

30
28j.



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**COMPARACION DE TRES METODOS
SEROLOGICOS PARA LA DETECCION DE
ANTICUERPOS CONTRA LA INFECCION
DE LA BOLSA DE FABRICO**



T E S I S

Que para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

María Antonieta Castelló Leyva

**Asesores: Dr. Benjamín Lucio M.
Dr. Rafael Hernández V.**



México, D. F.

1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
III. MATERIAL Y METODOS	11
IV. RESULTADOS	16
V. DISCUSION	25
VI. LITERATURA CITADA	23

I- RESUMEN

CASTELLO LEYVA, MARIA ANTONIETA. Comparación de tres métodos serológicos para la detección de anticuerpos contra la infección de la bolsa de Fabricio (Bajo la dirección de: Benjamin Lucio Martínez y Rafael Hernández).

El presente trabajo se realizó con el objeto de comparar la sensibilidad, especificidad y el valor predictivo de las prueba de sueroneutralización viral (VSN), precipitación en gel de agar (PA) e Inmunoadsorbencia enzimática (ELISA) para el diagnóstico de la infección de la bolsa de Fabricio (IBF). Se obtuvieron 79 sueros procedentes de aves vacunadas contra IBF y 27 sueros procedentes de aves libres de anticuerpos contra las enfermedades comunes de las aves. A cada suero se le hicieron las tres pruebas antes mencionadas. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo y eficiencia global fueron de 100 % para VSN y ELISA y ligeramente inferiores para PA. Aparentemente la prueba de VSN fué más precisa que ELISA cuando los niveles de anticuerpos eran elevados. Sin embargo se encontró correlación altamente significativa entre los dos métodos. Se concluye que los parámetros estudiados son similares para las tres pruebas.

II- INTRODUCCION

La infección de la Bolsa de Fabricio (IBF), también conocida como enfermedad de Gumboro, enfermedad bursal ó bursitis infecciosa, es una enfermedad viral, aguda, altamente contagiosa, de rápida difusión (9,23), que cursa con la destrucción de los linfocitos B de la bolsa de Fabricio, bazo, timo, glándula de Harder y otros acúmulos linfáticos (9).

Está ampliamente distribuida en todo el mundo, principalmente en zonas de gran producción avícola (9,13), y en la actualidad es considerada como uno de los principales problemas a los que se enfrenta la avicultura (3). En México se encuentra distribuida en casi toda la república (4).

La enfermedad fue observada por primera vez por Cosgrove en 1962 (2) en granjas aledañas al poblado de Gumboro, Delaware, en los Estados Unidos, de ahí que se le conozca también como enfermedad de Gumboro (2,3,9,13).

El agente etiológico es un virus desnudo, icosaédrico, de 55 a 60 nanómetros de diámetro (9, 17). La cápside del virión consta de 4 proteínas estructurales combinadas para darle a ésta un total de 32 capsómeros (9). Presenta una doble cadena de RNA con dos segmentos (17), por lo que ha sido incluido en una nueva familia llamada birnavirus (Birnaviridae) (9).

Se conocen dos serotipos del virus, denominados

serotipo 1 y 2, que han sido aislados de gallinas y patos, y gallinas y pavos respectivamente, causando la enfermedad (9). Se ha informado que existe variación antigénica entre ambos serotipos, pero no se sabe si existe inmunidad cruzada entre ellos (9).

El virus de la IBF es muy estable, razón por la cual tiene una larga persistencia en las casetas aún cuando se sigan procedimientos de lavado y desinfección (17).

La IBF tiene dos formas de presentación, la forma clínica en aves de tres semanas de edad en adelante, y la forma subclínica en aves de menos de tres semanas de edad (18). Se considera que el periodo de mayor susceptibilidad está entre la tercera y la sexta semana de edad, sin embargo, la infección puede presentarse durante toda la etapa funcional de la bolsa de Fabricio en el ave, esto es de la primera a la décima sexta semana de vida del animal (9, 18). De estas dos formas de presentación, la forma subclínica causa mayores pérdidas económicas por tener un efecto inmunosupresor en el ave durante la primera y segunda semana de vida (9, 18). Estas pérdidas económicas pueden ser resumidas como sigue:

-Produce pérdida de peso, retraso en el desarrollo y mala conversión alimenticia (13).

