

86
2es



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ESTUDIO DE LA POTENCIA DE UNA VACUNA
EXPERIMENTAL ELABORADA EN FIBROBLASTOS
DE POLLO, INACTIVADA Y EN EMULSION OLEOSA
CONTRA LA HEPATITIS CON CUERPOS DE INCLUSION
* HCI EMULSIONADA * EN POLLO DE ENGORDA**

PRESENTADO ANTE LA DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DE LA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DE LA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

POR

MANUEL ALEJANDRO FLORES GARCIA

ASESORES: MVZ HORACIO RAMIREZ JIMENEZ

MVZ JUAN JOSE ENRIQUEZ OCAÑA



MEXICO, D. F.

OCTUBRE 1995

FALLA DE ORIGEN



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.

TESIS SIN PAGINACION

COMPLETA LA INFORMACION

A Dios.....

que me dió la oportunidad y la capacidad de culminar

una etapa más en la vida

A mi madre....

**que supo mantener este trozo de carne
a pesar de las adversidades**

A mi padre....

**por el apoyo prestado
durante todos estos años**

A Nora....

**de quien aprendí el deseo
de superación y de éxito**

A Erika....

**de quien aprendí
a valorar las cosas**

Al Dr. Horacio Ramírez Jiménez

**por su constancia, empuje y paciencia para culminar
un trabajo tan ambicioso como este**

Al Dr. Juan José Enriquez Ocaña

**a quien admiro por su vocación de amigo, profesor
y su excepcional calidad humana**

57.

Al honorable jurado:

Dra. Laura Patricia Noé Martínez

Dr. José Antonio Quintana López

Dra. Elizabeth Morales Salinas

Dr. Ezequiel Sánchez Ramírez

Dr. Raymundo Iturbe Ramírez

**que han llegado tan lejos y su inicio
fue semejante al que yo hoy emprendo**

A Lourdes Valerio León

que me devolviste la vida

y la capacidad de percibir mi entorno

Gracias abuela

Al MC Antonio Díaz Cruz

**por su incondicional amistad
y la primer oportunidad de desarrollarme
en la noble labor de la Academia**

Gracias

Al bebé compañero entrañable

Al Coro Comunidades.....

de quien conservo uno de mis mejores tesoros

A mis camales Chucho y Galán..... en las buenas y en las malas

Al Padre Virgilio Ruiz..... signo de disciplina y fortaleza

Al Dr. Raymundo Martínez Peña..... mi segundo padre

Al Dr. Luis Jorge Alanís Calderón..... símbolo del "si se puede"

Y a los Beatles.....

por dejarme compartir su forma de ver al mundo

Todos los planes y proyectos
son sólo sueños
lo único que realmente deberían saber
es hacer el amor
no espero que tú comprendas
ahora que el reino de los cielos
está en tus manos
no espero que despiertes de tu sueño
demasiado tarde para llorar
ahora parece ser

Real love - John Lennon

RESUMEN

PMVZ Manuel Alejandro Flores García. ESTUDIO DE LA POTENCIA DE UNA VACUNA EXPERIMENTAL ELABORADA EN FIBROBLASTOS DE POLLO INACTIVADA Y EN EMULSION OLEOSA CONTRA LA HEPATITIS CON CUERPOS DE INCLUSION * HCI EMULSIONADA* EN POLLO DE ENGORDA. (Bajo la asesoría de MVZ Horacio Ramírez Jiménez y de MVZ Juan José Enríquez Ocaña).

