

DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA AVIAR EN POLLOS DE ENGORDE EN LA REGIÓN CENTRAL DE VENEZUELA

Luz Marina García¹; Carmen de Noguera¹; Antonio Valera²;
Víctor Bermudez³ y Mariano Salem⁴

RESUMEN

Esta investigación se realizó en una muestra de 320 pollos de engorde de edades comprendidas entre 1 y 4 semanas, que presentaron signos clínicos no específicos. En la necropsia se observó atrofia de timo (AT), médula ósea rosada o amarillenta-blanquecina y palidez de hígado. Histológicamente se observó depleción linfocítica cortical tímica desde leve hasta severa, presencia de células aumentadas de tamaño, con núcleos grandes, abundante citoplasma y cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos (CIIE), e hiperplasia de células reticulares. En médula ósea (LMO), se observó hipoplasia desde leve hasta severa (aplasia), sustitución del tejido hematopoyético por adipocitos, focos de hiperplasia mielopoyética y eritropoyética, algunos hemocitoblastos con núcleo grande y pequeños CIIE. Las lesiones hepáticas se caracterizaron por la presencia de infiltración perivascular de células mononucleares, dilatación sinusoidal, degeneración grasa y necrosis, también se evidenció hiperplasia de los conductos biliares y en algunos casos cuerpos de inclusión de tipo adenoviral. La PCR demostró la presencia del ADN del VAIA en 19 de 40 muestras evaluadas. El análisis de Correlación de Pearson confirmó la asociación entre las variables AT y LMO ($P=0.0209$). El análisis de correlación de Spearman Rank reveló que las lesiones en médula ósea se vinculan estrechamente al VAIA, diagnosticado mediante PCR ($r=0,7165$; $P=0.0000$). Este estudio ha demostrado la patogenicidad del VAIA en los pollos de engorde comerciales y permitió establecer el diagnóstico del VAIA presente en las granjas estudiadas.

Palabras Clave: anemia infecciosa aviar; inmunosupresión; patogenicidad; PCR.

¹ INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Sanidad Animal. Maracay, estado Aragua. E-mail: vetimarinag@hotmail.com

² Médico Veterinario en ejercicio libre. E-mail valerant@hotmail.com

³ Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracay.

⁴ Laboratorio Lasher. Universidad de Delaware. USA. E-mail: msalem@udel.edu

Recibido: 28/03/2006

Aprobado: 05/12/2006

MOLECULAR DETECTION OF AVIAR INFECTIOUS ANEMIA VIRUS IN BROILER CHICKENS AT THE CENTRAL REGION IN VENEZUELA

Luz Marina García¹; Carmen de Noguera¹; Antonio Valera²; Víctor Bermudez³ y Mariano Salem⁴

SUMMARY

This investigation was performed in a sample from 320 broilers chickens grown around 1 and 4 weeks old with no specific clinic signs. Thymus atrophy (AT), rosaceous to yellowish-whitish barrow bone and paleness liver was observed under the necropsy. The histopathology showed thymic cortical lymphoid depletion from mild to severe enlarged cell, with large nucleus, plentiful cytoplasm and small eosinophilic intra-nuclear inclusion bodies, hyperplasic reticular cell what also showed intranuclear eosinophilic inclusion bodies. In marrow bone (LMO), hypoplasia from mild to severe (aplasia), with depletion of both erythrocyte and granulocytic series accompanied by compensatory space occupying adipocyte growth adipocyte, focus of hyperplasia with erithropoietic and mielopoietic activity, some hemocytoblast increased of size, with large nucleus and small inclusion bodies, were observed. The hepatic lesions distinguished by the presence of perivascular infiltration of mononuclear cells, sinusoidal dilation, fat degeneration and necrosis, were registered. Also it was demonstrated hyperplasia of biliar conduct and in some cases intranuclear eosinophilic inclusion bodies of type adenoviral in hepatocytes. The PCR showed the presence of CAV'S DNA in 19 of 40 samples, in 9 of 10 farms evaluated. The Pearson Correlation analysis confirmed the presence of an association between the variables AT and LMO ($P=0.0209$) which is a characteristic of the CAV. The Spearman Rank analysis demonstrated that the marrow bone lesions is connected narrowly to the CAV, diagnosed using PCR ($r= 0.7165$; $P= 0.0000$). This study has demonstrated the pathogenicity of the CAV in the commercial broilers and it permitted to establish the diagnosis of the CAV present in the farms studied.

