



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

J
20/9

OBTENCION, SEROTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA
VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS
DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICO (VIBF) EN MEXICO

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS
VETERINARIAS: AVES

P R E S E N T A D A P O R :

MVZ ALEJANDRO BANDA CASTRO

Director de Tesis: M. en C. Juan Carlos Valladares de la Cruz

Asesor: M. en C. Susana Mendoza Elvira



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

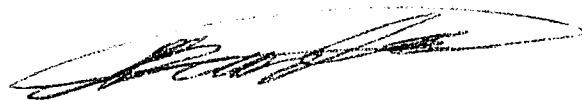
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



MVZ ALEJANDRO BANDA CASTRO

DEDICATORIAS

**A mi madre,
a mis hermanos: Ana Lilia, Rafael y Alfonso
y a mi sobrinita Liliana...**

**Porque compartimos la misma historia
y porque somos una familia.**

Al Dr. Eduardo Nuñez Bernal

**A quien le estaré agradecido y en deuda
por todos los días de mi vida.**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Xóchitl Hernández V. Por su amistad y por brindarme ayuda en los momentos en que más la necesité; cuando la cantidad de trabajo fue abrumadora. **De manera muy especial...**

¡GRACIAS... MP!

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Por contribuir en mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Por su apoyo en el financiamiento de mis estudios.

Al Programa de Apoyo a la Investigación de la FMVZ. Por su contribución al financiamiento de este trabajo.

A mis asesores. Por su apoyo y ayuda constantes.

A mis sinodales. Por sus aportaciones para el enriquecimiento de este trabajo.

Al Dr. José Antonio Quintana. Por ser mi tutor, mi maestro y por brindarme constantemente su confianza, ayuda y preocupación.

Al Dr. Guillermo Téllez Isaías. Por su motivación, apoyo y también por su presión en todo momento para terminar este trabajo.

Al Dr. Jaime Navarro. Por su ayuda en el análisis estadístico de los datos y por demostrarme que la estadística no es tan confusa como la pintan.

Al Lic. Antonio Manjarrez de Productores Agropecuarios Tepexpan SA.de CV. Por la donación de pollito de excelente calidad.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (FMVZ), en especial a los Drs. Ernesto Avila, Ezequiel Sanchez y Benjamín Fuente, por su colaboración en la elaboración del alimento.

Al Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes (FMVZ). Por el apoyo prestado en la obtención de material biológico.

A IDISA, en especial al Dr. Eduardo Lucio, a la Dra. Lilia Barrón y a la Dra. Graciela López. Por su ayuda para la obtención de embriones de pollo LPE y en la determinación de la pureza de los fluidos virales estudiados.

A la Dra. Maritza Tamayo S. (Intervet de México) y a la Dra. Alma Pérez (Servicios Profesionales Técnicos de Puebla), por su apoyo en la serotipificación de los virus.

A los Dres. Alberto Delgado (La Hacienda), Armando Arvizu, Angel Urbina (Avícola del Peñón), Martín Torres (Rhone Merieux) y al Ing. Arturo Carmona (Avícola San Andrés) por su ayuda en la fase de muestreo.

Al Sr. Juanito Merino Baranda. Por su ayuda en el procesado de los sueros y por su constante disposición a ayudar a los demás.

A la Dra. Ana Laura Chávez Ríos. Por su eficiente trabajo en el procesado histológico de la monstruosa cantidad de órganos.

Al Sr. Adelfo Juarez Muñoz. Por su apoyo en la limpieza y preparación de material y por ser una persona valiosa para el DPA: Aves.

Al Sr. Rodrigo Merino Baranda. Por su colaboración para realizar este trabajo

A mi hermano Rafael Banda C. Por su ayuda en el acondicionamiento de las unidades de aislamiento.

A la Dra. Odette Urquiza Bravo. Por ser mi amiga, por sus valiosos consejos y por ser compañeros del mismo dolor.

A todos mis compañeros del Departamento de Producción Animal: Aves. Por sus palabras de aliento, apoyo y por hacer bonito y agradable mi lugar de trabajo.

RESUMEN

MVZ Alejandro Banda Castro. Obtención, serotipificación y caracterización de la virulencia de tres aislamientos de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio IBF en México. (Bajo la asesoría de MC Juan Carlos Valladares de la Cruz y MC Susana Mendoza Elvira)

Se obtuvieron tres aislamientos del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF) que se denominaron H, P y G a partir de muestras obtenidas de granjas comerciales de pollo de engorda en México. Se determinaron las características antigénicas de cada aislamiento mediante la técnica de ELISA de captura (AC-ELISA), utilizando los anticuerpos monoclonales (AcM) B-29, R-63, BK-9, B-69 y 57. Se evaluó la virulencia de los mismos por inoculación oral en aves mediante signos clínicos, mortalidad, peso de la bolsa de Fabricio (BF), índice bursal, rango tarso-bursal, lesiones microscópicas, permanencia del VIBF en tejidos, producción de anticuerpos neutralizantes contra VIBF y medición de la respuesta inmune hacia *Brucella abortus* (antígeno T - independiente) y eritrocitos de ovino (antígeno T - dependiente). Los virus "P" y "G" presentaron los epítopes reconocidos por los AcM B-29, R-63 y B-69, que están presentes en las cepas clásicas de VIBF, el virus H no pudo ser reconocido por ningún AcM. Los tres aislamientos indujeron la presentación subclínica de la IBF en las aves inoculadas, se observó en BF atrofia y depleción linfoide severas, la permanencia del VIBF en bolsa se presentó hasta los catorce días postinoculación y la seroconversión a partir de la segunda semana en las aves. Aunque no fue detectado claramente el estado de inmunodepresión mediante la respuesta inmune a los dos antígenos utilizados, no puede descartarse el posible efecto inmunodepresor del aislamiento "H". No se observó diferencia en la virulencia de los tres VIBF aislados.

Palabras clave: Virus de la infección de bolsa de Fabricio - virulencia - aislamientos de campo en México

SUMMARY

MVZ Alejandro Banda Castro. Obtaining, serotyping and virulence characterization of three field isolates of infectious bursal disease (IBDV) in Mexico. (Advised by MC Juan Carlos Valladares de la Cruz and MC Susana Mendoza Elvira)

Three field isolates of infectious bursal disease virus (IBDV) were obtained from commercial broiler flocks in Mexico. Their antigenic properties were determined by AC-ELISA using the following monoclonal antibodies (Mab): B-29, R-63, BK-9, B-69 and 57. The virulence of the three isolates was evaluated in inoculated birds based on clinical signs, production of neutralizing antibodies against IBDV, mortality, bursal index, tarso-bursal rank, histological lesions, IBDV permanence in tissues, IBDV in tissues and *Brucella abortus* and sheep red blood cells antibody response. Isolates P and G hold the epitopes recognized by the Mab B-29, R-63, and B-69, that appear in classical IBDV strains, isolate H was not recognized by none Mab. The three isolates caused the subclinical form of IBD. In inoculated birds there were marked bursal atrophy, with severe lymphocyte depletion. The IBDV bursal permanence was until 14 days postinoculation and antibody production since second week postinoculation, Although immunosuppression was not detected by the measurement of immune response toward antigens used, the eventual immunosuppression effect by isolate "H" can not be discarded. No difference of virulence was observed among three isolates.

Key words: Infectious bursal disease virus - virulence - field isolates in Mexico

CONTENIDO

Capítulo	1.0	INTRODUCCION	1
	1.1	Historia de la enfermedad	1
	1.2	Distribución geográfica	2
	1.3	Etiología de la IBF	2
	1.4	Propiedades antigénicas del VIBF	4
	1.5	Epizootiología de la IBF	5
	1.6	Especies susceptibles	6
	1.7	Patogenia	6
	1.8	Características clínicas	7
	1.9	Lesiones macroscópicas	9
	1.10	Lesiones microscópicas	9
	1.11	Diferencias en la virulencia del VIBF	10
	1.12	Efectos inmunodepresores del VIBF	12
	1.13	Diagnóstico	16
	1.14	Prevención y control	17
	1.15	Objetivos	20
Capítulo	2.0	MATERIAL Y METODOS	21
Capítulo	3.0	RESULTADOS	32
Capítulo	4.0	DISCUSION Y CONCLUSIONES	43
Capítulo	5.0	LITERATURA CITADA	55
Capítulo	6.0	CUADROS Y GRAFICAS	69
Capítulo	7.0	FIGURAS	90

LISTA DE CUADROS Y GRÁFICAS

CUADRO 1.- Información relacionada a las ocho granjas muestreadas .

CUADRO 2.- Resultados de mortalidad embrionaria durante el aislamiento de virus de campo de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF).

CUADRO 3.- Diseño experimental.

CUADRO 4.- Mortalidad total de aves inoculadas con aislamientos de campo de VIBF.

CUADRO 5.- Pesos promedio de aves inoculadas a los 17 días de edad con tres aislamientos de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF).

CUADRO 6.- Pesos bursales promedio de aves inoculadas a los 17 días de edad con tres aislamientos de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF).

CUADRO 7.- Índices bursales (IB) promedio de aves inoculadas a los 17 días de edad con tres aislamientos de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF).

CUADRO 8.- Rangos tarso bursales (RTB) promedio de aves inoculadas a los 17 días de edad con tres aislamientos de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF).

CUADRO 9.- Coeficientes de correlación (r) y de determinación (r^2) entre IB y RTB de aves inoculadas a los 17 días de edad con tres aislamientos de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF).

CUADRO 10 .- Número de aves positivas a la presencia de VIBF en la bolsa de Fabricio y valores promedio sobre la cantidad de células inmunofluorescentes en aves inoculadas a los 17 días de edad con tres aislamientos de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF).

CUADRO 11 .- Número de aves positivas a la presencia de VIBF en el bazo y valores promedio sobre cantidad de células inmunofluorescentes en aves inoculadas a los 17 días de edad con tres aislamientos de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF).

CUADRO 12 .- Número de aves positivas a la presencia de VIBF en timo y valores promedio sobre cantidad de células inmunofluorescentes en aves inoculadas a los 17 días de edad con tres aislamientos de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF).

CUADRO 13 .- Número de aves positivas a la presencia de VIBF en tonsilas cecales y valores promedio sobre cantidad de células inmunofluorescentes en aves inoculadas a los 17 días de edad con tres aislamientos de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF).

CUADRO 14 .- Número de aves positivas a la presencia de VIBF en riñón y valores promedio sobre cantidad de células inmunofluorescentes en aves inoculadas a los 17 días de edad con tres aislamientos de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF).

TABLA 15 .- Calificaciones promedio de lesiones histológicas en bolsa de Fabricio en aves inoculadas a los 17 días de edad con tres aislamientos de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF).

CUADRO 16.- Títulos medios geométricos de anticuerpos neutralizantes contra VIBF en aves inoculadas a los 17 días de edad con tres aislamientos de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF).

CUADRO 17.- Títulos medios geométricos de anticuerpos contra eritrocitos de ovino (EO) en aves inoculadas a los 17 días de edad con tres aislamientos de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF).

CUADRO 18 .- Títulos promedio de anticuerpos contra *Brucella abortus* (Ba) en aves inoculadas a los 17 días de edad con tres aislamientos de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF).

GRAFICA 1.- Títulos medios geométricos de anticuerpos neutralizantes contra VIBF.

GRAFICA 2.- Títulos medios geométricos de anticuerpos contra eritrocitos de ovino

GRAFICA 3.- Títulos medios geométricos de anticuerpos contra *Brucella abortus*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.- Hemorragias y edema en bolsas de Fabricio de aves libres de patógenos específicos inoculadas con el aislamiento "P". 66 horas postinoculación.

FIGURA 2.- Bolsa de Fabricio de ave no inoculada con VIBF, detalle de un folículo linfóide cuya corteza y médula presentan una numerosa cantidad de linfocitos (40X).