El presente trabajo se realizó con el objeto de probar la potencia de una vacuna experimental contra la hepatitis con cuerpos de inclusión en pollo de engorda en México. Se utilizaron 90 pollos de 1 día de edad distribuidos en 6 grupos de 15 aves cada uno. Los grupos 1,2,3 se vacunaron al día de edad y se desafiaron a las 4 semanas y los grupos 4,5,6 solamente se desafiaron a la misma edad. Las aves se manejaron por separado y en unidades de aislamiento con la misma fuente de agua y de alimento con concentraciones inferiores a 20 ppb de aflatoxinas. Los resultados obtenidos en 56 días de experimentación indicaron una protección vacunal del 91% contra la mortalidad, presencia de cuerpos de inclusión intranucleares en el hígado y su confirmación por inmunofluorescencia en los grupos 1,2 y 3, mientras que en los grupos 4,5,6 murieron el 66.6% de los pollos. Estos resultados permiten sugerir el uso de esta vacuna experimental como alternativa profiláctica que evite las pérdidas económicas y productivas ocasionadas por HCI en México.

INTRODUCCION. La hepatitis con cuerpos de inclusión (HCI) es una enfermedad que afecta al pollo de engorda frecuentemente entre 4 a 6 semanas de edad, a pollas de reposición a las nueve (4,20) y cuyo agente etiológico pertenece al grupo 1 de los Adenovirus aviares de los cuales se reconocen al menos doce serotipos (4,5,12,21,32).

El aviadenovirus involucrado está constituido por una cápside icosaédrica de 70 a 90 nanómetros de diámetro, compuesta de 252 capsómeros, de los cuales 240 ocupan las caras y bordes de los 20 triángulos equiláteros del icosaedro y 12 pentámeros que ocupan los vértices. De cada pentámero se proyecta una fibra de 20 a 50 nanómetros de longitud engrosada en su porción terminal capaz de aglutinar eritrocitos de rata, mono y humano. Existen así mismo numerosas proteínas estructurales menores, algunas de las cuales están asociadas con la cápside y algunas con la zona central que contiene además el genoma viral. Este es un ADN lineal de doble cadena con un peso de 20 a 25 millones de daltones, 30 a 37 kpb de tamaño con terminales repetidas e invertidas y asociada covalentemente a una proteína de 55 k en cada terminal 5' y le confiere la capacidad de ser infecciosa (15).

Humboldt y Frazier describieron por primera vez la HCI en 1963 como hallazgo científico debido a que no provocó mortalidad superior al 0.5% (18)

En México se informó por primera vez en 1974 por Antillón, A. y Lucio, B. en pollos de engorda de 6 semanas de edad con una morbilidad del 2% y mortalidad del 0.5% lo que no se consideró de importancia económica ni productiva (2,18).

A partir de ésta fecha comenzaron a informarse mortalidades más altas por HCl en la literatura mundial. Petit en Canadá del 7%, en 1972 (21) ; Mac Pherson en Inglaterra del 13.5%, en 1974 (10); Bains en Nueva Zelanda del 5.3% y 32.3% en 1977 (10) ; en 1989, Fernández, M. en Perú informó brotes con mortalidades del 5 al 56% (16).

En México a finales de 1989, Ramírez, H. y col. consideraron a la HCl como responsable de la presentación de mortalidades del 17.5% al 34.9% en pollo de engorda a partir de la cuarta semana de edad en el Valle de México, Bajío y Jalisco (1).

Es precisamente el incremento súbito de la mortalidad por secciones lo que delata la presencia de la infección (4,11,14,19,20) ya que la signología no se utiliza como herramienta diagnóstica por ser común a otras enfermedades (8,10,11,25). Ocasionalmente se observa ictericia generalizada (4,7,22,25) anorexia (8,20) y diarrea verdosa (16,22,30).

Debido a que el curso de la enfermedad en su forma individual es sumamente rápido, de 36 a 72 horas, las aves manifiestan poco tiempo antes de morir una ligera depresión (2,4,7,10,20,26).

A la necropsia se aprecia hepatomegalia y focos amarillos en su superficie (19,21,22,23,26) hidropericardio y edema pulmonar (1,8,21) hemorragias en

piel (20) atrofia de bazo y timo (4,20) nefromegalia (4) así como atrofia y hemorragias en la Bolsa de Fabricio (14,19,25).