-Produce mortalidad muy variable que va del 1 al 20 o 30 % (13).

-Causa inmunosupresión o inmunodepresión que interfiere

con la respuesta del ave ante brotes de campo o vacunación contra otras enfermedades (3, 9, 13, 18).

-Predispone al ave ante otros padecimientos como son la hepatitis con cuerpos de inclusión, el síndrome anémico hemorrágico y la dermatitis gangrenosa (7, 18).

-Produce decremento en la producción de huevo y menor peso de los pollitos.

-Da lugar a parvadas conocidas como "parvadas problema" (13).

En la forma clínica, las aves presentan plumas erizadas, deshidratación, ataxia, y a la necropsia suelen observarse hemorragias en los músculos de muslos y pechuga, aumento del moco intestinal y palidez renal. La bolsa de Fabricio está aumentada de tamaño, edematosa y contiene un exudado amarillo, de consistencia cremosa a caseosa. En aves con más de cinco días de haber sido infectadas se puede presentar atrofia de la bolsa de Fabricio (9).

Para el diagnóstico es necesario tomar en cuenta varios factores de la parvada como son, la edad del ave, la historia clínica, signos clínicos, mortalidad y hallazgos histopatológicos y a la necropsia (17). Para confirmar este diagnóstico se puede tratar de aislar e identificar el virus a partir de moliendas de bolsa de Fabricio, o se pueden realizar pruebas serológicas (12).

Para la prevención de la IBF, lo más efectivo es la

inmunización tanto activa como pasiva (7, 9, 13, 18, 23).

Existen dos posibilidades para controlar la enfermedad:

- 1- Mediante el uso de vacunas en pollos jóvenes (inmunización activa).
- 2- Aumentando los niveles de anticuerpos maternos en los pollitos (inmunización pasiva).

De estos dos métodos, la inmunización pasiva es actualmente la más aceptada en los Estados Unidos, y es utilizada hasta en un 80 o 90 % más que la inmunización activa para protección del pollo de engorda contra la IBF (7, 19).

Una gran desventaja de la inmunización activa es que el pollito no es capaz de responder a la vacuna tanto de virus muerto emulsionado como de virus vivo modificado hasta que los anticuerpos maternos, en caso de existir, hayan disminuido considerablemente en él (9).

Lo ideal es vacunar a las reproductoras a edad temprana con virus vivo y revacunar entre las 14 y 16 semanas con vacunas de virus muerto emulsionado en aceite, para lograr en éstas aves altos títulos de anticuerpos contra la IBF, mismos que pasarán a través del huevo a la progenie (7, 9, 23). Las reproductoras así vacunadas transmiten anticuerpos pasivos que protegerán al pollito durante las primeras 4 a 6 semanas de vida (13).

Si las reproductoras solo son vacunadas con virus

vivo, la protección del pollito por anticuerpos maternos durará 1 a 3 semanas (13).

La inmunidad pasiva entonces protegerá al pollito contra la inmunosupresión causada por el virus de la IBF, para después dejar de vacunar ó vacunar con una cepa de mediana patogenicidad, protegiendo así de la mortalidad y las pérdidas económicas (13).

Un problema grave en la actualidad es el no saber el día propicio para efectuar la vacunación contra la IBF. Esto es debido a que los títulos de anticuerpos maternos presentes en la parvada son muy variables.

Skeeles (19) señala que los títulos de anticuerpos contra el virus de la IBF, cuantificados con la prueba de sueroneutralización viral, deben ser de 1:64 ó menores para que el pollito responda ante el virus vacunal atenuado, sin embargo, Lucio y Hitchner (13) demuestran que con títulos menores de 1:100 los pollitos son 100% susceptibles a la IBF, y presentan un 40% de protección con títulos entre 1:100 y 1:600.