FIGURA 3.- Bolsa de Fabricio de ave inoculada con la cepa 73688 de VIBF. Pliegue bursal donde aparecen siluetas de folículos que sufrieron depleción linfóide severa. Exudado seroso con infiltrado de células mononucleares en parte apical (a). Hiperplasia epitelial leve (flechas). Tercer día postinoculación (100X).

FIGURA 4.- Bolsa de Fabricio de ave inoculada con el aislamiento "H". Folículos linfóides con depleción severa. Hiperplasia del epitelio corticomedular moderada (flechas). Presencia de "adenoides" (a) que son invaginaciones del epitelio que recubre el pliegue. Séptimo día postinoculación (100X).

FIGURA 5.- Bolsa de Fabricio de ave inoculada con el aislamiento "P". Folículos linfóides con necrosis licuefactiva severa en el centro germinativo, donde se observan abundantes restos celulares (a), también se observa en otro folículo hiperplasia de células reticulares leve (flecha). Tercer día postinoculación (100X).

FIGURA 6.- Corte por congelación de riñón de pollo inoculado con el aislamiento "H", detalle de glomérulos y túbulos positivos a la presencia de VIBF por inmunofluorescencia indirecta. Tercer día postinoculación (400X).

Capítulo 1 INTRODUCCION

La infección de la bolsa de Fabricio (IBF) es una enfermedad de origen viral, aguda, altamente contagiosa, de aves jóvenes, caracterizada por afectar al sistema inmunocompetente, en especial a la bolsa de Fabricio (BF), lo que ocasiona un estado de inmunodepresión (Lukert y Saif, 1991).

1.1.- Historia de la enfermedad

La IBF se describió por primera vez en 1957 en áreas cercanas al condado de Gumboro en el estado de Delaware, EUA y se caracterizó por aumento de tamaño de la bolsa de Fabricio, daño renal y muerte en aves jóvenes; por la patología renal observada se le denominó inicialmente como "nefrosis aviar" (Cosgrove, 1962; Okoye, 1984).

En 1962, Winterfield y Hitchner aislaron las cepas Holte y Gray de bronquitis infecciosa a partir de un síndrome de nefritis nefrosis en pollo, lo que originó confusión en relación a la etiología (Okoye y Phil, 1984). Mas tarde, Winterfield *et al.* (1962) identificaron algunas diferencias entre las dos enfermedades y además, lograron el aislamiento del agente causal de la enfermedad en embriones de pollo y lo denominaron "agente infeccioso de la bolsa".

Posteriormente, Hitchner propuso el término de enfermedad infecciosa de la bolsa (infectious bursal disease, IBD) como nombre de la enfermedad aguda que causaba lesiones específicamente en dicho órgano (Lukert y Saif 1991; Okoye 1984).

1.2.- Distribución geográfica

Después de que se presentó el primer brote en EUA, la enfermedad se ha identificado en casi todo el mundo. En Europa la enfermedad se ha manifestado en Gran Bretaña, Francia, Italia, Bélgica, Alemania, Austria, Suiza, Bulgaria, Ex-Yugoslavia y España. La IBF se encuentra en todo el continente americano. En Asia ha ocurrido en países como Japón, Tailandia, India e Israel. Finalmente en Africa se han registrado brotes en Chad, Zaire, Nigeria, Egipto, Senegal, Ghana y Zambia (Okoye, 1984).

En México la enfermedad se presenta desde 1962. En ese año se detectó en varias zonas del país como Xochimilco y Azcapotzalco D.F.; Zintepec y Cuernavaca, Mor.; Texcoco, Cuautitlán y Tlalnepantla, Méx.; Pachuca, Hgo. y finalmente en Sonora, localizándose en Cd. Obregón y Guaymas (Correa, 1969). Por otra parte, en un muestreo serológico se demostró la presencia de anticuerpos en el 90.5% de las granjas localizadas en importantes áreas avícolas (Lucio *et al.*, 1971). En un informe elaborado por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) y la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA) (1993), se describe la presencia de IBF en 18 estados de la República Mexicana.

1.3.- Etiología de la IBF

El virus de la Infección de la bolsa de Fabricio (VIBF) es un miembro de la familia *Birnaviridae*, esta familia tiene un solo género, *Birnavirus* en el que se incluye además al virus de la necrosis pancreática de los peces, al virus tellina, al virus de las ostras y al virus X de la mosca de la fruta entre otros. Los integrantes de esta familia tienen genoma que

consta de ARN de doble banda segmentada, donde se deriva el nombre *Birnavirus* (Lukert y Saif 1991; Kibenge y *et al.*, 1988).

El VIBF tiene simetría icosaédrica, es desnudo, presenta un diámetro que varía de 55 a 65 nm. La densidad boyante de partículas completas en gradientes de cloruro de cesio tiene un rango de 1.31 a 1.34 g/ml, se describen densidades menores para virus incompletos (Lukert y Saif, 1991).

El VIBF está constituido por cuatro proteínas virales (Becht, 1980; Dobos, 1979; Dobos *et al.*, 1979; Todd y McNulty, 1979; Nick *et al.*, 1976), que se denominaron VP1, VP2, VP3 y VP4; de las cuales, VP2 es la más abundante, ya que constituye el 51% del total de las proteínas del serotipo 1. Por su parte, la VP3 constituye el 40% y las proteínas VP4 y VP1 el 6 y 3% respectivamente (Dobos *et al.*, 1979).

El VIBF es muy estable y puede permanecer en alojamientos aviares aún después de limpieza y desinfección, es resistente al éter y cloroformo, es estable a pH de 3 a 9.2, se reduce su infectividad a la exposición de formalina al 0.5% por seis horas (Benton *et al.*, 1967). El VIBF se inactiva si se expone a fenol o cresol en concentraciones de 1% durante una hora (Kibenge *et al.*, 1988). Por otra parte, Benton *et al.*, en 1967 encontraron que el VIBF puede permanecer infeccioso en un local alrededor de 120 días después de haber extraído a las aves afectadas, también demostraron virus infeccioso en el agua, alimento y heces obtenidos de granjas afectadas después de 50 días. De igual manera, Weinstock *et al.*, (1995) informaron de un brote de IBF en pollo de engorda en condiciones comerciales de Carolina del Norte, EUA a pesar de que la caseta había sido lavada y desinfectada.

1.4.- Propiedades antigénicas del VIBF

Se conocen dos serotipos del VIBF denominados 1 y 2 que fueron reconocidos en EUA y en Europa (Barnes *et al.*, 1982; Jackwood *et al.*, 1982; Jackwood y Saif, 1983; McFerran *et al.*, 1980). Se ha demostrado que la proteína VP2 posee los antígenos específicos de serotipo que a la vez son responsables de la inducción de anticuerpos neutralizantes protectores (Azad *et al.*, 1987; Becht *et al.* 1988).

El serotipo 1 se ha aislado de gallinas y patos, produciendo la enfermedad en la primera especie (Lukert y Saif, 1991). Entre los virus pertenecientes a este serotipo existe cierta variación antigénica, que se demostró en una investigación realizada mediante virus-suero neutralización, donde trece cepas del serotipo 1 se agruparon en seis subtipos antigénicos (Jackwood y Saif, 1987).

Las variaciones de antigenicidad más significativas se presentan en algunas cepas del serotipo 1 denominadas variantes antigénicas, aisladas inicialmente por Rosemberger *et al.*, de 1984 a 1985 en la península de Delmarva (EUA). A pesar de pertenecer al serotipo 1, dichos virus resultaron ser antigénicamente muy diferentes a las cepas de VIBF previamente identificadas, que actualmente se conocen como cepas clásicas o estándar (Snyder, 1990).

Por su parte, Rosales *et al.*, (1989a) aislaron dos cepas de VIBF en granjas de pollo de engorda en el estado de Georgia (EUA) que denominaron 3212 y U-28, las cuales mostraron diferencias antigénicas con las cepas Lukert, D-78, así como con las variantes A Delmarva y B Alabama, por virus-suero neutralización (VSN).

Snyder *et al.*, (1988a) determinaron por ELISA con una batería de anticuerpos monoclonales (AcM) específicos para el VIBF, la presencia de un epítoto común a todas las cepas conocidas definido por el AcM R-63. Más tarde, determinaron que dicho epítoto no está presente en las variantes antigénicas; por lo que sugirieron que el virus sufrió un cambio antigénico determinado por la eliminación de por lo menos uno de los dos sitios neutralizantes (R-63 y B-69) previamente encontrados en las cepas conocidas de VIBF (Snyder *et al.*, 1988b).

Sin embargo Ismail y Saif (1991) mediante un estudio de protección cruzada en pollos, concluyen que las cepas variantes y estándar comparten un antígeno que puede inducir a la formación de anticuerpos protectores, pero aparentemente no son expresados de la misma forma por las diferentes cepas.

El serotipo 2 se aisló en 1980 en gallinas y pavos, que fue identificado mediante pruebas de VSN. Debe señalarse que la inmunización contra el serotipo 2 parece no proteger contra el serotipo 1, la situación inversa no puede probarse porque no existe una cepa virulenta de desafío del serotipo 2 (Ismail y Saif, 1991, Mc Ferran *et al.* 1980).

1.5.- Epizootiología de IBF

El VIBF es un virus altamente contagioso y el virus permanece en el medio ambiente, la transmisión puede ser directa e indirecta. No existe evidencia de que el VIBF pueda ser transmitido por vía transovárica. Por otra parte, se ha demostrado la presencia del virus en larvas de *Alphitobius diaperinus* y mosquitos *Aedes vexans*, que fueron atrapados

en casetas afectadas, no obstante, aún no se determina claramente el papel de estos organismos en la transmisión de la enfermedad (Howie y Thorsen, 1981; Lukert y Saif 1991; McAllister *et al.*, 1995).

1.6.- Especies susceptibles

La IBF afecta a todas las estirpes de pollo sin embargo, las aves White Leghorn presentan un cuadro más severo con altos porcentajes de mortalidad. Se han reportado infecciones naturales en pavos y patos, que se han confirmado por la presencia de anticuerpos y el aislamiento de VIBF en esas especies (Lukert y Saif 1991). Recientemente Saif realizó el aislamiento de dicho virus en avestruces (Lukert, 1995).

La edad en la cual las aves poseen mayor susceptibilidad para la presentación de la IBF está entre las tres y seis semanas; sin embargo, varios estudios han demostrado que para que se manifieste la enfermedad es indispensable la presencia de la BF. Käufer *et al.*, en 1980, demostraron que aves bursectomizadas e inoculadas no se enferman y sólo desarrollan lesiones pasajeras. Por otro lado, Schat *et al.* (1981), mencionan que la extirpación de la bolsa retarda la diseminación del virus a otros órganos tal como señalan sus observaciones por la técnica de inmunofluorescencia.

1.7.- Patogenia

El período de incubación es muy corto, los signos de la enfermedad se observan a partir de dos a tres días postinfección. Cuatro a cinco horas después de la infección por vía oral, el virus tiene su sitio primario de replicación en las células linfoides y macrófagos

localizados en el intestino, a partir de los cuales el VIBF se disemina a diferentes órganos, en especial a la bolsa de Fabricio vía sistema porta y circulación general, de tal manera que el antígeno puede ser detectado en la BF desde las 11 horas postinfección (Becht, 1980). A su vez, Helmboldt y Garner indican que después de 24 horas ya se pueden observar lesiones en dicho órgano (Lukert y Saif 1991).

El virus se replica rápidamente en la BF donde puede alcanzar grandes cantidades, con la posterior diseminación a varios órganos; en algunos casos se presenta la muerte. Esto puede deberse probablemente a un daño directo de las células fibroblásticas (Becht, 1980) o por el depósito de complejos inmunes, principalmente en glomérulos renales, tal y como lo demuestran Ley *et al* (1978). Las lesiones en la BF son sugestivas de la presentación de la reacción de Arthus, inducida por complejos inmunes y la participación del complemento (Ivanyi y Morris, 1976). Sin embargo Schat *et al* (1981) describen la presencia de lesiones en aves bursectomizadas en etapa embrionarias, que no produjeron anticuerpos, lo que no concuerda con la suposición de la reacción de Arthus dentro de la patogenia de la IBF. Posiblemente la variación de las lesiones de la IBF en aves de diferentes edades pueda estar asociada a coagulopatías que pueden favorecer la presentación de lesiones hemorrágicas (Skeeles *et al.*, 1976).