Las pruebas contundentes de diagnóstico son el hallazgo histopatológico de cuerpos de inclusión intranucleares (CIIN) en los hepatocitos (4,7,8,16,17,20,22,23,24,28) e inmunofluorescencia directa (4,5,8,20) y las pruebas complementarias del mismo son el aislamiento e identificación del agente en embriones de pollo o cultivo celular (1,5,6,24,27,28,30,32) hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación con eritrocitos de rata (1,3,12,32) fijación de complemento indirecta (1,20,24,25) inmunodifusión en agar (5,6,12,20,26,32) microsuerovirusneutralización en cultivo celular método beta (1) y microscopía electrónica (20,23,26,28).

En la literatura la HCI ha sido considerada como enfermedad secundaria (2,4,11,14,19,20) relacionándose su presentación en pollos que han sufrido enfermedades inmunosupresoras como Gumboro y anemia Infecciosa (11,14,27) sin embargo Christensen en Nueva Zelanda (10) la informa por primera vez como patógeno primario hallando brotes con mortalidades del 30% sin hallar relación alguna con anemia Infecciosa ni Gumboro, ya que Nueva Zelanda se considera libre de esta última.

Las observaciones clínicas y de laboratorio en México señalan que como causa más frecuente para la presentación clínica de la HCI se encuentran agentes en el alimento de probada actividad inmunosupresora tales como las micotoxinas (29) principalmente aflatoxinas en cantidades superiores a 20 partes por billón, quienes son capaces de inhibir la actividad del complemento y la producción de interferón, ligados con la disminución de la actividad de los linfocitos T por lo que

bloquean parcialmente la inmunidad celular del ave (14,29). Si además la HCI se complica con otras enfermedades tales como infecciones respiratorias (11) o dermatitis gangrenosa, la duración y severidad se extienden notablemente (1,7,10,11,16).

El control de la infección se limita a

1. Utilizar medidas higiénicas estrictas, utilizando desinfectantes a base de compuestos yodados o hipoclorito de sodio, aunque con resultados variables (1)

2. Su transmisión vertical (27,31) encierra otro grave peligro, recomendándose mantener en estricto control serológico a las reproductoras mediante pruebas de SVN e inhibición de la hemoaglutinación método beta (31)

3. Otra alternativa es el empleo de vacunas para proveer un adecuado estado de inmunización a las parvadas.

Fadyly y Winterfield (13) prepararon una vacuna de virus activo a partir de la cepa Tipton inmunizando pollos libres de patógenos específicos a los 3 días de edad, bajo desafío a las 4 semanas, la evaluación de la vacuna se efectuó considerando la cantidad e intensidad de lesiones macroscópicas en hígado y la respuesta serológica, obteniendo una protección del 40%.

En 1977, Winterfield y col. (33) elaboraron en huevos embrionados vacunas atenuadas mono y polivalentes para aplicación ocular desafiando a los animales 4 semanas después y valiéndose del grado de lesiones macroscópicas en hígado y respuesta serológica para evaluar la vacuna, cuya protección alcanzó el 50%.

En Chile, 1988, Cubillos, J. A. manifiesta la elaboración de vacunas mono y polivalentes de virus activo en embriones de pollo y en cultivo celular, obteniendo una protección del 60% (9).

En México la primer vacuna contra HCl se elaboró a partir de un virus aislado de un brote natural de HCl en la granja San Vicente ubicada en Chicoloapan, Edo. de México, se aisló e identificó en 1990 en el laboratorio de Virología de la U.N.A.M. (Ramírez, H., Retana, A. y Altamirano, R.), y para su purificación y caracterización fue sometido en el Centro de Investigación Pecuario Privado (CIPP) a las siguientes pruebas. Hemoaglutinación con eritrocitos de rata (1,3,12,32) observando una actividad asociada completa; con eritrocitos de borrego fue incompleta; mientras que con eritrocitos de humano, pollo, ternero y equino no hubo hemoaglutinación; sin embargo, la sedimentación observada obligó a descartar la presencia del virus de Newcastle a través de la inhibición de la hemoaglutinación, presentándose un título de 160. Por ello fue necesario un reaislamiento en células renales de pollo y células hepáticas de embrión de pollo (1,5,6,24,28,30,32) en tres series de 20 cultivos para cada uno observando efecto citopático entre 36 y 120 horas (promedio de 96) con una gran cantidad de cuerpos de inclusión basófilos en los núcleos, halo en la periferia y necrosis (17). También realizaron cultivos en embriones de guajolotes (4,20) en células de cricetos (20,32) y fibroblastos humanos línea A1 (4,5,12), provocando los mismos efectos citopáticos y necrosis en un promedio de 120 horas. Así mismo inocularon embriones de pollo de 12 días de edad por membrana corioalantoidea (1,4,6,20) con mortalidad del 90% en 5 días, grandes focos de hemorragias y formación de placas en la misma. Realizaron por triplicado los procedimientos de cultivo, para confirmar las

