

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 417 019**

(51) Int. Cl.:

**C07K 14/08**

(2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2004 E 04810564 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 1689858**

---

(54) Título: **Procedimiento de caracterización del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa**

(30) Prioridad:

**13.11.2003 US 519571 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.08.2013**

(73) Titular/es:

**UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC. (100.0%)  
ROOM 634, BOYD GRADUATE STUDIES BLDG.  
ATHENS, GEORGIA 30602, US**

(72) Inventor/es:

**BROWN, THOMAS, PAUL**

(74) Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 417 019 T3**

---

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de caracterización del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa.

**5    CAMPO DE LA INVENCIÓN**

[0001] La presente descripción se refiere a la caracterización del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa ("VEBI") para su uso en la identificación y producción de vacunas. Se genera y se secuencia un ADNc del VEBI, por ejemplo, de una muestra de tejido de un ave que se sospecha que está infectada con el VEBI, el VEBI secuenciado se alinea con otras secuencias del VEBI, y se determina la relación de las secuencias VEBI alineadas. Los procedimientos permiten una selección rápida de una cepa de vacuna específica con una secuencia del VEBI más relacionada con el VEBI en la muestra que da la mayor protección contra esa cepa de virus sin aislamiento del virus, estudios de neutralización cruzada, o importación del virus vivo. Como alternativa, si la secuencia del VEBI de la muestra no se corresponde estrechamente a una secuencia del VEBI conocida, la descripción proporciona la identificación de una cepa novedosa del VEBI.

[0002] Las cepas del VEBI novedosas identificadas por la presente descripción son útiles para la preparación de composiciones inmunogénicas y vacunas contra enfermedades causadas por los virus. Dichas cepas del VEBI novedosas también pueden usarse para proporcionar composiciones inmunogénicas y vacunas atenuadas, inactivas y sub-unitarias.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

[0003] La enfermedad de la bursitis infecciosa (EBI), también denominada enfermedad de Gumboro, es una infección viral altamente contagiosa, aguda, en pollos que tiene el tejido linfoide como su objetivo principal, con un tropismo selectivo para células de la bolsa de Fabricio. La tasa de morbilidad en bandadas susceptibles es alta, con una rápida pérdida de peso y moderadas tasas de mortalidad. Los pollos que se recuperan de la enfermedad pueden tener deficiencias inmunes debido a la destrucción de la bolsa de Fabricio, que es un componente esencial del sistema inmune del pollo. El VEBI causa inmunosupresión severa en pollos menores de 3 semanas de edad e induce lesiones bursales en pollos de hasta 3 meses de edad.

[0004] Durante muchos años, la enfermedad podría prevenirse induciendo altos niveles de anticuerpos en bandadas reproductoras, mediante la aplicación de una vacuna inactiva a pollos que se han cebado con la vacuna del VEBI viva atenuada. Esto ha mantenido las pérdidas económicas causadas por la EBI a un mínimo. Los anticuerpos maternales en pollos obtenidos a partir de reproductores vacunados previene una infección temprana por el VEBI y disminuye los problemas relacionados con la inmunosupresión. Además, las vacunas vivas atenuadas también se han usado con éxito en bandadas de pollos comerciales después de la disminución de los anticuerpos maternales.

[0005] Recientemente, unas cepas muy virulentas del VEBI han causado brotes de la enfermedad con alta mortalidad en Europa. Los programas de vacunación actuales no consiguen proteger a los pollos lo suficiente. Los fracasos de vacunación se debieron principalmente a la incapacidad de las vacunas vivas para infectar a las aves antes de la estimulación con el virus de campo virulento.

[0006] Por lo tanto, existe una necesidad constante de mejorar las vacunas existentes y desarrollar nuevos tipos de vacunas. Para el desarrollo de vacunas vivas, se requieren virus de la EBI en forma atenuada. Convencionalmente, esto puede conseguirse mediante el pase seriado de aislados del campo del VEBI sobre un sustrato apropiado. Para el desarrollo de vacunas del VEBI inactivadas, es necesario un sustrato apropiado para la generación de altas cantidades de masa de antígeno del VEBI resultantes de la propagación de los virus de la EBI sobre el sustrato.

[0007] Se sabe que los VEBI de campo pueden propagarse fácilmente *in vivo* en la bursa de las aves infectadas o en huevos embrionados. Sin embargo, no obstante, se ha indicado la adaptación y propagación exitosa de algunas cepas del VEBI al cultivo celular *in vitro* de origen de embrión de pollo, se reconoce generalmente que la mayoría de las cepas del VEBI aisladas de la bolsa infectada en el campo, en particular las cepas del VEBI denominadas virulentas o muy virulentas, no pueden adaptarse a las células de origen de embrión de pollo, tales como los fibroblastos de embrión de pollo (FEP), o células de otros órganos, tales como el riñón y el hígado (véase, por ejemplo, Brown y col., J Gen Virol 1994 Mar; 75 (Pt 3): 675-80; y Van Loon y col., Proceedings of the International symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anaemia, Rauschholzhausen, Alemania, 179-187, 1994).

[0008] Las desventajas de los sustratos de cultivo *in vivo* son obvias. Dichos procedimientos de cultivo son desfavorables para los animales, se necesita una gran cantidad de animales, llevan mucho tiempo y no pueden realizarse en condiciones estandarizadas y rigurosas. Además, el número limitado de cepas del VEBI que no son

refractarias a la adaptación a los sustratos de cultivo celular *in vitro* tiene la desventaja de que, como un resultado del proceso de pase seriado que conduce a la adaptación de las cepas del VEBI, pueden introducirse mutaciones aleatorias en el genoma del virus de una manera no controlada. Dichas mutaciones pueden influenciar las propiedades del virus diferentes de las asociadas con la adaptación del virus al cultivo celular, por ejemplo, las propiedades relacionadas con la inmunogenicidad del virus. No se desean dichas mutaciones aleatorias adicionales. La adaptación de los VEBI mediante el pase del virus *in vitro* en cultivos celulares de FEP se ha relacionado con la atenuación de la virulencia como se demuestra por la reducción de la capacidad del virus para inducir lesiones en la bursa del ave infectada.

10 [0009] Existe la necesidad de un procedimiento más eficaz para la identificación rápida de una vacuna apropiada para un ave infectada con el VEBI, así como la identificación de cepas novedosas del VEBI, especialmente cepas muy virulentas del VEBI.

15 [0010] La cita o identificación de cualquier documento en esta solicitud no es una admisión de que tal documento esté disponible como la técnica anterior para la presente invención.

### **RESUMEN DE LA INVENCIÓN**

20 [0011] En un aspecto, la presente invención proporciona una secuencia polipeptídica aislada del VEBI que consiste en los residuos aminoacídicos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.

25 [0012] En otro aspecto, la presente invención proporciona una secuencia polinucleotídica aislada del VEBI que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5, o una hebra antisentido que es complementaria completamente a la misma.

30 [0013] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica de acuerdo con la presente invención.

35 [0014] La presente invención proporciona en otro aspecto, una preparación que comprende uno o más vectores de expresión de acuerdo con la presente invención.

[0015] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de una secuencia polipeptídica aislada del VEBI de acuerdo con la invención, o una secuencia polinucleotídica aislada del VEBI de acuerdo con la invención, o un vector de expresión de acuerdo con la invención para la preparación de una composición inmunogénica.

40 [0016] La presente invención proporciona, en un aspecto adicional, una secuencia polipeptídica aislada del VEBI de acuerdo con la invención, o una secuencia polinucleotídica aislada del VEBI de acuerdo con la invención, o un vector de expresión de acuerdo con la invención, o una preparación de acuerdo con la invención, para su uso en la inducción de una respuesta inmune al VEBI en un ave.

45 [0017] En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una secuencia polipeptídica aislada del VEBI de acuerdo con la invención, o una secuencia polinucleotídica aislada del VEBI de acuerdo con la invención, o un vector de expresión de acuerdo con la invención, o una preparación de acuerdo con la invención, para la preparación de un medicamento para inducir una respuesta inmune al VEBI en un ave.

50 [0018] La presente invención se basa, en parte, en un procedimiento para caracterizar rápidamente VEBI a partir de una muestra de tejido o celular que se sospecha que está infectada con el VEBI sin aislamiento del virus, estudios de neutralización cruzada, o importación de muestras que contienen el virus vivo de países extranjeros.

55 [0019] La descripción proporciona un procedimiento para caracterizar una cepa del VEBI que comprende: generar y secuenciar un ADNc del VEBI de una muestra que se sospecha que tiene una cepa del VEBI, alinear el VEBI secuenciado con una o más secuencias de VEBI, y comparar la relación de las secuencias de VEBI alineadas, caracterizando así una cepa del VEBI.

60 [0020] La muestra es cualquier muestra que se sospecha que tiene una cepa del VEBI. En una realización ventajosa, la muestra es una muestra de tejido, ventajosamente una muestra de tejido embebida en parafina. La muestra también puede ser una célula que se sospecha de estar infectada con el VEBI. En una realización ventajosa, los ADNc del VEBI se generan al extraer el ARN de la muestra de tejido embebida en parafina y la amplificación con RT-PCR del ADNc del VEBI con cebadores específicos del VEBI. Ventajosamente, los cebadores específicos de VEBI amplifican una porción hipervariable de VEBI, tal como VP1, VP2, VP3, VP4 o VP5.

[0021] En otra realización, las secuencias se comparan con un dendritograma. En una realización ventajosa, las secuencias de VEBI son secuencias de ácido nucleico. En otra realización ventajosa, se deduce una secuencia aminoacídica del ADNc del VEBI y las una o más secuencias del VEBI son secuencias aminoacídicas.

[0022] La descripción también proporciona la identificación de una cepa novedosa de VEBI en la que la secuencia del VEBI no se alinea a cualquiera de una o más de las secuencias de VEBI con homología estrecha. El procedimiento comprende (a) generar un ADNc del VEBI de la cepa del VEBI, (b) alinear el ADNc del VEBI con secuencias de VEBI, (c) comparar la relación de las secuencias de VEBI alineadas, e (d) identificar una cepa novedosa de VEBI si el ADNc del VEBI es menor del 95%, ventajosamente menor de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,9%, más ventajosamente menor de aproximadamente el 99,6% o aproximadamente el 99,8%, homóloga a cualquiera de las secuencias de VEBI conocidas. Es ventajoso que la cepa novedosa de VEBI tenga menos del 50%, menos del 60%, menos del 70%, menos del 75%, menos del 80%, menos del 85%, menos del 90%, menos del 93%, menos del 95%, menos del 97%, menos del 98%, menos del 98,1%, menos del 98,2%, menos del 98,3%, menos del 98,4%, menos del 98,5%, menos del 98,6%, menos del 98,7%, menos del 98,8%, menos del 98,9%, menos del 99%, menos del 99,1%, menos del 99,2%, menos del 99,3%, menos del 99,4%, menos del 99,5%, menos del 99,6%, menos del 99,7%, menos del 99,8%, menos del 99,9%, mucho más ventajosamente menos de aproximadamente el 99,6% o el 99,8%, de homología o identidad con cualquier secuencia del VEBI conocida. La presente descripción proporciona adicionalmente el aislamiento de la cepa novedosa de VEBI.

[0023] La descripción comprende nuevas cepas del VEBI identificadas por los procedimientos descritos en este documento. Ventajosamente, las nuevas cepas del VEBI se identifican por VGIS (Sistema de Identificación Genómico Viral). La invención proporciona cepas del VEBI, ácidos nucleicos, polipéptidos, así como análogos y fragmentos de los mismos, para nuevas secuencias identificadas utilizando VGIS: Secuencia Nº 1631, una nueva cepa similar a vvIBDV; Secuencia Nº 087, una nueva cepa Variante de VEBI y la Secuencia Nº 077, una nueva cepa del VEBI no identificada previamente. La descripción proporciona cepas del VEBI aisladas, polipéptidos aislados (por ejemplo, SEQ ID NO: 2) y polinucleótidos de VEBI aislados (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), o hebras antisentido completamente complementarias a los mismos, de la Secuencia Nº 1631. La descripción proporciona cepas del VEBI aisladas, polipéptidos aislados (por ejemplo, SEQ ID NO: 4) y polinucleótidos de VEBI aislados (por ejemplo, SEQ ID NO: 3), o hebras antisentido completamente complementarias a los mismos, de la Secuencia Nº 087. La descripción proporciona cepas del VEBI aisladas, polipéptidos aislados (por ejemplo, SEQ ID NO: 6) y polinucleótidos de VEBI aislados (por ejemplo, SEQ ID NO: 5), o hebras antisentido completamente complementarias a los mismos, de la Secuencia Nº 077. Los polinucleótidos pueden ser moléculas de ADN o ARN.

[0024] La presente descripción también proporciona la selección de una vacuna para proteger a un ave contra la cepa del VEBI, en la que la vacuna tiene una secuencia del VEBI más estrechamente igualada al ADNc del VEBI. El procedimiento comprende (a) generar un ADNc del VEBI de la cepa del VEBI, (b) alinear el ADNc del VEBI con las secuencias VEBI, (c) comparar la relación de las secuencias de VEBI alineadas, e (d) identificar una vacuna para una cepa del VEBI si el ADNc del VEBI es al menos homólogo al 95%, mucho más ventajosamente de aproximadamente al 98% a aproximadamente al 99,9%, a cualquiera de las secuencias de VEBI conocidas que corresponden a un virus de VEBI conocido. Es ventajoso que la cepa del VEBI tendrá al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 93%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 98,1%, al menos el 98,2%, al menos el 98,3%, al menos el 98,4%, al menos el 98,5%, al menos el 98,6%, al menos el 98,7%, al menos el 98,8%, al menos el 98,9%, al menos el 99%, al menos el 99,1%, al menos el 99,2%, al menos el 99,3%, al menos el 99,4%, al menos el 99,5%, al menos el 99,6%, al menos el 99,7%, al menos el 99,8%, al menos el 99,9%, de homología o identidad con cualquier secuencia del VEBI conocida con el fin de que la vacuna de VEBI conocida correspondiente a la secuencia del VEBI conocida sea eficaz. Es ventajoso que la cepa del VEBI tendrá al menos el 98%, al menos el 98,7%, al menos el 99,3%, al menos el 99,6%, al menos el 99,8%, mucho más ventajosamente al menos aproximadamente el 99,3% o el 99,6%, de homología o identidad con cualquier secuencia del VEBI conocida con el fin de que la vacuna de VEBI conocida sea eficaz.

[0025] La presente descripción también se refiere a un procedimiento asistido por ordenador para caracterizar una cepa del VEBI usando un sistema informático, por ejemplo, un ordenador programado que comprende un procesador, un sistema de almacenamiento de datos, un dispositivo de entrada y un dispositivo de salida, las etapas de: (a) introducir en el ordenador programado a través del dispositivo de entrada, datos que comprenden secuencias de VEBI generadas de una muestra que se sospecha que tiene una cepa del VEBI, generando así un conjunto de datos; (b) comparar, utilizando el procesador, el conjunto de datos con una base de datos informática de las secuencias de VEBI almacenadas en el sistema de almacenamiento de datos del ordenador; (c) seleccionar de la base de datos, utilizando procedimientos informáticos, secuencias del VEBI almacenadas en el sistema de almacenamiento de datos del ordenador que tengan una porción que sea aproximadamente el 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,9%, más ventajosamente aproximadamente el 99,3% o aproximadamente el 99,6%, homóloga al conjunto de datos; (d) y transmitir al dispositivo de salida las secuencias de VEBI seleccionadas que tengan una porción que sea al menos de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,9%, mucho más ventajosamente aproximadamente el 99,3% o aproximadamente el 99,6%, homóloga al conjunto de datos, u opcionalmente transmitir al dispositivo de salida indicando la ausencia de secuencias de VEBI que tengan una porción que sea al menos de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,9%, mucho más ventajosamente aproximadamente el 99,3% o aproximadamente el 99,6%, homóloga al conjunto de datos si no hay secuencias del VEBI que tengan una porción que sea al menos de aproximadamente el 98% a aproximadamente el

99,9%, más ventajosamente aproximadamente el 99,3% o aproximadamente el 99,6%, homóloga al conjunto de datos, caracterizando así una cepa del VEBI.

**[0026]** En una realización, la muestra es una muestra de tejido embebida en parafina. En una realización ventajosa, las secuencias de VEBI corresponden a una o más porciones hipervariables de VEBI, tales como VP1, VP2, VP3, VP4 o VP5. Las secuencias de VEBI en el sistema de almacenamiento son secuencias de ácido nucleico o secuencias aminoacídicas. En otra realización, se deduce un conjunto de datos de secuencias aminoacídicas si las secuencias de entrada son secuencias nucleotídicas.

**[0027]** La presente descripción también proporciona un procedimiento para transmitir datos que comprende la transmisión de información de dichos procedimientos analizados en este documento, o etapas de los mismos, por ejemplo, a través de telecomunicaciones, teléfono, videoconferencia, comunicación en masa, por ejemplo, una presentación, tal como una presentación informática (por ejemplo POWERPOINT), Internet, correo electrónico, comunicación documental, tal como un documento de un programa informático (por ejemplo WORD) y similares.

**[0028]** La descripción se refiere a un sistema computadora y un medio legible por ordenador para caracterizar una cepa del VEBI, conteniendo el sistema: secuencias nucleotídicas de VEBI de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1, o secuencias aminoacídicas del VEBI de la Tabla 3, o secuencias aminoacídicas del VEBI derivadas de las secuencias nucleotídicas de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1. Conteniendo un medio legible por ordenador: secuencias nucleotídicas del VEBI de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1, o secuencias aminoacídicas del VEBI de la Tabla 3, o secuencias aminoacídicas del VEBI derivadas de las secuencias nucleotídicas de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1. La descripción también se refiere a un procedimiento para hacer negocios que comprende proporcionar a un usuario el sistema informático descrito en este documento o el medio descrito en este documento o: las secuencias nucleotídicas del VEBI de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1, o las secuencias aminoacídicas del VEBI de la Tabla 3, o secuencias aminoacídicas del VEBI derivadas de las secuencias nucleotídicas de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1.

**[0029]** La descripción también proporciona el uso de nuevas cepas del VEBI identificadas por los procedimientos de la invención como vacunas. La descripción también se refiere a procedimientos para obtener un epítopo, un antígeno o un inmunógeno de una cepa novedosa de VEBI que comprende aislar el epítopo, el antígeno o el inmunógeno de una cepa novedosa de VEBI identificada por los procedimientos de la invención. El epítopo, el antígeno o el inmunógeno pueden ser un producto de expresión de una molécula de ácido nucleico que es heteróloga al virus.

**[0030]** La descripción proporciona procedimientos y composiciones para inducir una respuesta inmune y/o inducir una respuesta inmunológica o protectora que comprende administrar el VEBI novedoso, o un epítopo, un antígeno o un inmunógeno del mismo, en una cantidad eficaz para inducir la respuesta inmune a un animal, ventajosamente un ave. La descripción también se refiere a la administración de un adyuvante y/o una citocina, incluyendo un citocina que es expresada por el virus. El VEBI puede estar inactivado o atenuado.

**[0031]** La presente descripción se refiere a la caracterización de VEBI que infectan a las aves. El ave puede ser un pollo, pato, ganso, faisán, codorniz o pavo. En otras realizaciones, la descripción también se refiere a la caracterización de birnavirus en animales acuáticos, tales como, pero sin limitación, peces y moluscos.

**[0032]** Se aprecia que en esta divulgación, y particularmente en las reivindicaciones y/o párrafos, los términos, tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares, pueden tener el significado atribuido a este en la ley de patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y aquellos términos, tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado adscrito a estos en la ley de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no mencionados explícitamente, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención.

**[0033]** Estas y otras realizaciones se divultan o son obvias a partir de, e incluidas por, la siguiente Descripción Detallada.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

**[0034]** La siguiente descripción detallada, dada a modo de ejemplo, pero que no pretende limitar la invención únicamente a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse mejor junto con los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra un árbol filogenético de secuencias de ácido nucleico alineadas usando el procedimiento Clustal con una tabla de pesos de residuo ponderados. La secuencia principal (SEQ ID NO: 32) se indica en la parte superior de la alineación.

- La figura 2A muestra una sección histológica (fijada en formalina) de la bolsa normal.
- La figura 2B muestra una sección histológica (fijada en formalina) de la necrosis bursal aguda.
- 5 La figura 3 muestra un gel de agarosa de los resultados de RT-PCR que muestra un segmento amplificado compartido por los VEBI. El carril 1 es la escalera de tamaño, el carril 2 es el control negativo de agua, y los carriles 3 a 5 son muestras individuales que se fijaron en formalina, se embebieron en parafina, se tomaron secciones de tres bloques, se extrajo ARN, el análisis por RT-PCR se completó según el protocolo y productos se realizaron en gel. La banda tiene el tamaño esperado.
- 10 La figura 4A muestra las variaciones de secuencia en un amplicón de VP2 del VEBI de las secuencias de ácido nucleico.
- 15 La figura 4B muestra las variaciones de secuencia en las secuencias aminoacídicas deducidas VP2 del VEBI.
- 20 La figura 4C muestra las variaciones de secuencia de nuevas secuencias identificadas usando el nuevo VGIS (Sistema de Identificación Genómico Viral). Las secuencias nucleotídicas 1631 276 es una nueva cepa similar a vvIBDV, 087 276 es una nueva cepa Variante de VEBI, y 077 276 es una nueva cepa del VEBI no identificada previamente. Las secuencias aminoacídicas 1631 91 es una nueva cepa similar a vvIBDV, 087 91 es una nueva cepa Variante de VEBI, y 077 91 es una nueva cepa del VEBI no identificada previamente. Secuencias anotadas de Genebank para comparación: # AY321527 es una secuencia de vvIBDV, #Y14955 es otra secuencia de vvIBDV, #Z25482 es una tercera secuencia de vvIBDV, #000499 es una Cepa de Estimulación Estándar de USDA de VEBI (STC), #X54858 es una cepa de Variante E de VEBI, #M64285 es una cepa de Variante A de VEBI.
- 25 La figura 5 muestra un diagrama de flujo que ilustra el resumen general de la entrada, una etapa intermedia y la salida.
- 30 La figura 6 muestra fotomicrografías de proventrículos de un pollo de engorde normal (A y C), y de un pollo de engorde con proventriculitis de origen natural (B y D). H&E, 25x y 40x.
- 35 La figura 7 muestra fotomicrografías de bolsas de pollos de engorde, control y estimulados con el VEBI (cepa STC). (A) Tinción del antígeno de VEBI mediante IHQ, control negativo. (B) Tinción del antígeno de VEBI mediante IHQ, estimulado. (C) Tinción de apoptosis mediante el procedimiento TUNEL, control negativo. (D) Tinción de apoptosis mediante el procedimiento TUNEL, estimulado. 100x.
- 40 La figura 8 muestra (A) Proventriculitis en un pollo comercial inoculado con un homogenado proventricular infeccioso en el día de la edad (14 dpi). (B) Comparación entre la pared proventricular de un pollo normal (sección superior) y la pared proventricular de un pollo con proventriculitis (sección inferior), donde la pared se engrosa, con un patrón lobular blanco.
- 45 La figura 9 muestra (A y B) Proventrículos de un pollo normal (superior y a la izquierda) y un pollo con proventriculitis (inferior y a la derecha). El proventrículo está agrandado y el istmo gástrico distendido en la proventriculitis.
- 50 La figura 10 muestra fotomicrografías de proventrículos de un pollo normal (A) y de pollo con proventriculitis (B, C y D). Degeneración y necrosis del epitelio glandular con coalescencia de glándulas e infiltración linfocítica en la mucosa y glándulas (B). Dilatación del seno glandular con separación de células epiteliales de la membrana de basamento (C). Infiltración linfocítica en el intersticio glandular con hiperplasia epitelial ductal (D). H&E, 10 y 25 x.
- 55 La figura 11 muestra fotomicrografías de proventrículos de un pollo normal (A) y de pollos con proventriculitis (B, C y D). Los núcleos de las células epiteliales glandulares afectadas se agrandan y empalidecen con cromatina marginada (B). Epitelio ductal columnar que reemplaza el epitelio glandular secretor (C). Hipertrofia e hiperplasia del epitelio ductal (D). H&E, 40x.
- 60 La figura 12 muestra fotomicrografías de proventrículos de un pollo normal (A) y de pollos con proventriculitis (B, C y D) después de la tinción inmunofluorescente usando como anticuerpo primario sueros convalecientes de pollos inoculados. 25, 40x.
- 65 La figura 13 muestra fotografías de proventrículos de pollos de engorde (14 días de edad): inoculados con solución salina (A y C), o con homogenado proventricular infeccioso (B y D). El incremento en el tamaño del proventrículo y el istmo gástrico y un patrón lobular de color blanco en una mucosa engrosada se puede observar en pollos con proventriculitis inducida.
- 70 La figura 14 muestra fotomicrografías de proventrículos: A, proventrículo normal de pollos inoculados con solución salina (control negativo) (7 dpi). B, proventriculitis en pollos inoculados con homogenado proventricular positivo

(+PV) (7 dpi) con necrosis del epitelio glandular, coalescencia de glándulas e infiltración linfocítica difusa en glándulas y mucosa. C, proventriculitis en pollos inoculados con +PV (14 dpi), reemplazando el epitelio ductal el epitelio glandular. D, proventrículo en pollos SPF inoculados con +PV (21 dpi), con centros germinales pequeños. HE, 10x.

5 La figura 15 muestra fotomicrografías de proventrículos de pollos de engorde inoculados con homogenado proventricular positivo (+PV) (14 dpi). A y B, tratado con el CP y +PV, con reemplazo metaplásico del epitelio glandular proventricular mediante el epitelio ductal con necrosis mínima. C y D, tratados con CS y +PV, con necrosis aguda del epitelio con glándulas coalescentes y formación de centros germinales variables. 10, y 25x.

10 La figura 16 muestra fotomicrografías de proventrículos: A. De pollo inoculado con -PV a los 7 dpi. Infiltración linfocítica en la lámina propia de la mucosa y que rodea el orificio del ducto secretor. B. De pollo inoculado con -PV a los 21 dpi. Están presentes agregaciones de linfocitos pequeños en la glándula proventricular. C. De pollo inoculado con +PV positivo a los 7 dpi. Necrosis severa del epitelio glandular, dilatación del seno con epitelio descamado e infiltración linfocítica de la glándula proventricular. D. y E. De pollo inoculado con +PV a los 14 dpi. Infiltración linfocítica difusa en la glándula proventricular y la lámina propia de la mucosa. Epitelio tubular que reemplaza el epitelio glandular. F. De pollo inoculado con +PV a los 21 dpi. Agregaciones de linfocitos presentes en las glándulas proventriculares. HE, 25x.

15

20 La figura 17 muestra la tinción inmunohistoquímica (IHQ) de linfocitos proventriculares: A. De pollo inoculado con -PV, tinción de linfocitos B en la lámina propia de la mucosa, 7 dpi. B. De pollo inoculado -PV, tinción de linfocitos T CD3+ en la lámina propia de la mucosa, intersticio entre las glándulas proventriculares y la profundidad en las glándulas. 7 dpi. C. De pollo inoculado con +PV, tinción de linfocitos B en la glándula proventricular, 7 dpi. D. De pollo inoculado con +PV, tinción de linfocitos T CD3+ en la glándula proventricular, 7 dpi. E. y G. De pollo inoculado con +PV, tinción de célula B de as agregaciones de linfocitos en la glándula y la mucosa, 14 dpi. F. y H. De pollo inoculado con +PV, tinción de linfocitos T CD3+ en las glándulas y la mucosa, 14 dpi. 25 y 50x.

25

30 La figura 18 muestra tinción inmunohistoquímica (IHQ) de linfocitos proventriculares de pollos inoculados con +PV en 14 dpi. A. y E. Tinción de linfocitos B. B. y F. Tinción de linfocitos T CD3+. C y G. Tinción de linfocitos T CD4+. D. y H. Machado de células CD8+. 50 y 100x.

La figura 19 muestra la tinción inmunohistoquímica (IHQ) de agregaciones de linfocitos proventriculares de pollo inoculados con +PV a los 14 dpi. A. Tinción de linfocitos B. B. Tinción de linfocitos T CD3+. 10x.

### 35 DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0035]** La presente descripción se basa, en parte, en un procedimiento para caracterizar rápidamente el VEBI de una muestra de tejido o de células que se sospecha que está infectada con el VEBI sin aislamiento del virus, estudios de neutralización cruzada, o importación de muestras que contienen virus vivo de países extranjeros. La 40 presente invención se refiere a la caracterización de VEBI que infectan aves. El ave puede ser un pollo, pato, ganso, faisán, codorniz o pavo. En otras realizaciones, la invención también se refiere a la caracterización de birnavirus en animales acuáticos tales como, pero sin limitación, peces y moluscos.

**[0036]** Aunque la realización ventajosa de la presente descripción es la caracterización de VEBI, los 45 procedimientos descritos en este documento pueden aplicarse a otros virus, específicamente virus de aves. Un virus de ave alterno ventajoso al que se le pueden aplicar los procedimientos de la presente descripción es reovirus. Otros virus de aves a los que la presente invención puede aplicarse incluyen, pero sin limitación, arbovirus, astrovirus, adenovirus aviar, circovirus aviar, virus de encefalomielitis aviar, virus de la laringeotraqueitis infecciosa de ave, virus de la gripe aviar, virus de leucosis aviar, poliomavirus aviar, virus avipox, birnavirus, virus pox de canario, virus de la anemia del pollo, coronavirus, virus de la enteritis del pato, virus de la hepatitis del pato, enterovirus, herpesvirus de halcón, flavovirus, virus pox aviar, virus herpes de pavos, virus de la bronquitis infecciosa, virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI), virus de la enfermedad de Newcastle, oncornavirus, ortomixovirus, enfermedad de Pacheco, virus del grupo 2-9 de paramixovirus (PMV 2-9), parvovirus, herpesvirus de pichón, virus pox de pichón, pneumovirus, herpesvirus de psitacina (herpesvirus de Pachecco), virus pox de codornices, reovirus, rotavirus, virus de sarcoma de rous, virus de la gripe porcina, herpesvirus de pavo, virus de rinotraqueitis de pavo, virus vaccinia y virus del Nilo del Oeste (WNV).

**[0037]** La descripción proporciona un procedimiento para caracterizar una cepa del VEBI que comprende: generar y secuenciar un ADNc del VEBI de una muestra que se sospecha que tiene, es decir, que está infectada con, una cepa del VEBI, alinear el VEBI secuenciado con una o más secuencias de VEBI, y comparar la relación de las secuencias de VEBI alineadas, caracterizando así una cepa del VEBI.

**[0038]** En una realización, la muestra es una muestra de tejido embebida en parafina. En una realización ventajosa, los ADNc del VEBI se generan extrayendo ARN de la muestra de tejido embebida en parafina y la

amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR) del VEBI con cebadores específicos de VEBI. Se conocen bien en la técnica procedimientos para extraer el ARN y la amplificación de RT-PCR de un ADNc de una muestra de tejido embebida en parafina (véase, por ejemplo, Brown y col., Vet Pathol. 2003; 40(5): 613 y patentes de Estados Unidos 6.248.535; 6.428.963 y 6.610.610).

5 [0039] Ventajosamente, los cebadores específicos de VEBI amplifican una porción hipervariante de VEBI, tales como VP2, VP3, VP4 o VP5. En una realización en la que se amplifica VP2, los pares de cebadores ventajosos para la amplificación son B5 5': GGTATGTGAGGCTTGGTGAC (SEQ ID NO: 7) y B5 3': TTATCTCGTTGGTGGAAATC (SEQ ID NO: 8) o, como alternativa, B4 5': TCTTGGGTATGTGAGGCTTG (SEQ ID. NO: 9) y B4 3': GGATGTGATTGGCTGGGTTA (SEQ ID NO: 10).

10 [0040] En una realización ventajosa, las secuencias de VEBI son secuencias de ácido nucleico. En otra realización ventajosa, se deduce una secuencia aminoacídica del ADNc del VEBI y la una o más secuencias de VEBI es una secuencia aminoacídica. Los procedimientos para determinar secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos se conocen bien por un experto en la técnica.

15 [0041] Ventajosamente, la secuenciación de ácido nucleico es mediante procedimientos automatizados (revisado por Meldrum, Genome Res. 2000 Sep; 10 (9): 1288-303). Los procedimientos para secuenciar ácidos nucleicos incluyen, pero sin limitación, la secuenciación del ADN fluorescente automatizado (véase, por ejemplo, Watts & MacBeath, Methods Mol Biol. 2001; 167: 153-70 y MacBeath y col., Methods Mol Biol. 2001; 167: 119-52), electroforesis capilar (véase, por ejemplo, Bosserhoff y col., Comb Chem High Throughput Screen. diciembre de 2000; 3 (6): 455-66), chips de secuenciación de ADN (véase, por ejemplo, Jain, Pharmacogenomics. Agosto de 2000; 1(3): 289-307), espectrometría de masas (véase, por ejemplo, Yates, Trends Genet. Enero de 2000; 16(1): 5-8), pirosecuenciación (véase, por ejemplo, Ronaghi, Genome Res. Enero de 2001; 11(1): 3-11), y la electroforesis en gel de capa ultrafina (véase, por ejemplo, Guttman & Ronai, Electrophoresis. Diciembre de 2000; 21 (18): 3952-64). La secuenciación también se puede hacer mediante cualquier compañía comercial. Los ejemplos de dichas compañías incluyen, pero sin limitación, The University of Georgia Molecular Genetics Instrumentation Facility (Athens, Georgia) o SeqWright DNA Technologies Services (Houston, Texas).

20 [0042] Ventajosamente, la secuenciación de aminoácidos es mediante procedimientos automatizados. Los procedimientos para secuenciar aminoácidos incluyen, pero sin limitación, el procedimiento de tiohidantoína alquilada (véase, por ejemplo, Dupont y col., EXS. 2000; 88: 119-31), secuenciación de proteína química (véase, por ejemplo, Stolowitz, Curr Opin Biotechnol. Febrero de 1993; 4(1): 9-13), degradación de Edman (véase, por ejemplo, Prabhakaran y col., J Pept Res. Julio de 2000; 56 (1) :12-23), y espectrometría de masas (véase, por ejemplo, McDonald y col., Dis Markers. 2002; 18(2): 99-105). Como alternativa, las secuencias aminoacídicas pueden deducirse a partir de secuencias de ácidos nucleicos. Tales procedimientos se conocen bien en la técnica, por ejemplo, EditSeq de DNASTAR, Inc.

25 [0043] La invención proporciona la comparación de secuencias de VEBI. Ventajosamente, el VEBI secuenciado se compara con una biblioteca de secuencias de VEBI conocidas. Tales secuencias de VEBI conocidas incluyen, pero sin limitación, las secuencias de la figura 1 y las secuencias denominadas por los números de acceso en la Tabla 2 (véase el Ejemplo 4, a continuación).

30 [0044] Como alternativa, el VEBI puede aislarse de un ave infectada con el virus (véase, por ejemplo, Zorman-Rojs y col., Avian Dis Enero-Marzo de 2003; 47 (1): 186-92, Phong y col., Avian Dis Enero-Marzo de 2003; 47(1): 154-62 y Banda y col., Avian Dis Enero-Marzo de 2003; 47(1): 87-95) , como alternativa, el VEBI puede adquirirse a partir de una fuente comercial (véase, por ejemplo, Jackwood y Sommer, Virology 5 de diciembre de 2002; 304 (1): 105-13), o pueden utilizarse formas recombinantes (tipo natural y mutante) del VEBI (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 6.492.148, y Martínez-Torrecuadrada y col., Vaccine 16 de mayo de 2003; 21(17-18): 1952-1960). Las secuencias de estos VEBI pueden determinarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, si no están disponibles fácilmente. El término VEBI también comprende todas las cepas del VEBI, tales como, pero sin limitación, a la Vacuna de la Enfermedad Bursal, la cepa Lukert, el virus vivo, que es obtenido de Vineland Laboratorios (Vineland, N.J.) o Salsbury Laboratories (Charles City, Iowa), el Virus de Estimulación Virulenta de Enfermedad Bursal, que se obtiene del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en Ames, Iowa (aislado original de S. A. Edgar), y la cepa VR2161 del Virus de la Enfermedad de la Bursitis Infecciosa, divulgada en la patente de Estados Unidos Nº 4.824.668.

35 [0045] En una realización ventajosa, las secuencias se comparan con un dendritograma (véase, por ejemplo, la figura 1 y el ejemplo 3). En una realización ventajosa, se usa el programa MegAlign para alinear secuencias y hacer un árbol: MegAlign (DNASTAR, Inc.) y se usa EditSeq para convertir la secuencia de ácido nucleico en aminoácidos (DNASTAR, Inc.). Varias publicaciones describen el uso de RT-PCR y la secuenciación de ADNc para generar dendogramas para el VEBI virulento, muy virulento y cepas vacunales con el fin caracterizar nuevas cepas (véase, por ejemplo Sun y col., J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health, 2003, 50, 148-154; Parede y col., Avian Pathol. 2003, 32, 511-518; Bais y col., Acta Virol. 2003, 47, 73-77 y Phong y col., Avian Dis. 2003, 47, 154-162).

- [0046] La descripción comprende nuevas cepas del VEBI identificadas por los procedimientos descritos en este documento. Ventajosamente, las nuevas cepas del VEBI se identifican por VGIS (Sistema de Identificación Genómico Viral). La invención proporciona cepas del VEBI, ácidos nucleicos, polipéptidos, así como análogos y fragmentos de los mismos, para nuevas secuencias identificadas utilizando VGIS: Secuencia Nº 1631, una nueva cepa similar a vvIBDV; Secuencia Nº 087, una nueva cepa Variante de VEBI y Secuencia Nº 077, una nueva cepa del VEBI no identificada previamente.
- [0047] La descripción comprende nuevas cepas del VEBI identificadas por los procedimientos descritos en este documento. Ventajosamente, las nuevas cepas del VEBI se identifican por VGIS (Sistema de Identificación Genómico Viral). La descripción proporciona cepas del VEBI, ácidos nucleicos, polipéptidos, así como análogos y fragmentos de los mismos, para las nuevas cepas del VEBI identificadas utilizando VGIS: La descripción proporciona cepas del VEBI aisladas, polipéptidos aislados y polinucleótidos de VEBI aislados o hebras antisentido completamente complementarios a los mismos, de Secuencia Nº 1631, Secuencia Nº 087 y Secuencia Nº 077. Los polinucleótidos pueden ser moléculas de ADN o ARN.
- [0048] Ventajosamente, la invención proporciona una cepa del VEBI aislada, un polipéptido aislado (SEQ ID NO: 2) y un polinucleótido de VEBI aislado o hebras antisentido completamente complementarias a los mismos, de la Secuencia Nº 1631 (SEQ ID NO: 1). En otra realización ventajosa, la invención proporciona una cepa del VEBI aislada, un polipéptido aislado (SEQ ID NO: 4) y un polinucleótido de VEBI aislado, o hebras antisentido completamente complementarias a los mismos, de la Secuencia Nº 087 (SEQ ID NO: 3). En otra realización aún ventajosa, la invención proporciona una cepa del VEBI aislada, un polipéptido aislado (SEQ ID NO: 6) y un polinucleótido de VEBI aislado, o hebras antisentido completamente complementarias a los mismos, Secuencia Nº 077 (SEQ ID NO: 5).
- [0049] Para los fines de la presente invención, se determina la identidad u homología de secuencia comparando las secuencias cuando se alinean para maximizar el solapamiento y la identidad mientras que se minimizan los espacios de secuencia. En particular, la identidad de secuencia se puede determinar utilizando cualquiera de varios algoritmos matemáticos. Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para comparación de dos secuencias, es el algoritmo de Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 1990; 87: 2264-2268, modificado como en Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 1993; 90: 5873-5877.
- [0050] Otro ejemplo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers & Miller, CABIOS 1988; 4: 11-17. Tal algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineación de secuencia GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias aminoacídicas, puede usarse una tabla de residuos de peso PAM120, una sanción de longitud de espacio de 12, y una sanción de espacio de 4. Todavía otro algoritmo útil para identificar regiones de similitud y alineación de secuencia local es el algoritmo FASTA, como se describe en Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 1988; 85: 2444-2448.
- [0051] Ventajoso para su uso de acuerdo con la presente invención es el software WU-BLAST (Washington University BLAST) versión 2.0. Los programas ejecutables de WU-BLAST versión 2.0 para varias plataformas UNIX pueden descargarse de <ftp://blast.wustl.edu/blast/executables>. Este programa está basado en WU-BLAST versión 1.4, que a su vez está basado en NCBI-BLAST versión 1.4 de domino público (Altschul & Gish, 1996, Local alignment statistics, Doolittle ed., Methods in Enzymology 266: 460-480; Altschul y col., Journal of Molecular Biology 1990; 215: 403-410; Gish & States, 1993; Nature Genetics 3: 266-272; Karlin & Altschul, 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 90: 5873-5877).
- [0052] En general, la comparación de secuencias aminoacídicas se realiza alineando una secuencia aminoacídica de un polipéptido de una estructura conocida con la secuencia aminoacídica del polipéptido de estructura no conocida. Después, se comparan los aminoácidos en las secuencias y los grupos de aminoácidos que son homólogos se agrupan conjuntamente. Este procedimiento detecta regiones conservadas de los polipéptidos y tiene en cuenta inserciones y supresiones de aminoácidos. La homología entre secuencias aminoacídicas se puede determinar al utilizar algoritmos disponibles en el mercado (véase también la descripción de la homología anterior). Además de los mencionados de otra manera en este documento, se hace mención también a los programas BLAST, gapped BLAST, BLASTN, BLASTP y PSI-BLAST, proporcionados por el National Center for Biotechnology Information. Estos programas se utilizan ampliamente en la técnica para este propósito y pueden alinear regiones homólogas de dos secuencias aminoacídicas.
- [0053] En todos los programas de búsqueda del paquete de programas, las rutinas de alineación separadas son integrales a la propia búsqueda de la base de datos. La separación puede desactivarse si se desea. La sanción de error (Q) para un espacio de longitud uno es Q = 9 para proteínas y BLASTP y Q = 10 para BLASTN, pero puede cambiarse a cualquier número entero. La sanción por residuo de error para extender un espacio (R) es R = 2 para proteínas y BLASTP, y R = 10 para BLASTN, pero puede cambiarse a cualquier número entero. Puede usarse

cualquier combinación de valores para Q y R con el fin de alinear secuencias para maximizar el solapamiento y la identidad al mismo tiempo que se minimizan los espacios de secuencia. La matriz de comparación de aminoácidos por defecto es BLOSUM62, pero se pueden utilizar otras matrices de comparación de aminoácidos, tales como PAM.

5 [0054] Como alternativa, o adicionalmente, el término "homología" o "identidad", por ejemplo, con respecto a una secuencia de nucleótidos o aminoácidos, puede indicar una medición cuantitativa de homología entre dos secuencias. El porcentaje de homología de secuencia puede calcularse como  $(N_{ref} - N_{dif}) \times 100/N_{ref}$ , donde  $N_{dif}$  es el número total de residuos no idénticos en las dos secuencias cuando se alinean, y donde  $N_{ref}$  es el número de residuos en una de las secuencias. Por lo tanto, la secuencia de ADN AGTCAGTC tendrá una identidad de secuencia del 75% con la secuencia AATCAATC ( $N_{ref} = 8$ ;  $N_{dif} = 2$ ).

10 [0055] Como alternativa, o adicionalmente, "homología" o "identidad" con a secuencias pueden referirse al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos divididos entre el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las dos secuencias donde la alineación de las dos secuencias puede determinarse de acuerdo con el algoritmo de Wilbur y Lipman (Wilbur & Lipman, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos 1983; 80: 726), por ejemplo, utilizando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos, y una sanción de espacio de 4, y el análisis asistido por ordenador y la interpretación de los datos de secuencia que incluye la alineación puede realizarse convenientemente utilizando programas disponibles en el mercado (por ejemplo, Intelligenetics™ Suite, Intelligenetics Inc. CA). Cuando se dice que las secuencias de ARN son similares, o tienen un grado de identidad u homología de secuencia con las secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN se considera igual al uracilo (U) en la secuencia de ARN. Así, las secuencias de ARN están dentro del alcance de la invención y pueden obtenerse de secuencias de ADN, por timidina (T) en la secuencia de ADN que se considera igual al uracilo (U) en las secuencias de ARN.

25 [0056] Y, sin demasiada experimentación, el experto en la técnica puede consultar muchos otros programas o referencias para determinar el porcentaje de homología.

30 [0057] En una realización menos ventajosa, las secuencias de VEBI se comparan mediante el análisis de la curva de punto de fusión (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos Nº 6.495.326). En lugar de comparar las secuencias de VEBI, se determina la temperatura de fusión de la secuencia de ácido nucleico, y los patrones del análisis de la curva de fusión se comparan. En resumen, los productos de PCR se funden, por ejemplo, de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 95 °C en aproximadamente 10 minutos, y la forma de la curva de fusión es una función del contenido de GC, longitud y secuencia. Se ha descrito el uso de RT-PCR y sondas con diferentes temperaturas de fusión ( $T_m$ ) para caracterizar cepas del VEBI (véase, por ejemplo, Jackwood y col., Avian Dis, 2003, 47, 738-744).

35 [0058] La descripción también proporciona la identificación de una cepa novedosa de VEBI donde la secuencia del VEBI no se alinea a ninguna de la una o más secuencias del VEBI con homología estrecha. El procedimiento comprende (a) generar un ADNc del VEBI a partir de la cepa del VEBI, (b) alinear el ADNc del VEBI con secuencia del VEBI, (c) comparar la relación de las secuencias de VEBI alineadas, e (d) identificar una cepa novedosa de VEBI si el ADNc del VEBI es menor del 95%, ventajosamente menor de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,9%, más ventajosamente menor de aproximadamente el 99,6% o aproximadamente el 99,9%, homóloga a cualquiera de las secuencias de VEBI conocidas. Es ventajoso que la cepa novedosa de VEBI tenga menos del 50%, menos del 60%, menos del 70%, menos del 75%, menos del 80%, menos del 85%, menos del 90%, menos del 93%, menos del 95%, menos del 97%, menos del 98%, menos 98,1%, menos 98,2%, menos del 98,3%, menos del 98,4%, menos del 98,5%, menos del 98,6%, menos del 98,7%, menos del 98,8%, menos del 98,9%, menos del 99%, menos del 99,1%, menos del 99,2%, menos del 99,3%, menos del 99,4%, menos del 99,51, menos del 99,6%, menos del 99,7%, menos del 99,8%, menos del 99,9%, mucho más ventajosamente menos de aproximadamente el 99,6% o el 99,8% de homología o identidad con cualquier secuencia del VEBI conocida.

50 [0059] La presente descripción proporciona adicionalmente el aislamiento de la cepa novedosa de VEBI. Los procedimientos para aislar ácidos nucleicos novedosos, tales como virus, se conocen bien por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, protocolos en Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, 1991, John Wiley y Sons, New York; Sambrook y col., Molecular Cloning: A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York). En una realización ventajosa, el ADNc del VEBI generado de la muestra que se sospecha que tiene el VEBI se utiliza como una sonda para clasificar ADNc o bibliotecas genómicas específicas para la muestra (por ejemplo, de un tipo de célula o tejido similar) para aislar un clon de longitud completa correspondiente a la cepa novedosa de VEBI.

60 [0060] La presente descripción también proporciona la selección de una vacuna para proteger un ave contra la cepa del VEBI, donde la vacuna tiene una secuencia del VEBI más estrechamente igualada al ADNc del VEBI. El procedimiento comprende (a) generar un ADNc del VEBI de la cepa del VEBI, (b) alinear el ADNc del VEBI con secuencias de VEBI, (c) comparar la relación de las secuencias de VEBI alineadas, e (d) identificar una vacuna para una cepa del VEBI si el ADNc del VEBI es al menos homólogo al 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98%

a aproximadamente el 99,9% homólogo, o cualquiera de las secuencias de VEBI conocidas que corresponden a un virus de VEBI conocido. Es ventajoso que la cepa del VEBI tendrá al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 93%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 98,1%, al menos el 98,2%, al menos el 98,3%, al menos el 98,4%, al menos el 98,5%, al menos el 98,6%, al menos el 98,7%, al menos el 98,8%, al menos el 98,9%, al menos el 99%, al menos el 99,1%, al menos el 99,2%, al menos el 99,3%, al menos el 99,4%, al menos el 99,5%, al menos el 99,6%, al menos el 99,7%, al menos el 99,8%, al menos el 99,9% de homología o identidad con cualquier secuencia del VEBI conocida con el fin de que la vacuna de VEBI conocida corresponda a la secuencia del VEBI conocida sea eficaz. Es ventajoso que la cepa del VEBI tendrá al menos el 98%, al menos el 98,7%, al menos el 99,3%, al menos el 99,6%, al menos el 99,8%, más ventajosamente al menos el 99,3% o el 99,6%, de homología o identidad con cualquier secuencia del VEBI conocida con el fin de que la vacuna de VEBI conocida sea eficaz.

**[0061]** La vacuna de VEBI conocida puede seleccionarse entre cualquier vacuna de VEBI disponible. La cepa del VEBI tendrá al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 93%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 98,1%, al menos el 98,2%, al menos el 98,3%, al menos el 98,4%, por lo menos

98,5%, al menos el 98,6%, al menos el 98,7%, al menos el 98,8%, al menos el 98,9%, al menos el 99%, al menos el 99,1%, al menos el 99,2%, al menos el 99,3%, al menos el 99,4%, al menos el 99,5%, al menos el 99,6%, al menos el 99,7%, al menos el 99,8%, al menos el 99,9% de homología o identidad con cualquier secuencia del VEBI conocida que se correlaciona con la vacuna de VEBI conocida para ser eficaz. Ventajosamente, la vacuna de VEBI se correlaciona con la secuencia de la cepa del VEBI, donde la secuencia de la cepa del VEBI tendrá al menos el 98%, al menos el 98,7%, al menos el 99,3%, al menos el 99,6%, al menos el 99,8%, más ventajosamente al menos el 99,3% o el 99,6%, de homología o identidad con cualquier secuencia del VEBI conocida que se correlaciona con la vacuna de VEBI conocida para ser eficaz.

**[0062]** Como alternativa, o además del análisis de homología que se ha descrito anteriormente, se selecciona una vacuna de VEBI, en parte, mediante la identificación de residuos aminoacídicos críticos que están involucrados en las funciones virales (por ejemplo, virulencia) que son idénticos en la secuencia del VEBI conocida correspondiente a la vacuna que también están presentes en la cepa del VEBI de interés. Dichos residuos aminoacídicos críticos incluyen, pero sin limitación, 222 (Ala) (véase, por ejemplo, Cao y col., Avian Dis. Abril-Junio de 1998; 42 (2): 340-51, Hoque y col., J Biochem Mol Biol Biophys. Abril de 2002; 6(2): 93-9, Kwon y col., Avian Dis. Julio-Septiembre de 2000; 44(3): 691-6 y Parede y col., Avian Pathol. Octubre de 2003; 32(5): 511-8), 242 (Ile) (véase, por ejemplo, Rudd y col., Arch Virol. Julio de 2002; 147(7): 1303-22), 249 (Lys) (véase, por ejemplo, Cao y col., Avian Dis. Abril-Junio de 1998; 42 (2): 340-51), 253 (Gln) (véase, por ejemplo, Brandt y col., J Virol. Diciembre de 2001; 75(24): 11974-82), 254 (Gly) (véase, por ejemplo, Cao y col., Avian Dis. Abril-Junio de 1998; 42(2): 340-51 y Hoque y col., J Biochem Mol Biol Biophys. Abril de 2002; 6(2): 93-9), 256 (Ile) (véase, por ejemplo, Cao y col., Avian Dis. Abril-Junio de 1998; 42 (2): 340-51, Hoque y col., J Biochem Mol Biol Biophys. Abril de 2002; 6(2): 93-9, Kwon y col., Avian Dis. Julio-Septiembre de 2000; 44(3): 691-6, Parede y col., Avian Pathol. Octubre de 2003; 32(5): 511-8 y Rudd y col., Arch Virol. Julio de 2002; 147 (7): 1303-22), 270 (Ala) (véase, por ejemplo, Hoque y col., J Biochem Mol Biol Biophys. Abril de 2002; 6(2): 93-9), 279 (Asp) (véase, por ejemplo, Brandt y col., J Virol. Diciembre de 2001; 75 (24): 11974-82, Cao y col., Avian Dis. Abril-Junio de 1998; 42 (2): 340-51, Lim y col., J Virol. Abril de 1999; 73 (4): 2854-62 y Yamaguchi y col., Virology. 1 de Septiembre de 1996; 223: 219-23), 284 (Ala) (véase, por ejemplo, Brandt y col., J Virol. Diciembre de 2001; 75 (24): 11974-82, Cao y col., Avian Dis. Abril-Junio de 1998; 42 (2): 340-51, Lim y col., J Virol. Abril de 1999; 73 (4): 2854-62 y Yamaguchi y col., Virology. 1 de septiembre de 1996; 223: 219-23), 294 (Ile) (véase, por ejemplo, Cao y col., Avian Dis. Abril-Junio de 1998; 42(2): 340-51, Hoque y col., J Biochem Mol Biol Biophys. Abril de 2002; 6(2): 93-9, Kwon y col., Avian Dis. Julio-Septiembre de 2000; 44(3): 691-6, Parede y col., Avian Pathol. Octubre de 2003; 32(5): 511-8 y Rudd y col., Aren Virol. Julio de 2002; 147 (7): 1303-22) y 299 (Ser) (véase, por ejemplo, Hoque y col., J Biochem Mol Biol Biophys. Abril de 2002; 6(2): 93-9 y Kwon y col., Avian Dis. Julio-Septiembre de 2000; 44 (3): 691-6). Otros residuos críticos incluyen los nucleótidos y aminoácidos descritos a continuación en el Ejemplo 3. Se entiende que el codón de ácido nucleico correspondiente (excepto para la generación del tercer nucleótido) y la localización en la secuencia de nucleótidos pueden determinarse por un experto en la técnica.

**[0063]** Se entenderá por un experto en la técnica que la identidad u homología de secuencia no está limitada e incluye regiones de la secuencia del VEBI que se comparan. En una realización ventajosa, las secuencias de VEBI corresponden a una o más porciones hipervariables de VEBI, tales como VP1, VP2, VP3, VP4 o VP5. Se entiende por un experto en la técnica que si la secuencia del VEBI corresponde a VP2, entonces la secuencia del VEBI conocida también corresponde a VP2.

**[0064]** Ventajosamente, la vacuna de VEBI se fabrica por Merial, incluyendo, pero sin limitación, la serie Bur-Cell, Bursa Blen™ M, IBD Blen™, S-706 o SVS-510. En otra realización ventajosa, la vacuna del VEBI se correlaciona con cualquiera de las secuencias nucleotídicas del VEBI de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1. En otra realización ventajosa, la vacuna de VEBI es una fórmula de vacuna de polinucleótido de ave (Accesos al Gen Bank

Nº BD009825, BD009826, BD009827, BD009830, BD009832 y BD009833), la vacuna de virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa de amplio espectro (Accesos al Gen Bank Nº BD144646 y BD144647), gen VP2 parcial de virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado Venti (Acceso al Gen Bank Nº AJ586960), gen VP2 parcial de virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado BURSINE Plus (Acceso al

5 Gen Bank Nº AJ586961), gen VP2 parcial de virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado MB (Acceso al Gen Bank Nº AJ586962), gen VP2 parcial de virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado D78 (Acceso al Gen Bank Nº AJ586963), gen VP2 parcial de virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado NVRI-VOM (Acceso al Gen Bank Nº AJ586964), gen VP2 parcial de virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IBA (Acceso al Gen Bank Nº AJ586965), gen VP2  
10 parcial de virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado Nobilis Gumboro 228E (Acceso al Gen Bank Nº AJ586966), gen VP2 parcial de virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado Bursaplex (Acceso al Gen Bank Nº AJ586967), o gen VP2 parcial de virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado V877 (Acceso al Gen Bank Nº AJ586968).

15 [0065] La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento asistido por ordenador para caracterizar una cepa del VEBI usando un sistema informático, por ejemplo un ordenador programado que comprende un procesador, un sistema de almacenamiento de datos, un dispositivo de entrada y un dispositivo de salida, las etapas de: (a) introducir en el ordenador programado a través del dispositivo de entrada, datos que comprenden secuencias del VEBI generadas de una muestra que se sospecha que tiene, es decir, que está infectada, con una cepa del VEBI, generando así un conjunto de datos; (b) comparar, utilizando el procesador, el conjunto de datos con una base de datos informática de las secuencias de VEBI almacenadas en el sistema de almacenamiento de datos del ordenador; (c) seleccionar de la base de datos, utilizando los procedimientos informáticos, las secuencias del VEBI almacenadas en el sistema de almacenamiento de datos del ordenador que tengan una porción que sea aproximadamente el 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,8%, más ventajosamente aproximadamente el 99,3% a aproximadamente el 99,6%, homóloga al conjunto de datos; (d) y transmitir al dispositivo de salida las secuencias de VEBI seleccionadas que tienen una porción que es al menos aproximadamente el 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,8%, más ventajosamente aproximadamente el 99,3% a aproximadamente el 99,6%, homóloga al conjunto de datos, o opcionalmente transmitir al dispositivo de salida indicando la ausencia de secuencias de VEBI que tiene una porción que es al menos aproximadamente el 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,8%, mucho más ventajosamente aproximadamente el 99,3% a aproximadamente el 99,6%, homóloga al conjunto de datos si ninguna de las secuencias del VEBI tiene una porción que es al menos aproximadamente el 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,8%, mucho más ventajosamente aproximadamente el 99,3% a aproximadamente el 99,6%, homóloga al conjunto de datos, caracterizando así una cepa del VEBI.

20 [0066] Los sistemas, tales como sistemas informáticos, se proponen para caracterizar una cepa del VEBI de una muestra que se sospecha que tiene, es decir, que está infectada con, una cepa del VEBI. El sistema puede contener secuencias de VEBI conocidas que incluyen, pero sin limitación, las secuencias de la figura 1 y la secuencia a la que se hace referencia por los números de acceso de la Tabla 2 (véase el Ejemplo 4, a continuación), así como las secuencias aminoacídicas deducidas de las secuencias nucleotídicas y las secuencias nucleotídicas amplificadas por los cebadores referidos por los números de acceso y las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de los mismos. La descripción también implica medios legibles por ordenador con secuencias del VEBI que incluyen, pero sin limitación, las secuencias de la figura 1, y la secuencia referida por los números de acceso en la Tabla 2 (véase el Ejemplo 4, a continuación), así como las secuencias aminoacídicas deducidas de las secuencias nucleotídicas y las secuencias nucleotídicas amplificadas por los cebadores referidos por los números de acceso y las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de los mismos.

25 [0067] En una realización, la muestra es una muestra de tejido embebida en parafina. En una realización ventajosa, los ADNc del VEBI se generan extrayendo ARN de la muestra de tejido embebida en parafina y la amplificación de RT-PCR del ADNc del VEBI con cebadores específicos de VEBI. Los procedimientos para extraer ARN y la amplificación de RT-PCR de un ADNc de una muestra de tejido embebida en parafina se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo Brown y col., Vet Pathol. 2003; 40(5): 613 y las patentes de Estados Unidos Nº 6.248.535; 6.428.963 y 6.610.488).

30 [0068] En una realización ventajosa, las secuencias de VEBI corresponden a una o más porciones hipervariables de VEBI, tales como VP1, VP2, VP3, VP4 o VP5. Las secuencias de VEBI en el sistema de almacenamiento son secuencias de ácido nucleico o secuencias aminoacídicas. Las secuencias del VEBI en el sistema de almacenamiento incluyen, pero sin limitación, las secuencias de la figura 1 y las secuencias referidas por los números de acceso en la Tabla 2 (véase el Ejemplo 4, a continuación), así como las secuencias aminoacídicas deducidas de las secuencias nucleotídicas y las secuencias nucleotídicas amplificadas por los cebadores referidos por los números de acceso, y las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de los mismos. En otra realización, se deduce un conjunto de datos de secuencias aminoacídicas si las secuencias de entrada son secuencias nucleotídicas, por ejemplo, mediante el programa EditSeq de DNASTAR, Inc.

[0069] La descripción también proporciona la identificación de una cepa novedosa de VEBI donde la secuencia del VEBI no se alinea a ninguna de la una o más secuencias de VEBI con homología estrecha. El procedimiento comprende identificar una cepa novedosa de VEBI si ninguna de las secuencias del VEBI tiene una porción que es al menos aproximadamente el 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,8%, mucho más ventajosamente de aproximadamente el 99,3% a aproximadamente el 99,6%, homóloga al conjunto de datos. Es ventajoso que la cepa novedosa de VEBI tenga menos del 50%, menos del 60%, menos del 70%, menos del 75%, menos del 80%, menos del 85%, menos del 90%, menos del 93%, menos del 95%, menos del 97%, menos del 98%, menos del 98,1%, menos del 98,2%, menos del 98,3%, menos del 98,4%, menos del 98,5%, menos del 98,6%, menos del 98,7%, menos del 98,8%, menos del 98,9%, menos del 99%, menos del 99,1%, menos del 99,2%, menos del 99,3%, menos del 99,4%, menos del 99,5%, menos del 99,6%, menos del 99,7%, menos del 99,8%, menos del 99,9%, mucho más ventajosamente menos de aproximadamente el 99,6% o el 99,8%, de homología o identidad con cualquier secuencia de VEBI conocida. Los programas de alineación, tales como, pero sin limitación, ALIGN, FASTA, MegAlign, NCBI-BLAST (por ejemplo, BLAST, gapped BLAST, BLASTN, BLASTP y PSI-BLAST), y WU-BLAST (Washington University BLAST), se pueden utilizar para la caracterización de la secuencia del VEBI en comparación con las secuencias de VEBI conocidas en la base de datos. Dichos programas de alineación se pueden utilizar como algoritmos para calcular la homología o identidad entre la secuencia de VEBI que se caracterizará y las secuencias de VEBI conocidas en la base de datos. Un experto en la técnica podrá adaptar estos algoritmos en programas informáticos con experimentaciones de rutina para los fines de esta descripción. La presente descripción además proporciona el aislamiento de la cepa novedosa de VEBI.

[0070] La presente invención también proporciona la selección de una vacuna para proteger un ave contra la cepa del VEBI, donde la vacuna tiene una secuencia de VEBI que corresponde más estrechamente al ADNc del VEBI. El procedimiento comprende identificar cepas de VEBI con una o más secuencias de VEBI que tengan una porción que sea al menos aproximadamente el 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,8%, mucho más ventajosamente de aproximadamente el 99,3% a aproximadamente el 99,6%, homóloga al conjunto de datos. Es ventajoso que la cepa del VEBI tenga al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 93%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 98,1%, al menos el 98,2%, al menos el 98,3%, al menos el 98,4%, al menos el 98,5%, al menos el 98,6%, al menos el 98,7%, al menos el 98,8%, al menos el 98,9%, al menos el 99%, al menos el 99,1%, al menos el 99,2%, al menos el 99,3%, al menos el 99,4%, al menos el 99,5%, al menos el 99,6%, al menos el 99,7%, al menos el 99,8%, al menos el 99,9% de homología o identidad con cualquier secuencia de VEBI conocida con el fin de que la vacuna de VEBI conocida sea eficaz. Es ventajoso que la cepa del VEBI tenga al menos el 98%, al menos el 98,7%, al menos el 99,3%, al menos el 99,6%, al menos el 99,8%, más ventajosamente al menos el 99,3 o 99,6%, de homología o identidad con cualquier secuencia de VEBI conocida con el fin de que la vacuna VEBI conocida sea eficaz. Los programas de alineación, tales como, pero sin limitación, ALIGN, FASTA, MegAlign, NCBI-BLAST (por ejemplo, BLAST, gapped BLAST, BLASTN, BLASTP y PSI-BLAST) y WU-BLAST (Washington University BLAST), pueden utilizarse para la caracterización de la secuencia de VEBI en comparación a las secuencias de VEBI conocidas en la base de datos. Dichos programas de alineación se pueden utilizar como algoritmos para calcular la homología o identidad entre la secuencia de VEBI que se caracteriza, y las secuencias de VEBI conocidas en la base de datos. Un experto en la técnica podrá adaptar estos algoritmos en programas informáticos con experimentaciones de rutina para los fines de esta descripción.

[0071] La presente invención también proporciona un procedimiento de transmisión de datos que comprende la transmisión de información de tales procedimientos analizados en este documento, o etapas de los mismos, por ejemplo, a través de telecomunicaciones, teléfono, videoconferencia, comunicación en masa, por ejemplo, una presentación, tal como una presentación informática (por ejemplo POWERPOINT), Internet, correo electrónico, comunicación documental, tal como un documento de un programa informático (por ejemplo WORD) y similares.

[0072] La descripción se refiere a un sistema informático y un medio legible por ordenador para caracterizar una cepa del VEBI, conteniendo el sistema: las secuencias nucleotídicas de VEBI de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1, o las secuencias aminoacídicas del VEBI de la tabla 3, o las secuencias aminoacídicas del VEBI derivadas de las secuencias nucleotídicas de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1. Un medio legible por ordenador que contiene: secuencias nucleotídicas de VEBI de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1, o secuencias aminoacídicas del VEBI de la Tabla 3, o secuencias aminoacídicas del VEBI derivadas de las secuencias nucleotídicas de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1. La invención también se refiere a un procedimiento para hacer negocios que comprende proporcionar a un usuario el sistema informático descrito en este documento o el medio descrito en este documento o: las secuencias nucleotídicas de VEBI de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1, o las secuencias aminoacídicas del VEBI de la Tabla 3, o las secuencias aminoacídicas del VEBI derivadas de las secuencias nucleotídicas de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1.

[0073] "Medio legible por ordenador" se refiere a cualquier medio que pueda leerse puede y al que se pueda acceder directamente por un ordenador, e incluye, pero sin limitación: un medio de almacenamiento magnético, tal como discos blandos, medio de almacenamiento duro y cinta magnética; medio de almacenamiento óptico, tal como

discos ópticos o CD-ROM; medio de almacenamiento electrónico, tal como RAM y ROM; e híbridos de estas categorías, tales como los medios magnético/óptico. Proporcionando dichos medios legibles por ordenador, se puede acceder a los datos de secuencia del VEBI de forma rutinaria para caracterizar una secuencia de VEBI aislada de una muestra que se sospecha que tiene, es decir, que está infectada con, VEBI. Los programas de alineación, tales como, pero sin limitación, ALIGN, FASTA, MegAlign, NCBI-BLAST (por ejemplo, BLAST, gapped BLAST, BLASTN, BLASTP y PSI-BLAST) y WU-BLAST (Washington University BLAST), se pueden utilizar para la caracterización de la secuencia de VEBI en comparación con las secuencias del VEBI conocidas en la base de datos. Tales programas de alineación se pueden utilizar como algoritmos para calcular la homología o identidad entre la secuencia de VEBI que se caracteriza, y las secuencias de VEBI conocidas en la base de datos. Un experto en la técnica podrá adaptar estos algoritmos en programas informáticos con experimentaciones de rutina para los fines de esta descripción.

**[0074]** La invención comprende adicionalmente procedimientos para hacer negocio proporcionando acceso a tal medio legible por ordenador y/o sistemas informáticos y/o datos de secuencia a los usuarios; por ejemplo, el medio y/o los datos de secuencia pueden ser accesibles por un usuario, por ejemplo como una suscripción, a través de Internet o una red de comunicación global/red informática; o, el sistema informático puede estar disponible para un usuario, en una base de suscripción.

**[0075]** Un "sistema informático" se refiere al medio de hardware, el medio de software y el medio de almacenamiento de datos utilizados para analizar la secuencia de VEBI de la presente descripción. El medio de hardware mínimo de los sistemas basados en ordenadores de la invención puede comprender una unidad central de procesamiento (CPU), medios de entrada, medios de salida y medios de almacenamiento de datos. De forma deseable, se proporciona un monitor para visualizar los datos de la estructura. El medio de almacenamiento de datos puede ser RAM u otros medio para acceder el medio legible por ordenador de la invención. Ejemplos de tales sistemas son estaciones de trabajo de microordenador disponibles en Silicon Graphics Incorporated y Sun Microsystems que funcionan en sistemas operativos en base Unix, Linux, Windows NT o IBM OS/2.

**[0076]** Por consiguiente, la invención además comprende procedimientos de transmisión de la información obtenida en cualquier procedimiento o etapa del mismo descrito en este documento o cualquier información descrita en este documento, a través de telecomunicaciones, teléfono, comunicaciones en masa, medios en masa, presentaciones, Internet y correo electrónico, etc.

**[0077]** El aparato y el procedimiento para almacenar y/o recuperar una secuencia de datos diana en respuesta a una secuencia de datos de entrada descrita en la patente de Estados Unidos Nº 6.643.653, es ventajoso para la presente descripción. El aparato de la patente de Estados Unidos Nº 6.643.653 requiere una cantidad relativamente pequeña de espacio de almacenamiento y, por lo tanto, proporciona una alta velocidad de funcionamiento (por ejemplo, recuperación de la secuencia diana).

**[0078]** Aplicando el procedimiento y el aparato de la patente de Estados Unidos Nº 6.643.653 de la presente invención, se recibe una secuencia de datos claves (es decir, la secuencia de VEBI que se caracterizará), que puede ser una secuencia nucleotídica, una secuencia aminoacídica o datos de la curva de fusión, y se recupera, si existe, una secuencia de datos diana equivalente, traducida, normalizada u otra relacionada. Una secuencia de datos diana (por ejemplo, una vacuna de VEBI específica) puede identificarse y recuperarse para cualquier número de secuencias de datos dadas diferentes, asumiendo que hay una homología mínima entre las secuencias de VEBI.

**[0079]** En una realización de la descripción, la estructura de datos utilizada para almacenar y recuperar secuencias diana se puede considerar un árbol virtual. De forma ilustrativa, el árbol virtual se inicia en una raíz, cuyo tamaño (por ejemplo, número de células) puede ser equivalente a los posibles valores del primer dato, elemento u otra unidad de la secuencia de datos dada (por ejemplo secuencia de nucleótidos o aminoácidos). El árbol virtual también incluye bloques virtuales de tamaños variables (es decir, que comprende un número variable de nodos), y hojas que también son de tamaños variables y que contienen secuencias de datos diana de longitudes variables. El árbol virtual es atravesado por una secuencia de datos dada o clave localizando en primer lugar una célula de raíz que corresponde a la primera unidad dentro de la secuencia clave. Esa célula identificará (por ejemplo, por medio de la dirección o descentrado de la memoria), el bloque virtual que contiene un nodo correspondiente a la siguiente unidad. Ese nodo también almacenará un descentrado de la memoria o un indicador para el bloque virtual próximo que tiene nodo correspondiente al siguiente elemento, y así sucesivamente. El nodo que corresponde al elemento final de la secuencia clave identifica el nodo de hoja que contiene la secuencia de datos diana.

**[0080]** La descripción también proporciona el uso de nuevas cepas de VEBI identificadas por los procedimientos de la invención como vacunas. Es ventajoso para la nueva cepa del VEBI que sea clonada en un vector de expresión y se exprese en una célula. Como alternativa, la nueva VEBI puede aislarse y cultivarse en un sistema de cultivo celular.

**[0081]** La descripción proporciona cepas del VEBI aisladas, polipéptidos aislados y polinucleótidos de VEBI aislados, o hebras antisentido completamente complementarias a los mismos de Secuencia Nº 1631, Secuencia Nº 087 y Secuencia Nº 077. Los polinucleótidos de la Secuencia Nº 1631, Secuencia Nº 087 y Secuencia Nº 077 (SEQ ID NOS: 1, 3 y 5) pueden clonarse en un vector de expresión y se expresan en una célula. Como alternativa, las 5 cepas del VEBI de la Secuencia Nº 1631, Secuencia Nº 087 y Secuencia Nº 077 pueden aislarse y cultivarse en un sistema de cultivo celular.

**[0082]** Los elementos para la expresión del VEBI novedoso están presentes ventajosamente en un vector de la invención. De forma mínima, comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un codón de iniciación (ATG), un 10 codón de detención y un promotor, y opcionalmente también una secuencia de poliadenilación para ciertos vectores, tales como plasmídicos y ciertos vectores víricos, por ejemplo, vectores víricos distintos de poxvirus. Cuando el polinucleótido codifica un fragmento de poliproteína, por ejemplo VP2, VP3 o VP4 ventajosamente, en el vector, se coloca un ATG en la dirección 5' del marco de lectura y se coloca un codón de detención en la posición 3'. Pueden 15 estar presentes otros elementos para controlar la expresión, tales como secuencias potenciadoras, secuencias estabilizantes y secuencias de señal que permiten la secreción de la proteína.

**[0083]** Los procedimientos para hacer y/o administrar un vector o recombinantes o un plásmido para la expresión de productos génicos de la descripción *in vivo* o *in vitro* puede ser cualquier procedimiento deseado, por ejemplo, un procedimiento que es por, o análogo a los procedimientos divulgados en, o divulgados en los documentos citados 20 en: las patentes de Estados Unidos Nº 4.603.112; 4.769.330; 4.394.448; 4.722.848; 4.745.051; 4.769.331; 4.945.050; 5.494.807; 5.514.375; 5.744.140; 5.744.141; 5.756.103; 5.762.938; 5.766.599; 5.990.091; 5.174.993; 5.505.941; 5.338.683; 5.494.807; 5.591.639; 5.589.466; 5.677.178; 5.591.439; 5.552.143; 5.580.859; 6.130.066; 6.004.777; 6.130.066; 6.497.883; 6.464.984; 6.451.770; 6.391.314; 6.387.376; 6.376.473; 6.368.603; 6.348.196; 25 6.306.400; 6.228.846; 6.221.362; 6.217.883; 6.207.166; 6.207.165; 6.159.477; 6.153.199; 6.090.393; 6.074.649; 6.045.803; 6.033.670; 6.485.729; 6.103.526; 6.224.882; 6.312.682; 6.348.450 y 6.312.683; los documentos WO 20 90/01543; WO 91/11525; WO 94/16716; WO 96/39491; WO 98/33510; EP 265785; EP 0 370 573; Tandreasny y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 1996; 93: 11313-11318; Ballay y col., EMBO J. 1993; 4: 3861-65; Felgner y col., J. Biol. Chem. 1994; 269: 2550-2561; Frolov y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 1996; 93: 11371-25 11377; Graham, Tibtech 1990; 8: 85-87; Grunhaus y col., Sem. Virol. 1992; 3: 237-52; Ju y col., Diabetología 1998; 30 41: 736-739; Kitson y col., J. Virol. 1991; 65: 3068-3075; McClements y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 1996; 93: 11414-11420; Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 1996; 93: 11341-11348; Paoletti, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 1996; 93: 11349-11353; Pennock y col., Mol. Cell. Biol. 1984; 4: 399-406; Richardson 35 (Ed), Methods in Molecular Biology 1995; 39, "Baculovirus Expression Protocols", Humana Press Inc.; Smith y col., (1983) Mol. Cell. Biol. 1983; 3: 2156-2165; Robertson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 1996; 93: 11334-11340; Robinson y col., Sem. Immunol. 1997; 9: 271; y Roizman, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 1996; 93: 11307-11312. Así, el vector en la invención puede ser cualquier virus o vector de virus recombinante adecuado, tal como un poxvirus (por ejemplo, virus vaccinia, virus avipox, virus pox del canario, virus pox aviar, virus pox del mapache, virus pox del cerdo, etc.), adenovirus (por ejemplo, adenovirus canino), herpesvirus, baculovirus, retrovirus, etc.; o el vector puede ser un plásmido. Los documentos citados en este documento, además de 40 proporcionar ejemplos de vectores útiles en la práctica de la descripción, también pueden proporcionar fuentes para proteínas sin VEBI o epítopos de los mismos, por ejemplo, inmunógenos sin VEBI o epítopos de los mismos, citocinas, etc., que se expresarán por el vector o vectores en, o se incluirán en, composiciones inmunogénicas o vacunas multivalentes o de cóctel de la descripción.

**[0084]** La presente descripción también se refiere a preparaciones que comprenden vectores, tales como vectores de expresión, por ejemplo, vacunas o composiciones inmunogénicas. Las preparaciones pueden 45 comprender, consistir esencialmente en, o consistir en uno o más vectores, por ejemplo, vectores de expresión, tales como los vectores de expresión *in vivo*, que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten de (y ventajosamente que expresan) uno o más de los polinucleótidos de VEBI y, ventajosamente, el vector contiene y expresa un polinucleótido que incluye, consiste esencialmente en, o consiste en una región de codificación que codifica VEBI, en un transportador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable. Así, de acuerdo 50 con una realización de la descripción, el otro vector o vectores en la preparación comprenden, consisten esencialmente en, o consiste en un polinucleótido que codifica, y bajo circunstancias apropiadas, el vector expresa una o más proteínas diferentes del VEBI o un epítopo del mismo.

**[0085]** De acuerdo con otra realización, el vector o vectores en la preparación comprenden, o consisten 55 esencialmente en, o consiste en uno o más polinucleótidos que codifican una o más proteínas o epítopo(s) de los mismos de VEBI, por ejemplo, de una o más cepas o aislados de VEBI; y, ventajosamente, en una célula huésped adecuada o en las condiciones apropiadas, el vector o vectores han expresado el o los polinucleótidos. La preparación de la descripción comprende ventajosamente, consiste esencialmente en, o consiste en, al menos dos vectores que comprenden, que consisten esencialmente en, o que consisten en, y ventajosamente que también expresan, preferiblemente *in vivo* en las condiciones apropiadas, o en condiciones adecuadas, o en una célula huésped adecuada, polinucleótidos de diferentes cepas o aislados del VEBI que codifican las mismas proteínas y/o 60 diferentes proteínas, pero preferiblemente las mismas proteínas. En cuanto a las preparaciones que contienen uno o

más vectores que contienen, que consisten esencialmente en, o que consisten en polinucleótidos que codifican, y preferiblemente que expresan, ventajosamente *in vivo*, VEBI, o un epítopo del mismo, se prefiere que los productos de expresión sean de dos, tres o más cepas o aislados diferentes del VEBI, ventajosamente cepas. La descripción también se refiere a mezclas de vectores que contienen, consisten esencialmente en, o que consisten en la codificación de, y expresan, VEBI de diferentes cepas.

**[0086]** De acuerdo con todavía otra realización, y como se mostrará en más detalle en lo sucesivo en este documento, el otro vector o vectores en la preparación comprenden y expresan una o más citocinas y/o uno o más inmunógenos de uno o más de agentes patogénicos diferentes. Las fuentes de citocinas, inmunógenos para otros agentes o epítopo(s) de los mismos, y moléculas de ácidos nucleicos que codifican los mismos, se pueden encontrar en los documentos citados en este documento, así como en los documentos WO 02096349, WO 0208162, WO 0020025, WO 00152888, WO 0145735, WO 00127097, WO 0116330, WO 007721, WO 0077188, WO 0077043, WO 9842743, WO 9833928, WO 9749826, WO 9749825, las patentes de Estados Unidos Nº 6.387.376; 6.306.400; 6.159.477; 6.156.567; 6.153.199; 6.090.393; 6.074. 649; 6.033.670.

**[0087]** De acuerdo con una realización de la invención, los vectores, por ejemplo, vectores de expresión *in vivo*, son vectores virales. Los vectores virales, por ejemplo, los vectores de la expresión viral son ventajosamente: poxvirus, por ejemplo virus vaccinia o un virus de vaccinia atenuado, (por ejemplo, MVA, una cepa Ankara modificada obtenida después de más de 570 pases de la cepa de vacuna Ankara en fibroblastos de embrión de pollo; véase Stickl & Hochstein-Mintzel, Munch. Med. Wschr., 1971, 113, 1149-1153; Sutter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 1992, 89, 10847-10851; disponible como ATCC VR-1508; o NYVAC, véase la patente de Estados Unidos Nº 5.494.807, por ejemplo, los Ejemplos 1 a 6 y posteriores de la patente de Estados Unidos Nº 5.494.807 que analiza la construcción de NYVAC, así como variaciones de NYVAC con ORF adicionales suprimidos del genoma del virus de vaccinia de cepa Copenhague, así como la inserción de moléculas de ácido nucleico codificante heterólogas en sitios de este recombinante, y también, el uso de promotores correspondidos; véase también el documento WO 96/40241), virus avipox o un virus avipox atenuado (por ejemplo, pox del canario, pox aviar, pox de la paloma, pox del pichón, pox de codorniz, ALVAC o TROVAC; véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 5.505.941; 5.494.807), pox del cerdo, pox del mapache, pox del camello, o virus mixomatosis; adenovirus, tales como adenovirus de ave, canino, porcino, bovino, humano; o virus de herpes, tal como el virus de herpes canino (CHV), virus de enfermedad de Marek (VEM serotípos 1 y 2), virus de herpes de pavo (HVT o VEM serotípico 3), o virus de herpes de pato. Cuando se utiliza un virus de herpes, se prefiere el vector HVT para la vacunación de las especies de aves, y el vector EHV para la vacunación de caballos.

**[0088]** De acuerdo con otra realización de la invención, el vector poxvirus, por ejemplo, vector de expresión, es un virus pox del canario o un vector de virus pox aviar, ventajosamente un virus pox del canario atenuado o un virus pox aviar. A este respecto, el pox del canario se vuelve disponible en la ATCC con el número de acceso VR-111. Se describen virus pox del canario atenuados en patente de Estados Unidos Nº 5.756.103 (ALVAC) y el documento WO 01/05934. También están disponibles numerosas cepas de vacunación de virus pox aviar, por ejemplo la cepa de DIFTOSEC CT comercializada por MERIAL, y la vacuna NOBILIS VARIÓLE comercializada por Intervet; y, también se hace referencia a la patente de Estados Unidos Nº 5.766.599, que pertenece a la cepa de pox aviar atenuada TROVAC.