1.8.- Características clínicas

La enfermedad tiene dos formas de presentación: clínica y subclínica, que están determinadas por la edad cuando ocurre la infección, por la virulencia de la cepa viral involucrada y por el grado de inmunidad de las aves infectadas (Lukert y Saif, 1991).

La forma clínica generalmente se presenta en aves de tres a seis semanas. Cosgrove (1967) describió como primer indicio de la presentación clínica de la IBF, a la acción de las aves de picar su propia cloaca, posteriormente se presenta diarrea acuosa y blanquecina, anorexia, depresión, erizamiento de las plumas, temores y postración; las aves en las etapas finales muestran deshidratación severa e hipotermia. La morbilidad puede alcanzar el 100% y la mortalidad el 30% (Lukert y Saif 1991).

Las cepas de alta virulencia del VIBF inducen la presentación clínica de la enfermedad con alta morbilidad y mortalidad. Por otro lado, las infecciones con virus menos virulentos, pueden originar la forma subclínica con baja mortalidad (Rosemberger, 1995). Se describen brotes donde únicamente se observa alteración en la ganancia de peso, o inclusive puede ocurrir la producción de anticuerpos sin la aparición de signos clínicos (Van der Sluis, 1995).

La forma subclínica se presenta en aves menores de tres semanas. No se manifiestan signos; sin embargo, tiene como grave consecuencia la presentación de un cuadro de inmunodepresión, en donde se observa inflamación inicial de la bolsa de Fabricio y posteriormente atrofia de la misma (Saif, 1991).

El diferente comportamiento de la IBF de acuerdo a la edad puede estar ligado a factores de la coagulación, ya que a los 17 días los pollos no exhiben defectos en los tiempos de coagulación, pero a los 42 días, cuando las aves se afectan clínicamente, dichos tiempos se incrementan (Skeeles, *et al.*, 1980).

1.9.- Lesiones macroscópicas

Los hallazgos macroscópicos que se presentan en la forma clínica incluyen deshidratación y hemorragias en piernas y muslos. Entre las lesiones viscerales mencionadas son degeneración hepática, nefromegalia, acúmulo de uratos en ureteres esplenomegalia de leve a moderada y hemorragias en proventrículo (Okoye y Phil, 1984).

Las lesiones más importantes ocurren en la BF, en el segundo y tercer día postinfección aumenta de tamaño, presenta trasudado gelatinoso que cubre su serosa. Para el cuarto día puede alcanza el doble de su peso, al quinto día retorna a su tamaño original pero continúa con un proceso de atrofia y de esta manera la bolsa pesa un tercio de lo normal (Cheville, 1967).

Con relación a las lesiones producidas por las variantes, éstas difirieren de las cepas clásicas en que producen una rápida y severa atrofia de la bolsa asociada con una mínima respuesta inflamatoria (Saif, 1991; Sharma *et al*, 1989; Snyder, 1990).

1.10.- Lesiones microscópicas

Existen diversas descripciones de los cambios histopatológicos que ocurren en BF de aves infectadas con el virus de Gumboro (Cheville, 1967; Riddell, 1987). Al día uno postinfección se hace evidente la presencia de degeneración y necrosis en linfocitos de la zona medular de folículos acompañada por una reacción inflamatoria por heterófilos. A los tres o cuatro días se encuentran todos los folículos afectados y además se observa edema severo, acúmulo de heterófilos e hiperemia. Tan pronto como la reacción inflamatoria

declina se observan quistes medulares, fibroplasia del tejido conectivo y proliferación de la capa epitelial.

En el bazo se observa hiperplasia de las células reticuloendoteliales alrededor de las vainas periarteriolas, al tercer día postinfección se presenta necrosis linfoide en centros germinales y vainas periarteriolas. Posteriormente el bazo se recupera de la infección rápidamente sin daño aparente en los centros germinales (Lukert y Saif 1991).

En el timo ocurre, cuatro días después de la inoculación, severa necrosis de linfocitos e hiperplasia de los tejidos reticular y epitelial (Cheville, 1967).

Sharma *et al.*, (1989) describieron las lesiones bursales provocadas por la inoculación de la variante A en aves libres de patógenos específicos. Los cambios incluyeron necrosis y severa depleción en folículos linfoides, además de atrofia de los pliegues a partir del tercer día. La inflamación estuvo ausente en el grupo inoculado con la variante A. En el grupo inoculado con la cepa IM el proceso inflamatorio estuvo caracterizado por infiltrado de heterófilos. En el timo no se apreciaron lesiones significativas, sólo atrofia cortical leve.

1.11.- Diferencias en la virulencia del VIBF

La virulencia y los efectos inmunodepresores del VIBF son variados dependiendo de la cepa del virus (Saif, 1991), inclusive se aprecian variaciones en las cepas utilizadas como vacunas ya que Winterfield y Thacker (1978) observaron en ocho cepas una amplia variación en la patogenicidad en términos de daño bursal, morbilidad y mortalidad.

Las cepas variantes antigénicas también difieren de las cepas clásicas con relación a sus características patogénicas, ya que no causan la enfermedad clínica en aves de cuatro a seis semanas de edad, no producen mortalidad tal como se ha observado con algunas cepas clásicas, pero tienen alta capacidad para inducir rápidamente atrofia de la BF y por lo tanto originar inmunodepresión (Lukert, 1995; Sharma, *et al.*, 1989; Snyder, 1990).

En EUA, la presencia de las cepas variantes en las granjas es importante, ya que en la península de Delmarva la variante GLS se aisló en el 52% de los casos, y la variante Delaware en un 44% y los aislamientos de cepas clásicas únicamente abarcaron el 4%. En el sureste, la cepa Delaware se obtuvo del 45% de los aislamientos, la GLS del 24% y las cepas clásicas del 30%. Sin embargo, en las regiones del oeste y noroeste, incluyendo California, las cepas clásicas ocuparon el 94% y las dos variantes mencionadas anteriormente ocuparon cada una el 3%.

En México se realizó una investigación mediante la técnica ELISA de captura con AcM y se encontraron cepas con patrones antigénicos sugestivos de la variante Delaware y RS/593 (Pérez *et al.*, 1995).

En Europa, a partir de 1987 se han aislado cepas altamente virulentas del VIBF que se han denominado en inglés very virulent infectious bursal disease virus (vvIBDV) las cuales han originado problemas devastadores debido a la alta mortalidad. En la década de los noventa se han diseminado los brotes ocasionados por estas cepas principalmente en Asia y África. Estas cepas corresponden al tipo clásico o estándar del serotipo 1 (Lukert 1995, Kouwenhoven, 1995).

En Bélgica, la cepa altamente virulenta denominada 849 VB provocó 100% de mortalidad en aves de cuatro a seis semanas con severo daño bursal (Van Den Berg, 1991). En Holanda se presentaron brotes de IBF con cepas altamente virulentas a los 14 y 28 días de edad (Kouwenhoven, 1995).

Todas las formas vvIBDV en Europa así como la cepa de desafío europea F52/70 mostraron patrones de reacción con AcM. idénticos a las cepas clásicas de los EUA (Snyder, 1990).

Otro aislamiento muy virulento provocó 100% de morbilidad y mortalidad en pollas de cinco semanas de edad, en Bangladesh. Los signos fueron deshidratación severa y emaciación (Islam, 1995). En Tailandia a partir de 1990 se han presentado brotes de IBF agudo con mortalidades de hasta 60% en gallinas de postura y de 25% en pollo de engorda (Sasipreeyajan, 1991).

1.12.- Efectos inmunodepresores del VIBF

El VIBF es un agente viral inmunodepresor para la aves, debido a su capacidad para causar necrosis de la BF y posterior atrofia de la misma.

Entre los trabajos iniciales que evidenciaron la capacidad inmunodepresora del VIBF, Allan *et al.* en 1972 informaron una disminución en la respuesta inmune hacia la vacunación con la cepa B1 de la enfermedad de Newcastle. De igual manera, Craft *et al.* (1990) observaron una disminución en los niveles de anticuerpos para la misma enfermedad en aves inoculadas con la cepa Edgar o con la variante A.

De acuerdo con lo descrito por Sharma *et al.*, en 1989, la inmunodepresión ocasionada por el VIBF se debe a la destrucción de linfocitos B y sus precursores que presentan proliferación activa en la BF. Por lo anterior, el VIBF puede inducir una profunda disminución en los linfocitos B que presentan en su membrana moléculas de IgM. También puede especularse que la supresión de la función de las células puede ser causada por otros factores como daño a las células T cooperadoras u otras células involucradas en la generación de la respuesta inmune o a la estimulación de células supresoras (Saif 1991). Se ha demostrado que son blancos particulares para el VIBF los linfocitos que presentan IgM en su superficie (IgMs)¹ (Hirai y Calnek, 1979).

Los efectos adversos sobre la respuesta inmune celular parecen ser menos severos o de menor magnitud en comparación con la respuesta mediada por anticuerpos. Se menciona una prolongada reacción de rechazo a injertos de piel pero esto no ha sido corroborado por otros estudios; tampoco se ha detectado daño sobre la respuesta de hipersensibilidad retardada a la tuberculina, sin embargo, la estimulación a mitógenos de linfocitos de sangre periférica se deprime de manera pasajera. No se han detectado efectos en la actividad de las células asesinas naturales (Saif, 1991).

Estudios recientes han demostrado que los linfocitos T del Bazo y los circulantes presentan una marcada resistencia a la estimulación por mitógenos durante la fase aguda de la enfermedad, que puede ser debida a la acción inhibitoria de productos solubles producidos por los esplenocitos en las aves infectadas (Sharma *et al.*, 1994).

¹ IgMs = IgM de superficie en linfocitos B, descrita por Pleiman *et al.*, 1994

Por la inmunodepresión inducida por el VIBF, las aves presentan un incremento en la susceptibilidad a algunas enfermedades infecciosas, como enfermedad respiratoria crónica complicada, enfermedad de Newcastle, hepatitis con cuerpos de inclusión, laringotraqueítis infecciosa aviar, anemia infecciosa aviar e infecciones por reovirus. También incrementa la susceptibilidad a *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e infecciones por *Eimeria* sp. (Lukert y Saif 1991, Saif 1991).

También se afecta la respuesta inmune a las vacunaciones. Varios autores han observado disminución en la respuesta de anticuerpos en la vacunación contra la enfermedad de Newcastle (Panigrahy, *et al* 1982) y coriza infecciosa (Higashihara *et al*, 1991), en aves afectadas por la enfermedad. Rosemberger y Gelb (1978) desafiaron pollos de un día de edad con la cepa estándar de desafío de VIBF (STC) y observaron que disminuyó la respuesta humoral a las vacunaciones con Newcastle, bronquitis infecciosa y laringotraqueítis infecciosa además, de incrementar el número de aves afectadas ante el desafío de esos mismos virus respiratorios.

Cuando la infección del VIBF ocurre simultáneamente con otros agentes patológicos, incrementa la severidad del cuadro, como ocurre cuando se asocia con anemia infecciosa aviar, donde la asociación incrementa la susceptibilidad a enfermedad de Newcastle y de bronquitis infecciosa, siendo mayor la susceptibilidad que cuando se presenta cada virus solo. También se incrementa la severidad cuando se presentan juntos IBF, anemia infecciosa aviar (AIA) y reovirus ocasionando una enfermedad más severa en comparación que cuando se presenta cada virus sólo o en pares. En un experimento donde se comparó el efecto de la infección simultánea de dichos virus, se observó que al inocular simultáneamente VIBF, reovirus y virus de AIA, se presentó anemia en el 100% de las

aves, mientras que cuando con reovirus y AIA el 60% de las aves resultaron anémicas y con VIBF y virus de AIA dicho trastorno se presentó en el 86% de las aves. (Rosemberger, 1995).