características del virus, encontrando en promedio efectos citopáticos en 86.4% de los casos. Obtuvieron un concentrado de los mismos y procedieron a utilizarlos en doce cultivos más, encontrando las mismas características de desarrollo con un porcentaje de repetición del 87.1%. Dicho material se liofilizó y en Mayo de 1991 fue caracterizado en la Universidad de Davis, Cal. como Adenovirus Aviar Grupo 1 y diferente a 54 cepas aisladas en los Estados Unidos

Una vez identificado como serotipo propio del país, Enríquez, O.J.J. le realizó los siguientes estudios:

VIRUS DESAFIO. Virus activo cepa JJEHRJ1290 con un título de $10^{5.0}$ DICC 50% por dosis en solución salina c.b.p. 0.5 ml. La dosis de desafío (9) la determinó inoculando 4 grupos de 10 pollos libres de anticuerpos contra HCl de 4 semanas de edad por vía intramuscular con títulos virales de $10^{3.0}$, $10^{4.0}$, $10^{5.0}$, $10^{6.0}$ DICC 50%, presentándose cuerpos de inclusión en 0 de 10, 1 de 10, 7 de 10 y 10 de 10 pollos por grupo respectivamente.

VIRUS VACUNAL. Inactivado con beta propiolactona con un título mínimo de $10^{8.0}$ DICC 50%, el título viral lo determinó utilizando 3 grupos de pollos de engorda de 4 semanas de edad libres de anticuerpos contra HCl inoculando diferentes dosis $10^{3.0}$, $10^{6.0}$, $10^{8.0}$ DICC 50%. Tres semanas después se desafiaron con el virus activo homólogo por vía intramuscular con un título de $10^{6.0}$ DICC 50% y se determinaron los niveles de anticuerpos por SVN (3,4,10) siendo estos de 1:16, 1:32 y 1:128 por grupo respectivamente, considerando que el título óptimo de la vacuna es de $10^{8.0}$ DICC 50%. Se comprobó evaluando en los mismos grupos la presencia de cuerpos de inclusión en

características del virus, encontrando en promedio efectos citopáticos en 86.4% de los casos. Obtuvieron un concentrado de los mismos y procedieron a utilizarlos en doce cultivos más, encontrando las mismas características de desarrollo con un porcentaje de repetición del 87.1%. Dicho material se liofilizó y en Mayo de 1991 fue caracterizado en la Universidad de Davis, Cal. como Adenovirus Aviar Grupo 1 y diferente a 54 cepas aisladas en los Estados Unidos

Una vez identificado como serotipo propio del país, Enríquez, O.J.J. le realizó los siguientes estudios:

VIRUS DESAFIO. Virus activo cepa JJEHRJ1290 con un título de $10^{6.0}$ DICC 50% por dosis en solución salina c.b.p. 0.5 ml. La dosis de desafío (9) la determinó inoculando 4 grupos de 10 pollos libres de anticuerpos contra HCl de 4 semanas de edad por vía intramuscular con títulos virales de $10^{3.0}$, $10^{4.0}$, $10^{5.0}$, $10^{6.0}$ DICC 50%, presentándose cuerpos de inclusión en 0 de 10, 1 de 10, 7 de 10 y 10 de 10 pollos por grupo respectivamente.