**[0089]** Para obtener información sobre virus pox y cómo generar recombinantes de los mismos y cómo administrar recombinantes de los mismos, el experto puede referirse a los documentos citados en este documento y al documento WO 90/12882, por ejemplo, en cuanto al virus de vaccinia, se hace mención de las patentes de Estados Unidos Nº 4.769.330; 4.722.848; 4.603.112; 5.110.587; 5.494.807 y 5.762.938, entre otras; en cuanto al pox aviar, se hace mención de las patentes de Estados Unidos Nº 5.174.993; 5.505.941 y 5.766.599, entre otras; en cuanto al pox del cerdo, se hace mención de la patente de Estados Unidos Nº 5.756.103, entre otras; en cuanto al pox del pichón, se hace mención de la patente de Estados Unidos Nº 5.382.425, entre otras; y, en cuanto al pox del mapache, se hace mención del documento WO 00/03030, entre otros.

**[0090]** Cuando el vector de expresión es un virus de vaccinia, el sitio o sitios de inserción para el polinucleótido o polinucleótidos que se expresarán están ventajosamente en el gen de timidita cinasa (TK) o el sitio de inserción, el gen hemaglutinina (HA) o el sitio de inserción, la región que codifica el cuerpo de inclusión del tipo A (ATI); véase también los documentos citados en este documento, especialmente los que pertenecen al virus vaccinia. En el caso de pox del canario, ventajosamente el sitio o sitios de inserción son ORF(s) C3, C5 y/o C6; véase también los documentos citados en este documento, especialmente los que pertenecen al virus pox del canario. En el caso de pox aviar, ventajosamente el sitio o sitios de inserción son ORF F7 y/o F8; véase también los documentos citados en este documento, especialmente los que pertenecen al virus pox aviar. El sitio o sitios de inserción para el virus MVA son ventajosamente como en diversas publicaciones, incluyendo Carroll M. W. y col., Vaccine, 1997, 15(4), 387-394; Stittelaar K.J. y col., J. Virol., 2000, 74(9), 4236-4243; Sutter G. y col., 1994, Vaccine, 12(11), 1032-1040; y, a este respecto, también se observa que el genoma de MVA completo se describe en Antoine G., Virology, 1998, 244, 365-396, que permite al experto usar otros sitios de inserción u otros promotores.

**[0091]** Preferiblemente, cuando el vector de expresión es un poxvirus, el polinucleótido que se expresará se inserta bajo el control de un promotor de poxvirus específico, por ejemplo, el promotor de vaccinia de 7,5 kDa (Cochran y col., J. Virology, 1985, 54, 30-35), el promotor de vaccinia I3L (Riviere y col., J. Virology, 1992, 66, 3424-3434), el promotor de vaccinia HA (Shida, Virology, 1986, 150, 457), el promotor pox de vaca ATI (Funahashi y col., J. Gen. Virol., 1988, 69,35-47), el promotor de vaccinia H6 (Taylor J. y col., Vaccine, 1988, 6, 504-508; Guo P. y col., J. Virol., 1989, 63, 4189; Perkus M. y col., J. Virol., 1989, 63, 3829-3836), entre otros.

**[0092]** Preferiblemente, para la vacunación de mamíferos, el vector de expresión es un pox de canario o un pox aviar. De esta manera, puede haber expresión de las proteínas heterólogas con replicación limitada o no productiva. 10 Preferiblemente, para la vacunación de aves, el vector de expresión es un pox de canario o un pox aviar.

**[0093]** Cuando el vector de expresión es un virus herpes de pavos o HVT, el sitio o sitios de inserción ventajosa se localizan en el fragmento BamHII o en el fragmento BamHI M de HVT. El fragmento de restricción de BamHI I de HVT comprende varias estructuras de lectura abierta (ORF) y tres regiones de intergen, y comprende varias zonas 15 inserción preferidas, tales como las tres regiones de intergen 1, 2 y 3, que son regiones preferidas y ORF UL55 (véase por ejemplo, el documento FR-A-2 728 795, patente de Estados Unidos Nº 5.980.906). El fragmento de restricción de BamHI M de HVT comprende ORF UL43, que también es un sitio de inserción preferido (véase, por ejemplo, el documento FR-A-2 728 794, patente de Estados Unidos Nº 5.733.554).

**[0094]** Preferiblemente, cuando el vector de expresión es un virus de herpes, el polinucleótido que se expresará se inserta bajo el control de un promotor eucariótico, tal como un promotor eucariótico fuerte, de preferencia un promotor CMV-IE (murino o humano); es decir, en realizaciones en este documento, el polinucleótido que se expresará está unido de forma operativa a un promotor, y en realizaciones del herpes virus, ventajosamente el polinucleótido que se expresará está unido de forma operativa a un promotor eucariótico fuerte, tal como un promotor mCMV-IE o hCMV-IE. 20

**[0095]** En una realización ventajosa, se utiliza el sistema de expresión del virus Semliki Forest (SFV) para la expresión de VEBI, particularmente como una base para el desarrollo de la vacuna de aves (véase, por ejemplo, Phenix y col., Vaccine, 30 de Abril de 2001; 19 (23-24): 3116-23). 30

**[0096]** De acuerdo con otra realización de la invención, los vectores de expresión son vectores de expresión utilizados para la expresión *in vitro* de proteínas en un sistema de células apropiado. Las proteínas expresadas pueden recolectarse en o a partir del sobrenadante de cultivo después, o no, de la secreción (si no hay secreción típicamente tiene lugar o se realiza una lisis celular), opcionalmente concentrada por procedimientos de concentración, tales como ultrafiltración y/o purificado por medios de purificación, tal como afinidad, intercambio iónico o procedimientos de cromatografía de tipo de filtración en gel. 35

**[0097]** La presente descripción incluye la infección de una célula huésped apropiada con VEBI y proporciona procedimientos para cultivar VEBI en la célula huésped. La célula huésped se pone en contacto con el virus bajo condiciones que dan como resultado una infección viral de la célula huésped, por ejemplo, de acuerdo con una multiplicidad específica de infección (MOI) específica para el VEBI y el tipo de célula. Se conoce bien por un experto en la técnica que la MOI puede, de acuerdo con el virus particular y la célula huésped y que la experimentación rutinaria es necesaria a veces, para determinar la MOI óptima para un virus particular, y en algunos casos, la célula particular que se infecta. Después, las células infectadas se incuban durante un período de tiempo suficiente para permitir la replicación vírica. En una realización, el virus se recolecta del cultivo de células infectadas. En otra realización, el cultivo de células infectadas se congela, por ejemplo, a -70 °C. En todavía otra realización, el procedimiento además implica la medición de la multiplicación viral, por ejemplo, midiendo el efecto citopático (CPE) sobre células o comprando la titulación de los virus en puntos de tiempo variables durante la inoculación. 45

**[0098]** Las células huésped que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero sin limitación, células 293-EBNA, células madre de ave, linfocitos BGM-70, línea celular de linfocitos B de pollo (RP9), células bursales de embrión de pollo, fibroblastos de embrión de pollo (CEF), células de embrión de riñón de pollo, células de macrófago de pollo [MQ-NCSU], células de pulmón de rata de algodón, línea celular HRT-18, células HuTu 80, células linfoblástoides B LSCC-RP12, células de linfoblástoides B LSCC-RP9, células MOP-8, células PANC-1, células de codorniz [QT35] y células Vero. Se entenderá por un experto en la técnica que las condiciones para infectar una célula huésped varían de acuerdo con el virus particular, y que la experimentación de rutina es necesaria a veces 55 para determinar las condiciones óptimas para el cultivo de VEBI dependiendo de la célula huésped.

**[0099]** La expresión de "composición inmunogénica" incluye en este documento cualquier composición capaz de, una vez que se ha administrado a un animal, por ejemplo, un ave, inducir una respuesta inmune contra el virus o antígeno o inmunógeno o epítopo. El término de "vacuna" incluye en este documento cualquier composición capaz, una vez que se ha administrado al animal, por ejemplo, un ave, de inducir una respuesta inmune protectora contra el virus, o para proteger eficazmente al animal contra el virus. 60

**[0100]** En una realización ventajosa, las composiciones o vacunas de la presente invención comprenden las cepas de VEBI novedosas descritas en este documento, es decir, Secuencia Nº 1631, Secuencia Nº 087 y Secuencia Nº 077.

- 5      **[0101]** Las composiciones inmunogénicas o vacunas de acuerdo con la invención pueden incluir el cultivo de virus o la preparación o antígeno o inmunógeno o epítopo del virus, y al menos un inmunógeno, antígeno o epítopo de otro patógeno u otro patógeno (por ejemplo patógeno inactivado o atenuado). Tal inmunógeno, antígeno o epítopo puede ser, por ejemplo, de origen bacteriano, parasítico o vírico, o una forma inactivada o atenuada del patógeno. La descripción también comprende kits para preparar estas composiciones de combinación, así como procedimientos para hacer estas composiciones de combinación y el uso de los componentes de esas composiciones de combinación para preparar las composiciones de combinación. Por consiguiente, la invención implica un kit para preparar las composiciones inmunogénicas o de vacunas de combinación de la descripción; por ejemplo, tal kit comprende (a) un organismo, patógeno o virus o antígeno o epítopo del mismo (ventajosamente un virus como se mencionad en este documento) y (b) un organismo, patógeno o virus o inmunógeno, antígeno o epítopo del mismo (ventajosamente un virus o inmunógeno, antígeno o epítopo del mismo, pero también se contemplan otros patógenos como se menciona en este documento) que es diferente que (a), en contenedores separados, opcionalmente en el mismo paquete, y opcionalmente con instrucciones para la mezcla y/o administración.
- 10     **[0102]** Las composiciones inmunogénicas y/o vacunas de acuerdo con la descripción pueden incluir el cultivo o preparación de VEBI (por ejemplo VEBI inactivado o atenuado, o un inmunógeno o antígeno o epítopo del mismo), y al menos un inmunógeno, antígeno o epítopo de otro patógeno de ave (incluyendo sin limitación el patógeno en forma inactivado o atenuado). Para composiciones inmunogénicas multivalentes y vacunas multivalentes de ave, el patógeno o los patógenos de ave adicionales, en cuanto al antígeno o antígenos de ave adicionales o inmunógenos o epítopos de los mismos se incluyen en y/o se expresan por las composiciones inmunogénicas multivalentes, y vacunas multivalentes, son virus, enfermedades o patógenos del virus de enfermedad de Marek (VEM) (por ejemplo, serotipos 1 y 2, ventajosamente 1), virus de la enfermedad de Newcastle (VEN), paramixovirus diferentes de la enfermedad de Newcastle (PMV2 a PMV7), virus de la bronquitis infecciosa (VBI), virus de la anemia infecciosa o virus de la anemia del pollo (VAP), virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILT), virus de encefalomielitis o virus encefalomielitis aviar (VEA) o virus de leucosis de ave (VLA), virus de la enteritis hemorrágica de pavos (HEV), virus de pneumovirosis (TRTV), virus de la plaga de gallinas (gripe aviar), virus de hidropericarditis de pollo, reovirus de ave, coccidiosis, síndrome de caída del huevo (EDS76), pox aviar, hepatitis de cuerpo de inclusión (adenovirus), enfermedad linfoproliferativa de pavos, reticuloendoteliosis en pollos, reticuloendoteliosis en pavos, rotavirus enteritis, y rinotraqueitis de pavo, *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallinarum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Haemophilus avium*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella multocida gallicida* y mezclas de los mismos. Ventajosamente, para VEM el inmunógeno es ventajosamente gB y/o gD, por ejemplo, gB y gD, para VEN el inmunógeno es ventajosamente HN y/o F, por ejemplo, HN y F; para VEBI el inmunógeno ventajosamente es VP2; para VBI el inmunógeno es ventajosamente S (más ventajosamente S1) y/o M y/o N, por ejemplo, S (o S1) y M y/o N; para VAP el inmunógeno es ventajosamente VP1 y/o VP2; para ILT el inmunógeno es ventajosamente gB y/o gD; para VEA el inmunógeno es ventajosamente env y/o gag/pro, por ejemplo, env y gag/pro o gag/pro; para HEV el inmunógeno es ventajosamente la proteína de 100 K y/o hexón; para TRTV el inmunógeno es ventajosamente F y/o G, y para la plaga de gallinas el inmunógeno es ventajosamente HA y/o N y/o NP, por ejemplo, HA y N y/o NP. Por lo tanto, la invención también implica procedimientos para hacer estas composiciones, así como kits para las mismas.
- 15     **[0103]** Una composición inmunogénica o vacuna de acuerdo con la descripción que también comprende un componente inmunogénico adicional de este tipo (inmunógeno adicional, antígeno o epítopo) tiene la ventaja de que induce una respuesta inmune o protección frente a varias infecciones o enfermedades o agentes causantes de las mismas al mismo tiempo. Este componente inmunogénico adicional puede ser un microorganismo atenuado o inactivado, una construcción recombinante o sub-unidades (por ejemplo, proteínas, glicoproteínas, polipéptidos o epítopos). Los procedimientos de determinación de epítopo, tales como, la generación de bibliotecas de péptidos solapantes (Hemmer y col., Immunology Today, 1998, 19(4), 163-168), Pepscan (Geysen H. M. y col., Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos, 1984, 81(13), 3998-4002; Geysen H. M. y col., Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos, 1985, 82(1), 178-182; Van der Zee R. y col., Eur. J. Immunol., 1989, 19(1), 43-47; Geysen H. M., Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 1990, 21(4), 523-533; Multipin Peptide Synthesis Kits de Chiron) y algoritmos (De Groot A. y col., Nature Biotechnology, 1999, 17, 533-561), pueden usarse en la práctica de la descripción, para determinar epítopos de inmunógenos, antígenos, polipéptidos, glicoproteínas y los similares, sin demasiada experimentación. A partir de esta información, se pueden construir moléculas de ácido nucleico que codifican un epítopo de este tipo, y a partir de ese conocimiento y el conocimiento de la técnica, se pueden construir vectores o construcciones, por ejemplo, virus recombinantes o vectores o plásmidos que expresan inmunógenos, epítopos o antígenos; todos sin demasiada experimentación.
- 20     **[0104]** Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables se conocen bien por un experto en la técnica. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable pueden ser una solución de NaCl al 0,9% (por ejemplo, solución salina) o una solución tamponada con fosfato. El
- 25     **[0105]** Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables se conocen bien por un experto en la técnica. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable pueden ser una solución de NaCl al 0,9% (por ejemplo, solución salina) o una solución tamponada con fosfato. El
- 30     **[0106]** Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables se conocen bien por un experto en la técnica. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable pueden ser una solución de NaCl al 0,9% (por ejemplo, solución salina) o una solución tamponada con fosfato. El
- 35     **[0107]** Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables se conocen bien por un experto en la técnica. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable pueden ser una solución de NaCl al 0,9% (por ejemplo, solución salina) o una solución tamponada con fosfato. El
- 40     **[0108]** Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables se conocen bien por un experto en la técnica. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable pueden ser una solución de NaCl al 0,9% (por ejemplo, solución salina) o una solución tamponada con fosfato. El
- 45     **[0109]** Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables se conocen bien por un experto en la técnica. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable pueden ser una solución de NaCl al 0,9% (por ejemplo, solución salina) o una solución tamponada con fosfato. El
- 50     **[0110]** Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables se conocen bien por un experto en la técnica. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable pueden ser una solución de NaCl al 0,9% (por ejemplo, solución salina) o una solución tamponada con fosfato. El
- 55     **[0111]** Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables se conocen bien por un experto en la técnica. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable pueden ser una solución de NaCl al 0,9% (por ejemplo, solución salina) o una solución tamponada con fosfato. El
- 60     **[0112]** Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables se conocen bien por un experto en la técnica. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable pueden ser una solución de NaCl al 0,9% (por ejemplo, solución salina) o una solución tamponada con fosfato. El

portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser cualquier compuesto o combinación de compuestos que faciliten la administración del vector (o la proteína expresada de un vector de la invención *in vitro*); ventajosamente, el portador, vehículo o excipiente puede facilitar la transfección y/o mejorar la conservación del vector (o proteína). Las dosis y volúmenes de dosis se analizan en este documento en la

5 descripción general de procedimientos de inmunización y vacunación, y también pueden determinarse por el experto en la técnica a partir de esta divulgación leída junto con el conocimiento en la técnica, sin demasiada experimentación.

10 [0105] Las composiciones inmunogénicas y vacunas de acuerdo con la invención preferiblemente comprenden o consisten esencialmente en uno o más adyuvantes. Ventajosamente, el adyuvante utilizado para el VEBI inactivado es emulsión de agua en aceite, basada en aceite de parafina (véase, por ejemplo, Vaccine Design The Subunit and Adjuvant Approach Editado por Powel y Newman Plenum Press NY 1995 página 219, Woodard Bacterial vaccines Editado por Riss 1990 páginas 281-306; y Brugh y col., Am. J. Vet. Res. 1983, 44, 72-75).

15 [0106] Otros adyuvantes adecuados para su uso en la práctica de la presente descripción son (1) polímeros de ácido de acrílico o metacrílico, anhídrido maleico y polímeros derivados de alquenilo, (2) secuencias inmunoestimuladoras (ISS), tales como secuencias de oligodesoxirribonucleótido que tienen una o más unidades CpG no metiladas (Klinman D. M. y col., Proc. Natl. Acad. Sci., Estados Unidos, 1996, 93, 2879-2883; documento WO 98/16247), (3) una emulsión de aceite en agua, tal como la emulsión SPT descrita en la pág. 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" publicada por M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, y la emulsión MF59 descrita en la pág. 183 del mismo trabajo, (4) lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, (5) citocinas, (6) hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio u (7) otros adyuvantes analizados en cualquier documento citado, o (8) cualquier combinación o mezcla de los mismos.

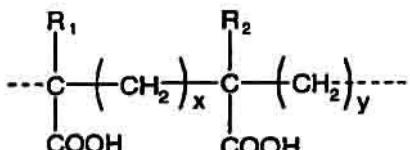
25 [0107] La emulsión de aceite en agua (3), que es especialmente apropiada para vectores virales, puede basarse en: aceite de parafina líquida ligera (tipo de la Farmacopea Europea), aceite isoprenoide, tal como escualano, escualeno, aceite resultante de la oligomerización de alquenos, por ejemplo isobuteno o deceno, ésteres de ácidos o alcoholes que tienen un grupo alquilo de cadena lineal, tales como aceites vegetales, oleato de etilo, propilenglicol, di(caprilato/caprato), glicerol tri(caprilato/caprato) y dioleato de propilenglicol, o ésteres de alcoholes grasos ramificados o ácidos, especialmente ésteres de ácido isosteárico. El aceite se usa en combinación con emulsionantes para formar una emulsión. Los emulsionantes pueden ser tensioactivos no iónicos, tales como: ésteres de, por una parte, sorbitán, manuro (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), glicerol, poliglicerol o propilenglicol y, por otra parte, ácido oleico, isosteárico, ricinoleico o hidroxisteárico, estando dichos ésteres opcionalmente etoxilados, o bloques de copolímero de polioxipropileno-polioxietileno, tales como Pluronic, por ejemplo, L121.

30 [0108] Entre los polímeros adyuvante de tipo (1), se da preferencia a polímeros de ácido de acrílico o metacrílico reticulado, especialmente reticulados por éteres polialquenílicos de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos se conocen con el nombre de carbómero (Pharneuropa, volumen 8, Nº 2, junio de 1996). Un experto en la técnica 35 también puede referirse a la patente de Estados Unidos Nº 2.909.462, que proporciona tales polímeros acrílicos reticulados por un compuesto de polihidroxilo que tiene al menos tres grupos hidroxilo, preferiblemente no más de ocho de tales grupos, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres grupos hidroxilo reemplazados por radicales alifáticos, insaturados que tienen al menos dos átomos de carbono. Los radicales preferidos son los que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados también pueden contener otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos vendidos con el nombre de Carbopol (BF Goodrich, Ohio, Estados Unidos) son especialmente adecuados. Se reticulan por alil sacarosa o por alil pentaeritritol. Entre ellos, se hace referencia a Carbopol 974P, 934P y 971P.

40 [0109] En cuanto a los copolímeros derivados de anhídrido maleico-alquenilo, se da preferencia a EMA (Monsanto), que son copolímeros de etileno-anhídrido maleico de cadena lineal o reticulada, y están, por ejemplo, 45 reticulados por éter divinílico. También se hace referencia a J. Fields y col., Nature 186: 778-780, 4 de junio de 1960.

50 [0110] Con respecto a la estructura, los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y EMA se forman preferiblemente por unidades básicas que tienen la siguiente fórmula:

55



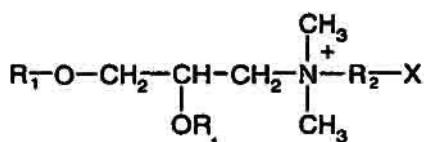
en la que:

- $R_1$  y  $R_2$ , que pueden ser iguales o diferentes, representan H o  $CH_3$
- $x = 0$  ó 1, preferiblemente  $x = 1$
- $y = 1$  ó 2, con  $x + y = 2$ .

5 [0111] Para EMA,  $x = 0$  y  $y = 2$  y para carbómeros  $x = y = 1$ .

[0112] Estos polímeros son solubles en agua o una solución salina fisiológica (20 g/l de NaCl) y el pH se pueden ajustar de 7,3 a 7,4, por ejemplo, mediante soda (NaOH), para proporcionar la solución adyuvante en la que se puede incorporar el o los vectores de expresión. La concentración polimérica en la composición de vacuna final 10 puede variar entre el 0,01 y el 1,5% p/v, ventajosamente del 0,05 al 1% p/v, y preferiblemente del 0,1 al 0,4% p/v.

[0113] Los lípidos catiónicos (4) que contienen una sal de amonio de cuaternario que son ventajosamente, pero no exclusivamente, adecuados para los plásmidos, son preferiblemente aquellos que tienen la siguiente fórmula:



15 en la que  $R_1$  es un radical alifático de cadena lineal, saturado o insaturado que tiene de 12 a 18 átomos de carbono,  $R_2$  es otro radical alifático que contiene de 2 ó 3 átomos de carbono, y X es un grupo amina o hidroxilo.

20 [0114] Entre estos lípidos catiónicos, se da preferencia a DMRIE (N-(2-hidroxietil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1-propano amonio; documento WO 96/34109), preferiblemente asociado con un lípido neutro, preferiblemente DOPE (dioleoil-fosfatidil-etanol amina; Behr J. P., 1994, Bioconjugate Chemistry, 5, 382-389), para formar DMRIE-DOPE.

25 [0115] De preferencia, la mezcla plasmídica con el adyuvante se forma extemporáneamente y preferiblemente contemporáneamente con la administración de la preparación, o poco tiempo antes de la administración de la preparación; por ejemplo, en poco tiempo antes o anterior a la administración, se forma la mezcla de plásmido-adyuvante, ventajosamente para dar bastante tiempo antes de la administración de la mezcla para formar un complejo, por ejemplo entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60 minutos antes de la administración, tal 30 como aproximadamente 30 minutos antes de la administración.

[0116] Cuando DOPE está presente, la relación molar DMRIE:DOPE es preferiblemente de aproximadamente 95:aproximadamente 5 a aproximadamente 5:aproximadamente 95, más preferiblemente aproximadamente 1:aproximadamente 1, por ejemplo, 1:1.

35 [0117] La relación en peso de adyuvante DMRIE o DMRIE-DOPE:plásmido puede estar entre aproximadamente 50:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 10, tal como aproximadamente 10:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 5, y preferiblemente aproximadamente 1:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 2, por ejemplo, 1:1 y 1:2.

40 [0118] La citocina o citocinas (5) pueden estar en forma de proteína en la composición inmunogénica o de vacuna, o pueden coexpresarse en el huésped con el inmunógeno o inmunógenos o el epítopo o epítopos del mismo. Se da preferencia a la co-expresión de la citocina o citocinas, ya sea por el mismo vector como aquel que expresa el inmunógeno o inmunógenos o epítopo(s) de los mismos, o por un vector separado para el mismo.

45 [0119] La invención comprende la preparación de dichas composiciones de combinación; por ejemplo mezclando los componentes activos, ventajosamente y conjuntamente con un adyuvante, portador, citocina y/o diluyente.

50 [0120] Las citocinas que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero sin limitación, el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de estimulación de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), interferón  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ), interferón  $\beta$  (IFN  $\beta$ ), interferón  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ), interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-2 (IL-2), interleucina-3 (IL-3), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-7 (IL-7), interleucina-8 (IL-8), interleucina-9 (IL-9), interleucina-10 (IL-10), interleucina-11 (IL-11), interleucina-12 (IL-12), factor de la necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), factor de la necrosis tumoral  $\beta$  (TNF  $\beta$ ) y factor de crecimiento de transformación  $\beta$  (TGF  $\beta$ ). Se entiende que las citocinas pueden co-administrarse y/o administrarse secuencialmente con la composición inmunogénica o de vacuna de la presente descripción. Por lo tanto, por ejemplo, un virus propagado en la presente descripción puede contener una molécula de ácido nucleico exógena y expresar *in vivo* una citocina adecuada, por ejemplo, una citocina que corresponde a este huésped que se vacunará o en el que se inducirá una respuesta inmunológica (por ejemplo, una citocina de ave para las preparaciones que se administrarán a aves).

- [0121] La descripción proporciona procedimientos y composiciones para inducir una respuesta inmune a un virus en un animal. Una célula huésped se pone en contacto con un virus en condiciones que dan como resultado una infección viral de la célula huésped. El cultivo de células infectadas se incuba durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la replicación viral. El virus se recolecta opcionalmente del cultivo de células infectadas. En una realización, el virus está atenuado. En otra realización, el virus está inactivado. La célula infectada, el virus recolectado o un inmunógeno, antígeno o epítopo del mismo, es decir, una composición inmunogénica o vacuna, se administra al animal en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmune al virus suficiente para proporcionar una respuesta inmunológica o protectora.
- [0122] Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento de inmunización o un procedimiento de vacunación usando las composiciones inmunogénicas o las composiciones de vacuna de acuerdo con la invención, respectivamente.
- [0123] El procedimiento incluye al menos una administración a un animal de una cantidad eficaz de la composición inmunogénica o vacuna de acuerdo con la invención. El animal puede ser macho, hembra, hembra preñada y recién nacido. Esta administración se puede hacer notablemente mediante inyección intramuscular (IM), intradérmica (ID) o subcutánea (SC) o por vía intranasal o administración oral. La composición inmunogénica o la vacuna de acuerdo con la descripción se puede administrar mediante una jeringa o un aparato sin aguja (similar, por ejemplo, a Pigjet o Biojector (Bioject, Oregon, Estados Unidos)).
- [0124] Una vacuna inactivada se puede preparar también a partir del fluido de cultivo recolectado. La inactivación se puede lograr al tratar los virus mediante cualquiera de los procedimientos comúnmente empleados para hacer vacunas inactivadas. Estos procedimientos incluyen, pero sin limitación, el tratamiento con formaldehído, tratamiento con betapropiolactona, tratamiento con etilen-imina, tratamiento con una pluralidad de disolventes orgánicos, tratamiento con una pluralidad de detergentes, tratamiento con radiación gamma o rayos X, o tratamiento con luz ultravioleta. Los procedimientos citados en este documento sirven como ejemplos conocidos en la técnica para inactivar virus. Las vacunas de virus inactivadas normalmente se administran mezcladas con un adyuvante, tal como hidróxido de aluminio y un emulsionante, tal como aceite o un detergente. La vacuna inactivada se puede administrar al animal mediante cualquiera de una pluralidad de procedimientos que incluyen, pero sin limitación, la inoculación por vía intramuscular o por vía subcutánea, pulverización, por vía ocular, por vía nasal, por vía oral o en el huevo.
- [0125] Para composiciones atenuadas, las dosis del virus u organismo o patógeno producidas sobre el nuevo cultivo de células pueden estar entre aproximadamente  $10^3$  y aproximadamente  $10^7$  DICC<sub>50</sub> (Dosis Infecciosas de Cultivo de Células medias), ventajosamente entre aproximadamente  $10^4$  y aproximadamente  $10^6$  DICC<sub>50</sub>, y más ventajosamente aproximadamente  $10^5$  DICC<sub>50</sub>. Los volúmenes son de 0,2 a 2,0 ml, ventajosamente aproximadamente 2,0 ml. Pueden hacerse una o más administraciones; por ejemplo con dos inyecciones a intervalos de 2-4 semanas, y ventajosamente con un refuerzo aproximadamente 3 semanas después de la primera inyección.
- [0126] Con las composiciones inactivadas del virus u organismo o patógeno producido sobre el nuevo cultivo de células, al animal se le puede administrar aproximadamente  $10^4$ - $10^9$  DICC<sub>50</sub> equivalentes (titulación antes de la inactivación), de manera ventajosa aproximadamente  $10^5$ - $10^8$  DICC<sub>50</sub> equivalentes en una unidad de dosis individual. El volumen de una unidad de dosis individual puede estar entre 0,2 ml y 5,0 ml, y ventajosamente entre 0,5 ml y 2,0 ml, y más ventajosamente de manera aproximada 2,0 ml. Pueden hacerse una o más administraciones; por ejemplo con dos inyecciones en intervalos de 2-4 semanas, y ventajosamente con un refuerzo aproximadamente 3 semanas después de la primera inyección.
- [0127] Con las composiciones sub-unitarias, por ejemplo, del virus o patógeno u organismo producido en el nuevo cultivo de células, al animal se le puede administrar aproximadamente de 5 µg a 500 µg, ventajosamente de 20 µg a 50 µg. Los volúmenes son de 0,2 a 2,0 ml, ventajosamente de manera aproximada 2,0 ml. Pueden hacerse una o más administraciones; por ejemplo con dos inyecciones en intervalos de 2-4 semanas, y ventajosamente con un refuerzo aproximadamente 3 semanas después de la primera inyección.
- [0128] Las composiciones de acuerdo con la invención se pueden administrar a otros mamíferos, por ejemplo ratones o animales de laboratorio, por ejemplo para generar anticuerpos policlonales o para preparar hibridomas para anticuerpos monoclonales.
- [0129] La presente invención proporciona la inmunización de animales, ventajosamente aves. Se describen procedimientos para administrar vacunas del VEBI en las patentes de Estados Unidos Nº 5.595.912; 5.614.409; 5.632.989; 5.849.575; 6.054.126; 6.451.321 y 6.528.063. Se describe un procedimiento para la administración de la composición inmunogénica o vacuna a un ave en la patente de Estados Unidos Nº 6.506.385. Medios ejemplares de administración son la administración oral (por ejemplo, en la alimentación o el agua para beber), inyección

- intramuscular, inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intra-abdominal, gotas de ojos o pulverizador nasal. A las aves también se les puede administrar vacunas en una cabina de pulverización, es decir, una cabina en la que las aves se colocan y se exponen a un vapor que contiene vacuna, o mediante la pulverización dirigida. Cuando se administran, las vacunas de la descripción a aves después de la eclosión, es ventajosa la administración por inyección subcutánea o la cabina de pulverización. A las aves también se les puede administrar la vacuna *in ovo*, como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 4.458.630. La administración *in ovo* de la vacuna es más ventajosa. Como una forma práctica, puede ser deseable administrar al animal composiciones que incluyen dos o más vacunas al mismo tiempo.
- 5 [0130] La administración en el huevo de la vacuna, como se ha descrito anteriormente en este documento, implica la administración de la vacuna al embrión del ave que está contenido en el huevo. La vacuna puede administrarse a cualquier compartimiento adecuado del huevo (por ejemplo, alantoides, saco de la yema, amnios, cámara de aire o en el propio embrión de ave), como será evidente para un experto en la técnica. Ventajosamente, la vacuna se administra al amnios. Los huevos administrados con las vacunas de la presente descripción son huevos fértiles que están ventajosamente en la última mitad, más ventajosamente en el último cuarto de la incubación. Los huevos de pollo se tratan en aproximadamente del duodécimo al vigésimo día de incubación, más ventajosamente del decimoquinto al decimonoveno día de incubación, y se tratan mucho más ventajosamente aproximadamente el decimocuarto día de la incubación (el decimooctavo día del desarrollo embrionario). Los huevos de pavo se tratan ventajosamente aproximadamente del decimocuarto al vigésimo sexto día de la incubación, más ventajosamente aproximadamente del vigésimo primer al vigésimo séptimo día de la incubación, más ventajosamente aproximadamente el vigésimo quinto día de incubación. Los expertos en la técnica apreciarán que la presente invención se puede realizar en cualquier momento predeterminado en el huevo, siempre que el embrión pueda articular una respuesta inmune a la vacuna del virus.
- 10 [0131] A los huevos se les puede administrar la vacuna por cualquier medio que transporte el compuesto a través de la cáscara. Sin embargo, el procedimiento de administración ventajoso es mediante inyección. La sustancia puede colocarse dentro de un compartimiento extraembrionario del huevo (por ejemplo, el saco de la yema, amnios, alantoides, células de aire) o dentro del propio embrión. El sitio de inyección es ventajosamente dentro de la región definida por el amnios, incluyendo el líquido amniótico y el propio embrión. Al comienzo del cuarto de la incubación, el amnios es lo suficientemente grande, de modo que la penetración del mismo se asegura casi todo el tiempo cuando la inyección se hace desde el centro del extremo grande del huevo a lo largo del eje longitudinal.
- 15 [0132] El mecanismo de inyección en el huevo no es crítico, pero es ventajoso que el procedimiento no dañe indebidamente los tejidos y órganos del embrión o las membranas extraembrionarias que lo rodean de manera que el tratamiento no reduzca la tasa de eclosión. Una jeringa hipodérmica equipada con una aguja de un calibre de aproximadamente 18 a 22 es adecuada para dicho propósito. Para la inyección en la cámara de aire, la aguja sólo necesita insertarse en el huevo aproximadamente dos milímetros. Una aguja de una pulgada, una vez insertada completamente desde el centro del extremo grande del huevo, atravesará la cáscara, las membranas externa e interna de la cáscara que delimitan la cámara de aire, y el amnios. Dependiendo de la etapa precisa de desarrollo y de la posición del embrión, una aguja de esta longitud acabará en el líquido por encima del polluelo o en el propio polluelo. Puede perforarse o taladrarse un orificio de prueba a través de la cáscara previamente a la inserción de la aguja a fin de evitar que la aguja se dañe o pierda su filo. Si se desea, el huevo puede sellarse con un material de sellado sustancialmente impermeable a las bacterias, tal como cera o similar, con el fin de evitar entradas posteriores de bacterias no deseables.
- 20 [0133] Se prevé que un sistema automatizado de alta velocidad de inyección en huevos para embriones aviares será particularmente adecuado para la puesta en práctica de la presente invención. Están disponibles numerosos dispositivos de este tipo, siendo ejemplos los desvelados en las patentes de Estados Unidos Nº 4.040.388; 4.469.047; 4.593.646; 4.681.063; y 4.903.635. Todos estos dispositivos, según se adaptan para la puesta en práctica de la presente invención, comprenden un inyector que contiene la vacuna descrita en este documento, con el inyector posicionado para inyectar la vacuna en un huevo sostenido por el aparato. Se han analizado anteriormente otras características del aparato. Además, si se desea, puede proporcionarse un aparato de sellado asociado operativamente con el aparato de inyección que selle el orificio en el huevo tras la inyección del mismo.
- 25 [0134] A continuación, la invención se describirá adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

**EJEMPLOS****Ejemplo 1: Cebadores para amplificar regiones VP2 del VEBI****[0135]**

B5 5': GGTATGTGAGGGCTTGGTGAC (SEQ ID NO: 7)  
 B5 3': TTATCTCGTTGGTTGGAATC (SEQ ID NO: 8)  
 B4 5': TCTTGGGTATGTGAGGCTTG (SEQ ID NO: 9)  
 B4 3': GGATGTGATTGGCTGGGTTA (SEQ ID NO: 10)

**[0136]** La figura 1 muestra un árbol filogenético de secuencias de ácido nucleico alineadas que usan el procedimiento Clustal con la tabla de pesos de residuos ponderada. Las secuencias se determinaron por la University of Georgia Molecular Genetics Instrumentation Facility (Athens, Georgia) o SeqWright DNA Technologies Services (Houston, Texas). Se usó el programa MegAlign (DNASTAR, Inc., 1228 S. Park St., Madison, 53715) para alinear y hacer el árbol y SeqEdit (DNASTAR, Inc., 1228 S. Park St., Madison, 53715) fue el programa que se usó para convertir las secuencias en aminoácidos. Es evidente para un experto en la técnica que las secuencias del VEBI de la figura 1 comprende la secuencia mayoritaria, así como las tres secuencias con las sustituciones nucleotídicas indicadas en la misma.

**Ejemplo 2: Patología del VEBI**

**[0137]** Recolección de tejido - Selección de la muestra. Se seleccionaron aves enfermas o graves para etiologías específicas. Se seleccionaron aves sanas de rutina para el control de rutina. Los pollos de engorden tenían 14, 21, 28 ó 35 días de edad. Las pollas tenían 21, 28, 35, 48 ó 60 días de edad. Las aves centinelas se recogieron 3-5 días después de la colocación. Para la documentación de micotoxina, las aves se colocaron en alimentos sospechosos y se sacrificaron secuencialmente 2-3 días después de la primera exposición.

**[0138]** Las muestras recogidas fueron órganos inmunes, tales como la bursa, el timo, el bazo y la médula. Para la conservación de muestra, el espesor se limitó a 0,5 cm. El hueso se dividió para exponer la médula. La muestra se fijó en formalina tamponada neutra al 10% durante 24 horas. Después de 24 horas, la muestra se almacenó en H<sub>2</sub>O, PBS y alcohol.

**[0139]** Transporte de la muestra. Las muestras eran estables a temperatura ambiente después de la fijación. Las muestras se protegieron de la congelación y no empaquetaron con suero o tejidos congelados. El peso de transporte se redujo retirando por vertido la formalina, que redujo el derrame de formalina en el envío. La muestra se mantuvo húmeda en recipiente hermético al aire.

**[0140]** Preparación de la muestra. Los tejidos se manipularon como se indica a continuación después de la recepción. En primer lugar, los tejidos se procesaron para comprobar su histopatología de rutina a través de alcoholes, aclarados y parafina. Los tejidos se dividieron en 5 micrómetros para la tinción de hematoxilina y eosinas (HE). El procesamiento de rutina se completó normalmente en 24 horas. SE investigó el análisis del ácido nucleico usando secciones de rutina para la extracción de ácido nucleico para la identificación de patógenos.

**[0141]** Enfermedad bursal infecciosa (EBI). El primer efecto (1-3 después de la infección) fue la lisis de linfocitos en la bolsa de Fabricio (BF) sin lesiones significativas en otros órganos. El segundo efecto (3-5 días después de la infección) fue la depleción linfoides continua en las cepas variantes y la necrosis fibrinoide aguda en las cepas clásicas. El tercer efecto (5-8 días después de la infección) fue la depleción linfoides difusa que afecta a todos los folículos de forma uniforme. El cuarto efecto (10 días después de la infección) fue la regeneración de algunos folículos, que si no están presentes en 10 días, normalmente no se presentarán. La supresión del sistema inmune fue transitoria si la regeneración tiene lugar, y permanente si no tiene lugar la regeneración. Se presenta una sección histológica (fijada en formalina) de la bursa normal en la figura 2A, y se presenta una sección de la necrosis bursal aguda en la figura 2B.

**[0142]** Interpretación de la EBI. El daño agudo a la bursa mostró que la protección es inadecuada. La atrofia crónica significa que hubo desarrollo y liberación de linfocitos B deteriorados. La variación sugiere que fue sospechosa la inmunidad materna. Las cepas de vacunas fueron capaces de producir graves lesiones y una supresión inmune. La producción de lesiones significa que la cepa de la vacuna o un aislado de campo penetró el anticuerpo existente y dañó el sistema inmune.

**Ejemplo 3: Caracterización del VEBI por RT-PCR**

**[0143]** Introducción. Los VEBI pertenecen a la familia Birnaviridae y el género Virnavirus. Los VEBI son icosaédricos, no envueltos y no tienen proyecciones superficiales. El virión tiene 60 nm en diámetro con 45 nm en la

microscopía electrónica de transmisión (TEM). El VEBI es un virus bi-segmentado de ARN de doble hebra. La proteína de la cápside externa principal es VP2, que está glucosilada y contiene epítopos neutralizantes mayores.

**[0144]** Las infecciones Birnavirales incluyen el virus de la necrosis pancreática infecciosa que infecta a los peces, el virus de tumor de piel que infecta anguilas, virus de la necrosis celular biliar laminar de las agallas, que infecta a las anguilas, birnavirus marinos, que infectan ostras y peces, y el VEBI en el que el serotipo 1 infecta a los pollos y el serotipo 2 infecta a los pavos.

**[0145]** El VEBI se clasifica por subtipos antigenicos, patotipos y grupos moleculares por polimorfismo de longitud de fragmento de enzimas de restricción (RFLP). Los subtipos antigenicos incluyen el Serotipo 1 (incluyendo Clásico y Variantes A y E) y el Serotipo 2. Los patotipos son apatogénicos, moderados, intermediarios, intermediarios plus, clásicos, variantes y muy virulentos. Los grupos moleculares por RFLP se han clasificado en seis grupos y se identificaron al extraer el ARN de una muestra fresca o una muestra almacenada en fenol/cloroformo, por RT-PCR del ARN que genera un ADNc, una restricción enzimática del ADNc, electroforesis en gel del ADNc restringido, comparación de perfiles de RFLP, y el diagnóstico del grupo molecular.

**[0146]** Cuestiones que afectan a la clasificación molecular por RT-PCR actual de los VEBI. El procedimiento de clasificación de los VEBI actual en grupos moleculares por RFLP no permite la correlación de lesiones con la identidad viral en la misma muestra. La correlación requiere un muestreo dual por histopatología y RT-PCR. Un segundo problema es que las muestras son difíciles de transportar internacionalmente. Un tercer problema es que el examen retrospectivo es difícil para el análisis epidemiológico. Un cuarto problema es que las muestras de RT-PCR no son estables con el tiempo y requieren reactivos especializados que no están disponibles comúnmente.

**[0147]** El sistema que agrupamiento molecular actual está diseñado únicamente para la categorización. La identidad del grupo molecular no puede usarse para el diseño potencial de estrategias de vacunación. La identidad del grupo molecular tampoco permite la identificación de agentes emergentes recientemente sin el uso adicional de técnicas de aislamiento clásicas.

**[0148]** Detección de VEBI temprana en tejidos embebidos en parafina. El RT-PCR del VEBI en tejidos de rutina en bloques embebidos en parafina de rutina permite (1) la correlación del daño con el virus, (2) bloques estables para su transporte, (3) agentes exterminados, por lo tanto, menos restricciones de importación, (4) el análisis viral retrospectivo y (5) RNAsas inactivadas en formalina. Se realizó un experimento de estudio temprano para detectar VEBI en tejidos embebidos en parafina, fijados en formalina mediante histopatología, inmunohistoquímica (IHQ) y RT-PCR.

**[0149]** Los casos de campo de VEBI incluyeron bursas y proventrículos que se recogieron en formalina tamponada al 10%, se fijaron durante 24 horas y se procesaron de forma rutinaria en bloques de parafina para su histopatología. Los análisis de histopatología, IHQ y RT-PCR se realizaron en todos los casos de campo.

**[0150]** Para la exposición experimental de VEBI, los pollos de engorde SPF sin anticuerpo ( $n = 32$ ) se eclosionaron y se criaron en aisladores hasta 28 días de edad y se expusieron por vía oral a las cepas del VEBI ( $10^3$  dosis infecciosa de cultivo tisular al 50% (DICT<sub>50</sub>)). Las cepas del VEBI incluyeron la cepa de estimulación estándar USDA del VEBI (STC), Lukert, Bursine 2, D78, Variante E, Variante A y una cepa del VEBI patentada por Intervet (GLS) de proventriculitis. Los animales se les hizo la necropsia a los 4 ó 6 días después de la exposición. La bursa, el proventrículo y el timo se recogieron, se fijaron (formalina tamponada neutra al 10% (NBF) durante 24 horas) y se procesaron para su histopatología.

**[0151]** Histopatología para lesiones de VEBI. Se examinaron muestras de tejido de la bursa, el timo y el proventrículo y las lesiones se clasificaron como 1 = Normal, 2 = Leve, 3 = Moderado y 4 = Grave.

**[0152]** Inmunohistoquímica para VEBI. La IHQ se realizó en un inmunotéñidor automatizado. El anticuerpo primario fue un anticuerpo de ratón reactivo a todos los VEBI. El anticuerpo secundario fue un anticuerpo dirigido contra ratón conjugado con peroxidasa sin biotina (Dako, Envision). La tinción del antígeno de VEBI en secciones tisulares se clasificó como 1 = Ninguna, 2 = Leve, 3 = Moderada y 4 = Difusa.

**[0153]** RT-PCR para VEBI. El ARN se aisló de tejidos embebidos en parafina como se indica a continuación. El tejido (30 micrómetros) se cortó en bloques. La desparafinización se hizo con HemoDe y etanol al 100%. La digestión se hizo con proteinasa K al 10% durante 1 hora a 50 °C. El ARN se extrajo con Trizol® (Gibco BRL).

**[0154]** Extracción de ARN. Las muestras de tejido fijadas en formalina conservadas en parafina se desparafinizaron con HemoDe y se digirieron con proteinasa K. El ARN se extrajo usando Trizol® (Gibco BRL). El ARN de muestra se diluyó en DMSO al 90%. El ARN se desnaturizó durante 5 minutos a 95 °C y se puso sobre hielo antes del análisis por RT-PCR. La figura 3 muestra un gel en agarosa de los resultados de RT-PCR que muestra un segmento amplificado compartido por los VEBI.

- [0155] Todos los procedimientos usados con éxito detectaron el VEBI en tejidos embebidos en parafina y fijados en formalina donde era de esperar. Para las secciones bursales, la histopatología demostró una necrosis aguda/subaguda, la inmunohistoquímica reveló la tinción del antígeno de VEBI presente en todas las secciones, y el análisis por RT-PCR dio positivo para el VEBI en todas las muestras. Para las secciones tímicas, la histopatología no mostró lesiones, la inmunohistoquímica reveló algo de tinción del VEBI, y el análisis por RT-PCR fue positiva para VEBI en la mayoría de las muestras. Para secciones proventriculares, la histopatología mostró ninguna o lesiones de baja clasificación, la inmunohistoquímica no reveló tinción de VEBI, y el análisis por RT-PCR dio un VEBI débil positivo en algunas muestras.
- [0156] ¿Pueden el RT-PCR en tiempo real y el RFLP adaptarse para el VEBI? El ARN se extrae de una muestra de tejido embebida en parafina, sometida a RT-PCR en tiempo real y la restricción enzimática seguido del análisis de la curva fusión, una comparación de patrones, y el diagnóstico de grupos moleculares.
- [0157] RT-PCR en tiempo real. El análisis por RT-PCR en tiempo real es de ciclo ultrarrápido con el control ciclo por ciclo. Se usó un colorante de unión de ADN en la mezcla de PCR. En este caso, se usó el colorante verde SYBR para controlar el PCR. El colorante verde I SYBR se vuelve fluorescente cuando se une al ADNds.
- [0158] Análisis de la curva de fusión. Los productos de PCR se diferenciaron mediante el análisis de las curvas de fusión cuya forma es una función del contenido de GC, longitud y secuencia.
- [0159] RT-PCR. Se usaron verde I SYBR y el instrumento LightCycler (Roche Diagnostics) para el análisis por RT-PCR. Las condiciones fueron 10 minutos de RT seguido de 45 ciclos de PCR en 20 minutos. Se usaron cebadores que dieron como resultado la amplificación de un fragmento de 400 pb en la región VP2 del VEBI.
- [0160] Análisis en tiempo real con RT-PCR. Usando extractos de ARN de los bloques de parafina, el ARN se desnaturizó a 95 °C durante 5 minutos y el RT-PCR se realizó usando el kit LightCycler-RNA Amplification SYBR Green I y LightCycler (Roche). Los cebadores se diseñaron para amplificar un segmento de 400 pb compartido por todos los VEBI. Este segmento tiene una ligera variación por la cepa. La amplificación y la detección de productos específicos se basó en la fluorescencia de colorante verde SYBR (Roche) que se unió al ADN. Los productos se fundieron de 55 °C a 95 °C en 10 minutos. Las cepas se identificaron mediante el análisis de la curva de fusión del ADN.
- [0161] RFLP de productos de RT-PCR. Se usaron las enzimas de restricción StyI, SacI y NarI. En capilares separados, se cortó 1 µl de producto de PCR con cada enzima en una reacción de 10 µl durante una hora a 37 °C. A cada tubo se le añadieron 2 µl del colorante verde SYBR. Se hizo un análisis de la curva de fusión sobre los productos restringidos y se compararon los picos de fusión.
- [0162] ¿Pueden los productos de RT-PCR en tiempo real secuenciarse para desarrollar una biblioteca de alineación de VEBI? El agrupamiento molecular por RFLP tiene poca correlación con los serotipos antigenicos. Las comparaciones de secuencia pueden producir más información relevante. Un lugar lógico para el inicio es la secuencia para la hipervariable VP2. La figura 4A muestra las variaciones de secuencia en un amplicón VP2 del VEBI de secuencias de ácido nucleico. La figura 4B muestra las variaciones de secuencia en las secuencias aminoacídicas deducidas de VP2 del VEBI.
- [0163] Los nucleótidos 36, 68, 74, 96, 98, 107, 138, 146, 149, 218, 230, 236, 252 y 268 se citaron como "únicos" para los VEBI muy virulentos (vvIBDV). Los aminoácidos 12, 32, 46, 84 y 89 se citaron como "únicos" para los vvIBDV. Se muestra una comparación de dos VEBI 2030 "(vvIBDV) frente a 1307 (estándar) en la Tabla 1.

50 Tabla 1: Comparación del VEBI 2030 (vvIBDV) frente a 1307 (estándar)

Nucleótidos:	36	68	74	96	98	107	138	146	149	218	230	236	252	268
#2030	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
#1307	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Aminoácidos:	12	32	46	84	89									
#2030	+	+	+	+	+									
#1307	-	-	-	-	+									

[0164] Conclusión en la identificación de VEBI muy virulentos (vvIBDV). En la actualidad, un marcador nucleotídico o aminoacídico no puede ser dependiente para diferenciar vvIBDV de otras cepas. La identificación

proteómica de los mecanismos patogénicos para el aumento de la virulencia del vvIBDV permitirá la determinación de los requerimientos para este aumento de virulencia.

**[0165]** En el entendimiento del VEBI, puede usarse una biblioteca de secuencias para propósitos distintos de la correspondencia de la vacuna. Específicamente, los aislados pueden variar su capacidades para inducir la muerte celular apoptótica y necrótica.

**[0166]** Apoptosis inducida por VEBI. Además de causar necrosis en las células linfoides de la bursa, el VEBI induce apoptosis (véase, por ejemplo, Vasconcelos & Lam, J Gen Virol. Julio de 1994; 75 (Pt 7): 1803-6, Tham & Moon, Avian Dis. Enero-Marzo de 1996; 40(1): 109-13, Fernandez-Arias y col., J Virol. Octubre de 1997; 71(10): 8014-8, Ojeda y col., Avian Dis. Abril-Junio de 1997; 41(2): 312-6 y Tanimura & Sharma, J Comp Pathol. Enero de 1998; 118(1): 15-27).

**[0167]** La apoptosis en células infectadas puede contribuir a la patogénesis del VEBI (véase, por ejemplo, Jungmann y col., J Gen Virol. Mayo de 2001; 82(Pt 5): 1107-15 y Ojeda y col., Avian Dis. Abril-Junio de 1997; 41 (2): 312-6). La inducción de la apoptosis se ha apreciado en linfocitos de sangre periférica de pollos infectados por el VEBI (véase, por ejemplo, Vasconcelos & Lam, J Gen Virol. Julio de 1994; 75(Pt 7): 1803-6) y en el timo (véase, por ejemplo, Inoue y col., Avian Dis. Octubre-Diciembre de 1994; 38(4): 839-46 y Tanimura & Sharma, J Comp Pathol. Enero de 1998; 118 (1): 15-27).

**[0168]** La apoptosis inducida por el VEBI tiene lugar en el proventrículo de pollos Leghorn SPF estimulados con el VEBI. La apoptosis inducida por el VEBI se estudió usando una marcación de extremo cortado dUTP mediada por desoxinucleotidil transferasa terminal modificada (TUNEL) en secciones de la bursa, el timo y el proventrículo de aves infectadas con el VEBI.

**[0169]** Materiales y procedimientos. Se usaron muestras de tejido embebidas en parafina fijadas con formalina de aves de los estudios del VEBI que se han descrito anteriormente para el ensayo de marcación de extremo cortado dUTP mediada por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL). Para la detección de células apoptóticas, se usó el equipo de detección de muerte celular *in situ* (DeadEnd Colorimetric TUNEL System, Promega Corp., Madison WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**[0170]** Resultados. Las bursas de las aves estimuladas con VEBI tuvieron una tinción de apoptosis intensa tanto en la corteza folicular como en la médula. La apoptosis presente en los folículos fue positiva para el antígeno de IHQ. La distribución dentro de los folículos positivos de apoptosis e IHQ fue la misma en una cepa.

**[0171]** Se observó apoptosis en algunas muestras con proventriculitis, principalmente linfocitos infiltrantes. Los resultados sugirieron la lisis apoptótica sistémica de linfocitos inducida por el VEBI además de la de los órganos linfoides primarios.

**[0172]** ¿Son los linfocitos B las únicas células diana para todos los aislados del VEBI o hay lisis y diversidad de linfocitos T? Se caracterizaron infiltrados linfoides inducidos por el VEBI y la necrosis de células diana *in situ* mediante inmunohistoquímica. Los monoclonales con IHQ para linfocitos T fueron CD3, CD4 y CD8, y para linfocitos B, HIS-C1. La marcación múltiple de linfocitos T usando IHQ para el VEBI, la lisis celular apoptótica y la confirmación de la identidad de la cepa usando PCR en tiempo real contestará la pregunta.

**[0173]** Conclusiones. El análisis de la curva de fusión es una manera simple de diferenciar las cepas en grupos moleculares, y elimina la necesidad de realizar geles. Los datos de secuencia se pueden obtener rápidamente a partir de los productos de RT-PCR en tiempo real sin limpieza adicional o purificación en gel. Los datos de la secuencia de la región hipervariable de VP2 generados usando estas técnicas es un conjunto de datos manejable que permitirá las aplicaciones de vacunas oportunas y dirigidas y la identificación de la secuencia de variantes emergentes para su uso biológico futuro.

**[0174]** Hasta la fecha, se han analizado 61 casos de EBI, 34 casos con RT-PCR positiva, se han secuenciado 33 casos, y 27 tuvieron una RT-PCR negativa. Hasta la fecha, se han analizado 66 casos de REO, 20 con una RT-PCR positiva, se han secuenciado 20 casos, y 46 tuvieron una RT-PCR negativa.

#### Ejemplo 4: Cepas de VEBI Novedosas Identificadas Usando el Sistema de Identificación Genómico Viral

**[0175]** Nuevas Secuencias identificadas usando el nuevo VGIS (Sistema de Identificación Genómico Viral). 1631 es una nueva cepa similar a vvIBDV, 087 es una nueva cepa Variante del VEBI, y 077 es una nueva cepa del VEBI no identificada previamente.

**[0176]** La figura 4C muestra variaciones de secuencias de nuevas secuencias identificadas usando el nuevo (Sistema de Identificación Genómico Viral). Las secuencias nucleotídicas 1631 276 es una nueva cepa similar a

vvIBDV, 087 276 es una nueva cepa variante del VEBI, y 077 276 es una nueva cepa del VEBI no identificada previamente. Las secuencias aminoácidas 1631 91 es una nueva cepa similar a vvIBDV, 087 91 es una nueva cepa variante de VEBI, y 077 91 es una nueva cepa del VEBI no identificada previamente. Secuencias postuladas de Genebank para la comparación: #AY321527 es una secuencia de vvIBDV, #Y14955 es otra secuencia de vvIBDV, #Z25482 es una tercera secuencia de vvIBDV, #D00499 es una Cepa de Estimulación Estándar (STC) de USDA del VEBI, #X54858 es una cepa de variante E del VEBI, #M64285 es una cepa de variante A del VEBI.

Secuencia Número 1631 - Nueva secuencia de ácido nucleico de cepa similar a vvIBDV:

```

1   CAGCCGATGATTACCAATTCTCATCTCAGTACCAAGCAGGTGGGTAACA
51  ATCACACTGTTCTCAGCTAATATCGATGCCATCACAAGCCTCAGCATCGG
101 GGGAGAACTCGTGTCAAACAAGCGTCCAAGGCCTATACTGGTGCTA
151 CCATCTACCTTATAGGCTTGTGGACTGCGTAATCACCAGAGCTGTG
201 GCCGCAGACAATGGGCTAACGGCCGGCACTGACAACCTATGCCATTCAA
251 TATTGTGATTCCAACCAACGAGATAA (SEQ ID NO: 1)

```

Secuencia Número 1631 - Nueva secuencia aminoacídica traducida de la cepa similar a vvIBDV:

```

1   ADDYQFSSQYQAGGVITLFSANIDAITSLSIGGELVFQTSVQGLILGAT
51  IYLIGFDGTAVITRAAADNGLTAGTDNLMPFNIVPTNEI (SEQ ID NO: 2)

```

Secuencia Número 087 - Nueva secuencia de ácido nucleico de la cepa variante de VEBI:

```

1   CAGCCAACATTGATGCCATCACAAGCCTCAGCGTTGGGGAGAGCTTTG
51  TTTAAAACAAGCGTCAAAGCCTTGTACTGGCGCTACCATCTACCTTAT
101 AGGCTTGATGGGACTGCGTAATCACTAGAGCTGTAGCCGCAAACAATG
151 GGCTGATGACCGGCATCGACAATCTATGCCATTCAATCTGTGATTCCA
201 ACCAACGAGATAA (SEQ ID NO: 3)

```

Secuencia Número 087 - Nueva secuencia aminoacídica traducida de la cepa variante VEBI:

```

1   ANIDAITSLSVGELLFKTSVQSLVLGATTIYLIGFDGTAVITRAVAANNG
51  LMTGIDNLMPNLVIPTNEI (SEQ ID NO: 4)

```

Secuencia Número 077 - Nueva secuencia de ácido nucleico de la cepa no identificada previamente:

```

1   CAGCCGATGATTACCAATTCTCATCTCAGTACCAATCAGGTGGAGTAACA
51  ATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCCATCACAAGCCTCAGCGTTGG
101 GGGAGAGCTTGTCAAACAAGCGTCCAAGACCTATACTGGCGCCA
151 CTATCTACCTTATAGGCTTGTGGACTACGGTGACCACCAAGAGCTGTG
201 GCCGCAAACAATGGGCTGACGGCCGGCACCGACAATCCTATTCCATTCAA
251 TCTTGTGTTCCCGACCAACGAGATAA (SEQ ID NO: 5)

```

Secuencia Número 077 - Nueva secuencia aminoacídica traducida de la cepa no identificada previamente:

1 ADDYQFSSQYQSGGVITLFSANIDAITSLSVGELVFQTSVQDLILGAT  
 51 IYLIGFDGTTVITRAVAANNGLTAGTDNPIPFLVFPTNEI (SEQ ID NO: 6)

5 Secuencias postuladas de Genebank para la comparación: #AY321527 es una secuencia de vvIBDV, #Y14955 es otra secuencia de vvIBDV, #Z25482 es una tercera secuencia de vvIBDV, #D00499 es una Cepa de Estimulación Estándar de USDA del VEBI (STC), #X54858 es una cepa de Variante E del VEBI, #M64285 es una cepa de Variante A del VEBI.

10 Cepa AY321527 del vvIBDV del VEBI 1-271 Clásico. Número de Acceso al Gene Bank: AY321527, DEFINICIÓN: Gen W/2003 VP2 de aislado del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial, REFERENCIA: bases 1 a 271.

15 Cepa AY321527 del vvIBDV de la secuencia de ácido nucleico del VEBI 1-271 Clásico:

1 CATCAGGACCAAAGAGAATGTCAGTTCCAAGCAGGTGGAGTGACAATCAC  
 51 ACTGTTCTCAGCCAATATCGATGCCATCACAAGCCTCAGCATCGGGGGAG  
 101 AACTCGTGTTCAAACAAGCGTCCAAGGCCTTATACTGGCGCTACCATC  
 151 TACCTTATAGGCTTGTGGAAGTGCAGTAATCACCAAGAGCTGTGGCCGC  
 201 AGATAATGGGCTGACGGCCGGCACTGACAACCTTATGCCATTCAATATTG  
 251 TAATTCCAACCAGCGAGATAA (SEQ ID NO: 11)

20 Cepa AY321527 del vvIBDV de la secuencia aminoacídica Traducida del VEBI 1-271 clásico:

1 HQDQRECQFQAGGVITLFSANIDAITSLSIGGELVFQTSVQGLILGATI  
 51 YLIGFDGTAVITRAVAADNGLTAGTDNLMPNIVIPTSEI (SEQ ID NO: 12)

25 Y14955 vvJV86 276 83-309 Clásico. Número de Acceso al Gene Bank: Y14955, DEFINICIÓN: Gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, cepa 94432, REFERENCIA: bases 83 a 309.

1 CAGCCGACGATTACCAATTCTCATCACAGTACCAAGCAGGTGGGTAACA  
 51 ATCACACTGTTCTCAGCTAATATCGATGCCATCACAAGCCTCAGCATCGG  
 101 GGGAGAACTCGTGTTCAAACAAGCGTCCAAGGCCTTATACTGGGTGCTA  
 151 CCATCTACCTTATAGGCTTGTGGAAGTGCAGTAATCACCAAGAGCTGTG  
 201 GCCGCAGACAATGGGCTGACGGCCGGCACTGACAACCTTATGCCATTCAA  
 251 TATTGTGATTCCAACCAGCGAGATAA (SEQ ID NO: 13)

30 Y14955 wJV86 276 83-309 Secuencia de ácido nucleico clásica:

1 ADDYQFSSQYQAGGVITLFSANIDAITSLSIGGELVFQTSVQGLILGAT  
 51 IYLIGFDGTAVITRAVAADNGLTAGTDNLMPNIVIPTSEI (SEQ ID NO: 14)

Y14955 vvJV86 276 83-309 Secuencia aminoacídica traducida clásica:

Z25482 vv NED 276 59-335 Clásica. Número de Acceso al Gene Bank: Z25482, DEFINICIÓN: Proteína PV2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, CDS parcial, REFERENCIA: bases 59 a 335.

5 Z25482 vv NED 276 59-335: Secuencia de ácido nucleico clásica:

```

1   CAGCCGATGATTACCAATTCTCATCACAGTACCAAGCAGGTGGGTAACA
51  ATCACACTGTTCTCAGCTAATATCGATGCCATCACAGCCTCAGCATCGG
101 GGGAGAACTCGTGTTCAAACAAGCGTCCAAGGCCTTATACTGGTGCTA
151 CCATCTACCTTATAGGCTTGATGGGACTGCGGTAAATCACCAAGAGCTGTG
201 GCCGCAGACAATGGGCTAACGGCCGGCACTGACAACCTTATGCCATTCAA
251 TATTGTGATTCCAACCAGCGAGATAA (SEQ ID NO: 15)

```

Z25482 vv NED 276 59-335 Secuencia de aminoácidos traducida clásica:

10

```

1   ADDYQFSSQYQAGGVITLFSANIDAITSLSIGGELVFQTSVQGLILGAT
51  IYLIGFDGTAVITRAVAADNGLTAGTDNLMPFNIVIPTSEI (SEQ ID NO: 16)

```

15 Cepa D00499 STC del VEBI 725-1001 clásico. Número de Acceso al Gene Bank: D00499 DEFINICIÓN: ARN genómico del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, segmento A que contiene ORF grande y ORF pequeño, CDS completo, REFERENCIA: Bases 725 a 1001.

Cepa D00499 STC de la secuencia de ácido nucleico clásica del VEBI 725-1001:

```

1   CAGCCGATGATTACCAATTCTCATCACAGTACCAACCAGGTGGGTAACA
51  ATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCTATCACAGCCTCAGCGTTGG
101 GGGAGAGCTCGTGTTCAAACAAGCGTCCAAGGTCTGTACTGGGCCCA
151 CCATCTACTTATAGGCTTGATGGGACTACGGTAATCACCAAGGGCTGTG
201 GCCGCAGACAATGGGCTGACGGCCGGCACCGACAATCTTATGCCATTCAA
251 TCITGTGATTCCAACCAACCGAGATAA (SEQ ID NO: 17)

```

20 Cepa de D00499 STC de la secuencia de aminoácidos traducida clásica del VEBI 725-1001:

```

1   ADDYQFSSQYQPGGVITLFSANIDAITSLSVGGEVFQTSVQGLVLGAT
51  IYFIGFDGTTVITRAVAADNGLTAGTDNLMPFNLVIPTNEI (SEQ ID NO: 18)

```

25 Cepa de variante E de X54858 de la Variante del VEBI 680-956. Número de Acceso al Gene Bank: X54858. DEFINICIÓN: ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa aviar para las proteínas VP2 y VP4 (parcial). REFERENCIA: bases 680 a 956.

Cepa de variable E de X54858 de la secuencia de ácidos nucleicos variante del VEBI 680-956:

1 CAGCCGATAATTACCAATTCTCATCACAGTACCAAACAGGTGGGTAACA  
 51 ATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCCATCACAAGTCTCAGCGTTGG  
 101 GGGAGAGCTCGTGTCAAAACAAGCGTCCAAAGCCTGTACTGGCGCCA  
 151 CCATCTACCTTATAGGCTTGTGATGGGACTGCGGTAAATCACCAGAGCTGTG  
 201 GCCGCAAACAATGGGCTGACGGCCGGCATCGACAATCTTATGCCATTCAA  
 251 TCTTGTGATTCCAACCAATGAGATAA (SEQ ID NO: 19)

**X54858 Variant E strain of IBDV 680-956 Variant translated amino acid sequence:**

1 ADNYQFSSQYQTGGVTITLFSANIDAITSLSVGELVFKTSVQSLVLGAT  
 51 IYLIGFDGTAVITRAVAANNGLTAGIDNLMPFNLVIPTNEI (SEQ ID NO: 20)

Cepa de variante A de M64285 de la variante del VEBI 688-964. Número de Acceso al Gene Bank: M64285, DEFINICIÓN: ARNm de poliproteína del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (que codifica VP2 y VP4), extremo 5', REFERENCIA: Bases 688 a 964.

Cepa de variante A de M64285 de la secuencia de ácido nucleico variante del VEBI 688-964:

1 CAGCCGATGATTACCAATTCTCATCACAAACAAAGGTGGGTAACG  
 51 ATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGATGCCATCACAAGCCTCAGCGTTGG  
 101 GGGAGAGCTTGTGTAAAACAAGCGTCCAAAGCCTGTACTGGCGCCA  
 151 CCATCTACCTTATAGGCTTGTGATGGGACTGCGGTAAATCACTAGAGCTGTG  
 201 GCCGCAAACAATGGGCTGACGGCCGGCATCGACAATCTTATGCCATTCAA  
 251 TCTTGTGATTCCAACCAACGAGATAA (SEQ ID NO: 21)

**M64285 Variant A strain of IBDV 688-964 Variant translated amino acid sequence:**

1 ADDYQFSSQYQQGGVTITLFSANIDAITSLSVGELVFKTSVQSLVLGAT  
 51 IYLIGFDGTAVITRAVAANNGLTAGIDNLMPFNLVIPTNEI (SEQ ID NO: 22)

#### Ejemplo 5: Diagrama de flujo

[0177] La figura 5 muestra un diagrama de flujo que ilustra el resumen general de la entrada, una etapa intermedia y la salida. La figura 5 demuestra un procedimiento para recuperar una secuencia de datos diana en respuesta a una secuencia de datos clave o la identificación de una nueva secuencia en ausencia de una correspondencia. Esta realización de la descripción puede configurarse para manejar secuencias de datos de un tipo (por ejemplo, secuencias nucleotídicas) o múltiples tipos (por ejemplo, ácidos nucleicos y/o aminoácidos) y las secuencias de datos clave y diana pueden ser de cualquier longitud.

[0178] En el estado 102, se recibe una secuencia de datos clave. Los datos clave pueden estar en cualquier notación adecuada (por ejemplo, nucleótido o aminoácido), o pueden convertirse en una notación adecuada (por ejemplo, un aminoácido se puede convertir en un triplete nucleotídico en el que el nucleótido en la tercera posición no está especificado, o una secuencia nucleotídica se convierte en una secuencia aminoacídica).

[0179] En el estado 104, la secuencia de datos clave se alinea a una base de datos de secuencias de datos diana, por ejemplo, los datos de árbol que comprenden una pluralidad de secuencias nucleotídicas o aminoacídicas. Se calcula un porcentaje de homología o identidad con los programas de alineación, tales como, pero sin limitación, ALIGN, FASTA, MegAlign, NCBI-BLAST (por ejemplo, BLAST, gapped BLAST, BLASTN, BLASTP y PSI-BLAST) y WU-BLAST (Washington University BLAST) para la secuencia de datos clave con cada secuencia de datos diana supuesta.

[0180] En el estado 106, el porcentaje de homología o de identidad está sujeto a una determinación de umbral. Si el porcentaje de homología o de identidad es mayor de aproximadamente el 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,8%, mucho más ventajosamente de aproximadamente el 99,3% a aproximadamente el 99,6%, entonces se identifica una correspondencia adecuada en el estado 108. De otra manera, si el porcentaje de homología o de identidad es menor que el umbral, entonces se identifica una nueva secuencia en el estado 110.

5

**Ejemplo 6: Secuencias del VEBI**

10 [0181]

Acceso Nº	Descripción
A12620	Segmento de ARN del VEBI
A28793	Fragmento de ADN de p501 de la patente WO9015140
A28794	Fragmento de ADN de p502 de la patente WO9015140
A28795	Fragmento de ADN de p601 de la patente WO9015140
A28796	Fragmento de ADN de p611 de la patente WO9015140
A28797	cebador de ADN N527 de la patente WO9015140
A28798	cebador de ADN N528 de la patente WO9015140
A28799	cebador de ADN N531 de la patente WO9015140
A28800	cebador de ADN N526 de la patente WO9015140
A28801	cebador de ADN N533 de la patente WO9015140
A28803	ADN de pIP41 (002-73 IBVD) de la patente WO9015140
A28805	ADN de pIPZ01 (E IBVD) de la patente WO9015140
A33255	Segmento A de la cepa Edgar del VEBI
A33259	Cebador 0 del segmento A de la cepa Edgar del VEBI sintético
A33260	Cebador 1 del segmento A de la cepa Edgar del VEBI sintético
A33261	Cebador 1b del segmento A de la cepa Edgar del VEBI sintético
A33262	Cebador 2 del segmento A de la cepa Edgar del VEBI sintético
A33263	Cebador 3 del segmento A de la cepa Edgar del VEBI sintético
A33264	Cebador 4 del segmento A de la cepa Edgar del VEBI sintético
A33265	Cebador 5 del segmento A de la cepa Edgar del VEBI sintético
A33266	Cebador 6 del segmento A de la cepa Edgar del VEBI sintético
A38328	Secuencia 1 de la patente WO9410321
AB024076	ARNm de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína VP2-4-3, cds parcial
AF006694	ARNm de proteína estructural (VP2) del segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF006695	ARNm de proteína estructural (VP2) del segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF006696	ARNm de proteína estructural (VP2) del segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF006697	ARNm de proteína estructural (VP2) del segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF06698	ARNm de proteína estructural (VP2) del segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF06699	ARNm de proteína estructural (VP2) del segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial

Acceso N°	Descripción
AF006700	ARNm de proteína estructural (VP2) del segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF006701	ARNm de proteína estructural (VP2) del segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF051837	Gen de la poliproteína estructural VP2, VP4, VP3 de la cepa GZ29112 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF051838	Gen de la poliproteína estructural VP2, VP4, VP3 de la cepa HK46 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF051839	Gen del precursor de la poliproteína VP2 estructural de la cepa HKL6 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF069577	ARNm de región hipervariable de poliproteína VP2 de la cepa V877 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF069578	ARNm de región hipervariable de poliproteína VP2 de la cepa V877/K del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF069579	ARNm de región hipervariable de poliproteína VP2 de la cepa GT 101 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF076223	Gen de la proteína VP2 del aislado C4-2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF076224	Gen de la proteína VP2 del aislado AH-2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF076225	Gen de la proteína VP2 del aislado B2/28 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF076226	Gen de la proteína VP2 del aislado HD96 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF076227	Gen de la proteína VP2 del aislado JS-18 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF076228	Gen de la proteína VP2 del aislado D11-2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF076229	Gen de la proteína VP2 del aislado HN3 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF076230	Gen de la proteína VP2 del aislado TS del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF076231	Gen de la proteína VP2 del aislado BJ-1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF076232	Gen de la proteína VP2 del aislado Ark del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF076233	Gen de la proteína VP2 del aislado Ga del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF076234	Gen de la proteína VP2 del aislado Miss del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF076235	Gen de la proteína VP2 del aislado BV3 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial

Acceso N°	Descripción
AF076236	Gen de la proteína VP2 del aislado Univax del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF083092	Gen VP1 de la cepa Winterfield-2512 del segmento B del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF083093	Gen VP1 de la cepa IL3 del segmento B del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF083094	Gen VP1 de la cepa IL4 del segmento B del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF091097	ARNm de la proteína 2 (VP2) vírica del aislado 3212 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF091098	ARNm de la proteína 2 (VP2) vírica del aislado Miss del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF0791099	ARNm de la proteína 2 (VP2) vírica del aislado U28 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF092171	Genes VP5 y de poliproteína del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF092943	Genes VP5 (VP5) y de poliproteína estructural (VP2-3) del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF092944	Gen de ARN polimerasa (VP1) dependiente de ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF109154	Gen de poliproteína estructural del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF121256	Gen de la proteína VP2 (VP2) de cápside principal de segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF133904	Genes de poliproteína VP0 (vp0) y vp5 del segmento A de la cepa de variante E del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF133905	Gen de ARN polimerasa VP1 (vp1) dependiente de ARN de doble hebra de segmento B de la cepa de variante E del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF140705	Gen de poliproteína de segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF148073	ARNm de proteína VP2 del segmento A del aislado 002/73 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF148074	ARNm de proteína VP2 del segmento A del aislado V877/K del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF148075	ARNm de proteína VP2 del segmento A vivo del aislado Bursavac del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF148076	ARNm de proteína VP2 del segmento A del aislado 01/94 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF148077	ARNm de proteína VP2 del segmento A del aislado 02/95 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF148078	ARNm de proteína VP2 del segmento A del aislado 03/95 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF148079	ARNm de proteína VP2 del segmento A del aislado 04/95 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF148080	ARNm de proteína VP2 del aislado 06/95 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds

Acceso N°	Descripción
	parcial
AF148081	Gen de proteína VP2 del aislado 08/95 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF155123	Gen de poliproteína de XJ-9 RNA del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF159207	Gen VP2 del segmento A N4 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF159208	Gen VP2 del segmento A N6 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF159209	Gen VP2 del segmento A N7 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF159210	Gen VP2 del segmento A N8 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF159211	Gen VP2 del segmento A N9 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF159212	Gen VP2 del segmento A N10 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF159213	Gen VP2 del segmento A N11 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF159214	Gen VP2 del segmento A N13 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF159215	Gen VP2 del segmento A N14 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF159216	Gen VP2 del segmento A K357/88 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF159217	Gen VP2 del segmento A K280/89 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF159218	Gen VP2 del segmento A K406/89 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF159219	Gen VP2 del segmento A Cu-1 wt del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF165149	Gen VP5 y de poliproteína de la cepa K310 del segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF165150	Genes VP5 y de poliproteína de la cepa KK1 del segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF165151	Genes VP5 y de poliproteína de la cepa KSH del segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF194428	ARNm de VP5 y poliproteína de aislado CEF94 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF194429	ARNm de VP1 de aislado CEF94 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF203880	Gen VP1 segmento B de la cepa Ts del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF240686	ARNm de proteína 5 y poliproteína vírica de segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF240687	ARNm de la proteína 1 vírica de segmento B del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF247006	Genes VP5 y de poliproteína de segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF248612	Gen de proteína VP2 (VP2) del segmento A /UPM94/273 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF260317	gen de poliproteína del segmento A BLRI94/B551 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF262030	gen de proteína VP2 (VP2) de segmento A UPM92-04 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia parcial
AF279287	ARNm de poliproteína VP2 de segmento A de la cepa V97/TW del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial

Acceso Nº	Descripción
AF279288	ARNm de poliproteína VP2 de segmento A de la cepa 2512 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF279691	gen de la proteína VP2 de segmento A del aislado Ca586-BR del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281220	gen de proteína VP2 del aislado 1174 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281221	gen de la proteína VP2 del aislado 1568 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281222	gen de la proteína VP2 del aislado 1610 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281223	gen de la proteína VP2 del aislado 43 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281224	gen de la proteína VP2 del aislado 404 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281225	gen de la proteína VP2 del aislado 405 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281226	gen de la proteína VP2 del aislado E3 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281227	gen de la proteína VP2 del aislado E6 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281228	gen de la proteína VP2 del aislado GER del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281229	gen de la proteína VP2 del aislado Int20 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281230	gen de la proteína VP2 del aislado RS593 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281231	gen de región variable de proteína 2 vírica (VP2) del aislado BursinePlus del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281232	gen de región variable de proteína 2 vírica (VP2) del aislado Bursine2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281233	gen de región variable de proteína 2 vírica (VP2) del aislado F3 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281234	gen de región variable de proteína 2 vírica (VP2) del aislado H2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281235	gen de región variable de proteína 2 vírica (VP2) del aislado V1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281236	gen de región variable de proteína 2 vírica (VP2) del aislado R1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281237	gen de región variable de proteína 2 vírica (VP2) del aislado S 1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281238	gen de región variable de proteína 2 vírica (VP2) del aislado T1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281239	gen de región variable de proteína 2 vírica (VP2) del aislado U1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281240	gen de región variable de proteína 2 vírica (VP2) del aislado Q2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial

Acceso Nº	Descripción
AF281311	gen de proteína 2 vírica del aislado NZ2103/97 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281312	gen de la proteína 2 vírica del aislado NZ1105/98 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF281651	gen de poliproteína del segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293774	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado G81 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293775	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado G07 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293776	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado G11 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293777	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado G16 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293778	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado G2369 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293779	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado G48 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293780	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado G52 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293781	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado G67 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293782	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado G68 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293783	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado G71 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293784	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado G72 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293785	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado G75 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293786	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado G79 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293787	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado G02 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293788	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado de Variante E del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293789	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado Edgar del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293790	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado Lukert del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293791	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado Mississippi del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293792	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado de Variante A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial

Acceso N°	Descripción
	infecciosa, cds parcial
AF293793	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado aphis del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293794	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado AvimmuneF del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293795	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado Bursine II del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293796	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado Gumboral CT del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293797	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado Gumboro Nobilis del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293798	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado Gumborvet del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293799	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado Gumbovax del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293800	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado Matternalin del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293801	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado Ultravac del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293802	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado Des603-BR del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293803	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado MC597-BR del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF293804	ARNm VP2 (VP2) de segmento A del aislado MC599-BR del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF303219	gen de la proteína VP2 de segmento A de la cepa T1/TW del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF303895	gen de la proteína VP2 del aislado 1174 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF303896	gen de la proteína VP2 del aislado V1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF304025	gen de la proteína 2 vírica (VP2) del aislado 92-12-12 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF304026	gen de la proteína 2 vírica (VP2) del aislado 94-3-6 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF304027	gen de la proteína 2 vírica (VP2) del aislado 94-3-10 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF304028	gen de la proteína 2 vírica (VP2) del aislado MB del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF305736	gen de la proteína VP2 del aislado L1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF305737	gen de la proteína VP2 del aislado L1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF305738	gen de la proteína VP2 del aislado 586 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial

Acceso N°	Descripción
AF305739	gen de la proteína VP2 del aislado 586 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF305740	gen de la proteína VP2 del aislado U2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF305741	gen de la proteína VP2 del aislado U2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF305742	gen de la proteína VP2 del aislado Q2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF305743	gen de la proteína VP2 del aislado Q2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF312371	gen de la proteína VP2 (VP2) del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF312793	ARNm de poliproteína de segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF321054	ARNm de VP5 y poliproteína de segmento A de la cepa HZ2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF321055	ARNm de VP5 y poliproteína de segmento A de la cepa JD1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF321056	ARNm de VP5 y poliproteína de segmento A de la cepa ZJ2000 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF322444	genes de proteína VP5 y poliproteína de segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF322445	gen de proteína VP1 de segmento B del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF362747	ARNm de poliproteína Cu-1 wt del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF362748	ARNm de ARN polimerasa dependiente de ARN Cu-1wt del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF362770	gen VP2 de ARN polimerasa dependiente de ARN de la cepa BD 3/99 de segmento del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF362771	gen de poliproteína estructural de segmento A de la cepa Cu-1 M del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF362772	gen VP1 de ARN polimerasa dependiente de ARN de segmento B de la cepa Cu-1 M del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF362773	gen de poliproteína estructural de segmento A de la cepa 23/82 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF362774	gen VP1 de ARN polimerasa dependiente de ARN de segmento B de la cepa 23/82 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF362775	gen VP1 de ARN polimerasa dependiente de ARN de segmento B de la cepa Cu-1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF362776	gen de poliproteína estructural de segmento A de la cepa BD 3/99 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF381000	gen de la proteína VP2 del aislado 01/96 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial

Acceso N°	Descripción
AF381001	gen de la proteína VP2 del aislado A-1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF381002	gen de la proteína VP2 del aislado M-1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF381003	ARNm de proteína VP2 del aislado R-1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF381004	gen de la proteína VP2 del aislado SS-1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF381005	gen de la proteína VP2 del aislado N1/99 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF381006	gen de la proteína VP2 del aislado K-2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF381007	ARNm de proteína VP2 del aislado T-4 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF381008	gen de la proteína VP2 del aislado Y5-3 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF381009	ARNm de proteína VP2 del aislado H-1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF381010	gen de la proteína VP2 del aislado C-1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF381011	gen de la proteína VP2 del aislado 05-5 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF413069	ARNm de proteína VP2 de la cepa BJ836 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF413070	ARNm de proteína 2 vírica de la cepa BX del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF413071	ARNm de proteína 2 vírica de la cepa LM del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF413072	ARNm de proteína 2 vírica de la cepa HD98 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF413073	ARNm de proteína 2 vírica de la cepa HB97 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF413074	ARNm de proteína 2 vírica de la cepa FJ del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF413075	ARNm de proteína 2 vírica de la cepa SC del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF413076	ARNm de proteína 2 vírica de la cepa YY del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF416620	ARNm de proteína 2 vírica de la cepa BK912 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF416621	ARNm de proteína 2 vírica de la cepa CJ801 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial

Acceso Nº	Descripción
AF416622	ARNm de proteína 2 vírica de la cepa DMS del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF416623	ARNm de proteína 2 vírica de la cepa NC del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF416624	ARNm de proteína 2 vírica de la cepa LX del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF416625	ARNm de proteína 2 vírica de la cepa LN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF416626	ARNm de proteína 2 vírica de la cepa QV del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF416627	ARNm de proteína 2 vírica de la cepa GZ902 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF426063	gen de poliproteína del aislado I-1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF426064	gen de poliproteína del aislado 01/00 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF426065	gen de poliproteína del aislado 01/01 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF426066	gen de poliproteína del aislado 03-4 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF426067	gen de poliproteína del aislado 02/00 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF427103	gen de la proteína VP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF443294	gen de poliproteína del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF454945	Segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia completa
AF455136	Segmento B del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia completa
AF457103	gen de la proteína VP2 de la cepa ABIC/MB71 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF457104	gen de la proteína VP2 de la cepa Int/228E del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF457105	gen de la proteína VP2 de la cepa Sanofi/2512 IM/TW del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF457106	gen de la proteína VP2 de la cepa Univax/G603/TW del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF464901	gen VP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF487340	ARNm VP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF491865	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa SP3338 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF493979	gen VP1 de ARN polimerasa dependiente ARN de la cepa HZ2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF498618	gen de la proteína 2 vírica (VP2) del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498619	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa MX7502 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498620	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa MX7504 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498621	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa MX7506 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial

Acceso N°	Descripción
AF498622	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa MX7997 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498623	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa DR3237 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498624	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa BR-5 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498625	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa DR-1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498626	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa DR-2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498627	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa C-278 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498628	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa 1084E del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498629	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa 89/03 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498630	gen de la proteína 2 vírica (VP2) del aislado 9865 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498631	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa Bursine 2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498632	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa Bursine Plus del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498633	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa Bursavac del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498634	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa KR-1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498635	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa U-28 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF498636	gen de proteína 2 (VP2) vírica de la cepa BR-8 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF499929	genes VP5 (VP5) y de poliproteína (pol) del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF499930	gen (VP1) ARN polimerasa dependiente de ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF506494	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb3, cds parcial
AF506495	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb5, cds parcial
AF506496	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb7, cds parcial
AF506497	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb8, cds parcial

Acceso N°	Descripción
AF506498	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb11, cds parcial
AF506499	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb12, cds parcial
AF506500	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb15, cds parcial
AF506501	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb20, cds parcial
AF506502	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb21, cds parcial
AF506503	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb22, cds parcial
AF506504	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb23, cds parcial
AF506505	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb24, cds parcial
AF506506	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb33, cds parcial
AF506507	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb34, cds parcial
AF506508	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb52, cds parcial
AF506509	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb72, cds parcial
AF506510	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb83, cds parcial
AF506511	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb96, cds parcial
AF506512	ARNm del fragmento variable de cadena individual de inmunoglobulina G del clon de construcción sintética CRAb0, cds parcial
AF508176	Segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia completa
AF508177	gen VP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF508738	ARNm de proteína VP2 de segmento A del aislado Indo1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF508739	ARNm de proteína VP2 de segmento A del aislado Indo2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF508740	ARNm de proteína VP2 de segmento A del aislado Indo3 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF508741	ARNm de proteína VP2 de segmento A del aislado Indo4 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF508742	ARNm de proteína VP2 de segmento A del aislado Indo5 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial

Acceso Nº	Descripción
AF508743	ARNm de proteína VP2 de segmento A del aislado Indo6 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF508744	ARNm de proteína VP2 de segmento A del aislado Indo7 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF508745	ARNm de proteína VP2 de segmento A del aislado Indo8 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF508746	ARNm de proteína VP2 de segmento A del aislado Indo9 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF508747	ARNm de proteína VP2 de segmento A del aislado Indo10 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF508748	ARNm de proteína VP2 de segmento A del aislado Indo11 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF508749	ARNm de proteína VP2 de segmento A del aislado Indo13 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF508750	ARNm de proteína VP2 de segmento A del aislado Indo14 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF508751	ARNm de proteína VP2 de segmento A del aislado Indo15 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF508752	ARNm de proteína VP2 de segmento A del aislado Indol6 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF508753	ARNm de proteína VP2 de segmento A del aislado Indol7 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF527038	gen de ARN polimerasa dependiente de ARN de la cepa UPM94/273 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF527039	genes VP5 y de poliproteína de la cepa UPM94/273 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF527040	gen de ARN polimerasa dependiente de ARN de la cepa UPM97/61 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF533670	ARNm de poliproteína de la cepa SH/92 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AF533671	gen VP2 de la cepa 225 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF533672	gen VP2 de la cepa 225V4 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF533673	gen VP2 de la cepa 310 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF533674	gen VP2 de la cepa 310V4 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF533675	gen VP2 de la cepa 269 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF533676	gen VP2 de la cepa 269V4 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF533677	gen VP2 de la cepa K1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF533678	gen VP2 de la cepa K1 V4 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF533679	gen VP2 de la cepa SH/92V4 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF537268	Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa de ARNm de poliproteína de pollo, cds parcial
AF537269	Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa de ARNm de poliproteína de pato, cds parcial
AF537270	Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa de ARNm de poliproteína de ganso, cds parcial

Acceso Nº	Descripción
AF537271	Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa de ARNm de poliproteína de gorrión, cds parcial
AF548653	gen de la proteína VP2 de la cepa P10 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF548654	gen de la proteína VP2 de la cepa P11 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF548655	gen de la proteína VP2 de la cepa P1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF548656	gen de la proteína VP2 de la cepa P3 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF548657	gen de la proteína VP2 de la cepa P7 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF548658	gen de la proteína VP2 de la cepa P9 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF548659	gen de la proteína VP2 de la cepa MOH96 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AF548660	gen de la proteína VP2 de la cepa 35.592 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AJ001941	ARNm de la enfermedad de la bursitis infecciosa para proteína de cápside VP2, cepa 88180, parcial
AJ001942	ARNm de la enfermedad de la bursitis infecciosa para proteína de cápside VP2, cepa 89224, parcial
AJ001943	ARNm de la enfermedad de la bursitis infecciosa para proteína de cápside VP2, cepa 91184, parcial
AJ001944	ARNm de la enfermedad de la bursitis infecciosa para proteína de cápside VP2, cepa 91247, parcial
AJ001945	ARNm de la enfermedad de la bursitis infecciosa para proteína de cápside VP2, cepa 92309, parcial
AJ001946	ARNm de la enfermedad de la bursitis infecciosa para proteína de cápside VP2, cepa 95072/2, parcial
AJ001947	ARNm de la enfermedad de la bursitis infecciosa para proteína de cápside VP2, cepa 95072/8, parcial
AJ001948	ARNm de la enfermedad de la bursitis infecciosa para proteína de cápside VP2, cepas 96108 y 96236, parcial
AJ238647	ARNm de la enfermedad de la bursitis infecciosa para proteína de cápside 2 vírica, parcial
AJ245883	Gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural, aislado KT1/98
AJ245884	Gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural, aislado AP1/93
AJ245885	Gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural, aislado CH2/97
AJ245886	Gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural, aislado CH1/97
AJ249517	Gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural
AJ249518	Gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural, aislado HR1/96
AJ249519	Gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural, aislado intermedio plus
AJ249520	Gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural, aislado JK1/97
AJ249521	Gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural, aislado KT1/98

Acceso N°	Descripción
AJ249522	Gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural, aislado TP1/96
AJ249523	Gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural, aislado Tri-bio
AJ249524	Gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural, aislado UP2/97
AJ277801	Gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, aislado UP1/99, ARN genómico
AJ295021	gen vp1 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, aislado RJ1/94, ARN genómico
AJ295022	gen vp1 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, aislado KT1/98, ARN genómico
AJ295023	gen vp1 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, aislado TN1/93, ARN genómico
AJ295024	gen vp1 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, aislado POONA, ARN genómico
AJ295025	gen vp1 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, aislado IM+, ARN genómico
AJ295026	gen vp1 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, aislado AP1/93, ARN genómico
AJ295027	gen vp1 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, aislado UP1/97, ARN genómico
AJ295028	gen vp1 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, aislado LUKERT, ARN genómico
AJ295029	gen vp2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, aislado MH1/97, ARN genómico
AJ310185	ARN genómico del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para genes de poliproteína VP5
AJ310186	ARN genómico del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para ARN polimerasa dependiente de ARN
AJ315026	ARN genómico parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína VP2, aislado Hyd(SPF10)
AJ315027	ARN genómico parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína VP2, aislado Hyd(BGM7)
AJ315028	ARN genómico parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína VP2, aislado Hyd(C)
AJ318896	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína
AJ318897	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para proteína VP1
AJ344251	gen vp2 parcial provírico del virus de Gumboro para una región variable VP2, ARN genómico
AJ404327	ARN parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2 (gen vp2)
AJ416444	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para el antígeno protector del huésped, ARN genómico
AJ416445	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para el antígeno protector del huésped, ARN genómico
AJ427340	ARN genómico del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína, aislado KT1/99
AJ496637	Gen VP1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para ARN polimerasa, ARN genómico
AJ504473	ARNm parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2
AJ577092	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico
AJ586916	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NIE/95/001 /c

Acceso N°	Descripción
AJ586917	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IBDV/Ogun.NIE/95/007/c
AJ586918	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/957003/c
AJ586919	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/95/008/c
AJ586920	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/95/016/c
AJ586921	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Ogun. NI E/96/005/c
AJ586922	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Ogun. NI E/96/086/c
AJ586923	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Ogun. NI E/96/080/c
AJ586924	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Osun. NI E/96/076/c
AJ586925	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Osun. NI E/96/036/c
AJ586926	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/96/090/c
AJ586927	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/96/017/c
AJ586928	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/96/077/c
AJ586929	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/96/033/c
AJ586930	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IBDV/Lagos.NIE/97/011/c
AJ586931	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IBDV/Ogun.NIE/97/010/c
AJ586932	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Ogun. NI E/97/014/c
AJ586933	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Ogun. NI E/97/078/c
AJ586934	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Ogun.NI E797/082/c
AJ586935	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Osun. NI E/97/092/c
AJ586936	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/97/057/c
AJ586937	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/97/006/c

Acceso N°	Descripción
AJ586938	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/97/013/c
AJ586939	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo.NIE/97/102/c
AJ586940	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/97/222/c
AJ586941	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NIE/97/001 /t
AJ586942	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/97/004/t
AJ586943	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/97/012/t
AJ586944	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IBDV/Ogun.NIE/98/120/c
AJ586945	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IBDV/Ogun.NIE/98/085/c
AJ586946	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Osun. NI E/98/062/c
AJ586947	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/98/084/c
AJ586948	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IBDV/Oyo.NIE/98/027/c
AJ586949	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IBDV/Oyo.NIE/98/227/c
AJ586950	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IBDV/Oyo.NIE/98/059/c
AJ586951	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/98/058/c
AJ586952	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/98/009/t
AJ586953	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Ogun. NI E/99/034/c
AJ586954	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Osun. NI E/99/030/c
AJ586955	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IBDV/Oyo.NIE/99/015/c
AJ586956	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/99/050/c
AJ586957	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IBDV/Oyo.NIE/99/054/c
AJ586958	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Osun. NI E/00/046/c

Acceso N°	Descripción
AJ586959	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IB DV/Oyo. NI E/00/042/c
AJ586960	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado Ventri (vacuna)
AJ586961	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado BURSINE Plus (vacuna)
AJ586962	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado MB (vacuna)
AJ586963	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado D78
AJ586964	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado NVRI-VOM (vacuna)
AJ586965	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado IBA (vacuna)
AJ586966	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado Nobilis Gumboro 228E (vacuna)
AJ586967	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado Bursaplex (vacuna)
AJ586968	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado V877 (vacuna)
AJ586969	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, ARN genómico, aislado 1084E
AR265314	Secuencia 1 de la patente de Estados Unidos 6492148
AR265315	Secuencia 2 de la patente de Estados Unidos 6492148
AR265316	Secuencia 3 de la patente de Estados Unidos 649214
AR265317	Secuencia 4 de la patente de Estados Unidos 6492148
AR265318	Secuencia 5 de la patente de Estados Unidos 6492148
AR265319	Secuencia 6 de la patente de Estados Unidos 6492148
AR265320	Secuencia 7 de la patente de Estados Unidos 6492148
AR265321	Secuencia 8 de la patente de Estados Unidos 6492148
AR265322	Secuencia 9 de la patente de Estados Unidos 6492148
AR283491	Secuencia 1 de la patente de Estados Unidos 6528063
AR337890	Secuencia 1 de la patente de Estados Unidos 6569422
AR337891	Secuencia 2 de la patente de Estados Unidos 6569422
AR337892	Secuencia 3 de la patente de Estados Unidos 6569422
AR337893	Secuencia 4 de la patente de Estados Unidos 6569422
AR337894	Secuencia 5 de la patente de Estados Unidos 6569422
AR337895	Secuencia 6 de la patente de Estados Unidos 6569422
AR337896	Secuencia 7 de la patente de Estados Unidos 6569422
AR337897	Secuencia 8 de la patente de Estados Unidos 6569422
AR337898	Secuencia 9 de la patente de Estados Unidos 6569422
AX034695	Secuencia 1 de la patente EP1035203
AX034696	Secuencia 2 de la patente EP1035203
AX034697	Secuencia 3 de la patente EP1035203

Acceso N°	Descripción
AX034698	Secuencia 4 de la patente EP1035203
AX034699	Secuencia 5 de la patente EP1035203
AX034700	Secuencia 6 de la patente EP1035203
AX034701	Secuencia 7 de la patente EP1035203
AX034702	Secuencia 8 de la patente EP1035203
AX034703	Secuencia 9 de la patente EP1035203
AX074441	Secuencia 1 de la patente WO0104319
AX074442	Secuencia 2 de la patente WO0104319
AX074443	Secuencia 3 de la patente WO0104319
AX074444	Secuencia 4 de la patente WO0104319
AX074445	Secuencia 5 de la patente WO0104319
AX074446	Secuencia 6 de la patente WO0104319
AX074447	Secuencia 7 de la patente WO0104319
AX074448	Secuencia 8 de la patente WO0104319
AX074449	Secuencia 9 de la patente WO0104319
AX074450	Secuencia 10 de la patente WO0104319
AX074451	Secuencia 11 de la patente WO0104319
AX074452	Secuencia 12 de la patente WO0104319
AX074453	Secuencia 13 de la patente WO0104319
AX074454	Secuencia 14 de la patente WO0104319
AX074455	Secuencia 15 de la patente WO0104319
AX074456	Secuencia 16 de la patente WO0104319
AX074457	Secuencia 17 de la patente WO0104319
AX074458	Secuencia 18 de la patente WO0104319
AX074459	Secuencia 19 de la patente WO0104319
AX074460	Secuencia 20 de la patente WO0104319
AX074461	Secuencia 21 de la patente WO0104319
AX074462	Secuencia 22 de la patente WO0104319
AX074463	Secuencia 23 de la patente WO0104319
AX074464	Secuencia 24 de la patente WO0104319
AX074465	Secuencia 25 de la patente WO0104319
AX074466	Secuencia 26 de la patente WO0104319
AX074467	Secuencia 27 de la patente WO0104319
AX074468	Secuencia 28 de la patente WO0104319
AX074469	Secuencia 29 de la patente WO0104319
AX074470	Secuencia 30 de la patente WO0104319
AX074471	Secuencia 31 de la patente WO0104319
AX074472	Secuencia 32 de la patente WO0104319
AX074473	Secuencia 33 de la patente WO0104319
AX074474	Secuencia 34 de la patente WO0104319
AX074475	Secuencia 35 de la patente WO0104319
AX074476	Secuencia 36 de la patente WO0104319

Acceso Nº	Descripción
AX074477	Secuencia 37 de la patente WO0104319
AX074478	Secuencia 38 de la patente WO0104319
AX074479	Secuencia 39 de la patente WO0104319
AX074480	Secuencia 40 de la patente WO0104319
AX074481	Secuencia 41 de la patente WO0104319
AX074482	Secuencia 42 de la patente WO0104319
AX074483	Secuencia 43 de la patente WO0104319
AX074484	Secuencia 44 de la patente WO0104319
AX074485	Secuencia 45 de la patente WO0104319
AX074486	Secuencia 46 de la patente WO0104319
AX074487	Secuencia 47 de la patente WO0104319
AX074488	Secuencia 48 de la patente WO0104319
AX074489	Secuencia 49 de la patente WO0104319
AX074490	Secuencia 50 de la patente WO0104319
AX074491	Secuencia 51 de la patente WO0104319
AX074492	Secuencia 52 de la patente WO0104319
AX074493	Secuencia 53 de la patente WO0104319
AX074494	Secuencia 54 de la patente WO0104319
AX074495	Secuencia 55 de la patente WO0104319
AX074496	Secuencia 56 de la patente WO0104319
AX074497	Secuencia 57 de la patente WO0104319
AX074498	Secuencia 58 de la patente WO0104319
AX074508	Secuencia 68 de la patente WO0104319
AX074509	Secuencia 69 de la patente WO0104319
AX074510	Secuencia 70 de la patente WO0104319
AX074511	Secuencia 71 de la patente WO0104319
AX074512	Secuencia 72 de la patente WO0104319
AX074513	Secuencia 73 de la patente WO0104319
AX074514	Secuencia 74 de la patente WO0104319
AX138218	Secuencia 1 de la patente EP1069187
AX138219	Secuencia 2 de la patente EP1069187
AX138220	Secuencia 3 de la patente EP1069187
AX138221	Secuencia 4 de la patente EP1069187
AX138222	Secuencia 5 de la patente EP1069187
AX138223	Secuencia 6 de la patente EP1069187
AX138224	Secuencia 7 de la patente EP1069187
AX138225	Secuencia 8 de la patente EP1069187
AX138226	Secuencia 9 de la patente EP1069187
AX138227	Secuencia 10 de la patente EP1069187
AX138228	Secuencia 11 de la patente EP1069187
AX138229	Secuencia 12 de la patente EP1069187
AX138230	Secuencia 13 de la patente EP1069187

Acceso Nº	Descripción
AX138231	Secuencia 14 de la patente EP1069187
AX138232	Secuencia 15 de la patente EP1069187
AX138233	Secuencia 16 de la patente EP1069187
AX138234	Secuencia 17 de la patente EP1069187
AX138235	Secuencia 18 de la patente EP1069187
AX138236	Secuencia 19 de la patente EP1069187
AX138237	Secuencia 20 de la patente EP1069187
AX138238	Secuencia 21 de la patente EP1069187
AX138239	Secuencia 22 de la patente EP1069187
AX138240	Secuencia 23 de la patente EP1069187
AX138241	Secuencia 24 de la patente EP1069187
AX138242	Secuencia 25 de la patente EP1069187
AX138243	Secuencia 26 de la patente EP1069187
AX138244	Secuencia 27 de la patente EP1069187
AX138245	Secuencia 28 de la patente EP1069187
AX138246	Secuencia 29 de la patente EP1069187
AX138247	Secuencia 30 de la patente EP1069187
AX138257	Secuencia 40 de la patente EP1069187
AX138258	Secuencia 41 de la patente EP1069187
AX138259	Secuencia 42 de la patente EP1069187
AX138260	Secuencia 43 de la patente EP1069187
AX138261	Secuencia 44 de la patente EP1069187
AX138262	Secuencia 45 de la patente EP1069187
AX138263	Secuencia 46 de la patente EP1069187
AX323155	Secuencia 1 de la patente WO0192486
AX323157	Secuencia 3 de la patente WO0192486
AX323158	Secuencia 4 de la patente WO0192486
AX343661	Secuencia 1 de la patente EP1170302
AX343663	Secuencia 3 de la patente EP1170302
AX709623	Secuencia 9 de la patente WO0209694
AX709650	Secuencia 36 de la patente WO02096940
AX709651	Secuencia 37 de la patente WO02096940
AX709652	Secuencia 38 de la patente WO02096940
AX709653	Secuencia 39 de la patente WO02096940
AX709654	Secuencia 40 de la patente WO02096940
AX709655	Secuencia 41 de la patente WO02096940
AX709656	Secuencia 42 de la patente WO02096940
AX709657	Secuencia 43 de la patente WO02096940
AX709658	Secuencia 44 de la patente WO02096940
AX709659	Secuencia 45 de la patente WO02096940
AX709660	Secuencia 46 de la patente WO02096940
AX709661	Secuencia 47 de la patente WO02096940

Acceso Nº	Descripción
AX709662	Secuencia 48 de la patente WO02096940
AX709663	Secuencia 49 de la patente WO02096940
AX709664	Secuencia 50 de la patente WO02096940
AX709665	Secuencia 51 de la patente WO02096940
AX709666	Secuencia 52 de la patente WO02096940
AX709667	Secuencia 53 de la patente WO02096940
AX709668	Secuencia 54 de la patente WO02096940
AX709669	Secuencia 55 de la patente WO02096940
AX709670	Secuencia 56 de la patente WO02096940
AX709671	Secuencia 57 de la patente WO02096940
AX709672	Secuencia 58 de la patente WO02096940
AX709673	Secuencia 59 de la patente WO02096940
AX709674	Secuencia 60 de la patente WO02096940
AX709675	Secuencia 61 de la patente WO02096940
AX709676	Secuencia 62 de la patente WO02096940
AX709677	Secuencia 63 de la patente WO02096940
AX709678	Secuencia 64 de la patente WO02096940
AX721965	Secuencia 1 de la patente EP1298139
AX721968	Secuencia 4 de la patente EP1298139
AX721969	Secuencia 5 de la patente EP1298139
AX721970	Secuencia 6 de la patente EP1298139
AX721971	Secuencia 7 de la patente EP1298139
AX721972	Secuencia 8 de la patente EP1298139
AX721975	Secuencia 11 de la patente EP1298139
AX721976	Secuencia 12 de la patente EP1298139
AX721977	Secuencia 13 de la patente EP1298139
AX721978	Secuencia 14 de la patente EP1298139
AX721979	Secuencia 15 de la patente EP1298139
AX721980	Secuencia 16 de la patente EP1298139
AX721988	Secuencia 24 de la patente EP1298139
AX721989	Secuencia 25 de la patente EP1298139
AY012677	ARNm de proteína 2 vírica (VP2) de segmento A del aislado 619 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY012678	ARNm de proteína 2 vírica (VP2) de segmento A del aislado 625 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY012679	ARNm de proteína 2 vírica (VP2) de segmento A del aislado 849 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY012680	ARNm de proteína 2 vírica (VP2) de segmento A del aislado 850 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY012681	ARNm de proteína 2 vírica (VP2) de segmento A del aislado 853 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY012682	ARNm de proteína 2 vírica (VP2) de segmento A del aislado 11153 del virus de la enfermedad de la

Acceso N°	Descripción
	bursitis infecciosa, cds parcial
AY012683	ARNm de proteína 2 vírica (VP2) de segmento A del aislado 9109 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY029165	gen de ARN polimerasa dependiente de ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AY029166	genes de proteína no estructural de 17 kDa y poliproteína de 110 kDa del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AY065630	ARNm VP2 (VP2) del aislado IBDTCN2001 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY065631	ARNm VP2 (VP2) del aislado IBDTCL2001 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY065632	ARNm VP2 (VP2) del aislado IBDTRP1999/2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY065633	proteína no funcional VP2 del aislado IBDTTN2000 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia parcial
AY065634	ARNm de proteína no funcional VP2 del aislado IBDTNK2001/1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia parcial
AY065635	ARNm VP2 (VP2) del aislado IBDTNK2001 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY065636	ARNm de proteína no funcional VP2 del aislado IBDTNK1999/1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia parcial
AY065637	ARNm VP2 (VP2) del aislado IBDTCB2001 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY083925	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de segmento A de la cepa VG-248 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY083926	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de segmento A de la cepa 5939 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY083927	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de segmento A de la cepa VG-311 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY083928	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de segmento A de la cepa VG-313 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY083929	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de segmento A de la cepa VG-262 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY083930	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de segmento A de la cepa 6145 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY083931	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de segmento A de la cepa VG-208 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY083932	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de segmento A de la cepa VG-276 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY083933	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de segmento A de la cepa 7333 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY094618	gen de poliproteína del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial

Acceso Nº	Descripción
AY095229	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa Edgar del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY095230	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa Lukert del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY095231	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa Ohio del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY095534	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa Mor del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY099456	Genes VP5 (VP5) y de poliproteína del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AY099457	gen VP1 (VP1) del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AY099997	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa Ven-1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY099998	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa Ven-2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY099999	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa Ven-3 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY100000	de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa Ven-4 gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY100001	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa Ven-5 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY100319	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa EC-3 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY100320	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa MTA del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY100321	gen de la proteína 2 vírica (VP2) de la cepa PAD del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY103464	gen VP1 de ARN polimerasa dependiente de ARN de la cepa JD1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AY115569	gen de la proteína VP2 de la cepa GDA del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY115570	gen de la proteína VP2 de la cepa GHD del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY115571	gen de la proteína VP2 de la cepa GPT del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY134874	gen de poliproteína de la cepa SH95 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AY134875	gen (VP2) de ARN polimerasa dependiente de ARN de la cepa SH95 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AY245550	gen de la proteína VP2 del aislado UPM 93273 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY288047	ARNm de VP2 del aislado SD1-97 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY288048	ARNm VP2 del aislado JS30-99 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial

Acceso Nº	Descripción
AY305386	ARNm (VP2) de proteína 2 vírica del aislado GX8/99 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY305387	ARNm de proteína 2 vírica (VP2) del aislado SD3-98 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY311479	gen (VP2) del proteína estructural VP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY318758	gen de región hipervariable (VP2) de proteína VP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY319768	genes VP5 y de poliproteína de la cepa NB del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AY321508	ARNm VP5 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AY321509	ARNm VP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AY321518	gen VP2 del aislado CO/2003 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY321519	gen VP2 no funcional del aislado DH/2003 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia parcial
AY321520	gen VP2 no funcional del aislado DHA/2003 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia parcial
AY321521	gen VP2 no funcional del aislado KAA/2003 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia parcial
AY321522	gen VP2 del aislado NAMI/2003 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY321523	gen VP2 no funcional del aislado NAM2/2003 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia parcial
AY321524	gen VP2 del aislado NAM3/2003 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY321525	gen VP2 no funcional del aislado NAMIV/2003 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia parcial
AY321526	gen VP2 no funcional del aislado TNU/2003 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia parcial
AY321527	gen VP2 del aislado VV/2003 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY321949	gen VP2 de la cepa 849VB del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY321950	gen VP2 de la cepa 96108 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY321951	gen VP2 de la cepa CJ801 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY321952	gen VP2 de la cepa Cu-1wt del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY321953	gen VP2 de la cepa F52-70 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY321954	gen VP2 de la cepa GX del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY321955	gen VP2 de la cepa Harbin del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY321956	gen VP2 de la cepa Henan1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY321957	gen VP2 de la cepa HK46 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY323952	genes VP5 de proteína estructural (VP5) y poliproteína de segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
AY327576	gen VP2 no funcional del aislado RAP del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia parcial
AY327577	gen VP2 no funcional del aislado RP del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia

Acceso N°	Descripción
	parcial
AY327578	gen VP2 no funcional del aislado SAL del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia parcial
AY327579	gen VP2 no funcional del aislado SALM del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia parcial
AY332560	gen de la proteína VP2 (VP2) del aislado IBD BLEN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY332561	gen de la proteína VP2 (VP2) del aislado Bursine-2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY332562	gen de la proteína VP2 (VP2) del aislado CEVAC IBD L del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY367560	gen de la proteína VP2 (VP2) del aislado NP2K del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
AY423560	gen VP2 (VP2) del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
BD000334	Mutantes del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) adaptado al cultivo celular creado por ingeniería genética
BD000335	Mutantes del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) adaptado al cultivo celular creado por ingeniería genética
BD000336	Mutantes del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) adaptado al cultivo celular creado por ingeniería genética
BD000337	Mutantes del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) adaptado al cultivo celular creado por ingeniería genética
BD000338	Mutantes del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) adaptado al cultivo celular creado por ingeniería genética
BD000339	Mutantes del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) adaptado al cultivo celular creado por ingeniería genética
BD000340	Mutantes del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) adaptado al cultivo celular creado por ingeniería genética
BD000341	Mutantes del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) adaptado al cultivo celular creado por ingeniería genética
BD000342	Mutantes del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) adaptado al cultivo celular creado por ingeniería genética
BD009825	Fórmula de vacuna de polinucleótido aviar
BD009826	Fórmula de vacuna de polinucleótido aviar
BD009827	Fórmula de vacuna de polinucleótido aviar
BD009829	Fórmula de vacuna de polinucleótido aviar
BD009830	Fórmula de vacuna de polinucleótido aviar
BD009832	Fórmula de vacuna de polinucleótido aviar
BD009833	Fórmula de vacuna de polinucleótido aviar
BD144646	Vacuna de amplio espectro para el virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa
BD144647	Vacuna de amplio espectro para el virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa
D00499	ARN genómico del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, segmento A que contiene ORF

Acceso Nº	Descripción
	grandes y ORF pequeños, cds completo
D00867	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína (VP2a-VP4-VP3), cds completo, cepa: Cu1
D00868	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína (VP2-VP4-VP3), cds parcial, cepa: PBG-98
D00869	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína (VP2-VP4-VP3), cds completo, cepa: 52/70
D10065	ARN genómico del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para VP2, secuencia parcial
D12609	ARN genómico del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, extremo 5' del segmento B
D12610	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para VP1, secuencia parcial
D16630	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína (región hipervariable), cds parcial, cepa: DV86
D16675	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína (región hipervariable), cds parcial, cepa: DV8
D16677	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína (región hipervariable), cds parcial, cepa: J1
D16678	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína (región hipervariable), cds parcial, cepa: K
D16679	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína (región hipervariable), cds parcial
D16828	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína (región hipervariable), cds parcial, cepa: GBF-1
D49706	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína (región hipervariable), cds parcial, cepa: OKYM
D49707	gen VP1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para ARN polimerasa, cds completo
D83985	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína (región hipervariable), cds parcial, cepa:
OKYMT	
D84071	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína (región hipervariable), cds parcial, cepa: TKSMT
D84072	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína (región hipervariable), cds parcial, cepa: TKSM
D86860	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para VP1, cds parcial, cepa: DV86
D86861	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para VP1, cds parcial, cepa: GBF-1
D87047	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para VP1, cds parcial, cepa: GBF-1E
D87048	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para VP1, cds parcial, cepa: LukertBP
D87049	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para VP1, cds parcial, cepa: J1
D87050	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para VP1, cds parcial, cepa: Cu-1
D87051	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para VP1, cds parcial, cepa: 2512
D87052	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para VP1, cds parcial, cepa: MO
E05277	ADNc que codifica una proteína estructural vírica dividida
E05442	secuencia de ADN del gen de SegA del VEBI

Acceso Nº	Descripción
E05443	secuencia de ADN del gen de SegA del VEBI
E05444	secuencia de ADN del gen de SegA del VEBI
E12060	ADNc que codifica proteína VP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI)
E12069	Secuencia de SegA del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI)
134206	Secuencia 1 de la patente de Estados Unidos 5595912
134207	Secuencia 2 de la patente de Estados Unidos 5595912
134208	Secuencia 3 de la patente de Estados Unidos 5595912
134209	Secuencia 4 de la patente de Estados Unidos 5595912
134210	Secuencia 5 de la patente de Estados Unidos 5595913
134211	Secuencia 6 de la patente de Estados Unidos 5595912
134212	Secuencia 7 de la patente de Estados Unidos 5595912
134213	Secuencia 8 de la patente de Estados Unidos 5595912
134214	Secuencia 9 de la patente de Estados Unidos 5595912
134215	Secuencia 10 de la patente de Estados Unidos 5595912
134216	Secuencia 11 de la patente de Estados Unidos 5595912
134217	Secuencia 12 de la patente de Estados Unidos 5595912
134218	Secuencia 13 de la patente de Estados Unidos 5595912
134219	Secuencia 14 de la patente de Estados Unidos 5595912
134220	Secuencia 15 de la patente de Estados Unidos 5595912
134221	Secuencia 18 de la patente de Estados Unidos 5595912
134222	Secuencia 26 de la patente de Estados Unidos 5595912
134223	Secuencia 28 de la patente de Estados Unidos 5595912
134224	Secuencia 30 de la patente de Estados Unidos 5595912
134225	Secuencia 32 de la patente de Estados Unidos 5595912
143648	Secuencia 1 de la patente de Estados Unidos 5632989
L19502	ARNm (VP1) de ARN polimerasa del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
L32984	gen OH del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, extremo 3' de cds
L32985	gen OH del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, extremo 3' de cds
L32986	ARN OH (OH) del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds parcial
L40429	Genes de la subunidad de reductasa grande de ribonucleótidos de herpesvirus 2 gallid (UL39), de la subunidad de reductasa pequeña de ribonucleótidos (UL40) y de la proteína de inhibición de viriones en el huésped (UL41), tres cds completos
L42284	Proteína vírica 2, Proteína vírica 4 y Proteína vírica 3 de segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa
M19336	Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa de pollos, segmento genómico de ARNdS pequeño que codifica una posible polimerasa, cds completo
M64285	ARNm de poliproteína del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (que codifica VP2 y VP4), extremo 5'
M66722	virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa de ARNm de precursor de VP2, VP3 y VP4 de segmento A de ARN grande de pollos, cds completo
M97346	genes VP2, VP3, VP4 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
NC_004178	Segmento A del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia completa

Acceso N°	Descripción
NC_004179	Segmento B del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, secuencia completa
S50730	(homología del genoma de la cepa STC) [virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa VEBI, E, ARN genómico, 310 nt]
U20950	gen (VP1) de ARN polimerasa de OH del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
U30818	gen de poliproteína estructural del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
U30819	gen de ARN polimerasa dirigida a ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
U62651	gen de ARN polimerasa VT1 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, cds completo
X03993	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína
X16107	gen VP5 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa CU-1) para la proteína vírica 5 y la poliproteína estructural
X54858	gen aviar del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para poliproteína, ARN genómico
X79600	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para VP2 (IBDV 9064-16)
X79601	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para VP2 (IBDV 9064-17)
X79602	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para VP2 (IBDV 9147)
X84022	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para el segmento A, 3-no codificante (23/82)
X84023	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para el segmento A, 5-no codificante (23/82)
X84024	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para el segmento B, 3-no codificante (23/82)
X84025	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para el segmento B, 5-no codificante (23/82)
X84026	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para el segmento A, 3-no codificante (Cu-1)
X84027	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para el segmento A, 5-no codificante (23/82)
X84028	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para el segmento B, 3-no codificante (Cu-1M)
X84029	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para el segmento B, 5-no codificante (Cu-1M)
X84030	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para el segmento A, 3-no codificante (Cu-1M)
X84031	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para el segmento A, 5-no codificante (Cu-1)
X84032	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para el segmento B, 3-no codificante (Cu-1)
X84033	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para el segmento B, 5-no codificante (Cu-1)
X84034	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para ORF pequeño (P2)
X84035	ARN del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para una posible polimerasa (P2)
X89570	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína VP2, ARN genómico
X92760	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para proteína VP5 y poliproteína VP2-4-3, ARN genómico
X92761	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para VP1 de ARN polimerasa dependiente de ARN, ARN genómico
X95883	gen del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa
X96430	gen VP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa
X96472	ARNm de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína de cápside VP2
X96718	gen VP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

Acceso N°	Descripción
Y14955	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, cepa 94432
Y14956	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, cepa 89163
Y14957	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, cepa 91168
Y14958	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, cepa Faragher 52/70
Y 14959	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, clon adaptado al cultivo celular de la variante A
Y14960	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, derivado clonado seleccionado en el laboratorio de la cepa Bursine2
Y14961	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, derivado clonado seleccionado en el laboratorio de la cepa CT
Y14962	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, derivado clonado seleccionado en el laboratorio de la cepa D78
Y14963	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, cepa EM3 de VEBI seleccionado en laboratorio
Y18612	gen VP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, parcial, aislado UP1/97
Y18650	virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, gen VP2, partial, aislado WB1/93
Y18682	gen VP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, parcial, aislado RJ1/94
221971	ORF del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa
Z25480	proteína VP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, CDS parcial
Z25481	proteína VP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, CDS parcial
Z25482	proteína VP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa, CDS parcial
Z96993	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-12/96
Z96994	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-1/93
Z96995	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-2/93
Z96996	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-3/93
Z96997	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-4/93

**Tabla 3: Proteína Entrez. Números de Acceso de las Secuencias Aminoacídicas del VEBI**

Acceso Nº	Descripción
A48546	poliproteína genómica - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa A) (fragmento)
AAA46237	ARN polimerasa
AAA46238	poliproteína
AAA46239	segmento A, poliproteína [virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAA52086	VP2, VP3 y VP4
AAA58741	OH
AAA58742	OH
AAA80220	ARN polimerasa
AAA80556	subunidad grande de reductasa de ribonucleótidos
AAA80557	subunidad pequeña de reductasa de ribonucleótidos
AAA80558	proteína de inhibición de viriones en el huésped
AAA89177	posible polimerasa
AAB22968	VP2 [virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa IBDV, serotipo 2, Péptido Parcial, 300 aa]
Z96998	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-5/93
Z96999	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-1/94
Z97000	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-2/94
Z97001	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-3/94
Z97002	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-5/94
Z97003	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-9/96
Z97004	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-7/94
Z97005	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-9/94
Z97006	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-1/95
Z97007	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-10/95
Z97008	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-12/95
Z97009	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-15/95
Z97010	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-1/96
Z97011	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-2/96

Acceso Nº	Descripción
Z97012	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-6/96
Z97013	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-8/96
Z97014	gen VP2 parcial del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa para la proteína estructural VP2, ARN genómico, aislado IBDVRF-14/96
AAB46090	Secuencia 16 de la patente de Estados Unidos 5595912
AAB46091	Secuencia 17 de la patente de Estados Unidos 5595912
AAB46092	Secuencia 19 de la patente de Estados Unidos 5595912
AAB46093	Secuencia 20 de la patente de Estados Unidos 5595912
AAB46094	Secuencia 21 de la patente de Estados Unidos 5595912
AAB46095	Secuencia 22 de la patente de Estados Unidos 5595912
AAB46096	Secuencia 23 de la patente de Estados Unidos 5595912
AAB46097	Secuencia 24 de la patente de Estados Unidos 5595912
AAB46098	Secuencia 25 de la patente de Estados Unidos 5595912
AAB46099	Secuencia 27 de la patente de Estados Unidos 5595912
AAB46100	Secuencia 29 de la patente de Estados Unidos 5595912
AAB46101	Secuencia 31 de la patente de Estados Unidos 5595912
AAB46102	Secuencia 33 de la patente de Estados Unidos 5595912
Lab46103	Secuencia 34 de la patente de Estados Unidos 5595912
AAB63594	proteína estructural [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAB68518	VP1 ARN polimerasa
AAB73033	Secuencia 2 de la patente de Estados Unidos 5632989
AAC06016	poliproteína estructural VP2, VP4, VP3 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC06017	poliproteína estructural VP2, VP4, VP3 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC06018	poliproteína estructural VP2 precursor [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC36480	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC36481	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC36482	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC55350	orf
AAC55351	poliproteína estructural
AAC55352	ARN polimerasa dirigida a ARN
AAC72901	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC72902	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC72903	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC72904	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC72905	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC72906	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC72907	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC72908	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC72909	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC72910	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]

Acceso Nº	Descripción
AAC72911	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC72912	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC72913	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC72914	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC78078	VP5; proteína no estructural [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAC78079	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD23373	poliproteína estructural [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD23374	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD23375	ARN polimerasa dependiente de ARN [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD25073	proteína de cápside principal VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD30136	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD32617	poliproteína VP0 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD32618	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD32619	VP1 de ARN polimerasa dependiente de ARN de doble hebra [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD36992	región hipervariable de poliproteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD36993	región hipervariable de poliproteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD36994	región hipervariable de poliproteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD43179	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD44525	poliproteína estructural [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD48020	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD48021	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD48022	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD48023	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD48024	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD48025	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD49775	VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD49776	VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAD49777	VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF07883	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF07884	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF07885	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF07886	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF07887	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF07888	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF07889	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF07890	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF07891	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF07892	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF07893	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF07894	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF07895	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]

Acceso Nº	Descripción
AAF16081	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF16082	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF16083	VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF67802	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF67803	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF67804	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF67805	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF67806	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF67807	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF67808	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF67809	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF67810	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF85952	proteína vírica 5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF85953	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF85954	proteína vírica 1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF86629	proteína estructural [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF86630	proteína estructural [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF86631	proteína estructural [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF86632	proteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF86633	proteína estructural [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF86634	proteína estructural [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF86635	proteína estructural [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF89210	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF91442	proteína vírica 2; VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF91443	proteína vírica 2; VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF98163	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF98164	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF98165	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF98166	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF98167	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF98168	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF98169	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF98170	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF98171	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF98172	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAF98173	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG01809	región variable de proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG01810	región variable de proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG01811	región variable de proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG01812	región variable de proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG01813	región variable de proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG01814	región variable de proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]

Acceso Nº	Descripción
AAG01815	región variable de proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG01816	región variable de proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG01817	región variable de proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG01818	región variable de proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG23824	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24574	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24575	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24576	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24577	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24578	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24579	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24580	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24581	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24582	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24583	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24584	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24585	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24586	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24587	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24588	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24589	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24590	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24591	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24592	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24593	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24594	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24595	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24596	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24597	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24598	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24599	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24600	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24601	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24602	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24603	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG24604	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG31694	VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG40005	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG40006	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG40007	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG40008	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG40009	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]

Acceso Nº	Descripción
AAG40010	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG41195	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AA041196	proteína vírica [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG41197	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG41198	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG42305	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG42306	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG42307	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG42308	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG42309	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG42310	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG42311	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG42312	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG45001	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG45002	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG45238	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG45239	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG45240	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG45241	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG45242	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG45243	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG45244	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG52759	poliproteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG52760	poliproteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG53939	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAG60048	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK12908	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK27323	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK30027	ARN polimerasa dependiente de ARN [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK30028	proteína no estructural de 17 kDa [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK30029	poliproteína de 110 kDa [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK50615	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK50616	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK51522	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK51523	ARN polimerasa dependiente de ARN [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK69710	VP1 de ARN polimerasa dependiente de ARN [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK69711	poliproteína estructural [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK69712	VP1 de ARN polimerasa dependiente de ARN [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK69713	poliproteína estructural [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK69714	VP1 de ARN polimerasa dependiente de ARN [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK69715	VP1 de ARN polimerasa dependiente de ARN [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK69716	poliproteína estructural [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]

Acceso Nº	Descripción
AAK72434	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAK72435	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL24821	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL35385	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL46930	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL57864	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL57865	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL57867	VP1 de ARN polimerasa dependiente de ARN [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL58578	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL58579	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL58580	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL58581	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL58582	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL75448	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL89461	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL89462	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL89463	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL89464	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL89465	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL89466	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL89467	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL89468	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL89469	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL89624	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL89625	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL89626	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL89627	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL89628	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL89629	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL89630	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAL93206	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM09565	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM11679	VP1 de ARN polimerasa dependiente de ARN [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM13411	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM13412	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM13413	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM13414	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM13415	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM13416	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM13417	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM13418	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM15645	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]

Acceso Nº	Descripción
AAM19248	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM19336	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM19337	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM19338	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM 19339	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM19340	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21057	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21058	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21059	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21060	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21061	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21062	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21063	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21064	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21065	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21066	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21067	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21068	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21069	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21909	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21910	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21911	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21912	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21913	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21914	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21915	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21916	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21917	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21918	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21919	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM21920	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM28898	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM28899	proteína vírica 5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM28900	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM45383	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM45384	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM45385	VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM46155	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM46156	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM46157	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM46158	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM46159	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]

Acceso Nº	Descripción
AAM46160	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM46161	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM46162	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM46163	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM46164	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM46165	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM46166	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM51641	VP1 de ARN polimerasa dependiente de ARN [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM76667	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM76668	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM76669	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM90732	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM90733	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM90734	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM90735	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM90736	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM90791	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM90792	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM90793	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM90794	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM97561	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAM97562	ARN polimerasa dependiente de ARN [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAN04459	ARN polimerasa dependiente de ARN [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAN04460	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAN04461	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAN04462	ARN polimerasa dependiente de ARN [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAN04902	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAN04903	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAN04904	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAN04905	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAN52491	proteína VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAN52492	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAN52493	proteína VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAN87130	OH [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15767	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15768	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15847	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15848	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15849	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15850	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15851	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15852	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]

Acceso Nº	Descripción
AAO15853	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15854	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15855	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15856	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15857	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15858	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15859	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15860	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15861	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15862	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15863	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15864	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15865	fragmento variable de cadena sencilla de inmunoglubulina G [construcción sintética]
AAO15883	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15769	ARN polimerasa dependiente de ARN [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15884	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15885	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15886	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15887	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15888	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15889	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15890	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15891	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15892	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15893	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15894	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15895	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15896	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15897	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO15898	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO16168	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO16169	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO16170	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO16171	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO16172	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO16173	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO16174	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO16175	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO16176	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO49501	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAO86512	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP29956	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]

Acceso Nº	Descripción
AAP29957	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP29958	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP29959	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP29960	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP29961	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP29962	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP29963	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP46104	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP461105	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP68822	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP68823	proteína vírica 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP75635	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP79442	región hipervariable de Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP83585	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP83586	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP84061	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP84062	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP84365	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP84366	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP84367	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP84368	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP84369	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP84370	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP84371	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP84372	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP84373	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP85291	proteína estructural VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP85292	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP94894	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP94895	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP94896	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAP94897	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAQ00946	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAQ00947	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAQ00948	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAQ75525	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
AAQ99274	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA00390	producto de proteína sin nombre [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA00391	producto de proteína sin nombre [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA00740	poliproteína de 110 kD [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA00741	poliproteína de 110 kD [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA00742	producto de proteína sin nombre [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]

Acceso Nº	Descripción
BAA00743	producto de proteína sin nombre [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA00744	producto de proteína sin nombre [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA00745	poliproteína de 110 kD [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA00954	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA02135	VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA04056	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA04083	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA04108	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA08555	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA12175	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA12211	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA12212	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA21001	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA23207	ARN polimerasa [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA25201	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA25202	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA87931	VP2-4-3 poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA89953	VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA89954	VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA89955	VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA89956	VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA89957	VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA89958	VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA89959	VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
BAA89960	VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA01045	segmento de ARN grande [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA02133	segmento A ORF 3 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA02134	segmento A ORF 2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA02135	segmento A ORF 1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA02337	producto de proteína sin nombre [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA05110	proteína de cápside, VP2, dominio variable [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA05111	proteína de cápside, VP2, dominio variable [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA05112	proteína de cápside, VP2, dominio variable [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA05113	proteína de cápside, VP2, dominio variable [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA05114	proteína de cápside, VP2, dominio variable [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA05115	proteína de cápside, VP2, dominio variable [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA05116	proteína de cápside, VP2, dominio variable [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA05117	proteína de cápside, VP2, dominio variable [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA27629	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA34233	proteína vírica 5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa CU-1)]
CAA34234	poliproteína estructural [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa CU-1)]
CAA38637	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]

Acceso Nº	Descripción
CAA58850	producto de proteína sin nombre [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA58851	producto de proteína sin nombre [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA58852	producto de proteína sin nombre [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA61749	región hipervariable de la proteína proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA63415	VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA63416	VP2-4-3 poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA63417	VP1 ARN polimerasa [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA65132	VP2a proteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA65290	proteína de cápside VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA65326	proteína de cápside VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA65479	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA75177	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA75178	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA75179	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA75180	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA75181	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA75182	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA75183	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA75184	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA75185	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA79982	producto de proteína sin nombre [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA79983	producto de proteína sin nombre [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA80968	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA80969	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAA80970	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09667	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09668	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09669	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09670	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09671	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09672	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09673	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09674	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09675	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09676	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09677	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09678	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09679	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09680	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09681	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09682	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]

Acceso Nº	Descripción
CAB09683	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09684	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09685	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09686	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09687	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB09688	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB41892	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB41893	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB41894	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB55814	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB55815	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB62394	proteína de cápside 2 vírica [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB65129	proteína estructural (VP2) [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB65130	proteína estructural (VP2) [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB65131	proteína estructural (VP2) [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB65132	proteína estructural (VP2) [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB65133	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB65134	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB65135	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB65136	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB65137	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB65138	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB90215	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAB93983	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC13128	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC17775	proteína VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC17776	proteína VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC17777	proteína VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC17778	proteína VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC17779	proteína VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC17780	proteína VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC17781	proteína VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC17782	proteína VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC35320	ARN polimerasa dependiente de ARN [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC35469	VP5 proteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC35470	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC59949	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC59950	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC59951	Proteína VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC60254	región variable de VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC60256	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC60257	proteína VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]

Acceso Nº	Descripción
CAC94911	antígeno protector del huésped [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAC94912	antígeno protector del huésped [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAD20409	producto de proteína sin nombre [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAD22374	producto de proteína sin nombre [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAD22375	producto de proteína sin nombre [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAD24856	poliproteína [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAD24857	proteína VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAD43216	ARN polimerasa [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAD43217	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAD90224	producto de proteína sin nombre [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAD90225	producto de proteína no nombrado [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE11792	proteína estructural VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52917	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52918	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52919	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52920	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52921	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52922	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52923	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52924	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52925	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52926	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52927	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52928	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52929	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52930	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52931	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52932	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52933	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52934	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52935	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52936	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52937	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52938	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52939	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52940	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52941	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52942	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52943	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52944	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52945	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52946	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]

Acceso Nº	Descripción
CAE52947	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52948	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52949	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52950	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52951	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52952	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52953	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
GAE52954	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52955	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52956	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52957	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52958	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52959	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52960	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52961	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52962	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52963	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52964	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52965	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52966	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52967	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52968	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52969	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
CAE52970	VP2 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
GNXS52	poliproteína genómica - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa 52/70)
GNXS98	poliproteína genómica virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa PBG98)
GNXSAU	poliproteína genómica - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa 002-73)
GNXSCU	poliproteína genómica - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa Cu-1)
GNXSIE	poliproteína genómica - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa E) (fragmento)
GNXSIR	poliproteína genómica - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa STC)
GNXSOH	poliproteína genómica - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa OH)
JC1327	antígeno protector VP2 - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa
JQ0942	proteína hipotética de 17 K - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa 52/70)
JQ0943	proteína hipotética de 1,3 K - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa 52/70)
JQ2197	proteína estructural principal VP2 - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa 23/82, serotipo II)
JQ2198	proteína estructural principal VP2 - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa Cu-1, serotipo I)
JS0359	proteína hipotética de 16,6 K - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa
NP_690837	proteína de VP5 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
NP_690838	poliproteína de VP2-4-3 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]
NP_690839	ARN polimerasa dependiente de ARN de VP1 [Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa]

Acceso Nº	Descripción
P08364	Poliproteína estructural [Contiene: Proteína estructural VP2 principal; Proteína no estructural VP4; Proteína estructural secundaria VP3]
P12918	ARN polimerasa dirigida a ARN supuesta (proteína VP1) (RDRP)
P15480	Poliproteína estructural [Contiene: Proteína estructural VP2 principal; Proteína VP4 no estructural; Proteína estructural secundaria VP3]
P15481	PROTEÍNA HIPOTÉTICA DE 16,6 KD
P22173	ARN polimerasa dirigida a ARN supuesta (proteína VP1) (RDRP)
P22174	ARN polimerasa dirigida a ARN supuesta (proteína VP1) (RDRP)
P22351	Poliproteína estructural [Contiene: Proteína estructural VP2 principal; Proteína no estructural VP4; Proteína estructural secundaria VP3]
P22440	PROTEÍNA HIPOTÉTICA DE 16,6 KD
P25219	Poliproteína estructural [Contiene: Proteína estructural VP2 principal; Proteína no estructural VP4; Proteína estructural secundaria VP3]
P25220	Poliproteína estructural [Contiene: Proteína estructural VP2 principal; Proteína no estructural VP4; Proteína estructural secundaria VP3]
P25221	PROTEÍNA HIPOTÉTICA DE 16,6 KD
P25222	PROTEÍNA HIPOTÉTICA DE 16,6 KD
P27276	Poliproteína estructural [Contiene: Proteína estructural VP2 principal; Proteína VP4 no estructural; Proteína estructural secundaria VP3]
P29802	Poliproteína estructural [Contiene: Proteína estructural VP2 principal; Proteína no estructural VP4]
P31817	ARN polimerasa dirigida a ARN supuesto (proteína VP1) (RDRP)
RRXS15	ARN polimerasa dirigida a ARN (EC 2.7.7.48) - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa 52/70) (fragmento)
RRXS1B	ARN polimerasa dirigida a ARN (EC 2.7.7.48) - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa
S06090	proteína hipotética I - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepas Cu-1 y PBG-98)
S32213	proteína hipotética - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa
S32214	proteína hipotética - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa
S36415	proteína estructural VP2 - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa del Reino Unido) (fragmento)
S36418	proteína estructural VP2 - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (aislado de los Países Bajos) (fragmento)
S58005	proteína estructural VP2 - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (fragmento)
S71934	poliproteína genómica - virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (cepa E/DEL) (fragmento)

**[0182] Ejemplo de Referencia 7: Proventriculitis en pollos de engorde y su relación con el VEBI**

**[0183]** RESUMEN: La **proventriculitis** en pollos de engorde causa la desaprobación del canal debido a la

5 contaminación cuando los proventrículos inflamados se rompen durante la evisceración. Aunque la causa de la proventriculitis es desconocida, está implicado el virus de la enfermedad de la bursitis infeccioso (VEBI). Para estudiar la función del VEBI en la proventriculitis, se recogieron los proventrículos y bursas de los pollos con proventriculitis de origen natural, y de pollos experimentalmente infectados con siete cepas diferentes del VEBI. Todos los tejidos se examinaron para el VEBI usando la microscopía de luz, la inmunohistoquímica (IHQ), RT-PCR en tiempo real, y para la apoptosis por el procedimiento de TUNEL. Se concluyó que la proventriculitis puede ocurrir en ausencia del VEBI, y que las cepas del VEBI ensayadas no producen directamente proventriculitis.

**[0184]** La proventriculitis se estudió reproduciendo de forma experimental la enfermedad en pollos de engorde comerciales y sin patógenos específicos (SPF). Se evaluaron las diferencias en la ganancia de peso, el peso de los

órganos y la presencia de lesiones entre estas aves y los controles. No se identificaron bacterias en las secciones histológicas de los proventrículos ni se aislaron de los proventrículos afectados. El intento de aislamiento del virus de los proventrículos afectados causó la atrofia de los embriones inoculados, y se detectó el virus de la bronquitis infecciosa (VBI) en el líquido alantoide. Los homogenados proventriculares utilizados para inducir proventriculitis fueron positivos para el VEBI, VBI, adenovirus y virus de la anemia del pollo (VAP), pero la proventriculitis también puede producirse en pollos en ausencia de estos virus.

**[0185]** La inmunosupresión se indujo en pollos de engorde usando sustancias químicas (ciclofosfamida y ciclosporina) o virus (VEBI) para estudiar el efecto de la inmunosupresión sobre la proventriculitis. La ciclofosfamida y el VEBI, ambos supresores de linfocitos B, no afectaron significativamente a la incidencia o las características de la proventriculitis inducida con un homogenado proventricular de un ave enferma. Sin embargo, se observó un aumento en el tamaño del proventrículo 7 días después de la inoculación. Los pollos inmunosuprimidos con ciclosporina, un supresor de linfocitos T, desarrollaron lesiones más graves y tuvieron una incidencia más alta de proventriculitis que los controles inmunocompetentes. Aunque ambos, los linfocitos B y T, están implicados en la respuesta inmune frente a la proventriculitis, parece que la inmunidad mediada celular desempeña una función más importante. Esto se sostiene por el infiltrado linfocítico observado en las glándulas proventriculares enfermas. Los linfocitos T CD8+ fueron el tipo de célula más común y se distribuyeron ampliamente en el proventrículo, mientras que los linfocitos T CD4+ y los linfocitos B tendieron a formar agregados en las etapas crónicas de la enfermedad.

**[0186]** INTRODUCCIÓN: Propósito del Estudio. La **proventriculitis** es una enfermedad de origen natural que afecta a pollos comerciales. Los proventrículos dañados se agrandan, se inflaman y se llenan de líquido y alimento, y con frecuencia se rompen durante la evisceración de rutina causando la contaminación del canal (2, 14). El impacto económico principal de esta enfermedad se debe a la condenación de estos canales contaminados, aunque la proventriculitis también se ha asociado con un crecimiento deteriorado, una deficiente conversión del alimento, fragilidad intestinal, síndrome de atrofiamiento y pase de alimento no digerido (1, 4, 14, 16, 21, 27). La industria avícola informa de brotes esporádicos, aunque económicamente importantes, de proventriculitis en pollos de engorde (14), y la afección se presenta más comúnmente en aves más jóvenes, procesadas a las 4 a 5 semanas de edad (2).

**[0187]** Las causas no infecciosas potenciales de la proventriculitis incluyen la exposición oral a aminas biogénicas (10, 20, 23), micotoxinas (5, 7, 11), falta de fibra dietética (20, 25), y sulfato de cobre en exceso (3, 15). Las causas infecciosas posibles incluyen adenovirus (16, 18), reovirus (17, 18, 21), virus de la bronquitis infecciosa (30), y megabacterias (12, 13, 19, 22). Sin embargo, no se ha encontrado ninguno de estos agentes no infecciosos o infecciosos en la mayoría de los casos. La microscopía electrónica ha detectado partículas virales en lesiones agudas, pero el aislamiento de este virus de proventrículos afectados no ha tenido éxito (8, 9, 14).

**[0188]** El virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) está implicado como la causa de enfermedad (2, 14) y la vacunación del VEBI disminuye su incidencia (6). La proventriculitis se ha reproducido al inocular por vía oral pollos de engorde con proventrículos homogenizados recolectados de aves afectadas (2, 14, 24). Un agente infiltrable que se encuentre en estos homogenados causa lesiones similares a las encontradas en los casos de campo (9, 14) y el VEBI se ha inmunoprecipitado de estos homogenados (14). Los pollos de engorde comerciales expuestos a este VEBI desarrollaron registros de lesión proventricular aumentados, pero no tuvieron un aumento en el tamaño proventricular, un aspecto característico producido por la exposición a los homogenados proventriculares infecciosos (14).

**[0189]** La enfermedad de la bursitis infecciosa (IBD) es una enfermedad viral altamente contagiosa y grave en pollos que produce la necrosis de los linfocitos en la bolsa de Fabricio seguido de inmunosupresión (28). Las cepas clásicas del VEBI produjeron lesiones en el proventrículo de leghorns (29) sin patógenos específicos (SPF). Sin embargo, el uso de tinción de hibridación *in situ* con ribosondas específicas para el gen VP2 del VEBI, no detectó virus en los proventrículos de pollos de 3 semanas de edad, expuestos experimentalmente a las cepas del VEBI Delaware A, D78 o Bursavac®, y había lesiones proventriculares histológicamente evidentes (26).

**[0190]** El objetivo de este estudio fue determinar la función del VEBI en la proventriculitis, y un mejor entendimiento de la patogénesis y causas posibles de la proventriculitis.

**[0191]** Objetivos y Originalidad. Recientes investigaciones han implicado al VEBI como una causa potencial de proventriculitis. Se han aislado cepas variantes del VEBI a partir de homogenados proventriculares a partir de aves enfermas, y leghorns SPF y pollos de engorde inoculados con estos homogenados, desarrollan una enfermedad típica de la infección por VEBI, así como proventriculitis. Además, la vacunación contra el VEBI reduce la incidencia de proventriculitis, pero no la elimina. Aunque existe la evidencia indirecta, la función definida del VEBI en proventriculitis no se ha determinado. Es posible que una nueva variante del VEBI pueda ser la causa directa de la enfermedad, o puede ser que el VEBI, por su efecto inmunosupresor, permita que algún otro agente produzca la enfermedad. Esta investigación se diseñó para investigar la función del VEBI como el agente causante de la proventriculitis en pollos.

**[0192]** El primer objetivo fue determinar si el VEBI ya sea directamente, o indirectamente al inducir apoptosis, causa proventriculitis en pollos. Para abordar esto, se examinaron los proventrículos y las bursas de pollos con proventriculitis de origen natural, así como los de pollos SPF infectados experimentalmente con múltiples cepas del VEBI. La presencia del VEBI en estos tejidos se determinó mediante RT-PCR e IHQ para secuencias de gen viral y antígeno viral, respectivamente. Se examinó la presencia de apoptosis mediante un procedimiento TUNEL modificado, y las lesiones inducidas por el virus se examinaron mediante histopatología.

5 **[0193]** El segundo objetivo fue reproducir la proventriculitis y caracterizar los cambios presentes en el proventrículo y otros órganos. Para realizar esto, se examinaron los proventrículos y otros órganos después de la inducción experimental de proventriculitis en pollos de engorde SPF y comerciales. En un intento para identificar los agentes causantes posibles involucrados en la proventriculitis, incluyendo el VEBI, se realizaron procedimientos moleculares, bacteriológicos, serológicos e histopatológicos y microscopía electrónica.

10 **[0194]** El propósito de este tercer estudio fue investigar si la inmunosupresión tuvo efecto sobre la incidencia, gravedad o el carácter de la proventriculitis en pollos de engorde. El VEBI induce la inmunosupresión en pollos, que puede desempeñar una función en la patogenicidad de la proventriculitis. Para abordar este objetivo, se inmunosuprimieron pollos comerciales y SPF de un día de edad con ciclofosfamida (supresor de linfocitos B), ciclosporina (supresor de linfocitos T) o el VEBI. Posteriormente, estos pollos se expusieron a un homogenado proventricular de pollos afectados, y se determinó el efecto de la inmunosupresión sobre la proventriculitis.

15 **[0195]** El hallazgo histológico principal en la proventriculitis transmisible es una infiltración linfocítica marcada de las glándulas proventriculares. El propósito del cuarto estudio fue caracterizar este infiltrado linfocítico para conocer mejor la identidad de estas células y su función potencial en la generación de una respuesta inmunoprotectora en el proventrículo. Para realizar este objetivo, se infectaron experimentalmente pollos de engorde comerciales con homogenados proventriculares de pollos de engorde afectados y se estudiaron las lesiones proventriculares usando histopatología. Los marcadores de superficie celular de linfocitos se tiñeron, y se estudió la distribución de los diferentes subconjuntos de linfocitos *in situ*.

20 30 Referencias:

**[0196]**

- 35 1. Apple y col. Avian Dis. 35: 422-425. 1991.
2. Bayyari y col. Poult Sci 74: 1799-1809. 1995.
3. Bayyari y col. Poult Sci 74: 1961-1969. 1995.
4. Bracewell y col. World's Poult Sci J 40. 1984.
5. Cullen y col. Am J Res 49: 5. 1988.
6. Dormitorio y col. Proc. Southern Conference on Avian Diseases, Atlanta, GA. 40. 2001.
- 40 7. Dorner y col. Appl Environ Microbiol. 46: 698-703. 1983.
8. Goodwin y col. Avian Pathol. 25: 269-279. 1996.
9. Guy & Barnes. Proc. 139th Meeting of the American Veterinary Medical Association, Nashville, TN. 2002.
10. Harry col. Br Poult Sci 16: 69-78. 1975.
11. Hayes & Wobeser. Can J Comp Med 47: 180-187. 1983.
- 45 12. Henderson col. Vet Rec 123: 492-494. 1988.
13. Huchzermeyery col. Vet Rec 133: 143-144. 1993.
14. Huff y col. Avian Dis. 45: 828-843. 2001.
15. Jensen y col. Avian Dis- 35: 969-973. 1991.
16. Kouwenhoven y col. Avian Pathol. 7: 183-187. 1978.
- 50 17. Kouwenhoven y col. Avian Pathol. 17: 879-892. 1988.
18. Lenz y col. J Vet Diagn Invest 10: 145-151. 1998.
19. Mutlu y col. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 25: 460-462. 1997.
20. Newberne y col. J Am Vet Assoc 128: 553-555. 1956.
21. Page y col. Avian Dis. 26: 618-624.1982.
- 55 22. Phalen & Moore. Avian Dis. 47: 254-260. 2003.
23. Poole. Proc. 43rd Western Poultry Disease Conference, Sacramento, CA. 40-42. 1994.
24. Reece. Canberra, Australia, RIRDC. 2002.
25. Riddell. Avian Dis. 20: 442-445. 1976.
26. Sellers y col. Avian Dis. 45: 26-33. 2001.
- 60 27. Shapiro & Nir. Poult Sci 74: 33-44. 1995.
28. Sharma y col. Dev Comp Immunol 24: 223-235. 2000.
29. Skeeles y col. Poult Sci. 77 (suppl.): 133. 1998.
30. Yu y col. Avian Dis. 45: 416-424. 2001.

**[0197]** REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA: El proventrículo o estómago glandular es un órgano fusiforme que se encuentra dorsal al hígado y entre el esófago y la molleja. Tiene aproximadamente 4-5 cm de largo y 2 cm de diámetro en el ave adulta. El lumen es estrecho y las paredes gruesas se componen principalmente de masa de glándulas tubulares compuestas (94). La función principal del proventrículo es la producción y liberación de las secreciones gástricas, pepsina, ácido clorhídrico y moco. El alimento que pasa a través del proventrículo se mantiene en la molleja, donde actúan las secreciones gástricas (222).

**[0198]** La pared del proventrículo consiste en cuatro capas: la membrana mucosa, submucosa, túnica muscular y serosa (154). El revestimiento de mucosa del lumen proventricular forma doblamientos llamados pliegues. Dispersados sobre la superficie de la mucosa hay varias papillas, a través de cada una de las cuales pasa un ducto secretor de las glándulas proventriculares que se abren en el ápice de la papila. La membrana mucosa está revestida por una sola capa de células columnares que secretan moco. Esta secreción mucosa actúa como revestimiento protector para la superficie del epitelio (154). Implícito al epitelio de la superficie, y ocupando el centro de los pliegues de la mucosa, está la lámina propia. Dentro de esta lámina los infiltrados linfoides se encuentran frecuentemente, y frecuentemente se presentan grandes focos linfoides en asociación con las papillas de la mucosa (151). Los agregados de linfocitos también se encuentran en la lámina propia de la unión esofágica-proventricular, y estas acumulaciones linfoides se han nombrado la tonsila esofágica (181).

**[0199]** La masa de las glándulas proventriculares constituye la parte más grande del espesor de la pared proventricular (94). Las glándulas están compuestas de numerosos lóbulos redondos o poliédricos que se disponen en pequeños grupos, drenando cada uno en el lumen a través de una de las papillas de la mucosa. Cada lóbulo está compuesto por numerosos alvéolos rectos que salen desde una cavidad central. Los grupos de varios alvéolos se unen conjuntamente para formar en primer lugar un ducto terciario común corto, después un ducto secundario más amplio, y finalmente un ducto primario corto que pasa a través de la papila de la mucosa y que se abre en el lumen. Rodeando cada lóbulo están los septos de tejido conectivo de fibras colagenosas y elásticas, unas cuantas fibras musculares y vasos sanguíneos y nervios (94).

**[0200]** Los ductos primario, secundario y terciario están revestidos con epitelio columnar similar al que cubre la superficie de la mucosa. El epitelio glandular consiste en una sola capa de células oxinticopépticas cuboidales a bajas columnares. Estas secretan tanto ácido clorhídrico como la enzima precursora pepsinógeno, combinando así las funciones de las células zimogénicas (principales) de mamífero y parietales (222). El jugo gástrico está compuesto principalmente por ácido clorhídrico, moco y la enzima proteolítica, pepsina. Además de la célula oxinticopéptica, el epitelio de los alvéolos tubulares contiene varias células endocrinas glandulares (154). Como en los mamíferos, la estimulación del nervio vago provoca la secreción del jugo, y también parece que existe un mecanismo de gastrina (154). Las células de gastrina se han descrito en la región pilórica del ave y parecen confirmar una función para la gastrina en el proceso de secreción proventricular (107). También pueden estar involucrados otros mecanismos hormonales en la estimulación de la secreción proventricular. La bombesina, presente en las células endocrinas proventriculares, se secreta a la sangre y se lleva a sus áreas diana para la estimulación de la liberación de gastrina, de la secreción pancreática, y el aumento de la motilidad intestinal (107).

**[0201]** El tejido conectivo de la submucosa consiste en una banda angosta de tejido conectivo fibroso blanco y contiene el plexo del nervio de la submucosa. La muscularis externa consiste en la capa circular interna y una capa mucho más delgada, externa longitudinal de fibras musculares lisas. Entre estas se encuentra el plexo del nervio mientérico. En el exterior, hay una capa delgada de tejido conectivo adventicio, suelto y un recubrimiento peritoneal (94). La arteria celiaca suministra tanto al proventrículo como a la molleja. El sobreflujo venoso tiene lugar por la vena gastrointestinal que fluye a la vena porta hepática (222). El proventrículo se inerva por ramificaciones del nervio vago y por las fibras nerviosas perivasculares de los plexos celiaco y mesentérico (222).

**[0202]** La zona intermedia entre el proventrículo y la molleja es muy corta, siendo aproximadamente de 0,75 cm en el pollo adulto. En el punto en el que el proventrículo se estrecha para formar este istmo, las glándulas proventriculares terminan abruptamente y los pliegues se vuelven más cortos y gradualmente cambian sobre las glándulas de la molleja. La zona intermediaria funciona principalmente cuando se contrae como una barrera que separa el proventrículo de la molleja (154).

**[0203]** Matsumoto y Hashimoto (151) describieron la distribución normal y los cambios de desarrollo de los tejidos linfoides en el proventrículo del pollo. El desarrollo de masas linfoides en la lámina propia proventricular ocurre por debajo de la superficie del epitelio y cerca de los orificios del ducto, lo cual sugiere que el mecanismo inmune de la mucosa local se desarrolla principalmente con una participación dominante de los linfocitos T en el período de post-incubación temprano. Los linfocitos que infiltran el epitelio de la glándula son los linfocitos T  $\gamma\delta$ , que desempeñan funciones importantes tanto en el reconocimiento de sustancias antigenicas que invaden el epitelio como en la renovación de células epiteliales dañadas. El desarrollo de linfocitos B tiene lugar después de la invasión de los antígenos relacionados con la ingesta de alimento. No se detectaron células M en el proventrículo lo que sugiere las rutas para la captación de los antígenos intraluminales diferentes de las atribuidas tradicionalmente a las células M.

- [0204]** Proventriculitis transmisible: Definición y significado económico. La proventriculitis transmisible es una enfermedad infecciosa de pollos de origen desconocido (73). Se caracteriza por un proventrículo atónico agrandado que está lleno de líquido y alimento (11, 74, 79, 99, 122, 193). El istmo gástrico que conecta el proventrículo y la molleja se agranda, con dilatación de la constricción presente en esta unión.
- [0205]** El impacto económico de la proventriculitis se debe principalmente a la desaprobación de los canales contaminados posteriormente a la ruptura del proventrículo durante la evisceración de rutina (11, 99). Una estimación del 1% de las aves procesadas deben procesarse de nuevo debido a la ruptura gastrointestinal durante la evisceración mecánica (230). La contaminación es la tercera causa más común de desaprobación de pollos de engorde en el procesamiento después de la septicemia y la airsaculitis en los Estados Unidos, tiendo en cuenta aproximadamente el 0,05% de pollos de engorde procesados en los Estados Unidos (poultry slaughter, 2001).
- [0206]** La proventriculitis es más severa en aves más jóvenes (4-5 semanas de edad) y se ha relacionado con un crecimiento deteriorado, una deficiente conversión del alimento, fragilidad intestinal, síndrome de atrofiamiento y paso del alimento no digerido (4, 21, 99, 130, 183, 193, 206). La industria aviar informa de brotes esporádicos, aunque económicamente importantes, de proventriculitis en pollos de engorde (99). Aunque hay plagas por todo el mundo de pollos de engorde con brotes de la enfermedad caracterizada, al menos en parte, por el agrandamiento proventricular, las lesiones coherentes con la proventriculitis transmisible se han descrito en detalle en detalle únicamente en los Estados Unidos (74, 79, 99), Holanda (130) y Australia (193). No están disponibles datos de prevalencia definitiva con respecto a la incidencia global y la distribución de proventriculitis.
- [0207]** Transmisión. Se desconoce la ruta de infección natural; sin embargo, los pollos pueden infectarse experimentalmente mediante la inoculación oral con un homogenizado preparado a partir de proventrículo de pollos con proventriculitis (11, 79, 99, 193). Debido a que la enfermedad se reproduce con filtrados de homogenizado proventricular (0,2 µm), se sospecha de un virus como el agente etiológico (79, 99, 193). En consecuencia, la enfermedad también se denomina proventriculitis viral transmisible (PVT) (74, 79). Sin embargo, la gravedad de las lesiones y los efectos en la producción son más graves en aves tratadas con homogenizados no filtrados, lo que sugiere un efecto aditivo de otros agentes infecciosos concomitantes (99).
- [0208]** Lesiones Macroscópicas. Los proventrículos de pollos afectados se agrandan y la superficie serosal del proventrículo frecuentemente parece moteada y tiene placas blancas irregulares. La pared proventricular se engrosa, algunas glándulas están distendidas y exudan un material blanco viscoso cuando se comprimen (73). El istmo gástrico está distendido y flácido. Algunas aves comerciales afectadas también tienen abrasiones en la molleja, intestinos frágiles y delgados, enteritis leve a moderada y baja uniformidad en el peso de la canal (11).
- [0209]** Lesiones Microscópicas. Hay necrosis de las células alveolares que secretan pepsinógeno y ácido clorhídrico (oxinticopépticas). Estas células tienen un citoplasma amorfó, granular o vacuulado y condensación nuclear, fragmentación o lisis (73). Muy pocas células unidas o pegadas tienen núcleos inflamados con centros de cromatina marginada y claros (11, 73, 79). La proliferación de células hiperplásicas e hipertróficas columnares a bajas cuboidales revisten los ductos glandulares primario, secundario y terciario. El epitelio similar al aducto cuboidal a bajo columnar, pálido, basofílico y distintamente vacuulado reemplaza las células secretoras alveolares destruidas (11, 74). Las glándulas gravemente afectadas ocasionalmente se combinan. Hay un aumento de moderado a marcado del número de linfocitos que infiltran el estroma del tejido conectivo (lámina propia). Los infiltrados de linfocitos en el intersticio glandular se desarrollan en áreas que contienen células epiteliales glandulares afectadas. Los infiltrados de linfocitos marcados expanden el intersticio glandular en el epitelio ductal y el glandular (79).
- [0210]** Diagnóstico diferencial: Varias causas se han relacionado con el agrandamiento proventricular y la proventriculitis. Una proventriculitis no infecciosa puede producirse mediante la exposición oral a sustancias químicas tóxicas, tales como aminas biogénicas (82, 172, 191, 221) y micotoxinas (39, 49, 84, 184, 185), que frecuentemente contaminan el alimentación de las aves. Se ha demostrado que una dieta baja en fibra causa inflamación proventricular y lesiones proventriculares (172, 197). El sulfato de cobre dietético dentro de los niveles comúnmente alimentados a los pollos como estimulante del crecimiento, también causa hipertrofia proventricular (12, 120).
- [0211]** Algunos agentes infecciosos aviares pueden producir lesiones proventriculares. Las cepas velogénicas del virus de la enfermedad de Newcastle (VEN) pueden producir hemorragias en la mucosa proventricular (2), ya que pueden producir el virus de la gripe aviar altamente patogénico (HPAI) (224). La infección con el virus de la reticuloendoteliosis (REV) puede causar atrofia e infiltrados celulares neoplásicos que se asemejan a la inflamación no purulenta que están presentes en los proventrículos (168). En la enfermedad de Marek, tiene lugar la implicación linfomatosa difusa y el agrandamiento del proventrículo. El aumento del número de folículos linfoides en la lámina muscular del proventrículo son patognómicos para la infección con encefalomielitis aviar (EA) (27).

[0212] El síndrome de la dilatación proventricular (SDP), es una enfermedad crónica común de las aves psitacinas caracterizado por la dilatación del proventrículo, anorexia, regurgitación, paso de semillas no digeridas en las heces, diarrea, signos neurológicos, pérdida de peso, etc. Se desconoce la causa, pero se presume que es un virus (75). En el SDP hay acumulación de linfocitos y células plasmáticas en el sistema nervioso autónomo, especialmente los nervios que suministran a los músculos en el proventrículo y otros órganos digestivos, incluyendo el buche, el ventrículo y el intestino delgado. Los signos del sistema nervioso central relacionados con SDP, que pueden ocurrir además de, o independiente de los signos gastrointestinales, pueden incluir ataxia, movimientos de la cabeza anormales, ataques y déficits proprioceptivos o motores. Los proventrículos delgados dilatados están presentes en el 70% de casos con ganglioneuritis linfoplasmacítica de los nervios esplácnicos del buche/esófago, proventrículo, molleja e intestino (75).

[0213] Se ha descubierto un microorganismo de forma de vara, Gram-positivo, muy grande relacionado con la proventriculitis en canarios, periquitos australianos, avestruces y recientemente en pollos (87, 97, 179, 187). Esta denominada "megabacteria" es una levadura ascomicotosa anamórfica novedosa denominada *Macrohabdus ornithogaster* que coloniza la zona angosta (istmo) entre el proventrículo y la molleja. La tricomoniasis proventricular se ha indicado en periquitos australianos (87) y las bacterias filamentosas (232) habitan el tracto gastrointestinal superior y son patógenos potenciales. Otra bacteria, *Helicobacter pullorum*, también se encuentra en el tracto digestivo del 60% de las aves comerciales ensayadas (5). *H. Pullorum* pertenece al género Helicobacter, el mismo que *H. Pylori* que causa gastritis ulcerosa en humanos y algunos otros mamíferos (64). Se desconoce la función de estas bacterias en la proventriculitis de los pollos. Pueden tener algunos efectos patogénicos en los proventrículos, posiblemente potenciados por otros agentes infecciosos, químicos o inmunosupresores.

[0214] Los casos de proventriculitis micótica ulcerosa necrotizante marcada en avestruces se ha relacionado con zigomicetos y está acompañada por microcolonias superficiales de levadura (presumiblemente *Candida* spp) (77, 119). La criptosporidiosis proventricular es común entre especies de aves de zoológico y de mascotas (19, 233) y se ha informado una vez en pollos (72). La colonización de la mucosa por *Cryptosporidium* está acompañada por la inflamación y exfoliación de células epiteliales parasitizadas. Se informó de proventriculitis necrotizante purulenta con *Toxoplasma gondii* intralesional en una bandada de pollos en Noruega (52).

[0215] Se ha informado de brotes de *Dispharyns nasyta* en varias especies de aves, incluyendo pollos. Los proventrículos infectados se agrandan, y la superficie de la mucosa se cubre con parásitos y residuos necróticos (70). *Tetramares americana*, *T. Crami* y *T. Fissispina* también parasitizan el proventrículo (176). Las hembras residen profundamente dentro de una glándula proventricular y llenan y distienden completamente su lumen. Las infecciones masivas en pollos pueden causar enfraquecimiento y anemia (176).

[0216] La proventriculitis traumática también puede tener lugar después de ingerir y retener cuerpos extraños (78) y puede aparecer la infección bacteriana secundaria.

[0217] Historia. Inicialmente, la proventriculitis transmisible se describió como una de las lesiones relacionadas con el síndrome de malabsorción (21). Combinaciones diferentes de manifestaciones clínicas dieron como resultado una diversidad de nombres para este síndrome: síndrome de atrofiamiento infeccioso (21, 194), síndrome de empequeñecimiento-atrofiamiento (157), síndrome de ave pálida (71), y proventriculitis infecciosa (130). Estas afecciones causan retardo del crecimiento y una deficiente conversión del alimento en pollos de engorde jóvenes. Los agentes causantes de este síndrome no se han identificado claramente, y la proventriculitis puede o no estar presente como una lesión en estos síndromes. Por ejemplo, los casos de síndrome de malabsorción pueden o no incluir lesiones proventriculares (219). Los agentes filtrables aislados en los Países Bajos se vincularon originalmente a la proventriculitis, que causa el síndrome de empequeñecimiento en pollos de engorde (130). Estos autores sugirieron la implicación tanto de bacterias como de virus en la etiología del síndrome de malabsorción (130, 131). Shapiro y Nir (206) informaron del agrandamiento proventricular y la disminución del peso del cuerpo en aves infectadas con homogenado en bruto de intestinos de pollos de engorde afectados con el síndrome de atrofiamiento.