La importancia económica de la inmunodepresión inducida por VIBF radica en que dicha infección puede producir retraso en el crecimiento, alteración en los parámetros productivos y aumento en la tasa de decomisos a nivel de rastro. Un estudio realizado en Irlanda del Norte, señaló que la presencia de la forma subclínica en las parvadas ocasionó una reducción del 11 al 14% en el ingreso económico por cada 1000 aves (McIlroy, 1995).

La severidad de la inmunodepresión está relacionada con la edad al momento de la infección por IBF. Se ha demostrado que si ocurre en las dos primeras semanas de edad provoca una inmunodepresión más severa que la que ocurre después, además de que las respuestas primaria y secundaria de anticuerpos a otros antígenos resulta severamente afectada. (Saif 1991). Por otra parte, Higashihara *et al* (1991) al trabajar con diferentes cepas de VIBF, determinaron que la virulencia y la inmunodepresión producida están correlacionadas. Esto se confirma con las cepas altamente virulentas del VIBF que parecen poseer mayor capacidad de inducir inmunodepresión, lo que aún no ha sido completamente determinado (Ducatelle *et al.*, 1995).

En relación a aislamientos de campo en Japón, Nakamura *et al*, en 1992 compararon los efectos inmunodepresores del aislamiento altamente virulento denominado 90-11 y de la cepa de referencia GBF-1. El virus 90-11 ocasionó mortalidad de 7% en aves de dos semanas y de 54% en aves de tres semanas, además, deprimió de manera severa la respuesta de anticuerpos por la vacunación contra la enfermedad de Newcastle y aumentó

la severidad ante el desafío de la misma. Por último fue capaz de provocar lesiones más severas en el timo, sin embargo, no existió diferencia en las lesiones bursales entre ambos virus.

Las cepas vacunales también pueden ejercer un efecto inmunodepresor. Mazariegos *et al*, en 1990 evaluaron la patogenicidad y propiedades para inducir inmunodepresión de siete vacunas intermedias, mediante la evaluación de las lesiones bursales, el índice entre el peso de dicho órgano y el peso corporal y por medición de la respuesta a la enfermedad de Newcastle. De dicho trabajo se clasificaron tres cepas como altamente virulentas e inmunodepresoras, otras dos fueron clasificadas como moderadas y dos como suaves. Por su parte, Ezeokoli *et al* (1990), observaron disminución en la respuesta contra la enfermedad de Newcastle además de lesiones bursales en aves vacunadas con vacunas elaboradas a partir de virus activo de la IBF.

1.13.- Diagnóstico

La enfermedad es difícil de diagnosticar basado en los signos clínicos, que no son específicos. Para el diagnóstico de la IBF, se puede intentar el aislamiento en embriones de pollo libres de patógenos específicos, a partir de muestras de la BF y de bazo, por la vía de la membrana corioalantoidea. La muerte embrionaria ocurre entre los tres y cinco días. Las lesiones observadas en los embriones incluyen congestión y hemorragias cutáneas, esplenomegalia y necrosis hepática. Las cepas variantes no inducen alta mortalidad al ser inoculadas (Rosemberger, 1989).

Se puede detectar el antígeno por técnicas de inmunofluorescencia a partir de preparaciones de órganos afectados como la BF (Allan *et al.*, 1980), o por inmunoperoxidasa (Saif, 1995; Tanimura *et al.*, 1995).

La observación de lesiones macroscópicas y microscópicas en la BF resulta de utilidad pero no es concluyente. Durante la observación de lesiones histológicas es importante considerar que las lesiones no son patognomónicas ya que existen otros agentes que inducen lesiones similares (Casaubon *et al.*, 1993). Por último ya se cuentan con técnicas de biología molecular como sondas de ácidos nucleicos y reacción en cadena de polimerasa (Saif, 1995).

Para la cuantificación de niveles de anticuerpos las técnicas de ELISA y virus-suero neutralización, son más sensibles que la prueba de difusión doble en agar (Weisman *et al.*, 1978). La técnica de ELISA posee la ventaja de ser rápida y adaptada a sistemas de software, facilita la interpretación de los resultados (Lukert y Saif 1991). Sin embargo, en una comparación entre las técnicas de ELISA y VSN, se observó que los títulos de anticuerpos detectados por VSN fueron más altos durante un período de 52 semanas, en comparación con ELISA (Sharma y Rosemberger, 1987).

1.14.- Prevención y control

Los métodos de prevención y control incluyen las medidas sanitarias y la vacunación. Existen muchos tipos de vacunas de virus activo, dependiendo de la virulencia y la diversidad antigénica. Las cepas altamente virulentas se han retirado del mercado en el continente americano, donde existen las cepas de virulencia intermedia y las altamente

modificadas (Lukert y Saif 1991). Las cepas intermedias pueden inducir atrofia en grado variable e inmunodepresión en aves de un día (Mazariegos *et al.*, 1990).

La dificultad principal para establecer un esquema de vacunación con productos de virus activo es la presencia de la inmunidad natural pasiva en aves jóvenes, ya que algunas cepas vacunales no producen una respuesta inmune adecuada en presencia de altos niveles de anticuerpos maternos (Winterfield y Thacker, 1978). Por otro lado, virus vacunales capaces de inducir protección en pollos con inmunidad materna, pueden producir inmunodepresión si se aplican en pollos sin o con bajos niveles de inmunidad (Muskett *et al.*, 1979). Otra condición que afecta la efectividad de los programas de vacunación, es que los títulos de dichos anticuerpos son variables en los pollos dentro de una misma parvada (Weisman y Hitchner 1978).

Las cepas vacunales pueden sobrepasar a los anticuerpos si los pollos poseen títulos determinados por VSN menores a 10^{27} , 10^{24} y 10^{20} con cepas altamente virulentas, intermedias y avirulentas respectivamente (Lukert y Saif 1991).

Las vacunas inactivadas emulsionadas en vehículos oleosos se utilizan para reforzar primovacunas y prolongar la inmunidad en parvadas de reproductores. Estas vacunas pueden estar elaboradas con cepas clásicas y variantes del virus (Lukert y Saif 1991).

Las cepas variantes constituyen un problema importante en Estados Unidos. En México, la IBF se presenta en varios estados sin embargo; se desconocen las propiedades antigénicas, la virulencia y los efectos inmunodepresores de los virus prevalentes en el campo por lo que es importante caracterizar la virulencia de los aislamientos en México, así como determinar sus posibles efectos inmunodepresores.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar las propiedades antigénicas y la virulencia de tres aislamientos del VIBF obtenidos de casos en parvadas de pollo de engorda comerciales en México.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1.- Realizar el aislamiento de cepas de campo del VIBF a partir de aves infectadas en embriones de pollo libres de patógenos específicos y su identificación.

2.- Determinar las propiedades antigénicas de los tres aislamientos de VIBF con cinco anticuerpos monoclonales mediante la técnica de ELISA de captura.

3.- Determinar la virulencia de los tres aislamientos del VIBF en aves inoculadas por vía oral, mediante la observación de lesiones en órganos linfoides, la cuantificación de su severidad en la bolsa de Fabricio, la detección y persistencia del VIBF y la medición de la respuesta humoral hacia antígenos T-dependientes y T-independientes.

Capítulo 2 MATERIAL Y MÉTODOS

Cepa de VIBF de referencia.

Se utilizó la cepa 73688 aislada por M.C. Peckham a partir de un brote de IBF en pollas de 16 semanas de edad (Lucio y Hichtner, 1980). Antes de la inoculación se le hicieron tres pases en aves libres de patógenos específicos. Se observaron lesiones severas en BF a partir del segundo pase. El título de la suspensión para desafío fue de $10^{2.8}$ DLEP_{50%}/ml.

Embriones de pollo y aves de experimentación.

Se utilizaron 300 embriones de pollo libres de patógenos (LPE) ALPES¹, para el aislamiento y titulación de los virus de campo de IBF. Para el estudio de virulencia, se usaron 620 pollos de engorda Arbor Acres por Arbor Acres no sexados y provenientes de una incubadora comercial² con un peso promedio al primer día de edad de 44.13 g y un título medio geométrico de anticuerpos maternos contra VIBF de $10^{2.87}$, determinado por VSN.

Los pollos fueron alojados en unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves, (FMVZ, UNAM), la crianza se realizó en piso. El agua y el alimento se proporcionaron a libre acceso. El sistema de alimentación incluyó un alimento iniciador, con 22% de proteína cruda y 2,950 Kcal. de EM/ kg hasta los 28 días de edad,

¹ Aves Libres de Patógenos Específicos. S. A. de C.V. Tehuacán, Pue.

² Unión de Productores Avícolas de Tepexpan S.A. de C.V.

posteriormente se administró un alimento finalizador con 20% de proteína cruda y 3050 Kcal de EM/ kg de los 29 a los 38 días de edad.

Elaboración de antisuero contra VIBF

Se elaboró un antisuero contra VIBF en 15 conejas de la raza Nueva Zelanda blanco, de 5 meses de edad y 1.80 Kg de peso promedio. Se inmunizaron cinco conejas con cada una de las tres siguientes cepas vacunales: Lukert³, 2512⁴, y Sal⁵, con títulos de $10^{4.8}$, $10^{5.0}$ y $10^{4.5}$ DICC_{50%}/ml respectivamente. La primera inoculación fue intramuscular con 0.5 ml. de suspensión viral mezclada con 0.5 ml de adyuvante completo de Freund⁶. Una segunda inoculación endovenosa se administró 28 días después de la primera, con 1 ml de suspensión viral sin adyuvante. Las conejas se sangraron a blanco a los 30 días posteriores a la segunda inmunización.

Antes de ser usados para el estudio de inmunofluorescencia, los antisueros específicos de cada cepa se mezclaron por partes iguales y se adsorbió con polvo de embrión de pollo por 24 horas a 4C para eliminar fluorescencia inespecífica.

Prueba de precipitación en gel de agar (PA)

La prueba de precipitación en gel de agar se realizó según lo descrito por Garvey y Sussdorf, (1977) utilizándose antisuero obtenido de aves LPE inmunizadas con la cepa Lukert de VIBF.

³ Anchor Boeringher - Ingelheim S.A. M.R.

⁴ Rhône Merieux M.R.

⁵ Bursine 2 Solvay Animal Health M.R.

⁶ Difco Lab. USA M.R.

Prueba de virus-suero neutralización (VSN).

Se realizó el método beta de virus seroneutralización (VSN) en cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo según se describe en la literatura (Beard, 1989), con la cepa Lukert de VIBF con un título de 10^2 DICC_{50%}/0.1 ml. Se consideró como título al recíproco de la máxima dilución de suero que neutralizó en un 100% el efecto citopático provocado por el VIBF. Para el cálculo de medias geométricas los valores menores de 10 se consideraron como cero.

Procesado histopatológico de tejidos.

Las porciones de órganos previamente fijadas en formalina amortiguada al 10% se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 4 μ de espesor, para posteriormente ser procesadas con la técnica de hematoxilina- eosina (HE) (Luna, 1968).

Técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Se realizó la técnica indirecta de inmunofluorescencia (Kawamura, 1977) en cortes de 4 μ de espesor de los órganos congelados. Como anticuerpo primario se utilizó antisuero contra VIBF elaborado en conejos, y como antisuero secundario se utilizó anti-IgG de conejo elaborado en cabra, conjugado con isotiocianato de fluoresceína⁷. La observación se realizó en microscopio de epifluorescencia con los filtros G-436, FT-510 y LP-520⁸.

⁷ Anti-Rabbit IgG Whole molecule FITC conjugate.- Sigma Immunochemicals.

⁸ Karl Zeiss, West Germany

Medición de la respuesta humoral timo-dependiente y timo-independiente.

Para titular los niveles de anticuerpos séricos contra eritrocitos de ovino (EO) (antígeno T-dependiente), se realizó microhemoaglutinación (Toivanen *et al.*, 1972), en diluciones dobles seriadas de los sueros en volúmenes de 25µl y utilizando suspensión de EO al 0.5% previamente lavados como antígeno. El título se consideró como el recíproco de la máxima dilución de suero que produjo 100% de hemoaglutinación.