Keys Words: chicken infectious anemia virus; immunosuppression; pathogenicity; anemia; PCR.

¹ Investigadores. INIA). Centro Nacional de Investigaciones Agropecuaria. Sanidad Animal. Maracay, estado Aragua. E-mail: vetimarinag@hotmail.com

² Médico Veterinario en ejercicio libre. E-mail valerant@hotmail.com

³ Profesor. UCV. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracay.

⁴ Laboratorio Lasher. USA. Universidad de Delaware. E-mail: msalem@udel.edu

INTRODUCCIÓN

El Virus de la Anemia Infecciosa Aviar (VAIA) consiste en una cadena circular de ADN sencilla, perteneciente al género gyrovirus de la Familia Circoviridae. Fue descrito por primera vez por Yuasa *et al.* (1979) como un contaminante de la vacuna de Marek y posteriormente se ha reportado en muchos países, considerándose de incidencia mundial.

Es el agente causal de una enfermedad de alta morbilidad, caracterizada por anemia aplásica, cuadro hemorrágico, atrofia de los órganos linfoides e inmunodeficiencia. Se replica principalmente en las células precursoras hematopoyéticas en la médula ósea: los hemocitoblastos, y en las células precursoras de timocitos: los linfoblastos en la corteza tímica, donde causan muerte celular por inducción de apoptosis (Jeurissen *et al.*, 1992).

La única especie conocida hasta ahora susceptible a la infección es el pollo joven (Yuasa *et al.*, 1979). La principal importancia del VAIA en pollos de engorde está en la capacidad de generar inmunosupresión en aves jóvenes, afectando los parámetros productivos, debido a su capacidad para inducir disfunción inmunológica sola o en combinación con otros patógenos.

En Venezuela, a partir del año 1996, se ha reportado seropositividad al VAIA, bajos valores de hematocrito en pollos de engorde y presencia de lesiones microscópicas compatibles con las causadas por el virus (Urdaneta *et al.*, 1996). En el año 2001 se realizó el primer aislamiento del VAIA a partir de pollos de engorde provenientes de una granja comercial de la Región Central de Venezuela, que mostraron signos compatibles con AIA (Noguera *et al.*, 2001).

Confirmada la presencia del virus, es imperativo continuar las investigaciones sobre la acción patógena que está ejerciendo en la salud aviar, para así dilucidar su participación como agente inmunosupresor en las parvadas comerciales, ya que este es un factor que aumenta la susceptibilidad a otras enfermedades aviares.

Debido a que otros virus, conjuntamente con ciertos factores, pueden causar signos y lesiones similares a las observadas en

Anemia Infecciosa Aviar (AIA), la presencia de los mismos sólo pueden orientar hacia un diagnóstico presuntivo, pero no son concluyentes, el diagnóstico definitivo de la infección por el VAIA se basa en el aislamiento viral en pollitos libres de patógenos (SPF) o en cultivos celulares (MSB1), pero son métodos muy laboriosos y consumen mucho tiempo, por lo cual, es necesario utilizar una técnica de alta sensibilidad y especificidad, rápida y eficiente, como la Técnica de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) que ha sido utilizada con gran éxito en muchos países, para identificar el VAIA en explotaciones avícolas donde ha sido reportado como la causa de grandes pérdidas para la industria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

Se seleccionaron 10 granjas de pollos de engorde comerciales, no vacunados y provenientes de reproductoras no vacunadas contra el virus de anemia infecciosa aviar (VAIA), distribuidas en la Región Central de Venezuela, en los estados Aragua, Carabobo y Cojedes. El Cuadro 1 resume la información de las granjas muestreadas: granjas I y II de una empresa productora de pollos de engorde y de ponedoras, granjas III al VI similar a la anterior más producción de pollos bebé, y granjas VII al X similar a la anterior más producción de alimentos.