[0218] Los reovirus se han implicado fuertemente como agente causante de lesiones proventriculares concurrentes presentes en algunas aves afectadas de forma natural con el síndrome de malabsorción (131). La proventriculitis se reprodujo mediante la inoculación de dos aislados de reovirus de los intestinos de aves con síndrome de malabsorción (183). Un homogenado de tejidos proventriculares y duodenales de aves atrofiadas creadas en Arkansas noroeste produjeron proventriculitis y una disminución del peso corporal cuando se cebó a aves sin el patógeno específico. Sin embargo, un reovirus adaptado al cultivo celular aislado de este mismo homogenado produjo proventriculitis sin afectar al peso corporal (4). La adición de histamina al alimento de pollos de engorde por vía oral infectados con una vacuna de reovirus aviar interaccionó para causar agrandamiento proventricular y disminución del peso corporal (24).

[0219] Un estudio comparativo de la patogénesis de cinco homogenados diferentes de síndrome de mala absorción de los Países Bajos y Alemania distinguió los grupos inoculados de pollos por sus lesiones histopatológicas: proventriculitis, lesiones sólo en el intestino, o una combinación de ambos (219). Las lesiones en el

intestino delgado tuvieron más impacto en la depresión de la ganancia del peso que las lesiones en el proventrículo. Las partículas similares a reovirus y enterovirus se detectaron en los grupos inoculados. También se aislaron bacteriófagos y bacterias (*Escherichia coli* hemolítica, *Pasteurella hemolítica* y *Enterococcus durans*) de pollos inoculados. La función individual que cada uno de estos patógenos desempeña en la patogénesis del síndrome de malabsorción todavía no está resuelta (219).

**[0220]** La proventriculitis moderada también se ha reproducido experimentalmente en pollos infectados con algunos aislados de adenovirus (130, 141), sin embargo, este virus no se ha aislado consistentemente a partir de proventrículos enfermos. Aislados del virus de la bronquitis infecciosa (VBI) de casos de origen natural en China produjeron lesiones proventriculares en aves infectadas. Sus proventrículos se agrandaron y se inflamaron y la mucosa se engrosó y se exudó líquido viscoso de color blanco (255).

**[0221]** Un agente filtrable (0,2 µm) encontrado en proventrículos afectados con homogenizado puede causar lesiones similares a la proventriculitis observada en casos de origen natural pero no al mismo grado que las causadas por el homogenizado no filtrado. Esta proventriculitis puede producirse independientemente de un efecto en el crecimiento, y solamente el homogenizado no filtrado causó atrofia (11). La proventriculitis producida se detectó mejor usando histopatología, y fue lo suficientemente grave para producir adelgazamiento mural con aumento de la susceptibilidad a ruptura durante la evisceración en el procesamiento.

**[0222]** Goodwin y col. (74) informaron sobre la presencia de viriones intralesionales en proventrículos de pollos que no lograron sobrevivir y tuvieron proventriculitis, y sugirieron una relación causal entre el virus y la lesión en su huésped. Se describieron partículas de virus intranucleares hexagonales e intracitoplasmáticas y se asemejaron a un adenovirus o polionavirus. Sin embargo, la hibridación *in situ* del DNA no logró detectar ácidos nucleicos de adenovirus o poliomavirus. Huff y col. (99) también informaron sobre la presencia de partículas semejantes a virus similares en los núcleos de muchas células epiteliales del proventrículo de pollos inoculados experimentalmente con homogenizado preparado a partir de los proventrículos de pollos con proventriculitis. Las partículas, esferas no envueltas de aproximadamente 100-200 nm de diámetro, parecían hexagonales y se dispusieron en conjuntos semiparacristalinos en los núcleos (99).

**[0223]** Guy y Barnes (79) reprodujeron la proventriculitis mediante la administración de un filtrado (0,2 µm) de un homogenizado producido a partir de proventrículos de pollos con proventriculitis. Sin embargo, los pollos afectados no tuvieron disminución en el peso corporal. Este inóculo no tenía reovirus aviares, adenovirus aviar del grupo I, virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) ni virus de la bronquitis infecciosa (VBI). Las partículas similares a adenovirus, similares a las observadas por Goodwin y col. (74), se identificaron mediante la microscopía electrónica de sección delgada en núcleos de células de epitelio glandular afectadas.

**[0224]** Reece (193) informó que las aves con proventriculitis y síndrome de atrofiamiento se caracterizaron generalmente por una deficiente conversión del alimento, una tasa de crecimiento reducida y/o un peso no uniforme en la edad del sacrificio. Los homogenados proventriculares preparados a partir de estas aves fueron altamente infecciosos y transmisibles por al menos cuatro pases en aves. El tratamiento del inóculo con cloroformo no redujo la infectividad, apoyando la hipótesis de que el agente etiológico supuesto de la proventriculitis infecciosa fue un virus no envuelto. Este no creció en ninguna de una amplia variedad de sistemas de cultivos de células primarias y establecidas. Los embriones de pollo se inocularon a través de diversas vías, las vísceras de embrión se recolectaron, y éstas se inocularon en pollos SPF. No se produjo proventriculitis. El inóculo original contenía virus de la anemia del pollo (VAP), adenovirus de ave de tipo 8, virus de la nefritis aviar y el virus de la enfermedad de Marek (VEM), pero no contenía el virus de la leucosis aviar (VLA), el virus de la bronquitis infecciosa (VBI), reovirus, el virus de la enfermedad de Newcastle (VEN) ni el virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI).

**[0225]** Proventriculitis y Virus de la Enfermedad de la Bursitis Infecciosa (VEBI). La proventriculitis se reprodujo experimentalmente mediante la infección oral de pollos de engorde comerciales con un filtrado de 0,2 µm de un homogenizado proventricular infeccioso (11). Las pruebas serológicas para el anticuerpo del VEBI inducido fueron positivas, mientras que las de los anticuerpos de reovirus fueron negativas, sugiriendo la posible implicación del VEBI. La presencia del VEBI en este homogenizado se confirmó posteriormente mediante el aislamiento del virus VEBI inmunoprecipitado en embriones, y la visualización de partículas similares al VEBI en los hígados de embriones SPF inoculados con un filtrado de este homogenizado (99). Un estudio de estimulación con el VEBI inmunoprecipitado de este homogenizado aumentó los registros de lesiones proventriculares 14 días después de la inoculación en pollos comerciales que recibieron el inóculo a un día de edad. Sin embargo, no hubo agrandamiento proventricular debido a la inoculación del VEBI. Huff y col. (99) informaron sobre el aislamiento de un cultivo bacteriano único (*Clostridia sp.*) del mismo homogenizado proventricular infectado, sugiriendo la implicación bacteriana en este síndrome. Los estudios de estimulación en pollos de engorde en comparación con la patogenicidad de este homogenizado proventricular infeccioso, el anticuerpo monoclonal del VEBI precipitado y este aislado de bacterias, solo o en combinación, mostraron que solamente la combinación de virus y bacterias reprodujo la proventriculitis similar al homogenizado proventricular. El homogenizado, bacterias solas, y la combinación de virus y bacterias causó cada uno una deficiente eficiencia de conversión de alimento en comparación con el control de solución salina, lo que indicó que el aislado de *Clostridium sp.*

puede ser responsable de la deficiente conversión de los alimentos. La gravedad de las lesiones y los efectos sobre la producción fueron más graves en aves tratadas con el homogenizado, lo que sugirió que había factores adicionales implicados, o efectos relacionados con la dosis sobre la patogénesis. Huff y col. concluyeron que una infección viral, así como diversos factores dietéticos, pueden facilitar la invasión bacteriana del proventrículo, y más de un tipo de virus

5 puede actuar como facilitador en este síndrome de enfermedad.

**[0226]** El VEBI produce hemorragias, necrosis y la infección heterofílica en la mucosa proventricular de leghorns SPF de color blanco (213). La proventriculitis producida experimentalmente por la estimulación de leghorns SPF con VEBI incluyó lesiones macroscópicas e histopatológicas, pero no el agrandamiento proventricular severo observado en casos de origen natural de esta enfermedad (173).

**[0227]** En los últimos años, se ha implicado al VEBI como la causa de la proventriculitis en aves de engorde de Alabama del norte (48). La enfermedad dio como resultado una deficiente conversión del alimento, una reducción del peso y mortalidad. Se realizó un pequeño estudio usando vacunas del VEBI vivas con dos vacunas del VEBI comerciales. Se vacunaron aves SPF con una vacuna intermedia viva que contenía un virus antigenico convencional o un producto de combinación, que contenía virus de la vacuna del VEBI tanto convencionales como variantes. Las aves vacunadas y no vacunadas se expusieron a un aislado virulento del VEBI de Alabama implicado en causar proventriculitis. El cincuenta por ciento de las aves no vacunadas mostraron atrofia de la bursa y proventriculitis. Por el contrario, solamente el 25% y el 10% de las aves que recibieron la combinación o la vacuna convencional sola, respectivamente, tuvieron estas lesiones. Las lesiones que todavía se presentaron sugieren que otro agente o agentes están implicados en la producción de proventriculitis. Los autores sugirieron que el VEBI variante puede desempeñar una función en la proventriculitis y que la vacunación de la progenie de pollos de engorde puede ser útil para reducir la incidencia y la gravedad de la enfermedad (48).

**[0228]** También se informaron de casos de proventriculitis en Arkansas (122). Estas aves dieron negativo al reovirus y de forma variable positivo para el virus de la anemia del pollo (VAP) mediante pruebas serológicas. El proventrículo tenía una pared engrosada con pérdida de integridad glandular y lesiones en la lámina propia mucosal. Los proventrículos homogenizados se cebaron en pollos SPF y llegaron a dar positivo en anticuerpos del VEBI y permanecieron negativos en anticuerpo del VAP y reovirus. Los pollos expuestos tenían atrofia bursal, proventrículos agrandados, riñones y vasos inflamados, y lesiones en la unión del esófago y el proventrículo.

**[0229]** La detección de VEBI mediante tinción con ISH utilizando ribosondas específicas para el gen VP2 del VEBI no logró detectar el virus de los proventrículos de pollos de 3 semanas de edad expuestos experimentalmente a Delaware A, D78 o Bursavac®. Además, no había presentes lesiones proventriculares histológicamente evidentes después de estas exposiciones (205). Combinados con los hallazgos previos, estos resultados indican que el VEBI probablemente no tiene efecto directo sobre el proventrículo.

**[0230]** El virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) es el agente etiológico de la enfermedad de Gumboro o la enfermedad de la bursitis infecciosa (EBI). EBI es una enfermedad viral altamente contagiosa de pollos jóvenes, caracterizada por la destrucción de los linfocitos en la bolsa de Fabricio, produciendo inmunosupresión severa. El VEBI es endémico en la mayoría de las áreas productoras de aves del mundo. El virus es altamente estable en el medio ambiente y tiene una tendencia a persistir en el medio ambiente a pesar de toda la limpieza y desinfección. Hay dos serotipos del VEBI: 1 y 2. Todos los virus capaces de causar una enfermedad en pollos pertenecen al serotipo 1. Los virus de serotipo 2 pueden infectar pollos y pavos pero no son patogénicos para cualquier especie (109, 155). Los pollos son la única especie de ave conocida que es susceptible de enfermedad clínica y a lesiones clínicas producidas por el VEBI. Los pavos, patos y avestruces son susceptibles a la infección con el VEBI pero son resistentes a la enfermedad clínica (148, 156).

**[0231]** A pesar de los programas de vacunación ampliamente utilizados, la EBI es una de las enfermedades económicamente más importantes principales de las aves a nivel mundial. La mayoría de los pollos comerciales han estado expuestos al VEBI temprano en su vida. En las aves no protegidas, el virus causa mortalidad e inmunosupresión. Aunque la mortalidad puede ser muy significativa, el problema económico principal es la capacidad del VEBI para producir inmunosupresión. Las aves inmunosuprimidas rinden mal y muestran reducen el retorno económico (209).

**[0232]** En primer lugar, se informó sobre la enfermedad por Cosgrove en 1957. Se reconoció inicialmente como "nefrosis aviar" y el síndrome llegó a ser conocido como "enfermedad de Gumboro" debido a que ocurrió en el distrito de Gumboro de Delaware, Estados Unidos. Las características clínicas del síndrome incluyeron diarrea blanquecina o acuosa, seguida de anorexia, depresión, temblores, postración severa y muerte. En la necropsia, las aves mostrar deshidratación, hemorragias en las patas y los músculos, depósitos de urato en los riñones y agrandamiento de la bolsa de Fabricio (37).

**[0233]** El consenso temprano fue que la nefrosis aviar, o enfermedad de Gumboro, fue causada por la cepa Gray del virus de la bronquitis infecciosa (VBI) debido a los cambios macroscópicos en el riñón y porque el VEBI y el VBI

fueron concurrentes en muchos casos. Este error conceptual también surgió debido a que las dos infecciones fueron concurrentes en muchos casos y el VEBI fue difícil de aislar con los procedimientos disponibles (135). Despues de estudios posteriores, Winterfield y col. (249), lograron aislar el agente causante en huevos embrionarios, y despues Hitchner (93) propuso la expresión "enfermedad de la bursitis infecciosa" para la enfermedad.

5 [0234] En 1972, Allan y col. (3) informaron que las infecciones del VEBI en una etapa temprana fueron inmunosupresoras. El reconocimiento de la capacidad inmunosupresora de las infecciones del VEBI aumentó en gran medida el interés en el control de estas infecciones. Se informó sobre la existencia de un segundo serotipo en 1980 (153).

10 [0235] En 1984 y 1985, el área de crecimiento de pollos de engorde de la península de Delmarva experimentó un aumento significativo de la mortalidad. El síndrome clínico tuvo una variabilidad significativa, pero con frecuencia fue de naturaleza respiratoria. Las lesiones variaron de moderadas a graves, atribuyéndose normalmente la muerte a la infección por *E. coli* (38). Usando aves centinela vacunadas, Rosenberger y col. (199) aislaron cuatro aislados denominados como A, D, G y E. Estos aislados difirieron de las cepas convencionales en que produjeron una atrofia bursal muy rápida relacionada con una respuesta inflamatoria mínima. Las vacunas inactivadas convencionales disponibles no dieron la protección completa frente a estos cuatro nuevos aislados de Delaware. Los aislados de Delaware, A, D, G y E se designaron como variantes antigenicas, y se desarrollaron, se experimentaron y se probaron vacunas inactivadas efectivas contra ellas (199). Actualmente, estas y otras variantes similares se distribuyen ampliamente en los Estados Unidos (217, 213).

15 [0236] Desde 1987, se llegó a informar comúnmente de casos de VEBI agudos con hasta el 30% al 60% de mortalidad en aves de engorde y pollas, respectivamente, en Europa. Los primeros informes se hicieron por Chettle y col. 1989 (30), y van den Berg y col. en 1991 (242). Algunos de estos brotes agudos ocurrieron en aves de engorde en las que se habían tomado medidas de higiene y profilácticas apropiadas. Aunque no se detectó tendencia antigenica, estas cepas de virulencia aumentada se identificaron como cepas del VEBI muy virulentas (vvIBDV) (242). La situación europea ha estado dominada durante una década por la aparición de cepas del vvIBDV. Ahora, estas cepas se han difundido por todo el mundo (57). En las Américas, ya se ha informado sobre brotes de EBI agudos debido a cepas del VEBI en Brasil (41, 100) y la República Dominicana (8).

20 [0237] Etiología. El VEBI es un virus no envuelto pequeño, que pertenece a la familia *Birnaviridae*, que se caracteriza por un genoma ARNds bisegmentado (123). La familia *Birnaviridae* incluye tres géneros: Género *Aquabirnavirus* (especie tipo: virus de necrosis pancreática infecciosa o VNPI), Género *Avibirnavirus* (especie tipo: virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa o VEBI), y Género *Entomobirnavirus* (especie tipo: virus *Drosophila* X o CXV). (43). Se han aislado otros birnavirus de moluscos bivalvos, tales como el virus Tellina (236) y el Virus de Ostra (43, 129) y anguilas Japonesas (139). Hasta la fecha, no se ha informado sobre ningún Birnavirus capaz de causar enfermedad en mamíferos.

25 [0238] El virión tiene una cubierta de cápside individual de simetría icosaédrica compuesta por 32 capsómeros y un diámetro de 60 a 70 nm (43, 81, 90, 174). Mediante criomicroscopía, las subunidades que forman la cápside son predominantemente agrupaciones triméricas. Debido a la conformación de estas subunidades, la cápside adquiere una forma no esférica (20).

30 [0239] Estructura del genoma viral y replicación. El genoma del VEBI se forma por dos segmentos de ARN de doble hebra (ARMds) con los dos segmentos detectados por electroforesis en gel de poliacrilamida (43, 113). El peso molecular de los dos segmentos de doble hebra es de  $2,2 \times 10^6$  y  $1,9 \times 10^5$  Da, respectivamente (162). La longitud de ambos segmentos es de 3,2 kb y 2,8 kb, respectivamente (98).

35 [0240] El segmento más grande A (aproximadamente 3400 pares de bases) contiene dos estructuras de lectura abierta parcialmente solapantes. La primera codifica un polipéptido no estructural de 17 kDa conocido como VP5, que es dispensable para la replicación *in vitro* pero importante para la patogenicidad inducida por el virus (165, 166). La segunda ORF codifica una poliproteína de 109 kDa que está autoproteolíticamente escindida en tres polipéptidos, VPX, VP3 y VP4. VPX se procesa adicionalmente para producir un polipéptido conocido como VP2 (6, 98, 161). VPX, VP2 y VP3 son las proteínas estructurales principales que forman la cápside del virus (20), mientras que VP4 parece ser responsable de la maduración proteolítica de la poliproteína (118, 126, 140).

40 [0241] El segmento B codifica VP1, una proteína de 95 kDa que es la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) responsable de la replicación del genoma y la síntesis de ARNm (44, 220). VP1 comparte varios aspectos de secuencia primarios con un ARN polimerasa de diversos orígenes (23).

45 [0242] En los extremos 5' y 3', en ambos segmentos del genoma del VEBI, hay repeticiones terminales directas e invertidas que es probable que contengan señales importantes para la replicación, transcripción y el empaquetamiento. No se sabe si las variaciones de virulencia se deben a mutaciones en estas regiones (170). Las repeticiones adyacentes invertidas en el extremo 3' en los segmentos A y el extremo 5' en el segmento B tienen el

potencial de formar las estructuras secundarias de tallo y lazo (124), que están implicadas en los procesos de replicación del ARN, traducción y encapsidación similar a otros virus de ARN, tales como poliovirus (211).

**[0243]** El mecanismo de síntesis de tanto ARNss como de ARNds específicos de virus durante la infección con el VEBI no se ha determinado claramente. Se ha demostrado un ARN polimerasa dependiente de ARN en el VEBI (220). Se han demostrado proteínas vinculadas al genoma en tres Birnavirus diferentes (162, 186, 195, 220), lo que indica que replican su ácido nucleico mediante un mecanismo de desplazamiento de hebra (semiconservativo) (17, 158, 220).

**[0244]** Proteínas Virales. Se detectan cuatro proteínas estructurales virales maduras, denominadas VP1, VP2, VP3 y VP4, en células infectadas (13, 42, 43, 174). Se ha identificado una proteína no estructural denominada VP5, la función de esta proteína todavía se desconoce, pero no es esencial para la replicación viral (165, 166).

**[0245]** Durante el procesamiento del precursor de la poliproteína pVP2, VP3 y VP4, se ha informado sobre la existencia de dos sitios, esencial para la escisión de los precursores VPX-VP4 y VP4-VP3, respectivamente (202). Estas secuencias se conservan altamente entre las cepas del VEBI de ambos serotipos 1 y 2.

**[0246]** VP1, el ARN polimerasa dependiente de ARN del virus, está presente en pequeñas cantidades en el virión, tanto como un polipéptido libre y como una proteína enlazada al genoma (125, 163). Desempeña una función clave en la encapsidación de las partículas virales (146).

**[0247]** VP2 es la proteína viral más abundante, contando con el 51% de las proteínas de virus del serotipo I del VEBI. Este es el componente de proteína principal de la cápside viral, y es el antígeno protector del huésped que contiene la región antigenica responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes y de la especificidad de este serotipo (60). La transición del precursor de VP2 (pVP2) a VP2 implica la escisión de pVP2 cerca de su extremo C (6). VP2 también se ha identificado como un inductor de la apoptosis (62).

**[0248]** VP3 también es una proteína estructural, y cuenta con el 40% de las proteínas del virión (123). VP3 solamente se encuentra en la superficie interna de las partículas similares a virus (150). Esta proteína desempeña una función en el montaje de las partículas virales, y el empaquetamiento del genoma viral (146, 150, 225). VP3 es un antígeno específico del grupo que es reconocido por anticuerpos no neutralizantes, algunos de los cuales reaccionan de forma cruzada con ambos serotipos 1 y 2 (14). Es probable que las subunidades externas en la cápside viral consistan en VP2, llevando el epítopo neutralizante dominante, y que los trímeros internos consistan en la proteína VP3 (20).

**[0249]** VP4 es la proteasa viral implicada en el procesamiento de la poliproteína precursora (6). Es una proteína similar a una enzima proteolítica, que usa un par de catalíticas Ser-Lys para actuar en los sustratos específicos y los sitios de escisión (18). La integridad de VP4 es esencial para el procesamiento proteolítico de la poliproteína (50, 118) y, ya sea por sí misma, o a través de proteínas bajo su control, desempeña una función en la activación de VP1 (18).

**[0250]** VP5 fue la última proteína del VEBI identificada (165). Esta proteína no es esencial para la replicación del VEBI *in vitro* o *in vivo*, sin embargo, desempeña una función importante en la patogénesis viral (153). Tiene propiedades citotóxicas y puede desempeñar una función en la liberación de la progenie del VEBI (147).

**[0251]** Susceptibilidad del huésped. Las aves domésticas son los huéspedes naturales del VEBI (86). Todas las razas están afectadas. Los leghorns blancos exhiben la enfermedad más grave y tienen la tasa de mortalidad más alta (148). Los pavos pueden infectarse con serotipos 1 y 2 pero no muestran signos clínicos de la enfermedad (110, 156). Sin embargo, hay un potencial considerable para la inmunosupresión o interacción con otras enfermedades en condiciones comerciales en pavos (136). El serotipo 2 se identificó originalmente en pavos adultos clínicamente no afectados en Irlanda (153). Los patos pueden desarrollar la infección por el VEBI y los anticuerpos se pueden detectar mediante la neutralización del virus en suero, pero no se presentan lesiones macroscópicas ni microscópicas. Se han detectado anticuerpos en aves silvestres. Cinco de 29 tejedores (*Ploceus cucullatus*) y uno de ocho pinzones (*Uraeginthus bengalus*) (171) fueron seropositivos. De manera sorprendente, la seropositividad también se ha detectado en pingüinos adelie Antárticos, pero la fuente de expresión del VEBI no se ha definido (66).

**[0252]** Transmisión. El VEBI es altamente contagioso y la enfermedad puede extenderse mediante el contacto directo entre las aves infectadas y susceptibles. Los pollos infectados despiden el VEBI un día después de la infección y pueden transmitir la enfermedad durante al menos 14 días. No hay datos experimentales ni observaciones de origen natural que sugieran que el VEBI se transmite verticalmente por la ruta transovárica (148).

**[0253]** La transmisión indirecta del virus ocurre más probablemente en fomites (alimento, ropa y lechos) o a través de la diseminación aérea de plumas cargadas con virus y el polvo del hogar de las aves (15). El VEBI es muy persistente en el entorno del hogar del ave. Las viviendas de cuyas aves estaban infectadas se eliminaron, todavía

tenían virus infeccioso para otras aves 54 y 122 días después (16). Los gusanos de la harina menores, *Alphitobius diaperinus* pueden ser huéspedes depósito (152, 214). El VEBI se ha aislado de mosquitos *Aedes vexans* (96) y se han detectado anticuerpos contra el VEBI en ratas encontradas en granjas de aves (180). Ninguna otra evidencia sustenta la conclusión de que los mosquitos o las ratas actúen como vectores o depósitos del virus.

- 5      [0254] Formas clínicas del VEBI. La forma clásica, como se describe desde principios de 1960, está causada por las cepas moderadamente virulentas clásicas del VEBI. El período de incubación del EBI varía de 2 a 4 días después de la exposición. Uno de los signos más tempranos de la infección clásica en un ave es la tendencia de algunas aves de volar a sus propias ventilaciones. La enfermedad también produce inicio agudo de depresión, 10     reluctancia para moverse, plumas marchitas, diarrea blanca o aguada, manchado pericloacal de las plumas con uratos, temblorina y postramiento. La toma de alimento disminuye pero el consumo de agua puede aumentar. Las aves gravemente afectadas pueden llegar a deshidratarse y mueren (37).
- 10     [0255] La forma inmunsupresora, principalmente descrita en los Estados Unidos, está causada por cepas de baja patogenicidad del VEBI, así como por cepas variantes, tales como las variantes Delaware o cepas GLS, que resisten parcialmente la neutralización por anticuerpos contra las denominadas cepas "clásicas" o convencionales (217).
- 15     [0256] La forma aguda y muy virulenta, descrita inicialmente en Europa, y después difundida a Asia, África y algunos países de Latinoamérica, está causada por cepas hipervirulentas del VEBI, y se caracteriza por una enfermedad clínica progresiva aguda, que conduce a altas tasas de mortalidad en las granjas afectadas. Los brotes iniciales en Europa se caracterizaron por alta morbidez (80%) y una mortalidad que alcanzó el 25% en pollos de engorde y el 60% en pollas durante un período de 7 días (30, 177, 242).
- 20     [0257] Lesiones macroscópicas. Los pollos que murieron agudamente de la infección de EBI primaria mostraron deshidratación de la fascia subcutánea y la musculatura de las áreas del pecho, inguinal y pectoral (37, 148). Las hemorragias tienen lugar en la mucosa del proventrículo en su unión con la molleja. Los riñones muestran agrandamiento y palidez con la acumulación de urato cristalino en los túbulos (37). Las lesiones renales fueron más prominentes en brotes tempranos en los Estados Unidos, quizás debido a la coinfección con cepas nefrotogénicas de la bronquitis infecciosa aviar (148).
- 25     [0258] La bolsa de Fabricio es el órgano principal en la que se desarrollan las lesiones después de la exposición al VEBI (31). Los pollos que mueren o son sacrificados en etapas tempranas después de la infección muestran un duplicamiento en el tamaño de la bolsa debido al edema. La bolsa es de color amarillo pálido y tiene estrías. El 5º día, la bolsa recupera su peso normal, pero continua la atrofia, y desde el 8º día hacia delante tiene aproximadamente un tercio de su peso original (148). Se informado de que las cepas variantes no inducen una respuesta inflamatoria aguda (199, 208). Sin embargo, se informó sobre al menos una cepa variante capaz de inducir dichas lesiones inflamatorias agudas (83).
- 30     [0259] El agrandamiento esplénico se ha documentado, con focos grises pequeños dispersados uniformemente a través del parenquima (148, 160). Las cepas del vvIBDV son capaces de causar una mayor disminución en el índice de peso tímico y lesiones más severas en las tonsillas cecales, timos, bazos y médula ósea, pero las lesiones bursales son similares (148). Se ha sugerido que el VEBI es parte de un complejo etiológico que causa proventriculitis en pollos de engorde (99).
- 35     [0260] Lesiones histopatológicas. La infección con cepas estándares o variantes da como resultado la muerte de linfocitos B bursales. La necrosis de linfocitos en las médulas de folículos bursales puede detectarse a un día de la infección. El tercer día, está presente una respuesta inflamatoria con edema, infiltración de heterófilos, congestión y hemorragia, en infecciones debido a cepas convencionales. En este momento, los folículos pueden reducirse a un centro necrótico rodeado por heterófilos. Desde el cuarto día después de la infección, la reacción inflamatoria aguda declina, y conforme los restos necróticos se aclaran por fagocitosis, se forman cavidades císticas. Tiene lugar la fibroplasia en el tejido conectivo circundante, y el epitelio de cobertura no llega a plegarse y se convierte en irregular (31, 192). Sharma y col. (1989) observaron que la infección con la cepa de variante A no dio como resultado una respuesta inflamatoria aguda, y fue evidente una necrosis linfoide folicular tres días después de la infección (208).
- 40     [0261] El desarrollo de lesiones por el VEBI en el timo depende de patotipo del virus (102, 226). La depleción de linfocitos tímicos corticales inducida por el VEBI está causado por la apoptosis (102). Las cepas del vvIBDV altamente patogénicas de Europa y Japón están relacionados con una grave pérdida de linfocitos tímicos en comparación con las cepas menos patogénicas (226). Aunque el timo experimenta una atrofia marcada y una apoptosis extensiva de células tímicas durante la fase aguda de la infección del virus, no hay evidencia de que el virus realmente se replique en los linfocitos T (228). Las lesiones macroscópicas y microscópicas en el timo se superan rápidamente, y el timo regresa a su estado normal en unos pocos días después de la infección por el virus (209).

**[0262]** El bazo puede tener hiperplasia de células reticuloendoteliales alrededor de las arterias de envoltura de las adenoides en etapas tempranas de la infección, y necrosis linfoide en los folículos germinales y la envoltura linfoide periarteriolar el tercer día (148). La glándula Harderiana también puede estar afectada. Normalmente, esta glándula está infiltrada y poblada con células plasmáticas según envejece el pollo. La infección con VEBI previene esta infiltración (223). En las tonsilas cecales puede haber inflamación de heterofilos aguda, destrucción de linfocitos y regeneración en el quinto día después de la infección (86).

5 **[0263]** Las lesiones histológicas en el riñón son no específicas y probablemente ocurren debido a la deshidratación severa de los pollos afectados. Las lesiones observadas consisten en formas grandes de material 10 homogéneo infiltrado con heterofilos, y también hipercelularidad glomerular (86).

15 **[0264]** Patogénesis e Inmunosupresión. El órgano diana principal del VEBI es la bolsa de Fabricio madura, que es la fuente de linfocitos B en especies aviares. Los pollos bursectomizados no desarrollaron la EBI clínica a pesar de la presencia de la infección (89). La severidad de la enfermedad se relaciona directamente con el número de células susceptibles presentes en la bolsa de Fabricio; por lo tanto la susceptibilidad de edad más alta está entre 3 y 6 semanas, cuando la bolsa de Fabricio está en su desarrollo máximo. Esta susceptibilidad de edad es más amplia en el caso de las cepas del vvIBDV (177).

20 **[0265]** Despues de la infección o inhalación oral, el virus se replica principalmente en los linfocitos y macrófagos de los tejidos asociados al intestino. Desde el intestino, el virus es transportado a otros tejidos mediante células fagocíticas, más probablemente macrófagos residentes (209, 240). 13 h post-inoculación (p.i.), la mayoría de los folículos bursales son positivos para el virus, y 16 h p.i., tiene lugar una segunda y pronunciada viremia con replicación secundaria en otros órganos que conducen a la enfermedad y la muerte (164). Se observan cinéticas similares en el vvIBDV, pero la replicación en cada etapa está amplificada (240).

25 **[0266]** En una división activa, los linfocitos B que llevan inmunoglobulina B superficial se lisán mediante infección (91, 92, 198), pero las células de linaje de monocito-macrófago pueden infectarse de una manera persistente y productiva, y desempeñan una función crucial en la diseminación del virus (25, 101) y en la aparición de la enfermedad (127, 133, 207). La causa exacta de la enfermedad clínica y la muerte todavía no está clara, pero no parece estar 30 relacionada únicamente con la gravedad de las lesiones y el daño bursal. El postramiento que precede a la muerte es muy similar a lo que se observa en la coccidiosis aguda, y es reminiscente de un síndrome de choque séptico (240). El macrófago podría desempeñar una función específica en esta patología mediante la liberación exacerbadas de citocinas, tales como el factor de necrosis tumoral de la interleucina 6 (127). Puesto que se sabe que los macrófagos se activan por interferón, esta función puede tener lugar a través de un aumento de la secreción de interferón como se ha 35 descrito *in vitro* después de la infección de cultivos de embrión de pollo o *in vivo* en pollos (67).

40 **[0267]** Las infecciones clínicas y subclínicas con el VEBI pueden causar la supresión de las respuestas inmunes tanto humoral como celular (209). La primera indicación de daño en el sistema inmune se informó por Helmboldt y Gardner en 1967 (86). En 1970, Cho demostró que los pollos leghorn blancos expuestos al VEBI de un día de edad tenían consistentemente más probabilidades de desarrollar tumores viscerales y alargamiento del nervio por el virus 45 de la enfermedad de Marek (32). En 1972, Alian y col. informaron que la infección del VEBI a una edad temprana era inmunosupresora, y deprimía gravemente la respuesta de los anticuerpos al virus de la enfermedad de Newcastle (3). La replicación del VEBI en la bolsa conduce a la amplia destrucción de las células linfoides en las médulas y cortezas foliculares (227). La fase lítica aguda del virus está relacionada con una reducción de las células IgM+ circulantes (92, 198). Los pollos expuestos al VEBI produce niveles subóptimos de anticuerpos frente a varios 50 antígenos infecciosos y no infecciosos (32, 61, 128, 250).

55 **[0268]** Solamente se deteriora la respuesta de anticuerpo primario, las respuestas secundarias permanecen intactas (68, 198, 208), y esta deficiencia humoral puede ser reversible (209). Aunque la destrucción de los linfocitos B productores de Ig puede ser una de las causas principales de la deficiencia humoral, son posibles otros mecanismos, incluyendo el efecto adverso del VEBI sobre las funciones de los linfocitos T que presentan antígeno y los auxiliares (208). Una paradoja asociada con infecciones del VEBI en pollos es que, aunque hay inmunosupresión contra muchos antígenos, la respuesta contra el propio VEBI es normal, incluso en pollos susceptibles de 1 día de edad (212). Parece ser una estimulación selectiva de la proliferación de linfocitos B comprometida con la producción 60 de anticuerpos dirigidos contra el VEBI (148).

**[0269]** Las linfocitos T son resistentes a la infección con el VEBI (91) (61), y no hay evidencia de que el virus realmente se replique en los linfocitos tímicos (208, 228). Sin embargo, hay evidencia de que la proliferación mitogénica *in vitro* de los linfocitos T de aves expuestas al VEBI se reduce severamente. Esta inhibición mitogénica está mediada probablemente por macrófagos, sin embargo, no está claro cómo el VEBI induce a los macrófagos a exhibir este efecto supresor (209).

**[0270]** Sharma y col. (209) detectaron una infiltración dramática de linfocitos T en la bolsa durante la infección aguda por el VEBI, acompañada por la caída precipitosa del número de células IgM+. El séptimo día de la infección,

las células infiltrantes eran predominantemente linfocitos CD8+. Se sugirió que los linfocitos T modulan la infección, limitando la replicación viral en la bolsa en la fase temprana de la enfermedad. También promueven el daño en el tejido bursal y la recuperación retardada, posiblemente a través de la liberación de citocinas y efectos citotóxicos (135). Los linfocitos T citotóxicos pueden exacerbar la destrucción celular inducida por el virus lisando las células que expresan抗ígenos virales. Los linfocitos T también pueden promover la producción de factores proinflamatorios, tales como óxido nítrico, aumentando la destrucción tisular (209).

**[0271]** El efecto del VEBI en la inmunidad innata se centra en el efecto modulador del VEBI en las funciones de los macrófagos. Hay evidencia de que la actividad fagocítica *in vitro* de estas células está comprometida (209).

**[0272]** Además de causar necrosis en las células linfoides de la bolsa, el VEBI también induce a apoptosis (62, 132, 175, 228, 229, 245, 246). La apoptosis se caracteriza por la contracción celular y la condensación de cromatina, y no genera una respuesta inflamatoria local. La inducción de apoptosis en células infectadas contribuye a la patogénesis del VEBI en la bolsa (121, 179), linfocitos de sangre periférica del pollo (245) y en el timo (102, 228). La apoptosis inducida viralmente puede tener lugar en células en ausencia de un virus detectable (121, 175, 228). Un efecto directo de las proteínas virales similares a VP2 y VP5 se ha implicado en la inducción de apoptosis (62, 254). Las células apoptóticas también se han observado en células bursales negativas de antígeno viral, lo que resalta la posible función de los mediadores inmunológicos en este proceso (175, 228). Y finalmente, también se ha observado apoptosis en el proventrículo de pollos leghorn SPF estimulados con el VEBI (173).

**[0273]** Diagnóstico del VEBI. Pueden aplicarse varios procedimientos de diagnóstico en el diagnóstico de la EBI. El diagnóstico de las formas clínicas de la EBI se basa en los signos típicos de la enfermedad y las lesiones de la bolsa de Fabricio. El diagnóstico diferencial debe incluir la enfermedad de Newcastle viscerotrópica velogénica, la anemia infecciosa del pollo y la micotoxicosis. En las formas subclínicas e inmunosopresoras de la EBI, la enfermedad de Marek, la anemia del pollo y la micotoxicosis deben considerarse (136, 148).

**[0274]** Puesto que la lesión causada por la infección del EBI está bien caracterizada (31, 192), el diagnóstico por histopatología se usa frecuentemente. Este procedimiento tiene la ventaja de dar información valiosa acerca de la virulencia de la cepa libre VEBI involucrada y el momento posible en el que tuvo lugar la infección.

**[0275]** Las pruebas serológicas actuales incluyen la neutralización del suero-virus y ELISA (200). ELISA se utiliza ampliamente debido a que es un procedimiento sensible y rápido. Con ELISA es fácil de manejar grandes números de muestras. Utilizando técnicas serológicas es posible detectar la respuesta inmunológica en un brote o evaluar los programas de vacunación (178).

**[0276]** El virus puede aislarse en huevos embrionados, cultivos celulares o mediante la inoculación de aves susceptibles. La inoculación en aves es el mejor procedimiento, debido a que los otros procedimientos pueden modificar las características originales de las cepas del VEBI de origen natural (200).

**[0277]** Los antígenos virales pueden detectarse mediante técnicas de anticuerpo fluorescente directas o indirectas, inmunohistoquímica, imundifusión en gel de agar y ELISA de captura de antígeno (AC-ELISA). El uso de anticuerpos monoclonales en la detección de captura permite una caracterización antigenética más precisa (216, 218).

**[0278]** La reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) permite la detección del ARN viral de muestras clínicas infectadas (114, 138, 252). La diferenciación de las cepas es posible si los amplicones de RT-PCR se analizan adicionalmente usando enzimas de restricción (113, 115, 117) o secuenciación (7, 9). Otras técnicas moleculares incluyen el uso de sondas de ADN (111, 112).

**[0279]** Inmunidad. La exposición natural al virus, o la vacunación con vacunas vivas o inactivadas, estimula la inmunidad activa. Los niveles de anticuerpos normalmente son muy altos después de la exposición de campo o la vacunación. La inmunización de apoyos es el procedimiento principal utilizado para el control de la EBI en pollos. La inmunización de bandadas reproductoras es especialmente importante para conferir inmunidad pasiva a su progenie (148). El anticuerpo transmitido de la madre a través de la yema del huevo puede proteger a los polluelos contra infecciones tempranas con la EBI, con protección resultante contra el efecto inmunosupresor del virus (148). Debido a que la inmunidad maternal difiere con la vacunación, el problema principal con la inmunización activa de polluelos maternalmente inmunes jóvenes es la determinación del tiempo apropiado de vacunación. Esta determinación se facilita controlando los niveles de anticuerpos en una bandada reproductora o su progenie (241).

**[0280]** La protección satisfactoria frente al VEBI se puede lograr mediante la inmunización con vacunas vivas o inactivadas. Las vacunas vivas clásicas logran una protección amplia y a largo plazo, pero poseen patogenicidad residual y un riesgo proporcional de reversión a la virulencia (240). Están disponibles muchas selecciones de vacunas vivas en base a la virulencia y la diversidad antigenética. De acuerdo con la virulencia, las vacunas se clasifican como leves, intermedias leves, intermedias, intermedias plus, o calientes. También están disponibles vacunas que contienen variantes Delaware (148). Se usan extensamente vacunas inactivadas en emulsiones de

aceite para estimular altos niveles de inmunidad maternal en el campo (148). Las vacunas inactivadas o las vacunas vivas hechas de cepas variantes protegen a los pollos de la enfermedad causada por cualquier cepa de variante o convencional, mientras que las vacunas inactivadas hechas de cepas convencionales no protegen, o sólo protegen parcialmente contra la estimulación con cepas variantes (105). Las cepas muy virulentas del VEBI pueden

5 controlarse adecuadamente bajo condiciones experimentales mediante la vacunación con vacunas comerciales preparadas a partir de cepas atenuadas clásicas (53, 182, 241).

**[0281]** La vacunación en el huevo puede proporcionar una forma de vacunas para obviar los efectos del anticuerpo maternal e iniciar una respuesta inmune primaria (65). También han surgido vacunas de complejo de virus-anticuerpo y parecen muy prometedoras (80). Esta nueva tecnología utiliza antisiero neutralizante hiperinmune específico con un virus de vacuna en condiciones que no son suficientes para neutralizar el virus de la vacuna, pero que son suficientes para retardar los efectos patológicos de la vacuna sola. Esto permite que los polluelos sean vacunados de forma más eficaz en presencia de inmunidad pasiva incluso con una cepa que será virulenta para el uso en el huevo o a la eclosión (80). Las proteínas del VEBI, expresadas en levadura o a través del sistema de vaculovirus, se han estudiado para el uso como vacunas subunitarias (51, 149, 189, 239). Una ventaja de esta tecnología es que una vacuna basada en VP2 sola debe permitir el control de la situación de campo mediante la discriminación entre el anticuerpo inducido por la vacuna (solamente anti-VP2) y el inducido por la infección (anti-VP2 y VP3) (240). El uso de un sistema de genética inversa podría representar una base para la atenuación genética de cepas y para la generación de nuevas vacunas, aunque la interferencia de la inmunidad pasiva aún existirá. Por lo tanto, debido a que son menos sensibles a la neutralización por los anticuerpos maternalmente derivados del anti-VEBI, las vacunas virales recombinantes que expresan la proteína VP2, tal como el virus pox aviar (10), herpesvirus del pavo (HVT) (40, 234), o adenovirus aviar (210) podrían ser capaces de cebar una respuesta inmune activa.

10 **[0282]** Variación antigénica. La alta tasa de mutación debida al ARN polimerasa de los virus de ARN, genera una diversificación genética que podría conducir a la aparición natural de virus con nuevas propiedades que les permitirán persistir en poblaciones inmunes (240). En el caso del VEBI, estas mutaciones conducen a variaciones y modificaciones antigénicas en la virulencia *in vivo* y la atenuación *in vitro* (240).

15 **[0283]** La proteína de cápside, VP2, es el principal inmunógeno protector del huésped. La inmunización de pollos susceptibles con VP2 purificada induce anticuerpos neutralizantes y confiere protección frente a la estimulación del virus virulento homólogo (14, 60). Los anticuerpos monoclonales alzados contra VP2 tienen la habilidad de neutralizar virus homólogos (6, 14, 215, 218). Utilizando un anticuerpo monoclonal neutralizante, se identificó una región antigénica específica de VP2 entre los aminoácidos 206 y 350. Puesto que este epítopo se desnaturizó mediante SDS, se determinó que es un epítopo dependiente conformacionalmente (6). También se ha informado de los epítopos antigénicos en la proteína VP3, pero estos anticuerpos no son completamente neutralizantes (6, 59).

20 **[0284]** La diversidad antigénica entre los serotipos del VEBI se ha reconocido desde 1980, cuando los serotipos 1 y 2 se definieron en base a su falta de neutralización cruzada *in vitro* (153). En base a estudios con anticuerpos monoclonales, se ha descubierto que las cepas del VEBI que pertenecen a los serotipos 1 y 2 no comparten epítopos neutralizantes principales (13, 203). Algunos investigadores han desarrollado anticuerpos monoclonales anti-serotipo 1 neutralizantes polivalentes, tales como los anticuerpos monoclonales 1, 6, 7, 8 y 9 (55), el anticuerpo monoclonal 8 (218), y anticuerpos monoclonales 6F6 y 7C9 (243).

25 **[0285]** Las diferencias antigénicas se han demostrado en el serotipo 1, y el estudio de diferentes cepas ha conducido a dividir el serotipo 1 en seis subtipos, diferenciados por los ensayos de neutralización cruzada usando sueros policlonales (108).

30 **[0286]** Los estudios con anticuerpos monoclonales demostraron la presencia de un número de epítopos neutralizantes modificados entre cepas antigenicamente variantes detectadas en los Estados Unidos. En base a esta evidencia, puede haber un desplazamiento antigénico en los virus del VEBI en los Estados Unidos (216). Hay un mínimo de al menos cinco epítopos de neutralización en las cepas del VEBI convencionales, como se define por los anticuerpos policlonales 8, 179, R63, B69 y 10. Los virus Delaware han perdido el sitio B69, los virus GLS carecen de los sitios B69 y R63, y el virus DS326 carece de los sitios para los anticuerpos monoclonales B69, R63 y 179 (216). Por lo tanto, en sobre la base de las reactividades con diversos anticuerpos monoclonales, los virus VEBI se agrupan antigenicamente como clásicos o convencionales, GLS, DS326 y variantes de tipo Delaware (238).

35 **[0287]** A pesar de sus mejores propiedades patogénicas, las cepas del vvIBDV se consideraron que estrechamente relacionadas antigenicamente a las cepas convencionales, tales como la cepa Faragher 52/70, en base a los altos índices de neutralización cruzada (53). Usando anticuerpos monoclonales neutralizantes desarrollados por Snider para las variantes US VEBI, van der Marel estudio doce aislados europeos del VEBI. No detectó diferencias importantes entre la cepa convencional 52/70 y el vvIBDV (244). Se produjeron datos similares por Oppling y col. (182). Sin embargo, Etteradossi y col. (54) desarrollaron nueve anticuerpos monoclonales diferentes y usando estos detectó de unión y neutralizantes modificadas frente a las cepas francesas del vvIBDV.

Todos sus anticuerpos monoclonales neutralizaron la mayoría de cepas de vacunas leves e intermedias, mientras que dos anticuerpos monoclonales no neutralizaron una cepa del vvIBDV francesa, así como la variante A de Estados Unidos, y la cepa europea Farahher 52/70. En base a sus resultados, se sugiere un epítopo neutralizante que puede alterarse en las cepas del vvIBDV europeas, causando una disminución de la neutralización del anticuerpo. Esta diferencia podría utilizarse para diferenciar cepas del vvIBDV (54, 55).

**[0288]** Base molecular de la variabilidad del VEBI. La secuenciación de ácidos nucleicos de genes que codifican VP2 y la deducción posterior de sus secuencias aminoacídicas predichas, condujo a la identificación de una región hipervariable. Los cambios de aminoácidos entre las cepas no se distribuyen uniformemente a través de la estructura de lectura abierta, pero se agrupan en ciertas regiones. La mayoría de los cambios que tienen lugar en VP2 están localizados entre los aminoácidos 239 y 332 (9, 134, 238). Esta región altamente variable está completamente dentro de las secuencias de VP2 identificadas como la región mínima requerida para la reacción con el anticuerpo monoclonal de neutralización del virus (6, 60, 251).

**[0289]** Los perfiles de hidrofilia de esta región muestran que han dos picos hidrófilos en el extremo de esta región, siendo el pico más grande de los aminoácidos 212 a 224 y el otro de 314 a 324. Se ha mostrado que estas regiones hidrófilas son importantes en la unión de anticuerpos neutralizantes, y, por consiguiente, se presume que son una parte principal del dominio neutralizante (85, 203). Es interesante que la mayoría de las variaciones de aminoácidos en esta región están dentro de estos dos picos (9, 134).

**[0290]** Las variaciones en antigenicidad del VEBI dependen de los cambios en los picos hidrófilos. La cepa de serotipo 2 23/82 (203), las variantes antigenicas Norteamericanas A, E, GLS y DS326 (85, 134, 238) y los mutantes de escape resistentes a la neutralización (203) exhiben cambios de aminoácidos en estos picos hidrófilos. Sólo se encuentran diferencias en los dominios hidrófobos de intervención entre las cepas de serotipo 1 típicas (238).

**[0291]** Una comparación de las secuencias nucleotídicas sugirió que cuatro alteraciones de aminoácidos en la proteína VP2 de la cepa Delaware E permitieron el escape de los anticuerpos neutralizantes. Estos aminoácidos se localizaron en las posiciones 213, 222, 318 y 323 (85). Mediante enzimas de restricción y análisis de la secuencia aminoacídica, se han detectado mutaciones puntuales en los residuos 222, 254 y 323. Los residuos aminoacídicos 222 y 254 se mutan consistentemente en las cepas de variantes (47, 116). La glicina está presente en las cepas convencionales, residuo aminoacídico número 254, mientras que las variantes tienen serina en esta posición (47, 116).

**[0292]** Vakharia y col. (238) utilizaron anticuerpos monoclonales para correlacionar variaciones antigenicas con sustituciones de secuencia aminoacídica en la región hipervariable de VP2. Descubrieron que el residuo aminoacídico glutamina en la posición 249 podría estar implicado en la unión del anticuerpo neutralizante B69, que reconoce epítopos en cepas convencionales. Todos los virus variantes tienen lisina en lugar de glutamina en esta posición, y escapan con la unión con el anticuerpo B69.

**[0293]** Usando un sistema de expresión de baculovirus para sintetizar todas las proteínas estructurales codificadas para el segmento A del genoma del VEBI, Vakharia y col. (237), produjeron partículas similares a virus. Mapearon los sitios antigenicos al producir clones de ADNc químicos del VEBI usando el plásmido GLS variante como una cadena principal e insertando fragmentos de las cepas D78 y Delaware. Están presentes al menos dos sitios antigenicos en la superficie del VEBI, uno reside entre los residuos aminoacídicos 222 y 249, y el otro entre 269 y 323.

**[0294]** La función de VP1 en la virulencia de VEBI todavía se ha establecido. Es probable que la polimerasa viral influya en la tasa de replicación y, por lo tanto, en el potencial patogénico de un virus. Las secuencias de VP1 de cepas del VEBI muy virulentas son genéticamente distintas de las de las cepas virulentas clásicas o atenuadas, así, la VP1 del vvIBDV constituye un linaje genético distinto de aquel de las cepas virulentas clásicas o atenuadas y también las cepas del serotipo 2 (104).

**[0295]** En las cepas altamente virulentas, se ha informado de tres residuos aminoacídicos específicos en VP2 en la posición 222 (Ala), 256 (Ile), 294 (Ile) y 299 serina, que difieren de las cepas clásicas (22). Estas sustituciones también están presentes en otras cepas aisladas de otros países, tales como Alemania (256), Bangladesh (103), China (29), Israel (190), Japón (143, 252), Taiwán (144), Malasia (33, 95), Nigeria (231, 256), Vietnam (231) y Brasil (41, 100). Las posiciones 222-223 y 318-324 pueden ser críticas para los vvIBDV (56). Estas posiciones se han identificado como "puntos calientes" para las mutaciones en varios mutantes de escape resistentes a los anticuerpos monoclonales neutralizantes seleccionados (203, 243).

**[0296]** Inmunosupresión en pollos. En la producción aviar, las enfermedades inmunosupresoras han sido y permanecen siendo económicamente importantes. El fracaso de la vacunación, el aumento de decomisos y la mortalidad, la deficiente conversión del alimento y el aumento de la morbilidad y el coste de la medicación comúnmente son resultantes de la inmunosupresión. La inmunosupresión se ha definido como "un estado de

disfunción temporal o permanente de la respuesta inmune que resulta del daño al sistema inmune que conduce a un aumento de la susceptibilidad de la enfermedad (46). Numerosos agentes inmunosupresores afectan a las especies aviares y de mamíferos (167), incluyendo virus, parásitos procarióticos y eucarióticos, toxinas microbianas, sustancias químicas, fármacos, deficiencia nutricional (137) y diversos varios estresantes psicológicos y físico-ambientales (45). El virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) es de mayor interés debido a la difundida aparición de la infección en pollos comerciales. La infección con VEBI en una etapa temprana compromete significativamente las respuestas inmunes humorales y locales de los pollos (201). El virus de la anemia del pollo también es un patógeno importante en las aves y parece dirigirse a las células progenitoras eritroides y linfoides en la médula ósea y el timo, respectivamente (1). La destrucción de los progenitores eritroides y mieloides en la médula ósea da como resultado anemia severa, y la depleción de granulocitos y trombocitos. La destrucción de linfocitos T da como resultado la depleción de células citotóxicas maduras y linfocitos T auxiliares con la inmunosupresión consecuente. En la infección por virus de la enfermedad de Marek (VEM), el grado de inmunosupresión se determina mediante la persistencia de la infección citolítica temprana, la atrofia de la bolsa de Fabricio y el timo, y la evidencia histológica de la necrosis y de atrofia en los órganos linfoides (26, 28). Los síndromes causados por el consumo dietético de alimento que contiene niveles moderados a altos de micotoxinas varía de mortalidad aguda a crecimiento lento y reducción de la eficiencia reproductora (188). El consumo de niveles inferiores de metabolitos tóxicos fúngicos puede dar como resultado una deterioro de la inmunidad y una disminución de la resistencia a la enfermedad infecciosa. La inmunosupresión inducida por micotoxinas se puede manifestar como una disminución de la actividad de linfocitos T o B, inmunoglobulina suprimida y producción de anticuerpos, actividad de complemento reducida, o un deterioro de la función de la célula reductora de macrófagos (35).

**[0297]** Se han usado tratamientos de pollos con ciclofosfamida o ciclosporina como un medio para inhibir las respuestas inmunes humorales o mediadas por células con el fin de determinar la función de los linfocitos T y B en las respuestas protectoras a patógenos infecciosos de los pollos (36, 58, 63, 106, 196, 247).

**[0298]** La ciclosporina es un agente antineoplásico y un inmunomodulador usado terapéuticamente en el tratamiento de tumores y trastornos autoinmunes. El precursor, ciclofosfamida, *in vivo* no es alquilante, citotóxico, ni inmunosupresor (7 6). *In vivo*, la ciclofosfamida se convierte mediante enzimas microsómicas hepáticas en 4-hidroxiciclofosfamida (4-OHCP) que se altera reversiblemente para dar aldofosfamida (AP) (34). Después, el compuesto 4-OHCP/AP se destoxifica enzimáticamente o se somete a una degradación espontánea para dar mostaza de fosfaramida (pM) y acroleína dentro de las células (34). Este agente alquilante induce reticulaciones de ADN, una etapa importante en la provocación del desarrollo de mutaciones puntuales y aberraciones cromosomales (34). Los pollos recientemente eclosionados tratados con ciclofosfamida se transforman irreversiblemente en deficientes de linfocitos B (142). Además, la citotoxicidad de linfocitos B selectiva se consigue más notablemente cuando la exposición de ciclofosfamida tiene lugar durante la embriogénesis (248). Los linfocitos T pueden inactivarse o su proliferación puede ralentizarse mediante el tratamiento de CP individual o múltiple, de alta dosis en polluelos neonatales, pero el número de linfocitos T en el timo pueden recuperarse en dos semanas (69). La toxicidad selectiva de ciclofosfamida se debe principalmente a su sensibilidad diferencial de linfocitos, y no debido a la distribución del compuesto diferencial, la captación de los tejidos inmunes o la activación específica de sitio y la destoxicificación (159). Los estudios de estructura-actividad en el embrión de polluelo revelaron la inducción de la toxicidad de linfocitos B selectiva que se indujo mediante análogos de ciclofosfamida capaces de formar reticulaciones entre hebras de ADN (248).

**[0299]** La ciclosporina, un fármaco inmunosupresor de linfocitos T selectivos, disminuye la inmunidad mediada por las células en pollos, causando una supervivencia del injerto de piel prolongada, una disminución de respuestas proliferativas en linfocitos estimulados con mitógenos y un descenso de respuestas de linfocitos T entramados al antígeno inyectado (88). La ciclosporina impide la síntesis de citocinas por los linfocitos T bloqueando una fase tardía en la ruta de señalización iniciada por el receptor de linfocitos T. Esto afecta especialmente a la producción de interleucina-2 (IL-2), por lo tanto, se reduce la proliferación de linfocitos T. Como consecuencia, las funciones dependientes de IL-2 que incluyen actividades T-auxiliares, citotoxicidad, actividad celular inactivada natural y una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos se disminuirán después del tratamiento con ciclosporina (88).

#### Referencias:

**55 [0300]**

1. Adair. Dev Comp Immunol 24: 247-255. 2000.
2. Alexander. Diseases of Poultry 11 ed. Saif, Y. M. Iowa State Press Ames, IA. 63-87. 2003.
3. Allan y col. Vet Rec 90: 511-512. 1972.
4. Apple y col. Avian Dis 35: 422-425. 1991.
5. Atabay y col. J Appl Microbiol. 84: 1017-1024. 1998.
6. Azad y col. Virology 161: 145-152. 1987.
7. Banda y col. Avian Dis 45: 620-630. 2001.
8. Banda y col. Avian Dis. 47: 87-95. 2003.

9. Bayliss y col. *J Gen Virol* 71 (Pt 6): 1303-1312. 1990.  
 10. Bayliss y col. *Arch Virol* 120: 193-205. 1991.  
 11. Bayyari y col. *Poult Sci* 74: 1799-1809. 1995.  
 12. Bayyari y col. *Poult Sci* 74: 1961-1969. 1995.
- 5 13. Becht. *Curr Top Microbiol Immunol* 90: 107-121. 1980.  
 14. Becht y col. *J Gen Virol* 69 (Pt 3): 631-640. 1988.  
 15. Benton y col. *Avian Dis* 11: 430-438. 1967.  
 16. Benton y col. *Avian Dis* 11: 438-445. 1967.  
 17. Bernard y col. *J Virol*. 33: 717-723. 1980.
- 10 18. Birghan y col. *Embo J* 19: 114-123. 2000.  
 19. Blagburn y col. *J Protozool* 38: 25S-28S. 1991.  
 20. Bottcher y col. *J Virol* 71: 325-330. 1997.  
 21. Bracewell y col. *World's Poult Sci J* 40. 1984.  
 22. Brown y col. *J Gen Virol* 75 (Pt 3): 675-680. 1994.
- 15 23. Bruenn. *Nucleic Acids Res* 19: 217-226. 1991.  
 24. Brugh. *Avian Dis* 30: 199-203. 1986.  
 25. Burkhardt & Muller. *Arch Virol* 94: 297-303. 1987.  
 26. Buscaglia y col. *J Gen Virol* 69: 1067-1077. 1988.  
 27. Calnek. *Diseases of Poultry* 11<sup>a</sup> ed. Saif, Y. M. Iowa State Press Ames, IA. 271-282. 2003.
- 20 28. Calnek y col. *Avian Dis* 42: 124-132. 1998.  
 29. Cao y col. *Avian Dis* 42: 340-351. 1998.  
 30. Chettle y col. *Vet Rec* 125: 271-272. 1989.  
 31. Cheville. *Am J Pathol* 51: 527-551. 1967.  
 32. Cho. *Avian Dis* 14: 665-675. 1970.
- 25 33. Chong y col. *Acta Virol* 45: 217-226. 2001.  
 34. Colvin & Hilton. *Cancer Treat Rep* 65: 89-95. 1981.  
 35. Corrier. *Vet Immunol Immunopathol* 30: 73-87. 1991.  
 36. Corrier y col. *Avian Dis* 35: 40-45. 1991.  
 37. Cosgrove. *Avian Dis* 6: 385-389. 1962.
- 30 38. Craig. *Proc 20th National Meeting on Poultry Health and Condemnations*, Ocean City, MD. 35-37. 1985.  
 39. Cullen y col. *Am J Res* 49: 5. 1988.  
 40. Darteil y col. *Virology* 211: 481-490. 1995.  
 41. Di Fabio y col. *Vet Rec* 145: 203-204. 1999.  
 42. Dobos. *J Virol* 32: 1047-1050. 1979.
- 35 43. Dobos y col. *J Virol* 32: 593-605. 1979.  
 44. Dobos & Roberts. *Can J Microbiol* 29: 377-384. 1983.  
 45. Dohms & Metz. *Vet Immunol Immunopathol* 30: 89-109. 1991.  
 46. Dohms & Saif. *Avian Dis*. 28: 305-310. 1984.  
 47. Dormitorio y col. *Avian Dis* 41: 36-44. 1997.
- 40 48. Dormitorio y col. *Southern Conference on Avian Diseases*, Atlanta, GA. 40. 2001.  
 49. Dorner y col. *Appl Environ Microbiol* 46: 698-703. 1983.  
 50. Duncan y col. *J. Virol.* 61: 3655-3664. 1987.  
 51. Dybing & Jackwood. *Avian Dis* 42: 80-91. 1998.  
 52. Erichsen & Harboe. *Acta Pathol Microbiol Scand* 33: 56-71. 1953.
- 45 53. Eterradossi y col. *Zentralbl Veterinarmed [B]* 39: 683-691. 1992.  
 54. Eterradossi y col. *Arch Virol* 142: 2079-2087. 1997.  
 55. Eterradossi y col. *Arch Virol* 142: 255-270. 1997.  
 56. Eterradossi y col. *Arch Virol* 143: 1627-1636. 1998.  
 57. Eterradossi y col. *Avian Pathol.* 28: 36-46. 1999.
- 50 58. Fadly y col. *Avian Dis* 29: 12-25. 1985.  
 59. Fahey y col. *J Gen Virol* 66 (Pt 12): 2693-2702. 1985.  
 60. Fahey y col. *J Gen Virol* 70 (Pt 6): 1473-1481. 1989.  
 61. Faragher y col. *Vet Rec* 95: 385-388. 1974.  
 62. Fernandez-Arias y col. *J Virol* 71: 8014-8018. 1997.
- 55 63. Fitzgerald y col. *Avian Dis* 43: 476-483. 1999.  
 64. Fox & Lee. *Lab Anim Sci* 47: 222-225. 1997.  
 65. Gagic y col. *Avian Dis* 43: 293-301. 1999.  
 66. Gardner y col. *Nature* 387: 245. 1997.  
 67. Gelb y col. *Avian Dis* 23: 634-645. 1979.
- 60 68. Giambrone y col. *Am J Vet Res* 38: 581-583. 1977.  
 69. Glick. *Transplantation* 11: 4334-4439. 1971.  
 70. Goble & Kutz. *J Parasitology* 31: 323-331. 1945.  
 71. Good. *Poult Dig* 41: 298. 1982.  
 72. Goodwin. *Avian Dis* 39: 643-645. 1995.

73. Goodwin & Hafner. Diseases of Poultry. 10<sup>a</sup> ed. Calnek, B. W. Iowa State University Press Ames, IA. 1034-1038. 1997.
74. Goodwin y col. Avian Pathol 25: 269-279. 1996.
75. Gregory, C. R., B. W. Ritchie, K. S. Latimer, W. L. Steffens, D. Pesti, R. Campagnoli, and P. D. Lukert. Progress in understanding proventricular dilatation disease. International Aviculturists Society, Orlando, FL. 1998
- 5 76. Grochow, L. B., and M. Colvin. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. Clin Pharmacokinet. 4: 380-394. 1979.
77. Gulbahar y col. Aust Vet J 78: 247-249. 2000.
78. Gupta & Trapp. Avian Dis 15: 408-412. 1971.
- 10 79. Guy & Barnes. 139th Meeting of the American Veterinary Medical Association, Nashville, TN. 2002.
80. Haddad y col. Avian Dis 41: 882-889. 1997
81. Harkness y col. Arch Virol 48: 63-73. 1975.
82. Harry y col. Br Poult Sci 16: 69-78. 1975.
83. Hassan y col. Avian Dis 40: 567-571. 1996.
- 15 84. Hayes & Wobeser. Can J Comp Med 47: 180-187. 1983.
85. Heine y col. J Gen Virol 72 (Pt 8): 1835-1843. 1991.
86. Hemboldt & Garner. Avian Dis 8: 561-575. 1964.
87. Henderson y col. Vet Rec 123: 492-494. 1988.
88. Hill y col. Avian Dis 33: 86-92. 1989.
- 20 89. Hiraga y col. J Vet Med Sci 56: 1057-1063. 1994
90. Hirai y col. Infect Immun 10: 1235-1240. 1974.
91. Hirai & Calnek. Infect Immun 25: 964-970. 1979.
92. Hirai y col. Avian Dis 25: 484-496. 1981.
93. Hitchner. Poult Sci 49: 511-516. 1970.
- 25 94. Hodges. The histology of the fowl. Academic Press. Londres. 1974.
95. Hoque y col. Avian Dis 30: 369-380. 2001.
96. Howie & Thorsen. Can J Comp Med 45: 315-320. 1981.
97. Huchzermeyer y col. Vet Rec 133: 143-144. 1993.
98. Hudson y col. Nucleic Acids Res 14: 5001-5012. 1986.
- 30 99. Huff y col. Avian Dis 45: 828-843. 2001.
100. Ikuta y col. Avian Dis 45: 297-306. 2001.
101. Inoue y col. J Vet Med Sci 54: 575-577. 1992.
102. Inoue y col. Avian Dis 38: 839-846. 1994.
103. Islam y col. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 48: 211-221. 2001.
- 35 104. Islam y col. Arch Virol 146: 2481-2492. 2001.
105. Ismail & Saif. Avian Dis 35: 460-469. 1991.
106. Isobe y col. Dev Comp Immunol 24: 433-441. 2000.
107. Hill. Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl. Ed. B. M. Freeman. Academic Press. Londres. 1983.
108. Jackwood & Saif. Avian Dis 31: 766-770. 1987.
- 40 109. Jackwood y col. Avian Dis 26: 871-882. 1982.
110. Jackwood y col. Avian Dis 29: 1184-1194. 1985.
111. Jackwood. Vet Microbiol 24: 253-260. 1990
112. Jackwood y col. Avian Dis 36: 154-157. 1992.
113. Jackwood & Jackwood. Avian Dis 38: 531-537. 1994.
- 45 114. Jackwood y col. Avian Dis 40: 457-460. 1996.
115. Jackwood & Jackwood. Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. Avian Dis 41: 97-104. 1997.
116. Jackwood y col. Virus Res 49: 131-137. 1997.
117. Jackwood & Sommer. Avian Dis 42: 321-339. 1998.
- 50 118. Jagadish y col. J Virol 62: 1084-1087. 1988.
119. Jeffrey y col. Avian Dis 38: 630-634. 1994.
120. Jensen y col. Avian Dis 35: 969-973. 1991.
121. Jungmann y col. J Gen Virol 82: 1107-1115. 2001.
122. Kelly y col. 138th American Veterinary Medical Association, Boston, MA. 2001.
- 55 123. Kibenge, F. S., A. S. Dhillon and R. G. Russell. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. J Gen Virol 69 (Pt 8): 1757-1775. 1988.
124. Kibenge y col. Arch Virol 141: 1133-1141. 1996.
125. Kibenge & Dhama. Arch Virol 142: 1227-1236. 1997.
126. Kibenge y col. Arch Virol 142: 2401-2419. 1997.
- 60 127. Kim y col. Vet Immunol Immunopathol 61: 331-341. 1998.
128. Kim y col. Avian Dis 43: 401-413. 1999.
129. Kitamura y col. Arch Virol 145: 2003-2014. 2000.
130. Kouwenhoven y col. Avian Pathol 7: 183-187. 1978.
131. Kouwenhoven y col. Avian Pathol 17: 879-892. 1988.

132. Lam. J Comp Pathol 116: 367-377. 1997.  
 133. Lam. Microb Pathog 25: 147-155. 1998.  
 134. Lana y col. Virus Genes 6: 247-259. 1992.  
 135. Lasher & Davis. Avian Dis 41: 11-19. 1997.  
 5 136. Lasher & Davis. World's Poult Sci J 50: 134-166. 1994.  
 137. Latshaw. Vet Immunol Immunopathol 30: 111-120. 1991.  
 138. Lee y col. J Virol Methods 40: 243-253. 1992.  
 139. Lee y col. Dis Aquat Organ 37: 13-21. 1999.  
 140. Lejal y col. J Gen Virol 81: 983-992. 2000.  
 10 141. Lenz y col. J Vet Diagn Invest 10: 145-151. 1998.  
 142. Lerman & Weidanz. J Immunol. 105: 614-619. 1970.  
 143. Lin y col. Avian Dis 37: 315-323. 1993.  
 144. Liu y col. Res Vet Sci 70: 139-147. 2001.  
 145. Liu y col. Avian Dis 44: 161-169. 2000.  
 15 146. Lombardo y col.. J Virol 73: 6973-6983. 1999.  
 147. Lombardo y col. Virology 277: 345-357. 2000.  
 148. Lukert & Saif. Diseases of Poultry. 10th B. W. Calnek, H. J. B., C. W. Beard, L. R. McDougald, Y. M. Saif. Iowa State University Press Ames, IA. 721-738- 1997.  
 149. Macreadie y col. Vaccine 8: 549-552. 1990.  
 20 150. Martinez-Torrecuadrada y col. Virology 278: 322-331. 2000.  
 151. Matsumoto, R., and Y. Hashimoto. Distribution and developmental change of lymphoid tissues in the chicken proventriculus. J Vet Med Sci 62: 161-167. 2000.  
 152. McAllister y col. Poult Sci 74: 45-49. 1995.  
 153. McFerran y col. Avian Pathol 9: 395-404. 1980.  
 25 154. McLelland. Form and function in birds. Vol 1. A. S. King, a. J. M. Academic Press. Londres. 103-132. 1979.  
 155. McNulty & Saif. Avian Dis 32: 374-375. 1988.  
 156. McNulty y col. Avian Pathol 8: 205-212. 1979.  
 157. McNulty y col. Avian Pathol 13: 429-439. 1984.  
 158. Mertens y col. J Gen Virol 59: 47-56. 1982.  
 30 159. Misra & Bloom. Toxicology 66: 239-256. 1991.  
 160. Morales & Boclair. 42nd. Western Poultry Disease Conference, Sacramento, CA. 91-92. 1993.  
 161. Muller & Becht. J Virol 44: 384-392. 1982.  
 162. Muller & Nitschke. Virology 159: 174-177. 1987.  
 163. Muller & Nitschke. Med Microbiol Immunol (Berl) 176: 113-121. 1987.  
 35 164. Muller y col. Zentralbl Veterinarmed [B] 26: 345-352. 1979.  
 165. Mundt y col. J Gen Virol 76 (Pt 2): 437-443. 1995.  
 166. Mundt y col. J Virol 71: 5647-5651. 1997.  
 167. Muneer y col. Br Vet J 144: 288-301. 1988.  
 168. Mussman & Twiehaus. Avian Dis 15: 483-502. 1971.  
 40 169. Mutlu y col. Tierarztl Prax Ausg G Grossstiere Nutztiere 25: 460-462. 1997.  
 170. Nagarajan & Kibenge. Can J Vet Res 61: 81-88. 1997.  
 171. Nawathe y col. Vet Rec 102: 444. 1978.  
 172. Newberne y col. J Am Vet Assoc 128: 553-555. 1956.  
 173. Newberry. Ph.D. Dissertation. Fayetteville, AR, University of Arkansas. 1996.  
 45 174. Nick y col. J Virol 18: 227-234. 1976.  
 175. Nieper y col. Avian Pathol. 28: 279-285. 1999.  
 176. Norton & Ruff. Diseases of Poultry 11<sup>a</sup> ed. Saif, Y. M. Iowa State Press Ames, IA. 937-938. 2003.  
 177. Nunoya y col. Avian Dis 36: 597-609. 1992.  
 178. Odor, E. M. Elisa serology: Application to ibd in broiler production. International Poultry Symposium-Summit on  
 50 Infectious Bursal Disease, Athens, GA. 104-105. 1995.  
 179. Ojeda y col. Avian Dis 41: 312-316. 1997.  
 180. Okoye & Uche. Acta Vet Brno 58: 91-96. 1986.  
 181. Olah y col. Poult Sci 82: 767-770. 2003.  
 182. Oppling y col. Arch Virol 119: 211-223. 1991.  
 55 183. Page y col. Avian Dis 26: 618-624. 1982.  
 184. Pegram y col. Avian Dis 26: 47-59. 1982.  
 185. Pegram & Wyatt. Poult Sci 60: 2429-2440. 1981.  
 186. Persson y col. J Virol 44: 437-443. 1982.  
 187. Phalen & Moore. Avian Dis 47: 254-260. 2003.  
 60 188. Pier y col. J Am Vet Med Assoc. 179: 719-724. 1980.  
 189. Pitcovski y col. Avian Dis 40: 753-761. 1996.  
 190. Pitcovski y col. Avian Dis 42: 497-506. 1998.  
 191. Poole. 43rd Western Poultry Disease Conference, Sacramento, CA. 40-42. 1994.

192. Pope. Avian histopathology. Ridell, C. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square. PA 17-44. 1996.
193. Reece. Infectious proventriculitis and stunting syndrome of broiler chickens. Canberra, Australia, RIRDC. 2002.
194. Reece & Frazier. Avian Pathol. 19: 723-758. 1990.
- 5 195. Revet & Delain. Virology 123: 29-44. 1982.
196. Reynolds & Maraqa. Avian Dis 44: 145-154. 2000.
197. Riddell. Avian Dis 20: 442-445. 1976.
198. Rodenberg y col. Avian Dis 38: 16-21. 1994.
199. Rosenberger & Cloud. J Vet Med Assoc 189: 357. 1986.
- 10 200. Rosenberger y col. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens 4<sup>a</sup> edición. D. E. Swayne, J. R. G., M. W. Jackwood, J. E. Pearson, W. M. Reed. American Association of Avian Pathologists Kennet Square, PA. 215-218. 1998.
201. Saif. Vet Immunol Immunopathol 30: 45-50. 1991.
202. Sanchez & Rodriguez. Virology 262: 190-199. 1999.
- 15 203. Schnitzler y col. J Gen Virol 74 (Pt 8): 1563-1571. 1993.
204. Schulze & Heidrich. Dtsch Tierarztl Wochenschr 108: 264-266. 2001.
205. Sellers y col. Avian Dis 45: 26-33. 2001.
206. Shapiro & Nir. Poult Sci 74: 33-44. 1995.
207. Sharma & Lee. Infect Immun 42: 747-754. 1983.
- 20 208. Sharma y col. Avian Dis 33: 112-124. 1989.
209. Sharma y col. Dev Comp Immunol 24: 223-235. 2000.
210. Sheppard y col. Arch Virol 143: 915-930. 1998.
211. Simoes & Sarnow. J Gen Virol 74: 661-668. 1993.
212. Skeeles y col. Avian Dis 23: 107-117. 1979.
- 25 213. Skeeles y col. Poult Sci 77 (suppl.): 133. 1998.
214. Snedeker y col. Avian Dis 11: 519-528. 1967.
215. Snyder y col. Avian Dis 32: 527-534. 1988.
216. Snyder y col. Avian Dis 32: 535-539. 1988.
217. Snyder. Avian Pathol. 19: 419-423. 1990.
- 30 218. Snyder y col. Arch Virol 127: 89-101. 1992.
219. Songserm y col. Avian Dis 44: 556-567. 2000.
220. Spies y col. Virus Res 8: 127-140. 1987.
221. Stuart y col. J Environ Pathol Toxicol Oncol 6: 369-386. 1986.
- 35 222. Sturkie. Avian Physiology. Cuarta Edición, Springer-Verlag. Nueva York. 1986.
223. Survashe y col. Avian Pathol. 8: 77-93. 1979.
224. Swayne & Halvorson. Diseases of Poultry 11<sup>a</sup> ed. Saif, Y. M. Iowa State Press Ames, IA. 135-160. 2003.
225. Tacken y col. J Gen Virol 81: 209-218. 2000.
226. Tanimura y col. Avian Dis 39: 9-20. 1995.
- 40 227. Tanimura & Sharma. Avian Dis 41: 638-645. 1997.
228. Tanimura & Sharma. J Comp Pathol 118: 15-27. 1998.
229. Tham & Moon. Avian Dis 40: 109-113. 1996.
230. Thayer & Walsh. Poult Sci 72: 741-746. 1993.
231. To y col. J Vet Med Sci 61: 429-432. 1999.
- 45 232. Tsai, S. S., J. H. Park, K. Hirai and C. Itakura. Catarrhal proventriculitis associated with a filamentous organism in pet birds. Jpn J Vet Res 40: 143-148. 1992.
233. Tsai y col. Chin J Microbiol Immunol 16: 307-311. 1983.
234. Tsukamoto y col. Virology 257: 352-362. 1999.
235. Turpin. Master Thesis. Athens, GA, University of Georgia. 1998.
236. Underwood y col. J Gen Virol 36: 93-109. 1977.
- 50 237. Vakharia. Biotech Ann Rev 3: 15-168. 1997.
238. Vakharia y col. Virus Res 31: 265-273. 1994.
239. Vakharia y col. Vaccine 12: 452-456. 1994.
240. van den Berg. Avian Pathol 29: 174-194. 2000.
241. Van den Berg & Meulemans. Avian Pathol. 20: 409-421. 1991.
- 55 242. Van den Berg y col. Avian Pathol. 20: 133-143. 1991.
243. Van der Berg y col. Avian Pathol. 25: 751-768. 1996.
244. Van der Marel y col. Dtsch Tierarztl Wochenschr 97: 81-83. 1990.
245. Vasconcelos & Lam. J Gen Virol 75 (Pt 7): 1803-1806. 1994.
246. Vasconcelos & Lam. J Comp Pathol 112: 327-338. 1995.
- 60 247. Weinack y col. Avian Dis 28: 416-425. 1984.
248. Wilmer & Bloom. Mutat Res 253: 161-172. 1991.
249. Winterfield y col. L&M News Views 3: 103. 1962.
250. Wyeth. Vet Rec 96: 238-243. 1975.
251. Yamaguchi y col. Arch Virol 141: 1493-1507. 1996.

252. Yamaguchi y col. Arch Virol 142: 1441-1458. 1997.  
 253. Yao y col. J Virol 72: 2647-2654. 1998.  
 254. Yao & Vakharia. Virology 285: 50-58. 2001.  
 255. Yu y col. Avian Dis 45: 416-424. 2001.  
 5 256. Zierenberg y col. Arch Virol 145: 113-125. 2000.

VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA Y PROVENTRICULITIS EN POLLOS DE ENGORDE  
 (Véase, Pantin-Jackwood & Brown. 2003. *Avian Diseases*. 47: 681-690).

- 10 [0301] Tabla 4. Casos de origen natural de proventriculitis. Histopatología, RT-PCR para VEBI, IHQ para VEBI y tinción de apoptosis (TUNEL) en secciones tisulares embebidas en parafina y fijadas en formalina de bolsas y proventrículos de pollos de engorde con proventriculitis.

Ave	Bolsa				Proventrículo			
	CL <sup>A</sup>	RT-PCR	IHQ <sup>C</sup>	TUNEL <sup>D</sup>	CL	RT-PCR	IHQ	TUNEL
1	2	-	-	+	4	-	-	+
2	3	+	+	++	4	-	-	+
3	2	-	-	+	4	-	-	+
4	3	+	+	++	4	-	-	+

<sup>A</sup>CL = clasificación de la lesión. 1 = sin lesiones. Para secciones bursales, 2=variación leve del tamaño folicular; 3 = variación moderada del tamaño de los folículos; 4 = necrosis o atrofia folicular. Para secciones proventriculares, 2 = ectasia luminal glandular leve; 3 = ectasia más infiltrados linfoides en el intersticio interglandular; 4 = necrosis glandular aguda o fibrosis severa con infiltrados linfoides.  
<sup>B</sup>Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa; - = negativo; + = positivo.  
<sup>C</sup>Inmunohistoquímica; - = sin tinción; + = tinción mínima; ++ = tinción moderada; +++ = tinción intensa.  
<sup>D</sup>TUNEL = marcación de extremo marcado de dUTP mediada por desoxinucleotidil transferasa terminal; - = sin tinción; + = tinción mínima; ++ = tinción moderada; +++ = tinción intensa

Tabla 5. Pollos experimentales. 4 dpi. Histopatología, RT-PCR para VEBI, IHQ para VEBI y tinción de apoptosis (TUNEL) sobre secciones de tejido embebidas en parafina y fijadas en formalina de pollos de engorde estimulados con diferentes cepas del VEBI. Datos para aves individuales.

Cepa <sup>A</sup>	Proventrículo			Bolsa			Timo					
	CL <sup>B</sup>	RT-PCR <sup>C</sup>	IHQ <sup>D</sup>	TUNEL <sup>E</sup>	CL	RT-PCR	IHQ	TUNEL	CL	RT-PCR	IHQ	TUNEL
Control	1	-	-	-	1	-	-	+	1	-	-	+
	1	-	-	-	1	-	-	+	1	-	-	+
STC	1	-	-	+	4	+	+++	+++	4	+	-	++
	1	+	+	+	4	+	+++	+++	3	+	-	++
GLS	1	-	-	-	2	+	+	++	1	-	-	++
	1	+	-	-	4	+	+++	+++	1	+	-	++
Var.E	1	+	-	+	4	+	++	+++	1	+	-	++
	1	-	-	-	4	+	++	+++	1	+	-	++
Var.A	1	-	-	-	4	+	++	+++	1	+	-	++
	1	-	-	-	4	+	+++	+++	1	-	-	++
D78	1	-	-	-	2	+	++	++	1	-	-	++
	1	-	-	-	2	+	+	++	2	+	-	++
Bursine	1	-	-	-	4	+	+	++	1	-	-	++
	1	-	-	-	4	+	++	++	1	-	-	++
Lukert	1	-	-	-	1	-	-	+	1	-	-	+
	1	-	-	-	1	-	-	+	1	-	-	+

<sup>A</sup>Cepa del VEBI usada para estimular pollos.

<sup>B</sup>CL = clasificación de la lesión. 1 = sin lesiones. Para secciones bursales, 2 = variación leve en el tamaño del folículo; 3 = variación moderada del tamaño de los folículos; 4 = necrosis o atrofia folicular. Para secciones proventriculares, 2 = ectasia luminal glandular libre; 3 = ectasia más infiltrado linfoides en el intersticio interglándular; 4, necrosis glandular aguda o fibrosis severa con infiltrados linfoides.