La microaglutinación para titular anticuerpos séricos contra *Brucella abortus* (Ba) (antígeno T-independiente) se realizó según Toivanen *et al.*, 1972 utilizando el antígeno destinado para la prueba de tubo con la cepa de *B. abortus* 1119-3⁹ diluido según las especificaciones del fabricante. El título se consideró como el recíproco de la máxima dilución de suero que produjo 100% de aglutinación de bacterias.

3.1.- Muestreo y obtención de muestras.

Se muestrearon ocho granjas avícolas en Huasca de Ocampo, Hgo.; Iguala, Gro., Perote Ver.; Texcoco y Zumpango, Edo de Méx., con serología positiva a IBF, a pesar de que no se aplicaba ninguna vacunación contra la infección de la bolsa de Fabricio (Cuadro No. 1). Se recolectaron muestras de BF, bazo y tonsilas cecales y sangre para obtención de suero. Una porción de la BF se fijó en formalina amortiguada y el resto se mantuvo en congelación hasta su uso.

⁹ Aba Test Tubo.- Pronabive México D..F.

3.2.- Aislamiento e identificación del VIBF

Se maceraron las BF, el bazo y tonsilas cecales utilizando como diluyente caldo triptosa fosfatado, adicionado con 1000 UI/ml de penicilina G sódica, 2 mg/ml de estreptomicina y fracción V de albúmina sérica bovina al 0.75%. La dilución fue de 1:10. Los fluidos obtenidos se centrifugaron a 700g durante 20 minutos, se filtraron por una membrana millipore de 0.45µm y se determinó su esterilidad. Posteriormente, se inocularon en embriones de pollo LPE por membrana corioalantoidea (MCA) según lo descrito anteriormente (Senne, 1989), se incubaron a 37 C por seis días. Se observaron diariamente, desechando a los embriones que murieron antes de 24 horas.

Para detectar la presencia del VIBF en los embriones LPE inoculados, se realizaron macerados de los embriones muertos y de las MCA para efectuar la prueba de precipitación en gel de agar (PA).

Para descartar la posible presencia de los virus de Newcastle e influenza aviar, se realizó hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación a partir del líquido alantoideo. Para el caso de Reovirus y Adenovirus, se realizó PA y VSN¹⁰ con los macerados de tejidos embrionarios, la VSN se realizó en cultivos renales de embrión de pollo, utilizándose un antisuero de reovirus para la cepa S1133 y de adenovirus grupo I, serotipo 1 (CELO) y serotipo 4

¹⁰ Realizada en el Laboratorio de Biología. Investigación Aplicada SA. de CV.

La titulación de las suspensiones virales se realizó por inoculación en embriones de pollo LPE de las suspensiones virales, tal como lo describen Villegas y Purchase (1989). El número de DLEP_{50%}/ml. se determinó por el método de Reed and Muench.

3.3.- Determinación de las características antigénicas de los VIBF.

Se realizó la técnica de ELISA de captura (AC-ELISA)¹¹ con microplacas cubiertas con proteína A de *Staphylococcus aureus* y cinco anticuerpos monoclonales específicos para epítopes del VIBF denominados B-29, R-63, BK-9, B-69, y 57 (Snyder *et al.*, 1988). La enzima utilizada fue peroxidasa y como sustrato ABTS (Pérez *et al.*, 1995)

3.4. - Caracterización de la virulencia de los aislamientos de VIBF.

Para la realización de los estudios de virulencia se seleccionaron tres aislamientos de VIBF denominados H, P y G, con base a la mayor mortalidad embrionaria y líneas de identidad más definidas mediante la prueba de precipitación en agar. Previamente a la inoculación, a los VIBF se llevó a cabo un pase en aves libres de patógenos específicos. A las 50 hr postinoculación, se recolectaron las BF y se maceraron de la forma descrita anteriormente. Los fluidos resultantes se titularon en embriones de pollo LPE para su utilización como material de desafío.

Las aves se asignaron de manera aleatoria en cinco grupos de 25 individuos (grupo A = testigo, B = inoculado con la cepa 73688, C = con aislamiento H, D = con aislamiento P y E = con aislamiento G), con tres réplicas cada uno. Los grupos fueron

¹¹ Realizada en Servicios Profesionales Técnicos, Tehuacán, Pue.

alojados en diferentes unidades de aislamiento y se incluyeron aves excedentes en un número determinado para la medición de la respuesta inmune hacia los dos antígenos utilizados (Cuadro No. 2).

El título de los fluidos para desafío de los aislamientos de VIBF H, P y G fue de $10^{2.8}$, $10^{3.0}$ y $10^{3.2}$ DLEP_{50%}/ml respectivamente. La inoculación de los tres aislamientos de campo y de la cepa 73688 fue a los 17 días de edad por vía oral y con un volumen de inóculo de 0.2 ml. Al grupo testigo se le administró 0.2 ml de caldo triptosa fosfatado. A partir de este momento, se observó diariamente la signología y se registró la mortalidad.

El primer muestreo se realizó un día antes de la inoculación a los 16 días de edad y después se realizaron muestreos a los 3, 7, 14, y 21 días postinoculación con VIBF. Se seleccionaron aleatoriamente doce aves de cada grupo (cuatro por cada réplica). La rutina incluyó la identificación individual de cada pollo, su pesaje y obtención de sangre sin anticoagulante; las aves se sacrificaron por descarga eléctrica para realizar la necropsia. En primer lugar se disecó la BF para obtener su diámetro transversal *in situ* y se extrajo completa para ser pesada. Se obtuvieron muestras de BF, timo, tonsilas cecales, bazo y riñón para los estudios de inmunofluorescencia e histopatología. Finalmente, se realizó la medición de ambos metatarsos, para la determinación del rango tarso bursal.

Para la evaluación de la virulencia de los tres aislamientos de campo de VIBF se consideraron los siguientes criterios:

3.4.1.- Peso Corporal.

3.4.2.- Mortalidad.

3.4.3.- Evaluación de la proporción BF: Peso corporal o índice bursal IB.

Definido como la proporción de la bolsa de Fabricio con relación al peso corporal, este índice se utilizó para determinar alguna alteración en el peso de la bolsa de Fabricio tomando como referencia el peso corporal. La fórmula para su cálculo fue la siguiente (Lucio y Hichtner, 1979):

$$IB = \frac{\text{Peso de la BF (g)}}{\text{Peso corporal (g)}} \times 1000$$

Para determinar la existencia de atrofia, se calculó la proporción de IB de los animales inoculados con el IB promedio del grupo testigo, a lo que se denominó Índice B:B, este índice se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula (Lucio y Hichtner, *op. cit.*).

$$B:B = \frac{\text{IB de cada pollo desafiado}}{\text{IB promedio del grupo testigo}}$$

Se consideró atrofia bursal cuando en los grupos inoculados se obtuvieron valores de B:B menores a 0.70.

3.4.4.- Evaluación del Rango Tarso Bursal (RTB).

Se utilizó para determinar alguna alteración en el desarrollo de la bolsa de Fabricio tomando como referencia el desarrollo corporal. El RTB es la proporción del diámetro de la bolsa con el largo del metatarso, que es un indicador del desarrollo corporal, tal y como lo describe Rountre (citado por Guerrero, 1993).

$$\text{RTB} = \frac{\text{Diámetro bursal (cm)}}{\text{Largo promedio de metatarsos (cm)}}$$

3.4.5.- Determinación de la persistencia del VIBF en tejidos por inmunofluorescencia (IF)

Se determinó la presencia del VIBF en tejidos mediante inmunofluorescencia indirecta en la BF, bazo, timo, tonsilas cecales, hígado y riñón.

La cuantificación de la inmunofluorescencia en los cortes se llevó a cabo según el siguiente criterio:

0 = Ausencia de células con IF.

1 = Escasas células con IF.

2 = Grupos de células con IF.

3 = Abundantes del tejido con células con IF.

3.4.6.- Evaluación histopatológica.

Se realizó una descripción de las lesiones presentes en BF, bazo, timo, tonsilas cecales y riñón, en los diferentes muestreos. Únicamente para la BF se calificó la lesión bursal, utilizando el criterio propuesto por Muskett *et al.* (1979) que es el siguiente:

0 = Sin lesión.

1 = Necrosis leve en folículos aislados.

2 = Depleción linfoide moderada difusa o folículos aislados con depleción severa.

3 = Depleción linfoide severa en mas del 50% de los folículos.

4 = Presencia únicamente del contorno de los folículos linfoides con sólo algunos linfocitos, aumento del tejido conectivo, presencia de quistes e hiperplasia del epitelio

5 = Pérdida completa de la arquitectura folicular con fibroplasia.

3.4.7.- Medición de la respuesta inmune hacia el virus de la infección de bolsa de Fabricio (VIBF).-

La titulación de anticuerpos contra VIBF se hizo por VSN con el suero de las aves sacrificadas a los 16 día y a los 3, 7 14 y 21 días postinoculación.

3.4.8.- Medición de la respuesta humoral hacia antígenos T-dependientes y T-independientes.

A los seis días después de la inoculación con los cuatro diferentes VIBF, un número determinado de pollos (Cuadro No. 2) se inocularon intraperitonealmente con un ml de suspensión de EO al 7% o con Ba con título de 3.6×10^9 bacterias viables por ml.

Las aves se sangraron a los 7 y 14 días después de aplicados los dos antígenos para la obtención de suero, el cual se procesó posteriormente por microhemoaglutinación y microaglutinación para la titulación de anticuerpos hacia EO y Ba respectivamente.

3.5.- Análisis estadístico.

Para las variables peso corporal, peso y diámetro bursal, índice bursal y rango tarso bursal se realizó análisis de varianza para determinar el efecto en cada grupo, para realizar comparaciones entre medias se realizó la prueba de Tukey a un nivel de significancia de 0.05.

Para determinar el grado de asociación entre IB y RTB se determinó el coeficiente de correlación de Pearson, para los diferentes grupos y edades.

Para analizar los valores de calificaciones de lesiones histológicas, cantidad de células inmunofluorescentes y niveles de anticuerpos se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. La diferencia entre medias se determinó por la Prueba de Wilcoxon-Mann Whitney, también con un nivel de significancia de 0.05.

Previamente al análisis estadístico, los títulos de anticuerpos para VIBF, contra *B. abortus* y eritrocitos de ovino se transformaron en $\text{Log}_{10}(\text{Título} + 1)$.

3.1.- Aislamiento e identificación de VIBF de campo.

De los procedimientos realizados se aislaron e identificaron tres virus de IBF que produjeron mortalidad superior al 60% al ser inoculados en embriones de pollo SPF de nueve días.

Aislamiento No. 1.- Fue obtenido de pollo de engorda de 42 días de edad en una granja de tres edades ubicada en Huasca, Hgo, Dicho virus fue identificado como "H".

Aislamiento No. 2.- Obtenido de pollo de engorda de 32 días de edad de edad en una granja ubicada en Perote, Ver., el que fue identificado como "P".

Aislamiento No. 3.- Obtenido de pollo de engorda de 42 días en una granja de dos edades ubicada en Iguala, Gro, que se identificó como "G".

El número de embriones muertos después de la inoculación con cada uno de los tres aislamientos se muestra en el Cuadro No. 3. Dicha mortalidad se presentó entre los tres y cinco días postinoculación y las lesiones encontradas en los embriones incluyeron congestión y hemorragia difusa en la piel. edema en la región abdominal, enanismo y congestión en órganos internos

Con relación a la pureza de los aislamientos, no se observó hemoaglutinación que pudiera atribuirse al virus de la enfermedad de Newcastle e influenza aviar, al mezclar cada fluido con suspensión de eritrocitos de ave al 2%. Para el caso de reovirus y adenovirus con la prueba de PA no se observaron líneas de identidad a las 48 hr, tampoco se produjo neutralización con antisueros específicos para dichos virus.

3.2.- Determinación de las características antigénicas de los VIBF.