VIRUS VACUNAL. Inactivado con beta propiolactona con un título mínimo de $10^{6.0}$ DICC 50%, el título viral lo determinó utilizando 3 grupos de pollos de engorda de 4 semanas de edad libres de anticuerpos contra HCl inoculando diferentes dosis $10^{3.0}$, $10^{4.0}$, $10^{5.0}$ DICC 50%. Tres semanas después se desafiaron con el virus activo homólogo por vía intramuscular con un título de $10^{6.0}$ DICC 50% y se determinaron los niveles de anticuerpos por SVN (3,4,10) siendo estos de 1:16, 1:32 y 1:128 por grupo respectivamente, considerando que el título óptimo de la vacuna es de $10^{6.0}$ DICC 50%. Se comprobó evaluando en los mismos grupos la presencia de cuerpos de inclusión en

el hígado, encontrándose en 10 de 10, 2 de 10 y 0 de 10 pollos por grupo respectivamente.

Inoculó en embriones de pollo libres de patógenos específicos de 10 días de edad por vía saco alantoideo (5,6,32) y membrana alantoidea (6,30,32) sin presentar lesiones, mortalidad ni contaminación alguna.

Comprobó la esterilidad de la vacuna sembrando 1 ml de la misma en agar Salmonella-Shigella, Mc Conkey y Verde brillante para bacterias sin crecimiento alguno en lecturas a las 24,48,72 y 96 horas y agar Sabouraud para hongos sin crecimiento alguno con lecturas a los 28,35 y 42 días.

HIPOTESIS. Al vacunar a pollos de engorda por vía subcutánea al primer día de edad con la vacuna *HCl emulsionada* no morirán ni desarrollarán cuerpos de inclusión al menos el 80% de los sujetos al desafiarse a las 4 semanas de edad.

HIPOTESIS. Al vacunar a pollos de engorda por vía subcutánea al primer día de edad con la vacuna "HCl emulsionada" no morirán ni desarrollarán cuerpos de inclusión al menos el 80% de los sujetos al desafiarse a las 4 semanas de edad.

OBJETIVOS.

Determinar la potencia de la vacuna *HCl emulsionada* aplicada a pollos de 1 día de edad.

MATERIAL Y METODOS

AVES. 90 pollos de engorda de 1 día de edad .

GRUPOS EXPERIMENTALES. 6 grupos de 15 aves cada uno manejados por separado y en unidades de aislamiento del CIPP.

Los grupos 1,2,3 se vacunaron al día de edad vía subcutánea en parte media posterior del cuello con 0.2 ml del virus vacunal $10^{8.0}$ DICC 50% por dosis y se desafiaron por vía intramuscular (en la pechuga) a las 4 semanas de edad con 0.5 ml del virus de desafío $10^{6.0}$ DICC 50% por dosis.

Los grupos 4,5,6 no se vacunaron, sin embargo se desafiaron a las 4 semanas de edad por vía intramuscular (en pechuga) con 0.5 ml del virus de desafío $10^{6.0}$ DICC 50 % por dosis.

Todos los pollos se evaluaron diariamente durante toda la fase experimental y fueron sometidos a estudios Histopatológico e Inmunofluorescencia directa de hígado (4,5,7,8,16,17,22,23,28) cuyo conjugado se elaboró a partir del aislamiento original y fue realizado por Enríquez,O.J.J.

Se proporcionó un alimento comercial adquirido el mismo día y para toda la fase experimental con una concentración inferior a 20 ppb de aflatoxinas determinado en el CIPP por el método de cromatografía en capa fina (29).

RESULTADOS. De los grupos 1,2,3 (vacunados y desafiados) murieron 5 sujetos de los cuales 1 fue por aplastamiento y los otros 4 al examen histopatológico desarrollaron CIIN y confirmados por IF (cuadro 1). Los 40 individuos restantes sacrificados al final del modelo no presentaron CIIN ni resultaron positivos a IF. (cuadro 2).