<sup>C</sup>Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa; - = negativo; + = positivo.

<sup>D</sup>Inmunohistoquímica; - = sin tinción; + = tinción mínima; ++ = tinción moderada; +++ = tinción intensa.

<sup>E</sup>TUNEL = marcación de extremo marcado de dUTP mediada por desoxinucleotidil transferasa terminal; - = sin tinción; + = tinción mínima; ++ = tinción moderada; +++ = tinción intensa.

Tabla 6. Pollos experimentales 6 dpi. Histopatología, RT-PCR para VEBI, IHQ para VEBI y tinción de apoptosis (TUNEL) en secciones de tejido embebidas en parafina, fijadas en formalina de proventrículos, bolsas y timos de pollos de engorde estimulados con diferentes cepas de VEBI. Datos para aves individuales.

Cepa <sup>A</sup>	Proventrículo				Bolsa				Timón			
	CL <sup>B</sup>	RT-PCR <sup>C</sup>	IHQ <sup>D</sup>	TUNEL <sup>E</sup>	CL	RT-PCR	IHQ	TUNEL	CL	RT-PCR	IHQ	TUNEL
Control	1	-	-	-	1	-	-	+	1	-	-	+
	1	-	-	-	1	-	-	+	1	-	-	+
STC	1	-	+	+	4	+	+++	+++	4	+	+	++
		+	+	+	4	+	+++	+++	3	+	-	++
GLS	1	-	-	+	4	+	+	+++	1	-	-	++
		+	+	+	4	+	+	+++	1	+	-	++
Var.E	1	-	-	-	4	+	++	+++	1	+	++	++
	1	+	-	+	4	+	++	+++	1	+	+	++
Var.A	1	-	-	-	4	+	++	+++	1	+	-	++
		+	-	+	4	+	++	+++	1	-	-	++
D78	1	-	-	-	4	+	+++	++	1	-	-	++
	1	+	-	+	4	+	+++	++	2	+	-	++
Bursine	1	-	-	-	4	+	+	++	1	-	-	++
	1	+	-	-	4	+	++	++	1	-	-	++
Lukert	1	-	-	-	1	-	-	+	1	-	-	+
	1	-	-	-	1	-	-	+	1	-	-	+

<sup>A</sup>Cepa del VEBI usada para estimular pollos.

<sup>B</sup>CL = clasificación de la lesión. 1 = sin lesiones. Para secciones bursales, 2 = variación leve en el tamaño del folículo; 3 = variación moderada del tamaño de los folículos; 4 = necrosis o atrofia folicular. Para secciones proventriculares, 2 = ectasia luminal glandular libre; 3 = ectasia más infiltrado linfoides en el intersticio interglandular; 4, necrosis glandular aguda o fibrosis severa con infiltrados linfoides.

<sup>C</sup>Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa; - = negativo; + = positivo.

<sup>D</sup>Inmunohistoquímica; - = sin tinción; + = tinción mínima; ++ = tinción moderada; +++ = tinción intensa.

<sup>E</sup>TUNEL = marcación de extremo marcado de dUTP mediada por desoxinucleotidil transferasa terminal; - = sin tinción; + = tinción mínima; ++ = tinción moderada; +++ = tinción intensa.

5

## REPRODUCCIÓN DE PROVENTRICULITIS EN POLLOS DE ENGORDE COMERCIALES Y SPF (Pantin-Jackwood y col., *Avian Diseases, en prensa*)

- [0302] RESUMEN.** La proventriculitis se estudió reproduciendo experimentalmente la enfermedad en pollos de engorde. Se cebaron pollos comerciales SPF de un día de edad por vía oral con un homogenizado proventricular producido a partir de los ventrículos de pollos de engorde con proventriculitis. 7 y 14 días después de la inoculación, se evaluaron las diferencias en la ganancia de peso, las relaciones de peso de órganos/cuerpo, y la presencia de lesiones macro y microscópicas entre estas aves y los controles. Ambos, tanto los pollos de engorde SPF como los comerciales, tenían agrandamiento del proventrículo con necrosis del epitelio glandular e infiltrados linfocíticos en la glándula proventricular. Los pollos de engorde SPF expuestos a los homogenizados proventriculares desarrollaron Enfermedad de la Bursitis Infecciosa, y el virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) se detectó mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR) y la inmunohistoquímica (IHQ) en tejidos bursales y proventriculares. También fueron positivos por RT-PCR al virus de la bronquitis infecciosa (VBI) y la nefritis desarrollada. Los pollos de engorde comerciales desarrollaron nefritis leve pero no enfermedad de la bursitis, y fueron negativos para el VEBI y el VBI por RT-PCR. Ambos, tanto los pollos de engorde SPF como los comerciales fueron negativos para reovirus y el virus de la enfermedad de Newcastle (VEN), y positivos para el virus de la anemia del pollos (VAP) y adenovirus mediante técnicas moleculares. No se identificaron bacterias en secciones histológicas ni se aislaron de proventrículos afectados. Los filtrados de los homogenizados proventriculares pasados en embriones para el aislamiento del virus causaron atrofia, pero la identificación de la causa por microscopía electrónica (ME) no tuvo éxito. Sin embargo, el líquido alantoide de los huevos fue positivo para el VBI por RT-PCR. La ME de seccionamiento delgado sobre los proventrículos de aves afectadas no logró identificar un agente causante. En conclusión, los homogenizados proventriculares originales tenían VEBI, VBI, adenovirus y VAP, pero no se demostró su función en la producción de proventriculitis. Palabras claves: Pollo; Proventriculitis. Abreviaturas: VAP = virus de la anemia del pollo; Dpi = días después de la inoculación; ME = microscopía electrónica; H&E = hematoxilina y eosina; VEBI = virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa; VBI = virus de la bronquitis infecciosa; IHQ = inmunohistoquímica; VEN = virus de la enfermedad de Newcastle; PBS = solución salina tamponada con fosfato; RT = transcriptasa inversa; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; SPF = libre de patógenos específicos.

**[0303]** INTRODUCCIÓN. La proventriculitis es una enfermedad infecciosa de pollos de etiología desconocida (7). Se caracteriza por un proventrículo atónico, agrandado que se llena de líquido y alimento (2, 8, 9, 13, 17, 28). El istmo gástrico que conecta el proventrículo y la molleja está agrandado, con dilatación de la constricción presente en esta unión.

5

**[0304]** El impacto económico de la proventriculitis se debe principalmente al decomiso de canales contaminados por la ruptura del proventrículo durante la evisceración de rutina (2, 13). La proventriculitis es más severa en aves más jóvenes (4-5 semanas de edad) y se ha asociado con crecimiento deteriorado, una deficiente conversión del alimento, fragilidad intestinal, síndrome de atrofiamiento y paso de alimento no digerido (1, 3, 13, 19, 24, 28, 30). La industria aviar informa de brotes esporádicos, aunque económicamente importantes, de proventriculitis en pollos de engorde (13). Aunque hay plagas por todo el mundo de pollos de engorde con brotes de la enfermedad caracterizada, al menos en parte, por el agrandamiento proventricular, las lesiones coherentes con la proventriculitis transmisible se han descrito en detalle en detalle únicamente en los Estados Unidos (8, 9, 13), Holanda (19) y Australia (28).

10

**[0305]** No se conocen las rutas de infección natural de proventriculitis; sin embargo, los pollos pueden infectarse experimentalmente mediante la inoculación oral con un homogenado preparado a partir de proventrículos de pollos con proventriculitis (2, 9, 13, 28). Debido a que la enfermedad se reproduce con filtrados homogenizados proventriculares ( $0,2\text{ }\mu\text{m}$ ), se sospecha de un virus como el agente etiológico (9, 13, 28). En consecuencia, la enfermedad también se denomina proventriculitis viral transmisible (PVT) (8, 9). Sin embargo, la severidad de las lesiones y los efectos en la producción son más graves en aves tratadas con homogenados no filtrados, lo que sugiere un efecto aditivo de otros agentes infecciosos (13).

**[0306]** Las causas infecciosas potenciales de proventriculitis incluyen adenovirus (12, 21), reovirus (20, 21, 24), virus de la bronquitis infecciosa (VBI) (35), virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) (2, 13, 14, 17, 23, 31) y megabacterias (11, 12, 22, 26). Sin embargo, no se ha descubierto ninguno de estos agentes en una mayoría de casos. La microscopía electrónica ha detectado partículas virales similares a los adenovirus en lesiones agudas pero el aislamiento de este virus a partir de proventrículos afectados ha sido infructuoso (8, 9, 13).

**[0307]** El objetivo de los inventores en este estudio fue reproducir la proventriculitis en pollos de engorde, caracterizar los cambios presentes en los proventrículos y otros órganos, y examinar los proventrículos afectados por la presencia de virus o bacterias mediante procedimientos histológicos, bacteriológicos, virológicos y moleculares.

**[0308]** MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS. Pollos. Se obtuvieron pollos de engorde no vacunados de un día de edad de un criadero comercial. Además, se obtuvieron huevos de pollo Plymouth Rock Blancos Fértils (SEPR, USDA, Athens, GA, Estados Unidos) de una bandada reproductora mantenida en condiciones de SPF y emplumada. La bandada de origen en toda la progenie estuvieron libres de enfermedades aviares comunes, específicamente el VEBI, VEM, VBI, reovirus y VAP. A todos los pollos se les puso una banda, se pesaron, se separaron en grupos y se mantuvieron en unidades de aislamiento Horfsal de presión positiva. Se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*.

**[0309]** Homogenados proventriculares. Se usaron dos homogenados proventriculares diferentes. El homogenado 1 (Hom. 1) se preparó a partir de proventrículos de pollos de 4 semanas de edad con proventriculitis, obtenidos de una planta de procesamiento de gallinas Cornish en Alabama del noroeste (2). El homogenado 2 (Hom. 2) se preparó a partir de proventrículos de pollos de engorde que presentaron proventriculitis después de ser estimulados el día de edad con Hom. 1 (13).

**[0310]** Diseño experimental. 18 pollos comerciales de un día de edad, y 18 pollos de engorde SPF de un día de edad se dividieron en 3 grupos cada uno. El primer grupo se inoculó mediante cebadura oral con 1 ml de solución salina estéril (control negativo). El segundo grupo recibió 1 ml de homogenado 1 proventricular (Hom. 1). El tercer grupo recibió 1 ml del homogenado 2 proventricular (Hom. 2).

**[0311]** Recolección en la muestra y procesamiento. En el día 7 y 14 de edad, se examinaron 3 aves de cada grupo, se pesaron, se desangraron, se sacrificaron mediante dislocación cervical y se les hizo la necropsia. La bolsa, el proventrículo, el bazo y lado derecho del timo se pesaron y las secciones de estos órganos y del hígado, riñón, duodeno, páncreas, corazón, molleja y hueso se recolectaron de cada ave y se fijaron inmediatamente mediante inmersión en formalina tamponada neutra al 10% durante 24 horas. Despues, los tejidos se procesaron y se embebieron en parafina utilizando técnicas histológicas de rutina. También se recogió una sección de proventrículos en una solución de glutaraldehído al 2%, paraformaldehído al 2%, ácido pírico al 0,2% y una solución tamponada de cacodilato 0,1 M a pH 7,2-7,3 para el seccionamiento delgado y el examen microscópico electrónico. Los proventrículos restantes se acumularon por grupo y se recolectaron en tubos de plástico estériles sobre hielo, los homogenados se prepararon (2, 13). En resumen, los proventrículos se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) en un agitador magnético para eliminar los residuos de alimentos y las toxinas. Despues, los proventrículos lavados se diluyeron 1:1 peso/vol en PBS estéril y se homogenizaron con una

mezcladora comercial (Waring, New Hartford, Connecticut). Después, los homogenados se congelaron a -80 °C. Se obtuvo el peso relativo de los órganos usando la fórmula [peso relativo del órgano = (peso del órgano/peso corporal) x 100].

5 **[0312] Histopatología.** Los tejidos embebidos en parafinas se seccionaron, se montaron, se tiñeron usando hematoxilina y eosina (H&E) y se examinaron a ciegas para el tratamiento de lesiones usando microscopía de luz. A las secciones tisulares del proventrículo, la bolsa, el timo y el bazo se les asignó una clasificación de gravedad de la lesión. Una clasificación de lesión de 1 representó ninguna lesiones. Para las secciones bursales, 2 se definió como leve variación del tamaño folicular, 3 como variación moderada del tamaño del folículo, y 4 como necrosis o atrofia folicular. Para las secciones proventriculares, 2 se definió como leve ectasia luminal glandular, 3 como ectasia, leve necrosis glandular, más infiltrados linfoides en el intersticio interglandular, y 4 como necrosis glandular aguda o fibrosis severa con infiltrados linfoides. Para las secciones del timo, 2 se definió como leve adelgazamiento cortical, 3 como moderado adelgazamiento cortical, y 4 como ausencia de linfocitos corticales. Para las secciones del bazo, 2 se definió como leve depleción de linfocitos, 3 como moderado depleción de linfocitos, y 4 como depleción severa de 15 linfocitos.

**[0313]** Para la identificación de bacterias mediante microscopía de luz, las secciones tisulares de proventrículos se tiñeron mediante la técnica de Warthin-Starry (4), y un *Helicobacter pylori* modificado y tinción gástrica (6).

20 **[0314] Serología.** Las muestras de suero obtenidas los días 7 y 14 de edad, de pollos de engorde, tanto comerciales como SPF, se examinaron para comprobar el anticuerpo para VEBI, VBI, VEN, VAP, reovirus, MS y MG, usando pruebas de ELISA disponibles en el mercado (IDEXX Laboatories, Inc. Westbrook, Maine).

25 **[0315] Bacteriología.** Se diluyeron homogenados proventriculares acumulados de aves infectadas experimentalmente de cada grupo en solución salina y se colocaron en placas sobre agar de sangre Campy (Remel, Lenexa, TX). Las placas inoculadas se colocaron en bolsas GasPak (BD Diagnostic Systems; Sparks, MD) y se incubaron a 42 °C durante 48 h. Para verificar el crecimiento anaeróbico, se extendieron placas de agar de sangre y de agar de PEA (alcohol feniletílico) y se incubaron durante una noche a 37 °C en una bolsa GasPak. Los homogenados proventriculares también se colocaron sobre placas de agar de dextrosa Sabouraud y se incubaron a 30 37 °C durante una noche, y después se mantuvieron a temperatura ambiente y se examinaron diariamente para comprobar el crecimiento de moho. El aislamiento de *Salmonella* sp. se intentó mediante un protocolo convencional usando el caldo de enriquecimiento de tetracionato (10).

35 **[0316] Aislamiento del virus.** Una porción del homogenado 2 proventricular (Hom. 2), homogenado proventricular hecho a partir de proventrículos acumulados obtenidos de pollos comerciales estimulados con Hom. 2 (Hom. 2 com.) 7 dpi, y homogenado proventricular negativo del grupo de control (-PV), se congeló y se descongeló tres veces. El sedimento se eliminó de los homogenados mediante centrifugación a 2.500 x g durante 30 min a 4 °C. Los sobrenadantes se hicieron pasar a través de una serie de filtros de fibra de vidrio con un tamaño de poro de membrana final de 0,2 µm. Se inocularon cuatro grupos de cinco embriones de pollo leghorn SPF a los 9 días de 40 edad a través de la membrana corioalantoica y las rutas de la cavidad alantoica (29), con 0,2 ml de uno de los siguientes: filtrado Hom. 2, filtrado Hom. 2 com., filtrado -PV, y solución salina estéril. Los huevos se examinaron diariamente para comprobar la muerte del embrión. A los 7 días después de la inoculación, las membranas corioalantoicas (CAM) y el líquido alantoides se recogieron asepticamente y se colocaron en tubos de microcentrifuga estériles y se congelaron a -80 °C. Una porción de los CAM se recolectó en formalina tamponada al 10% y se 45 procesaron para comprobar su histopatología. Se hicieron cinco pasos ciegos y, en cada uno, se diluyeron el líquido alantoides y CAM 1:10 en diluyente antibiótico antes de la reinoculación.

50 **[0317] Extracción de ARN.** El RNA se extrajo en bolsas y proventrículos embebidos en parafina y fijados en formalina, y en homogenados proventriculares acumulados de Hom. 1, Hom. 2 de grupos experimentales 7 dpi, y del líquido alantoides de huevos inoculados con filtrados de homogenados (quinto pase). Las secciones que hacían un total de cincuenta µm de espesor se cortaron de cada bloque de tejido embebido en parafina y fijado en formalina con un microtomo y una nueva cuchilla para cada bloque. Despues, las secciones se desparafinizaron (HemoDe y etanol al 100%; Fisher Scientific, Pittsburg, PA). Todos los tejidos se digirieron con proteinasa K al 10% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante 3 h a 50 °C. El ARN se extrajo con Trizol (Life Technologies, Inc. Gaithersburg, 55 MD) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, se diluyó en sulfóxido de dimetilo al 90% (DMSO) y se congeló a -80 °C hasta que se analizó.

60 **[0318] Extracción de ADN.** El DNA se extrajo en homogenados proventriculares acumulados, Hom. 1, Hom. 2, de grupos experimentales 7 dpi y del líquido alantoides de huevos inoculados con filtrados de homogenados (quinto pase) usando el Mini Kit de QIAamp DNA (Qiagen Inc., Valencia, CA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ADN extraído se congeló a -80 °C hasta que se analizó.

**[0319] Reacción de la polimerasa de transcriptasa inversa en tiempo real (RT-PCR).** Para la detección de VEBI, VBI, VEN y reovirus se siguió este protocolo: El ARN extraído se desnaturizó a 95 °C durante 5 min y se puso

- sobre hielo (solamente para las reacciones del VEBI y reovirus). La RT-PCR en tiempo real se realizó por separado para cada muestra con los reactivos del kit Light Cycler-RNA Amplification SYBR® Green I (ROCHE Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). Los cebadores usados fueron específicos para la amplificación de cada uno de los virus (Tabla 7). La amplificación y detección de productos específicos se realizó con un Light Cycler de acuerdo con 5 las recomendaciones del fabricante (ROCHE Light Cycler versión 3.0; ROCHE Molecular Biochemicals). En resumen, la transcripción inversa se hizo a 55 °C durante 10 minutos seguida de la desnaturización a 95 °C durante 30 segundos. Se hicieron cuarenta ciclos de PCR que consistían en desnaturización (95 °C durante 1 s), hibridación (55 °C durante 10 s) y extensión (72 °C durante 13 s). Se hizo un análisis de curva de fusión después de una desnaturización iniciada a 95 °C. La curva de fusión se estableció con una temperatura inicial de 65 °C durante 10 10 segundos y después se hizo un aumento de la temperatura gradual de 0,1 °C por segundo hasta alcanzar 95 °C. La temperatura de fusión se usó para confirmar la identidad de los productos específicos virales obtenidos usando el RT-PCR en tiempo real. La confirmación adicional de la amplificación específica se hizo mediante la electroforesis en gel de 8 µl de los productos de PCR en agarosa al 2% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) seguido de la tinción con bromuro de etidio. Los productos de PCR de muestras positivas del VEBI se purificaron usando el kit de 15 purificación QIAgen y se secuenciaron (Molecular Genetics Instrumentation Facility; University of Georgia, GA). Después, los datos de la secuencia se analizaron mediante DNASTAR y las secuencias se compararon con las del VEBI conocido. Las muestras positivas para VBI se analizaron mediante RT-PCR RFLP para comprobar el agrupamiento molecular (15).
- 20 [0320] PCR. La detección del adenovirus y el VAP se hizo como se indica a continuación. Los cebadores usados para estas reacciones se especifican en la Tabla 7. La PCR para el adenovirus se realizó usando lechos de PCR "Ready to go" (Pharmacia Biotech) y siguiendo el protocolo de Raue y col. (27). La PCR para el virus de la anemia del pollo se realizó siguiendo el mismo protocolo usado por Todd y col. (33). Se separó una alícuota de 8 µl de cada reacción mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Sigma Chemical Co.) seguido de la tinción con bromuro 25 de etidio y el examen con un transiluminador U.V.
- 30 [0321] Inmunohistoquímica (IHQ) del VEBI y Ensayo de Inmunofluorescencia (EIF). Todos los procedimientos se hicieron a temperatura ambiente. Las secciones de tejido se cortaron (4 µm) de bolsa embebidas en parafina y provenículos de pollos inoculados y se montaron en portaobjetos de vidrio cargados positivamente (Superfrost/Plus; Fisher Scientific). Se fundió la parafina de los portaobjetos (10 min a 65 °C) y se eliminó mediante inmersión tres veces en Hemo-De (5 min cada vez). Después, los portaobjetos se secaron al aire y se digirieron con proteinasa K al 10% (DAKO, Capinteria, CA) durante 5 min para exponer los sitios diana antigenicos. La tinción para IHQ se realizó sobre las bolsas y provenículos con un teñidor automatizado (Leica ST 5050, Nussloch, Alemania) con un kit de peroxidasa sin biotina (DAKO Envision System; DAKO) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El anticuerpo primario 35 usado fue un anticuerpo monoclonal específico a y reactivo cruzado para todos los VEBI (ATCC Nº HB9490). Después de la tinción de IHQ, las secciones se contratiñeron con hematoxilina, se secaron al aire, se cubrieron con una tapa y se examinaron por microscopía de luz. La tinción para el VEBI se registró como una tinción positiva o negativa. El EIF se realizó sobre secciones de provenículo usando como anticuerpo primario un suero convaleciente obtenido de pollos SPF 14 dpi y diluido 1:100 en PBS estéril. Los portaobjetos se incubaron durante 20 min seguido de tres lavados con 40 PBS de 5 min cada vez. Para el anticuerpo secundario, se usó IgG dirigido contra pollo monoclonal FITC (ACU-Specs) a una dilución 1:40 en PBS. Los portaobjetos se incubaron durante 20 min y después se lavaron tres veces con PBS. Las cubiertas de los portaobjetos se montaron usando 1:1 de glicerol/PBS y las secciones se examinaron usando un microscopio fluorescente (Leitz).
- 45 [0322] Microscopía electrónica de transmisión. Las secciones de provenículo recolectadas de pollos inoculados que presentaron proventriculitis y líquido alantoides recogido del quinto paso en huevos de Hom. 2, Hom. 2 com. y - PV se enviaron para su examen directo con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1210.
- 50 [0323] Análisis estadísticos. La ganancia de peso corporal, peso del órgano relativo y las clasificaciones de lesión se analizaron usando ANOVA, y la comparación media para todos los pares usando HSD de Tukey-Kramer (JMP). Se asumió un significado en el nivel de 0,05 de probabilidad.
- 55 [0324] RESULTADOS. Signos clínicos y lesiones macroscópicas. No se observaron signos clínicos en los grupos de control de solución salina o los pollos comerciales que recibieron los homogenados proveniciales. Los pollos de engorde SPF que recibieron los homogenados tuvieron depresión leve. Se observaron lesiones macroscópicas en todos los provenículos de pollos comerciales inoculados con homogenado y SPF. En ambos, 7 y 14 días después de la inoculación, los provenículos se agrandaron, se moteados y tenían un istmo gástrico distendido (figura 8, 9). La pared provenicular se engrosó, con un patrón lobular de color blanco observado cuando se seccionó. Estas lesiones fueron más evidentes en los pollos de engorde comerciales que en los pollos de engorde 60 SPF, y a los 14 días después de la inoculación para ambos grupos. No se observaron lesiones macroscópicas en ningún otro órgano de las aves infectadas experimentalmente.
- [0325] Ganancia de peso corporal. Los pollos de engorde comerciales inoculados con el homogenado provenicular no tuvieron una supresión significante de ganancia de peso en comparación con las aves de control

de igual edad. La ganancia en peso en pollos de engorde SPF se vio afectada por ambos tratamientos de homogenado proventricular (Tabla 8 y 9).

**[0326] Peso de los órganos y lesiones microscópicas.** Los pollos comerciales y SPF que recibieron los homogenados proventriculares positivos tuvieron una relación aumentada de órgano proventricular/peso, y lesiones microscópicas en el proventrículo 7 y 14 dpi. La relación órgano/peso de la bolsa y el timo no se vio afectada en los pollos de engorde comerciales, pero el peso del bazo aumentó con el tratamiento de homogenados (Tablas 8 y 9). Los pollos de engorde SPF que recibieron homogenado proventricular tuvieron bolsas, timos y bazos más pequeños en comparación con los controles a los 14 dpi (Tabla 9). Microscópicamente, a los 7 dpi, la necrosis aguda del epitelio glandular proventricular estuvo presente tanto en pollos comerciales como SPF (Fig. 10, 11, 12). Los senos de recogida de las glándulas se dilataron y contenían el epitelio descamado. Las glándulas severamente afectadas se combinaron. Los núcleos de las células epiteliales glandulares se agrandaron y palidecieron, con cromatina marginada. La infiltración linfocítica estuvo presente en la lámina propia de la mucosa y en el intersticio glandular y áreas que contenían células epiteliales glandulares afectadas. 14 dpi, las células hiperplásicas e hipertróficas proliferantes recubrieron los ductos glandulares primarios, secundarios y terciarios. El epitelio similar al ducto cuboidal a bajo columnar, pálido, basofílico y distintamente vacuulado reemplazó las células secretoras alveolares destruidas. La formación de centro germinal estuvo presente en las glándulas y la mucosa. No había diferencias en las clasificaciones de lesiones en la bolsa, el timo y el bazo entre los pollos comerciales y los controles. La bolsa y el timo de los pollos SPF que recibieron los homogenados tuvieron un aumento de la clasificación de lesiones en comparación con los controles (Tablas 8 y 9).

**[0327]** La infiltración linfocítica leve estuvo presente en el intestino, el páncreas y el hígado de pollos comerciales y SPF inoculados con los homogenados proventriculares, tanto a los 7 como a los 14 dpi (Tablas 10 y 11). Ninguno de los pollos de engorde SPF inoculados con homogenado tuvieron infiltración linfocítica moderada a grave en los riñones, tanto a los 7 como a los 14 dpi. No había presentes otras lesiones en estos y los órganos restantes examinados de tanto los pollos comerciales como SPF.

**[0328] Serología.** Los pollos de engorde comerciales que recibieron homogenado proventricular fueron negativos para reovirus, VEN, MG y MS a los 7 y 14 dpi. Estas aves fueron positivas para VEBI e VBI en ambos puntos en el tiempo y también para VAP a los 14 dpi (Tabla 12). Los pollos de engorde SPF que recibieron los homogenados proventriculares fueron negativos para VEBI, VBI, reovirus, VEN, MG, MS y VAP a los 7 dpi, pero a los 14 dpi se seroconvirtieron al VEBI, VBI y VAP (Tabla 13).

**[0329] Bacteriología.** No se aislaron bacterias a partir de homogenados proventriculares de aves infectadas experimentalmente mediante los procedimientos que se han descrito anteriormente. No se observaron bacterias mediante microscopía de luz directa en secciones teñidas de rutina o especiales.

**[0330] Aislamiento del virus.** El embrión inoculado con homogenado 2 proventricular (Hom. 2) y el homogenado proventricular de pollos comerciales inoculados con Hom. 2 (Hom. 2 com.) se atrofiaron desde el segundo pase. Las membranas corioalantoides (CAM) recolectadas de estos huevos no tuvieron formación de placa y no se observaron lesiones histopatológicamente.

**[0331] Resultados del análisis por RT-PCR y PCR.** Análisis por *RT-PCR de la EBI en tejidos embebidos en parafina*. Las bolsas y proventrículos de pollos de engorde comerciales dieron todos negativo para el VEBI (Tabla 12). Todos las bolsas, y algunos de los proventrículos de pollos de engorde SPF que recibieron homogenado proventricular dieron positivo para el VEBI (Tabla 13). Los amplicones se enviaron para su secuenciación y fueron la mayoría similares al VEBI de variante A (no se muestran los datos).

**[0332] RT-PCRs y PCR sobre homogenados proventriculares y líquidos alantoides.** Todas las muestras dieron negativo para reovirus y VEN (Tabla 14). Hom. 1 dio positivo para VEBI, VBI, adenovirus y VAP. Hom. 2 dio positivo para VEBI, VBI y VAP y negativo para adenovirus. Los homogenados proventriculares de pollos de engorde comerciales inoculados con el Hom. 1 y recolectados 7 dpi, dieron negativo para todos los virus examinados, excepto adenovirus. Los pollos de engorde comerciales inoculados con Hom. 2 dieron negativos para todos los virus examinados. Los pollos de engorde SPF inoculados con Hom. 1 dieron positivo para VEBI, VBI y adenovirus y negativo para el resto. Los pollos de engorde SPF inoculados con Hom. 2 dieron positivo para VEBI e VBI y negativo para el resto. Los líquidos alantoides para embriones inoculados con Hom. 2 o Hom. 2 com. dieron solamente positivo para VBI.

**[0333] Caracterización molecular de VEBI e VBI detectados.** El análisis de los datos de secuencia obtenidos del VEBI amplificado revelaron que este virus es una cepa variante del VEBI y es más similar a la Variante A. El análisis de RFLP del VBI determinó que esta cepa vírica era Connecticut (no se muestran los datos).

**[0334] Inmunohistoquímica del VEBI.** La tinción positiva para el antígeno vírico se detectó en todos las bolsas y algunos de los proventrículos de pollos SPF inoculados con los homogenados proventriculares. Ninguna de las bolsas o proventrículos de los pollos de engorde comerciales dieron positivo.

[0335] Ensayo de Inmunofluorescencia (EIF). La tinción fluorescente positiva estuvo presente en células epiteliales glandulares en los proventrículos de pollos inoculados con homogenado cuando se examinaron a los 7 dpi. La reacción específica se observó localizada en el citoplasma de las células epiteliales glandulares. La tinción fluorescente también estuvo presente en la superficie externa de lo que parecían ser linfocitos. No se observó tinción fluorescente en proventrículos de pollos inoculados con una solución salina.

[0336] Microscopía electrónica. No se detectaron virus en las muestras enviadas para su examen.

10 [0337] ANÁLISIS. La proventriculitis se reprodujo con éxito mediante inoculación oral de pollos de engorde comerciales y SPF con homogenados proventriculares obtenidos a partir de pollos con proventriculitis. Los pollos inoculados tenían agrandamiento del proventrículo y un istmo gástrico distendido. Las paredes proventriculares se engrosaron con un patrón lobular de color blanco observado cuando se seccionaron. Las lesiones microscópicas consistían en degeneración y necrosis del epitelio glandular, severa infiltración linfocítica e hiperplasia epitelial 15 ductal. Esta pérdida de tejido glandular e hiperplasia ductal puede dar como resultado la pérdida de la función del proventrículo (10). Esto explicaría la deficiente conversión de los alimentos y la reducción de las tasas de crecimiento informadas sobre algunos pollos afectados de forma natural con proventriculitis (28), y también la ganancia de peso reducida observada en los pollos SPF inoculados con homogenado de los inventores. Sin embargo, la ganancia de peso corporal en los pollos comerciales de los inventores no vio afectada. Bayyari y col. (2) 20 descubrieron que la proventriculitis se produjo independientemente de un efecto en el crecimiento, y una observación de campo común es que la proventriculitis puede tener lugar en las mejores bandadas reproductoras cuando se procesan a las 4-5 semanas de edad (13). Esto conduce a los inventores a creer que la proventriculitis puede o no estar relacionada con la atrofia en pollos de engorde, y que varios agentes o afecciones modifican más probablemente la gravedad de la proventriculitis y su efecto en la ganancia de peso. De hecho, la proventriculitis se 25 ha relacionado con el atrofiamiento infeccioso o el síndrome de malabsorción en pollos (3), pero, algunos casos de síndrome de malabsorción pueden o no incluir lesiones proventriculares (32). Los agentes filtrables aislados en los Países Bajos se vincularon originalmente a la proventriculitis, causando el síndrome de enflaquecimiento en pollos de engorde (19). Estos autores sugirieron la implicación tanto de bacterias como de virus en la etiología del síndrome de malabsorción (19, 20). Un estudio comparativo de la patogénesis de cinco homogenados diferentes del 30 síndrome de malabsorción de los Países Bajos y Alemania distinguió los grupos inoculados de pollos por sus lesiones histopatológicas: proventriculitis, lesiones en el intestino solamente, o una combinación de ambos (32). Las lesiones en el intestino delgado tuvieron más impacto en la depresión de la ganancia de peso que las lesiones en el proventrículo. En este estudio no se observaron lesiones intestinales en los pollos inoculados con los homogenados proventriculares.

35 [0338] Los reovirus se han implicado como un agente causante de lesiones proventriculares concurrentes presentes en algunas bandadas afectadas de forma natural con el síndrome de malabsorción (20), y la proventriculitis se reprodujo mediante la inoculación de dos aislados de reovirus de los intestinos de aves con síndrome de malabsorción (24). Sin embargo, en este estudio, no se aislaron reovirus a partir de los homogenados, 40 y no se detectó reovirus por RT-PCR en ninguno de los grupos inoculados. Además, ninguno de los pollos se seroconvirtió en este virus, lo que indica que la proventriculitis puede ocurrir en ausencia de reovirus.

45 [0339] La proventriculitis leve también se ha reproducido experimentalmente en pollos infectados con algunos aislados de adenovirus (19, 21), aunque este virus no se ha aislado consistentemente a partir de proventrículos enfermos. Uno de los homogenados proventriculares usados en este estudio dio positivo para adenovirus, y también los proventrículos de los pollos que se inocularon con este homogenado. Sin embargo, la función de este virus en la proventriculitis no está clara debido a que la enfermedad podría ocurrir en su ausencia, y la visualización de partículas virales en glándulas proventriculares afectadas por EM fue infructuosa. Goodwin y col. (8) informaron sobre la presencia de viriones intralesionales en proventrículos de polluelos que tuvieron proventriculitis, y sugirieron 50 una relación causal entre el virus y la lesión en su huésped. Se describieron partículas de virus intranucleares hexagonales describieron y parecían a adenovirus o poliomavirus. Sin embargo, la hibridación *in situ* de ADN no logró detectar ácidos nucleicos de adenovirus o poliomavirus. Huff y col. (13) también informaron sobre la presencia de partículas semejantes a virus similares en los núcleos de muchas células epiteliales del proventrículo de pollos inoculados experimentalmente con homogenado preparado a partir de los proventrículos de pollos con 55 proventriculitis. Las partículas, esferas no envueltas de aproximadamente 100-200 nm de diámetro, parecían hexagonales y se dispusieron en conjuntos semiparacristalinos en los núcleos (13). Estas partículas semejantes a adenovirus no se han aislado, por lo que no se ha corroborado su función como agente causal en la proventriculitis.

60 [0340] El VEBI también se ha relacionado con la proventriculitis (2, 13, 23) pero su función en esta enfermedad no está clara. Se han producido lesiones tanto macroscópicas como microscópicas del proventrículo mediante la estimulación del VEBI en pollos leghorn (24) y se ha informado de que la vacunación contra el VEBI disminuye la incidencia de la proventriculitis (7, 15). Sin embargo, la proventriculitis no se produjo mediante inoculación de pollos de engorde SPF con diferentes cepas del VEBI (25). Ambos homogenados proventriculares usados en este estudio para inducir proventriculitis fueron positivos para VEBI por RT-PCR. Los proventrículos de pollos de engorde

comerciales inoculados con estos homogenados fueron negativos para el virus por RT-PCR e IHQ, y estas aves no presentaban lesiones ni virus en la bolsa. Estos pollos tuvieron titulaciones de anticuerpos frente al VEBI a los 7 y 14 dpi y probablemente estaban protegidos contra el virus. Por otra parte, los pollos de engorde SPF tenían lesiones en la bolsa característicos de la infección por el VEBI, el virus se detectó por RT-PCR e IHQ en todas las bolas y 5 algunos de los proventrículos, y algunas de las aves se reconvirtieron a los 14 dpi. Debido a que la proventriculitis se produjo en pollos de engorde comerciales independientemente de la presencia del VEBI, probablemente este virus no está implicado directamente en la enfermedad.

**[0341]** Ambos de los homogenados proventriculares usados en este estudio para inducir proventriculitis también 10 fueron positivos para VBI mediante RT-PCR, y los homogenados producidos a partir de los proventrículos de pollos de engorde SPF inoculados también fueron positivos por RT-PCR y se seroconvirtieron en VBI a los 14 dpi. Estas aves también tenían nefritis moderada a grave, una lesión relacionada con la infección con el VBI (5). Los pollos de engorde comerciales inoculados con los homogenados proventriculares fueron negativos por RT-PCR para el VBI, pero presentaron una leve nefritis intersticial, y el VBI se aisló en embriones cuando se inocularon con un filtrado 15 producido a partir del homogenado preparado de los proventrículos acumulados de estas aves. Estos pollos de engorde comerciales tenían anticuerpos frente al VBI, la mayoría probablemente de origen maternal, detectados tanto a los 7 como a los 14 dpi, lo que probablemente ofreció alguna protección frente al efecto del virus. Se ha informado que los aislados del virus de la bronquitis infecciosa (VBI) de casos de origen natural en China producen 20 lesiones proventriculares en aves infectadas (35). Se determinó que la cepa del VBI aislada en este estudio era Connecticut por RFLP, una cepa que se ha aislado también de tonsillas cecales y el intestino en pollos (16). La función de esta cepa del VBI en la proventriculitis ha de explorarse adicionalmente.

**[0342]** Guy y Barnes (9) reprodujeron la proventriculitis mediante la administración de un filtrado (0,2 µm) de un homogenado producido a partir de los proventrículos de pollos con proventriculitis. Este inóculo no tenía reovirus 25 aviar, adenovirus de grupo I aviar, virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) y virus de la bronquitis infecciosa (VBI). Las partículas similares a adenovirus, similares a las observadas por Goodwin y col. (8), se identificaron mediante microscopía electrónica de sección delgada en núcleos de células de epitelio glandular afectadas. Estos autores también detectaron la tinción intranuclear mediante EIF usando como anticuerpo primario suero hiperinmune de aves inoculadas con filtrados proventriculares infecciosos. Los resultados de estos ensayos 30 inmunofluorescentes no corroboraron estos hallazgos. Aunque también se observó inmunofluorescencia en las células epiteliales glandulares afectadas, ésta se localizó en el citoplasma, no en el núcleo. Además, se observó la tinción de la superficie de los linfocitos, que fue probablemente el antígeno unido a éstos.

**[0343]** Reece (28) informó sobre que los homogenados proventriculares preparados de pollos con proventriculitis 35 eran altamente infecciosos y transmisibles para al menos cuatro pases en aves. El tratamiento del inóculo con cloroformo no redujo la infectividad sustentando la hipótesis de que el supuesto agente etiológico de la proventriculitis infecciosa era un virus no envuelto. Este virus no creció en ninguna de una amplia diversidad de sistemas de cultivo de células primarias establecidas y el aislamiento viral en embriones no tuvo éxito. El inóculo original contenía virus de la anemia del pollo (VAP), adenovirus de ave tipo 8, virus de nefritis de ave y virus de la 40 enfermedad de Marek (VEM), pero no contenía virus de la leucosis aviar (VLA), virus de la bronquitis infecciosa (VBI), reovirus, virus de la enfermedad de Newcastle (VEN) o virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI). Los homogenados proventriculares usados en este estudio también fueron positivos para VAP, y todas las aves tratadas con estos homogenados se seroconvirtieron a los 14 dpi. La función de este virus en la proventriculitis 45 también ha de estudiarse.

**[0344]** Huff y col. (13) informaron sobre el aislamiento de un agente bacteriano único (*Clostridia* sp.) de un homogenado de proventrículo que causó proventriculitis, lo que sugiere la implicación bacteriana en este síndrome. Estos autores concluyen que una infección vírica, así como diversos factores dietéticos, pueden facilitar la invasión 50 bacteriana del proventrículo, además más de un tipo de virus puede actuar como facilitador en este síndrome de enfermedad. En este estudio, no se aislaron bacterias ni se identificaron por histopatología ni tinción especial del ventrículo de pollos afectados, sin embargo, la función de las bacterias debe tenerse en cuenta cuando se estudia la proventriculitis.

**[0345]** En conclusión, la proventriculitis puede transmitirse por inoculación oral con homogenados producidos a 55 partir de proventrículos de aves con proventriculitis. El agente o agentes causantes no se identificó, aunque lo más probablemente es que sea un virus. La gravedad de la proventriculitis y su efecto sobre la ganancia de peso se ve afectada probablemente por otros factores, tales como una infección concomitante con otros agentes, factores víricos o bacterianos y nutricionales. Los candidatos víricos que parecen estar implicados en la proventriculitis son VBI, VEBI, adenovirus y reovirus, sin embargo, se ha demostrado que ninguno de ellos se encuentra en cada caso 60 de proventriculitis ni puede reproducir la enfermedad cuando se inoculan en pollos. Esto conduce a creer que otro virus, no identificado, es el agente causante primario de la proventriculitis.

Tabla 7. Cebadores utilizados para el análisis por RT-PCR y PCR.

Virus	Secuencia de cebadores	Tamaño del producto	Referencia
VEBI	B4 5'TCTTGGGTATGTGAGGCTTG (SEQ ID NO: 9) B4 3'GGATGTGATTGGCTGGTTA (SEQ ID NO: 10)	400 pb	Pantin y col. (25)
Reovirus	MK87: GGTGCGACTGCTGTATTGGTAAC (SEQ ID NO: 22) MK88: AATGGAACGATAGCGTGTGGG (SEQ ID NO: 23)	532 pb	Xie y col. (33)
VBI	Nuevo oligo S1 5': TGAAACTGGAACAAAAGAC (SEQ ID NO: 24) S1 oligo 3': CATAACTAACATAAGGGCAA (SEQ ID NO: 25)	1720 pb	Jackwood y col. (15)
VEN	FOP1: TACACCTCATCCCAGACAGGGTC (SEQ ID NO: 26) FOP2: AGGCAGGGGAAGTGATTGTGGC (SEQ ID NO: 27)	532 pb	Kho y col. (18)
VAP	F: CTAAGATCTGCACTGCGGA (SEQ ID NO: 28) R: CCTTGGAAAGCGGATAGTCAT (SEQ ID NO: 29)	675 pb	Todd. y col. (32)
Adenovirus	H1: TGGAC ATGGGGCGACCTA (SEQ ID NO: 30) H2: AGGG ATTGACGTTGTCCA (SEQ ID NO: 31)	1219 pb	Raue y col. (27)

Tabla 8. Ganancia de peso corporal (g), pesos de los órganos relativos (% peso corporal) y clasificaciones de las lesiones de los órganos de pollos de engorde comerciales estimulados por vía oral en el día de edad con una solución salina estéril, homogenizado 1 proventricular (Hom. 1) u Homogenizado 2 proventricular (Hom. 2), y necropsiados a los 7 ó 14 días post-inoculación (dpi)

Dpi	Tratamiento	Ganancia de peso corporal	Peso relativo PV	Clasificación lesión PV	Peso relativo de la bolsa	Clasificación de lesión de la bolsa	Peso relativo del timo	Clasificación de lesión del timo	Peso relativo del bazo	Clasificación de lesión del bazo
7	Solución salina	120 ± 10 <sup>a</sup>	81 ± ,09 <sup>a</sup>	1,33 ± ,57 <sup>a</sup>	,10 ± ,005 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>	,10 ± ,02 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	,02 ± ,005 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>
	Hom. 1	122 ± 6 <sup>a</sup>	1,20 ± ,01 <sup>ab</sup>	3,00 ± 1,0 <sup>b</sup>	,20 ± ,04 <sup>a</sup>	3,00 <sup>a</sup>	,23 ± ,04 <sup>b</sup>	1,00 <sup>a</sup>	,12 ± ,03 <sup>b</sup>	2,00 <sup>a</sup>
	Hom. 2	98 ± 16 <sup>a</sup>	1,48 ± ,33 <sup>b</sup>	3,66 ± 57 <sup>b</sup>	,17 ± ,06 <sup>a</sup>	3,0 ± 1,0 <sup>a</sup>	,16 ± ,65 <sup>ab</sup>	1,00 <sup>a</sup>	,17 ± ,02 <sup>b</sup>	2,00 <sup>a</sup>
	Solución salina	399 ± 50 <sup>a</sup>	,53 ± ,05 <sup>a</sup>	1,33 ± ,57 <sup>a</sup>	,15 ± ,03 <sup>a</sup>	1,33 ± 5 <sup>ab</sup>	,20 ± ,03 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	,05 ± ,005 <sup>a</sup>	1,66 ± ,57 <sup>a</sup>
14	Hom. 1	336 ± 2 <sup>a</sup>	1,06 ± ,37 <sup>b</sup>	3,00 ± 1°	,23 ± ,03 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	,23 ± ,03 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	,12 ± ,03 <sup>b</sup>	1,66 ± ,57 <sup>a</sup>
	Hom. 2	402 ± 47 <sup>a</sup>	,97 ± ,17 <sup>b</sup>	4,00 <sup>b</sup>	,15 ± ,03 <sup>a</sup>	2,00 <sup>b</sup>	,26 ± ,07 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	,08 ± ,08 <sup>ab</sup>	1,00 <sup>a</sup>

Tabla 9. Ganancia de peso corporal (g), pesos de los órganos relativos (% peso corporal) y clasificaciones de las lesiones de los órganos de pollos de engorde SPF estimulados por vía oral en el día de edad con una solución salina estéril, homogenizado 1 proventricular (Hom. 1) u Homogenizado 2 proventricular (Hom. 2), y necropsiados a los 7 ó 14 días post-inoculación (dpi)

Dpi	Tratamiento	Ganancia de peso corporal	Peso relativo PV	Clasificación lesión PV	Peso relativo de la bolsa	Clasificación de lesión de la bolsa	Peso relativo del timo	Clasificación de lesión del timo	Peso relativo del bazo	Clasificación de lesión del bazo
7	Solución salina	41 ± 3 <sup>a</sup>	,93 ± ,12 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	,22 ± ,04 <sup>a</sup>	2,66 ± ,57 <sup>a</sup>	,20 ± ,05 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	,55 ± ,64 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>
	Hom. 1	24 ± 7 <sup>b</sup>	1,29 ± ,18 <sup>a</sup>	1,33 ± ,5 <sup>a</sup>	,08 ± ,02 <sup>b</sup>	4,00 <sup>b</sup>	,13 ± ,005 <sup>a</sup>	2,66 ± ,57 <sup>a</sup>	,20 ± ,06 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>
	Hom. 2	22 ± 8 <sup>b</sup>	1,47 ± ,46 <sup>a</sup>	3,00 ± 1,73 <sup>a</sup>	,21 ± ,02 <sup>a</sup>	3,33 ± ,5 <sup>ab</sup>	,18 ± ,007 <sup>a</sup>	2,00 ± 1,73 <sup>a</sup>	,21 ± ,06 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>
	Solución salina	126 ± 19 <sup>a</sup>	,72 ± ,06 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	,36 ± ,12 <sup>a</sup>	1,33 ± ,57 <sup>a</sup>	,35 ± ,19 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	,27 ± ,08 <sup>a</sup>	1,66 ± ,57 <sup>a</sup>
14	Hom. 1	88 ± 18 <sup>ab</sup>	,98 ± ,4 <sup>ab</sup>	2,00 ± 1 <sup>ab</sup>	,11 ± ,03 <sup>b</sup>	4,00 <sup>b</sup>	,17 ± ,07 <sup>b</sup>	3,00 ± 1,7 <sup>ab</sup>	,17 ± ,06 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>
	Hom. 2	53 ± 9 <sup>b</sup>	1,55 ± ,49 <sup>b</sup>	3,33 ± 1,1 <sup>b</sup>	,16 ± ,04 <sup>ab</sup>	3,33 ± 1,5 <sup>b</sup>	,07 ± ,03 <sup>b</sup>	4,00 <sup>b</sup>	,14 ± ,08 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>

Tabla 10. Infiltración linfocítica en órganos de pollos de engorde comerciales inoculados con homogenados proventriculares infecciosos (Hom. 1 ó 2) o solución salina, a los 7 y 14 días post-inoculación (dpi)

Dpi	Tratamiento	Intestino	Páncreas	Hígado	Riñón
7	Solución salina	0/3 <sup>a</sup>	0/3	0/3	0/3
	Hom 1	2/3	2/3	1/3	1/3
	Hom 2	3/3	2/3	0/3	0/3
14	Solución salina	0/3	0/3	0/3	0/3
	Hom 1	2/3	1/3	2/3	1/3
	Hom 2	2/3	3/3	3/3	1/3

<sup>a</sup> = número de pollos positivos/número de pollos inoculados

5 Tabla 11. Infiltración linfocítica en órganos de pollos de engorde SPF inoculados con homogenados proventriculares infecciosos (Hom. 1 ó 2) o solución salina, a los 7 y 14 días post-inoculación (dpi)

Dpi	Tratamiento	Intestino	Páncreas	Hígado	Riñón
7	Solución salina	0/3 <sup>a</sup>	0/3	0/3	0/3
	Hom 1	1/3	1/3	2/3	3/3
	Hom 2	1/3	2/3	2/3	3/3
14	Solución salina	0/3	0/3	0/3	0/3
	Hom 1	3/3	2/3	3/3	3/3
	Hom 2	1/3	2/3	1/3	3/3

<sup>a</sup> = número de pollos positivos/número de pollos inoculados

10 Tabla 12. Seropositividad por ELISA de pollos de engorde comerciales inoculados con homogenados proventriculares infecciosos (Hom. 1 ó 2), o solución salina, a los 7 y 14 días post-inoculación (dpi)

Dpi	Tratamiento	VEBI	Reovir.	VBI	VEN	VAP	MS	MG
7	Solución salina	3/3 <sup>a</sup>	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Hom 1	3/3	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Hom 2	3/3	0/3	3/3	1/3	0/3	0/3	0/3
14	Solución salina	2/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Hom 1	2/3	0/3	2/3	0/3	1/3	0/3	0/3
	Hom 2	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3

<sup>a</sup> = número de pollos positivos/número de pollos inoculados

15 Tabla 13. Seropositividad por ELISA de pollos de engorde SPF inoculados con homogenados proventriculares infecciosos (Hom. 1 ó 2), o solución salina, a los 7 y 14 días post-inoculación (dpi)

Dpi	Tratamiento	VEBI	Reovir.	VBI	VEN	VAP	MS	MG
7	Solución salina	3/3 <sup>a</sup>	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Hom 1	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Hom 2	1/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3
14	Solución salina	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Hom 1	1/3	0/3	1/3	0/3	3/3	0/3	0/3
	Hom 2	1/3	0/3	1/3	0/3	3/3	0/3	0/3

<sup>a</sup> = número de pollos positivos/número de pollos inoculados

20 Tabla 14. Resultados de VEBI por RT-PCR e IHQ de la bolsa y tejidos proventriculares embebidos en parafina, fijados en formalina de pollos de engorde comerciales inoculados con homogenados proventriculares infecciosos (Hom. 1 ó 2) o solución salina, en 7 o 14 días post-inoculación (dpi).

Dpi	Tratamiento	RT-PCR de la bolsa	IHQ de la bolsa	RT-PCR de PV	IHQ de PV
7	Solución salina	0/3 <sup>a</sup>	0/3	0/3	0/3
	Hom 1	0/3	0/3	0/3	0/3
	Hom 2	0/3	0/3	0/3	0/3
14	Solución salina	0/3	0/3	0/3	0/3
	Hom 1	0/3	0/3	0/3	0/3
	Hom 2	0/3	0/3	0/3	0/3

<sup>a</sup> = número de pollos positivos/número de pollos inoculados

Tabla 15. Resultados de VEBI por RT-PCR e IHQ de la bolsa y tejidos proventriculares embebidos en parafina, fijados en formalina de pollos de engorde SPF inoculados con homogenados proventriculares infecciosos (Hom. 1 ó 2) o solución salina, en 7 o 14 días post-inoculación (dpi).

Dpi	Tratamiento	RT-PCR de la bolsa	IHQ de la bolsa	RT-PCR de PV	IHQ de PV
7	Solución salina	0/3 <sup>a</sup>	0/3	0/3	0/3
	Hom 1	3/3	3/3	2/3	0/3
	Hom 2	1/3	3/3	0/3	0/3
14	Solución salina	0/3	0/3	0/3	0/3
	Hom 1	3/3	1/3	2/3	0/3
	Hom 2	1/3	0/3	1/3	0/3

<sup>a</sup> = número de pollos positivos/número de pollos inoculados

- 5 Tabla 16. Resultados de RT-PCR y PCR de muestras de homogenado proventricular y líquido alantoide (AF). Homogenados proventriculares usados para la inoculación de pollos (Hom. 1 y 2), homogenados proventriculares obtenidos de pollos inoculados con solución salina, Hom. 1 o Hom. 2; de pollos de engorde comerciales (Com.) y 10 SPF a los 7 dpi; líquido alantoide (AF) de embriones inoculados con el filtrado de Hom. 2, filtrado de homogenado proventricular obtenido de los proventrículos de pollos de engorde comerciales inoculados con Hom. 2, y de filtrado de homogenado proventricular hecho a partir de los proventrículos de pollos de control (-PV), recolectados en el 5º pase.

Muestra	VEBI	Reovirus	VEN	VBI	Adenovirus	VAP
Hom. 1	+	-	-	-	+	-
Hom. 2	-	-	-	+	-	-
Solución salina Com. 7 dpi	-	-	-	-	-	NR <sup>a</sup>
Hom. 1 Com. 7 dpi	-	-	-		+	NR
Hom. 2 Com. 7 dpi	-	-		-	-	NR
Solución salina SPF 7 dpi	-	-	-		-	NR
Hom. 1 SPF 7 dpi	+		-	+	-	NR
Hom. 2 SPF 7 dpi	+			+	-	NR
AF Hom. 2 5º pase	-	-	-	+	-	NR
AF Hom. 2 5º pase	-	-	-	+	-	NR
AF - PV 2 5º pase	-	-	-	-	-	NR

<sup>a</sup> = NR, no realizado

15 Referencias:

[0346]

- Apple y col. Avian Dis 35: 422-425. 1991.
- Bayyari y col. Poult Sci 74: 1799-1809. 1995.
- Bracewell y col. World's Poult Sci J 40. 1984.
- Carson. Histotechnology. A self instructional text. Second edition. Chicago, American Society of Clinical Pathologists. 1997.
- Cavanagh & Naqi. Diseases of Poultry. 10<sup>a</sup> ed. B. W. Calnek, H. J. B., C. W. Beard, L. R. McDougald, Y. M. Saif. Iowa State University Press Ames, IA. 1997.
- Genta y col. Human Path. J. 25: 221-226. 1994.
- Goodwin & Hafner. Diseases of Poultry. 10<sup>a</sup> ed. Calnek, B. W. Iowa State University Press Arnes, IA. 1034-1038. 1997.
- Goodwin y col. Avian Pathol 25: 269-279. 1996.
- Guy & Barnes. 139th Meeting of the American Veterinary Medical Association, Nashville, TN. 2002.
- Hajna & Damon. Appl Microbiol 4: 341-345. 1956.
- Henderson y col. Vet Rec 123: 492-494. 1988.
- Huchzermeyer y col. Vet Rec 133: 143-144. 1993.

13. Huff y col. Avian Dis 45: 828-843. 2001.  
 14. Huff y col. Poult Sci 73: 1352-1356. 1994.  
 15. Jackwood y col. Avian Dis 41: 105-110. 1997.  
 16. Karaca y col. Avian Dis 34: 899-904. 1990.  
 5 17. Kelly y col. 138th American Veterinary Medical Association, Boston, MA. 2001.  
 18. Kho y col. J Virol Methods 80: 71-83. 2000.  
 19. Kouwenhoven y col. Avian Pathol. 7: 183-187. 1978.  
 20. Kouwenhoven y col.. Avian Pathology 17: 879-892. 1988.  
 21. Lenz y col. J Vet Diagn Invest 10: 145-151. 1998.  
 10 22. Mutlu y col. Tierarztl Prax Ausg G Grossstiere Nutztiere 25: 460-462. 1997.  
 23. Newberry. Ph.D. Dissertation. Fayetteville, AR, University of Arkansas. 1996.  
 24. Page y col. Avian Diseases 26: 618-624. 1982.  
 25. Pantin-Jackwood & Brown. Avian Dis 47: 681-690. 2003.  
 26. Phalen & Moore. Avian Dis 47: 254-260. 2003.  
 15 27. Raué & Hess. J Virol Methods 73: 211-217. 1998.  
 28. Reece. Infectious proventriculitis and stunting syndrome of broiler chickens. Canberra, Australia, RIRDC. 2002.  
 29. Senne. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4<sup>a</sup> ed. D. E. Swayne, J. R. G., M. W. Jackwood, J. E. Pearson, W. M. Reed. American Association of Avian Pathologists. 235-247. 1998.  
 30. Shapiro & Nir. Poult Sci 74: 33-44. 1995.  
 20 31. Skeels y col. Poult Sci 77 (supl.): 133. 1998.  
 32. Songserm y col. Avian Dis 44: 556-567. 2000.  
 33. Todd y col. J Clin Microbiol 30: 1661-1666. 1992.  
 34. Xie y col. Avian Dis 41: 654-660. 1997.  
 35. Yu y col. Avian Dis 45: 416-424. 2001.  
 25 PROVENTRICULITIS EN POLLOS DE ENGORDE: EFECTOS DE LA INMUNOSUPRESIÓN (Pantin-Jackwood y col., *Avian Diseases*, en prensa)
- [0347]** RESUMEN. La proventriculitis en pollos de engorde causa decomisos del canal cuando los proventrículos inflamados se rompen durante la evisceración. La causa de esta proventriculitis es desconocida, pero se han relacionado a ésta varios agentes infecciosos. Un agente de este tipo, el virus de la enfermedad de la bursitis infeccioso (VEBI), se ha implicado como causa de la proventriculitis, pero no se ha demostrado un efecto directo de este virus en el proventrículo. La función del VEBI en la proventriculitis puede ser indirecta debido a su habilidad para causar inmunosupresión. El objetivo de este estudio fue entender cómo afecta la inmunosupresión a la incidencia de la proventriculitis en pollos de engorde. Se indujo la inmunosupresión en pollos de engorde comerciales y SPF usando sustancias químicas (ciclofosfamida y ciclosporina) o virus (VEBI). Despues, todos los grupos se expusieron a un homogenizado proventricular producido a partir de aves. A los 7 y 14 días después de la inoculación, la incidencia de la proventriculitis en estos grupos se comparó con la producida por la exposición a homogenizado en pollos de engorde inmunocompetentes. Todas las aves expuestas al homogenizado proventricular de aves enfermas desarrollaron proventriculitis. La ciclofosfamida y el VEBI, ambos supresores de linfocitos B, no afectaron significativamente a la incidencia o características de la proventriculitis observada, aunque tuvieron un efecto en el tamaño del proventrículo a los 7 días después de la inoculación. Los pollos inmunosuprimidos con ciclosporina, un supresor de linfocitos T, desarrollaron lesiones más graves y tuvieron una mayor incidencia de proventriculitis. Estos hallazgos indican que ambos, los linfocitos B y T, están implicados en la respuesta inmune frente a la proventriculitis, pero la inmunidad mediada por las células parece tener una función más importante en el control de la enfermedad. El VEBI afecta tanto a la inmunidad humoral como celular en el pollo por lo que, aunque las condiciones experimentales no tuvieron un efecto mayor en la proventriculitis, esto puede explicar por qué el control del VEBI en el campo parece reducir la incidencia de la proventriculitis. Palabras claves: Proventriculitis, inmunosupresión, VEBI. Abreviaturas: CBH = hipersensibilidad basófila cutánea; CMI = inmunidad mediada por células; Cp = ciclofosfamida; Cp = ciclosporina; VEBI = virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa; RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa; Spf = sin patógeno específico.

**[0348]** INTRODUCCIÓN. La proventriculitis es una afección clínica que afecta a los pollos de engorde. Se caracteriza por el agrandamiento del proventrículo y la debilidad del istmo gástrico. Durante la evisceración de rutinaria en el procesamiento, los proventrículos afectados se rompen causando el derrame del contenido proventricular en la cavidad corporal, lo que da como resultado el decomiso de los canales afectados por la contaminación. La enfermedad también se ha asociado con el crecimiento deteriorado, y una deficiente conversión de los alimentos (16, 13). Microscópicamente, se observa la degeneración y la necrosis de glándulas proventriculares acompañada por la infiltración linfocítica intersticial intraglandular marcada (4.9, 10).

**[0349]** Están implicados varios agentes como causas potenciales de lesiones proventriculares. Las causas no infecciosas incluyen la exposición oral a aminas biogénicas (2, 27), micotoxinas (26), falta de fibra dietética (29) y sulfato de cobre en exceso (3, 14, 41). Las causas infecciosas incluyen adenovirus (19), reovirus (17, 38), virus de la bronquitis infecciosa (39) y megabacterias (23, 35). Sin embargo, en la mayoría de los casos no se ha encontrado

regularmente ninguno de estos agentes no infecciosos o infecciosos. La microscopía electrónica ha detectado partículas virales en lesiones agudas, pero el aislamiento a partir de un virus de proventrículos afectado no ha tenido éxito (9, 10, 13).

- 5      [0350]    El Virus de la Enfermedad de la Bursitis Infecciosa (VEBI) está implicado como la causa para esta enfermedad (4, 13, 24), y se ha informado sobre la vacunación del VEBI para disminuir su incidencia (7, 15). La proventriculitis se puede reproducir inoculando por vía oral pollos de engorde con proventrículos homogeneizados recolectados de aves afectadas (16, 4). Un agente filtrable encontrado en estos homogenados causa lesiones similares las que se encuentran en los casos de campo (4), e el VEBI se ha inmunoprecipitado de estos homogenados (13). Los pollos de engorde comerciales expuestos a este VEBI desarrollaron clasificaciones de lesiones proventriculares incrementadas, pero no tuvieron aumento en el tamaño proventricular, un aspecto característico producido por la exposición a los homogenados proventriculares (13). Estos hallazgos sugieren que pueden requerirse otros agentes o afecciones para producir la proventriculitis.
- 10     [0351]    El VEBI induce la inmunsupresión en pollos (21, 34, 40). Las bandadas inmunsuprimidas pueden tener un aumento de la incidencia de infecciones secundarias, una deficiente conversión del alimento y una reducción de la respuesta protectora a las vacunas comúnmente utilizadas (34). El VEBI causa la destrucción lítica de los linfocitos B de IgM+ que da como resultado niveles subóptimos de anticuerpos frente a varios antígenos infecciosos y no infecciosos (8, 30, 34). Aunque la inmunsupresión causada por el VEBI se debe principalmente al daño de los linfocitos B, también se ha demostrado un efecto en la inmunidad mediada por las células (CMI) (5, 18, 33, 34).
- 15     [0352]    Los pollos de engorde SPF expuestos en diferentes cepas del VEBI no desarrollaron lesiones proventriculares ni agrandamiento a los 4 o 6 días después de la inoculación (25). El virus se detectó en grandes cantidades en la bolsa de estas aves mediante RT-PCR y técnicas inmunohistoquímicas, pero no en el proventrículo, lo que indica que no es un órgano diana para el VEBI. Sin embargo, el efecto inmunsupresor del VEBI puede explicar su relación indicada en la proventriculitis. El propósito de este estudio fue observar si la inmunsupresión tenía algún efecto en la incidencia, gravedad o carácter de la proventriculitis en pollos de engorde. Para abordar esto, se inmunsuprimieron pollos de engorde comerciales y SPF de un día de edad con ciclofosfamida (supresor de linfocitos B), ciclosporina (supresor de linfocitos T), o el VEBI. Posteriormente, estos pollos se expusieron a un homogenado proventricular de pollos afectados, y se determinó el efecto de la inmunsupresión sobre la proventriculitis.
- 20     [0353]    MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS. Alojamiento de animales. Los pollos de un día de edad se dividieron en grupos y se alojaron en unidades Horsfal de presión positiva. Se proporcionó alimento no medicado y agua *ad libidum*.
- 25     [0354]    Diseño experimental. Ensayos 1 y 2. Un total de 88 pollos de engorde comerciales no vacunados, obtenidos de un criadero local, se dividieron en 9 grupos de 8 ó 12 aves, y los polluelos de cada grupo recibieron un tratamiento inmunsupresor o ningún tratamiento (Tabla 17). Los pollos recibieron posteriormente, como se describe a continuación, un homogenado proventricular positivo (+PV) o negativo (-PV), solución salina, o ningún homogenado. El grupo 1 tenía 12 aves, que se inocularon *per os* con 1 ml de solución salina estéril a los 7 días de edad. El grupo 2 tenía 8 aves, que se inocularon *per os* con 1 ml de -PV producido a partir de pollos de engorde comerciales normales a los 7 días de edad. El grupo 3 tenía 8 aves, que se inocularon *per os* con 1 ml de +PV producido a partir de pollos de engorde que tuvieron proventriculitis a los 7 días de edad. El grupo 4 tenía 12 aves, que se inmunsuprimieron con el VEBI administrado en un día de edad. El grupo 5 tenía 12 aves, que se inmunsuprimieron con ciclofosfamida (CP) que se inició a 1 día de edad. El grupo 6 tenía 12 aves, que se inmunsuprimieron con ciclosporina (CS) que se inició a 1 día de edad. El grupo 7 tenía 8 aves, que se inmunsuprimieron con el VEBI administrado a 1 día de edad y se trataron con +PV a los 7 días de edad. El grupo 8 tenía 8, que se inmunsuprimieron con CP que se inició a 1 día de edad y se trataron con +PV a los 7 días de edad. El grupo 9 tenía 8 aves, que se inmunsuprimieron con CS que se inició a 1 día de edad y se trataron con +PV a los 7 días de edad.
- 30     [0355]    Ensayo 3. Este experimento se realizó como los ensayos 1 y 2 con las siguientes modificaciones.
- 35     [0356]    Pollos. Se obtuvieron huevos de pollo Plymouth Rock blancos fértiles (SEPRL, USDA, Athens, GA) de una bandada reproductora mantenidos en condiciones SPF, se incubaron y se mantuvieron en unidades de aislamiento Horsfal de presión positiva. La bandada de origen y toda la progenie usada en este experimento estaban libres de enfermedades aviares comunes, específicamente VEBI, VEM, VBI, reovirus y VAP. Se siguió el mismo diseño experimental y protocolo que en los ensayos 1 y 2. Los animales adicionales se incluyeron para permitir un tercer sacrificio a los 21 días después de la inoculación.
- 40     [0357]    Grupos de tratamiento inmunsupresores. Los pollos se inmunsuprimieron con VEBI, CP o CS como se describe a continuación.

- [0358] *Tratamiento con VEBI.* Las aves en el ensayo 1, (grupos 4 y 7) se estimularon con la cepa de variante E de VEBI (Intervet, Inc. Millsboro, DE). En los ensayos 2 y 3, los pollos de los grupos 4 y 7 se trataron con la cepa de estimulación STC 124-ADV del VEBI (National Veterinary Services Laboratory, Ames, Iowa). Las inoculaciones se dieron *per os* y mediante gotas oculares, y consistieron en 100 µl que contenían al menos  $10^3$  dosis infecciosa de cultivo tisular media del virus diluido en una solución salina tamponada con fosfato (PBS).
- [0359] *Tratamiento con ciclofosfamida (CP).* La inmunosupresión de linfocitos B se indujo utilizando un protocolo establecido (32). En resumen, los grupos 5 y 8 en los tres ensayos recibieron una inyección intraperitoneal de 4 mg de CP (monohidrato de ciclofosfamida; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (0,1 ml) a diario durante 4 días al inicio del primer día después de la eclosión. Para la inyección, se obtuvo CP en una forma seca, y se preparó una solución acuosa reconstituyendo 1,6 g en 40 ml de solución salina estéril tamponada con fosfato sin calcio ni magnesio (CMF-PBS) y filtrando ésta a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm. La solución resultante contenía 40 mg de CP/ml.
- [0360] *Tratamiento de ciclosporina (CS).* La inmunosupresión de linfocitos T se indujo utilizando un protocolo establecido (31). En resumen, los pollos de los grupos 6 y 9 en los tres ensayos recibieron una inyección intramuscular de CS, 100 mg/kg de peso corporal, cada 3 días desde el primer día después de la eclosión hasta que el experimento terminó. La CS se preparó diluyendo una solución madre (Sandimmune, 100 mg/ml, Novartis Pharma AG, Basle, Suiza) 1:1 en aceite de oliva. Las diluciones del fármaco se ajustaron conforme aumentaron los pesos corporales.
- [0361] Se evaluó la inmunosupresión en los grupos tratados con VEBI, CP y CS mediante el examen histopatológico de órganos inmunes (bolsa, timo y bazo), la prueba de respuesta de hipersensibilidad cutánea (CBH), y la respuesta humorala a la vacunación de VEN.
- [0362] *Estimulación con homogenados proventriculares.* A los 7 días de edad, las aves de los grupos 3, 7, 8 y 9 en el ensayo 1 se inocularon mediante cebadura oral con 1 ml de un homogenado proventricular positivo (+PV) que consistía en proventrículos obtenidos de pollos de engorde comerciales con proventriculitis (13). Los proventrículos de pollos en el grupo 3 (tratados con +PV) del ensayo 1 se homogeneizaron como se ha descrito previamente (4) y se usaron para exponer los grupos +PV en el ensayo 2 y el ensayo 3. En resumen, los proventrículos recolectados de las aves que desarrollaron proventriculitis se lavaron tres veces en una solución salina normal estéril (PBS) en un agitador magnético para eliminar los residuos de alimentos y toxinas. Después, los proventrículos lavados se diluyeron 1:1 peso/vol en PBS y se homogeneizaron con una mezcladora comercial (Waring, New Hartford, Connecticut). Los homogenados se congelaron a -80 °C y se descongelaron a temperatura ambiente inmediatamente antes de la inoculación. Se usó el mismo procedimiento con proventrículos de pollos de engorde normales sin proventriculitis para producir un homogenado proventricular negativo (-PV). Se usó para inocular aves del grupo 2 en los tres ensayos. Las aves del grupo 1 en los ensayos se inocularon de forma simulada con 1 ml de solución salina estéril.
- [0363] *Respuesta de la hipersensibilidad basófila cutánea (CBH).* Esta prueba se realizó para evaluar la función de los linfocitos T de los grupos de tratamiento de inmunosupresión a las 2 semanas de edad como se ha descrito previamente (6). Se inyectaron cuatro pollos de los grupos 1 (solución salina), 4 (VEBI), 5 (CP) y 6 (CS) por vía intradérmica en la piel entre el tercer y el cuarto dedo de la pata izquierda con 200 µg de Fitohemaglutinina-P (PHA-P, Sigma, St. Louis, MOS) en 100 µl de solución salina fisiológica estéril (PSS). La pata derecha de cada pollo se inyectó de manera similar con 100 µl de PSS sin PHA-P para servir como control. La respuesta de CBH a PHA-P se evaluó determinando el espesor de la piel interdigital antes de la inyección, y a las 12 y 24 horas después de la inyección con un micrómetro digital de tensión constante (Mitotuyo Co., Kanagawa, Japón). La respuesta de CBH se calculó mediante dos procedimientos: 1) CBH-1 o aumento del espesor de la piel - (espesor de la piel después de la inyección, pata izquierda) - (espesor de la piel antes de la inyección, pata izquierda); y 2) respuesta CBH-2 = (respuesta de PHA-P, pata izquierda) - (respuesta de PSS, pata derecha).
- [0364] *Vacunación del VEN.* Para evaluar la función inmune humorala, se vacunaron 4 aves de los grupos 1 (solución salina), 4 (VEBI), 5 (CP) y 6 (CS) a los 21 días de edad con la vacuna inactivada de la enfermedad de Newcastle (Vineland Laboratories, Vineland, NJ). A cada ave se le dio una dosis de 0,5 ml de vacuna por vía intramuscular como se recomendó por el fabricante. Dos semanas después, las aves se desangraron para obtener sueros, y se cuantificaron anticuerpos de VEN mediante ELISA (IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, Maine), y la prueba de HI usando el procedimiento de suero-diluido virus constante (37).
- [0365] *Recolección de la muestra y procesamiento.* Todas las aves se marcaron con una banda en el ala y se pesaron a un día de edad. A los 14 y 21 días de edad, se seleccionaron aleatoriamente 4 aves de cada grupo y se examinaron, se pesaron, se desangraron, se sacrificaron mediante dislocación cervical, y se necropsiaron. De cada ave se recogieron la bolsa, el proventrículo, el bazo, y la mitad derecha del timo, se pesaron y una porción de cada uno se fijó inmediatamente mediante la inmersión en formalina tamponada neutra al 10% durante 24 horas. Después, los tejidos se procesaron y se embebieron en parafina usando técnicas histológicas de rutina. Los

proventrículos restantes se recogieron en tubos de plástico estériles sobre hielo para la preparación posterior del homogenado como se ha explicado previamente. Se obtuvieron los pesos de órganos relativos usando la fórmula [peso de órgano relativo = (peso de órgano/peso corporal) x 100].

- 5      **[0366] Histopatología.** Las muestras de tejidos embebidas en parafina de la bolsa, el proventrículo, el bazo y el timo de cada ave se seccionaron, se montaron, se tiñeron utilizando hematoxilina y eosina (HE) y se examinaron de forma ciega en cuanto al tratamiento para lesiones utilizando microscopía de luz. A todas las secciones de la bolsa y el proventrículo se les asignó una clasificación de gravedad de la lesión. Una clasificación de la lesión de 1 representa ninguna lesión. Para las secciones bursales, 2 se definió como la variación leve del tamaño folicular, 3 como la variación moderada del tamaño folicular, y 4 como necrosis o atrofia folicular. Para secciones proventriculares, 2 se definió como ectasia luminal glandular leve, 3 como ectasia más infiltrados linfoides en el intersticio glandular, y 4 como necrosis glandular aguda o fibrosis severa con infiltrados linfoides. También se examinaron el bazo y el timo para determinar la presencia de lesiones.
- 10     **[0367] Serología.** Las muestras de suero obtenidas los días 14 y 21 de edad se examinaron para determinar el anticuerpo al VEBI, VBI, VEN, VAP y el reovirus usando pruebas ELISA disponibles en el mercado (IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, Maine).
- 15     **[0368] RT-PCR en tiempo real.** El ARN se extrajo de las bolsas y proventrículos embebidos en parafina y fijados en formalina y se examinaron para determinar el ácido nucleico del VEBI mediante el análisis por RT-PCR en tiempo real (25). Las secciones que hacían un total de cincuenta micrómetros de espesor se cortaron de cada bloque de tejido embebido en parafina y fijado en formalina, se desparafinizaron en HemoDe (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), se lavaron con etanol al 100% y se digirieron con 25 µg/ml de proteinasa K (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante 1 hora a 50 °C. El ARN se extrajo usando Trizol (Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, se diluyeron en 25 µl de sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 90% y se congelaron a -80 °C hasta que se ensayaron. El ARN extraído se desnaturizó a 95 °C durante 5 minutos y se puso sobre hielo. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR) usando reactivos del kit Light Cycler-RNA Amplification SYBR® Green I (ROCHE Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). Los cebadores usados se diseñaron para amplificar un segmento de 400 pb del genoma del VEBI compartido por todas las cepas, que flanquea una región hipervariable del gen VP2. Las secuencia de cebadores fueron B4 5' TCTTGGGTATGTGAGGCTTG (SEQ ID NO: 9) y B4 3' GGATGTGATTGGCTGGTTA (SEQ ID NO: 10). La amplificación y detección de los productos específicos también se realizó usando un Light Cycler (ROCHE Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (ROCHE Light Cycler versión 3.0, ROCHE Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). En resumen, la transcripción inversa se hizo a 55 °C durante 10 minutos seguida de desnaturización a 95 °C durante 30 segundos. Se hicieron cuarenta ciclos de PCR que consistían en desnaturización (95 °C durante 1 segundo), hibridación (55 °C durante 10 s) y extensión (72 °C durante 13 s). Se hizo un análisis de curva de fusión con una desnaturización inicial a 95 °C. La fusión de ADN se realizó con una temperatura inicial de 65 °C durante 10 segundos y un aumento de temperatura gradual de 0,1 °C por segundo hasta alcanzar 95 °C. La temperatura de fusión del amplicón de 400 pb esperado estuvo entre 82 °C y 84 °C. Esta temperatura de fusión estimada se usó para confirmar la identidad de los productos específicos del VEBI obtenidos usando RT-PCR en tiempo real. La confirmación adicional de la amplificación específica se hizo utilizando técnicas electroforéticas en gel de rutina de los productos de PCR sobre agarosa al 2% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) seguido de la tinción con bromuro de etidio.
- 20     **[0369] Análisis estadístico.** La ganancia de peso del cuerpo, pesos bursales y proventriculares relativos, y las clasificaciones de lesión bursal y proventricular se analizaron usando ANOVA y comparaciones medias para todos los pares usando Turkey-Kramer HSD. El significado se asumió en el nivel 0,05 de probabilidad.
- 25     **[0370] RESULTADOS: Grupos de Control.** Controles de homogenado proventricular. Los pollos inoculados únicamente con una solución salina y un homogenado proventricular negativo (-PV) no desarrollaron proventriculitis en ninguno de los tres ensayos. No se observaron lesiones macroscópicas cuando se examinaron en la necropsia (figura 13). La ganancia de peso corporal media y el peso del proventrículo relativo para estos dos grupos fue muy similar (Tablas 18 y 19, respectivamente). Las lesiones microscópicas leves que consistían principalmente en ectasia luminal leve de las glándulas proventriculares estuvieron presentes en algunas de estas aves (Tabla 20). Los pollos que se inocularon únicamente con homogenado proventricular positivo (+PV) no tuvieron supresión significante de ganancia de peso en comparación con los grupos de solución salina y -PV en los tres ensayos (Tabla 18). Hubo una tendencia hacia al agrandamiento del proventrículo en pollos que recibieron el homogenado proventricular positivo. Estuvo presente un aumento de las lesiones microscópicas en el proventrículo de pollos que recibieron homogenado proventricular positivo en los ensayos 1 y 2 a los 7 y 14 dpi, y en el ensayo 3 a los 14 dpi. En la necropsia, los proventrículos de estos pollos estaban agrandados e inflamados, con placas o moteamiento visible sobre la superficie serosal, dilatación del istmo gástrico, y lesiones mucosales (papillas aplanas, con secreción de líquido blanco) (figura 13). Microscópicamente, a los 7 dpi, estuvo presente la necrosis aguda del epitelio glandular. Los senos de recogida de las glándulas se dilataron y contenían el epitelio descamado. Los núcleos de las células epiteliales glandulares se agrandaron y palidecieron, con cromatina marginada. Los infiltrados linfocíticos estuvieron

presentes como hojas en la lámina propia de la mucosa y expandieron el epitelio glandular entre el epitelio de los conductos y las glándulas (figura 14). A los 14 dpi, el epitelio glandular se reemplazó por el epitelio ductal. Los infiltrados de linfocitos y la formación del centro germinal estuvieron presentes en las glándulas y la mucosa (figura 14). En el ensayo 3, los pollos que se inocularon con +PV, mostraron lesiones similares de leves a moderadas en el

5 proventrículo a los 21 dpi, pero ningún aumento significativo de tamaño del proventrículo en comparación con los controles de solución salina o PV. Los centros germinales pequeños estuvieron presentes en las glándulas (figura 14) de pollos dosificados con +PV pero no en los administrados con solución salina o -PV.

10 [0371] No se observaron lesiones o diferencias en el peso del órgano relativo de la bolsa entre los pollos que recibieron solución salina, -PV o +PV (Tablas 21 y 22).

15 [0372] Controles de la inmunosupresión. Los pollos de engorde comerciales (grupo 4) en los ensayos 1 y 2, tratados con la cepa del VEBI Variante E y STC respectivamente, no tenían signos de infección del VEBI a los 7 y 14 dpi. Sus bolsas no tenían lesiones microscópicas significativas, ninguna diferencia en el peso del órgano relativo en comparación con los controles (Tablas 21 y 22), y fueron negativos para VEBI por RT-PCR. La respuesta de CBH y la respuesta humoral a la vacunación de VEN fue similar al grupo de control de solución salina (Tablas 23 y 24), indicando todas que la estimulación con el VEBI en estas aves no produjo infección por el VEBI. Sin embargo, los pollos de engorde SPF en el ensayo 3 expuestos a la cepa del VEBI STC tuvieron signos de depresión a los 7 días 20 después de la inoculación, y sus bolsas eran significativamente más pequeñas que las de los pollos de control de solución salina a los 7, 14 y 21 dpi (Tabla 21). También se observaron lesiones microscópicas severas (Tabla 22) y los sacos dieron positivo para VEBI por RT-PCR. La respuesta inmune humoral a la vacunación de VEN fue significativamente menor que los controles de solución salina (Tabla 24).

25 [0373] Los pollos de control de ciclofosfamida (CP) (Grupo 5) en los tres ensayos tendieron a ser menos que los pollos de los demás grupos, debido a una reducción en su ganancia de peso. Esta reducción fue significativa en los pollos de engorde SPF en el ensayo 3 (Tabla 18). Estos pollos también tuvieron emplumamiento disminuido y se presentaron débiles. Las bolsas de estos pollos fueron significativamente más pequeñas en los tres ensayos (Tabla 21), y se observó la depleción linfocítica marcada y la atrofia de la bolsa (Tabla 22). Se observó una pequeña 30 reducción de la respuesta de CBH en estas aves (Tabla 23), y la respuesta humoral a la vacunación de VEN se redujo significativamente (Tabla 24).