Para la detección de anticuerpos, se utilizan varias pruebas serológicas. Entre ellas cabe mencionar:

Inmunodifusión ó precipitación en gel de agar (PA).- Esta es una prueba sencilla, rápida, económica y muy utilizada para detectar exposiciones de campo al virus de la IBF, así como para detectar la presencia de anticuerpos maternos en el pollito, aunque se ha informado que presenta

algunas desventajas, como el hecho de ser una prueba cualitativa no muy sensible, que requiere de grandes concentraciones de anticuerpos en la muestra, que suele dar resultados falsos positivos o negativos por vacunación, y más aún, aves negativas a ésta prueba pueden tener altos títulos de anticuerpos neutralizantes (14, 15, 19, 22).

Para realizar la prueba de PA se recomienda utilizar sueros en la primera fase de la infección, es decir entre 15 y 21 días después de iniciado el problema (12).

Existe también una modificación a la técnica original descrita por Hirai en 1972 (8), que es capaz de medir anticuerpos precipitantes en forma cuantitativa y no cualitativamente (16).

Suero neutralización viral (VSN).— Esta es una prueba muy utilizada en la actualidad. Para realizarla se utilizan sueros en cualquier momento de la infección (12). Se trata de una reacción antígeno-anticuerpo que se basa en detectar anticuerpos neutralizantes utilizando diferentes diluciones del suero problema y cantidades de virus constantes (método beta), conforme a la técnica descrita por Lucio y Hitchner en 1978 (13) y Skeeles en 1979 (19).

Tiene como ventajas el ser más sensible y específica que la PA, pero así mismo es más variable, más costosa, más laboriosa, requiere de equipo y personal especializado y tarda más tiempo en realizarse (16, 17, 22).

ELISA.- En los últimos años se ha desarrollado un tipo de prueba de diagnóstico serológico que detecta una gran cantidad de patógenos, incluyendo virus, bacterias, parásitos, micoplasmas y clamidias (15, 21, 25).

Esta es una prueba enzimática de inmunoadsorción que detecta anticuerpos, en éste caso virales (3). ELISA, que es su abreviatura en inglés (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), se ha convertido en los últimos años, en una técnica ampliamente utilizada, y de gran importancia para inspeccionar la salud de las aves, determinando el estado inmune de éstas, hayan sido vacunadas o no (10).

La técnica de ELISA parece ofrecer muchas ventajas sobre las técnicas convencionales de diagnóstico de anticuerpos (10, 11, 15, 16). Es una prueba cuantitativa, semiautomatizada y requiere menor tiempo que otras para realizarse (6, 11, 15, 20). Además no se necesita trabajar bajo condiciones de esterilidad extrema (21), no requiere de preparación de células o inoculación de embriones (21), requiere solo de una pequeña cantidad de suero (1 microlitro) (22), y debido a ello es menos costosa (La inversión fuerte se realiza al principio solamente, al comprar el espectrofotómetro) (25).

La simplicidad y economía de ELISA, sin embargo, depende de la disponibilidad de los reactivos necesarios para la prueba, del tipo de equipo de laboratorio

disponible, y de personal capacitado para llevar a cabo ésta prueba (10). También sería deseable contar con un estándar de referencia para ELISA, que permitiera una evaluación más crítica de los resultados y la comparación de los mismos con pruebas llevadas a cabo en varios laboratorios, así como su correlación con las pruebas de diagnóstico serológico tradicionalmente usadas (10, 21).

ELISA puede ser utilizada para detectar antígenos (método directo) o para detectar anticuerpos (método indirecto) (6, 11, 15, 20). Para cuantificar los anticuerpos es necesario contar con un suero testigo o referencia positivo y uno negativo, los cuales se comparan con los sueros problema mediante un cálculo matemático. Las muestras son leídas por un espectrofotómetro, que puede conectarse a una calculadora programable, la cual correlaciona el grado de absorbancia con el título o cantidad de anticuerpos presentes en el suero. La intensidad de color de la reacción, dada por un agente cromógeno, es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos ligados a enzimas que reaccionan con los anticuerpos del suero unidos al antígeno específico fijo a la fase sólida de cada pozo en la microplaca (10, 11, 15, 21, 25).