De los grupos 4,5,6 (no vacunados y desafiados) murieron 32 sujetos de los cuales 2 fueron por aplastamiento (cuadro 1) . Los 30 restantes fueron positivos a IF y 28 presentaron CIIN. Al final del experimento se sacrificaron los 13 pollos sobrevivientes, de los cuales 7 presentaron CIIN y 11 son positivos a IF. (cuadro 2).

DISCUSION. Los resultados del experimento en términos de mortalidad indican que la vacuna experimental utilizada en pollo de engorda a un título de $10^{8.9}$ DICC 50% es capaz de proteger al menos el 88% de los sujetos empleados 40 de 45 contra el 28.8% de los no vacunados 13 de 45, (CUADRO 3); mientras que las pruebas de Histopatología e IF señalan una protección del 91 %, lo que equivale a pensar que la vacuna podría utilizarse como medida profiláctica en granjas que presenten brotes de HCI.

Es conveniente señalar además que la protección conferida es superior a la informada en otros trabajos de vacunas experimentales, como Fadly y Winterfield en 1975 (13) cuya protección alcanzó apenas el 40%; Cubillos logró protección cercana al 60% (7,8) y Fernández, M. (15) alcanzó a reducir mortalidades y confirió protección cercana al 80%.

Ciertamente se esperaba que los grupos sin vacunar y desafiados presentaran una protección inferior al 30 %. Los resultados no difieren con el modelo de reproducción de la enfermedad descrito por Saifuddin (29) en Nueva Zelanda a partir de un aislamiento original de ese país. Aún así de los grupos sin vacunar y desafiados se presentaron 13 casos que aún bajo estas condiciones resistieron la infección, demostrando que un porcentaje de la población sin vacunar es susceptible de superar el brote sin desarrollar signología (28.8%). De estos 13 casos, 6 no presentaron CIIN (13.5%) y 2 no fueron positivos a IF (4.4%). Ver cuadro 3.

Con base en los resultados obtenidos bajo las condiciones en que se realizó este experimento se concluye que la potencia de la vacuna "HCl emulsionada" fue de 91% en los grupos vacunados y desafiados, mientras que en los grupos solamente desafiados el 66.6% de los pollos murieron.

CUADRO 1					
		PROTECCION	CONTRA	MORTALIDAD	
	GRUPOS	# DE AVES	# DE MUERTOS	MUERTOS CONFIN	MUERTOS -AF
VACUNADOS	1	15	2	2	2
y	2	15	1	1	1
DESAFIADOS	3	15	2	1	1
	total	45	5	4	4
VACUNADOS	4	15	9	8	8
NO	5	15	11	10	11
DESAFIADOS	6	15	12	10	11
	total	45	32	28	30

CUADRO 2				
SACRIFICADOS	DESPUES	DEL	EXPERIMENTO	
	GRUPOS	0 DE AVES	0 DE AVES -ACIN	0 DE AVES -AF
VACINADOS	1	13	0	0
Y	2	14	0	0
DESAFIADOS	3	13	0	0
	total	40	0	0
NO VACINADOS	4	6	4	5
Y	5	4	2	3
DESAFIADOS	6	3	1	3
	total	13	7	11

CUADRO 3			
PROTECCION CONTRA LA MORTALIDAD			
CUERPOS DE INCLUSION (CIIN) E INMUNOFLUORESCENCIA (IF)			
	TOTAL DE VIVOS /	TOTAL SIN CIIN /	TOTAL FREGATIVOS /
	TOTAL DE AVES	TOTAL DE AVES	TOTAL DE AVES
VACUNADOS			
Y	40 / 45 (88.8%)	41 / 45 (91.1%)	41 / 45 (91.1%)
DESAFIADOS			
NO VACUNADOS			
Y	13 / 45 (28.8%)	10 / 45 (22.2%)	4 / 45 (8.88%)
DESAFIADOS			

LITERATURA CITADA.