Muestras

Se seleccionaron 320 pollos de engorde, provenientes de 10 granjas avícolas en zonas con problemas sanitarios y pobre respuesta a las vacunas, se evaluó la presencia de lesiones macroscópicas por edad. El análisis histopatológico se efectuó en las muestras que presentaron lesiones macroscópicas. Para la prueba de PCR se tomaron muestras por edad y granja. Cada muestra equivale a 8 pollos por edad/granja, los cuales fueron tomados de una (1) hasta cuatro (4) semanas de edad en c/u de las granjas, durante 4 semanas, con intervalo de una semana, para un total de 40 muestras evaluadas, se identificaron las granjas con números romanos (I) y las semanas de edad, con números arábigos. El Cuadro 2 demuestra la distribución de la muestra.

CUADRO 1. Integraciones, estado, granjas.

Integración	Estado	Granja
A	Carabobo	I
A	Carabobo	II
B	Carabobo	III
B	Aragua	IV
B	Aragua	V
B	Cojedes	VI
C	Carabobo	VII
C	Carabobo	VIII
C	Aragua	IX
C	Aragua	X
Total		10

CUADRO 2. Distribución de la muestra en las granjas por semana de edad.

GE (sem)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Total
1	8 (II)	8 (III)	8 (III1)	8 (IV1)	8 (V1)	8 (VI1)	8 (VII1)	8 (VIII1)	8 (IX1)	8 (X1)	80
2	8 (I2)	8 (II2)	8 (III2)	8 (IV2)	8 (V2)	8 (VI2)	8 (VII2)	8 (VIII2)	8 (IX2)	8 (X2)	80
3	8 (I3)	8 (II3)	8 (III3)	8 (IV3)	8 (V3)	8 (VI3)	8 (VII3)	8 (VIII3)	8 (IX3)	8 (X3)	80
4	8 (I4)	8 (II4)	8 (III4)	8 (IV4)	8 (V4)	8 (VI4)	8 (VII4)	8 (VIII4)	8 (IX4)	8 (X4)	80
Sub- Total	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	
Total	320										320

Donde G= Granja y E= edad en semanas.

Fase de Campo

Se seleccionaron aves que presentaron signos clínicos no específicos de enfermedad o posiblemente compatibles con los causados por AIA, tales como anemia, palidez, presencia de hemorragias subcutáneas, depresión, pesos bajos con respecto a los aparentemente sanos, desuniformidad, pollo de descarte (%) y mortalidad.

Se realizó la necropsia para detectar y demostrar la presencia de lesiones macroscópicas en diferentes órganos y tejidos. Se tomaron muestras en formol buferado al 10% para realizar análisis histopatológico. A partir de las muestras, por cada granja y edad (40 muestras), que presentaron lesiones macroscópicas, se tomaron secciones de hígado, timo y médula ósea, las cuales fueron conservadas en congelación (-70°C) para su utilización en la técnica de la PCR.

Fase de Laboratorio

Las lesiones microscópicas fueron detectadas durante la evaluación morfológica de los órganos y tejidos lesionados, mediante el análisis histopatológico. Para la extracción de ADN y Amplificación del Genoma del VAIA, se aplicó la Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La extracción del ADN del VAIA se realizó a partir de homogenizados de hígados de las aves que presentaron lesiones macroscópicas y microscópicas compatibles con las causadas por el virus en cada muestra por granja/edad. La extracción y purificación del ADN se realizó siguiendo las instrucciones del protocolo del kit de extracción de ADN Wizard Genomic DNA Purification System (A2360, Promega).

Las secuencias de los *primers* utilizados fueron: NVSL 1- 5'- CTA AGATCTGCAACTGCG GA-3' las cuales son complementarias a las bases 654-673 de la cadena negativa del ADN; NVSL 2- 5'- CCT TGG AAG CGG ATA GTC AT-3'. Esta cadena es complementaria a las 1053-1072 de la cadena positiva del ADN.