Mediante la técnica de AC-ELISA, utilizando la batería de AcM, la cepa 73688 y los aislamientos P y G, mostraron poseer los epítopes reconocidos los AcM B-29, R63 y B69. Sin embargo, el aislamiento H no fue reconocido por ninguno de los AcM utilizados.

3.3.- Caracterización de la virulencia de los aislamientos de VIBF.

3.3.1.- Signología clínica y mortalidad.

No se observaron signos de enfermedad en las aves incluidas en los cuatro grupos inoculados sólo se observó baja uniformidad en el tamaño que fue muy evidente en el grupo C, inoculado con el aislamiento "H".

El número de aves muertas y el porcentaje de mortalidad se muestra en el Cuadro No. 4. La mortalidad se presentó principalmente entre la primera y tercera semana de edad. Los hallazgos macroscópicos presentes en las aves muertas incluyeron severo retraso en el crecimiento, anormalidades en los miembros inferiores y atrofia en la BF, sin embargo en los grupos C (aislamiento "H") y D (aislamiento "P") se presentaron con mayor frecuencia aves con cianosis de cresta y barbillas, presencia en cavidad abdominal de líquido seroso pajizo en cantidad variable, hidropericardio leve y hepatitis grasa leve, estos hallazgos son sugestivos de síndrome ascítico.

3.3.2.- Peso corporal.

Los promedios de pesos corporales durante el experimento se observan en el Cuadro No. 5. Se presentaron diferencias estadísticas de los pesos corporales en el muestreo preinoculación (dieciséis días de edad), a los tres y a los siete días postinoculación. Cuando

finalizó el experimento a los 21 días, el grupo con mayor peso promedio fue el A (testigo) con 1689 g y el menor fue el grupo "C" (aislamiento "H") con 1550 g, aunque en los días catorce y veintiuno postinoculación las medias son numéricamente distintas pero no existe diferencia estadística entre los cinco grupos ($P > 0.05$).

La uniformidad de los pesos corporales disminuyó notablemente en las aves inoculadas con los VIBF de campo a los 21 días posteriores a la inoculación, lo que se hace evidente por sus valores de desviación estándar (DE). El grupo A (testigo) tuvo una DE de 96.64 (con un coeficiente de variación $CV = 5.72\%$) el grupo B (cepa 73688) una DE de 96.64 ($CV = 6.12\%$) y en los grupos C, D y E se presentaron valores de 208.60 ($CV = 13.45\%$), 154.42 ($CV = 9.54\%$), y 143.98 ($CV = 8.80\%$) respectivamente. El grupo C (aislamiento "H") mostró la mayor variabilidad de pesos corporales, que se confirmó por la DE del peso corporal promedio.

3.3.3.- Peso de la bolsa de Fabricio.

El peso promedio de las bolsa de Fabricio durante todo el experimento se presenta en el Cuadro No. 6. El grupo A (testigo) presentó los mayores pesos del día tres al veintiuno. En los días tercero y séptimo postinoculación el grupo "B" (cepa 73688), presentó el menor peso promedio (0.70 g para los dos días), existiendo diferencia estadística ($P < 0.05$) con los otros grupos. Entre los tres aislamientos de campo no existieron diferencias estadísticas durante los cuatro muestreos postinoculación.

3.3.4.- Índice bursal

Los valores promedio de índices bursales (IB) se muestran en el Cuadro No. 7. A los dieciséis días (preinoculación), no se observó diferencia estadística entre los cinco grupos. A partir de los tres días, el grupo B (73688) tuvo el menor valor de índice bursal

con 0.0013. No existieron diferencias estadísticas entre los tres aislamientos durante todo el experimento.

3.3.5.- Rango tarso bursal

Los valores promedios de rango tarso bursal (RTB) se muestran en el Cuadro No. 8. Solamente se observó diferencia estadística en el día tres postinoculación entre el grupo B (inoculado con la cepa 73688) con los otros grupos inoculados, después no existieron diferencias estadísticas entre los grupos inoculados.

El estudio de correlación entre IB y RTB se muestra en el cuadro No. 9. Los índices de correlación resultaron ser muy heterogéneos dentro de cada grupo y edad.

3.3.6.- Detección del virus por inmunofluorescencia indirecta.

Bolsa de Fabricio.- Los resultados acerca de la detección del antígeno viral por inmunofluorescencia indirecta se muestra en el Cuadro No. 10. Se detectó presencia de antígeno viral desde los tres hasta catorce días postinoculación. Al tercer día postinoculación las aves del grupo E (aislamiento "G") presentaron mayor cantidad de células con IF con diferencia estadística ($P < 0.05$) con los grupos B (73688) y C (aislamiento "H"). En los días siete y catorce no se observan diferencias significativas entre los grupos inoculados con los virus de campo. La IF se observó en el citoplasma en corteza y médula de folículos linfoides, también se observaron células escasas distribuidas en el tejido conectivo de los septos interfoliculares. Los tejidos de las aves pertenecientes al grupo A (testigo) no presentaron indicio de inmunofluorescencia específica durante el transcurso de todo el experimento.

Bazo.- Los resultados de la inmunofluorescencia en el bazo se presentan en el Cuadro No. 11. Se presentaron indicios de virus a partir del día tres hasta el día catorce en los grupos B (73688) y E (aislamiento. "G"), aunque únicamente en dos y tres aves respectivamente y a los siete días para los grupos C y D. Durante todo el experimento no se presentaron diferencias estadísticas entre los grupos B, C, D y E.

Timo.- Los resultados de inmunofluorescencia para el timo se muestran en el Cuadro No. 12. El antígeno viral fue evidente desde el día tres hasta el catorce. A lo largo de todo el experimento aunque las calificaciones medias son distintas, no son diferentes estadísticamente ($P > 0.05$).

Tonsilas cecales.- La presencia del antígeno de VIBF abarcó del día tres hasta el siete en los grupos A, C y D y hasta el día catorce únicamente en los grupos B (73688) y E (aislamiento. "G") (Cuadro No. 13) siendo el grupo E el que presentó mayor número de células IF en este día. No se observaron diferencias estadísticas significativas.

Riñón.- Se detectó el antígeno hasta el día tres en todos los grupos y en el día catorce sólo en B (73688) y C (aislamiento. "H") (Cuadro No. 14). Tampoco se determinó diferencia estadística significativa entre los cinco grupos en todo el período estudiado.

3.3.7.- Evaluación histopatológica.

a) Descripción de las lesiones histológicas en la bolsa de Fabricio.

Bolsa de Fabricio:

Grupo A (Testigo)

A los dieciséis días de edad, momento antes de la inoculación, se observaron focos discretos de necrosis leve en folículos aislados, se presentó depleción linfoide leve, llegó a presentar exudado seroso leve entre los folículos. Estos hallazgos permanecieron constantes a lo largo de todo el desarrollo del experimento.

Grupo B. (Cepa 73688)

Día Tres.- Se observó disminución severa del tamaño de los pliegues que llegó a un tercio en comparación con el grupo testigo. Se presentaron folículos escasos con núcleos picnóticos y restos celulares. La depleción linfoide severa fue frecuente, en la mayoría de los cortes abarcó hasta el 100% de los folículos y únicamente se apreciaron las siluetas, que eran pequeñas, alargadas, con escasas células linfoides o inclusive desprovistas de células. El epitelio corticomedular presentó hiperplasia de moderada a severa y existió proliferación leve de células reticulares. Se llegó a observar inflamación serosa de moderada a severa con células mononucleares en su mayoría linfocitos. Los septos interfoliculares presentaron ligero engrosamiento. Finalmente se presentó hiperplasia leve del epitelio que recubre a los pliegues con la aparición de quistes pequeños escasos en algunos cortes.

Día Siete.- La depleción linfoide siguió con grado severo, sin embargo, se observaron algunos folículos con repoblación de linfocitos, hasta aproximadamente en un 20% del corte, se presentó necrosis de leve a moderada en algunos de ellos. La inflamación serosa fue leve a moderada. En algunos casos, los quistes intrafoliculares, llegaron a ser numerosos y alcanzaron tamaño considerable, ya que en algunos el tamaño podía equipararse al tamaño de los folículos. Continuó observándose hiperplasia leve a moderada de epitelio corticomedular y las células reticulares con hiperplasia leve. La hiperplasia del epitelio aumentó ya que en algunas porciones llegaba a adquirir apariencia adenoide.

Día Catorce.- Se observó repoblación folicular importante, que alcanzó en algunas preparaciones aproximadamente un 70% del corte. En los folículos regenerados se observó necrosis discreta y algunos presentaron depleción linfoide leve a moderada. El número de folículos con hiperplasia aparente de células corticomedulares y reticulares fue menor. Persistió el proceso inflamatorio seroso leve a moderado en sólo algunos cortes.

Día Veintiuno.- Se presentó depleción linfoide moderada a severa, que alcanzó el 100% en tres bolsas estudiadas, el proceso de repoblación continuó y fue frecuente la necrosis de leve a moderada. Persistió el proceso inflamatorio en forma leve en siete cortes.

Grupo C (Aislamiento "H")

Tres Días.- Se observó necrosis leve a moderada con abundantes núcleos picnóticos y restos celulares; la depleción linfoide fue leve a moderada, pero severa abarcando el 100% de extensión en una bolsa. Se presentó hiperplasia leve a moderada de células corticomedulares y reticulares, la inflamación serosa se presentó hasta en forma moderada. La fibroplasia interfolicular fue leve y por último se presentó hiperplasia epitelial moderada con la presencia de adenoides en un corte.

A los siete días se acentuó la depleción linfoide, llegando a ser severa en la mayoría de las bolsas. La hiperplasia de células corticomedulares fue leve a moderada al igual que para la hiperplasia de células reticulares. La severidad del proceso inflamatorio fue moderada en todos los casos. Finalmente se presentó leve incremento del tejido conjuntivo interfolicular y adenoide moderado.

A los catorce días continuó la depleción linfoide moderada a severa, la repoblación de los folículos fue incipiente. Se presentó hiperplasia moderada de células

corticomedulares. La inflamación se presentó predominantemente en forma moderada. Finalmente se observó hiperplasia epitelial leve.

A los veintiún días postinoculación se presentó repoblación de células linfoides que llegó hasta un 30% de los folículos, la depleción linfoide se presentó de leve a moderada y en tres cortes fue severa. El proceso inflamatorio fue moderado.

Grupo D (Aislamiento "P")

Día Tres.- Se presentó frecuentemente necrosis multifocal, se observaron abundantes núcleos picnóticos, en tres cortes se observaron folículos con necrosis licuefactiva centrofolicular severa. En los centros de los folículos se observaron cavidades con abundantes detritus celulares. La depleción linfoide fue moderada a severa.

Día Siete.- La depleción linfoide fue severa en la mayoría de los cortes observados. Se presentó hiperplasia moderada de corticomedulares y la inflamación serosa fue leve en la mayoría de los casos.

Día Catorce.- La repoblación linfoide se hizo evidente, pero en menor proporción en comparación con el grupo "B". Predominó la necrosis moderada, la depleción linfoide fue moderada y en cuatro bolsas severa. La inflamación serosa moderada se observó en varios cortes y en un corte fue serofibrinoso leve.

Día Veintiuno.- La depleción fue más severa que en el muestreo anterior ya que abarcó el 100% de las bolsas en diez cortes. Se presentó necrosis moderada en algunos cortes y persistió un infiltrado mononuclear leve.

Grupo E (Aislamiento G)

Día Tres.- Se presentó necrosis multifocal moderada difusa y en un corte se observó necrosis licuefactiva severa de los centros germinativos en un 30% aproximadamente de los folículos. Se presentó también deplesión linfoide moderada a severa. Se observó en un corte quistes intrafoliculares grandes y abundantes. La inflamación fue principalmente leve.

Día Siete.- La deplesión linfoide predominó en forma severa y abarcó la totalidad del corte en 11 muestras. El exudado inflamatorio persistió en forma leve.

Día Catorce.- Persistió la deplesión linfoide severa, en la mayoría de los cortes, se presentó hiperplasia de células corticomedulares moderada y la inflamación serosa fue moderada.