1. Altamirano, R.R.; Ramírez, J.H.; Retana, R.A. y Zurita, D.J.: Hepatitis con cuerpos de inclusión y su relación con altas mortalidades en pollo de engorda en México. XV Convención Nacional ANECA Tomo II. Cancún, Q.Roo, México, 279-286, 1990.
2. Antillón, R.A. and Lucio, M.B.: Inclusion body hepatitis in Mexico. Avian Dis ,19: 195-197, 1974.
3. Arias, R.M.: Valoración serológica a la respuesta en aves S.P.F. inoculadas con vacuna experimental hepatitis a cuerpos de inclusión. Tesis de grado. Fac. de Ciencias Vet. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile, 1986.
4. Calnek, B.W.: Diseases of Poultry. 9th ed. De. Iowa St. Univ. Press. Iowa, U.S.A., 1991.
5. Cowen, B.S.: A trivalent antigen for the detection of type 1 avian adenovirus precipitin. Avian Dis ,31: 351-354, 1987.
6. Cowen, B.S. Chicken embryo propagation of type 1 avian adenovirus. Avian Dis ,32: 347-352, 1988.

7. Cubillos, G.A.: Hepatitis a cuerpos de inclusión en aves. Fac. de Ciencias Vet Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile, 1988.
8. Cubillos, G.A.: Metodología diagnóstica en el síndrome de hepatitis con cuerpos de inclusión. Fac. de Ciencias Vet. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile, 1988.
9. Cubillos, J.A.: Posibilidades de uso de vacunas autógenas en hepatitis a cuerpos de inclusión en aves. Fac. de Ciencias Vet. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile, 1988.
10. Christensen, N.H. and Saifuddin, Md.: A primary epidemic of inclusion body hepatitis in broilers. Avian Dis. **33**: 622-630, 1989.
11. Dhillon, A.S. and Kibenge, F.S.B.: Adenovirus infection associated with respiratory disease in commercial chickens. Avian Dis. **31**: 654-657, 1987.
12. Erny, K.M.; Barr, D.A. and Fahey, K.J.: Molecular characterization of highly virulent fowl adenoviruses associated with outbreaks inclusion body hepatitis. Avian Pathol. **20**: 597-606, 1991.
13. Fadly, A.M. and Winterfield, R.W.: Antigenic characterization of the inclusion body hepatitis virus. Am J Vet Res. **36**: 532-534, 1975

14. Fadly, A.M.; Winterfield, R.W. and Olander, H.J.: Role of the bursa of fabricious in the pathogenicity of inclusion body hepatitis and infectious bursal disease viruses. Avian Dis, 20: 467-477, 1976.

15. Fenner, J.F. et al.: Adenoviridae. In Veterinary Virology (Fenner, J.F.; Gibbs, J.E.P.; Murphy, A.F.; Rott, R.; Studdert, J.M. and White, O.D. eds.) 2nd ed. Ed. Academic Press, Inc. pag 337. Cal., U.S.A., 1993

16. Fernández, D.M. y col.: Hepatitis con cuerpos de inclusión en el Perú. Lab. Farvet, E.I.R.L. Integ. Avícola La Esperanza, Chincha, Perú, 1989.

17. González, C.M.: Utilización de la técnica de Papanicolau en el diagnóstico aviar. II Jornada Médico Avícola. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, 1991.

18. Hemboldt, C.F. and Frazier, M.N.: Avian hepatic inclusion bodies of unknown significance. Avian Dis, 7: 446-450, 1963.

19. Hoffmann, R. and Dorn, P.Ñ Histological development of lesiones of the bursa of fabricious of chickens with inclusion body hepatitis. Avian Dis, 22: 266-272, 1978.

20. Hofstad, M.S.: Diseases of Poultry. 8th de. De. Iowa St Univ Press, Iowa, U.S.A., 1984.

21. Howell, J.; Mc Donald, and Christian, R.G.: Inclusion body hepatitis in chickens. Can Vet J, 11: 99-101, 1970.

22. Iglesias, A.H.: Estudio anatomopatológico en aves S.P.F. inmunizadas experimentalmente con virus a hepatitis con cuerpos de inclusión. Tesis de grado. Fac. de Ciencias Vet. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile, 1988.