El tamaño del producto obtenido fue de 418 pb, aproximadamente. La técnica PCR se llevó a cabo siguiendo el protocolo publicado por Lauerman (1998), el cual consiste en utilizar para un volumen total de 50 µl por muestra: 35,75 µl de agua pura libre de nucleasas;

5 µl de Buffer 10x; 1 µl dNTP (10mM) (nucleótidos); 0.5 µl de *primer* NVSL1 (20 pmol/µl); 0.5 µl de *primer* NVSL2 (20 pmol/µl); 0,25 µl de Taq polimerasa (5 U/µl); 2 µl de MgCl₂ (50 nM). Se adicionó 45 µl de esta mezcla en un tubo limpio para microcentrífuga de 0,5 ml, destinado para PCR, agregar 5 µl de la muestra. El termociclador se programó de la siguiente manera: 1 ciclo a 95 °C durante 3 minutos y 50 ciclos a 95 °C durante 30", 50 °C durante 30", 72 °C durante 30". Almacenar a 4 °C. Se mezcló 5 µl del producto amplificado y 1 µl del colorante (loading dye, Promega) y se colocó en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio al 1%, también se colocó un marcador de peso molecular, luego fueron colocados en una cámara de electroforesis a 85 w, durante 30 minutos.

Las muestras se observaron bajo una lámpara de rayos ultravioleta y las que resultaron positivas se visualizaron como bandas brillantes dentro del gel, de un tamaño de 418 pb.

Análisis estadístico

La disminución de tamaño de las aves problema y las lesiones macroscópicas fueron evaluadas mediante estadística descriptiva, utilizando el programa Statistix 7.0, para el Software Windows.

Estas lesiones fueron confirmadas mediante la descripción de las características morfológicas de los tejidos observados por microscopía óptica, en el análisis histopatológico. Para la técnica de PCR, se realizó estadística descriptiva, registrando la frecuencia de ADN detectado en las muestras evaluadas. Se realizó análisis de correlación de Spearman y de Pearson (Milton, 2001), para demostrar asociación entre las variables atrofia de timo (AT) y lesiones en médula ósea (LMO), lesiones características de AIA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Signos clínicos

Los animales seleccionados para esta investigación estaban clínicamente enfermos o no, deprimidos y emaciados, se observaron pequeños, con pesos promedios inferiores (más de dos desviaciones estándar), con respecto a las aves aparentemente sanas (Cuadro 3) como se observa en la Figura 1.

CUADRO 3. Pesos promedio (g) y desviación estándar de las aves problema evaluadas y de aves normales.

Edad	Aves evaluadas	Aves normales
1	82,0 ± 5,14	152,4 ± 5,85
2	225,6 ± 26,42	436,5 ± 38,16
3	422,0 ± 38,90	677,0 ± 20,17
4	789,8 ± 45,23	1 039,0 ± 90,61

Los cambios macroscópicos consistieron en atrofia de timo (Figura 2) y hemorragias, cambios de coloración en médula ósea desde rosado hasta amarillento-blanquecino de consistencia grasosa (Figura 3), y palidez de hígado (PH). Estos hallazgos fueron idénticos a los reportados por Yuasa *et al.* (1979), Goryo *et al.* (1989), Zhou *et al.* (1997), Rosenberger y Cloud (1998), Toro *et al.* (2000) Urdaneta *et al.* (2000) Ledesma *et al.* (2001), Noguera *et al.* (2001) y Sommer y Cardona (2003).



FIGURA 1. AA: Aves problema evaluadas. AAS: aves aparentemente sanas.