Día Veintiuno.- Se hizo evidente el proceso de repoblación linfoide, que abarcó de un 5 hasta un 50% de los cortes, algunos folículos presentaron deplesión linfoide severa y la inflamación fue leve.

b) Evaluación del grado de lesión bursal.

Las calificaciones promedio de las lesiones histológicas se presentan en el cuadro No. 15.

El grupo A presentó el grado de lesión más bajo y mostró oscilaciones alrededor del valor 1 durante todo el experimento.

En el grupo B, inoculado con la cepa 73688, se presentaron más rápidamente lesiones severas, ya que en los días tres y siete se obtuvieron las calificaciones más altas (3.75 y 4.00 respectivamente) con diferencia estadística significativa únicamente para el tercer día, sin embargo el grado de lesión disminuyó en el día 14 (2.25), siendo el más bajo de los grupos inoculados; finalmente en el día 21 se incrementó nuevamente a 3.16.

Los tres virus de campo presentan diferencias estadísticas sólo en los días 14 y 21. El aislamiento P (Grupo D) indujo un desarrollo de lesiones similar a la cepa 73688, con el mayor grado de lesión al día siete (3.75), disminuyendo en el día catorce (3.00) e incrementándose nuevamente en el día 21 (3.91).

El grupo E, inoculado con el aislamiento G, a los tres días presentó el segundo lugar en la severidad de lesión bursal (3.00), que se incrementó a los siete días (3.91), disminuyó ligeramente a los 14 días (3.75) y para el día 21 continuó en descenso (3.33). La severidad de la lesión se incrementó más lentamente en el grupo C (aislamiento H) con su nivel máximo en el día siete (3.75) y con disminución a los días 14 y 21 (2.83 y 2.66 respectivamente).

c) Descripción de las lesiones histológicas en otros órganos:

No se observaron lesiones histológicas importantes en timo, bazo, tonsilas cecales y riñones en ninguno de los animales estudiados; los hallazgos en dichos órganos fueron similares en los cinco grupos y permanecieron constantes durante todo el experimento.

Timo.- Necrosis cortical multifocal leve.

Bazo.- Necrosis leve en folículos de neoformación.

Tonsilas cecales.- Necrosis leve en nódulos linfoides de neoformación.

Riñón.- Nefrosis tubular difusa leve.

3.3.8.- Medición de la respuesta inmune hacia el virus de la infección de bolsa de Fabricio (VIBF).

Los títulos medios geométricos expresados en \log_{10} se muestran en el Cuadro No. 16. Antes de la inoculación, no existieron diferencias entre los grupos A, B, C y D. El

grupo A no inoculado a lo largo de los cuatro muestreos presentó una disminución en los niveles de anticuerpos que fue cero en el día veintiuno. A partir del día siete postinoculación se observó un ascenso de los anticuerpos en los grupos inoculados, sin embargo no se apreciaron diferencias entre los cuatro grupos durante los diferentes muestreos postinoculación.

3.3.9.- Medición de la respuesta a la aplicación de eritrocitos de ovino y de *Brucella abortus*.

Los títulos medios geométricos de las aves inoculadas con EO expresados en Log_{10} se muestran en el cuadro No. 17. Se observaron diferencias estadísticas significativas únicamente en el día siete postinmunización. El título más alto correspondió al grupo D (Aislamiento "P"), con 0.84 y 0.33 en los días siete y catorce, siendo diferente estadísticamente con los grupos B, C y E (cepa 73688, aislamientos "H" y "G") sólo en el día siete. El valor mas bajo se presentó en el grupo C (aislamiento "H") con 0.33 en el día siete y el grupo E (aislamiento "G"), con 0.18 en el día catorce.

En el cuadro 18 se muestran los títulos medios Log_{10} de la respuesta contra *Brucella abortus*. Se observaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) a los días siete y catorce postinmunización. El grupo E (aislamiento "G") mostró los títulos de anticuerpos más altos a los siete y catorce días (2.20 y 2.14 respectivamente) y los más bajos fueron obtenidos por el grupo B (cepa 73688) con 1.98 y 0.88 respectivamente para ambos muestreos. El grupo C (aislamiento "H") presentó los títulos más bajos de anticuerpos de entre los tres grupos inoculados con aislamientos de campo, con una clara diferencia estadística significativa en el día catorce postinoculación ($P < 0.05$).

Capítulo 4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1.- Aislamientos del virus de IBF.

En el presente estudio se obtuvieron tres aislamientos de VIBF a partir de ocho granjas con evidencias serológicas o lesiones microscópicas y detección del VIBF por inmunofluorescencia en BF; sin antecedentes de vacunación. Durante el aislamiento en embriones de pollo LPE, en los casos de donde se obtuvieron los tres virus evaluados en este trabajo, se observó mortalidad embrionaria superior al 60%.

En las dos parvadas donde se obtuvieron los aislamientos H y G no manifestaron signología clínica evidente, mientras que en la parvada donde se obtuvo el virus P presentó un cuadro clínico respiratorio al momento de realizar la recolección de muestras.

Las lesiones embrionarias observadas en este trabajo coinciden con lo observado por Hitchner (1970), que menciona que la mayor mortalidad ocurre entre los tres y cinco días después de la inoculación; por otra parte, describe la presencia de congestión y hemorragias cutáneas, edema de la región abdominal, sin embargo en este estudio no se observaron palidez ni necrosis hepática.

4.2.- Propiedades antigénicas de los aislamientos del VIBF

La diferenciación entre cepas variantes y clásicas de VIBF es posible mediante el uso de AcM con especificidad para la proteína VP2, con ensayos de fijación primaria o por virus neutralización (Lana, 1992).

Snyder *et al.* (1988a) elaboraron un panel de nueve AcM para epítopes del VIBF (B29, 8, 179, BK-44, R63, B69, 42, BK-9 y 57), de los cuales siete tienen capacidad neutralizante y dos carecen de dicha actividad. El R63 y el B69 mostraron la mayor actividad neutralizante. Mediante la técnica AC-ELISA se demostró que todas las cepas clásicas examinadas poseen el sitio B69 mientras que la variante Delaware aislada en 1985 y la GLS carecen de los sitios definidos por los AcM R63 y B69 (Snyder, 1990).

En el presente estudio, los aislamientos “P” y “G” mostraron poseer los epítopes definidos por los AcM B29, R63 y B69, que están presentes en las cepas clásicas de VIBF. Sin embargo, las propiedades antigénicas del aislamiento “H” no pudieron ser identificadas con el ensayo utilizado por lo que se requiere completar su identificación.

4.3.- Caracterización de la virulencia de los aislamientos de VIBF

4.3.1.- Signología clínica y mortalidad

A pesar de presentarse una atrofia bursal marcada con deplesión severa con los aislamientos “H”, “P” y “G”, no se presentó signología clínica sugestiva ni mortalidad, condición similar a la descrita por Rosales *et al.* (1989a) que aislaron dos virus de IBF prevalentes en granjas del estado de Georgia, EUA. Dichos aislamientos designados 3212 y U-28, que no correspondieron a cepas clásicas, causaron atrofia severa de la BF, sin otras lesiones macroscópicas, signos clínicos o mortalidad. Por su parte, Weinstock *et al.*, 1995, describen la presencia de lesiones microscópicas en BF, pero sin una alteración clínica en las aves durante un brote de IBF en una explotación de pollo de engorda de cuatro semanas.

Las lesiones presentes en las aves muertas durante este estudio no son indicativas de que el VIBF fue la causa de la muerte.

4.3.2.- Peso corporal

El efecto de la infección subclínica de VIBF sobre la ganancia de peso se ha descrito en trabajos anteriores. Van der Sluis (1995) menciona que en brotes poco severos, lo único que se observa es una disminución en la ganancia de peso, falta de uniformidad y muerte por otras causas. McIlroy *et al.*, (1989) determinaron que parvadas sanas tenían un peso superior en 10% en comparación con las parvadas afectadas por la forma subclínica de IBF.

En este trabajo los pesos promedios de los diferentes grupos no tuvieron diferencias estadísticas significativas a los 21 días postinoculación (38 días de edad) esto puede ser atribuido al tamaño de la muestra estudiada, sin embargo la diferencia entre los promedios de pesos promedio del grupo testigo y el grupo inoculado con el aislamiento "H" fue de 139 gramos que sería importante si se presentara en condiciones de campo debido al número tan grande de aves que se explotan.

4.3.3.- Peso bursal, índice bursal y rango tarso bursal

El desarrollo de la bolsa se determinó por el peso , el índice bursal y el rango tarso bursal.

Las diferencias de los pesos bursales promedio dentro de los cinco grupos, en el muestreo preinoculación, estuvieron determinados por el peso corporal de las aves, ya que a

los 16 días, los pesos bursales menores se presentaron en los grupos A y B, donde las aves alcanzaron también menor peso corporal al momento del muestreo. Esto se reafirma por los valores de IB, que fueron muy similares en los cinco grupos y no presentaron diferencias estadísticas significativas.

En este estudio, el grupo B presentó atrofia macroscópica severa evidente desde el tercer día con un valor de B:B de 0.49, es importante considerar que no se observó aumento de volumen de la bolsa, al día tres postinoculación. Sería recomendable realizar observaciones en bolsas de aves inoculadas con dicha cepa en los días uno y dos después de la inoculación para determinar el tiempo en el cual se produce aumento de volumen bursal por inflamación aguda. Las cepas variantes de VIBF no producen aumento de tamaño bursal por la inflamación y provocan rápidamente atrofia de la BF, características que mencionan varios autores. (Lukert y Saif, 1991; Sharma *et al.*, 1989; Snyder, 1990). La cepa 73688 presentó un comportamiento patológico similar a las cepas variantes de VIBF, sin embargo, sus características antigénicas corresponden a una cepa clásica.

En los grupos C, D y E se observó claramente la atrofia a los siete días con valores de B:B de 0.58, 0.43 y 0.42 con los virus "H", "P" y "G" respectivamente. Para los 14 y 21 días la atrofia bursal fue semejante para los cuatro grupos inoculados.

Lucio y Hitchner (1980) utilizando aves White Leghorn observaron valores de B:B de 0.2 a los catorce días postinoculación utilizando la cepa 73688 de VIBF. Por otra parte, Rosales *et al.*, (1989c) mencionan que en el día quinto, la atrofia fue evidente en aves inoculadas con las cepas Edgar, U-28 y la variante A ya que redujeron el valor de B:B a

0.55. En aves de cuatro semanas de edad, la cepa U-28 redujo el tamaño bursal en un 75% después de siete días postinoculación. (Rosales *et al.*, 1989a).

Otro método para evaluar el grado de atrofia bursal es el rango tarso bursal, que es la comparación entre el largo del tarso con relación al diámetro de la bolsa. Se considera a este parámetro como un método sencillo a nivel de campo para determinar el estado general del sistema inmunocompetente de las aves (Rountre, 1984).

Se ha propuesto que el RTB puede ser un indicador útil del comportamiento del IB. En un estudio realizado en pollo de engorda durante seis semanas (Guerrero, 1993), se evaluó el grado de asociación entre ambos índices mediante la determinación de los índices de correlación. Al finalizar el trabajo, se obtuvieron correlaciones aceptables (de 0.8392 y de 0.8964 para aves no vacunadas y vacunadas respectivamente), por lo que se confirma la utilidad de este parámetro previamente propuesta por Rountre.

En este estudio, a pesar de que los RTB promedio tuvieron el mismo comportamiento que el IB, los índices de correlación entre estos dos parámetros resultaron muy heterogéneos, por lo que para este experimento el uso del RTB para estimar el comportamiento del IB resultó limitada.

4.3.4.- Detección del antígeno viral en órganos por inmunofluorescencia indirecta.

El antígeno del VIBF fue detectado por inmunofluorescencia indirecta en BF, timo, bazo, tonsilas cecales y riñón. Sin embargo, se detectó en forma general de los tres a los 14 días, pero la mayor cantidad de antígeno se presentó en la BF.