El objetivo del presente trabajo fué comparar la eficiencia diagnóstica de las pruebas de VSN, PA y ELISA para la IBF mediante la determinación de la sensibilidad,

especificidad y el valor predictivo de cada una a través del modelo matemático descrito por Galen (5).

III- MATERIAL Y METODOS

Obtención del Material Biológico

Sueros con anticuerpos contra la IBF .- Estos se obtuvieron a partir de aves progenitoras pesadas localizadas en granjas de los estados de Morelos (56 animales) y Coahuila (23 animales), las cuales habían estado sujetas al siguiente calendario de vacunación contra la IBF:

MORELOS:

- Virus vivo, por vía ocular a los 3 días de edad.
- Virus vivo, por vía ocular a las 10 semanas de edad.
- Virus muerto emulsionado, por vía parenteral a las 22 semanas.

Estas aves, provenientes de 3 casetas diferentes, fueron sangradas a las 43 semanas de edad en la caseta 1 (20 aves), a las 60 semanas de edad en la caseta 2 (19 aves), y a las 26 semanas de edad en la caseta 3 (17 aves).

COAHUILA:

- Virus vivo en agua de bebida a los 21 días de edad.
- Virus muerto emulsionado, por vía parenteral a las 21 semanas.
- Virus muerto emulsionado, por vía parenteral a las 45 semanas.

Estas aves fueron sangradas a las 51 semanas de edad.

Sueros sin anticuerpos contra la IBF.- Estos se clasificaron en dos subgrupos que fueron:

a) Sueros libres de anticuerpos contra las enfermedades comunes de las aves- Se obtuvieron a partir de 11 pollitos de 10 días de edad, libres de patógenos específicos (SPF), y 8 gallitos SPF de la raza Leghorn, de 6 semanas de edad.

b) Sueros positivos a la enfermedad de Newcastle (ENC) y a la bronquitis infecciosa (BI), pero negativos a la IBF; se obtuvieron a partir de 8 gallitos de la raza Leghorn, de 6 semanas de edad, libres de patógenos específicos, pero vacunados a las cuatro semanas de edad con vacuna de virus muerto emulsionado ENC-BI. Estos 8 sueros, junto con los 8 sueros de gallitos libres de patógenos específicos, habían sido previamente analizados por pruebas de inhibición de la hemaglutinación viral contra la ENC y la BI para determinar los títulos de anticuerpos contra estas dos enfermedades.

En todos los casos, una vez obtenido el suero, se procedió a centrifugarlo y decantarlo, separándolo en dos porciones, de las cuales una se inactivó a 56 grados

centígrados por 30 minutos, para realizar las pruebas de VSN y PA, y la otra fracción no fué inactivada y se utilizó para la prueba de ELISA.

Descripción de los métodos-

Antes de trabajarse, los sueros permanecieron en congelación por espacio de 1 a 2 semanas. Se procedió a trabajar la prueba de PA conforme al método descrito por Hirai (8); la prueba de VSN conforme a la técnica descrita por Lucio y Hitchner (13); y la prueba de ELISA conforme al método descrito por Marquardt (25).

Análisis de los datos.

En la prueba de VSN, el título se obtiene a partir de la máxima dilución del suero que es aún capaz de evitar la lisis celular. En la prueba de PA, se consideró un suero como positivo si hubo formación de bandas de precipitación debidas a la reacción antígeno anticuerpo.

En el caso de ELISA, la determinación del título se realiza mediante la siguiente fórmula*:

Título del suero = Antilog de $(1.09 (\log S/P) + 3.36)$

donde $S/P = (AS - AMCN) / (AMCP - AMCN)$

AS = Absorbancia del suero problema.

AMCN = Absorbancia promedio del control negativo.

AMCP = Absorbancia promedio del control positivo

* Agritech. Infectious Bursal Disease Antibody Test Kit (Manual de procedimientos).

Se obtuvieron la sensibilidad, especificidad, valor predictivo y eficiencia global de cada una de las tres pruebas utilizadas conforme al método descrito por Galen (5). Las fórmulas para éste análisis son las siguientes:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{PV}{PV + FN} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{NV}{FP + NV} \times 100$$

$$\text{Valor Predictivo de Resultados Positivos} = \frac{PV}{PV + FP} \times 100$$

$$\text{Valor Predictivo de Resultados Negativos} = \frac{NV}{NV + FN} \times 100$$

$$\text{Eficiencia Global del Método} = \frac{PV + NV}{PV + FP + FN + NV} \times 100$$

Donde:

PV = Positivo verdadero - número de sueros positivos correctamente identificados por la prueba.