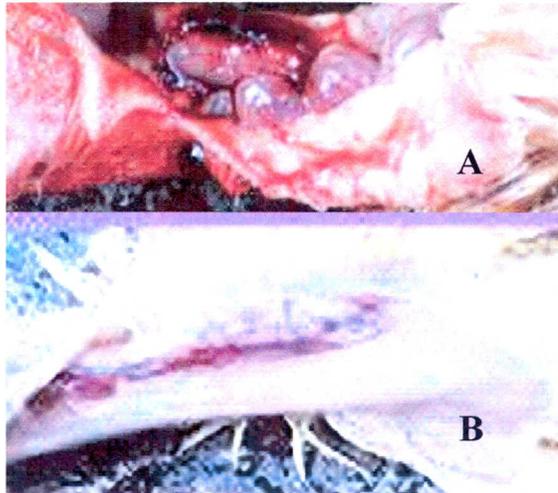


FIGURA 2. A: Timo normal de ave de 1 semana de edad. B: Atrofia de timo en ave problema de 1 semana de edad.

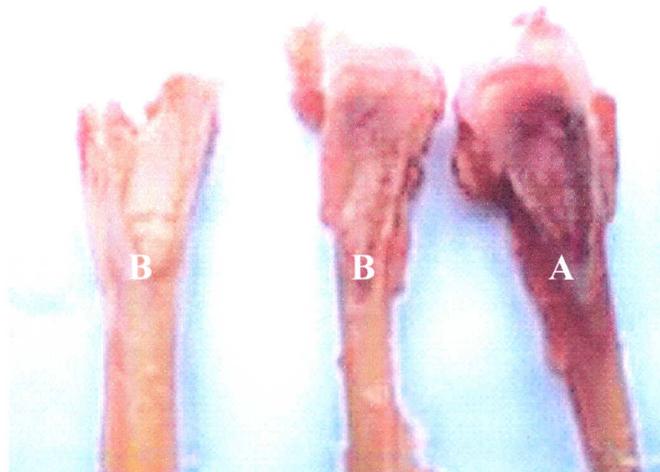


FIGURA 3. A: Médula ósea normal de ave de 4 semanas de edad. B: Médulas óseas de aves problema de la misma edad que la de A.

La frecuencia (%) de las lesiones macroscópicas presentes en las aves problema evaluadas entre 1 y 4 semanas de edad, ha sido descrita en el Cuadro 4. Las lesiones consistentes con Anemia infecciosa aviar, tales como atrofia de timo (AT) registraron una frecuencia de 37,5 y 41,25% en las semanas 2 y 3, respectivamente y las lesiones en médula ósea (LMO) registraron una frecuencia de 46,25 y 63,75% en las semanas 1 y 2, respectivamente.

Estas frecuencias elevadas en las semanas de edad 1 y 2, se han relacionado directamente con la transmisión vertical del VAIA (Chettle *et al.*, 1989 y Jorgensen, 1991); sin embargo, estas lesiones también fueron observadas en aves de 3 y 4 semanas de edad (Cuadro 4), las cuales se asocian principalmente con transmisión horizontal o puede relacionarse con infección vertical, que debido a la presencia de cofactores inmunosupresores, presentes en condiciones de campo, no permiten la recuperación de los tejidos afectados después de 28 días postinfección (Cloud *et al.*, 1992).

CUADRO 4. Frecuencia (%) de lesiones macroscópicas presentes en aves problema desde 1 hasta 4 semanas de edad, evaluadas en la región central de Venezuela.

Edad	AT	LMO	PH
1	28,75	46,25	40,00
2	37,50	63,75	36,25
3	41,25	38,75	31,25
4	23,75	43,75	36,25
Total	32,81	48,13	35,94

Donde, AT: atrofia de timo, LMO: lesiones en médula ósea, PH: palidez de hígado.

actividad mielopoyética y eritropoyética, algunos hemocitoblastos agrandados con núcleo grande con pequeños cuerpos de inclusión eosinofílicos intranucleares (Figura 6 A), estos hallazgos son consistentes con los reportados por Yuasa *et al.* (1980); Gorvo *et al.* (1989); Jeurissen *et al.*, (1992); Smyth *et al.* (1993); Urdaneta *et al.* (2000) y Spackman *et al.* (2002).