23. Itakura, C.; Yasuba, M. and Goto, M.: Histopathological studies on inclusion body hepatitis in broiler chickens. Jap. J. Vet. Sci. **36**:329-340, 1974.

24. Lotsy, J.; Schat, A.K.; Solórzano, S.A. y González del Angel, J.: Hepatitis con corpúsculos de inclusión 1. Aislamiento de un virus. Tec. Pec. **29**: 41-45, 1975.

25. Menéndez, A. y col.: Hepatitis con cuerpos de inclusión por adenovirus en pollos de engorde en la provincia de Matanzas 1. Clínica y Morfopatología. Rev. Salud Anim. **5**: 567-581, 1983.

26. Menéndez, A. y col.: Hepatitis con cuerpos de inclusión por adenovirus en pollos de engorde en la provincia de Matanzas III. Evidencia histológica por ovotransmisión. Rev. Salud Anim. **5**: 743-750, 1983.

27. Menéndez, A. y col.: Hepatitis con cuerpos de inclusión por adenovirus en pollo de engorde en la provincia de Matanzas IV. Asociación con Burssitis Infecciosa. Rev. Salud Anim. **5**: 751-762, 1983.

28. Noda, J. y col.: Hepatitis con cuerpos de inclusión por adenovirus en pollo de engorde en la provincia de Matanzas II. Aislamiento e identificación. Rev Salud Anim, 5: 509-551, 1983.

29. Ramírez, J.H. and Enriquez, O.J.J.: Mycotoxicosis in poultry: diagnosis, prevention and control. Proceedings of the forty second western poultry disease conference. Feb 28 Marc 1, 2 1993. Sacramento, Cal., U.S.A., 1993.

30. Saifuddin, Md. and Wilks, C.R.: Reproduction of inclusion body hepatitis in conventionally raised chockens inoculated with a New Zealand isolate of avian adenovirus. New Zea Vet J, 38: 62-66, 1990.

31. Saifuddin, Md. and Wilks, C.R.: Vertical transmission of avian adenovirus associated with inclusion body hepatitis. New Zea Vet J, 39: 50-52, 1991.

32. Saifuddin, Md.; Wilks, C.R. and Murray, A.: Characterization of avian adenoviruses associated with IBH. New Zea Vet J, 40: 52-55, 1992.

33. Winterfield, R.W.; Fadly, A.M. and Huerr, F.J.: Immunization of chickens against adenovirus infection. Poult Sci, 56: 1481- 1486, 1977.

28. Noda, J. y col.: Hepatitis con cuerpos de inclusión por adenovirus en pollo de engorde en la provincia de Matanzas II. Aislamiento e identificación. Rev Salud Anim, 5: 509-551, 1983.

29. Ramírez, J.H. and Enríquez, O.J.J.: Mycotoxicosis in poultry: diagnosis, prevention and control. Proceedings of the forty second western poultry disease conference. Feb 28 Mar 1, 2 1993. Sacramento, Cal. U.S.A., 1993.

30. Saifuddin, Md. and Wilks, C.R.: Reproduction of inclusion body hepatitis in conventionally raised chockens inoculated with a New Zealand isolate of avian adenovirus. New Zea Vet J, 38: 62-66, 1990.

31. Saifuddin, Md. and Wilks, C.R.: Vertical transmission of avian adenovirus associated with inclusion body hepatitis. New Zea Vet J, 39: 50-52, 1991.

32. Saifuddin, Md.; Wilks, C.R. and Murray, A.: Characterization of avian adenoviruses associated with IBH. New Zea Vet J, 40: 52-55, 1992.

33. Winterfield, R.W.; Fadly, A.M. and Huierr, F.J.: Immunization of chickens against adenovirus infection. Poult Sci, 56: 1481- 1486, 1977.