna supera la prueba de la potencia del lote durante todo el periodo de validez indicado o, como alternativa, 3 meses después de que termine dicho periodo.

## BIBLIOGRAFÍA

AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN PATHOLOGISTS (2008). Chapter 43. *In:* Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, Fifth Edition. AAAP, University of Pennsylvania, New Bolton Center, Kenneth Square, PA 19348-1692, USA.

ASHRAF S., ABDEL-ALIM G. & SAIF Y.M. (2006). Detection of antibodies against serotypes 1 and 2 infectious bursal disease virus by commercial ELISA kits. *Avian Dis.* ,**50**, 104–109.

BLOCK H., MEYER-BLOCK K., REBESKI D.E., SCHARR H., DE WIT S., ROHN K. & RAUTENSCHLEIN S. (2007). A field study on the significance of vaccination against infectious bursal disease virus (IBDV) at the optimal time point in broiler flocks with maternally derived IBDV antibodies. *Avian Pathol.*, **36**, 401–409.

BROWN M.D., GREEN P. & SKINNER M.A. (1994). VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical strains'. *J. Gen. Virol*., **75**, 675–680.

BOOT H.J., TER HUURNE A.A., HOEKMAN A.J., PEETERS B.P., & GIELKENS A.L. (2000). Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *J. Virol.,* **74**, 6701–6711.

COULIBALY F., CHEVALIER C., GUTSCHE I., POUS J., NAVAZA J. BRESSANELLI S., DELMAS B. & REY F.A. (2005) The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell,* **120**, 761–772.

CULLEN G.A. & WYETH P.J. (1975). Quantitation of antibodies to infectious bursal disease. *Vet. Rec*., **97**, 315.

DE WIT J.J., VAN DE SANDE H.W., COUNOTTE G.H. & WELLENBERG G.J. (2007) Analyses of the results of different test systems in the 2005 global proficiency testing schemes for infectious bursal disease virus and Newcastle disease virus antibody detection in chicken serum. *Avian Pathol.*, **36**, 177–183.

ESCAFFRE O., LE NOUËN C., AMELOT M., AMBROGGIO X., OGDEN K.M., GUIONIE O., TOQUIN D., MÜLLER H., ISLAM M.R. & ETERRADOSSI N. (2013). Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J. Virol.*, **87**, 2767–2780.

ETERRADOSSI N., ARNAULD C., TEKAIA F., TOQUIN D., LE COQ H., RIVALLAN G., GUITTET M., DOMENECH J., VAN DEN BERG T.P. & SKINNER M.A. (1999). Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate. *Avian Pathol*., **28**, 36–46.

ETERRADOSSI N., ARNAULD C., TOQUIN D. & RIVALLAN G. (1998). Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch. Virol*., **143**, 1627–1636.

ETERRADOSSI N. & SAIF Y.M. (2013). Chapter 7: Infectious bursal disease. *In:* Diseases of Poultry, 13th Edition, Editor in chief D.E. Swayne, John Wiley & Sons Inc., Ames, Iowa, USA, pp 219–246.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.2. (2014). European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France. Available online at http://online.edqm.eu/.

HADDAD E.E., WHITFILL C.E., AVAKIAN A.P., RICKS C.A., ANDREWS P.D., THOMA J.A. & WAKENELL P.S. (1997). Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Dis.,* **41**, 882–889.

IVÁN J., VELHNER M., URSU K., GERMAN P., MATÓ T., DRÉN C.N. & MÉSZÁROS J. (2005). Delayed vaccine virus replication in chickens vaccinated subcutaneously with an immune complex infectious bursal disease vaccine: quantification of vaccine virus by real-time polymerase chain reaction. *Can. J. Vet. Res.*, **69**, 135–142.

JACKWOOD D.H. & SAIF Y.M. (1987). Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.,* **31**, 766–770.

JACKWOOD D.J., SOMMER-WAGNER S.E., CROSSLEY B.M., STOUTE S.T., WOOLCOCK P.R. & CHARLTON B.R. (2011). Identification and pathogenicity of a natural reassortant between a very virulent serotype 1 infectious bursal disease virus (IBDV) and a serotype 2 IBDV. *Virology*, **420**, 98–105.

KREIDER D.L., SKEELES J.K., PARSLEY M., NEWBERRY L.A. & STORY J.D. (1991). Variability in a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay system. II Laboratory variability. *Avian Dis.,* **35,** 288–293.

LE GROS F.X., DANCER A., GIACOMINI C., PIZZONI L., BUBLOT M., GRAZIANI M. & PRANDINI F. (2009) Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. *Vaccine*, **27**, 592–596.

LE NOUËN C., RIVALLAN G., TOQUIN D., DARLU P., MORIN Y., BEVEN V., DE BOISSESON C., CAZABAN C., COMTE S., GARDIN Y. & ETERRADOSSI N. (2006). Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment B-reassorted isolate. *J. Gen. Virol.,* **87**, 209–216.