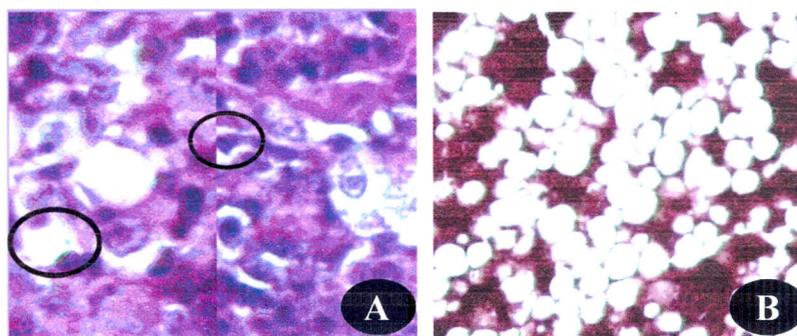


FIGURA 5. A: Cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos en células reticulares hiperplásicas (círculo). 1000X H&E. B: Médula ósea de ave de 2 semanas de edad mostrando aplasia medular severa. 1000X, H&E.

Las lesiones hepáticas se caracterizaron por la presencia de infiltración perivascular de células mononucleares (Figura 6 B), dilatación sinusoidal, degeneración grasa del hepatocito y necrosis. Estas lesiones coinciden con las reportadas por Yuasa *et al.* (1979) y Goryo *et al.* (1989); sin embargo, se evidenció hiperplasia de los conductos biliares, lesión compatible con micotoxinas, y en algunos casos cuerpos de inclusión de tipo adenoviral, compatible con Hepatitis viral por cuerpos de inclusión (Figura 7). Estos hallazgos coinciden con los reportados por Toro *et al.* (2000), en relación a la presencia de VAIA y adenovirus como una asociación que induce el síndrome hidropericardio/hepatitis por cuerpos de inclusión. Tanto las micotoxinas como los adenovirus son factores inmunosupresores que pueden estar potenciando, en forma sinérgica, la inmunosupresión a nivel de campo, en los lotes de pollos de engorde.

La especificidad de la prueba de PCR fue probada con ADN extraído de hígado de ave sin lesiones macroscópicas compatibles con AIA y una vacuna comercial. El producto amplificado de 418 pb fue detectado en ADN de la vacuna comercial (Figura 8).

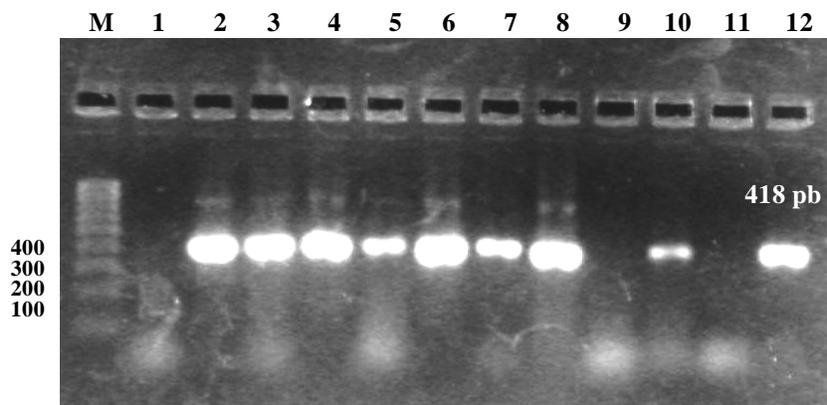


FIGURA 8. Amplificación del ADN del VAIA. Línea 1: I1; línea 2: I2; Línea 3: I3; línea 4: I4; línea 5: II1; línea 6: II2; línea 7: II3; línea 8: II4; línea 9: III1; línea 10: III2; línea 11: CN = Control negativo; línea 12: CP = Control positivo (vacuna comercial). Línea M: Marcador de tamaño molecular mostrando pb.