35 [0374] Los pollos de control de ciclosporina (CS) (grupo 6) en los ensayos 1 y 2 parecían normales (similares a los controles de solución salina). Aunque su ganancia de peso se redujo, esta no fue significativamente diferente de la de los controles de solución salina (Tabla 18). La ganancia de peso en los pollos en el ensayo 3 se redujo a los 7 y 21 dpi. Las bolsas de aves tratadas con CS no tenían lesiones y no hubo diferencia del tamaño en comparación 40 con los controles de solución salina (Tablas 21 y 22). Los timos no tuvieron ninguna lesión significativa, pero la capacidad inmune de CM1 se redujo significativamente (Tabla 23). Las respuestas de CBH-1 y CBH-2 disminuyeron ( $p < 0,05$ ) en comparación con el grupo de control de solución salina. La respuesta inmune humoral, medida por la producción de anticuerpos después de la vacunación contra el VEN, no se vio afectada (Tabla 24).

45 [0375] El efecto de los tratamientos inmunosupresivos (VEBI, CP, CS) en el peso relativo del proventrículo o la presencia de lesiones fue muy leve y no significativamente diferente del observado en los controles de solución salina o -PV (Tablas 19 y 20).

50 [0376] Grupos experimentales. *Ganancia de peso corporal.* Los pollos tratados con CP y +PV tenían una reducción significativa en la ganancia de peso corporal en comparación con los grupos de control (solución salina - PV y +PV), incluyendo aquellos administrados solamente con CP, en el ensayo 1 a los 7 y 14 dpi, y el ensayo 2 a los 7 dpi (Tabla 18). La combinación de CS y +PV tuvo un efecto perjudicial en la ganancia del peso en el ensayo 2 a los 14 dpi y el ensayo 3 a los 7 y 21 dpi, pero la diferencia de los pollos a los que se administró solamente CS no fue significativa en ningún caso.

55 [0377] *Pesos relativos de órganos y lesiones.* No se observó una diferencia significante entre los grupos de control y experimentales para el bazo y el timo en cualquiera de los ensayos. (No se muestran los datos). Las excepciones fueron los pollos tratados con CP en los que a los 7 dpi sus timos eran más pequeños que en el resto de los grupos, pero a los 14 dpi, eran iguales que en los controles. En los tres ensayos, las aves tratadas con CP y +PV tenían una disminución significativa del tamaño bursal y desarrollaron altas clasificaciones de lesión, pero no eran diferentes a las de los controles de CP (Tablas 21 y 22). En el ensayo 3, tuvieron lugar lesiones y una disminución significante del tamaño de la bolsa en los pollos que se estimularon con VEBI y se expusieron a +PV, similar a lo observado en los controles del VEBI (Tablas 21 y 22). Estas bolsas también dieron positivo para el VEBI 60 por RT-PCR.

[0378] El peso proventricular relativo de pollos que se inmunosuprimieron y se trataron con +PV aumentó a los 7 y 14 dpi en comparación con los pollos de control (solución salina y -PV), pero en la mayoría de los casos no hubo una diferencia significativa en comparación con los controles de +PV. Los pollos en el ensayo 1 y 2 a los 7 dpi

tratados con la combinación de CP/+PV, tuvieron un incremento significante del peso proventricular relativo con relación a los controles de +PV (Tabla 19). La clasificación de lesiones de los proventrículos de todas las aves inmunosuprimidas tratadas con +PV también fue similar a las observadas en el grupo de control de +PV a los 7 y 14 dpi (Tabla 20), aunque hubo un aumento en la incidencia de la proventriculitis y una diferencia en la apariencia y la

5 gravedad de las lesiones observadas en las aves tratadas con CS. Esto fue más evidente en los pollos de engorde SPF en los que todas las aves tratadas con la combinación de CS y +PV tuvieron proventriculitis moderada severa. Las clasificaciones de CS/+PV fueron significativamente mayores que todos los demás tratamientos a los 21 dpi en el ensayo 3. En los tres ensayos, la incidencia y la gravedad de la proventriculitis fue superior a los 14 dpi que a los 7 dpi. En el ensayo 3 a los 21 dpi, el peso relativo y la clasificación de las lesiones de los proventrículos de todas las 10 aves que recibieron +PV fue similar a los controles negativos, con la excepción de los pollos tratados con CP/+PV cuya clasificación y peso permanecieron significativamente mayores que en las aves de los demás grupos (Tablas 19 y 20).

15 [0379] Los pollos tratados con +PV en los tres ensayos, independientemente del tratamiento de inmunosupresión, tuvieron necrosis aguda de las glándulas proventriculares a los 7 dpi con algunos infiltrados de linfocitos, principalmente en la mucosa. En algunos casos, los infiltrados de linfocito también estuvieron presentes en las glándulas en la forma de láminas. Algunas veces, también estuvieron presentes la hemorragia y la congestión. Las aves tratadas con CS tuvieron más lesiones, con destrucción y coalescencia de las glándulas.

20 [0380] A los 14 dpi, los pollos tratados con VEBI y +PV, o CP y +PV, tuvieron reemplazo metaplásico del epitelio secretor glandular proventricular por el epitelio ductal, e infiltrados linfoides como se observa en los pollos tratados únicamente con +PV. Los centros germinales linfoides proventriculares eran más pequeños, o no estaban presentes, en aves tratadas con CP (en los tres ensayos) o VEBI (en el ensayo 3). Los pollos tratados con CS y +PV en los 25 ensayos 1 y 2 todavía tenían necrosis aguda a los 14 dpi, infiltración linfoide reducida, y formación de centro germinal variable, y una mínima metaplasia (Fig. 15).

30 [0381] A los 21 dpi, los pollos de engorde SPF tratados con EBI y +PV, o CP y +PV, tuvieron lesiones de leves a moderadas, con muy poca infiltración de linfocitos. Estos estaban principalmente en forma de centros germinales pequeños. Los pollos tratados con CS y +PV tuvieron lesiones graves que consistían en necrosis aguda del epitelio glandular, coalescencia de glándulas, y centros germinales pequeños y múltiples.

35 [0382] Serología. Los pollos de todos los grupos en el ensayo 1 tuvieron titulaciones ELISA frente al VEBI e VBI a los 14 días de edad (7 dpi), y no tenían titulaciones frente al VEN, reovirus o VAP. Estas titulaciones del VEBI y VBI disminuyeron, pero todavía estuvieron presentes a los 21 días de edad (14 dpi). Los pollos en el ensayo 2 tuvieron titulaciones para el VEBI, VBI y VEN a los 14 días de edad (7 dpi), pero no frente al reovirus. En ambos 40 ensayos, los pollos que recibieron -PV o +PV (con la excepción de las aves tratadas con CP) desarrollaron titulaciones frente al reovirus a los 21 días de edad (14 dpi).

45 [0383] Los pollos de engorde SPF (ensayo 3) a los 14 días de edad (7 dpi) fueron seronegativos para el VEN, VBI, reovirus y VAP. También fueron negativos para el VEBI, con la excepción de los estimulados con el VEBI, que desarrollaron y tenían seroconversión a los 14, 21 y 30 días de edad (7, 14 y 21 dpi). A los 21 y 30 días de edad (14 y 21 dpi), las aves que recibieron +PV, pero no que se trataron con CP, tenían titulaciones frente al VBI, VEN y reovirus. Todas las aves fueron negativas para el VAP en todos los puntos del tiempo.

50 [0384] RT-PCR del VEBI. El VEBI no se detectó en las bolsas o proventrículos embebidos en parafina de cualquiera de las aves en los ensayos 1 ó 2. En el ensayo 3, se detectó el VEBI a los 7, 14 y 21 dpi en la bolsas embebidas en parafina de todas las aves estimuladas con el VEBI. No se detectó en ninguno de los proventrículos de estas aves, o en las bolsas o proventrículos de los pollos de los demás grupos en el ensayo 3.

55 [0385] **ANÁLISIS.** La relación entre el VEBI y la proventriculitis no está clara. Tanto las lesiones macroscópicas como las microscópicas del proventrículo se han producido mediante la estimulación del VEBI en pollos Leghorn (24), y se ha indicado que la vacunación frente al VEBI disminuye la incidencia de la proventriculitis (7, 15). Sin embargo, la proventriculitis no se produjo por la inoculación de pollos de engorde SPF con diferentes cepas del VEBI (25). Los pollos comerciales se exponen al VEBI a una edad temprana, y aunque la mortalidad en las bandadas no protegidas puede ser muy significativa, el principal problema para la industria aviar es la capacidad del VEBI de causar inmunosupresión. A menudo, las aves inmunosuprimidas no logran responder adecuadamente a la vacunación y son susceptibles a infecciones secundarias. Los mecanismos de la inmunosupresión inducida por VEBI no se comprenden completamente. Las respuestas inmunes tanto humorales como celulares, están comprometidas (34). La inhibición de la inmunidad humoral es más grave y se atribuye a la destrucción de los linfocitos B que producen inmunoglobulina por el virus. Los pollos expuestos al VEBI producen niveles subóptimos de anticuerpos contra varios antígenos infecciosos y no infecciosos (34). Aunque los linfocitos T no sirven como dianas para la replicación del VEBI, las respuestas inmunes mediadas por células de pollos expuestos a virus parecen estar comprometidas (5, 18, 33, 34).

- [0386] La protección frente al VEBI se consigue mediante la inducción de anticuerpos neutralizantes, así como la transferencia pasiva de anticuerpos maternales a pollos jóvenes. Estos anticuerpos maternales pueden interferir con los programas de vacunación del VEBI. En este estudio, los pollos de engorde comerciales (ensayos 1 y 2) inoculados con una dosis infecciosa del VEBI no desarrollaron la enfermedad. No se observaron lesiones en sus bolsas, y el análisis por RT-PCR no detectó ningún virus. En consecuencia, estas aves no estaban inmunosuprimidas por el VEBI como se pretendía, y tenían una respuesta normal a la vacunación del VEN. Por otra parte, los pollos de engorde SPF se infectaron exitosamente con el VEBI cuando se estimularon de forma intencionada a un día de edad. Sus bolsas eran significativamente más pequeñas que los controles, tuvieron lesiones típicas de la infección por el VEBI, y daban positivo para el virus por RT-PCR. También desarrollaron anticuerpos frente al VEBI, y se inmunosuprimieron como se midió por su baja seroconversión al VEN. Sin embargo, la infección con esta cepa particular de VEBI (STC) no produjo proventriculitis.
- [0387] Se ha usado el tratamiento de CP para inhibir la inmunidad humoral con el fin de determinar su función en la patogénesis de patógenos infecciosos de pollos (1, 31). Los pollos tratados con CP tenían bolsas que eran significativamente más pequeñas y carecían de linfocitos, y no desarrollaron un anticuerpo específico después de la vacunación para el VEN, lo que demuestra su inmunosupresión humoral. Tanto CP como VEBI tienen efectos menores sobre CMI (32, 34). Hubo una leve depresión de la respuesta de CBH en aves tratadas con VEBI (ensayo 3) o CP, pero esto no fue significante en comparación con los controles.
- [0388] Como se esperaba, los pollos de los tres ensayos tratados con CS mostraron una respuesta de CBH significativamente disminuida (6). La CS impide la síntesis de citocina en los linfocitos T al bloquear una fase posterior de la señalización iniciada por el receptor linfocitos T, reduciendo la producción de interleucina-2 (IL-2), y por lo tanto, la proliferación de linfocitos T (12, 28). Como consecuencia, se reducen las funciones dependientes de IL-2, que incluyen actividades de T-auxiliares, citotoxicidad, actividad natural de células inactivadas, y citotoxicidad dependiente del anticuerpo (11). Como se esperaba, la respuesta inmune humoral de aves tratadas con CS no se vio afectada, y desarrollaron anticuerpos dirigidos contra el VEN después de la vacunación contra el VEN.
- [0389] Se sabe que el homogenado usado para inducir la proventriculitis en el ensayo 1 contenía el VEBI (13). En un intento de reproducir una proventriculitis lo más parecida a la observada en casos de origen natural, se utilizaron pollos de engorde comerciales con anticuerpos maternales al VEBI en los ensayos 1 y 2. La inoculación de estos pollos en el ensayo 1 con el homogenado que lleva el VEBI produjo proventriculitis pero no infección del VEBI, puesto que su anticuerpo anti-VEBI era protector. Ya que la proventriculitis todavía no tuvo lugar, esto sugiere que la proventriculitis no se produjo directamente mediante la infección con el VEBI presente en ese homogenado, pero no excluye el VEBI como un factor contribuyente potencial. En los ensayos 2 y 3, la proventriculitis se produjo inoculando aves con homogenado proventricular positivo producido de aves con proventriculitis en el ensayo 1. Excluyendo los estimulados con el VEBI de forma intencionada, los pollos a los que se les dio este homogenado en los ensayos 2 y 3 desarrollaron proventriculitis, pero no infección por el VEBI. Estos datos sugieren que el pase seriado del homogenado proventricular original a través de los pollos de engorde positivos de anticuerpo limpió éste del VEBI y propagó el agente causante responsable de la proventriculitis.
- [0390] La proventriculitis producida en el ensayo 1 fue más grave que los en los ensayos 2 y 3. Esto puede deberse a la reducción en la titulación del patógeno causante por el pase *in vivo* en presencia de anticuerpo, o la eliminación del VEBI como se ha descrito anteriormente. Aun así, la incidencia de proventriculitis dentro de los grupos y los efectos de la inmunosupresión sobre la proventriculitis fueron similares en los tres ensayos.
- [0391] La inmunosupresión inducida por ciclofosfamida (CP) en los tres ensayos, y por el VEBI en el ensayo 3, no afectó a la incidencia o gravedad de las lesiones de la proventriculitis observada. Las lesiones proventriculares observadas en pollos que recibieron CP/+PV fueron similares a las observadas en los controles de +PV. Hubo una necrosis glandular aguda y algún infiltrado de linfocito a los 7 dpi, y metaplasia glandular con infiltrado de linfocitos grave a los 14 dpi. Ambos, láminas y folículos de linfocitos, estuvieron presentes, representando los linfocitos T y B, respectivamente (22, 25), sin embargo, en estas aves se observó menos formación folicular. Tanto los linfocitos T auxiliares como citotóxicos están presentes en los proventrículos normales (22), y su número aumenta notablemente en la proventriculitis (25). Está presente un menor número de linfocitos B en los proventrículos normales, y en la proventriculitis su número también aumenta. Aunque las lesiones observadas en los proventrículos de aves tratadas con CP/+PV fueron similares a las de los controles, a los 7 dpi los pollos de estos grupos en los ensayos 1 y 2, tenían pesos de los proventrículos significativamente mayores que los controles de +PV. Esto sugiere una función de los linfocitos B en las fases tempranas de la proventriculitis, donde la producción comprometida de anticuerpos podría exacerbar la gravedad de la afección.
- [0392] Todos los pollos con supresión de linfocitos T debido a la ciclosporina (CS) y tratados con +PV tuvieron una incidencia y clasificaciones de lesión de proventriculitis iguales o superiores que los controles de +PV. Los pesos relativos proventriculares también tendían a ser superiores que los controles de +PV, siendo más evidentes en las aves SPF en el ensayo 3, donde esta diferencia fue significativa a los 21 dpi. Se ha sugerido que las respuestas inmunes mediadas por células (CMI) desempeñan una función clave en la eliminación de los patógenos

entéricos aviares (1, 20, 36), y estos datos indican que las funciones de los linfocitos T desempeñan una función en el control la proventriculitis. La alta incidencia de lesiones en los proventrículos de aves en el ensayo 3 a los 21 dpi que estaban inmunosuprimidos con CP y tratados con +PV, indica la importancia de los linfocitos T en la aclaración y la resolución de la proventriculitis. Se conoce bien que el VEBI puede afectar a la respuesta de CMI (5, 18, 33, 34), y

5 aunque se observó el poco efecto de la inmunosupresión inducida por el VEBI sobre la gravedad de la proventriculitis en este estudio, es posible que la prevención de la inmunosupresión severa en el campo a través de la vacunación frente al VEBI pueda disminuir la gravedad de la proventriculitis.

10 [0393] Los resultados serológicos presumen que el homogenado proventricular positivo original usado en este estudio contenía VEBI, VBI, VEN y reovirus debido a que algunos pollos experimentales dosificados se seroconvirtieron en estos agentes. El pase de este homogenado en pollos de engorde comerciales parecía tener el VEBI eliminado debido a que los SPF estimulados con el homogenado proventricular posterior no se seroconvirtieron en este virus o desarrollaron una enfermedad bursal. Los objetivos y el diseño experimental del presente estudio no se diseñaron para determinar la función o funciones de estos agentes en la proventriculitis, por 15 lo que no debe extraerse ninguna conclusión de su presencia aquí.

20 [0394] En conclusión, la inmunosupresión de linfocitos B, por CP o VEBI, no tuvo un efecto sobre la incidencia de la proventriculitis, y las lesiones observadas fueron similares a las producidas por +PV solo. Sin embargo, el agrandamiento proventricular fue más evidente en estas aves a los 7 dpi, indicando que la respuesta humorar puede ser importante en las fases tempranas de la enfermedad controlando probablemente el agente causante mediante la producción de anticuerpos. Por otro lado, la supresión de linfocitos T por CS tuvo un efecto sobre la incidencia de proventriculitis, y las lesiones observadas fueron más graves y duraron más tiempo que los controles de +PV. Los linfocitos T son más abundantes en el proventrículo que los linfocitos B, lo cual sugiere su importancia en las 25 respuestas inmunes a agentes infecciosos en este órgano. En este estudio, al afectar a la función de los linfocitos T, la gravedad de la proventriculitis aumentó, y se prolongó la resolución de la enfermedad.

#### Referencias:

##### [0395]

- 30 1. Arnold & Holt. Poult Sci. 74: 656-665. 1995.
2. Barnes y col. Poultry Sci. 80: 906-911. 2001.
3. Bayyari y col. Poult Sci. 74: 1961-1969. 1995.
4. Bayyari y col. Poult Sci. 74: 799-1809. 1995.
- 35 5. Confer y col. Am J Vet Res 42: 2109-2113. 1981.
6. Corrier & De Loach. Poult Sci. 69: 403-408. 1990.
7. Dormitorio y col. International Poultry Scientific Forum. 15-16 de enero. Atlanta, Georgia. 2001.
8. Giambrone y col. Am J Vet Res 38: 581-583. 1977.
9. Goodwin y col. Avian Pathol. 25: 369-379. 1996.
- 40 10. Guy & Barnes. Proceedings of the 139th AVMA Annual Convention. Julio. Nashville. TN. 2002.
11. Hill y col. Avian Dis. 33: 86-92. 1989.
12. Ho y col. Clinical Immunol Immunopathol. 80: S40-45. 1996.
13. Huff y col. Avian Dis. 45: 828-843. 2001.
- 45 14. Jensen y col. Avian Dis. 35: 969-973. 1991.
15. Kelly y col. Proceedings of the 138th AVMA Annual Convention. 14-18 de julio. Boston, MA. 2001.
16. Kouwenhoven y col. Avian Pathol. 7: 183-187. 1978.
17. Kouwenhoven y col. Avian Pathol. 17: 879-892. 1988.
18. Lam. Avian Pathol. 20: 867-876. 1991.
19. Lenz y col. J Vet Diagn Invest. 10: 145-151. 1998.
- 50 20. Lillehoj & Bacon. Avian Dis. 35: 294-301. 1991.
21. Lukert & Saif. Disease of Poultry, 11th edition. B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L. R. McDougald y Y.M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames. IA. Pág. 161-179. 2003.
22. Matsumoto & Hashimoto. J Vet Med Sci 62: 161-167. 2000.
23. Mutlu y col. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere. 25: 460-462. 1997.
- 55 24. Newberry. Ph. D. Dissertation. University of Arkansas, Fayetteville, AR. 1996.
25. Pantin & Brown. Abstracts of the 52nd Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists. Vet Pathol. 38: 579. 2001.
26. Pegram & Wyatt. Poultry Sci. 60: 2429-2440. 1981.
27. Poole. Proceedings of the 43rd Western Poultry Disease Conference, Sacramento CA. Págs. 40-42. 1994.
- 60 28. Resch & Szamel. Int J Immunopharmacology. 19: 579-585. 1997.
29. Riddell. Avian Dis. 20: 442-445. 1976.
30. Rodenberg y col. Avian Dis. 38: 16-21. 1994.
31. Russell y col. Vet Immunol Immunopathol. 60: 171-185. 1997.
32. Sharma & Lee. Infection and Immunity. 227-230. 1977.

33. Sharma y col. Avian Dis. 33: 112-124. 1989.  
 34. Sharma y col. Dev Comp Immunology. 24: 223-235. 2000.  
 35. Schulze & Heidrich. Dtsch Tierarztl Wochenschr 108: 264-266.2001.  
 36. Songserm y col. Vet Immunol Immunopathol 85: 51-62. 2002.  
 5 37. Thayer & Beard. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Cuarta edición.  
 Publicado por The American Association of Avian Pathologists. 1998.  
 38. Turpin. Ms. Thesis. UGA .1998.  
 39. Yu y col. Avian Dis. 45: 416-424. 2001.  
 40. Van der Berg. Avian Pathol. 29: 175-194. 2000.  
 10 41. Wideman y col. J Appl Poult Res 5: 219-230. 1996.

PROVENTRICULITIS EN POLLOS DE ENGORDE: EFECTOS DE LA INMUNOSUPRESIÓN (Pantin-Jackwood y col., *Veterinary Pathology*, en prensa)

15 [0396] RESUMEN. La proventriculitis en pollos de engorde causa decomisos del canal cuando los proventrículos inflamados se rompen durante la evisceración. La causa de esta proventriculitis es desconocida, pero se han relacionado a ésta varios agentes infecciosos. Un agente de este tipo, el virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI), se ha implicado como causa de la proventriculitis, pero no se ha demostrado un efecto directo de este virus en el proventrículo. La función del VEBI en la proventriculitis puede ser indirecta debido a su habilidad para causar inmunosupresión. El objetivo de este estudio fue entender cómo afecta la inmunosupresión a la incidencia de la proventriculitis en pollos de engorde. Se indujo la inmunosupresión en pollos de engorde comerciales y SPF usando sustancias químicas (ciclofosfamida y ciclosporina) o virus (VEBI). Después, todos los grupos se expusieron a un homogenizado proventricular producido a partir de aves. A los 7 y 14 días después de la inoculación, la incidencia de la proventriculitis en estos grupos se comparó con la producida por la exposición a homogenizado en pollos de engorde inmunocompetentes. Todas las aves expuestas al homogenizado proventricular de aves enfermas desarrollaron proventriculitis. La ciclofosfamida y el VEBI, ambos supresores de linfocitos B, no afectaron significativamente a la incidencia o características de la proventriculitis observada, aunque tuvieron un efecto en el tamaño del proventrículo a los 7 días después de la inoculación. Los pollos inmunosuprimidos con ciclosporina, un supresor de linfocitos T, desarrollaron lesiones más graves y tuvieron una mayor incidencia de proventriculitis. Estos hallazgos indican que ambos, los linfocitos B y T, están implicados en la respuesta inmune frente a la proventriculitis, pero la inmunidad mediada por las células parece tener una función más importante en el control de la enfermedad. El VEBI afecta tanto a la inmunidad humorral como celular en el pollo por lo que, aunque las condiciones experimentales no tuvieron un efecto mayor en la proventriculitis, esto puede explicar por qué el control del VEBI en el campo parece reducir la incidencia de la proventriculitis. Palabras claves: Proventriculitis, inmunosupresión, VEBI. Abreviaturas: CBH = hipersensibilidad basófila cutánea; CMI = inmunidad mediada por células; Cp = ciclofosfamida; Cp = ciclosporina; VEBI = virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa; RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa; Spf = sin patógeno específico.

40 [0397] INTRODUCCIÓN. La proventriculitis es una afección clínica que afecta a los pollos de engorde. Se caracteriza por el agrandamiento del proventrículo y la debilidad del istmo gástrico. Durante la evisceración de rutinaria en el procesamiento, los proventrículos afectados se rompen causando el derrame del contenido proventricular en la cavidad corporal, lo que da como resultado el decomiso de los canales afectados por la contaminación. La enfermedad también se ha asociado con el crecimiento deteriorado, y una deficiente conversión de los alimentos (16, 13). Microscópicamente, se observa la degeneración y la necrosis de glándulas proventriculares acompañada por la infiltración linfocítica intersticial intraglandular marcada (4,9, 10).

50 [0398] Están implicados varios agentes como causas potenciales de lesiones proventriculares. Las causas no infecciosas incluyen la exposición oral a aminas biogénicas (2, 27), micotoxinas (26), falta de fibra dietética (29) y sulfato de cobre en exceso (3, 14, 41). Las causas infecciosas incluyen adenovirus (19), reovirus (17, 38), virus de la bronquitis infecciosa (39) y megabacterias (23, 35). Sin embargo, en la mayoría de los casos no se ha encontrado regularmente ninguno de estos agentes no infecciosos o infecciosos. La microscopía electrónica ha detectado partículas virales en lesiones agudas, pero el aislamiento a partir de un virus de proventrículos afectado no ha tenido éxito (9, 10, 13).

55 [0399] El Virus de la Enfermedad de la Bursitis Infecciosa (VEBI) está implicado como la causa para esta enfermedad (4, 13, 24), y se ha informado sobre la vacunación del VEBI para disminuir su incidencia (7, 15). La proventriculitis se puede reproducir inoculando por vía oral pollos de engorde con proventrículos homogeneizados recolectados de aves afectadas (16, 4). Un agente filtrable encontrado en estos homogenizados causa lesiones similares las que se encuentran en los casos de campo (4), e el VEBI se ha inmunoprecipitado de estos homogenizados (13). Los pollos de engorde comerciales expuestos a este VEBI desarrollaron clasificaciones de lesiones proventriculares incrementadas, pero no tuvieron aumento en el tamaño proventricular, un aspecto característico producido por la exposición a los homogenizados proventriculares (13). Estos hallazgos sugieren que pueden requerirse otros agentes o afecciones para producir la proventriculitis.

**[0400]** El VEBI induce la inmunosupresión en pollos (21, 34, 40). Las bandadas inmuno-suprimidas pueden tener un aumento de la incidencia de infecciones secundarias, una deficiente conversión del alimento y una reducción de la respuesta protectora a las vacunas comúnmente utilizadas (34). El VEBI causa la destrucción lítica de los linfocitos B de IgM+ que da como resultado niveles subóptimos de anticuerpos frente a varios antígenos infecciosos y no infecciosos (8, 30, 34). Aunque la inmunosupresión causada por el VEBI se debe principalmente al daño de los linfocitos B, también se ha demostrado un efecto en la inmunidad mediada por las células (CMI) (5, 18, 33, 34).

**[0401]** Los pollos de engorde SPF expuestos en diferentes cepas del VEBI no desarrollaron lesiones proventriculares ni agrandamiento a los 4 o 6 días después de la inoculación (25). El virus se detectó en grandes cantidades en la bolsa de estas aves mediante RT-PCR y técnicas inmunohistoquímicas, pero no en el proventrículo, lo que indica que no es un órgano diana para el VEBI. Sin embargo, el efecto inmuno-supresor del VEBI puede explicar su relación indicada en la proventriculitis. El propósito de este estudio fue observar si la inmunosupresión tenía algún efecto en la incidencia, gravedad o carácter de la proventriculitis en pollos de engorde. Para abordar esto, se inmuno-suprimieron pollos de engorde comerciales y SPF de un día de edad con ciclofosfamida (supresor de linfocitos B), ciclosporina (supresor de linfocitos T), o el VEBI. Posteriormente, estos pollos se expusieron a un homogenado proventricular de pollos afectados, y se determinó el efecto de la inmunosupresión sobre la proventriculitis.

**[0402]** MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS. Alojamiento de animales. Los pollos de un día de edad se dividieron en grupos y se alojaron en unidades Horsfal de presión positiva. Se proporcionó alimento no medicado y agua *ad libidum*.

**[0403]** Diseño experimental. Ensayos 1 y 2. Un total de 88 pollos de engorde comerciales no vacunados, obtenidos de un criadero local, se dividieron en 9 grupos de 8 ó 12 aves, y los polluelos de cada grupo recibieron un tratamiento inmuno-supresor o ningún tratamiento (Tabla 17). Los pollos recibieron posteriormente, como se describe a continuación, un homogenado proventricular positivo (+PV) o negativo (-PV), solución salina, o ningún homogenado. El grupo 1 tenía 12 aves, que se inocularon *per os* con 1 ml de solución salina estéril a los 7 días de edad. El grupo 2 tenía 8 aves, que se inocularon *per os* con 1 ml de -PV producido a partir de pollos de engorde comerciales normales a los 7 días de edad. El grupo 3 tenía 8 aves, que se inocularon *per os* con 1 ml de +PV producido a partir de pollos de engorde que tuvieron proventriculitis a los 7 días de edad. El grupo 4 tenía 12 aves, que se inmuno-suprimieron con el VEBI administrado en un día de edad. El grupo 5 tenía 12 aves, que se inmuno-suprimieron con ciclofosfamida (CP) que se inició a 1 día de edad. El grupo 6 tenía 12 aves, que se inmuno-suprimieron con ciclosporina (CS) que se inició a 1 día de edad. El grupo 7 tenía 8 aves, que se inmuno-suprimieron con el VEBI administrado a 1 día de edad y se trataron con +PV a los 7 días de edad. El grupo 8 tenía 8, que se inmuno-suprimieron con CP que se inició a 1 día de edad y se trataron con +PV a los 7 días de edad. El grupo 9 tenía 8 aves, que se inmuno-suprimieron con CS que se inició a 1 día de edad y se trataron con +PV a los 7 días de edad.

**[0404]** Ensayo 3. Este experimento se realizó como los ensayos 1 y 2 con las siguientes modificaciones.

**Pollos.** Se obtuvieron huevos de pollo Plymouth Rock blancos fértiles (SEPRL, USDA, Athens, GA) de una bandada reproductora mantenidos en condiciones SPF, se incubaron y se mantuvieron en unidades de aislamiento Horsfal de presión positiva. La bandada de origen y toda la progenie usada en este experimento estaban libres de enfermedades aviares comunes, específicamente VEBI, VEM, VBI, reovirus y VAP. Se siguió el mismo diseño experimental y protocolo que en los ensayos 1 y 2. Los animales adicionales se incluyeron para permitir un tercer sacrificio a los 21 días después de la inoculación.

**[0405]** Grupos de tratamiento inmuno-supresores. Los pollos se inmuno-suprimieron con VEBI, CP o CS como se describe a continuación.

**[0406]** Tratamiento con VEBI. Las aves en el ensayo 1, (grupos 4 y 7) se estimularon con la cepa de variante E de VEBI (Intervet, Inc. Millsboro, DE). En los ensayos 2 y 3, los pollos de los grupos 4 y 7 se trataron con la cepa de estimulación STC 124-ADV del VEBI (National Veterinary Services Laboratory, Ames, Iowa). Las inoculaciones se dieron *per os* y mediante gotas oculares, y consistieron en 100 µl que contenían al menos  $10^3$  dosis infecciosa de cultivo tisular media del virus diluido en una solución salina tamponada con fosfato (PBS).

**[0407]** Tratamiento con ciclofosfamida (CP). La inmunosupresión de linfocitos B se indujo utilizando un protocolo establecido (32). En resumen, los grupos 5 y 8 en los tres ensayos recibieron una inyección intraperitoneal de 4 mg de CP (monohidrato de ciclofosfamida; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (0,1 ml) a diario durante 4 días al inicio del primer día después de la eclosión. Para la inyección, se obtuvo CP en una forma seca, y se preparó una solución acuosa reconstituyendo 1,6 g en 40 ml de solución salina estéril tamponada con fosfato sin calcio ni magnesio (CMF-PBS) y filtrando ésta a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm. La solución resultante contenía 40 mg de CP/ml.

**[0408]** *Tratamiento de ciclosporina (CS).* La inmunosupresión de linfocitos T se indujo utilizando un protocolo establecido (31). En resumen, los pollos de los grupos 6 y 9 en los tres ensayos recibieron una inyección intramuscular de CS, 100 mg/kg de peso corporal, cada 3 días desde el primer día después de la eclosión hasta que el experimento terminó. La CS se preparó diluyendo una solución madre (Sandimmune, 100 mg/ml, Novartis Pharma AG, Basle, Suiza) 1:1 en aceite de oliva. Las diluciones del fármaco se ajustaron conforme aumentaron los pesos corporales.

5 **[0409]** Se evaluó la inmunosupresión en los grupos tratados con VEBI, CP y CS mediante el examen histopatológico de órganos inmunes (bolsa, timo y bazo), la prueba de respuesta de hipersensibilidad cutánea (CBH), y la respuesta humoral a la vacunación de VEN.

10 **[0410]** *Estimulación con homogenados proventriculares.* A los 7 días de edad, las aves de los grupos 3, 7, 8 y 9 en el ensayo 1 se inocularon mediante cebadura oral con 1 ml de un homogenado proventricular positivo (+PV) que consistía en proventrículos obtenidos de pollos de engorde comerciales con proventriculitis (13). Los proventrículos de pollos en el grupo 3 (tratados con +PV) del ensayo 1 se homogeneizaron como se ha descrito previamente (4) y se usaron para exponer los grupos +PV en el ensayo 2 y el ensayo 3. En resumen, los proventrículos recolectados de las aves que desarrollaron proventriculitis se lavaron tres veces en una solución salina normal estéril (PBS) en un agitador magnético para eliminar los residuos de alimentos y toxinas. Después, los proventrículos lavados se diluyeron 1:1 peso/vol en PBS y se homogeneizaron con una mezcladora comercial (Waring, New Hartford, Connecticut). Los homogenados se congelaron a -80 °C y se descongelaron a temperatura ambiente inmediatamente antes de la inoculación. Se usó el mismo procedimiento con proventrículos de pollos de engorde normales sin proventriculitis para producir un homogenado proventricular negativo (-PV). Se usó para inocular aves del grupo 2 en los tres ensayos. Las aves del grupo 1 en los ensayos se ocularon de forma simulada con 1 ml de solución salina estéril.

15 **[0411]** *Respuesta de la hipersensibilidad basófila cutánea (CBH).* Esta prueba se realizó para evaluar la función de los linfocitos T de los grupos de tratamiento de inmunosupresión a las 2 semanas de edad como se ha descrito previamente (6). Se inyectaron cuatro pollos de los grupos 1 (solución salina), 4 (VEBI), 5 (CP) y 6 (CS) por vía 20 intradérmica en la piel entre el tercer y el cuarto dedo de la pata izquierda con 200 µg de Fitohemaglutinina-P (PHA-P, Sigma, St. Louis, MOS) en 100 µl de solución salina fisiológica estéril (PSS). La pata derecha de cada pollo se 25 inyectó de manera similar con 100 µl de PSS sin PHA-P para servir como control. La respuesta de CBH a PHA-P se evaluó determinando el espesor de la piel interdigital antes de la inyección, y a las 12 y 24 horas después de la inyección con un micrómetro digital de tensión constante (Mitotuyo Co., Kanagawa, Japón). La respuesta de CBH se 30 calculó mediante dos procedimientos: 1) CBH-1 o aumento del espesor de la piel - (espesor de la piel después de la inyección, pata izquierda) - (espesor de la piel antes de la inyección, pata izquierda); y 2) respuesta CBH-2 = (respuesta de PHA-P, pata izquierda) - (respuesta de PSS, pata derecha).

35 **[0412]** *Vacunación del VEN.* Para evaluar la función inmune humoral, se vacunaron 4 aves de los grupos 1 (solución salina), 4 (VEBI), 5 (CP) y 6 (CS) a los 21 días de edad con la vacuna inactivada de la enfermedad de Newcastle (Vineland Laboratories, Vineland, NJ). A cada ave se le dio una dosis de 0,5 ml de vacuna por vía intramuscular como se recomendó por el fabricante. Dos semanas después, las aves se desangraron para obtener sueros, y se cuantificaron anticuerpos de VEN mediante ELISA (IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, Maine), y la prueba de HI usando el procedimiento de suero-diluido virus constante (37).

40 **[0413]** *Recolección de la muestra y procesamiento.* Todas las aves se marcaron con una banda en el ala y se pesaron a un día de edad. A los 14 y 21 días de edad, se seleccionaron aleatoriamente 4 aves de cada grupo y se examinaron, se pesaron, se desangraron, se sacrificaron mediante dislocación cervical, y se necropsiaron. De cada ave se recogieron la bolsa, el proventrículo, el bazo, y la mitad derecha del timo, se pesaron y una porción de cada uno se fijó inmediatamente mediante la inmersión en formalina tamponada neutra al 10% durante 24 horas. 45 Despues, los tejidos se procesaron y se embebieron en parafina usando técnicas histológicas de rutina. Los proventrículos restantes se recogieron en tubos de plástico estériles sobre hielo para la preparación posterior del homogenado como se ha explicado previamente. Se obtuvieron los pesos de órganos relativos usando la fórmula [peso de órgano relativo = (peso de órgano/peso corporal) x 100].

50 **[0414]** *Histopatología.* Las muestras de tejidos embebidas en parafina de la bolsa, el proventrículo, el bazo y el timo de cada ave se seccionaron, se montaron, se tiñeron utilizando hematoxilina y eosina (HE) y se examinaron de forma ciega en cuanto al tratamiento para lesiones utilizando microscopía de luz. A todas las secciones de la bolsa y el proventrículo se les asignó una clasificación de gravedad de la lesión. Una clasificación de la lesión de 1 representa ninguna lesión. Para las secciones bursales, 2 se definió como la variación leve del tamaño folicular, 3 como la variación moderada del tamaño folicular, y 4 como necrosis o atrofia folicular. Para secciones proventriculares, 2 se definió como ectasia luminar glandular leve, 3 como ectasia más infiltrados linfoides en el intersticio glandular, y 4 como necrosis glandular aguda o fibrosis severa con infiltrados linfoides. También se examinaron el bazo y el timo para determinar la presencia de lesiones.

**[0415]** Serología. Las muestras de suero obtenidas los días 14 y 21 de edad se examinaron para determinar el anticuerpo al VEBI, VBI, VEN, VAP y el reovirus usando pruebas ELISA disponibles en el mercado (IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, Maine).

5      **[0416]** RT-PCR en tiempo real. El ARN se extrajo de las bolsas y proventrículos embebidos en parafina y fijados en formalina y se examinaron para determinar el ácido nucleico del VEBI mediante el análisis por RT-PCR en tiempo real (25). Las secciones que hacían un total de cincuenta micrómetros de espesor se cortaron de cada bloque de tejido embebido en parafina y fijado en formalina, se desparafinizaron en HemoDe (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), se lavaron con etanol al 100% y se digirieron con 25 µg/ml de proteinasa K (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante 1 hora a 50 °C. El ARN se extrajo usando Trizol (Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, se diluyeron en 25 µl de sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 90% y se congelaron a -80 °C hasta que se ensayaron. El ARN extraído se desnaturizó a 95 °C durante 5 minutos y se puso sobre hielo. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR) usando reactivos del kit Light Cycler-RNA Amplification SYBR® Green I (ROCHE Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). Los cebadores usados se diseñaron para amplificar un segmento de 400 pb del genoma del VEBI compartido por todas las cepas, que flanquea una región hipervariante del gen VP2. Las secuencias de cebadores fueron B4 5' TCTTGGGTATGTGAGGCTTG (SEQ ID NO: 9) y B4 3' GGATGTGATTGGCTGGTTA (SEQ ID NO: 10). La amplificación y detección de los productos específicos también se realizó usando un Light Cycler (ROCHE Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (ROCHE Light Cycler versión 3.0, ROCHE Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). En resumen, la transcripción inversa se hizo a 55 °C durante 10 minutos seguida de desnaturización a 95 °C durante 30 segundos. Se hicieron cuarenta ciclos de PCR que consistían en desnaturización (95 °C durante 1 segundo), hibridación (55 °C durante 10 s) y extensión (72 °C durante 13 s). Se hizo un análisis de curva de fusión con una desnaturización inicial a 95 °C. La fusión de ADN se realizó con una temperatura inicial de 65 °C durante 10 segundos y un aumento de temperatura gradual de 0,1 °C por segundo hasta alcanzar 95 °C. La temperatura de fusión del amplicón de 400 pb esperado estuvo entre 82 °C y 84 °C. Esta temperatura de fusión estimada se usó para confirmar la identidad de los productos específicos del VEBI obtenidos usando RT-PCR en tiempo real. La confirmación adicional de la amplificación específica se hizo utilizando técnicas electroforéticas en gel de rutina de los productos de PCR sobre agarosa al 2% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) seguido de la tinción con bromuro de etidio.

30     **[0417]** Análisis estadístico. La ganancia de peso del cuerpo, pesos bursales y proventriculares relativos, y las clasificaciones de lesión bursal y proventricular se analizaron usando ANOVA y comparaciones medias para todos los pares usando Turkey-Kramer HSD. El significado se asumió en el nivel 0,05 de probabilidad.

35     **[0418]** RESULTADOS: Grupos de Control. Controles de homogenado proventricular. Los pollos inoculados únicamente con una solución salina y un homogenado proventricular negativo (-PV) no desarrollaron proventriculitis en ninguno de los tres ensayos. No se observaron lesiones macroscópicas cuando se examinaron en la necropsia (figura 13). La ganancia de peso corporal media y el peso del proventrículo relativo para estos dos grupos fue muy similar (Tablas 18 y 19, respectivamente). Las lesiones microscópicas leves que consistían principalmente en ectasia luminal leve de las glándulas proventriculares estuvieron presentes en algunas de estas aves (Tabla 20). Los pollos que se inocularon únicamente con homogenado proventricular positivo (+PV) no tuvieron supresión significante de ganancia de peso en comparación con los grupos de solución salina y -PV en los tres ensayos (Tabla 18). Hubo una tendencia hacia al agrandamiento del proventrículo en pollos que recibieron el homogenado proventricular positivo. Estuvo presente un aumento de las lesiones microscópicas en el proventrículo de pollos que recibieron homogenado proventricular positivo en los ensayos 1 y 2 a los 7 y 14 dpi, y en el ensayo 3 a los 14 dpi (Tabla 4). En la necropsia, los proventrículos de estos pollos estaban agrandados e inflamados, con placas o moteamiento visible sobre la superficie serosal, dilatación del istmo gástrico, y lesiones mucosales (papillas aplanadas, con secreción de líquido blanco) (figura 13). Microscópicamente, a los 7 dpi, estuvo presente la necrosis aguda del epitelio glandular. Los senos de recogida de las glándulas se dilataron y contenían el epitelio descamado. Los núcleos de las células epiteliales glandulares se agrandaron y palidecieron, con cromatina marginada. Los infiltrados linfocíticos estuvieron presentes como hojas en la lámina propia de la mucosa y expandieron el epitelio glandular entre el epitelio de los conductos y las glándulas (figura 14). A los 14 dpi, el epitelio glandular se reemplazó por el epitelio ductal. Los infiltrados de linfocitos y la formación del centro germinal estuvieron presentes en las glándulas y la mucosa (figura 14). En el ensayo 3, los pollos que se inocularon con +PV, mostraron lesiones similares de leves a moderadas en el proventrículo a los 21 dpi, pero ningún aumento significativo de tamaño del proventrículo en comparación con los controles de solución salina o PV. Los centros germinales pequeños estuvieron presentes en las glándulas (figura 14) de pollos dosificados con +PV pero no en los administrados con solución salina o -PV.

60     **[0419]** No se observaron lesiones o diferencias en el peso del órgano relativo de la bolsa entre los pollos que recibieron solución salina, -PV o +PV (Tablas 21 y 22).

**[0420]** Controles de la inmunosupresión. Los pollos de engorde comerciales (grupo 4) en los ensayos 1 y 2, tratados con la cepa del VEBI Variante E y STC respectivamente, no tenían signos de infección del VEBI a los 7 y 14 dpi. Sus bolsas no tenían lesiones microscópicas significativas, ninguna diferencia en el peso del órgano relativo en

comparación con los controles (Tablas 21 y 22), y fueron negativos para VEBI por RT-PCR. La respuesta de CBH y la respuesta humoral a la vacunación de VEN fue similar al grupo de control de solución salina (Tablas 23 y 24), indicando todas que la estimulación con el VEBI en estas aves no produjo infección por el VEBI. Sin embargo, los pollos de engorde SPF en el ensayo 3 expuestos a la cepa del VEBI STC tuvieron signos de depresión a los 7 días 5 después de la inoculación, y sus bolsas eran significativamente más pequeñas que las de los pollos de control de solución salina a los 7, 14 y 21 dpi (Tabla 21). También se observaron lesiones microscópicas severas (Tabla 22) y los sacos dieron positivo para VEBI por RT-PCR. La respuesta inmune humoral a la vacunación de VEN fue significativamente menor que los controles de solución salina (Tabla 24).

10 [0421] Los pollos de control de ciclofosfamida (CP) (Grupo 5) en los tres ensayos tendieron a ser menos que los pollos de los demás grupos, debido a una reducción en su ganancia de peso. Esta reducción fue significativa en los pollos de engorde SPF en el ensayo 3 (Tabla 18). Estos pollos también tuvieron emplumamiento disminuido y se presentaron débiles. Las bolsas de estos pollos fueron significativamente más pequeñas en los tres ensayos (Tabla 21), y se observó la depresión linfocítica marcada y la atrofia de la bolsa (Tabla 22). Se observó una pequeña 15 reducción de la respuesta de CBH en estas aves (Tabla 23), y la respuesta humoral a la vacunación de VEN se redujo significativamente (Tabla 24).

20 [0422] Los pollos de control de ciclosporina (CS) (grupo 6) en los ensayos 1 y 2 parecían normales (similares a los controles de solución salina). Aunque su ganancia de peso se redujo, esta no fue significativamente diferente de la de los controles de solución salina (Tabla 18). La ganancia de peso en los pollos en el ensayo 3 se redujo a los 7 y 21 dpi. Las bolsas de aves tratadas con CS no tenían lesiones y no hubo diferencia del tamaño en comparación 25 con los controles de solución salina (Tablas 21 y 22). Los timos no tuvieron ninguna lesión significativa, pero la capacidad inmune de CM1 se redujo significativamente (Tabla 23). Las respuestas de CBH-1 y CBH-2 disminuyeron ( $p < 0,05$ ) en comparación con el grupo de control de solución salina. La respuesta inmune humoral, medida por la producción de anticuerpos después de la vacunación contra el VEN, no se vio afectada (Tabla 24).

30 [0423] El efecto de los tratamientos inmunosupresivos (VEBI, CP, CS) en el peso relativo del proventrículo o la presencia de lesiones fue muy leve y no significativamente diferente del observado en los controles de solución salina o -PV (Tablas 19 y 20).

35 [0424] Grupos experimentales. *Ganancia de peso corporal.* Los pollos tratados con CP y +PV tenían una reducción significativa en la ganancia de peso corporal en comparación con los grupos de control (solución salina - PV y +PV), incluyendo aquellos administrados solamente con CP, en el ensayo 1 a los 7 y 14 dpi, y el ensayo 2 a los 7 dpi (Tabla 18). La combinación de CS y +PV tuvo un efecto perjudicial en la ganancia del peso en el ensayo 2 a los 14 dpi y el ensayo 3 a los 7 y 21 dpi, pero la diferencia de los pollos a los que se administró solamente CS no fue significativa en ningún caso.

40 [0425] *Pesos relativos de órganos y lesiones.* No se observó una diferencia significante entre los grupos de control y experimentales para el bazo y el timo en cualquiera de los ensayos. (No se muestran los datos). Las excepciones fueron los pollos tratados con CP en los que a los 7 dpi sus timos eran más pequeños que en el resto de los grupos, pero a los 14 dpi, eran iguales que en los controles. En los tres ensayos, las aves tratadas con CP y +PV tenían una disminución significativa del tamaño bursal y desarrollaron altas clasificaciones de lesión, pero no eran diferentes a las de los controles de CP (Tablas 21 y 22). En el ensayo 3, tuvieron lugar lesiones y una 45 disminución significante del tamaño de la bolsa en los pollos que se estimularon con VEBI y se expusieron a +PV, similar a lo observado en los controles del VEBI (Tablas 21 y 22). Estas bolsas también dieron positivo para el VEBI por RT-PCR.

50 [0426] El peso proventricular relativo de pollos que se inmunosuprimieron y se trataron con +PV aumentó a los 7 y 14 dpi en comparación con los pollos de control (solución salina y -PV), pero en la mayoría de los casos no hubo una diferencia significativa en comparación con los controles de +PV. Los pollos en el ensayo 1 y 2 a los 7 dpi tratados con la combinación de CP+PV, tuvieron un incremento significante del peso proventricular relativo con relación a los controles de +PV (Tabla 19). La clasificación de lesiones de los proventrículos de todas las aves inmunosuprimidas tratadas con +PV también fue similar a las observadas en el grupo de control de +PV a los 7 y 14 dpi (Tabla 20), aunque hubo un aumento en la incidencia de la proventriculitis y una diferencia en la apariencia y la gravedad de las 55 lesiones observadas en las aves tratadas con CS. Esto fue más evidente en los pollos de engorde SPF en los que todas las aves tratadas con la combinación de CS y +PV tuvieron proventriculitis moderada severa. Las clasificaciones de CS+PV fueron significativamente mayores que todos los demás tratamientos a los 21 dpi en el ensayo 3. En los tres ensayos, la incidencia y la gravedad de la proventriculitis fue superior a los 14 dpi que a los 7 dpi. En el ensayo 3 a los 60 21 dpi, el peso relativo y la clasificación de las lesiones de los proventrículos de todas las aves que recibieron +PV fue similar a los controles negativos, con la excepción de los pollos tratados con CP+/PV cuya clasificación y peso permanecieron significativamente mayores que en las aves de los demás grupos (Tablas 19 y 20).

[0427] Los pollos tratados con +PV en los tres ensayos, independientemente del tratamiento de inmunosupresión, tuvieron necrosis aguda de las glándulas proventriculares a los 7 dpi con algunos infiltrados de

linfocitos, principalmente en la mucosa. En algunos casos, los infiltrados de linfocito también estuvieron presentes en las glándulas en la forma de láminas. Algunas veces, también estuvieron presentes la hemorragia y la congestión. Las aves tratadas con CS tuvieron más lesiones, con destrucción y coalescencia de las glándulas.

5 [0428] A los 14 dpi, los pollos tratados con VEBI y +PV, o CP y +PV, tuvieron reemplazo metaplásico del epitelio secretor glandular proventricular por el epitelio ductal, e infiltrados linfoideos como se observa en los pollos tratados únicamente con +PV. Los centros germinales linfoideos proventriculares eran más pequeños, o no estaban presentes, en aves tratadas con CP (en los tres ensayos) o VEBI (en el ensayo 3). Los pollos tratados con CS y +PV en los ensayos 1 y 2 todavía tenían necrosis aguda a los 14 dpi, infiltración linfoide reducida, y formación de centro germinal variable, y una mínima metaplasia (Fig. 15).

10 [0429] A los 21 dpi, los pollos de engorde SPF tratados con EBI y +PV, o CP y +PV, tuvieron lesiones de leves a moderadas, con muy poca infiltración de linfocitos. Estos estaban principalmente en forma de centros germinales pequeños. Los pollos tratados con CS y +PV tuvieron lesiones graves que consistían en necrosis aguda del epitelio glandular, coalescencia de glándulas, y centros germinales pequeños y múltiples.

15 [0430] Serología. Los pollos de todos los grupos en el ensayo 1 tuvieron titulaciones ELISA frente al VEBI e VBI a los 14 días de edad (7 dpi), y no tenían titulaciones frente al VEN, reovirus o VAP. Estas titulaciones del VEBI y VBI disminuyeron, pero todavía estuvieron presentes a los 21 días de edad (14 dpi). Los pollos en el ensayo 2 tuvieron titulaciones para el VEBI, VBI y VEN a los 14 días de edad (7 dpi), pero no frente al reovirus. En ambos ensayos, los pollos que recibieron -PV o +PV (con la excepción de las aves tratadas con CP) desarrollaron titulaciones frente al reovirus a los 21 días de edad (14 dpi).

20 [0431] Los pollos de engorde SPF (ensayo 3) a los 14 días de edad (7 dpi) fueron seronegativos para el VEN, VBI, reovirus y VAP. También fueron negativos para el VEBI, con la excepción de los estimulados con el VEBI, que desarrollaron y tenían seroconversión a los 14, 21 y 30 días de edad (7, 14 y 21 dpi). A los 21 y 30 días de edad (14 y 21 dpi), las aves que recibieron +PV, pero no que se trataron con CP, tenían titulaciones frente al VBI, VEN y reovirus. Todas las aves fueron negativas para el VAP en todos los puntos del tiempo.

25 [0432] RT-PCR del VEBI. El VEBI no se detectó en las bolsas o proventrículos embebidos en parafina de cualquiera de las aves en los ensayos 1 ó 2. En el ensayo 3, se detectó el VEBI a los 7, 14 y 21 dpi en la bolsas embebidas en parafina de todas las aves estimuladas con el VEBI. No se detectó en ninguno de los proventrículos de estas aves, o en las bolsas o proventrículos de los pollos de los demás grupos en el ensayo 3.

30 [0433] **ANÁLISIS.** La relación entre el VEBI y la proventriculitis no está clara. Tanto las lesiones macroscópicas como las microscópicas del proventrículo se han producido mediante la estimulación del VEBI en pollos Leghorn (24), y se ha indicado que la vacunación frente al VEBI disminuye la incidencia de la proventriculitis (7, 15). Sin embargo, la proventriculitis no se produjo por la inoculación de pollos de engorde SPF con diferentes cepas del VEBI (25). Los pollos comerciales se exponen al VEBI a una edad temprana, y aunque la mortalidad en las bandadas no protegidas puede ser muy significativa, el principal problema para la industria aviar es la capacidad del VEBI de causar inmunosupresión. A menudo, las aves inmunosuprimidas no logran responder adecuadamente a la vacunación y son susceptibles a infecciones secundarias. Los mecanismos de la inmunosupresión inducida por VEBI no se comprenden completamente. Las respuestas inmunes tanto humorales como celulares, están comprometidas (34). La inhibición de la inmunidad humoral es más grave y se atribuye a la destrucción de los linfocitos B que producen inmunoglobulina por el virus. Los pollos expuestos al VEBI producen niveles subóptimos de anticuerpos contra varios antígenos infecciosos y no infecciosos (34). Aunque los linfocitos T no sirven como dianas para la replicación del VEBI, las respuestas inmunes mediadas por células de pollos expuestos a virus parecen estar comprometidas (5, 18, 33, 34).

35 [0434] La protección frente al VEBI se consigue mediante la inducción de anticuerpos neutralizantes, así como la transferencia pasiva de anticuerpos maternales a pollos jóvenes. Estos anticuerpos maternales pueden interferir con los programas de vacunación del VEBI. En este estudio, los pollos de engorde comerciales (ensayos 1 y 2) inoculados con una dosis infecciosa del VEBI no desarrollaron la enfermedad. No se observaron lesiones en sus bolsas, y el análisis por RT-PCR no detectó ningún virus. En consecuencia, estas aves no estaban inmunosuprimidas por el VEBI como se pretendía, y tenían una respuesta normal a la vacunación del VEN. Por otra parte, los pollos de engorde SPF se infectaron exitosamente con el VEBI cuando se estimularon de forma intencionada a un día de edad. Sus bolsas eran significativamente más pequeñas que los controles, tuvieron lesiones típicas de la infección por el VEBI, y daban positivo para el virus por RT-PCR. También desarrollaron anticuerpos frente al VEBI, y se inmunosuprimieron como se midió por su baja seroconversión al VEN. Sin embargo, la infección con esta cepa particular de VEBI (STC) no produjo proventriculitis.

40 [0435] Se ha usado el tratamiento de CP para inhibir la inmunidad humoral con el fin de determinar su función en la patogénesis de patógenos infecciosos de pollos (1, 31). Los pollos tratados con CP tenían bolsas que eran significativamente más pequeñas y carecían de linfocitos, y no desarrollaron un anticuerpo específico después de la

vacunación para el VEN, lo que demuestra su inmunosupresión humoral. Tanto CP como VEBI tienen efectos menores sobre CMI (32, 34). Hubo una leve depresión de la respuesta de CBH en aves tratadas con VEBI (ensayo 3) o CP, pero esto no fue significante en comparación con los controles.

5 [0436] Como se esperaba, los pollos de los tres ensayos tratados con CS mostraron una respuesta de CBH significativamente disminuida (6). La CS impide la síntesis de citocina en los linfocitos T al bloquear una fase posterior de la señalización iniciada por el receptor linfocitos T, reduciendo la producción de interleucina-2 (IL-2), y por lo tanto, la proliferación de linfocitos T (12, 28). Como consecuencia, se reducen las funciones dependientes de IL-2, que incluyen actividades de T-auxiliares, citotoxicidad, actividad natural de células inactivadas, y citotoxicidad dependiente del anticuerpo (11). Como se esperaba, la respuesta inmune humoral de aves tratadas con CS no se vio afectada, y desarrollaron anticuerpos dirigidos contra el VEN después de la vacunación contra el VEN.

10 [0437] Se sabe que el homogenado usado para inducir la proventriculitis en el ensayo 1 contenía el VEBI (13). En un intento de reproducir una proventriculitis lo más parecida a la observada en casos de origen natural, se 15 utilizaron pollos de engorde comerciales con anticuerpos maternales al VEBI en los ensayos 1 y 2. La inoculación de estos pollos en el ensayo 1 con el homogenado que lleva el VEBI produjo proventriculitis pero no infección del VEBI, puesto que su anticuerpo anti-VEBI era protector. Ya que la proventriculitis todavía no tuvo lugar, esto sugiere que la 20 proventriculitis no se produjo directamente mediante la infección con el VEBI presente en ese homogenado, pero no excluye el VEBI como un factor contribuyente potencial. En los ensayos 2 y 3, la proventriculitis se produjo inoculando aves con homogenado proventricular positivo producido de aves con proventriculitis en el ensayo 1. Excluyendo los estimulados con el VEBI de forma intencionada, los pollos a los que se les dio este homogenado en 25 los ensayos 2 y 3 desarrollaron proventriculitis, pero no infección por el VEBI. Estos datos sugieren que el pase seriado del homogenado proventricular original a través de los pollos de engorde positivos de anticuerpo limpió éste del VEBI y propagó el agente causante responsable de la proventriculitis.

25 [0438] La proventriculitis producida en el ensayo 1 fue más grave que los en los ensayos 2 y 3. Esto puede deberse a la reducción en la titulación del patógeno causante por el pase *in vivo* en presencia de anticuerpo, o la eliminación del VEBI como se ha descrito anteriormente. Aun así, la incidencia de proventriculitis dentro de los 30 grupos y los efectos de la inmunosupresión sobre la proventriculitis fueron similares en los tres ensayos.

[0439] La inmunosupresión inducida por ciclofosfamida (CP) en los tres ensayos, y por el VEBI en el ensayo 3, no afectó a la incidencia o gravedad de las lesiones de la proventriculitis observada. Las lesiones proventriculares observadas en pollos que recibieron CP/+PV fueron similares a las observadas en los controles de +PV. Hubo una necrosis glandular aguda y algún infiltrado de linfocito a los 7 dpi, y metaplasia glandular con infiltrado de linfocitos grave a los 14 dpi. Ambos, láminas y folículos de linfocitos, estuvieron presentes, representando los linfocitos T y B, respectivamente (22, 25), sin embargo, en estas aves se observó menos formación folicular. Tanto los linfocitos T auxiliares como citotóxicos están presentes en los proventrículos normales (22), y su número aumenta notablemente en la proventriculitis (25). Está presente un menor número de linfocitos B en los proventrículos normales, y en la proventriculitis su número también aumenta. Aunque las lesiones observadas en los proventrículos de aves tratadas 40 con CP/+PV fueron similares a las de los controles, a los 7 dpi los pollos de estos grupos en los ensayos 1 y 2, tenían pesos de los proventrículos significativamente mayores que los controles de +PV. Esto sugiere una función de los linfocitos B en las fases tempranas de la proventriculitis, donde la producción comprometida de anticuerpos podría exacerbar la gravedad de la afección.

45 [0440] Todos los pollos con supresión de linfocitos T debido a la ciclosporina (CS) y tratados con +PV tuvieron una incidencia y clasificaciones de lesión de proventriculitis iguales o superiores que los controles de +PV. Los pesos relativos proventriculares también tendían a ser superiores que los controles de +PV, siendo más evidentes en las aves SPF en el ensayo 3, donde esta diferencia fue significativa a los 21 dpi. Se ha sugerido que las 50 respuestas inmunes mediadas por células (CMI) desempeñan una función clave en la eliminación de los patógenos entéricos aviares (1, 20, 36), y estos datos indican que las funciones de los linfocitos T desempeñan una función en el control la proventriculitis. La alta incidencia de lesiones en los proventrículos de aves en el ensayo 3 a los 21 dpi que estaban inmunosuprimidos con CP y tratados con +PV, indica la importancia de los linfocitos T en la aclaración y la resolución de la proventriculitis. Se conoce bien que el VEBI puede afectar a la respuesta de CMI (5, 18, 33, 34), y aunque se observó el poco efecto de la inmunosupresión inducida por el VEBI sobre la gravedad de la proventriculitis en este estudio, es posible que la prevención de la inmunosupresión severa en el campo a través de la vacunación frente al VEBI pueda disminuir la gravedad de la proventriculitis.

55 [0441] Los resultados serológicos presumen que el homogenado proventricular positivo original usado en este estudio contenía VEBI, VBI, VEN y reovirus debido a que algunos pollos experimentales dosificados se 60 seroconvirtieron en estos agentes. El pase de este homogenado en pollos de engorde comerciales parecía tener el VEBI eliminado debido a que los SPF estimulados con el homogenado proventricular posterior no se seroconvirtieron en este virus o desarrollaron una enfermedad bursal. Los objetivos y el diseño experimental del presente estudio no se diseñaron para determinar la función o funciones de estos agentes en la proventriculitis, por lo que no debe extraerse ninguna conclusión de su presencia aquí.

[0442] En conclusión, la inmunosupresión de linfocitos B, por CP o VEBI, no tuvo un efecto sobre la incidencia de la proventriculitis, y las lesiones observadas fueron similares a las producidas por +PV solo. Sin embargo, el agrandamiento proventricular fue más evidente en estas aves a los 7 dpi, indicando que la respuesta humoral puede ser importante en las fases tempranas de la enfermedad controlando probablemente el agente causante mediante la producción de anticuerpos. Por otro lado, la supresión de linfocitos T por CS tuvo un efecto sobre la incidencia de proventriculitis, y las lesiones observadas fueron más graves y duraron más tiempo que los controles de +PV. Los linfocitos T son más abundantes en el proventrículo que los linfocitos B, lo cual sugiere su importancia en las respuestas inmunes a agentes infecciosos en este órgano. En este estudio, al afectar a la función de los linfocitos T, la gravedad de la proventriculitis aumentó, y se prolongó la resolución de la enfermedad.

5 Tabla 17. Protocolo experimental para los ensayos 1 y 2 (pollos de engorde comerciales), y el ensayo 3 (pollos de engorde SPF). Se hizo la necropsia de cuatro aves por grupo el día 14 (7 dpi) y 21 (14 dpi) en los tres ensayos, y  
10 también el día 28 (21 dpi) en el ensayo 3.

GRUPOS	TRATAMIENTO DE INMUNOSUPRESIÓN A UN DÍA DE EDAD <sup>1</sup>	TRATAMIENTO DE HOMOGENADO A LOS SIETE DÍAS DE EDAD <sup>2</sup>
1.Solución salina	-	Solución salina
2.-PV	-	-PV
3.+PV		+PV
4. VEBI	VEBI	-
5. CP	CP	-
6. CS	CS	-
7.VEBI/+PV	VEBI	+PV
8. CP/+PV	CP	+PV
9.CS/+PV	CS	+PV

15

<sup>1</sup>Tratamiento con VEBI:  $10^3$  DIC<sub>50</sub> per os de cepas de Variante E (ensayo 1) o STC (ensayos 2 y 3). Tratamiento con ciclofosfamida (CP): 4 mg por vía intraperitoneal durante 4 días al inicio de un día de edad. Tratamiento con ciclosporina (CS): inyección intramuscular de 50 mg/kg de peso corporal cada tercer día, al inicio de un día de edad.

<sup>2</sup>Solución salina: 1 ml de solución salina estéril per os; -PV = homogenado proventricular de pollos normales, 1 ml per os; +PV = homogenado proventricular de pollos con proventriculitis, 1 ml per os

Tabla 18. Ganancia de peso del cuerpo (g) de pollos de engorde comerciales (ensayos 1 y 2), y pollos de engorde SPF (ensayo 3), estimulados por vía oral a los 7 días de edad con una solución salina estéril, homogenado proventricular negativo (-PV), u homogenado proventricular positivo (+PV), y necropsiados a los 7, 14, y 21 días post-inoculación (media ± desviación típica)<sup>1</sup>.

Grupos	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Día 14 (7 dpi)			
1. Solución salina	360,5 ± 34,3 <sup>a</sup>	403,5 ± 14,5 <sup>a</sup>	146,2 ± 10,2 <sup>a</sup>
2.-PV	392,0 ± 7,16 <sup>a</sup>	411,2 ± 31,8 <sup>a</sup>	160,0 ± 16,7 <sup>a</sup>
3.+PV	349,0 ± 24,9 <sup>a</sup>	356,6 ± 45,0 <sup>ab</sup>	147,5 ± 10,1 <sup>a</sup>
4.VEBI	406,0 ± 42,6 <sup>a</sup>	400,8 ± 26,1 <sup>a</sup>	131,2 ± 13,2 <sup>ab</sup>
5. CP	329,2 ± 95,9 <sup>a</sup>	326,6 ± 50,8 <sup>ab</sup>	76,7 ± 21,6 <sup>c</sup>
6.CS	332,0 ± 83,7 <sup>a</sup>	360,7 ± 54,7 <sup>ab</sup>	128,7 ± 7,5 <sup>ab</sup>
7.VEBI/+PV	340,0 ± 25,9 <sup>a</sup>	361,8 ± 28,4 <sup>ab</sup>	130,7 ± 2,7 <sup>ab</sup>
8.CP/+PV	174,7 ± 40,5 <sup>b</sup>	220,1 ± 43,0 <sup>b</sup>	84,7 ± 8,1 <sup>c</sup>
9.CS/+PV	370,7 ± 29,9 <sup>a</sup>	290,3 ± 76,2 <sup>ab</sup>	114,7 ± 8,13 <sup>b</sup>
Día 21 (14 dpi)			
1. Solución salina	800,2 ± 26,1 <sup>a</sup>	807,7 ± 39,1 <sup>a</sup>	258,7 ± 18,7 <sup>ab</sup>
2.-PV	831,7 ± 67,5 <sup>a</sup>	714,4 ± 52,5 <sup>a</sup>	294,0 ± 19,3 <sup>a</sup>
3.+PV	807,7 ± 45,9 <sup>a</sup>	689,0 ± 24,3 <sup>ab</sup>	285,2 ± 24,2 <sup>a</sup>
4.VEBI	741,2 ± 104,5 <sup>a</sup>	773,4 ± 8,1 <sup>a</sup>	254,2 ± 32,8 <sup>ab</sup>
5. CP	733,2 ± 65,8 <sup>a</sup>	549,0 ± 80,0 <sup>ab</sup>	144,2 ± 39,1 <sup>c</sup>
6.CS	816,2 ± 43,8 <sup>a</sup>	506,2 ± 75,8 <sup>ab</sup>	229,5 ± 256 <sup>ab</sup>
7.VEBI/+PV	729,2 ± 123,9 <sup>a</sup>	712,5 ± 81,9 <sup>ab</sup>	248,5 ± 43,2 <sup>ab</sup>
8.CP/+PV	539,2 ± 77,5 <sup>b</sup>	392,2 ± 148,7 <sup>b</sup>	169,5 ± 36,5 <sup>c</sup>
9.CS/+PV	658,0 ± 72,0 <sup>ab</sup>	528,4 ± 157,6 <sup>ab</sup>	213,5 ± 11,3 <sup>b</sup>
Día 28 (21 dpi)			
1. Solución salina			561,3 ± 73,0 <sup>a</sup>
2.-PV			561,0 ± 109,9 <sup>a</sup>
3.+PV			532,0 ± 97,5 <sup>a</sup>
4.VEBI			518,6 ± 92,6 <sup>ab</sup>
5. CP			316,0 ± 67,2 <sup>b</sup>
6.CS			484,0 ± 68,9 <sup>ab</sup>
7.VEBI/+PV			553,0 ± 92,9 <sup>a</sup>
8.CP/+PV			393,0 ± 95,3 <sup>b</sup>
9.CS/+PV			422,0 ± 74,1 <sup>ab</sup>

Las medias en una columna y el punto de tiempo con diferente superíndice en minúscula son significativamente diferentes ( $P<0,05$ ). Medias calculadas de cuatro aves en cada grupo

Tabla 19. Peso relativo del proventrículo (% de peso corporal) de pollos de engorde comerciales (ensayos 1 y 2), y pollos de engorde SPF (ensayo 3), estimulados por vía oral a los 7 días de edad con una solución salina estéril, homogenado proventricular negativo (-PV), u homogenado proventricular positivo (+PV), y necropsiados a los 7, 14, y 21 días post-inoculación (media ± desviación típica)<sup>1</sup>.

Grupos	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Día 14 (7 dpi)			
1. Solución salina	0,602 ± ,051 <sup>a</sup>	0,582 ± ,047 <sup>a</sup>	0,677 ± ,097 <sup>a</sup>
2.-PV	0,654 ± ,042 <sup>ab</sup>	0,562 ± ,040 <sup>a</sup>	0,707 ± ,058 <sup>ab</sup>
3.+PV	0,932 ± ,023 <sup>ab</sup>	0,812 ± ,250 <sup>a</sup>	0,925 ± ,750 <sup>abc</sup>
4.VEBI	0,550 ± ,045 <sup>a</sup>	0,670 ± ,083 <sup>a</sup>	0,685 ± ,120 <sup>a</sup>
5. CP	0,754 ± ,098 <sup>ab</sup>	0,685 ± ,023 <sup>a</sup>	0,965 ± ,054 <sup>abc</sup>
6.CS	0,670 ± ,080 <sup>ab</sup>	0,696 ± ,064 <sup>a</sup>	0,892 ± ,180 <sup>abc</sup>
7.VEBI/+PV	0,962 ± ,220 <sup>b</sup>	0,770 ± ,153 <sup>a</sup>	1,010 ± ,212 <sup>c</sup>
8.CP/+PV	1,406 ± ,330 <sup>c</sup>	1,002 ± ,208 <sup>b</sup>	0,985 ± ,105 <sup>bc</sup>
9.CS/+PV	0,930 ± ,095 <sup>ab</sup>	0,895 ± ,175 <sup>a</sup>	1,020 ± ,099 <sup>c</sup>
Día 21 (14 dpi)			
1. Solución salina	0,540 ± ,075 <sup>a</sup>	0,473 ± ,030 <sup>a</sup>	0,552 ± ,061 <sup>a</sup>
2.-PV	0,510 ± ,060 <sup>a</sup>	0,610 ± ,140 <sup>a</sup>	0,582 ± ,022 <sup>a</sup>
3.+PV	0,922 ± ,194 <sup>ab</sup>	0,743 ± ,089 <sup>a</sup>	0,745 ± ,140 <sup>abcd</sup>
4.VEBI	0,532 ± ,072 <sup>a</sup>	0,480 ± ,036 <sup>a</sup>	0,650 ± ,083 <sup>abc</sup>
5. CP	0,490 ± ,057 <sup>a</sup>	0,540 ± ,045 <sup>a</sup>	0,852 ± ,140 <sup>bcd</sup>
6.CS	0,535 ± ,050 <sup>a</sup>	0,580 ± ,060 <sup>a</sup>	0,685 ± ,100 <sup>abc</sup>
7.VEBI/+PV	0,900 ± ,204 <sup>ab</sup>	0,723 ± ,130 <sup>a</sup>	0,820 ± ,110 <sup>abcd</sup>
8.CP/+PV	0,950 ± ,154 <sup>ab</sup>	0,706 ± ,210 <sup>a</sup>	1,020 ± ,152 <sup>d</sup>
9.CS/+PV	1,202 ± ,470 <sup>b</sup>	0,886 ± ,370 <sup>a</sup>	0,927 ± ,170 <sup>bcd</sup>
Día 28 (21 dpi)			
1. Solución salina			0,463 ± ,083 <sup>a</sup>
2.-PV			0,436 ± ,073 <sup>a</sup>
3.+PV			0,580 ± ,111 <sup>a</sup>
4.VEBI			0,483 ± ,149 <sup>a</sup>
5. CP			0,676 ± ,005 <sup>a</sup>
6.CS			0,546 ± ,096 <sup>a</sup>
7.VEBI/+PV			0,506 ± ,046 <sup>a</sup>
8.CP/+PV			0,640 ± ,103 <sup>a</sup>
9.CS/+PV			0,970 ± ,261 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Las medias en una columna y el punto de tiempo con diferente superíndice en minúscula son significativamente diferentes ( $P<0,05$ ). Medias calculadas de cuatro aves en cada grupo

Tabla 20. Incidencia y clasificación de la gravedad de lesiones proventriculares en pollos de engorde comerciales (ensayos 1 y 2) y pollos de engorde SPF (ensayo 3), estimulados por vía oral a los 7 días de edad con solución salina estéril, homogenizado proventricular negativo (-PV) u homogenizado proventricular positivo (+PV) y necropsiados a los 7, 14 y 21 días post-inoculación<sup>1</sup>.

Grupos	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3	
Día 14 (7 dpi)						
1. Solución salina	1,00 <sup>a2</sup>	0/4 <sup>3</sup>	1,00 <sup>a</sup>	0/4	1,50 <sup>a</sup>	2/4
2.-PV	1,00 <sup>a</sup>	0/4	1,00 <sup>a</sup>	0/4	1,75 <sup>a</sup>	2/4
3.+PV	3,00 <sup>b</sup>	3/4	2,50 <sup>b</sup>	2/4	2,50 <sup>ab</sup>	3/4
4.VEBI	1,00 <sup>a</sup>	0/4	1,25 <sup>a</sup>	1/4	1,50 <sup>a</sup>	2/4
5. CP	1,25 <sup>a</sup>	1/4	1,25 <sup>a</sup>	1/4	1,00 <sup>a</sup>	0/4
6.CS	2,00 <sup>a</sup>	2/4	1,00 <sup>a</sup>	0/4	1,50 <sup>a</sup>	2/4
7.VEBI/+PV	3,00 <sup>b</sup>	3/4	2,00 ab	2/4	2,50 <sup>ab</sup>	3/4
8.CP/+PV	2,50 <sup>ab</sup>	3/4	2,50 <sup>b</sup>		3/4	1,25 <sup>a</sup>
9.CS/+PV	3,50 <sup>b</sup>	4/4	2,75 <sup>b</sup>	3/4	3,25 <sup>b</sup>	4/4
Día 21 (14 dpi)						
1. Solución salina	1,25 <sup>a</sup>	1/4	1,00 <sup>a</sup>	0/4	1,25 <sup>a</sup>	2/4
2.-PV	1,00 <sup>a</sup>	0/4	1,50 <sup>a</sup>	2/4	1,50 <sup>a</sup>	2/4
3.+PV	3,75 <sup>b</sup>	4/4	3,50 <sup>b</sup>	4/4	3,25 <sup>b</sup>	4/4
4.VEBI	1,50 <sup>a</sup>	2/4	1,25 <sup>a</sup>	1/4	1,00 <sup>a</sup>	0/4
5. CP	1,25 <sup>a</sup>	1/4	1,25 <sup>a</sup>	1/4	1,25 <sup>a</sup>	1/4
6.CS	1,25 <sup>a</sup>	1/4	1,00 <sup>a</sup>	0/4	1,50 <sup>a</sup>	2/4
7.VEBI/+PV	3,25 <sup>b</sup>	4/4	3,50 <sup>b</sup>	4/4	2,50 <sup>ab</sup>	2/4
8.CP/+PV	3,00 <sup>b</sup>	4/4	2,50 <sup>ab</sup>		3/4	2,75 <sup>ab</sup>
9.CS/+PV	4,00 <sup>b</sup>	4/4	4,00 <sup>b</sup>	4/4	3,25 <sup>b</sup>	4/4
Día 28 (21 dpi)						
1. Solución salina					1,25 <sup>a</sup>	1/4
2.-PV					1,50 <sup>a</sup>	2/4
3.+PV					1,50 <sup>a</sup>	2/4
4.VEBI					1,25 <sup>a</sup>	1/4
5. CP					1,25 <sup>a</sup>	1/4
6.CS					1,50 <sup>a</sup>	2/4
7.VEBI/+PV					1,50 <sup>a</sup>	2/4
8.CP/+PV					1,50 <sup>a</sup>	2/4
9.CS/+PV					3,50 <sup>b</sup>	4/4

<sup>1</sup>Las medias en una columna y el punto de tiempo con diferente superíndice en minúscula son significativamente diferentes ( $P<0,05$ ). Medias calculadas de cuatro aves en cada grupo.

<sup>2</sup>Clasificación del proventrículo: 1: sin lesiones; 2: ectasia lumenal glandular leve; 3: ectasia más infiltrados linfoides en el intersticio interglandular; y 4: necrosis glandular aguda o fibrosis severa con infiltrados linfoides.

<sup>3</sup>Número de aves con lesiones leves, moderadas o graves en el proventrículo/número de aves necropsiadas

Tabla 21. Peso relativo de la bolsa (% de peso corporal) de pollos de engorde comerciales (ensayos 1 y 2), y pollos de engorde SPF (ensayo 3), estimulados por vía oral a los 7 días de edad con una solución salina estéril, homogenado proventricular negativo (-PV), u homogenado proventricular positivo (+PV), y necropsiados a los 7, 14, y 21 días post-inoculación (media  $\pm$  desviación típica)<sup>1</sup>.

Grupos	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Día 14 (7 dpi)			
1. Solución salina	0,127 $\pm$ ,075 <sup>a</sup>	0,220 $\pm$ ,034 <sup>a</sup>	0,310 $\pm$ ,045 <sup>a</sup>
2.-PV	0,170 $\pm$ ,027 <sup>a</sup>	0,160 $\pm$ ,039 <sup>a</sup>	0,320 $\pm$ ,029 <sup>a</sup>
3.+PV	0,195 $\pm$ ,020 <sup>a</sup>	0,205 $\pm$ ,035 <sup>a</sup>	0,365 $\pm$ ,090 <sup>a</sup>
4.VEBI	0,160 $\pm$ ,010 <sup>a</sup>	0,165 $\pm$ ,052 <sup>a</sup>	0,065 $\pm$ ,010 <sup>b</sup>
5. CP	0,032 $\pm$ ,009 <sup>b</sup>	0,060 $\pm$ ,008 <sup>b</sup>	0,017 $\pm$ ,015 <sup>b</sup>
6.CS	0,150 $\pm$ ,017 <sup>a</sup>	0,213 $\pm$ ,020 <sup>a</sup>	0,370 $\pm$ ,067 <sup>a</sup>
7.VEBI/+PV	0,200 $\pm$ ,026 <sup>a</sup>	0,152 $\pm$ ,035 <sup>a</sup>	0,172 $\pm$ ,009 <sup>b</sup>
8.CP/+PV	0,055 $\pm$ ,012 <sup>b</sup>	0,060 $\pm$ ,024 <sup>b</sup>	0,085 $\pm$ ,005 <sup>b</sup>
9.CS/+PV	0,202 $\pm$ ,022 <sup>a</sup>	0,182 $\pm$ ,088 <sup>a</sup>	0,325 $\pm$ ,098 <sup>a</sup>
Día 21 (14 dpi)			
1. Solución salina	0,250 $\pm$ ,098 <sup>a</sup>	0,230 $\pm$ ,081 <sup>a</sup>	0,340 $\pm$ ,065 <sup>a</sup>
2.-PV	0,272 $\pm$ ,090 <sup>a</sup>	0,230 $\pm$ ,095 <sup>a</sup>	0,304 $\pm$ ,045 <sup>a</sup>
3.+PV	0,225 $\pm$ ,036 <sup>a</sup>	0,196 $\pm$ ,075 <sup>a</sup>	0,305 $\pm$ ,084 <sup>a</sup>
4.VEBI	0,190 $\pm$ ,060 <sup>a</sup>	0,193 $\pm$ ,068 <sup>a</sup>	0,112 $\pm$ ,009 <sup>b</sup>
5. CP	0,032 $\pm$ ,009 <sup>b</sup>	0,050 $\pm$ ,017 <sup>b</sup>	0,055 $\pm$ ,012 <sup>b</sup>
6.CS	0,232 $\pm$ ,033 <sup>a</sup>	0,153 $\pm$ ,055 <sup>a</sup>	0,387 $\pm$ ,098 <sup>a</sup>
7.VEBI/+PV	0,225 $\pm$ ,042 <sup>a</sup>	0,193 $\pm$ ,064 <sup>a</sup>	0,080 $\pm$ ,049 <sup>b</sup>
8.CP/+PV	0,070 $\pm$ ,018 <sup>b</sup>	0,063 $\pm$ ,020 <sup>b</sup>	0,070 $\pm$ ,040 <sup>b</sup>
9.CS/+PV	0,282 $\pm$ ,052 <sup>a</sup>	0,190 $\pm$ ,066 <sup>a</sup>	0,377 $\pm$ ,054 <sup>a</sup>
Día 28 (21 dpi)			
1. Solución salina			0,233 $\pm$ ,023 <sup>a</sup>
2.-PV			0,243 $\pm$ ,015 <sup>a</sup>
3.+PV			0,316 $\pm$ ,047 <sup>a</sup>
4.VEBI			0,073 $\pm$ ,036 <sup>b</sup>
5. CP			0,066 $\pm$ ,005 <sup>b</sup>
6.CS			0,325 $\pm$ ,051 <sup>a</sup>
7.VEBI/+PV			0,060 $\pm$ ,010 <sup>b</sup>
8.CP/+PV			0,060 $\pm$ ,036 <sup>b</sup>
9.CS/+PV			0,463 $\pm$ ,027 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Las medias en una columna y el punto de tiempo con diferente superíndice en minúscula son significativamente diferentes ( $P<0,05$ ). Medias calculadas de cuatro aves en cada grupo

Tabla 22. Incidencia y clasificación de la gravedad de lesiones bursales en pollos de engorde comerciales (ensayos 1 y 2) y pollos de engorde SPF (ensayo 3), estimulados por vía oral a los 7 días de edad con solución salina estéril, homogenado proventricular negativo (-PV) u homogenado proventricular positivo (+PV) y necropsiados a los 7, 14 y 21 días post-inoculación<sup>1</sup>.