LEMIERE S., WONG S.Y., SAINT-GERAND A.L., GOUTEBROZE S. & LE GROS F.X. (2011). Compatibility of turkey herpesvirus-infectious bursal disease vector vaccine with Marek's disease rispens vaccine injected into day-old pullets. *Avian Dis.,* **55**, 113–118.

LIN Z., KATO A., OTAKI Y., NAKAMURA T., SASMAZ E. & UEDA S. (1993). Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis*., **37**, 315–323.

MAAS R., VENEMA S., KANT A., OEI H. & CLAASSEN I. (2004). Quantification of infectious bursal disease viral proteins 2 and 3 in inactivated vaccines as an indicator of serological response and measure of potency. *Avian Pathol.*, 33 (2), 126–132.

MARQUARDT W.W., JOHNSON R.B., ODENWALD W.F. & SCHLOTTHOBER B.A. (1980). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis*., **24**, 375–385.

MEULEMANS G., ANTOINE O. & HALEN P. (1977). Application de l'immunofluorescence au diagnostic de la Maladie de Gumboro. *OIE Bull.*, **88**, 225–229.

MÜLLER H., MUNDT E., ETERRADOSSI N. & ISLAM M.R. (2012) Review: current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathol.*, **41**, 133–139.

MUNDT E. (1999). Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *J. Gen. Virol.,* **80**, 2067–2076.

MUSKETT J.C., HOPKINS I.G., EDWARDS K.R. & THORNTON D.H. (1979). Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: Efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. *Vet. Rec.*, **104**, 332–334.

PITCOVSKI J., GUTTER B., GALLILI G., GOLDWAY M., PERELMAN B., GROSS G., KRISPEL S., BARBAKOV M. & MICHAEL A. (2003). Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine*, **21**, 4736–4743.

ROSENBERGER J.K. & CLOUD S.S (1986). Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., **189**, 357.

ROSENBERGER J.K., KLOPP S., ECKROADE R.J. & KRAUSS W.C. (1975). The role of the infectious bursal agent and several adenoviruses in the hemorrhagic-aplastic-anaemia syndrome and gangrenous dermatitis. *Avian Dis.,* **19**, 717–729.

SCHNITZLER D., BERNSTEIN F., MÜLLER H. & BECHT H. (1993). The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol*., **74**, 1563–1571.

SKEELES J.K., LUKERT P.D., FLETCHER O.J. & LEONARD J.D. (1979). Immunisation studies with a cell-culture-adapted infectious bursal virus*. Avian Dis*., **23**, 456–465.

SMILEY J.R., SOMMER S.E. & JACKWOOD D.J. (1999). Development of an ssRNA internal control reagent for an infectious bursal disease virus reverse transcription/polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism diagnostic assay. *J. Vet. Diagn. Invest*., **11**, 497–504.

SNYDER D.B., LANA D.P., SAVAGE P.K., YANCEY F.S., MENGEL S.A. & MARQUARDT W.W. (1988). Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: Evidence for a major antigenic shift in recent field isolates. *Avian Dis*., **32**, 535–539.

SNYDER D.B., VAKHARIA V.N. & SAVAGE P.K. (1992). Naturally occurring neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. *Arch. Virol*., **127**, 89–101.

TITLE 9, CODE OF FEDERAL REGULATIONS, PART 113 (AVAILABLE ON LINE).

VAKHARIA V.N., HE J., AHAMED B. & SNYDER D.B. (1994). Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res.,* **31**, 265–273.

VAN DEN BERG T.P., GONZE M., MORALES D. & MEULEMANS G. (1996). Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain. *Avian Pathol*., **25**, 751–768.

VAN DEN BERG T.P. & MEULEMANS G. (1991). Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. *Avian Pathol*., **20**, 409–421.

WEI Y., YU X., ZHENG J., CHU W., XU H., YU X. & YU L. (2008). Reassortant infectious bursal disease virus isolated in China. *Virus Res*., **131**, 279–282.

WU C.C., LIN T.L., ZHANG H.G., DAVIS V.S. & BOYLE J.A. (1992). Molecular detection of infectious bursal disease virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **36**, 221–226.

WU C.C., RUBINELLI P. & LIN T.L. (2007). Molecular detection and differentiation of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, **51**, 515–526.

WYETH P.J. & CULLEN G.A. (1979). The use of an inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccine in commercial broiler parent chickens. *Vet. Rec*., **104**, 188–193.

*
* *

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la bursitis infecciosa (enfermedad de Gumboro) (puede consultarse la página web de la OIE: https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3)
Por favor, póngase en contacto con los Laboratorios de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la bursitis infecciosa (enfermedad de Gumboro).

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2016.