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) demostró la presencia del ADN del VAIA en 47,5% de las muestras evaluadas en este estudio (Cuadro 5), confirmando el diagnóstico definitivo de AIA en pollos de engorde en granjas comerciales. El diseño de los *primers* utilizados en el protocolo para PCR, detectó de manera específica el ADN del VAIA, coincidiendo estos hallazgos con los reportados por Van Santen *et al.* (2001).

Análisis de Correlación

El análisis de correlación de Pearson confirma la presencia de una

asociación entre las variables (AT) atrofia de timo (32.81%) y (LMO) lesiones en médula ósea (48.13%) ($r= 0.3642$; $P= 0.0209$), lo cual indica que el porcentaje de aves que presentaron atrofia de timo también exhibieron lesiones en la médula ósea, siendo la presencia de ambas una característica de la AIA.

CUADRO 5. Detección del ADN del VAIA, mediante la amplificación por PCR, en aves entre 1 y 4 semanas de edad, procedentes de granjas comerciales de la Región Central de Venezuela.

Granja	Edad (semanas)			
	1	2	3	4
I	-	+	+	+
II	+	+	+	+
III	-	+	-	+
IV	-	-	-	+
V	+	+	-	-
VI	-	-	+	-
VII	-	+	-	-
VIII	+	-	+	-
IX	-	+	+	+
X	-	-	-	-
Total positivos	3/10	6/10	5/10	5/10

El índice de correlación explica que a nivel de campo, existen otras entidades que afectan a las aves produciendo lesiones similares. Tal es el caso de la enfermedad de Marek en su etapa inicial, cursa con atrofia de timo, la cual podría estar jugando un papel en la inmunosupresión, pero esta enfermedad no fue evaluada durante este estudio. Sin embargo, puede estar asociada con AIA como lo señalan Rosenberger y Cloud (1998).

El análisis de correlación de Spearman Rank reveló una correlación positiva altamente significativa ($r=0.7165$; $P=0.0000$) entre las variables LMO y PCR, lo que demuestra que las lesiones en médula ósea están vinculadas estrechamente al VAIA. Estos resultados coinciden con los reportados por Sommer y Cardona (2003) y Davidson *et al.* (2003), quienes indicaron un vínculo estrecho entre la presencia de las secuencias virales y los signos clínicos de AIA.

CONCLUSIÓN

- En la manifestación clínica del AIA, las lesiones en médula ósea son una característica a tomar en cuenta, más que atrofia de timo, a la hora de sospechar de AIA en pollos de engorde.
- En las granjas de pollo de engorde evaluadas se observaron signos, lesiones macroscópicas y microscópicas compatibles con AIA. Se detectó el ADN del VAIA, lo que confirma su presencia y patogenicidad en las aves en edades comprendidas entre 1 y 4 semanas.

BIBLIOGRAFÍA

CHEITTLE, N. J.; R. K. EDDY; P. J. WYETH; S. A. LISTER. 1989. An outbreak of disease due to chicken anaemia agent in broiler chickens in England. *Vet. Rec.* 124:211-215.

CLOUD, S. S.; H. S. LILLIEHOJ; J. K. ROSENBERGER. 1992. Immune dysfunction following infection with chicken anemia agent and infectious bursal disease virus. I. Kinetic alterations of avian lymphocyte subpopulations. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 34:337-352.

DAVIDSON, A. M.; B. H. KEDEM; C. N. BOROCHOVITZ; D. G. KASS; D.E. AYALI; D. B. HAMZANI; E. B. PERELMAN; C. SMITH; S. PERKA. 2003. Chicken infectious anemia virus infection in Israel commercial flocks: virus amplification, clinical signs, performance, and antibody status. *Avian Dis.* 48. (Resumen).

GORYO, M.; T. SUWA; T. UMEMURA; C. ITAKURA; S. YAMASHIRO. 1989. Histopathology of chicks inoculated with chicken anaemia agent (MSB1-TK5803 strain). *Avian Pathol.* 18:73-89.