Grupos	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Día 14 (7 dpi)			
1. Solución salina	1,00 <sup>a2</sup> 0/4 <sup>3</sup>	1,50 <sup>a</sup> 2/4	1,25 <sup>a</sup> 1/4
2.-PV	1,00 <sup>a</sup> 0/4	2,00 <sup>a</sup> 4/4	1,25 <sup>a</sup> 1/4
3.+PV	1,75 <sup>a</sup> 2/4	2,25 <sup>a</sup> 4/4	2,50 <sup>b</sup> 4/4
4.VEBI	1,25 <sup>a</sup> 1/4	1,75 <sup>a</sup> 3/4	4,00 <sup>c</sup> 4/4
5. CP	4,00 <sup>b</sup> 4/4	4,00 <sup>b</sup> 4/4	4,00 <sup>c</sup> 4/4
6.CS	1,75 <sup>a</sup> 3/4	1,25 <sup>a</sup> 1/4	1,75 <sup>ab</sup> 3/4
7.VEBI/+PV	1,75 <sup>a</sup> 3/4,	1,25 <sup>a</sup> 1/4	4,00 <sup>c</sup> 4/4
8.CP/+PV	4,00 <sup>b</sup> 4/4	4,00 <sup>b</sup> 4/4	4,00 <sup>c</sup> 4/4
9.CS/+PV	1,50 <sup>a</sup> 2/4	1,50 <sup>a</sup> 3/4	2,00 <sup>ab</sup> 4/4
Día 21 (14 dpi)			
1. Solución salina	1,25 <sup>a</sup> 1/4	1,25 <sup>a</sup> 1/4	1,25 <sup>a</sup> 1/4
2.-PV	1,25 <sup>a</sup> 1/4	1,00 <sup>a</sup> 0/4	1,50 <sup>a</sup> 2/4
3.+PV	1,25 <sup>a</sup> 1/4	1,25 <sup>a</sup> 1/4	1,75 <sup>a</sup> 2/4
4.VEBI	1,00 <sup>a</sup> 0/4	1,25 <sup>a</sup> 1/4	4,00 <sup>b</sup> 4/4
5. CP	4,00 <sup>b</sup> 4/4	4,00 <sup>b</sup> 4/4	4,00 <sup>b</sup> 4/4
6.CS	1,50 <sup>a</sup> 2/4	1,25 <sup>a</sup> 1/4	1,50 <sup>a</sup> 2/4
7.VEBI/+PV	1,00 <sup>a</sup> 0/4	2,00 <sup>a</sup> 4/4	4,00 <sup>b</sup> 4/4
8.CP/+PV	4,00 <sup>b</sup> 4/4	4,00 <sup>b</sup> 4/4	4,00 <sup>b</sup> 4/4
9.CS/+PV	1,75 <sup>a</sup> 2/4	1,00 <sup>a</sup> 0/4	1,00 <sup>a</sup> 0/4
Día 28 (21 dpi)			
1. Solución salina			1,00 <sup>a</sup> 0/4
2.-PV			1,25 <sup>a</sup> 1/4
3.+PV			1,00 <sup>a</sup> 0/4
4.VEBI			4,00 <sup>b</sup> 4/4
5. CP			4,00 <sup>b</sup> 4/4
6.CS			1,00 <sup>a</sup> 0/4
7.VEBI/+PV			4,00 <sup>b</sup> 4/4
8.CP/+PV			4,00 <sup>b</sup> 4/4
9.CS/+PV			1,00 <sup>a</sup> 0/4

<sup>1</sup>Las medias en una columna y el punto de tiempo con diferente superíndice en minúscula son significativamente diferentes ( $P<0,05$ ). Medias calculadas de cuatro aves en cada grupo.

<sup>2</sup>Clasificación de la bolsa: 1: sin lesiones; 2: variación leve del tamaño folicular; 3: variación moderada en el tamaño del folículo; y 4: necrosis o atrofia folicular.

<sup>3</sup>Número de aves con lesiones leves, moderadas o severas en la bolsa/número de aves necropsiadas

Tabla 23. Efecto de los tratamientos de inmunosupresión<sup>1</sup> en la respuesta de hipersensibilidad basófila cutánea (CBH)<sup>2</sup> inducida por inyección de fitohemaglutinina P (PHA-P) y solución salina fisiológica (PSS) en pollos de 2 semanas de edad.

Tratamiento	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3	
	CBH-1	CBH-2	CBH-1	CBH-2	CBH-1	CBH-2
Solución Salina	,74 ± ,14	,87 ± ,10	,72 ± ,21	,74 ± ,18	,58 ± ,18	,54 ± ,17
VEBI	,75 ± ,25	,80 ± ,24	,82 ± ,27	,80 ± ,24	,45 ± ,22	,30 ± ,08
CP	,67 ± ,07	,73 ± ,01	,69 ± ,18	,69 ± ,2	,34 ± ,06	,31 ± ,07
CS	,42 ± ,14*	,49 ± ,15*	,33 ± ,21*	,27 ± ,14*	,19 ± ,03*	,14 ± ,02*

<sup>1</sup>Tratamiento con VEBI: 10<sup>3</sup> DIC<sub>50</sub> per os de cepas de Variante E (ensayo 1) o STC (ensayos 2 y 3). Tratamiento con ciclofosfamida (CP): 4 mg por vía intraperitoneal durante 4 días al inicio de un día de edad. Tratamiento con CS: inyección intramuscular de 50 mg/kg de peso corporal cada tercer día al inicio de un día de edad.

<sup>2</sup>Datos expresados como media ± desviación típica; n = 4.

<sup>3</sup>CBH-1 = (espesor de la piel en 12 h después de la inyección, pata izquierda) - (espesor de la piel antes de la inyección, pata izquierda).

<sup>4</sup>CBH-2 (espesor de la piel, pata inyectada con PHA-P) - (espesor de la piel, pata inyectada con PSS)

\* Significativamente diferente de los grupos de la misma columna (P<0,05).

5 Tabla 24. Respuestas inmunes a la vacuna inactivada de la enfermedad de Newcastle (ND) en pollos inoculados con solución salina estéril, Virus de la Enfermedad de la Bursitis Infecciosa (VEBI), ciclofosfamida (CP) o ciclosporina (CS). 14 días después de la inoculación<sup>1</sup>.

Ensayo 1	Solución salina <sup>2</sup>	VEBI	CP	CS <sup>5</sup>
Titulación de ELISA media	3,966 <sup>a</sup>	3,433 <sup>a</sup>	1,0 <sup>b</sup>	3,034 <sup>a</sup>
Titulación de HI media	200 <sup>a</sup>	160 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	160 <sup>a</sup>
Ensayo 2	Solución salina <sup>2</sup>	VEBI <sup>3</sup>	CP <sup>4</sup>	CS <sup>5</sup>
Titulación de ELISA media	5,277 <sup>a</sup>	5,240 <sup>a</sup>	36,0 <sup>b</sup>	4,801 <sup>a</sup>
Titulación de HI media	200 <sup>a</sup>	200 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	200 <sup>a</sup>
Ensayo 3	Solución salina <sup>2</sup>	VEBI <sup>3</sup>	CP <sup>4</sup>	CS <sup>5</sup>
Titulación de ELISA media	11,784 <sup>a</sup>	4,202 <sup>bc</sup>	1,0 <sup>c</sup>	11,140 <sup>a</sup>
Titulación de HI media	480 <sup>a</sup>	160 <sup>bc</sup>	0 <sup>c</sup>	360 <sup>ab</sup>

<sup>1</sup> Las medias en una fila sin un superíndice en minúscula común son significativamente diferentes (P<0,05). Medias calculadas de cuatro aves.

<sup>2</sup> Solución salina: 1 ml de una solución salina estéril per os.

<sup>3</sup> Tratamiento con VEBI: 10<sup>3</sup> DIC<sub>50</sub> per os de cepas de Variante E (ensayo 1) o STC (ensayos 2 y 3).

<sup>4</sup> Tratamiento con CP: 4 mg por vía intraperitoneal durante 4 días al inicio de un día de edad.

<sup>5</sup> Tratamiento con CS: inyección por vía intramuscular de 50 mg/kg de peso corporal cada tercer día, al inicio de un día de edad

10

#### Referencias:

#### [0443]

- 15 1. Arnold & Holt. Poult Sci.74: 656-665. 1995.  
 2. Barnes y col. Poultry Sci. 80: 906-911. 2001.  
 3. Bayyari y col. Poult Sci. 74: 1961-1969. 1995.  
 4. Bayyari y col. Poult Sci. 74: 1799-1809. 1995.  
 5. Confer y col. Am J Vet Res 42: 2109-2113. 1981.  
 20 6. Corrier & De Loach. Poult Sci. 69: 403-408.1990.  
 7. Dormitorio y col. International Poultry Scientific Forum. 15-16 de enero. Atlanta, Georgia. 2001.  
 8. Giambrone y col. Am J Vet Res 38: 581-583. 1977.  
 9. Goodwin y col. Viral proventriculitis in chickens. Avian Pathol. 25: 369-379. 1996.  
 10. Guy & Barnes. Proceedings of the 139th AVMA Annual Convention. Julio. Nashville. TN. 2002.  
 25 11. Hill y col. Avian Dis. 33: 86-92. 1989.  
 12. Ho y col. Clinical Immunol Immunopathol. 80: S40-45. 1996.

13. Huff y col. Avian Dis. 45: 828-843. 2001.  
 14. Jensen y col. Avian Dis. 35: 969-973. 1991.  
 15. Kelly y col. Proceedings of the 138th AVMA Annual Convention. 14-18 de julio. Boston, MA. 2001.  
 16. Kouwenhoven y col. Avian Pathol. 7: 183-187. 1978.  
 5 17. Kouwenhoven y col. Avian Pathol. 17: 879-892. 1988.  
 18. Lam. Avian Pathol. 20: 867-876. 1991.  
 19. Lenz y col. J Vet Diagn Invest. 10: 145-151. 1998.  
 20. Lillehoj & Bacon. Avian Dis. 35: 294-301. 1991.  
 21. Lukert & Saif. Disease of Poultry, 11th edition. B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L. R. McDougald y Y.M.  
 10 Saif, eds. Iowa State University Press, Ames. IA. Pág. 161-179. 2003.  
 22. Matsumoto & Hashimoto. J Vet Med Sci 62: 161-167. 2000.  
 23. Mutlu y col. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere. 25: 460-462. 1997.  
 24. Newberry. Ph. D. Dissertation. University of Arkansas, Fayetteville, AR. 1996.  
 15 25. Pantin & Brown. Abstracts of the 52nd Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists. Vet  
 Pathol. 38: 579. 2001.  
 26. Pegram & Wyatt. Poultry Sci. 60: 2429-2440. 1981.  
 27. Poole. Proceedings of the 43rd Western Poultry Disease Conference, Sacramento CA. Págs. 40-42. 1994.  
 28. Resch & Szamel. Int J Immunopharmacology. 19: 579-585. 1997.  
 29. Riddell. Avian Dis. 20: 442-445. 1976.  
 20 30. Rodenberg y col. Avian Dis. 38: 16-21. 1994.  
 31. Russell y col. Vet Immunol Immunopathol. 60: 171-185. 1997.  
 32. Sharma & Lee. Infection and Immunity. 227-230. 1977.  
 33. Sharma y col. Avian Dis. 33: 112-124. 1989.  
 34. Sharma y col. Dev Comp Immunology. 24: 223-235. 2000.  
 25 35. Schulze y col. Dtsch Tierarztl Wochenschr 108: 264-266. 2001.  
 36. Songserm y col. Vet Immunol Immunopathol 85: 51-62. 2002.  
 37. Thayer & Beard. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Cuarta edición.  
 Publicada por The American Association of Avian Pathologists. 1998.  
 38. Turpin. Ms. Thesis. UGA. 1998.  
 30 39. Yu y col. Avian Dis. 45: 416-424. 2001.  
 40. Van der Berg. Avian Pathol. 29: 175-194. 2000.  
 41. Wideman y col. J Appl Poult Res 5: 219-230. 1996.

35 PROVENTRICULITIS EN POLLOS DE ENGORDE: CARACTORIZACIÓN DE LA INFILTRACIÓN LINFOCÍTICA EN LAS GLÁNDULAS PROVENTRICULARES (Pantin-Jackwood y col.)

40 [0444] RESUMEN. Los pollos de engorde con proventriculitis transmisible tienen infiltración severa linfocítica en las glándulas proventriculares y la mucosa. La distribución de linfocitos T (CD3+, CD4+ y CD8+) y linfocitos B en el proventrículo del pollo afectado se estudió inmunohistoquímicamente e histopatológicamente. Se cebaron por vía oral pollos comerciales de un día de edad con un homogenado proventricular producido de pollos de engorde con proventriculitis para reproducir esta enfermedad. Las lesiones proventriculares resultantes se estudiaron a los 7, 14 y 21 días post-inoculación (dpi). Los infiltrados linfocíticos en las glándulas proventriculares y la lámina propia de la mucosa se observaron en todos los puntos del tiempo, y fueron más prominentes a los 14 días post-inoculación con agregados linfoides bien desarrollados presentes. Tanto los linfocitos T como los B estuvieron presentes durante la proventriculitis aguda y crónica, pero su distribución varió dentro de las glándulas. Los infiltrados linfocíticos tanto en las glándulas proventriculares como la lámina propia fueron principalmente linfocitos T (CD3+) y fueron predominante linfocitos T CD8+. Los linfocitos T CD4+ y los linfocitos B tendieron a formar agregados conforme a la proventriculitis se volvió crónica. Estos descubrimientos muestran que las respuestas inmunes tanto mediadas por células como humorales se inducen durante la proventriculitis transmisible, y que la respuesta inmune mediada por las células es morfológicamente mayor. Palabras claves: Pollo; Proventriculitis; Linfocitos T y B; Inmunohistoquímica. Abreviaturas: Dpi, días post-inoculación; IEL, linfocitos intraepiteliales; MALT, tejido linfoide asociado a mucosa; -PV, homogenado proventricular negativo; +PV, homogenado proventricular positivo.

55 [0445] Introducción. La proventriculitis es una enfermedad transmisible que ocurre en pollos de engorde comerciales. Se caracteriza por el agrandamiento del proventrículo y la debilidad del istmo gástrico. Durante la evisceración de rutina en el procesamiento, los proventrículos afectados se rompen causando el derrame de la ingesta retenida en la cavidad corporal, lo que da como resultado el decomiso de los canales afectados por la contaminación. La enfermedad también se ha asociado con el crecimiento deteriorado y la deficiente conversión del alimento (10, 12). Microscópicamente, la degeneración y la necrosis del epitelio glandular proventricular está acompañado por la infiltración linfocítica marcada (4, 10, 11, 12).

60 [0446] La etiología de la proventriculitis no está clara. Varios agentes están implicados como causas potenciales de la proventriculitis. Las causas no infecciosas incluyen la exposición oral a aminas biogénicas (3), micotoxinas (24), falta de fibra dietética (25) y sulfato de cobre en exceso (5, 13). Las causas infecciosas incluyen adenovirus

(17), reovirus (16, 29) , virus de la bronquitis infecciosa (33), virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (4, 10, 12, 20) y megabacterias (27). Sin embargo, en la mayoría de los casos no se ha encontrado regularmente ninguno de estos agentes no infecciosos o infecciosos. La microscopía electrónica ha detectado partículas virales en lesiones agudas, pero el aislamiento a partir de un virus de proventrículos afectado no ha tenido éxito (10, 11, 12). La proventriculitis se ha reproducido con éxito mediante inoculación con homogenados proventriculares producidos de pollos enfermos (10, 12). Los filtrados de estos homogenados también produjeron lesiones dentro del proventrículo, sugiriendo que un virus es la causa de la enfermedad (10, 11, 12). Sin embargo, la proventriculitis es más grave cuando las aves se inoculan con el homogenado no filtrado, lo que sugiere que la proventriculitis infecciosa tiene una etiología compleja que involucra agentes tanto virales como bacterianos (12).

**[0447]** El descubrimiento histológico principal en la proventriculitis transmisible es una infiltración linfocítica marcada de las glándulas proventriculares (22). El propósito de este estudio fue caracterizar este infiltrado linfocítico para ganar conocimiento sobre la identidad de estas células y su papel funcional en la generación de una respuesta inmune protectora en el proventrículo. Para realizar esto, se infectaron experimentalmente pollos de engorde comerciales con homogenados proventriculares de pollos afectados y se estudiaron las lesiones proventriculares utilizando la histopatología, la tinción para marcadores de superficie de célula de linfocitos, y la identificación de la distribución de estos diferentes subconjuntos de linfocitos.

**[0448]** MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS. Pollos. Se obtuvieron pollos de engorde no vacunados de un día de edad de un criadero comercial. Todos los pollos se marcaron con una banda en el ala, se pesaron, se separaron en grupos y se mantuvieron en unidades de aislamiento Horsfall de presión positiva. El alimento y el agua se proporcionaron *ad libitum*.

**[0449]** Homogenados Proventriculares. Un homogenado proventricular (+PV) se preparó a partir de los proventrículos de pollos de 2 a 4 semanas de edad con proventriculitis (12). Un segundo homogenado proventricular (-PV) se preparó de manera similar a partir de los proventrículos de pollos de engorde sanos normales sin proventriculitis y se uso como un inóculo de control. Tanto +PV y -PV se preparan como se ha descrito previamente (4), y se congelaron a -70 °C y se descongelaron inmediatamente antes del uso.

**[0450]** Diseño experimental. Los inventores dividieron 24 pollos de engorde comerciales de un día de edad en 2 grupos. El primer grupo se inoculó mediante cebado por vía oral con 1 ml de -PV. El segundo grupo recibió 1 ml del +PV. A los 7, 14 y 21 días post-inoculación (dpi), se pesaron cuatro aves de cada grupo y se sacrificaron mediante dislocación cervical. La bolsa, el proventrículo y el lado derecho del timo se pesaron y las secciones de estos órganos se recogieron de cada ave, y se fijaron inmediatamente mediante inmersión en formalina tamponada neutra al 10% durante 24 horas para su histopatología. Las secciones del proventrículo, la bolsa y el timo también se colocaron en un medio de incrustación Cryo-Gel (Instrumedics, Inc., Hackensack, NJ) e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -70 °C hasta que se realizaron los estudios inmunohistológicos. Después, los tejidos en formalina se procesaron usando técnicas histológicas de rutina y se embebieron en parafina. Además, una parte del proventrículo de cada ave se lavó varias veces en solución salina estéril, se homogeneizó y se congeló a -70 °C.

**[0451]** Histopatología. Los tejidos embebidos en parafina se seccionaron, se montaron, se tiñeron usando hematoxilina y eosina (HE), y se examinaron, a ciegas como para el tratamiento, para determinar las lesiones usando microscopía de luz. A todas las secciones se les asignó una clasificación de gravedad de la lesión. Para todos los tejidos, una clasificación de lesión de 1 representó sin lesiones. Para las secciones bursales, 2 se definió como variación leve en el tamaño del folículo, 3 como variación moderada en el tamaño de folículo, y 4 como necrosis o atrofia del folículo. Para secciones tímicas, 2 se definió como adelgazamiento cortical leve, 3 como adelgazamiento cortical moderado, y 4 como ausencia de linfocitos corticales. Para las secciones proventriculares, 2 se definió como ectasia luminal glandular leve, 3 como ectasia, necrosis del epitelio glandular, más infiltrados de linfoide en el intersticio interglándular, y 4 como necrosis glandular aguda o fibrosis severa con infiltrados linfoideos. El espesor de la pared de las secciones de proventrículos montados sobre los portaobjetos se midió con un calibrador milimétrico en la parte más gruesa.

**[0452]** Anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales para los linfocitos T (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, Alabama) fueron: CT-3 de ratón dirigido contra pollo (anti-CD3), CT-4 (anti-CD-4) y CT-8 (anti-CD8). Se usó el anticuerpo HisCl (Cedi Diagnostics BV, Lelystad, Países Bajos) para los linfocitos B.

**[0453]** Inmunohistoquímica. Las condiciones óptimas para la tinción inmunohistoquímica con cada anticuerpo monoclonal se determinaron usando tejidos de la bolsa y del timo de pollos normales. Todos los monoclonales tuvieron poblaciones celulares en tejidos de control positivo con igual intensidad. Estos tejidos se incluyeron como controles durante la tinción de cada grupo de portaobjetos. Los bloques de tejido congelados se cortaron en un criostato en secciones de 5 µm, y se pusieron en portaobjetos Superfrost Plus (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Se fijaron inmediatamente en acetona durante 10 minutos y se almacenaron a -70 °C hasta que se tiñeron. La inmunotinción se realizó usando un kit de peroxidasa sin biotina (DAKO Envision System, DAKO, Carpinteria, CA) de

acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En resumen, las secciones sobre portaobjetos se colocaron en una cámara húmeda y se lavaron durante 5 min en solución salina tamponada con fosfato 0,1 M (PBS) seguido de incubación durante 5 min en reactivo de boqueo de peroxidasa (DAKO Envision System). Después, las secciones se lavaron en PBS durante 5 minutos y se incubaron con anticuerpos monoclonales a 4 °C durante la noche (se usaron CD-3, CD-4 y CD-8 en una dilución de 1:100; His-Cl en una dilución de 1:50). Después de la incubación del anticuerpo primario, las secciones se lavaron en PBS durante 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario (polímero marcado con peroxidasa conjugado con inmunoglobulinas anti-ratón de cabra, DAKO Envision System) a temperatura ambiente durante 45 minutos. Después del lavado en PBS durante 5 min, el anticuerpo unido se detectó mediante una incubación de 5-10 min con sustrato de 3,3'-diaminobencidina-cromógeno (DAB, DAKO Envision System). Después de la tinción con IHQ, las secciones se contratiñeron con hematoxilina, se secaron al aire, se taparon y se examinaron utilizando microscopía de luz.

**[0454]** Análisis estadístico. Los pesos de órganos relativos y clasificaciones de lesiones se analizaron utilizando ANOVA y comparaciones medias para todos los pares utilizando Tukey-Kramer HSD. El significado se ajustó en un nivel de 0,05 de probabilidad.

**[0455]** RESULTADOS. Signos clínicos y lesiones macroscópicas. No se observaron signos clínicos en ninguno de los pollos en los grupos de control experimentales. Se observaron lesiones macroscópicas en todos los proventrículos de pollos inoculados con +PV. A los 7 y 14 días post-inoculación (dpi), los proventrículos se agrandaron con una apariencia moteada y un istmo gástrico distendido. A los 21 dpi, el agrandamiento todavía estaba presente pero fue menos grave. No se observó ningún agrandamiento del proventrículo en los pollos a los que se les dio -PV. La pared proventricular de los pollos inoculados con +PV se engrosó, con un patrón regular blanco observado cuando se seccionó. No se observaron lesiones macroscópicas en ningún órgano de las aves infectadas experimentalmente.

**[0456]** Ganancia de peso corporal. A los 7 y 14 dpi, los pollos inoculados con homogenado positivo no tuvieron supresión significante de ganancia del peso en comparación con los pollos de igual edad a los que se les dio -PV. A los 21 dpi, hubo una disminución en la ganancia de peso corporal en aves que recibieron +PV (Tabla 25).

**[0457]** Pesos de los órganos. Los pollos que recibieron +PV tuvieron una relación de órgano proventricular/peso aumentada a los 7 y 14 dpi, que fue estadísticamente significativa cuando se comparó con pollos que recibieron -PV (Tabla 25). No hubo diferencia en la relación de órgano de la bolsa y el timo/peso entre las aves inoculadas con +PV y las que se les dio -PV (no se muestran los datos).

**[0458]** Lesiones macroscópicas. La clasificación de lesiones proventriculares fue significativamente más alta en aves que recibieron +PV en comparación con las que recibieron -PV. No había presentes lesiones en las glándulas proventriculares de las aves tratadas con -PV a los 7 dpi. A los 14 y 21 dpi, 2 de las 4 aves de este grupo tuvieron ectasia lumenar leve del lumen glandular. Se observaron linfocitos en todos los puntos de tiempo, y lámina propia de la mucosa, especialmente en áreas que rodean los orificios de los conductos excretores de las glándulas proventriculares profundas (figura 16-A). A los 21 dpi, estos linfocitos formaron agregados pequeños en las glándulas proventriculares (figura 16-B).

**[0459]** Los proventrículos de pollos estimulados con +PV presentaron necrosis del epitelio glandular a los 7 dpi (figura 16-C). Los senos de recogida de las glándulas se dilataron y contenían el epitelio descamado y restos celulares. Los núcleos del epitelio glandular se agrandaron y palidecieron, con cromatina marginada. A los 7 y 14 dpi, los infiltrados linfocíticos estuvieron presentes gran número en la lámina propia de la mucosa y también en las glándulas afectadas que expanden el intersticio glandular (figura 16-C y 16-D). A los 14 y 21 dpi, el epitelio glandular en algunas de las glándulas se reemplazó por el epitelio ductal (figura 16-E). A los 21 dpi, hubo menos necrosis del epitelio glandular, pero hubo regeneración o metaplasia al epitelio ductal. En ese momento, los linfocitos todavía estaban presentes, formando principalmente agregados o centros germinales (figura 16-F).

**[0460]** Espesor de la pared proventricular. Hubo una diferencia significante en el espesor de la pared proventricular entre los pollos inoculados con -PV y los inoculados con +PV en todos los puntos del tiempo (Tabla 25).

**[0461]** Localización de linfocitos CD3+, CD4+, CD8+ y B. Tanto los linfocitos T como B estaban presentes en la lámina propia de la mucosa proventricular de pollos tratados con -PV. La mayoría de los linfocitos en las glándulas proventriculares eran linfocitos T, y se localizaron en el intersticio entre las glándulas, e intraepitelialmente como linfocitos individuales (figura 16-B). Había presentes agregados linfoides pequeños en las glándulas a los 14 y 21 dpi, y se componían principalmente por linfocitos B.

**[0462]** En pollos que recibieron +PV, los linfocitos T predominaron en todos los puntos de tiempo, y se dispersaron dentro de la lámina propia de la mucosa y en áreas más profundas de las glándulas proventriculares. Los linfocitos B también estuvieron presentes, pero su distribución varió dependiendo de la fase de la proventriculitis.

Inicialmente, los linfocitos B se localizaron similares a los linfocitos T, pero en menor número (figura 17-C). Según progresó la proventriculitis, los linfocitos B formaron agregados (centros germinales) en porciones más profundas de las glándulas proventriculares y menos frecuentemente en la lámina propia de la mucosa (figura 17-E y 17-G). Los linfocitos T circundaron estos centros germinales e infiltraron las glándulas proventriculares y la mucosa (figuras 17-D, 17-F y 17-H).

**[0463]** Los dos subconjuntos de linfocitos T estudiados (CD4+ y CD8+) se distribuyeron de forma diferente en los proventrículos afectados (figura 19 A a H). Ambos subconjuntos se encontraron en todos los puntos del tiempo en grandes cantidades en la lámina propia de la mucosa, pero los CD4+ predominaron a los 7 dpi. A los 14 y 21 dpi, 5 se encontraron células positivas CD4+ rodeando principalmente los centros germinales de linfocitos B y formando agregados que mediante la tinción de HE eran centros germinales. Además, las células CD4+ infiltraron estos 10 centros germinales de linfocitos B. Los linfocitos CD8+ se distribuyeron más ampliamente, rodeaban los centros germinales, y también infiltraron las glándulas proventriculares en los espacios intraepiteliales. En glándulas con 15 necrosis agudas del epitelio, los linfocitos CD8+ fueron las células predominantes que infiltraban la glándula. En las lesiones crónicas, este subconjunto se observó aún en un gran número a lo largo de toda la glándula, mientras que los linfocitos CD4+ y B formaron agregados localizados en porciones más profundas de las glándulas proventriculares (figura 19-A y 19-B).

**[0464]** ANÁLISIS. En el presente estudio, se investigaron los cambios de subpoblación de los linfocitos durante 20 la proventriculitis. La proventriculitis se reprodujo con éxito mediante la inoculación con un homogenado proventricular obtenido del proventrículo recogido de pollos de engorde afectados con proventriculitis (+PV). Los cambios microscópicos en estos proventrículos incluyeron la necrosis del epitelio glandular y el reemplazo de este epitelio por el epitelio ductal. Esta pérdida de tejido glandular e hiperplasia ductal puede dar como resultado la 25 pérdida de la función del proventrículo (10). Esto explicaría la deficiente conversión del alimento y las tasas de crecimiento reducidas observadas en pollos afectados de forma natural con proventriculitis, y la reducción del peso corporal observada en los pollos de este experimento a los 21 días post-inoculación.

**[0465]** Se observó infiltración linfocítica severa en todos los pollos infectados experimentalmente. La distribución 30 de estos linfocitos en el proventrículo varió. En las fases agudas o tempranas, estaban presentes linfocitos como hojas en gran número en la lámina propia de la mucosa e infiltrando las glándulas afectadas. En las fases posteriores, los linfocitos formaron agregados tanto en la lámina propia de la mucosa como en la profundidad en las 35 glándulas proventriculares. Estos cambios crónicos estaban acompañados por menos necrosis e hiperplasia ductal. La tinción de estos linfocitos mostró que tanto los linfocitos B como T aumentaron en número la proventriculitis, pero ocuparon diferentes localizaciones histológicas dentro del proventrículo dependiendo de la fase de la enfermedad.

**[0466]** Los linfocitos están presentes en la mucosa de órganos de pollo normales, como el tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT). Este complejo aparato inmune se ha desarrollado en los pollos en respuesta a antígenos que entran en el cuerpo a través del revestimiento de superficies de mucosas de los tracto respiratorio, digestivo y genitourinario, y proporciona la primera línea de defensa contra estos antígenos (2). Matsumoto y Hashimoto (19) describieron la distribución normal y los cambios en el desarrollo de los tejidos linfoideos en el proventrículo de pollo. Observaron el desarrollo de masas linfoideas en la lámina propia proventricular por debajo del epitelio superficial y cerca del orificio del ducto, lo cual sugirió que el mecanismo inmune de la mucosa local se desarrolla principalmente con una participación dominante de linfocitos T en el período de post-eclosión temprana. El desarrollo de linfocitos B tiene lugar después de la invasión de los antígenos asociados con la ingesta alimento, 40 debido a la información inmunológica de los linfocitos T prenecesarios. En este estudio, la respuesta a un agente infeccioso no definido presente en el homogenado proventricular positivo indujo la proliferación del tejido linfoide presente en el proventrículo. Esta respuesta inmune era similar a la observada en la mucosa de otros órganos en respuesta a diferentes patógenos (2, 6, 8, 11, 18, 21, 26, 28, 31, 32). Pueden observarse linfocitos intrapiteliales (IEL) en la glándula proventricular profunda, y Matsumoto y Hashimoto (19) los identificaron como linfocitos T  $\gamma\delta$ , 45 similares a los que se encuentran en el intestino del pollo. Estos autores no pudieron demostrar la presencia de células M en el proventrículo, lo que sugiere que hay rutas alternativas para la captación de antígenos intraluminales.

**[0467]** La causa de proventriculitis no se conoce pero parece más probable que un virus sea el agente primario 50 involucrado (11, 12). Las respuestas inmunes mediadas por linfocitos T a patógenos virales se establecen, y tienen lugar por varios mecanismos diferentes, incluyendo inducción de la actividad citotóxica, reconocimiento de antígenos diana junto con el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC), y la producción de linfocinas, tales como interferón- $\gamma$ , interleucina-2 y factores de necrosis tumoral  $\beta$ . Las células que median estas diferentes actividades pueden identificarse por antígenos de superficie celular, CD4+ para linfocitos T auxiliares, CD8+ para linfocitos T citotóxicos y supresores, y CD3+ como un antígeno de linfocitos T común (30). La mayor parte de la actividad de los linfocitos T citotóxicos específicos del virus (CTL) identificada es MHC de clase I restringido y mediado por los linfocitos T CD8+. 55 El subconjunto CD4+ tiene una función importante en las infecciones víricas ya que proporciona el linfocito T auxiliar necesario para promover la expansión clonal y la diferenciación de los linfocitos B específicos de virus (1). La activación de los linfocitos B y su diferenciación en células plasmáticas que secretan anticuerpos se activa por

antígeno y normalmente requiere linfocitos T auxiliares. En este estudio, los linfocitos T CD4+ eran el subconjunto de linfocitos más abundante encontrado en la lámina propia de la mucosa en las etapas tempranas de la proventriculitis. Estos linfocitos se encontraron posteriormente rodeando lo que parecían ser centros germinales de linfocitos B.

5 [0468] Las linfocitos T CD8+ encontrados en las glándulas proventriculares afectadas, formaron hojas que infiltran el epitelio glandular. El influjo de linfocitos T CD8+ sugiere una actividad citotóxica asociada con la eliminación de patógenos. Se ha demostrado que la respuesta de CTL CD8+ es crítica para el control de infecciones víricas primarias, persistentes y reactivadas (7). La acción antiviral de CTL está mediada por la lisis directa de células infectadas (por ejemplo, mediante la liberación perforina/granzima), la inducción de apoptosis (por ejemplo 10 mediante la interacción de ligandos Fas/Fas), y la producción de citocinas antivirales (7). Kotani y col., estudiaron los subconjuntos linfocíticos en la tráquea de pollos inoculados con el virus de la bronquitis infecciosa (VBI) y que concluyeron que el sistema inmune del pollo puede utilizar CTL específico para eliminar el VBI en la etapa temprana de la infección, y en la etapa posterior puede depender de la inmunidad humorla para controlar la infección viral. En un estudio temprano, se descubrió que la inmunosupresión celular aumentó la gravedad y la duración de la 15 proventriculitis, subrayando la importancia de los linfocitos T en la respuesta inmune contra la proventriculitis (23).

20 [0469] Songserm y col., (28) también observaron un aumento de linfocitos CD8+ en el intestino de pollos inoculados con el homogenado del síndrome de malaabsorción. Encontraron que un aumento en la actividad citotóxica estaba relacionado con las lesiones intestinales y la depresión de ganancia de peso. En este estudio, el influjo de linfocitos CD8+ en el proventrículo pareció ocurrir después del inicio de la necrosis del epitelio glandular. Sin embargo, el aumento de linfocitos en las glándulas exacerbó las lesiones presentes en el proventrículo aumentando la pérdida del epitelio glandular. Las lesiones en las glándulas proventriculares no ocurrieron simultáneamente. La necrosis y el influjo de linfocitos T pareció comenzar en el área que rodea las papilas mucosas y expandirse a las glándulas que se drenaban a través de estas papilas. Microscópicamente, algunas 25 glándulas presentan lesiones y otras parecen normales, y dependiendo de la gravedad de la proventriculitis, habrá afectadas más glándulas.

30 [0470] Además de los linfocitos CD4+ y CD8+, las células inactivadas naturales (NK) pueden desempeñar un función en la defensa frente a los patógenos del intestino. Las células NK se definen fenotípicamente como que carecen de CD8+ (CD3+) o marcadores específicos del linaje B. Gobel y col., (9) demostraron mediante estos criterios que aproximadamente el 30% de los linfocitos intraepiteliales intestinales (IEL) CD8+ eran células NK. No se conoce la función fisiológica de las células NK intestinales, pero podría constituir la primera línea de defensa una vez que las células epiteliales se infectan, sirviendo para diferentes funciones como linfocitos T (9). En este estudio, 35 debido a que no se disponía de un marcador para células NK, este subconjunto específico no se analizó y no se pudieron sacar conclusiones sobre la función de las células NK en la proventriculitis. La mayoría de los linfocitos observados en los proventrículos afectados que se tiñeron con el marcador de linfocitos T citotóxicas (CD8+) también se tiñeron con el marcador de todos los linfocitos T (CD3+) con un bajo porcentaje sin tinción para el marcador CD3+. La presencia de células NK en el proventrículo, y su función en la proventriculitis ha de investigarse adicionalmente.

40 [0471] En conclusión, el influjo de linfocitos CD4+ durante la proventriculitis sugiere que estas células están implicadas en la inducción de la respuesta inmune, mientras que los linfocitos CD8+ actúan más probablemente como células efectoras. El influjo de linfocitos B y la formación de centros germinales altamente organizados, indica que los mecanismos mediados por anticuerpos también están involucrados en el control de la proventriculitis en pollos. La formación del centro germinal ocurrió en las etapas posteriores de la enfermedad cuando las lesiones en el proventrículo fueron menos graves. En este estudio, la tinción de las inmunoglobulinas de linfocitos B (IgG, IgM e IgA) no se realizó. La IgM e IgA en las secreciones intestinales impiden el influjo de antígenos ambientales en los compartimientos corporales internos, la neutralización de virus y toxinas microbianas, y la prevención de la adherencia y la colonización de superficies de la mucosa por patógenos (18). La función de estas inmunoglobulinas 45 no está clara para algunas infecciones aviares y debe hacerse un estudio adicional de su importancia en la proventriculitis.

5 Tabla. 25. Ganancia de peso corporal (g), peso del proventrículo relativo (% de peso corporal), puntuación de lesiones del proventrículo e incidencia de la proventriculitis, y espesor de la pared del proventrículo (mm) de pollos de engorde comerciales por vía oral estimulados a un día de edad con un homogenizado proventricular negativo (-PV), o un homogenizado proventricular positivo (+PV), y necropsiados a los 7, 14 y 21 días post-estimulación (media ± desviación típica)<sup>1</sup>.

Días después de la inoculación	Tratamiento	Ganancia de peso corporal	Peso PV relativo	Clasificación de la lesión e incidencia	Espesor de la pared PV
7	-PV	153,7 ± 29,6 <sup>a</sup>	0,85 ± ,11 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> 0/4	3,62 <sup>a</sup>
	+PV	144,0 ± 10,6 <sup>a</sup>	1,26 ± ,22 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup> 3/4	4,62 <sup>b</sup>
14	-PV	370,0 ± 44,2 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,5 <sup>a</sup> 2/4	4,25 <sup>a</sup>
	+PV	331,0 ± 62,8 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,09 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup> 4/4	5,10 <sup>b</sup>
21	-PV	882,0 ± 35,7 <sup>a</sup>	0,54 ± ,005 <sup>a</sup>	1,5 <sup>a</sup> 2/4	5,00 <sup>a</sup>
	+PV	749,0 ± 20,8 <sup>b</sup>	0,78 ± 0,15 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup> 4/4	7,75 <sup>b</sup>

1 Las medias en una columna y el punto de tiempo con diferente superíndice en minúscula son significativamente diferentes ( $P<0,05$ ). Medias calculadas de cuatro aves en cada grupo.

#### Referencias:

10 [0472]

1. Ahmed y col. J Virol. 62: 2101-2106. 1988.
2. Bar-Shira y col. Dev Comp Immunol. 27: 147-157. 2003
3. Barnes y col. Poult Sci 80: 906-911. 2001.
4. Bayyari y col. Poult Sci, 74: 1799-1809. 1995.
5. Bayyari y col. Poult Sci 74: 1961-1969. 1996.
6. Collisson y col. Dev Comp Immunol 24: 187-200. 2000.
7. Farrel y col. Cell Dev Biol. 9: 369-378. 1998.
8. Gaunson y col. Microbiology, 146: 1223-1229. 2002.
9. Gobel y col. Int Immunology 13: 757-762. 2001.
10. Goodwin y col. Avian Pathol. 25: 369-379. 1996.
11. Guy & Barnes. Proceedings of the 139th AVMA annual Convention. 13-17 de julio. Nashville, Tennessee. 2002.
12. Huff y col. Avian Dis. 45: 828-843, 2001.
13. Jensen y col. Avian Dis. 35: 969-973. 1991.
14. Kelly y col. Proceedings of the 1381h AVMA Annual Convention. 14-18 de julio. Boston, MA. 2001.
15. Kotani y col. J Vet Med Sci 62: 397-401. 2000.
16. Kouwenhoven y col. Avian Pathol. 7: 183-187. 1978.
17. Lenz y col. J Vet Diagn Invest 10: 145-151. 1998.
18. Lillejoh & Trout. 1996. Clin Microbiol Rev 9, 349-360.
19. Matsumoto & Hashimoto. J Vet Med Sci 62: 161-167. 2000.
20. Newberry. Ph. D. Dissertation. University of Arkansas, Fayetteville, AR. 1996.
21. Ohshima & Hiramatsu. Histol Histopathol 15: 713-720. 2000.
22. Pantin-Jackwood & Brown. Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists. Nueva Orleans, LA. 8-11 de diciembre, 2002.
23. Pantin-Jackwood & Brown. Proceedings of the 139th AVMA annual Convention. July 13-17. Nashville, Tennessee. 2002.
24. Pegram & Wyatt. Poultry Sci. 60: 2429-2440. 1981.
25. Riddell. Avian Dis. 20: 442-445. 1976.
26. Rothwell y col. Parasite Immunol. 17: 525-533. 1995
27. Schulze & Heidrich. Dtsch Tierarztl Wochenschr 108: 264-266. 2001.
28. Songserm y col. Vet Immunol Immunopathol. 85: 51-62. 2002.
29. Turpin. Thesis. University of Georgia. 1998.

30. Vainio & Lassila. Crit Rev Poult Biol 2: 97-102. 1989.  
 31. Vervelde y col. Parasite Immunol. 18: 247-256. 1996.  
 32. Withanage y col. Vet Immunol Immunopathol. 66: 173-184. 1998.  
 33. Yu y col. Avian Dis. 45: 416-424. 2001.

5 [0473] **ANÁLISIS Y CONCLUSIONES.** Los pollos de engorde SPF infectados experimentalmente con diferentes cepas del VEBI no desarrollaron proventriculitis, y los pollos con casos de proventriculitis de origen natural no tuvieron el VEBI en sus proventrículos. Aunque las cepas seleccionadas para este estudio pertenecen a cinco de los seis grupos moleculares utilizados para clasificar cepas del VEBI, es posible que las otras cepas no ensayadas 10 puedan producir proventriculitis directamente, o que la proventriculitis se deba a una causa indeterminada y pueda exacerbarse por la inmunosupresión producida por la infección de VEBI.

15 [0474] La proventriculitis se estudió reproduciendo experimentalmente la enfermedad en pollos de engorde. Pollos comerciales SPF de un día de edad se cebaron por vía oral con un homogenado proventricular producido a partir de los proventrículos de pollos de engorde con proventriculitis. Tanto los pollos comerciales como SPF presentaron agrandamiento del proventrículo con necrosis del epitelio glandular e infiltrados linfocíticos en la 20 glándula proventricular. Los pollos de engorde SPF expuestos a los homogenados proventriculares desarrollaron una Enfermedad Bursal Infecciosa, y el virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (VEBI) se detectó mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR) y la inmunohistoquímica (IHQ) en tejidos bursales y proventriculares. Ellos también fueron positivos mediante RT-PCR al virus de la bronquitis infecciosa 25 (VBI) y desarrollaron nefritis. Los pollos de engorde comerciales desarrollaron una leve nefritis pero no enfermedad bursal, y fueron negativos para el VEBI e VBI por RT-PCR. Tanto los pollos comerciales como SPF, dieron negativos para reovirus y el virus de enfermedad Newcastle (VEN), y positivos para el virus de la anemia del pollo (VAP) y adenovirus mediante técnicas moleculares. Las bacterias no se identificaron en secciones histológicas ni se aislaron 30 de proventrículos afectados. Los filtrados de los homogenados proventriculares pasados en embriones para el aislamiento del virus causaron atrofia pero la identificación de causa mediante microscopía electrónica fue infructuosa. Sin embargo, el líquido alantoides de los huevos fue positivo para VBI mediante RT-PCR. La EM de seccionamiento delgado en proventrículos de aves afectadas no logró identificar un agente causante. En conclusión, los homogenados proventriculares originales tenían VEBI, VBI, adenovirus y VAP, pero la función de cada uno en la producción de proventriculitis no se demostró.

35 [0475] La inmunosupresión de linfocitos B, mediante CP o VEBI, no tuvo un efecto en la incidencia de la proventriculitis, y las lesiones observadas fueron similares a las producidas por el homogenado proventricular positivo (+PV) solo. Sin embargo, el agrandamiento proventricular fue más evidente en aves inmunosuprimidas con estos agentes a los 7 dpi, lo que indicaba que una respuesta humoral podría desempeñar una función en las etapas tempranas de la enfermedad probablemente controlando el agente causante mediante la producción de anticuerpos. Por otra parte, la supresión de linfocitos T mediante CS tuvo un efecto en la incidencia de la proventriculitis, y las 40 lesiones observadas eran más graves y duraron más tiempo que los controles de +PV. Los linfocitos T son más abundantes en el proventrículo que los linfocitos B, subrayando su importancia en las respuestas inmunes para los agentes infecciosos en este órgano. En este estudio, al afectar a la función de los linfocitos T, la gravedad de proventriculitis aumentó y la resolución de la enfermedad se prolongó.

45 [0476] Los infiltrados linfocíticos presentes durante la proventriculitis, tanto en la glándula proventricular como en la lámina propia, eran principalmente linfocitos T. El influjo de linfocitos CD4+ sugiere que estas células están involucradas en la inducción de la respuesta inmune, mientras que los linfocitos CD8+ actúan más probablemente como células efectoras. El influjo de linfocitos B y la formación de centros germinales altamente organizados, indica que los mecanismos mediados por anticuerpos también están involucrados en el control de proventriculitis en pollos.

50 [0477] En conclusión, la proventriculitis puede reproducirse mediante la inoculación oral de pollos con homogenados producidos a partir de proventrículos de aves con proventriculitis. El agente o los agentes causantes no se identificaron, aunque lo más probable es que sea un virus. La gravedad de la proventriculitis y su efecto en la ganancia del peso se ve afectada probablemente por otros factores, tales como la infección concomitante con más de un agente, viral o bacteriano, y factores nutricionales. La proventriculitis se reprodujo en ausencia del VEBI, y el VEBI no causó proventriculitis cuando los pollos susceptibles se inocularon con el virus. El VEBI afecta a la 55 inmunidad, tanto humoral como celular en el pollo, por lo que, aunque en condiciones experimentales no tuvo un efecto mayor en la proventriculitis, esto puede explicar por qué el control del VEBI en condiciones comerciales reduce la incidencia de la proventriculitis.

60 [0478] La descripción se describe adicionalmente por los siguientes párrafos numerados:

1. Un procedimiento para caracterizar una cepa del VEBI que comprende: generar y secuenciar un ADNc de VEBI de una muestra que se sospecha que tiene una cepa del VEBI, alinear el VEBI secuenciado con una o más secuencias del VEBI, y comparar la relación de las secuencias de VEBI alineadas, caracterizando así una cepa del VEBI.

2. El procedimiento del párrafo 1, en el que la muestra es una muestra de tejido embebida en parafina.
- 5 3. El procedimiento del párrafo 1 ó 2, en el que la generación de ADNc del VEBI comprende extraer ARN de la muestra y la amplificación por RT-PCR del ADNc del VEBI con cebadores específicos del VEBI.
4. El procedimiento del párrafo 3, en el que los cebadores específicos del VEBI amplifican una porción hipervariable del VEBI.
- 10 5. El procedimiento del párrafo 4, en el que la porción hipervariable del VEBI es VP1, VP3, VP4 o VP5.
6. El procedimiento del párrafo 4, en el que la porción hipervariable de VEBI es VP2.
- 15 7. El procedimiento de los párrafos 1 a 6, en el que la comparación es con un dendritograma.
8. El procedimiento de los párrafos 1 a 7, en el que la una o más secuencias de VEBI son secuencias de ácido nucleico.
- 20 9. El procedimiento de los párrafos 1 a 7, en el que se deduce una secuencia aminoacídica del ADNc del VEBI y la una o más secuencias de VEBI son secuencias aminoacídicas.
- 25 10. El procedimiento de los párrafos 1 a 9, que comprende adicionalmente identificar una cepa novedosa del VEBI en el que la secuencia del VEBI no se alinea a ninguna de la una o más secuencias del VEBI con aproximadamente el 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,8%, mucho más ventajosamente de aproximadamente el 91,3% a aproximadamente el 99,6% de homología.
11. El procedimiento del párrafo 10, que comprende adicionalmente aislar la cepa novedosa del VEBI.
- 30 12. El procedimiento de los párrafos 1 a 9, que comprende adicionalmente seleccionar una vacuna para proteger un ave contra la cepa del VEBI, en el que la vacuna tiene una secuencia de VEBI más estrechamente igualada con aproximadamente el 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,8%, mucho más ventajosamente aproximadamente el 99,3% a aproximadamente el 99,6% de homología al ADNc del VEBI.
- 35 13. El procedimiento del párrafo 12, en el que una secuencia aminoacídica se deduce del ADNc del VEBI, y la una o más secuencias de VEBI son secuencias aminoacídicas.
14. El procedimiento del párrafo 12, en el ave se selecciona entre el grupo que consiste en un pollo, pato, ganso, faisán, codorniz y pavo.
- 40 15. Un procedimiento para identificar una vacuna para una cepa del VEBI que comprende: (a) generar un ADNc del VEBI de la cepa del VEBI, (b) alinear el ADNc del VEBI con una pluralidad de secuencias de VEBI, (c) comparar la relación de las secuencias de VEBI alineadas, e (d) identificar una vacuna para una cepa del VEBI si el ADNc del VEBI es al menos aproximadamente el 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,8%, mucho más ventajosamente aproximadamente el 99,3% a aproximadamente el 99,6%, homóloga a cualquiera de la pluralidad de secuencias del VEBI.
- 45 16. Un procedimiento para identificar una cepa novedosa de VEBI que comprende: (a) generar un ADNc del VEBI de la cepa del VEBI, (b) alinear el ADNc del VEBI con una pluralidad de secuencias de VEBI, (c) comparar la relación de las secuencias de VEBI alineadas, e (d) identificar una cepa novedosa de VEBI si el ADNc del VEBI es menor de aproximadamente el 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,8%, mucho más ventajosamente aproximadamente el 99,3% a aproximadamente el 99,6%, homóloga a cualquiera de la pluralidad de secuencias de VEBI.
- 50 17. El procedimiento del párrafo 15 ó 16, en el que la cepa del VEBI es de una muestra que se sospecha que tiene una cepa del VEBI.
- 55 18. El procedimiento del párrafo 17, en el que la muestra es una muestra de tejido embebida en parafina.
- 60 19. El procedimiento del párrafo 17 ó 18, en el que la generación de un ADNc del VEBI comprende extraer ARN de la muestra y la amplificación por TR-PCR del ADNc del VEBI con cebadores específicos de VEBI.
20. El procedimiento del párrafo 19, en el que los cebadores específicos del VEBI amplifican una porción hipervariable del VEBI.

21. El procedimiento del párrafo 20, en el que la porción hipervariable de VEBI es VP1, VP3, VP4 o VP5.
22. El procedimiento del párrafo 20, en el que la porción hipervariable de VEBI es VP2.
- 5 23. El procedimiento de los párrafos 16 a 22, en el que la comparación es con un dendritograma.
24. El procedimiento de los párrafos 16 a 22, en el que la pluralidad de secuencias de VEBI son secuencias de ácido nucleico.
- 10 25. El procedimiento de los párrafos 16 a 22, en el que una secuencia aminoacídica se deduce del ADNc del VEBI, y la pluralidad de secuencias de VEBI son secuencias aminoacídicas.
26. Un procedimiento asistido por ordenador para caracterizar una cepa del VEBI que comprende: usar un sistema informático, por ejemplo, un ordenador programado que comprende un procesador, un sistema de almacenamiento de datos, un dispositivo de entrada y un dispositivo de salida, las etapas de: (a) introducir en el ordenador programado a través del dispositivo de entrada datos que comprenden secuencias del VEBI generadas de una muestra que se sospecha que tiene una cepa del VEBI, generando así un conjunto de datos; (b) comparar, usando el procesador, el conjunto de datos con una base de datos informática de secuencias del VEBI almacenadas en el sistema de almacenamiento de datos del ordenador; (c) seleccionar de la base de datos, usando procedimientos informáticos, secuencias del VEBI almacenadas en el sistema de almacenamiento de datos del ordenador que tengan una porción que sea de aproximadamente el 95%, ventajosamente aproximadamente del 98% a aproximadamente el 99,8%, mucho más ventajosamente aproximadamente del 99,2% a aproximadamente el 99,6%, homóloga al conjunto de datos; (d) y transmitir al dispositivo de salida las secuencias de VEBI seleccionadas que tengan una porción que sea al menos aproximadamente el 95%, mucho más ventajosamente aproximadamente el 99,3% a aproximadamente el 99,6% a aproximadamente el 99,8%, mucho más ventajosamente aproximadamente el 99,2% a aproximadamente el 99,4%, homóloga al conjunto de datos, u opcionalmente transmitir al dispositivo de salida indicando la ausencia de secuencias del VEBI que tengan una porción que sea al menos aproximadamente el 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,8%, mucho más ventajosamente aproximadamente el 99,3% a aproximadamente el 99,6%, homóloga con respecto al conjunto de datos si ninguna secuencia de VEBI tiene una porción que sea al menos aproximadamente el 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,8%, mucho más ventajosamente aproximadamente el 99,3% a aproximadamente el 99,6%, homóloga al conjunto de datos, caracterizando así una cepa del VEBI.
27. El procedimiento del párrafo 26, en el que la muestra es una muestra de tejido embebida en parafina.
- 35 28. El procedimiento del párrafo 26 ó 27, en el que las secuencias de VEBI corresponden a una o más porciones de hipervariable de VEBI.
29. El procedimiento del párrafo 28, en el que la porción hipervariable del VEBI es VP1, VP3, VP4 o VP5.
- 40 30. El procedimiento del párrafo 28, en el que la porción hipervariable de VEBI es VP2.
31. El procedimiento de los párrafos 26 a 30, en el que las secuencias del VEBI en el sistema de almacenamiento son secuencias de ácido nucleico.
- 45 32. El procedimiento de los párrafos 26 a 30, en el que las secuencias del VEBI en el sistema de almacenamiento son secuencias aminoacídicas.
33. El procedimiento del párrafo 32, que comprende adicionalmente generar un conjunto de datos de secuencias aminoacídicas.
- 50 34. El procedimiento de los párrafos 26 a 33, que comprende identificar una vacuna para la cepa del VEBI en el que la vacuna se identifica identificando cepas del VEBI con una o más secuencias del VEBI que tengan una porción que sea al menos aproximadamente el 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,8%, mucho más ventajosamente aproximadamente el 99,3% a aproximadamente el 99,6%, homóloga al conjunto de datos.
35. El procedimiento de los párrafos 26 a 33, que comprende identificar una cepa novedosa del VEBI, en el que la cepa novedosa se identifica si ninguna secuencia del VEBI tiene una porción que sea al menos aproximadamente el 95%, ventajosamente de aproximadamente el 98% a aproximadamente el 99,8%, mucho más ventajosamente aproximadamente el 99,3% a aproximadamente el 99,6%, homóloga al conjunto de datos.
- 60 36. Un procedimiento para transmitir datos que comprende la transmisión de información de dichos procedimientos analizados en este documento o etapas de los mismos, por ejemplo, a través de telecomunicaciones, teléfono,

videoconferencia, comunicación en masa, por ejemplo, presentación, tal como una presentación informática (por ejemplo POWERPOINT), Internet, correo electrónico, comunicación documental, tal como un documento de un programa informático (por ejemplo WORD) y similares.

- 5      37. Un sistema informático para caracterizar una cepa del VEBI, conteniendo el sistema: secuencias nucleotídicas del VEBI de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1, o secuencias aminoacídicas del VEBI de la Tabla 3, o secuencias aminoacídicas del VEBI derivadas de las secuencias nucleotídicas de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1.
- 10     38. Un medio legible por ordenador que contiene: secuencias nucleotídicas del VEBI de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1, o secuencias aminoacídicas del VEBI de la Tabla 3, o secuencias aminoacídicas del VEBI derivadas de las secuencias nucleotídicas de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1.
- 15     39. Un procedimiento para hacer negocio que comprende proporcionar a un usuario el sistema informático del párrafo 37 o el medio del párrafo 38 o: secuencias nucleotídicas del VEBI de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1, o las secuencias aminoacídicas del VEBI de la Tabla 3, o secuencias aminoacídicas del VEBI derivadas de las secuencias nucleotídicas de acuerdo con la Tabla 2 y/o la figura 1.
- 20     40. Un procedimiento para obtener un epítopo, un antígeno o un inmunógeno de una cepa novedosa de VEBI que comprende aislar el epítopo, el antígeno o el inmunógeno de una cepa novedosa de VEBI identificada por los procedimientos de los párrafos 10, 16 o 35.
- 25     41. El procedimiento del párrafo 40, en el que el epítopo, antígeno o inmunógeno es producto de expresión de una molécula de ácido nucleico que es heteróloga al virus.
- 30     42. Un procedimiento para inducir una respuesta inmune que comprende administrar el epítopo, antígeno o inmunógeno del procedimiento de los párrafos 40 ó 41 en una cantidad eficaz para inducir la respuesta inmune a un animal.
- 35     43. Un procedimiento para inducir una respuesta inmune que comprende: administrar el virus de una cepa novedosa de VEBI identificada por los procedimientos de los párrafos 10, 16 ó 35 en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmune a un animal.
- 40     44. El procedimiento del párrafo 42 ó 43, que comprende adicionalmente administrar un adyuvante.
- 45     45. El procedimiento de los párrafos 42 a 44, que comprende adicionalmente administrar una citocina.
- 50     46. El procedimiento del párrafo 45, en el que la citocina se expresa por el virus.
- 55     47. El procedimiento de los párrafos 40 a 46, en el que dicho animal es un ave.
- 60     48. El procedimiento del párrafo 47, en el que el ave se selecciona entre el grupo que consiste en pollo, pato, ganso, faisán, codorniz y pavo.
- 65     49. El procedimiento de los párrafos 40 y 48, en el que el virus está inactivado o atenuado.
- 70     50. Un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica o protectora que comprende administrar una cantidad eficaz de un virus del procedimiento de los párrafos 43 a 49, o un inmunógeno, antígeno o epítopo del mismo, para inducir la respuesta en un ave.
- 75     51. Un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica o protectora que comprende administrar una cantidad eficaz de un inmunógeno, antígeno o epítopo del procedimiento de los párrafos 40 ó 41 para inducir la respuesta en un ave.
- 80     52. Un VEBI aislado que consiste esencialmente en la Secuencia Nº 1631 y tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.
- 85     53. Un VEBI aislado que consiste esencialmente en la Secuencia Nº 087 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3.
- 90     54. Un VEBI aislado que consiste esencialmente en la Secuencia Nº 077 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 5.
- 95     55. Un polipéptido de VEBI aislado que consiste esencialmente en los residuos aminoácidos de la Secuencia Nº 1631 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2.
- 100    56. Un polipéptido de VEBI aislado que consiste esencialmente en los residuos aminoácidos de la Secuencia Nº 087 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4.

57. Un polipéptido de VEBI aislado que consiste esencialmente en los residuos aminoacídicos de la Secuencia N° 077 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 6.
- 5 58. Un polinucleótido de VEBI aislado, o una hebra antisentido que es completamente complementaria al mismo, que consiste esencialmente en la Secuencia N° 1631, que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.
59. Un polinucleótido de VEBI aislado, o una hebra antisentido que es completamente complementaria al mismo, que consiste esencialmente en la Secuencia N° 087, que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3.
- 10 60. Un polinucleótido de VEBI aislado, o una hebra antisentido que es completamente complementaria al mismo, que consiste esencialmente en la Secuencia N° 077, que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 5.
- 15 61. El polinucleótido de los párrafos 58-60, en el que el polinucleótido es una molécula de ADN.
62. El polinucleótido de los párrafos 58-60, en el que el polinucleótido es una molécula de ARN.
- 20 63. Un procedimiento para obtener un epítopo, un antígeno o un inmunógeno de una cepa novedosa de VEBI que comprende aislar el epítopo, el antígeno o el inmunógeno del VEBI de los párrafos 52-54.
64. El procedimiento del párrafo 63, en el que el epítopo, antígeno o inmunógeno es producto de expresión de una molécula de ácido nucleico que es heteróloga al virus.
- 25 65. Un procedimiento para inducir una respuesta inmune que comprende administrar el epítopo, antígeno o inmunógeno del procedimiento de los párrafos 63-64 en una cantidad eficaz para inducir la respuesta inmune en un animal.
66. Un procedimiento para inducir una respuesta inmune que comprende: administrar el virus de VEBI de los párrafos 52-54 en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmune a un animal.
- 30 67. El procedimiento de los párrafos 65-66, que comprende adicionalmente administrar un adyuvante.
68. El procedimiento de los párrafos 65-67, que comprende adicionalmente administrar una citocina.
- 35 69. El procedimiento de la reivindicación 57, en el que la citocina se expresa por el virus.
70. El procedimiento de los párrafos 65-69, en el que el animal es un ave.
- 40 71. El procedimiento del párrafo 70, en el que el ave se selecciona entre el grupo que consiste en pollo, pato, ganso, faisán, codorniz y pavo.
72. El procedimiento de los párrafos 65-71, en el que el virus está inactivado o atenuado.
- 45 73. Un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica o protectora que comprende administrar una cantidad eficaz de VEBI de los párrafos 52-54, o un inmunógeno, antígeno o epítopo del mismo, para inducir la respuesta en un ave.
74. Un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica o protectora que comprende administrar una cantidad eficaz de un inmunógeno, antígeno o epítopo del VEBI de los párrafos 52-54 para inducir la respuesta en un ave.

## LISTA DE SECUENCIAS

[0479]

5           <110> UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.  
 <120> METHODS OF CHARACTERIZING INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS  
 <130> 574313-3195.1

10          <140> PCT/US2004/037255  
           <141> 08-11-2004

15          <150> 60/519.571  
           <151> 13-11-2003  
 <160> 61

20          <170> PatentIn ver. 3.3  
 <210> 1  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

25          <400> 1

```
cagccgatga ttaccaggatc tcatacacagt accaaggcagg tggggtaaca atcacactgt 60
tctcagctaa tatcgatgcc atcacaagcc tcagcatcgg gggagaactc gtgtttcaaa 120
caagcgtcca aggccattata ctgggtgcta ccatctacct tataggctt gatgggactg 180
cggttaatcac cagagctgtg gccgcagaca atgggctaac ggccggcact gacaacctta 240
tgccattcaa tattgtgatt ccaaccaacg agataa 276
```

30          <210> 2  
 <211> 91  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

35          <400> 2

```
Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Ala Gly Gly Val Thr
  1           5           10          15
Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu Ser Ile
  20          25          30
Gly Gly Glu Leu Val Phe Gln Thr Ser Val Gln Gly Leu Ile Leu Gly
  35          40          45
Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Ala Val Ile Thr Arg
  50          55          60
Ala Val Ala Ala Asp Asn Gly Leu Thr Ala Gly Thr Asp Asn Leu Met
  65          70          75          80
Pro Phe Asn Ile Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile
  85          90
```

40          <210> 3  
 <211> 213  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

&lt;400&gt; 3

cagccaaat	tgtgccatc	acaaggctca	gcgttggggg	agagctttt	tttaaaacaa	60
gcgtccaaag	ccttgactg	ggcgctacca	tctacctt	aggcttgat	gggactgcgg	120
taatcaactag	agctgttagcc	gcaaacaatg	ggctgatgac	cggcatcgac	aatcttatgc	180
cattcaatct	tgtgattcca	accaacgaga	taa			213

5 &lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

10 &lt;400&gt; 4

Ala	Asn	Ile	Asp	Ala	Ile	Thr	Ser	Leu	Ser	Val	Gly	Gly	Glu	Leu	Leu
1					5					10					15
Phe	Lys	Thr	Ser	Val	Gln	Ser	Leu	Val	Leu	Gly	Ala	Thr	Ile	Tyr	Leu
				20					25					30	
Ile	Gly	Phe	Asp	Gly	Thr	Ala	Val	Ile	Thr	Arg	Ala	Val	Ala	Ala	Asn
				35				40						45	
Asn	Gly	Leu	Met	Thr	Gly	Ile	Asp	Asn	Leu	Met	Pro	Phe	Asn	Leu	Val
		50				55					60				
Ile	Pro	Thr	Asn	Glu	Ile										
					70										

15 &lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 276

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

20 &lt;400&gt; 5

cagccgatga	ttaccaattc	tcatctcagt	accaatcagg	tggagtaaca	atcacactgt	60
tctcagccaa	cattgatgcc	atcacaagcc	tcagcgttgg	gggagagctt	gtgttccaaa	120
caagcgccca	agaccttata	ctggggcgcca	ctatctacct	tataggcttt	gatgggacta	180
cggtgaccac	cagagctgtg	gccgcaaaca	atgggctgac	ggccggcacc	gacaatccta	240
ttccattcaa	tcttggttc	ccgaccaacg	agataaa			276

25 &lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 91

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

&lt;400&gt; 6

**Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Ser Gly Gly Val Thr**  
 1                   5                   10                   15  
**Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu Ser Val**  
 20                   25                   30  
**Gly Gly Glu Leu Val Phe Gln Thr Ser Val Gln Asp Leu Ile Leu Gly**  
 35                   40                   45  
**Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Thr Thr Arg**  
 50                   55                   60  
**Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Ala Gly Thr Asp Asn Pro Ile**  
 65                   70                   75                   80  
**Pro Phe Asn Leu Val Phe Pro Thr Asn Glu Ile**  
 85                   90

5       <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 10      <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador  
 10      <400> 7  
  
 ggtatgtgag gcttggtgac       20  
  
 15      <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20      <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador  
  
 20      <400> 8  
  
 25      ttatctcggtt gggtggaaatc       20  
  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30      <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador  
  
 35      <400> 9  
  
 tcttgggtat gtgaggcttg       20  
  
 40      <210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 45      <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador  
  
 45      <400> 10  
  
 ggatgtgatt ggctgggtta       20

5 <210> 11  
 <211> 271  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa  
 <400> 11

```

catcaggacc aaagagaatg tcagttccaa gcaggtggag tgacaatcac actgttctca 60
gc当地atcg atgccatcac aagcctcagc atcggggag aactcgttt tcaaacaagc 120
gtccaaggcc ttatactggg cgctaccatc taccttatag gctttatgg aactgcagta 180
atcaccagag ctgtggccgc agataatggg ctgacggccg gcactgacaa ccttatgcca 240
ttcaatattg taattccaaac cagcgagata a 271
  
```

10 <210> 12  
 <211> 90  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa  
 15 <400> 12

```

His Gln Asp Gln Arg Glu Cys Gln Phe Gln Ala Gly Gly Val Thr Ile
  1           5          10          15
Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu Ser Ile Gly
  20          25          30
Gly Glu Leu Val Phe Gln Thr Ser Val Gln Gly Leu Ile Leu Gly Ala
  35          40          45
  
```

```

Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Ala Val Ile Thr Arg Ala
  50          55          60
Val Ala Ala Asp Asn Gly Leu Thr Ala Gly Thr Asp Asn Leu Met Pro
  65          70          75          80
Phe Asn Ile Val Ile Pro Thr Ser Glu Ile
  85          90
  
```

20 <210> 13  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa  
 25 <400> 13

```

cagccgacga ttaccaattc tcatcacagt accaaggcagg tggggtaaca atcacactgt 60
tctcagctaa tatcgatgcc atcacaagcc tcagcatcg ggagaactc gtgttcaaa 120
caagcgccca aggccctata ctgggtgcta ccatctacct tataggctt gatgggactg 180
cggttaatcac cagagctgtg gccgcagaca atgggctgac ggccggcact gacaaccta 240
tgccattcaa tattgtgatt ccaaccagcg agataa 276
  
```

30 <210> 14  
 <211> 91  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa  
 <400> 14

35

**Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Ala Gly Gly Val Thr**  
 1                   5                   10                   15  
**Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu Ser Ile**  
 20               25               30  
**Gly Gly Glu Leu Val Phe Gln Thr Ser Val Gln Gly Leu Ile Leu Gly**  
 35               40               45  
**Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Ala Val Ile Thr Arg**  
 50               55               60  
**Ala Val Ala Ala Asp Asn Gly Leu Thr Ala Gly Thr Asp Asn Leu Met**  
 65               70               75               80  
**Pro Phe Asn Ile Val Ile Pro Thr Ser Glu Ile**  
 85               90

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 276

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

&lt;400&gt; 15

cagccgatga	ttaccaattc	tcatcacagt	accaaggcagg	tgggttaaca	atcacactgt	60
tctcagctaa	tatcgatgcc	atcacaagcc	tcagcatcg	gggagaactc	gtgttcaaa	120
caagcgtcca	aggccttata	ctgggtgcta	ccatctacct	tataggctt	gatgggactg	180
cggtaatcac	cagagctgtg	gccgcagaca	atgggctaac	ggccggcact	gacaaccta	240
tgccattcaa	tattgtgatt	ccaaccagcg	agataaa			276

10

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 91

&lt;212&gt; PRT

15 &lt;213&gt; Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

&lt;400&gt; 16

**Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Ala Gly Gly Val Thr**

20

1	5	10	15
<b>Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu Ser Ile</b>			
20	25	30	
<b>Gly Gly Glu Leu Val Phe Gln Thr Ser Val Gln Gly Leu Ile Leu Gly</b>			
35	40	45	
<b>Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Ala Val Ile Thr Arg</b>			
50	55	60	
<b>Ala Val Ala Ala Asp Asn Gly Leu Thr Ala Gly Thr Asp Asn Leu Met</b>			
65	70	75	80
<b>Pro Phe Asn Ile Val Ile Pro Thr Ser Glu Ile</b>			
	85	90	

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 276

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

&lt;400&gt; 17

<b>cagccgatga ttaccaattc tcatacacagt accaaccagg tgggttaaca atcacactgt</b>	<b>60</b>
<b>tctcagccaa cattgatgtc atcacaagcc tcagcggtgg gggagagctc gtgtttcaaa</b>	<b>120</b>
<b>caagcggttcca aggtcttgta ctgggcgcaca ccatctactt tataggcttt gatgggacta</b>	<b>180</b>
<b>cggtaatcac cagggctgtg gcccgcagaca atgggctgac ggcgcgcacc gacaatctta</b>	<b>240</b>
<b>tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataa</b>	<b>276</b>

10

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 91

&lt;212&gt; PRT

15 &lt;213&gt; Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

&lt;400&gt; 18

<b>Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly Val Thr</b>	<b>15</b>		
<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>
<b>Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu Ser Val</b>			
20	25	30	
<b>Gly Gly Glu Leu Val Phe Gln Thr Ser Val Gln Gly Leu Val Leu Gly</b>			
35	40	45	
<b>Ala Thr Ile Tyr Phe Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile Thr Arg</b>			
50	55	60	
<b>Ala Val Ala Ala Asp Asn Gly Leu Thr Ala Gly Thr Asp Asn Leu Met</b>			
65	70	75	80
<b>Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile</b>			
	85	90	

20

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 276

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

25

&lt;400&gt; 19

cagccgataa ttaccaattc tcatcacagt accaaacagg tgggttaaca atcacactgt 60  
 tctcagccaa cattgatgcc atcacaagtc tcagcgttgg gggagagctc gtgttcaaaa 120  
 caagcgcca aagccttgta ctgggcgcca ccatctacct tataggctt gatgggactg 180  
 cggtaatcac cagagctgtg gccgcaaaca atgggctgac ggccggcatc gacaatctta 240  
 tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaatg agataa 276

<210> 20

<211> 91

5 <212> PRT

<213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

<400> 20

Ala	Asp	Asn	Tyr	Gln	Phe	Ser	Ser	Gln	Tyr	Gln	Thr	Gly	Gly	Val	Thr	
1					5				10					15		
Ile	Thr	Leu	Phe	Ser	Ala	Asn	Ile	Asp	Ala	Ile	Thr	Ser	Leu	Ser	Val	
					20				25					30		
Gly	Gly	Glu	Leu	Val	Phe	Lys	Thr	Ser	Val	Gln	Ser	Leu	Val	Leu	Gly	
					35			40					45			
Ala	Thr	Ile	Tyr	Leu	Ile	Gly	Phe	Asp	Gly	Thr	Ala	Val	Ile	Thr	Arg	
					50			55				60				
Ala	Val	Ala	Asn	Asn	Gly	Leu	Thr	Ala	Gly	Ile	Asp	Asn	Leu	Met		
	65				70				75				80			
Pro	Phe	Asn	Leu	Val	Ile	Pro	Thr	Asn	Glu	Ile						
					85				90							

10

<210> 21

<211> 276

<212> ADN

15 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

<400> 21

cagccgatga ttaccaattc tcatcacaaat accaacaagg tgggttaacg atcacactgt 60  
 tctcagccaa cattgatgcc atcacaagcc tcagcgttgg gggagagctt gtgtttaaaa 120  
 caagcgcca aagccttgta ctgggcgcca ccatctacct tataggctt gatgggactg 180  
 cggtaatcac tagagctgtg gccgcaaaca atgggctgac ggccggcatc gacaatctta 240  
 tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataa 276

20

<210> 22

<211> 91

<212> PRT

<213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

25

<400> 22

Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Gln Gly Gly Val Thr  
 1 5 10 15

Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu Ser Val  
 20 25 30

Gly Gly Glu Leu Val Phe Lys Thr Ser Val Gln Ser Leu Val Leu Gly  
 35 40 45

Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Ala Val Ile Thr Arg  
 50 55 60

Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Ala Gly Ile Asp Asn Leu Met  
 65 70 75 80

Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile  
 85 90

- 5 <210> 23  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador
- 15 <400> 23
- 20 aatggAACGA TAGCGTGTGG G 21
- 25 <210> 24  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador
- 35 <400> 24
- 40 tggAACTGG ACAAAGAC 19
- 45 <210> 25  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador
- 50 <400> 25
- cataactaac ATAAGGGCAA 20
- 55 <210> 26  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial
- 60 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador
- 65 <400> 26

tacacctcat cccagacagg gtc                    23  
 <210> 27  
 <211> 23  
 5    <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador  
 10   <400> 27  
 aggcagggga agtgatttgt ggc                    23  
 15   <210> 28  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20   <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador  
 <400> 28  
 25   ctaagatctg caactgcgga                20  
 <210> 29  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30   <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador  
 35   <400> 29  
 ctttggaaagc ggatagtcat                20  
 40   <210> 30  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45   <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador  
 <400> 30  
 tggacatggg ggcgaccta                19  
 50   <210> 31  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55   <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador  
 <400> 31  
 60   agggattgac gttgtcca                18  
 <210> 32  
 <211> 276

<212> ADN  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

5 <400> 32  
 cagccgatga ttaccaattc tcatacacagt accaaccagg tggggtaaca atcacactgt 60  
 tctcagccaa cattgatgcc atcacaagcc tcagcggtgg gggagagctc gtgttccaaa 120  
 caagcgtcca aggccttgtt ctgggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggactg 180  
 cggtaatcac cagagctgtg gcccggaaaca atgggctgac ggccggcacc gacaatctta 240  
 tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataaa 276

10 <210> 33  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

15 <400> 33  
 cagccgatga ttaccaattc tcatacacaat accaacaagg tggggtaaca atcacactgt 60  
 tctcagccaa cattgatgcc atcacaagcc tcagcggtgg gggagagctt gtgtttaaaa 120  
 caagcgtcca aaggccttgtt ctgggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggactg 180  
 cggtaatcac tagagctgtt gcccggaaaca atgggctgac ggccggcacc gacaatctta 240  
 tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataaa 276

20 <210> 34  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

25 <400> 34  
 cagccgatga ttaccaattc tcatacacagt accaaacagg tggggtaaca atcacactgt 60  
 tctcagccaa cattgatgcc atcacaagtc tcagcggtgg gggagagctc gtgttccaaa 120  
 caagcgtcca aaggccttgtt ctgggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggactg 180  
 cggtaatcac cagagctgtg gcccggaaaca atgggctgac ggccggcacc gacaatctta 240  
 tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaatg agataaa 276

30 <210> 35  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

35 <400> 35  
 cagccgataa ttaccaattc tcatacacagt accaaacagg tggggtaaca atcacactgt 60  
 tctcagccaa cattgatgcc atcacaagtc tcagcggtgg gggagagctc gtgttccaaa 120  
 caagcgtcca tagcccttgtt ctgggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggactg 180  
 cggtaatcac cagagctgtg gcccggaaaca atgggctgac gaccggcacc gacaatctta 240  
 tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaatg agataaa 276

40 <210> 36  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

**cagccgatga ttaccaattc tcatacacagt accaaccagg tgggtaaca atcacactgt 60**  
**tctcagccaa cattgatgct atcacaagcc tcagcggtgg gggagagctc gtgttcaaa 120**  
**caagcgtcca aggccttgta ctggcgcca ccatctacct tataggctt gatgggacta 180**  
**cggtaatcac cagggctgtg gcccgagaca atgggctgac ggccggcacc gacaatctta 240**  
**tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataa 276**

5 <210> 37  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa  
 <400> 37

**cagccgatga ttaccaattc tcatacacagt accaaccagg tgggtaaca atcacactgt 60**  
**tctcagccaa cattgatgcc atcacaagcc tcagcggtgg gggagagctc gtgttcaaa 120**  
**caagcgtcca cggccttgta ctggcgcca ccatctacct cataggctt gatgggacaa 180**  
**cggtaatcac cagggctgtg gccgcaaaca atgggctgac aaccggcacc gacaacctta 240**  
**tgccattcaa tcttgtgatt ccaacaaacg agataa 276**

10 <210> 38  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 15 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa  
 <400> 38

**cagccgatga ttaccaattc tcatacacagt accaaccagg tgggtaaca atcacactgt 60**  
**tctcagccaa cattgatgcc atcacaagcc tcagcggtgg gggagagctc gtgttcaaa 120**  
**caagcgtcca cggccttgta ctggcgcca ccatctacct cataggctt gatgggacaa 180**  
**cggtaatcac cagggctgtg gccgcaaaca atgggctgac gaccggcacc gacaacctta 240**  
**tgccattcaa tcttgtgatt ccaacaaacg agataa 276**

20 <210> 39  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa  
 25 <400> 39

**cagccgatga ttaccaattc tcatacacagt accaaccagg tgggtaaca atcacactgt 60**  
**tctcagccaa cattgatgcc atcacaagcc tcagcggtgg gggagagctc gtgttcaaa 120**  
**caagcgtcca cggccttgta ctggcgcca ccatctacct cataggctt gatgggacaa 180**

**cggtaatcac cagggctgtg gccgcaaaca atgggctgac gaccggcacc gacaatctta 240**  
**tgccattcaa tcttgtgatt ccaacaaacg agataa 276**

30 <210> 40  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa  
 35 <400> 40

**cagccgatga ttaccaattc tcatacacagt accaaccagg tgggtaaca atcacactgt 60**  
**tctcagccaa cattgatgct atcacaagcc tcagcggtgg gggagagctc gtgttcaaa 120**  
**caagcgtcca aggccttgta ctggcgcca ccatctacct tataggctt gatgggacta 180**  
**cggtaatcac cagggctgtg gcccgagaca atgggctgac ggccggcacc gacaatctta 240**  
**tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataa 276**

<210> 41

<211> 276  
<212> ADN  
<213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

5 <400> 41

```
cagccgatga ttaccaattc ttatcacagt accaaccagg tgggtaaca atcacactgt 60
tctcagccaa cattgatgct atcacaagcc tcagcggtgg gggagagctc gtgttctaaa 120
caagcgttca aggccttgta ctggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggacta 180
cgtaatcac cagggctgtg gccgcagaca atgggctgac ggccggcacc gacaatctta 240
tgccattcaa tattgtgatt ccaaccaacg agataaa 276
```

10 <210> 42  
<211> 276  
<212> ADN  
<213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

<400> 42

15

```
cagccgatga ttaccaattc ttatcacagt accaaccagg tgggtaaca atcacactgt 60
tctcagccaa cattgatgct atcacaagcc tcagcggtgg gggagagctc gtgttctaaa 120
caagcgttca aggccttgta ctggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggacta 180
cgtaatcac cagggctgtg gccgcagaca atgggctgac ggccggcacc gacaatctta 240
tgccattcaa tattgtgatt ccaaccaacg agataaa 276
```

20 <210> 43  
<211> 276  
<212> ADN  
<213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

<400> 43

25

```
cagccgataa ttaccagttc tcacacagt accaaacagg tgggtaaca atcacactgt 60
tctcagccaa cattgatgcc atcacaagtc tcagcggtgg gggagagctc gtgttctaaa 120
caagcatcca aaaccttgta ctggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggactg 180
cgtaatcac cagagctgtg gccgcaaaca atgggctgac ggccggcacc gacaatctta 240
tgccattcaa ctttgtgatt ccaaccaatg agataaa 276
```

30 <210> 44  
<211> 276  
<212> ADN  
<213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

<400> 44

35

```
cagccgatga ttaccaattc tcacacagt accaaccagg tcgggtaaca atcacactgt 60
tctcagccaa cattgatgct atcacaagcc tcagcggtgg gggagagctc gtgttctaaa 120
caagtgttca aggccttgta ctggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggacta 180
cgtaatcac cagggctgtg gccgctgaca atgggctgac ggccggcacc gacaatctta 240
tgccattcaa cattgtgatt ccaaccaacg agataaa 276
```

40 <210> 45  
<211> 276  
<212> ADN  
<213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

<400> 45

**cagccgataa ttaccaattc tcatcacagt accaaacagg tgggttaaca atcacactgt 60**  
**tctcagccaa cattgatgcc atcacaagtc tcagcggtgg gggagagctc gtgttcaaaa 120**  
**caagcgtcca tagccttgc ctggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggactg 180**  
**cggtaatcac cagagctgtg gccgcaaaca atgggctgac gaccggcattc gacaatctta 240**  
**tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaatg agataa 276**