FP = Falso Positivo - número de sueros negativos incorrectamente clasificados como positivos por la prueba.

NV = Negativo Verdadero- número de sueros negativos correctamente identificados por la prueba.

FN = Falso Negativo- número de sueros positivos incorrectamente clasificados como negativos por la prueba.

También, se correlacionó la prueba de VSN con la prueba de ELISA mediante correlación no paramétrica.

IV- RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestran los títulos promedio obtenidos mediante las pruebas de ELISA y VSN en aves positivas y negativas. En los animales positivos, los títulos obtenidos mediante VSN fueron mayores a los obtenidos mediante ELISA ($p < 0.001$), y los títulos de los sueros obtenidos en Coahuila fueron superiores a los de Morelos para ambas pruebas ($p < 0.001$). En las aves de Morelos, los títulos obtenidos mediante VSN fueron diferentes en las distintas casetas ($p < 0.001$), esta diferencia no fué detectada por ELISA. El coeficiente de variación de la prueba de VSN fué muy superior al de la prueba de ELISA. Para los animales negativos no se realizaron comparaciones estadísticas debido a que los títulos fueron muy bajos en todos los casos.

El número de sueros FP, FN, VP y VN para cada prueba se muestran en el cuadro 2. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo de los resultados positivos, valor predictivo de los resultados negativos, y la eficiencia global del método para cada prueba se muestran en el cuadro 3. La única prueba que no obtuvo valores del 100 % para todos los parámetros fue PA. Se obtuvo una correlación de 0.44 ($p < 0.001$) entre las pruebas de ELISA y VSN al realizar la prueba de correlación no paramétrica de Spearman.

Cuadro 1. Títulos promedio obtenidos con las pruebas serológicas de ELISA y VSN en aves con o sin anticuerpos contra la infección de la bolsa de Fabricio.

	P R U E B A	
	ELISA	VSN
CON ANTICUERPOS*		
MORELOS		
caseta 1	4110 ± 811 ^a (19.8 %)	12620 ± 10218 ^a (80.9 %)
caseta 2	3828 ± 1117 ^a (29.2 %)	3975 ± 3008 ^b (75.6 %)
caseta 3	4371 ± 2161 ^a (49.4 %)	5520 ± 4915 ^b (89.0 %)
Promedio	4111 ± 1411 (34.3 %)	7535 ± 7679 (101.9 %)
COAHUILA	6195 ± 1003 ^b (16.2 %)	12466 ± 7589 ^a (60.8 %)
SIN ANTICUERPOS**		
NO VACUNADAS	25 ± 38	0 ± 0
VACUNADAS CONTRA OTRAS ENFERMEDADES	64 ± 22	0 ± 0

* Aves vacunadas contra la IBF.

** Aves libres de patógenos específicos.

- Los valores en la misma columna, pero con diferente

literal son significativamente diferentes ($p < 0.01$).

- Los valores son $\bar{X} \pm d.e.$

- Los valores entre paréntesis son coeficientes de variación.

Cuadro 2. Número de sueros identificados como falsos positivos (FP), falsos negativos (FN), verdaderos positivos (VP) y verdaderos negativos (VN) mediante la utilización de tres pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra la IBF.

	P R U E B A		
	ELISA	VSN	PA
FP	0	0	0
FN	0	0	2
VP	79	79	77
VN	27	27	27

Cuadro 3. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo de los resultados positivos (VPRP), valor predictivo de los resultados negativos (VPRN), y eficiencia global del método calculados para tres diferentes pruebas serológicas utilizadas para la detección de anticuerpos contra la IBF.