JEURISSEN, S. H. M.; F. WAGENAAR; J. M. A. POL; A. J. VAN DER EB. 1992. Chickens anemia virus causes apoptosis of thymocytes after in vivo infection and of cell lines after in vitro infection. *J. Virol.* 66:7 383-7 388.

JORGENSEN, P. H. 1991. Mortality during an outbreak of blue wing disease in broilers. *Vet. Rec.* 129:490-491.

LAUERMAN, L. H. 1998. Chicken anemia virus PCR assay. **In:** *Nucleic Acid Amplification Assays for Diagnosis of Animal Diseases.* L. H Lauerman, ed. Auburn, Alabama, USA. p. 106.

LEDESMA, N.; T. FEHERVARI; M. T. CASAUBON; E. LUCIO; F. RATZ. 2001. Chicken infectious anemia in Mexico: virus identification and serology survey. *Avian Dis.* 45:788- 795.

MCCONNELL, C. D. G.; B. M. ADAIR; M. S. MCNULTY. 1993. Effects of chicken anemia virus on cell-mediated immune function in chickens exposed to the virus by a natural route. *Avian Dis.* 37:366-374.

MILTON, J. S. 2001. *Estadística para Biología y Ciencias de la Salud.* McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. (3ª edición).

NOGUERA, C. R. de; M. de ROLO; A. GODOY; A. HERRERA; Y. MARTÍNEZ; L. ÁLVAREZ; M. BRET. 2001. Agentes infecciosos que afectan la Salud Aviar. *Jornadas Científicas del CENIAP.* Maracay, Venezuela. (Resumen).

ROSENBERGER, J. K.; S. S. CLOUD. 1998. Chicken Anemia Virus. *Poul. Sci.* 77:1190-1192.

SMYTH, J. A.; D. A. MOFFET; M. S. MCNULTY; D. TODD; D. P. MACKIE. 1993. A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chicken anemia virus infection at one day of age. *Avian Dis.* 37:324-338.

SOMMER, F.; C. CARDONA. 2003. Chicken anemia virus in broilers: dynamics of the infection in two commercial broilers flocks. *Avian Dis.* 47. (Resumen).

SPACKMAN, E.; S. S. CLOUD; J. K. ROSENBERGER. 2000. Comparison of a putative second serotype of chicken infectious anemia virus with a prototypical isolate II. Antigenic and physicochemical characteristics. *Avian Dis.* 46:956-963.

TORO, H.; C. GONZÁLEZ; L. CERDA; M. HESS; E. REYES; Y. GEISSE. 2000. Chicken anemia virus and fowl adenoviruses: Association to induce the inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome. *Avian Dis.* 44:51-58.

URDANETA, S.; L. F. ANDRADE; E. DÍAZ; G. RUCSÓN. 2000. Estudio histopatológico en órganos linfoides de pollos con anticuerpos séricos a la anemia infecciosa aviar. *Revista Científica Veterinaria, FCV-LUZ, X (3):274-282.*

URDANETA, S.; L. F. ANDRADE; O. PARRA. 1996. Estudio serológico y valores de hematocrito para la Anemia Infecciosa Aviar en pollos de engorde de los municipios Mara y La Cañada de Urdaneta del estado Zulia. VI Congreso Nacional de Avicultura. *Memorias. Maracaibo. Venezuela. p. 537-543*

VAN SANTEN, V. L.; L. LI; F. J. HOERR; L. H. LAUERMAN. 2001. Genetic characterization of chicken anemia virus from commercial broiler chicken in Alabama. *Avian Dis.* 45:373-388.

YUASA, N.; T. TANIGUCHI; I. YOSHIDA. 1979. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chickens. *Avian Dis.* 23:366-385.

YUASA, N.; T. NOGUCHI; K. FURUTA; I. YOSHIDA. 1980. Maternal antibody and its effect on the susceptibility of chicks to chicken anemia agent. *Avian Dis.* 24:197-201.

ZHOU, W.; S. BING; Y. BING; H. SUPING; LL. WEI; X. BAOZHEN; Z. JIAO. 1997. Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in China. *Avian Dis.* 41:361-364.