5 <210> 46  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa  
 <400> 46

**cagccgataa ttaccaattc tcatcacagt accaaacagg tgggttaaca atcacactgt 60**  
**tctcggccaa cattgatgct atcacaagcc tcagcggtgg gggggagctt gtgttcaaaa 120**  
**caagcgtcca aaaccttgc ctggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggactg 180**  
**cggtaatcac cagagccgtg gccgcaaaca atgggctgac ggccggcattc gacaatctta 240**  
**tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataa 276**

10 <210> 47  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 15 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa  
 <400> 47

**cagccgataa ttaccaattc tcatcacagt accaaacagg tgggttaaca atcacactgt 60**  
**tctcggccaa cattgatgcc atcacaagtc tcagcggtgg aggagagctc gtgttcaaaa 120**  
**caagcgtcca aaaccttgc ctggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggactg 180**  
**cggtagtcac cagagctgtg gccgcaaaca atgggctgac ggccggcattc gacaatctta 240**  
**tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataa 276**

20 <210> 48  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa  
 25 <400> 48

**cagctgacaa ttaccaggtc tcatcacagt accaaacagg tgggttaca atcacactgt 60**  
**tctcagccaa cattgatgcc atcacgagtc tcagcggtgg gggagagctc gtgttcaaaa 120**  
**caagcgtcca aaggcttgc ctggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggactg 180**  
**cggtaatcac cagagctgtg gccgcaaaca atgggctgac ggccggcattc gacaatctta 240**  
**tgccattcaa ctttgtgatt ccaaccaacg agataa 276**

30 <210> 49  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa  
 35 <400> 49

**cagccgatga ttaccaattc ttatcacagt accaaccagg tgggttaaca atcacactgt 60**  
**tctcggccaa cattgatgct atcacaagcc tcagcggtgg gggagagctc gtgttcaaaa 120**  
**caagcgttca aggcccttgc ctggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggacta 180**  
**cggtaatcac cagggctgtg gcccgagaca atgggctgac ggccggcacc gacaatctta 240**  
**tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaatg agataa 276**

40 <210> 50  
 <211> 276  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

<400> 50

```
cagccgatga ttaccaattc tcatcacagt accaaccagg tgggtaaca atcacactgt 60
tctcagccaa cattgatgcc atcacaagcc tcagcggtgg gggagagctc gcgttcaaa 120
caagcgatcca aggcccttgta ctggcgcca ccatctacct cataggcttt gatgggacaa 180
cgtaatcac caggcgtgtg gccgcaaaca atgggctgac gaccggcacc gacaacctta 240
tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataa 276
```

5 <210> 51  
<211> 276  
<212> ADN  
<213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

10 <400> 51

```
cagccgatga ttaccaattc tcatcacagt accaaccagg cgggtaaca atcacactgt 60
tctcagccaa cattgatgtc atcacaagcc tcagcggtgg gggagagctc gtgttcaaa 120
caagtgttca aggcccttgta ctggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggacta 180
cgtaatcac caggcgtgtg gccgctgaca atgggctgac ggccggcacc gacaatctta 240
tgccattcaa catttgtgatt ccaaccaacg agataa 276
```

15 <210> 52  
<211> 276  
<212> ADN  
<213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

20 <400> 52

```
cagccgacga ttaccaattc tcatcacagt accaagcagg tgggtaacg atcacactgt 60
tctcagccaa catcgatgcc atcacaagcc tcagcatcggtgg gggagaactc gtgttcaaa 120
caagcgatcca aggccttata ctggcgcta ccatctacct tataggcttt gatgggactg 180
cgtaataac cagagctgtg gctgcagaca atgggctgac ggccggcact gacaacctta 240
tgccattcaa tatttgtgatt ccaaccaacg agataa 276
```

25 <210> 53  
<211> 276  
<212> ADN  
<213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (41)  
<223> a, t, c o g

<400> 53

35 cagccgataa ttaccaattc tcatcacagt accaaacagg ngggtaaca atcacactgt 60
tctcagccaa cattgatgcc attacaagtc tcagcggtgg gggggagctc gtgttcaaaa 120
caaacgttcaaa aaccccttgta ctggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggactg 180
cgtaatcac cagagctgtg gccgcaaaca atgggctgac ggccggcact gacaatctta 240
tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataa 276

40 <210> 54  
<211> 276  
<212> ADN  
<213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

<400> 54

cagccgacga ttaccaattc tcatctcagt accaaacagg tggggtaaca atcgactgt 60  
tctcagccaa cattgacgcc atcacaagtc tcagcgttgg gggagagctc gtgttcaaaa 120  
caagcgtcca aaggccttgta ctgggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggactg 180  
cggtaatcac cagagctgtg gctgcaaaca atgggctgac ggccggcattc gacaatctta 240  
tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataa 276

<210> 55  
<211> 276  
5 <212> ADN  
<213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa  
<400> 55

cagccgataa ttaccaattc tcatcacagt accaaacagg tggggtaaca atcacattgt 60  
tctcagctaa cattgatgtc atcacaagcc tcagcgttgg gggagagctc gtgtcaaga 120  
caagcgtcca aaggccttgta ctgggcgcca ccatctacct tataggcttc gatgggactg 180  
cggtaatcac cagagctgtg gctgcaaaca atgggctgac ggccggatcc gacaatctta 240  
10 tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataa 276

<210> 56  
<211> 276  
<212> ADN  
15 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa  
<400> 56

cagccgataa ttaccaattc tcatcacagt accaaacagg tggggtaacg atcagactgt 60  
tctcagccaa cattgatgcc atcacaagtc tcagtggtgg gggagagctc gtgttcaaaa 120  
caaacgtcca aggcccttgta ctgggcgcca ccatctacct tataggcttt gatgggactg 180  
cggtatcac cagagctgtg gccgcaaaca atgggctgac ggccggcattc gacaatctta 240  
20 tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataa 276

<210> 57  
<211> 276  
<212> ADN  
25 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa  
<400> 57

cagccgatga ttaccaattc tcatcacagt accaaccagg tggggtaaca atcacactgt 60  
tctcagccaa cattgatgtc atcacaagcc tcagcattgg gggagagctc gtgttccaaa 120  
caagcgtcca aggcccttgta ctgggcgcta ccatctacct tataggcttt gatgggacta 180  
cgtaatcac cagagctgtg gcctcagaca atgggctgac tgccggcacc gacaatctta 240  
30 tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataa 276

<210> 58  
<211> 276  
<212> ADN  
35 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa  
<400> 58

cagccgataa ttaccaattc tcatcacagt accaaccagg tggggtaaca atcacactgt 60  
tctcagccaa cattgatgtc atcacaagcc tcagcattgg gggagagctc gtgttccaaa 120  
caagcgtcca aggcccttgta ctgggcgcta ccatctacct tataggcttt gatgggacta 180  
cgtaatcac cagagctgtg gcctcagaca atgggctgac tgccggcattc gacaatctta 240  
40 tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataa 276

<210> 59  
<211> 276  
<212> ADN

<213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

<400> 59

<b>cagccgataa ttaccaattc tcatcacagt accaaccagg tgggttaaca atcacactgt</b>	<b>60</b>
<b>tctcagccaa cattgatgct atcacaagcc tcagcattgg gggagagctc gtgttccaaa</b>	<b>120</b>
<b>caagcgcca aggccttgtt ctggcgcta ccatctacct tataggcttt gatgggacta</b>	<b>180</b>
<b>cagtaatcac cagagctgt gcctcagaca atgggctgac tgccggcattc gacaatctta</b>	<b>240</b>
<b>tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataaa</b>	<b>276</b>

5

<210> 60

<211> 276

<212> ADN

10 <213> Virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa

<400> 60

<b>cagccgataa ttaccaattc tcatcacagt accaaccagg tgggttaaca atcacactgt</b>	<b>60</b>
<b>tctcagccaa cattgatgct atcacaagcc tcagcattgg gggagagctc gtgttccaaa</b>	<b>120</b>
<b>caagcgcca aggccttgtt ctggcgcta ccatctacct tataggcttt gatgggacta</b>	<b>180</b>
<b>cagtaatcac cagagctgt gcctcagaca atgggctgac tgccggcattc gacaatctta</b>	<b>240</b>
<b>tgccattcaa tcttgtgatt ccaaccaacg agataaa</b>	<b>276</b>

15

<210> 61

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador

<400> 61

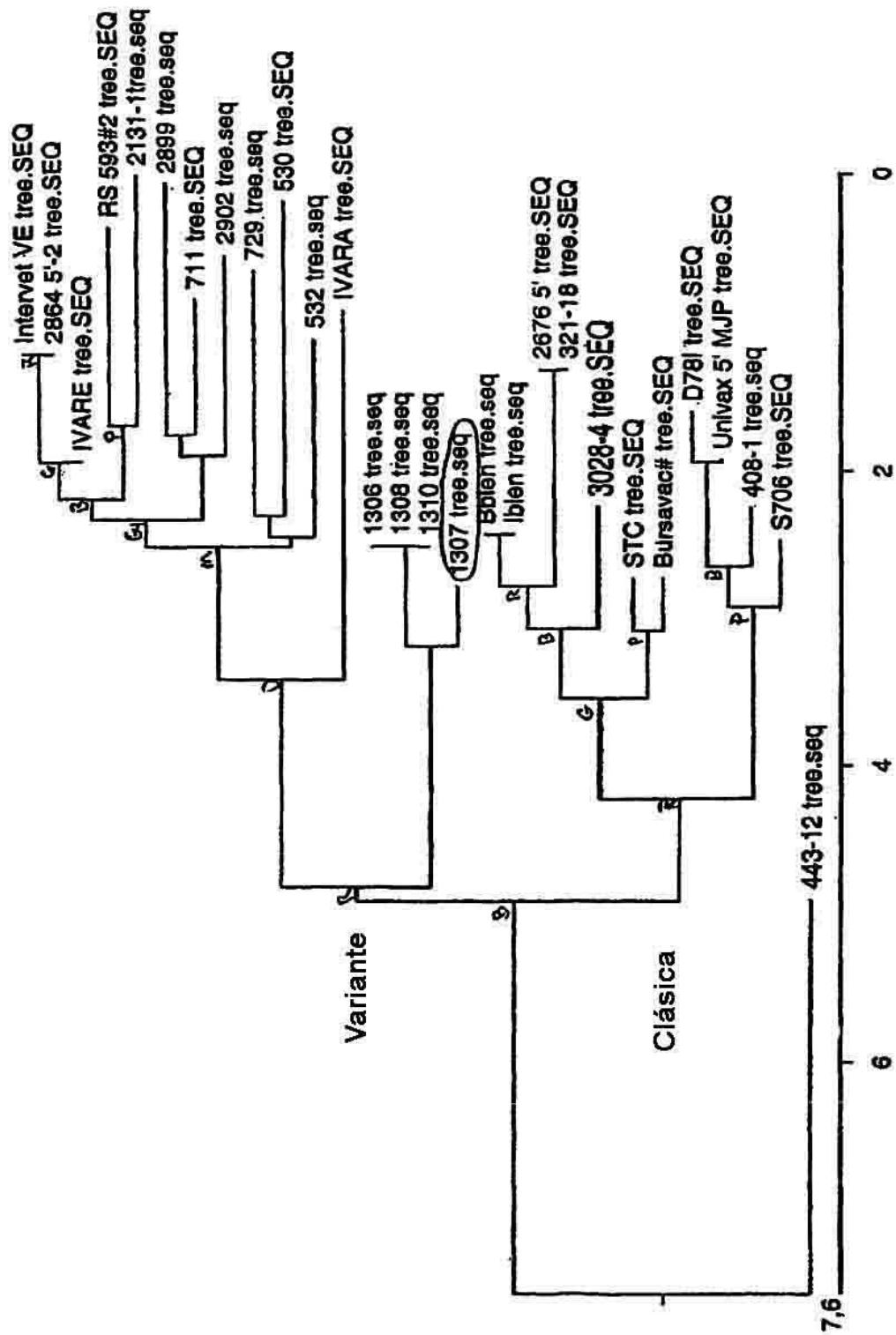
25

ggtgcgactg ctgtattgg taac

24

**REIVINDICACIONES**

1. Una secuencia polipeptídica aislada del VEBI que consiste en los residuos aminoacídicos de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.  
5
2. Una secuencia polinucleotídica aislada del VEBI que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5, o una hebra antisentido que es completamente complementaria a la misma.
3. La secuencia polinucleotídica de la reivindicación 2, en la que la secuencia polinucleotídica es una molécula de ADN.  
10
4. La secuencia polinucleotídica de la reivindicación 2, en la que la secuencia polinucleotídica es una molécula de ARN.
- 15 5. Un vector de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
6. Una preparación que comprende uno o más vectores de expresión de acuerdo con la reivindicación 5.
- 20 7. La preparación de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicha preparación es una composición inmunogénica.
8. La preparación de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en la que dicha preparación comprende un transportador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.  
25
9. Uso de una secuencia polipeptídica del VEBI aislada de acuerdo con la reivindicación 1, o una secuencia polinucleotídica del VEBI aislada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, para la preparación de una composición inmunogénica.
- 30 10. Una secuencia polipeptídica del VEBI aislada de acuerdo con la reivindicación 1, o una secuencia polinucleotídica del VEBI aislada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, o una preparación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para su uso en la inducción de una respuesta inmune al virus en un ave.
- 35 11. Uso de una secuencia polipeptídica del VEBI aislada de acuerdo con la reivindicación 1, o una secuencia polinucleotídica del VEBI aislada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, o una preparación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para la preparación de un medicamento para inducir una respuesta inmune al VEBI en un ave.



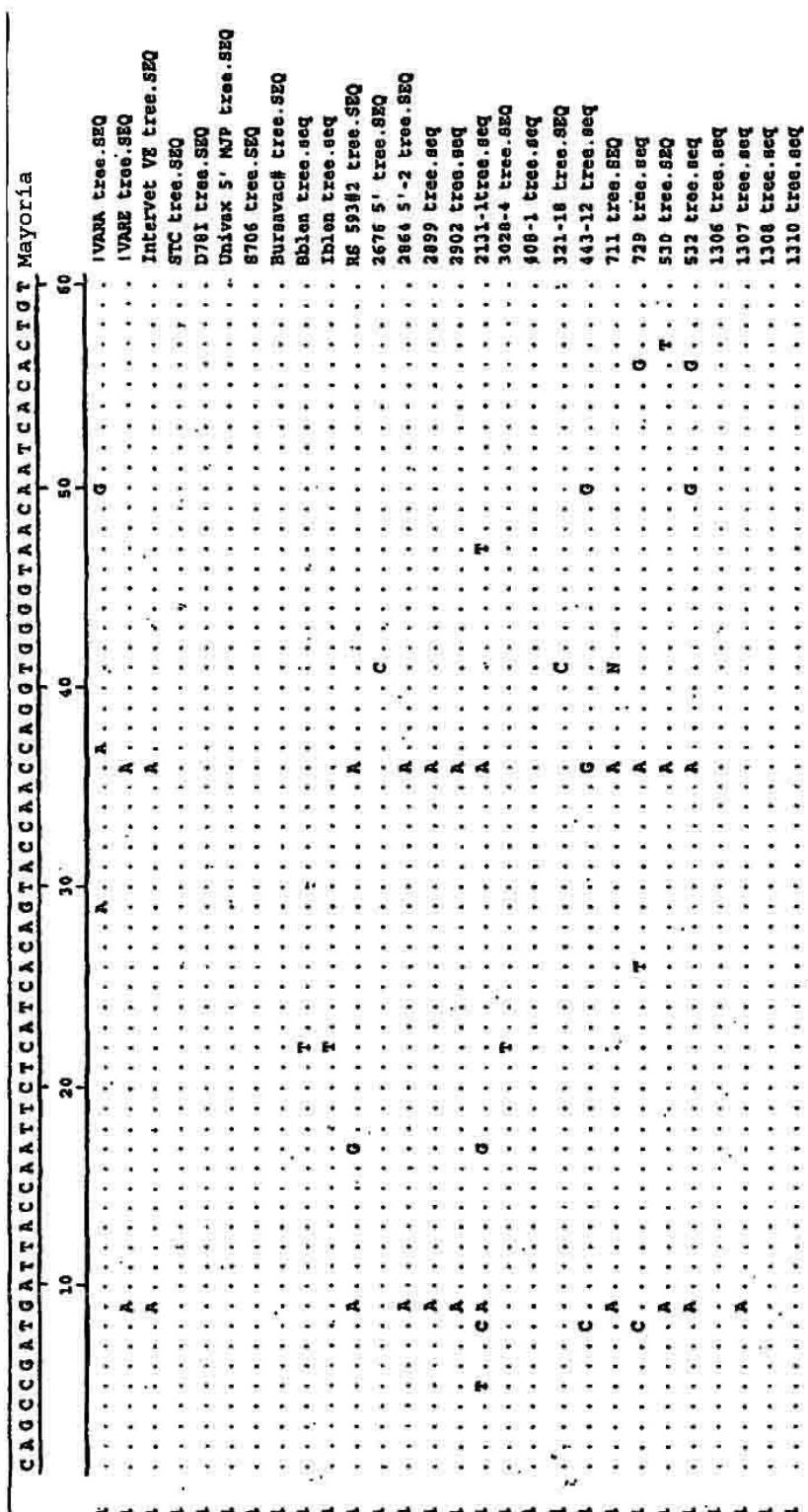
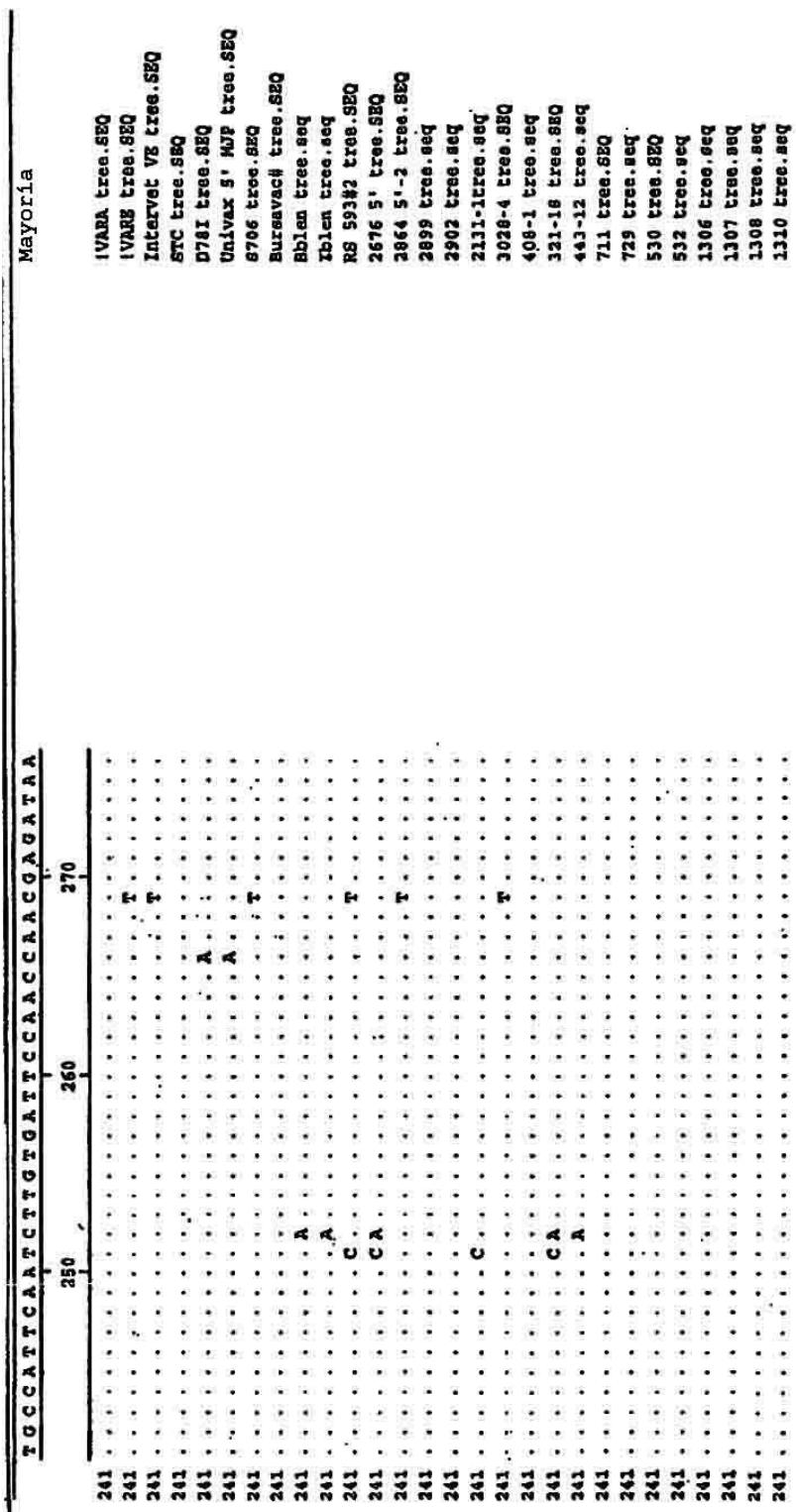


FIG. 1

C A G C G T C C A G G C C T T G T A C T G G G C G C A C C A T C T A C C T T A T A G G C T T G A T G G C A C T A Mayoria									
	130	140	150	160	170	180			
121	.	A	.	.	.	.	G	IVAR tree. SEQ	
121	.	A	.	.	.	.	G	IVAR tree. SEQ	
121	.	T A	.	.	.	.	G	Intervet VZ tree. SEQ	
121	.	T	C	.	.	.	A	STC tree. SEQ	
121	.	C	C	.	.	.	A	DNA tree. SEQ	
121	.	C	C	.	.	.	A	Univax 5' NIP tree. SEQ	
121	.	C	C	.	.	.	A	6706 tree. SEQ	
121	.	T	T	.	.	.	.	Buravax# tree. SEQ	
121	.	T	T	.	.	.	.	Balen tree. seq	
121	.	T	T	.	.	.	.	Ibolen tree. seq	
121	.	A	A	.	.	.	.	G RS 59#2 tree. SEQ	
121	.	T	T	.	.	.	.	2676 5' tree. SEQ	
121	.	T A	.	.	.	.	G	2864 5'-2 tree. SEQ	
121	.	A A	.	.	.	.	G	2899 tree. seq	
121	.	A A	.	.	.	.	G	2902 tree. seq	
121	.	A	A	.	.	.	G	2131-1tree. seq	
121	.	T	T	.	.	.	.	3028-4 tree. SEQ	
121	.	C	C	.	.	.	A	408-1 tree. seq	
121	.	T	T	.	.	.	.	J21-18 tree. SEQ	
121	.	A A	.	.	.	.	.	G 443-13 tree. seq	
121	.	A A	.	.	.	.	.	G 731 tree. SEQ	
121	.	A	A	.	.	.	.	G 729 tree. seq	
121	.	A	A	.	.	.	.	G 530 tree. SEQ	
121	.	A	A	.	.	.	.	G 532 tree. seq	
121	.	T	T	.	.	.	.	1306 tree. seq	
121	.	T	T	.	.	.	.	1307 tree. seq	
121	.	T	T	.	.	.	.	1308 tree. seq	
121	.	T	T	.	.	.	.	1310 tree. seq	

PIG. 1

FIG. 1



Decoración "Decoración #1". Residuos ocultos (como ".") que corresponden al consenso exactamente.

FIG. I

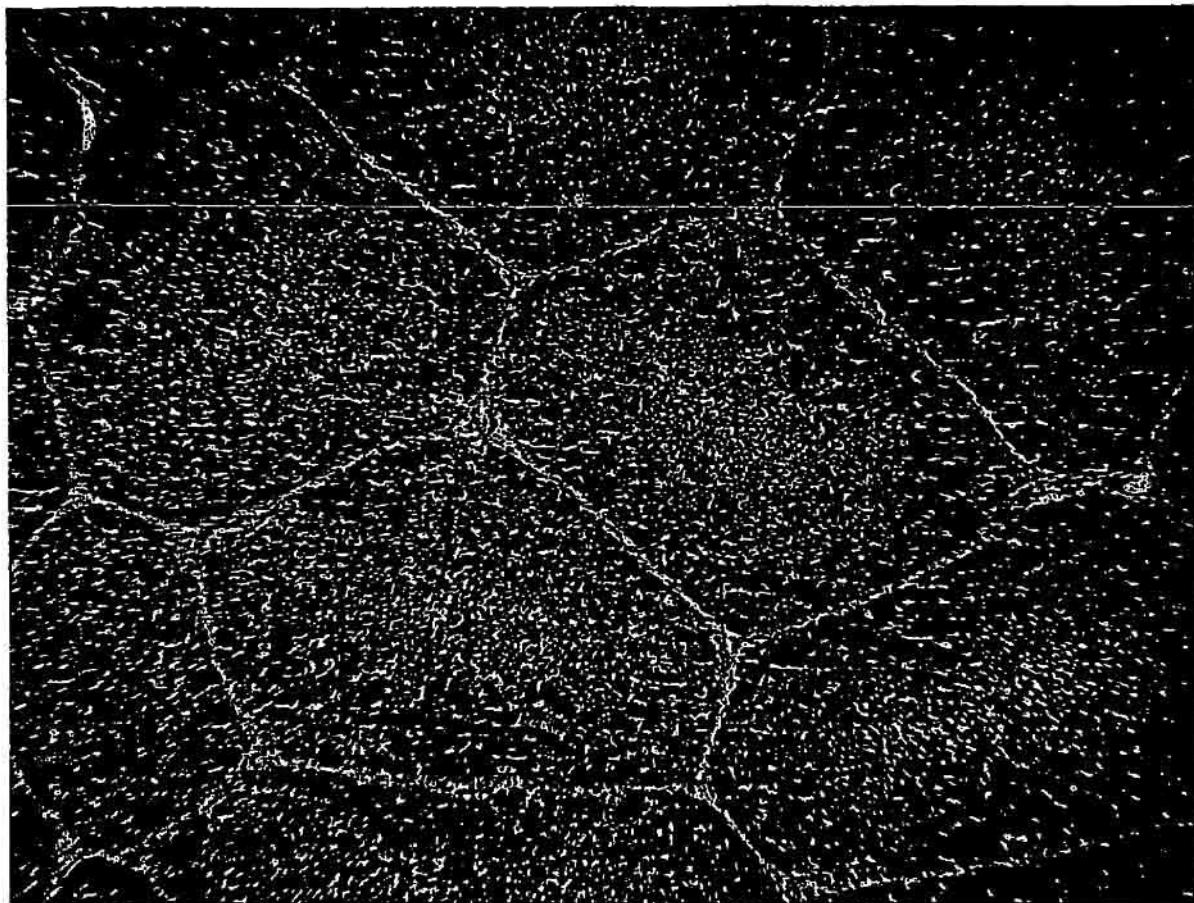


FIG. 2A

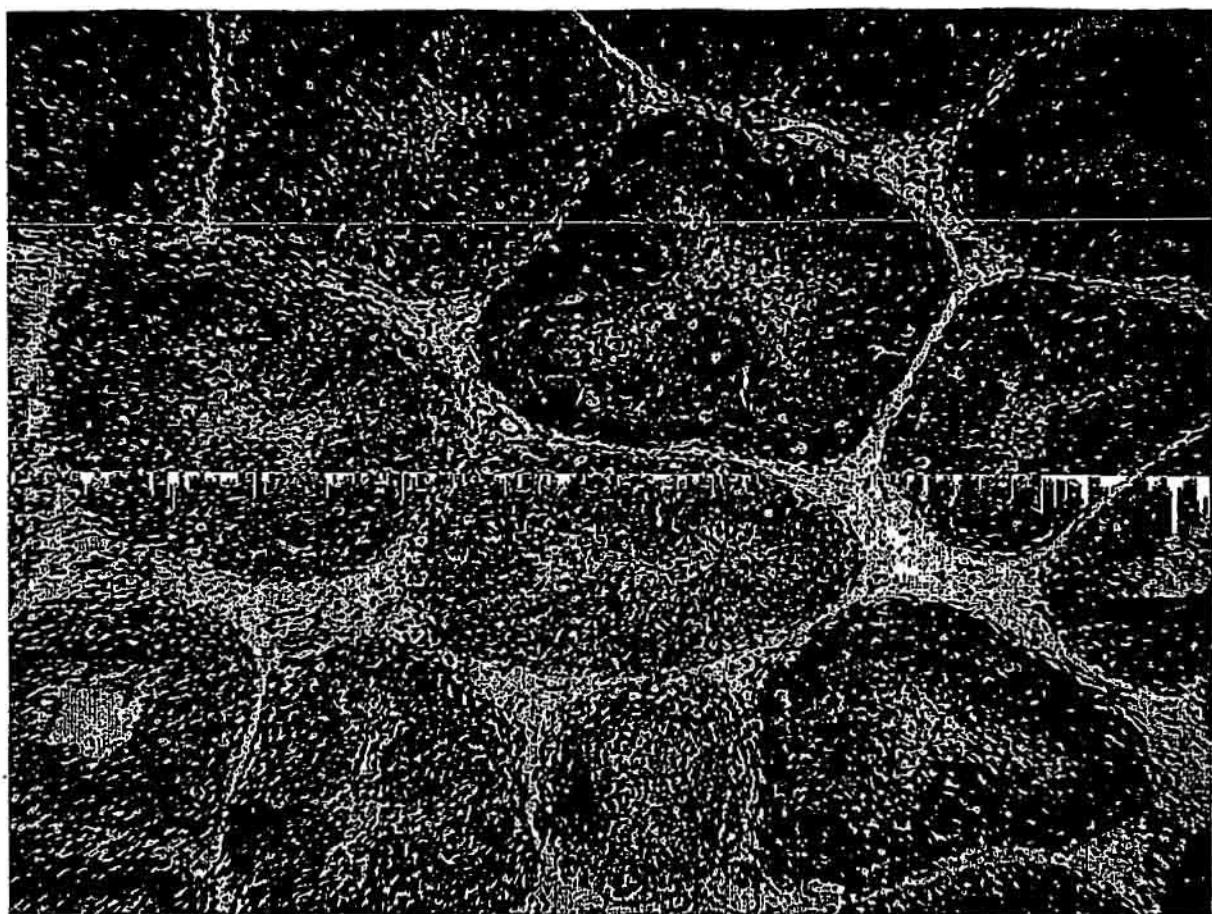


FIG. 2B

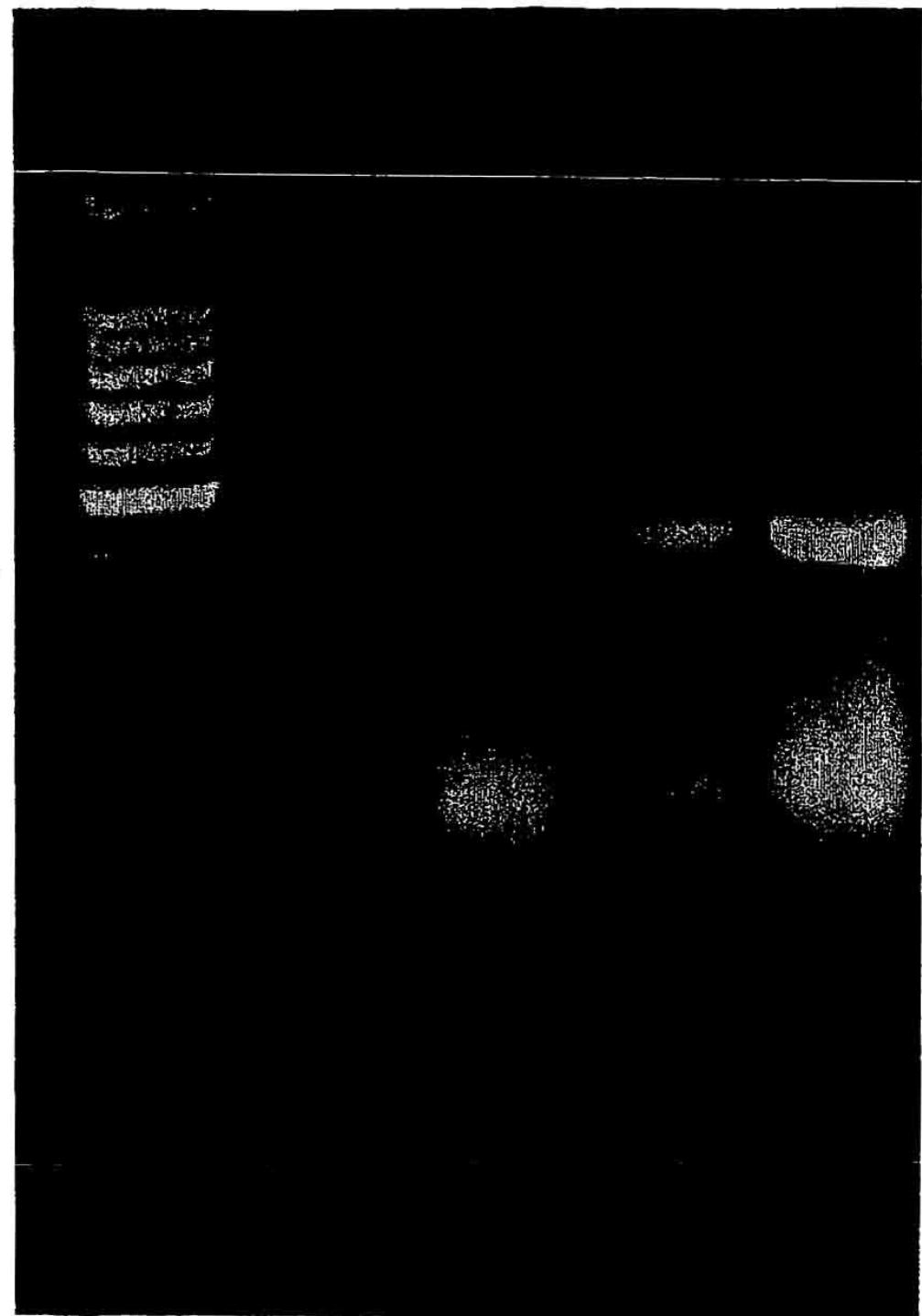


FIG. 3

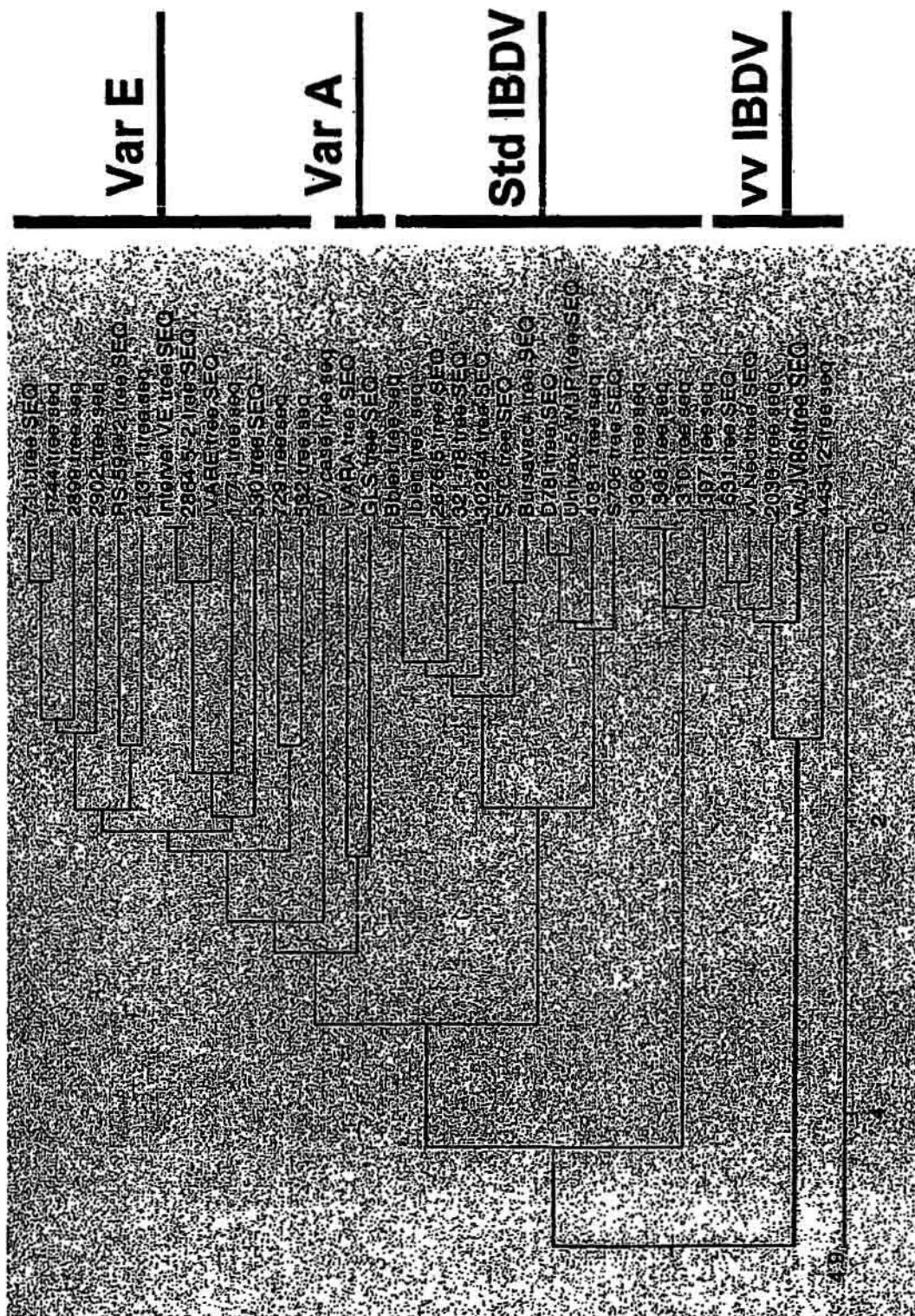


Fig. 4A

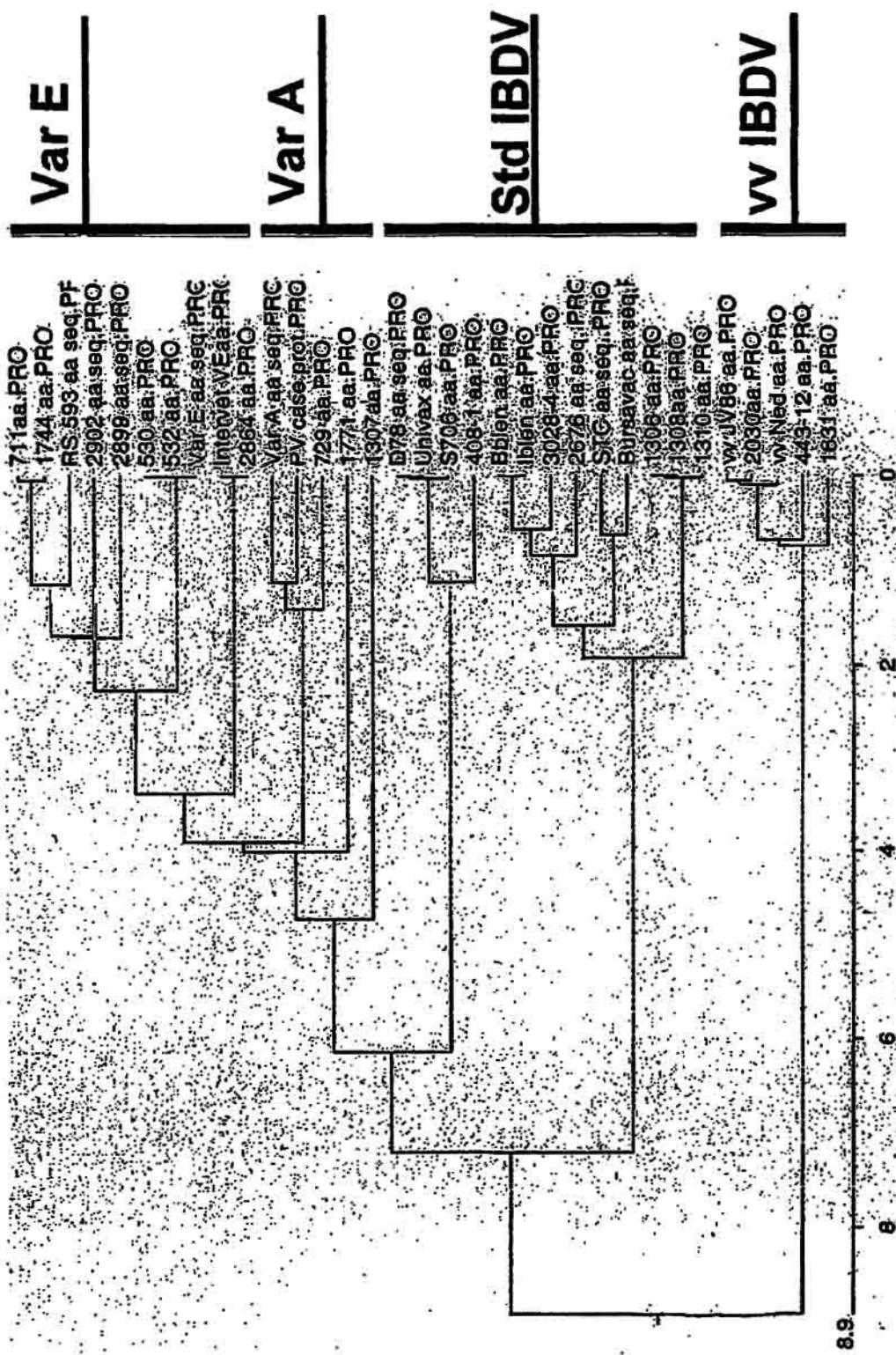
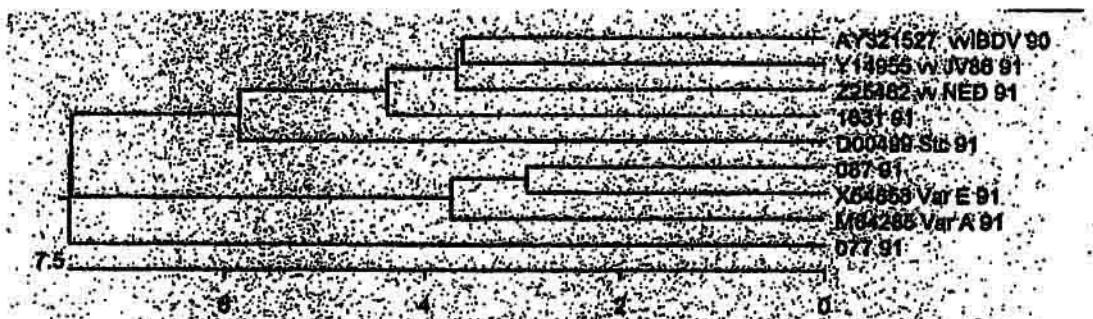
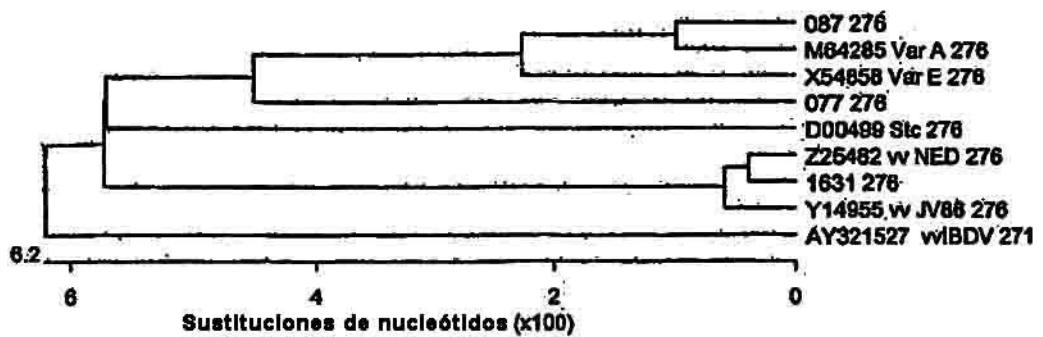


Fig. 46.



F16. 4C

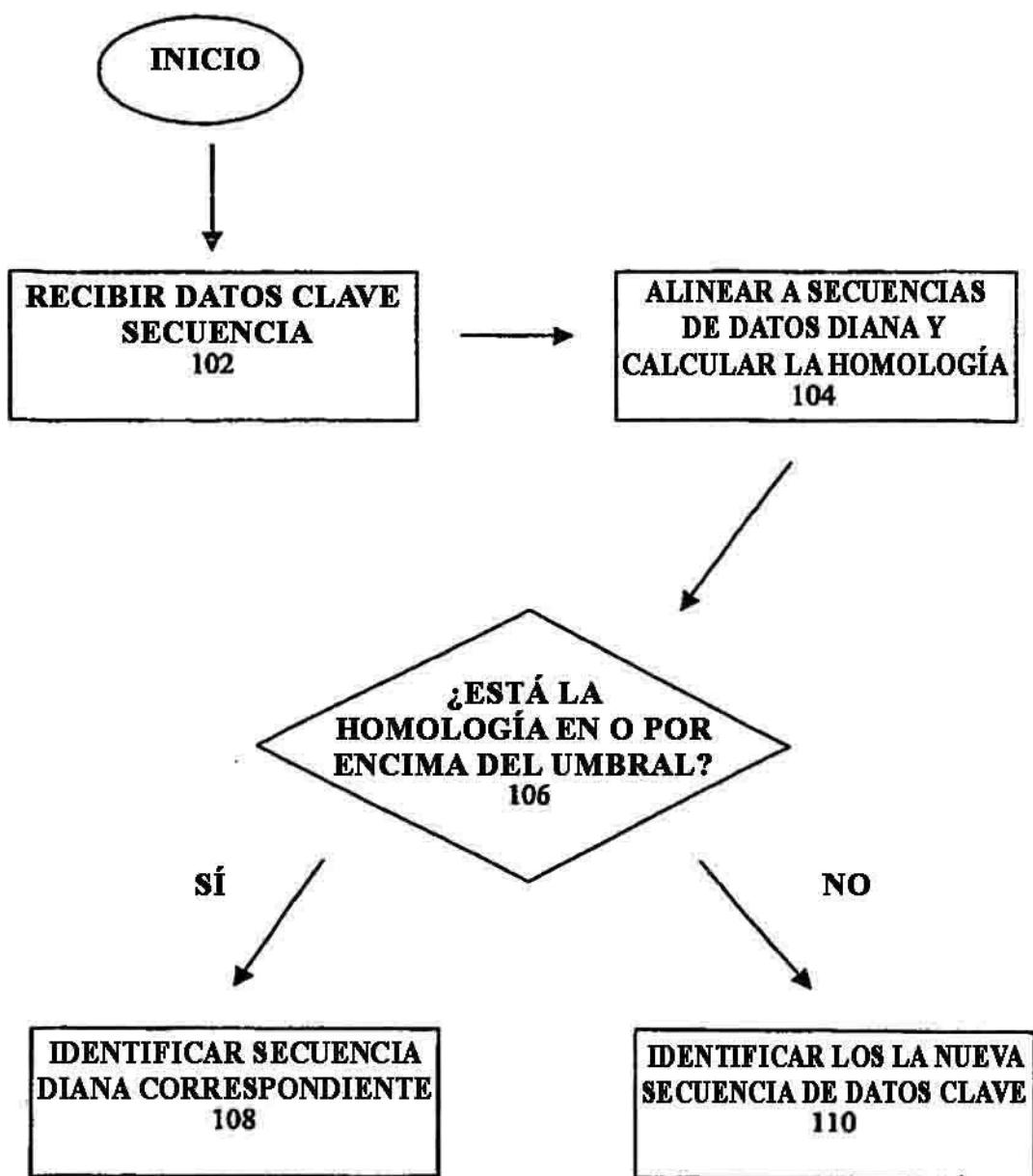


FIG.5

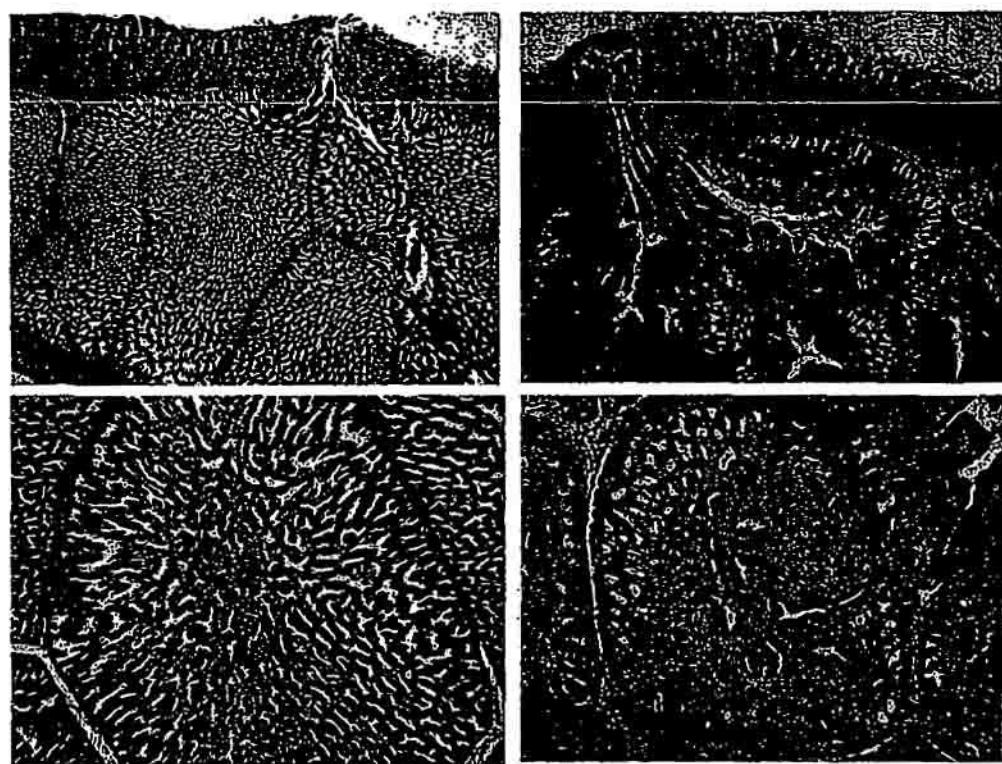
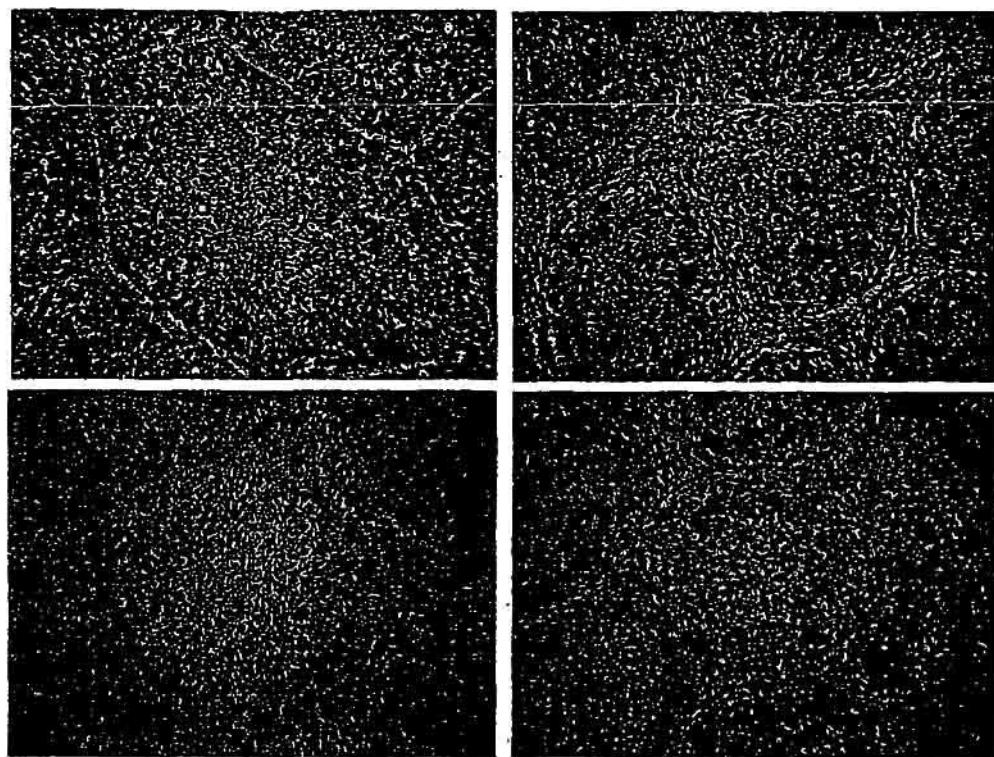
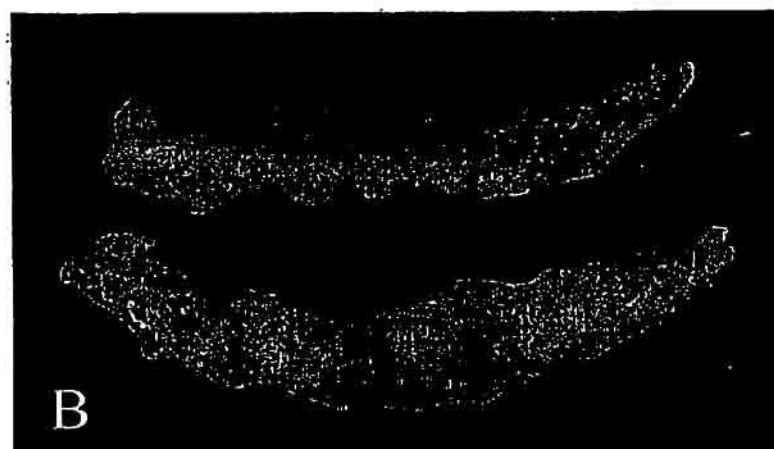
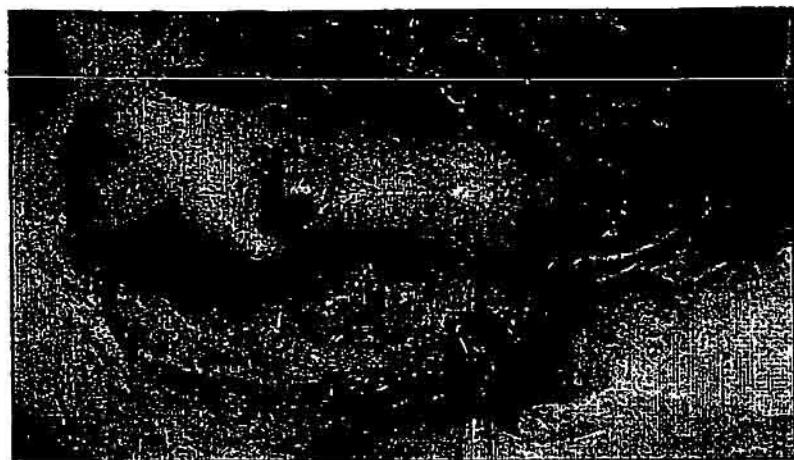


FIG. 6



PI6.7



PIG. 8

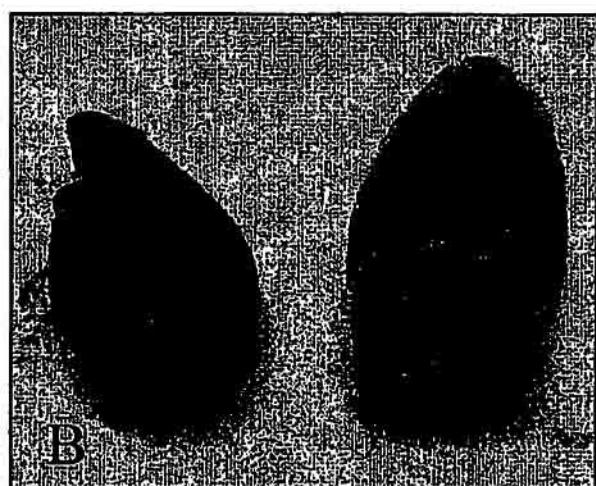
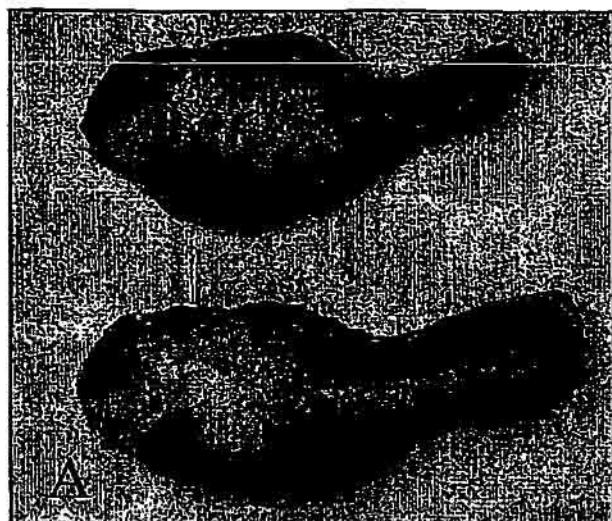


FIG. 9

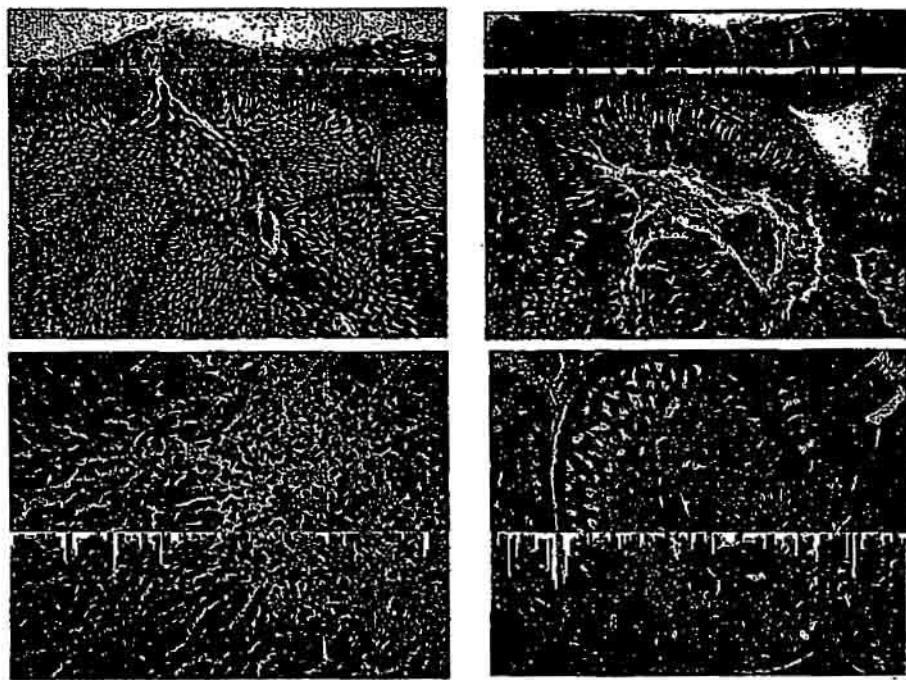


FIG. 10

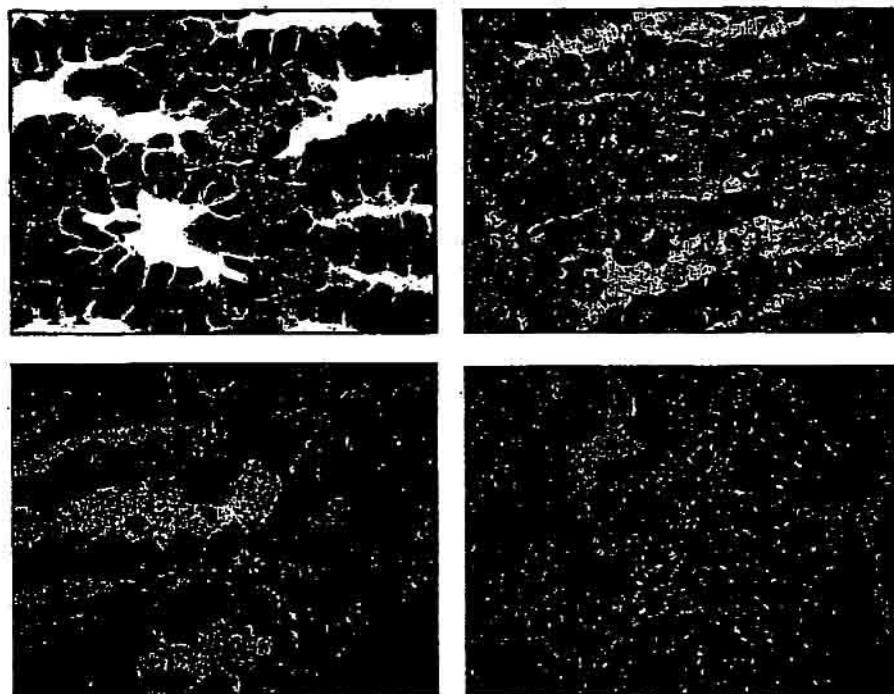


FIG. 11

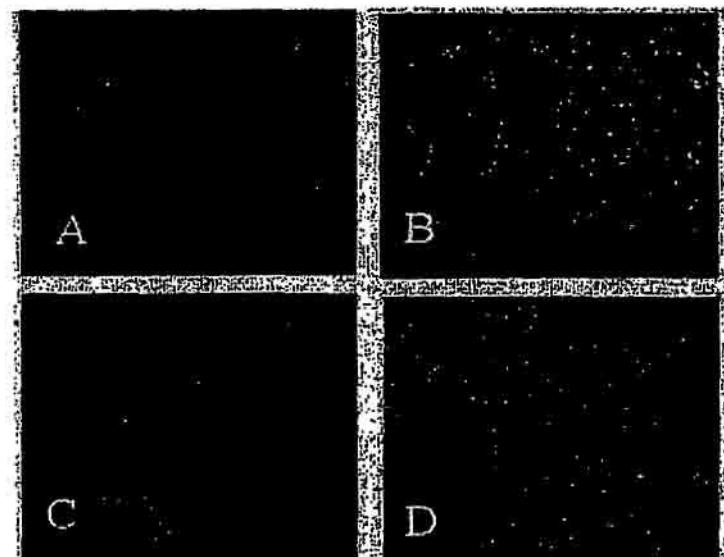


FIG. 12

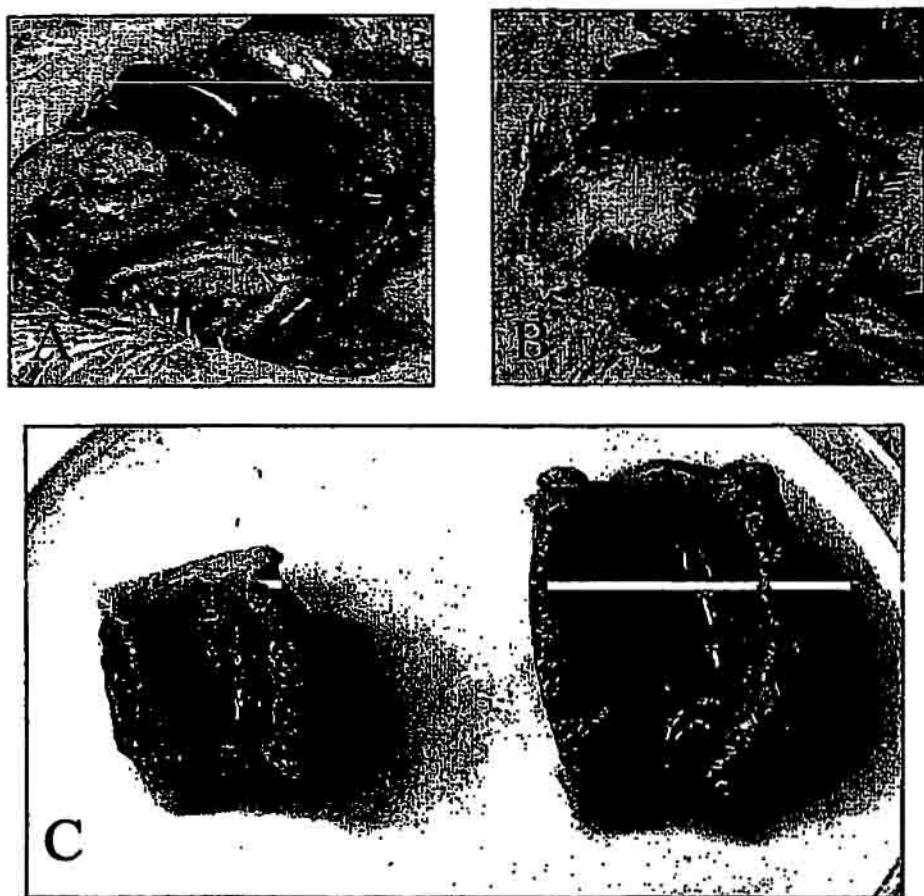


FIG. 13

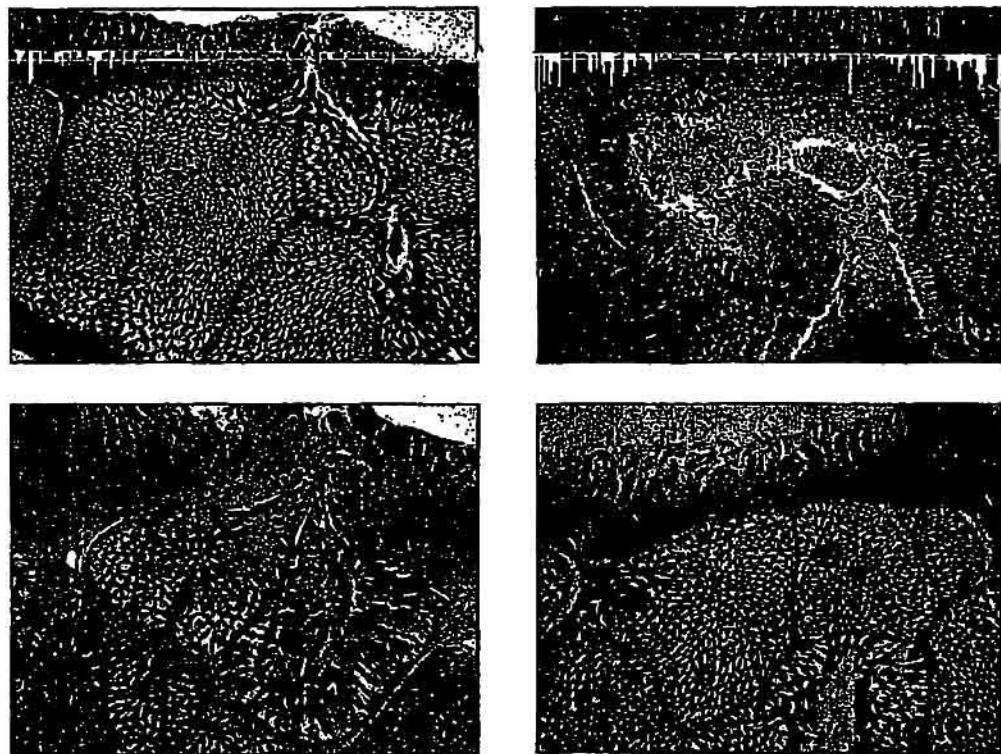


FIG. 14

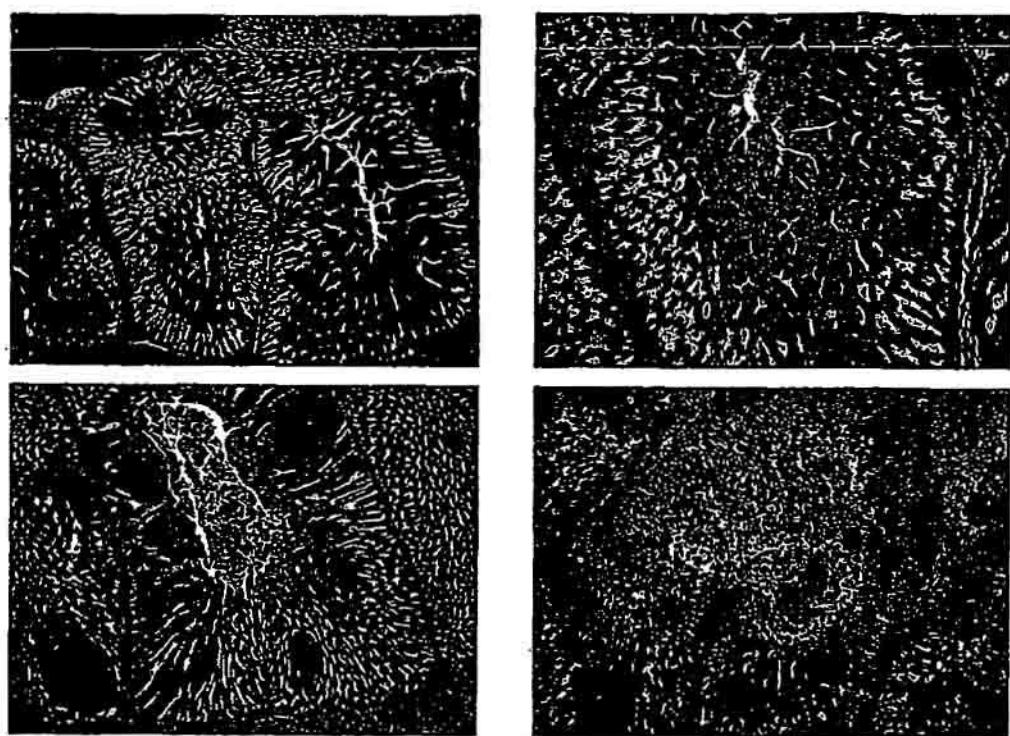


FIG. 15

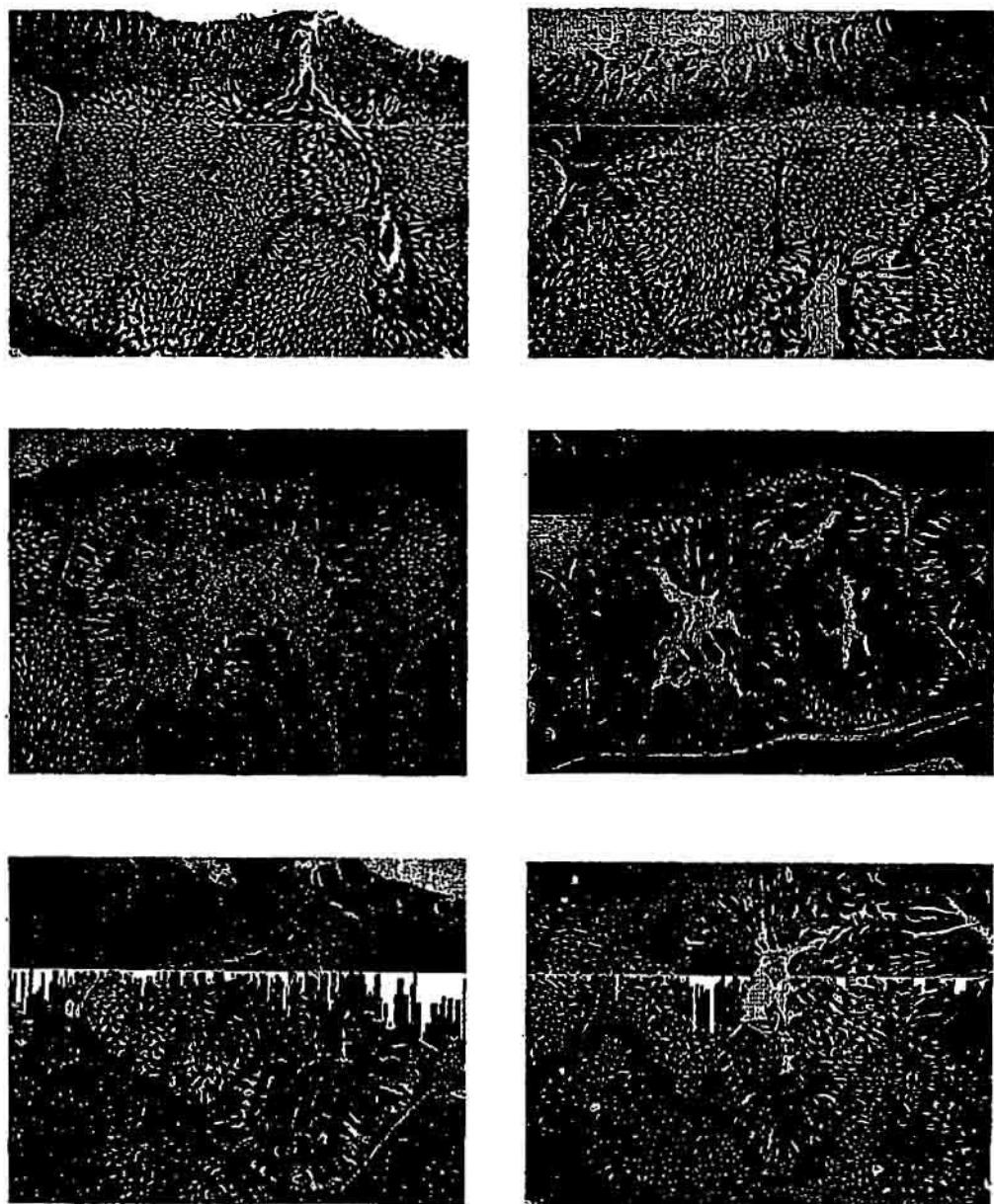


FIG. 16

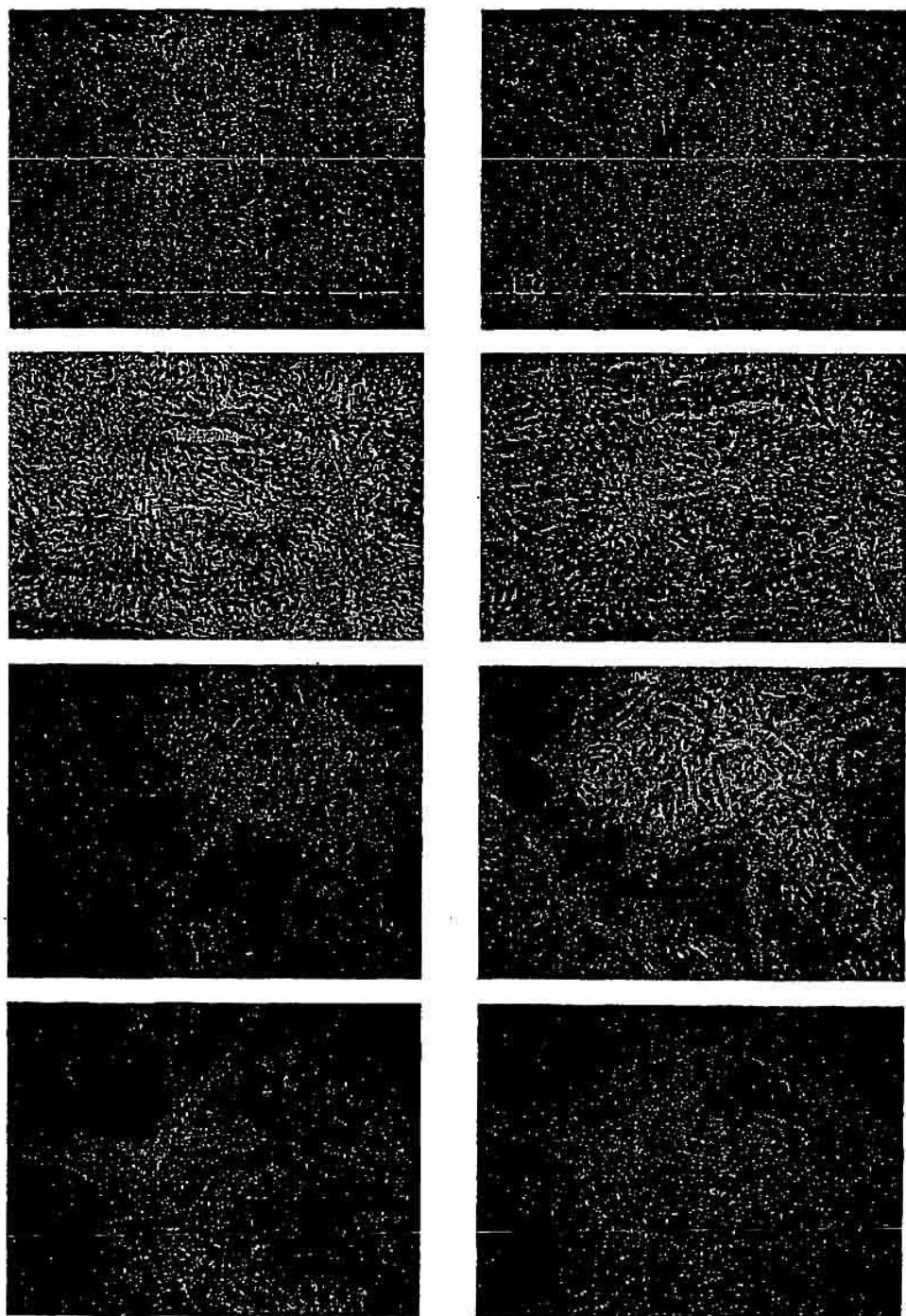


FIG. 17

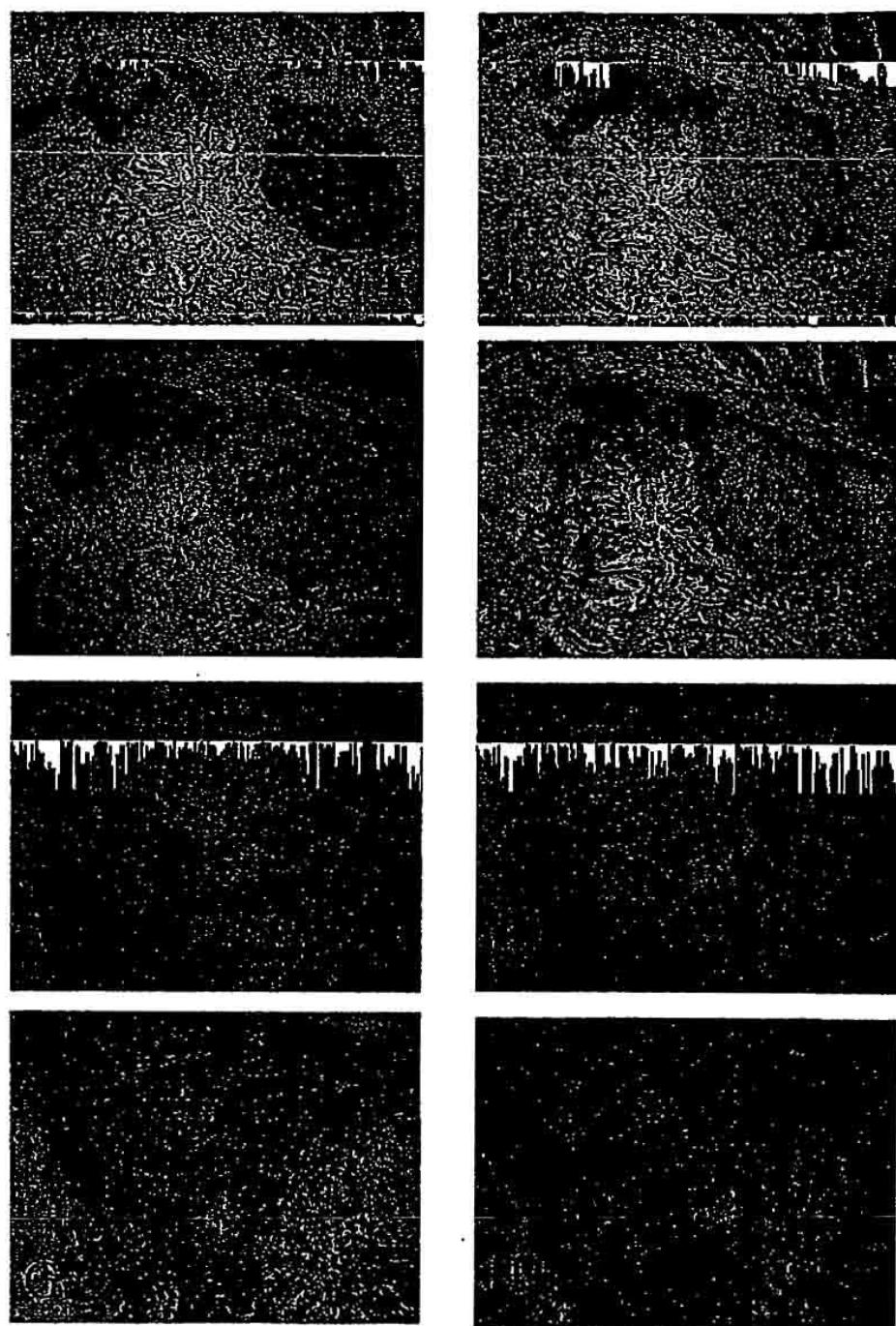


FIG. 18

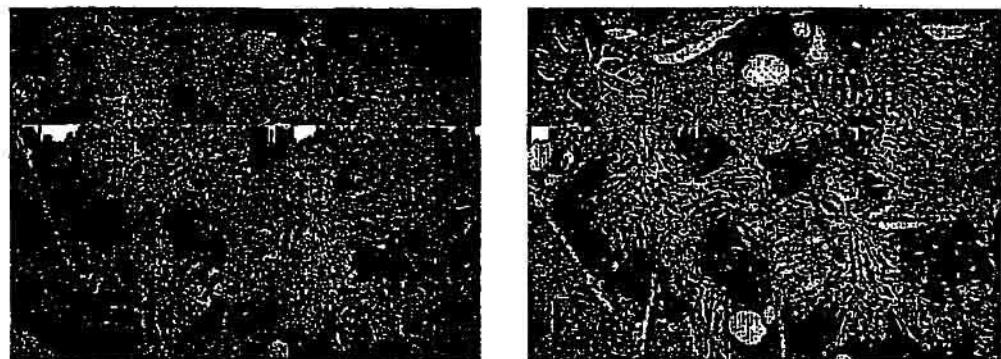


FIG. 19