	P R U E B A		
	ELISA	VSN	PA
SENSIBILIDAD (%)	100	100	97.4
ESPECIFICIDAD (%)	100	100	100
VPRP (%)	100	100	100
VPRN (%)	100	100	93.1
EGM (%)	100	100	98.1

V- DISCUSSION

En el presente trabajo, los títulos obtenidos mediante VSN fueron mayores a los obtenidos por ELISA, sin embargo es necesario tomar en cuenta que el título de VSN está expresando una dilución, mientras que el de ELISA es el resultado de cálculos aritméticos que expresan la relación entre la absorbancia del suero problema con el control positivo y el control negativo, por lo que la comparación de ambos títulos no es válida. Esto ha sido discutido por Nicholas y col. (16), quienes hacen notar que para poder comparar los títulos de ELISA con los de VSN, se tendría que realizar la prueba de ELISA con diluciones seriadas, lo cual eliminaría las ventajas de esta técnica. A pesar de estas consideraciones, la correlación encontrada en el presente trabajo entre ambas pruebas, es altamente significativa.

Los títulos de los sueros en la caseta número 1 de Morelos, fueron superiores a los de las otras dos casetas de ese mismo estado al ser evaluados mediante VSN; esta diferencia no fue detectada por la prueba de ELISA. Esto podría indicar que ELISA no es capaz de detectar diferencias en los niveles de anticuerpos cuando éstos sobrepasan cierto límite. Como apoyo a lo anterior, podemos señalar que aún dentro de cada caseta, la prueba de VSN detectó más variación (indicada por un mayor coeficiente de variación) que la prueba de ELISA.

Los títulos obtenidos con sueros de aves provenientes de Coahuila fueron superiores a los de Morelos al utilizar tanto la prueba de ELISA como la de VSN. Esto quizá sea debido a diferencias en el calendario de vacunación, cepa vacunal, edad de las aves al obtenerse los sueros, estirpe de los animales u otra variables.

ELISA, como cualquier método serológico, presenta cierta variabilidad. Debido a esto, y al método utilizado para calcular los títulos, el promedio de los sueros negativos es un valor ligeramente positivo. Esto se debe a que cualquier muestra negativa que por variación aleatoria resulte en una proporción S/P ligeramente superior a 1 resultará en un valor positivo, mientras que las muestras que por la misma variación aleatoria resulten en una proporción S/P inferior a 1, darán un título de 1, y no un valor negativo, por lo que al promediar los resultados de varias muestras negativas, el título promedio siempre será ligeramente positivo.

Se debe señalar que el único método en este trabajo que dió resultados falsos negativos fue la PA (Cuadro 2), por lo que los parámetros de esta prueba fueron inferiores a los de ELISA y VSN (Cuadro 3). Por otra parte, los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo y eficiencia global fueron similares para ELISA y VSN. Esto concuerda con los resultados de Marquardt y col. (15) y de Nicholas y col. (16), los cuales encontraron sensibilidad

similar para ambas pruebas. En contraste, Howie y Thorsen, citados por Nicholas y col (16) encontraron que ELISA fué más sensible que VSN para la detección de anticuerpos contra IBF ; así mismo, Buscaglia (1) encontró que ELISA fué más sensible que VSN en el diagnóstico de viruela aviar.

Consideramos que la sensibilidad y especificidad obtenidas en este trabajo tanto para la prueba de ELISA como para VSN son superiores a las que se encontrarían al realizar estas pruebas rutinariamente. Esto es porque los animales utilizados en el presente trabajo eran totalmente negativos (aves SPF) o animales con títulos elevados debido a programas rigurosos de vacunación. Tanto la sensibilidad como la especificidad, podrían verse afectados al incluir animales con títulos intermedios.

Se concluye que los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo y eficiencia de la prueba de ELISA para IBF son iguales o superiores a los de las pruebas de VSN o PA, aunque cuando los niveles de anticuerpos son muy elevados, la prueba de ELISA pierde cierta capacidad de discriminación.

VI- LITERATURA CITADA

1. Buscaglia, C., Bankowski, R. A. and Miers, L.: Cell culture virus neutralization test and enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of immunity in chickens against fowl pox. Avian Dis. 29: 673-680. (1984).
2. Cosgrove, A. S.: An apparently new disease of chickens. Avian Dis. 6: 385-389 (1972).
3. Dekich, A. M. and Lester, L. T.: Practical approach to IBD control. Poult. Dig. (1986)
4. Fernández, R. P. and Lucio, M. B.: Identification of the infectious bursal disease virus in Mexico. Avian Dis. 16: 241-248. (1972).
5. Galen, S. R.: New math in the lab. Predictive value theory. Diagnostic Medicine (1979).
6. Garret, J. K., Davis, R. B. and Ragland, W. L.: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to avian encephalomyelitis virus in chickens. Avian Dis. 28: 117-130 (1983).
7. Giambone, J. J. and Yu, M.: Field trials with an oil emulsion infectious bursal disease vaccine in broiler breeder pullets. Poult. Sci. 61: 1823-1827 (1982).
8. Hirai, K. and Shimakura, S.: Immunodiffusion reaction to avian infectious bursal disease virus. Avian Dis. 16: 961-964 (1972).
9. Hofstad, M. S., Barnes, H. J., Calnek, B. W., Reid, W. M. and Yoder, H. W.: Disease of Poultry. 8th. Ed. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, (1984).
10. Kumar, S., Sarma, G. y Boclair, W.: El papel de ELISA. Industria Avícola: 30-32. (1986).
11. Leinikki, P. O. and Posila, S.: Quantitative, semiautomated enzyme-linked immunosorbent assay for viral antibodies. J. Inf. Dis. 136: 5294-5299. (1977).
12. Lucio, M. B.: Guía de métodos de diagnóstico de laboratorio para las enfermedades virales comunes en las gallinas. Memorias del curso "Apoyo del laboratorio al diagnóstico". Monterrey, N.L., pp. 79-85. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. (1985).

13. Lucio, M. B. and Hitchner, B. S.: Infectious bursal disease emulsified vaccine: Effect upon neutralizing-antibody levels in the dam and subsequent protection. Avian Dis. **23**: 466-478. (1979).
14. Lukert, P. D. and Davis, R. B.: Infectious bursal disease virus: Growth and characterization in cell cultures. Avian Dis. **18**: 243-250. (1974).
15. Marquardt, W. W., Johnson, R. B., Odenwald, W. F. and Schlotthober, B. A.: An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. Avian Dis. **24**: 375-385. (1979).
16. Nicholas, R. A., Reed, N. E., Wood, G. W., Herbert, C. N., Moskett, J. C. and Thornton, D. H.: Detection of antibodies against infectious bursal disease virus: A comparison of three serological methods. Res. Vet. Sci. **38**: 189-192. (1985).
17. Okoye, J. O. A. and Phil, M.: Infectious bursal disease of chickens. Vet. Bull. **54**: 425-465 (1984).
18. Rosenberger, J. K.: Salud de la parvada: Habrán pronto mejores vacunas para control de gumboro. Industria Avicola: 40-45 (1981).
19. Skeeles, J. K., Lukert, P. D., Fletcher, O. J. and Leonard, J. D.: Immunization studies with a cell-culture adapted infectious bursal disease virus. Avian Dis. **23**: 456-465. (1978).
20. Solano, W., Giambone, J. J. and Panangala, V. S.: Comparison of kinetic-based enzyme-linked immunosorbent assay (KELISA) and virus-neutralization test for infectious bursal disease virus. I. Quantitation of antibody in white Leghorn hens. Avian Dis. **29**: 662-671. (1984).
21. Villegas, P.: La prueba de ELISA. Avicultura profesional **3**: 117-118. (1985).
22. Weisman, J. and Hitchner, S. B.: Virus neutralization versus agar-gel precipitin test for detecting serological response to infectious bursal disease virus. Avian Dis. **22**: 598-603 (1978).
23. Wyeth, P. J. and Chettle, N.: Comparison of the efficacy of four inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccines. Vet. Rec. **110**: 359-361. (1982).

24. You-Quan Cheng, Lee, L. F., Smith, E. J. and Witter, R. L.: An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Marek's disease virus. Avian Dis. **28**: 900-910. (1984).
25. Zellen, G.: ELISA: La prueba inmunoabsorbente de enzima ligada. Industria Avicola :26-28 (1986).