Estos resultados son similares a los reportados por Schat *et al.*, (1981) que al inocular aves White Leghorn con la cepa 73688 observaron células positivas en la BF, bazo, tonsilas cecales y timo. También, observaron que la cantidad máxima de antígeno en BF se presentó entre los dos y cuatro días postinoculación y permaneció la presencia de células inmunofluorescentes hasta los 18 días.

En un estudio realizado por Valdés *et al.* (1971), utilizando la cepa de VIBF 2512, se observó la presencia del antígeno por inmunofluorescencia directa en la BF, bazo, timo, riñón, proventrículo, molleja y duodeno, detectándose en la bolsa desde las 24 horas hasta los nueve días. En el bazo y el timo únicamente se detectó antígeno a las 24 horas y a los seis días respectivamente. Las tonsilas cecales fueron positivas del segundo al noveno día, excepto en el día sexto.

Vindevogel *et al.*, (1976) por su parte, describen que únicamente detectaron VIBF en la BF, donde fue encontrado por diez días, las más altas concentraciones virales ocurrieron entre el día cuarto y quinto. Cheville (1967), por su parte describe que se observó fluorescencia desde el segundo día hasta el día sexto después de la inoculación.

Por otra parte, Sharma *et al.*, (1989), no pudieron detectar el antígeno viral en cortes por congelación de timo inoculados con la cepa IM. Sin embargo Inoue *et al.* (1994) por técnicas de inmunohistoquímica detectaron antígeno en el timo a los siete días.

Becht (1980) propuso que el desarrollo de los signos clínicos se puede relacionar con la velocidad de replicación del virus en los linfocitos bursales. Por otra parte, Tanimura *et al.* (1995) concluyeron que la virulencia de las cepas de campo del VIBF se correlaciona

con la producción de lesiones en los órganos linfopoyéticos diferentes a la bolsa y que puede asociarse con la distribución del antígeno en esos órganos.

En este trabajo se observó que la cantidad de células con inmunofluorescencia en BF no fue abundante, lo que puede explicarse por la depleción linfoide severa. Sin embargo, es recomendable realizar estudios con muestreos más frecuentes.

Por otro lado, aunque no se observaron diferencias estadísticas en la cantidad de células inmunofluorescentes entre los grupos, el aislamiento "G" fue el que indujo mayor cantidad de células inmunofluorescentes en BF al tercer día y en bazo a los siete y catorce días, además de que permaneció más tiempo en mayor número de órganos.

4.3.5.- Evaluación histopatológica

No existieron diferencias en las lesiones observadas con los aislamientos "H", "P" y "G", aunque sí se observó variación en el desarrollo de las mismas, sin embargo fueron semejantes a lo que previamente han descrito otros autores (Cheville, 1967; Ridell, 1987). Sin embargo, con los virus "H", "P" y "G", el proceso de fibroplasia fue mínimo y se presentó rápidamente repoblación linfoide. Por otra parte, estos autores mencionan que la hiperplasia de las células reticulares es importante; sin embargo en este trabajo, la hiperplasia de las células corticomedulares fue mayor en comparación con las reticulares. Se ha detectado que las cepas variantes de VIBF inducen rápidamente atrofia bursal y una inflamación pasajera o ausente. Las bolsas de las aves inoculadas con los tres aislamientos presentaron inflamación de leve a moderada hasta el día 21 postinoculación, además la

atrofia se observó a partir del día siete postinoculación que es similar al comportamiento de las cepas clásicas o estándar.

Sharma *et al* (1992) describen que ciertas cepas virulentas de VIBF pueden causar lesiones extensivas en el timo de aves afectadas. De igual manera, observó que la cepa IM producía necrosis linfoide cortical de leve a moderada y atrofia cortical moderada en comparación con la variante A (Sharma *et al*, 1989). Por su parte, Inoue *et al* (1994) observaron depleción cortical marcada en el timo de aves inoculadas con la cepa altamente virulenta HP-2.

La ausencia de lesiones en el bazo, timo, tonsilas cecales y riñón, además de la escasa presencia de células inmunofluorescentes, puede atribuirse a la baja virulencia de los tres aislamientos, de acuerdo a lo propuesto por Tanimura *et al*, (1995).

4.3.6.- Respuesta de anticuerpos contra eritrocitos de ovino y *Brucella abortus*.

Cierto tipo de moléculas pueden ser inmunogénicas sin la participación aparente de los linfocitos T. Tales moléculas parece que están capacitadas para estimular de manera directa a los linfocitos B. Como una característica importante de su estructura es que están formados por unidades repetidas, tal como ocurre con los polisacáridos bacterianos (Goodman, 1987). Por lo anterior, en este trabajo se consideró el estudio de los títulos contra *B. abortus*, como una medida de la actividad de los linfocitos B.

Estudios previos han definido los efectos inmunodepresores del virus de VIBF sobre la respuesta inmune hacia *B. abortus*. Sharma *et al.*, en 1989, inocularon aves LPE con la

cepa IM y la variante A, (VA) y midieron la respuesta a dicho antígeno. Aunque se presentaron bajos títulos en todos los pollos contra ese antígeno, fueron aparentes las diferencias entre las medias, porque los títulos medios de anticuerpos fueron menores en comparación con las aves no inoculadas, aunque únicamente en el grupo inoculado con la cepa IM de IBF la diferencia fue estadísticamente significativa sólo en la respuesta primaria.

En otro estudio realizado por Craft *et al.* (1990), observaron que únicamente la cepa Edgar produjo depresión de la respuesta inmune contra *B. abortus*, condición que no ocurrió con la variante A. Finalmente, Hopkins *et al.* (1979) reportaron que la vacunación contra la IBF deprimió la respuesta a dicho antígeno.

Hopkins *et al.* (1979) observaron depresión en la respuesta a *B. abortus* en aves previamente vacunadas contra IBF, además, sugieren que la medición de la respuesta humoral hacia este antígeno puede ser útil como una prueba para medir posibles estados de inmunodepresión en condiciones de campo donde no es posible aplicar agentes patógenos o la presencia de anticuerpos maternos puede interferir con la respuesta a patógenos aviares.

El ensayo de anticuerpos contra EO puede indicar indirectamente una depresión de la actividad de las células T, pero debe considerarse que mide únicamente su efecto sobre la producción de anticuerpos (Craft *et al.*, 1990).

Por los resultados en los títulos de Ba y EO de este trabajo, es difícil determinar completamente la inducción de un estado de inmunodepresión en las aves por los cuatro VIBF inoculados. Esto se debe a que en la respuesta inmune hacia *B. abortus* los grupos D

(aislamiento "P") y E (aislamiento "G") presentaron una respuesta de anticuerpos mayor en comparación con el grupo testigo. Para el caso de eritrocitos de ovino, las aves inoculadas con el aislamiento "P" también presentaron un título medio mayor que en el grupo testigo.

Sin embargo, se observó disminución en la respuesta a *B. abortus* en el grupo B inoculado con la cepa 73688 a los siete y catorce días. Los efectos inmunodepresores de la cepa 73688 de VIBF ya han sido descritos anteriormente, en un trabajo realizado por Lucio y Hitchner, (1980) donde observaron una supresión a la respuesta inmune a *Salmonella pullorum* en pollos de 4 semanas o más jóvenes. En relación a la respuesta humoral hacia albúmina bovina ésta fue suprimida sólo en los pollos de 1 a 2 semanas.

Por otra parte, no puede descartarse totalmente el posible efecto inmunodepresor del aislamiento "H"; ya que indujo el nivel más bajo de anticuerpos contra *B. abortus* de entre los tres aislamientos de campo a los catorce días con diferencia estadística significativa. En la respuesta inmune contra eritrocitos de ovino, aunque no se determinó diferencia estadística también se presentó el nivel más bajo de anticuerpos a los siete días en las aves inoculadas con el virus "H".

Los resultados de este trabajo parecen indicar que la respuesta humoral T independiente resultó más afectada en comparación con la respuesta T dependiente, por lo que es recomendable realizar más experimentos para determinar cual de las dos respuestas resulta con mayor afección.

Bajo las condiciones de este trabajo, se presentó la forma subclínica de IBF con atrofia evidente macroscópica, depleción linfoide severa e inducción de la respuesta

inmune hacia VIBF. Sin embargo, es difícil determinar totalmente un estado de inmunodepresión por los métodos utilizados.

Lo anterior puede explicarse en función de la edad a la cual se decidió inocular a las aves, ya que varios autores mencionan que conforme es mayor la edad de las aves cuando ocurre la infección con VIBF, disminuye el efecto inmunodepresor de la enfermedad. Por su parte, Naqi (1986) describe que si las aves se infectan al día de edad la inmunodepresión es severa, si ocurre a los siete días es moderada y si ocurre de los catorce a 21 días es leve.

Sin embargo, es importante considerar la importancia del daño al sistema inmune por VIBF cuando ocurre la infección a mayor edad, ya que Weinstock *et al.* (1995) informaron que en un brote de VIBF en pollo de engorda aproximadamente a las cuatro semanas en Carolina del Norte (EUA), se presentaron lesiones histológicas en BF, además de disminución en la respuesta humoral hacia EO, aunque no observaron aumento en la mortalidad, baja ganancia de peso, ni disminución en la proporción del peso bursal con el peso corporal.

La edad de inoculación en este estudio, 16 días, fue determinada para permitir el catabolismo natural de los anticuerpos maternos y que no neutralizara a los VIBF inoculados.

La evaluación del sistema inmune por análisis morfométrico o por el estudio de lesiones puede ser insuficiente, ya que aunque se observen alteraciones importantes en el sistema linfoide, no significa un daño funcional hacia la respuesta inmune hacia antígenos.

FALTA PAGINA

No. 54

Capítulo 5 LITERATURA CITADA

1. Allan, G.M.; McNulty, M.S.; Connor, T.J; McCracken, R.M.- McFerran, J.B.: Rapid diagnosis of infectious bursal disease infection by immunofluorescence on clinical material. **Avian Pathol**, 13:419-427 (1980).
2. Allan, W.H.; Faragher, J.T.; Cullen, G.A.: Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease. **Vet Rec.** 99: 511-512 (1972)
3. ANECA - SARH.- Situación epidemiológica de las principales enfermedades de las aves en México. **XVIII Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (Memorias)** Cancún Q.R. 1993, 362 - 385, ANECA México, D.F. (1993)
4. Azad, A.A., Jagadish, M.N., Brown, M.A., Hudson, P.J.: Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. **Virology** 161:145-152 (1987).
5. Barnes, H.J., Wheeler, J, Reed, D.: Serological evidence of infectious bursal disease virus infection in Iowa turkeys. **Avian Dis.** 26: 560-565 (1982)
6. Beard, C.W. Serologic Procedures *in*: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Edited by Purchase, H.G., 192-200. **American Association of Avian Pathologists**, Pennsylvania, USA. 1989.

7. Becht, H.: Infectious bursal disease virus. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 90: 107-121 (1980)
8. Becht, H., Müller, H., Müller, H.K.: Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. **Jour. Gen. Virol.** 69:631-640 (1988)
9. Benton, W.J., Cover, M.S., Rosenberger, J.K., Lake, R.S.: Physicochemical properties of the infectious bursal agent (IBA). **Avian Dis.** 11: 438-445 (1967)
10. Casaubon, M.T., Altamirano, R., Valladares, C. J.C.: Importancia de la cuantificación de severidad de lesiones bursales en el diagnóstico diferencial de la respuesta vacunal e infección de campo por birnavirus. **XVIII Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (Memorias)** Cancún Q.R. 1993, 42 - 45, ANECA México, D.F. (1993)
11. Cheville, N.F.: Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen, and thymus of the chicken. **Am. J. Pathol.** 51: 527-551 (1967)
12. Correa G.P.: Resultados sobre la identificación de dos virus que semejan al de la nefritis-nefrosis aviaria y el de la enfermedad de Gumboro". **Informe anual del Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias. SAG** México, D.F. 12-13, 1965.
13. Correa G.P. Algunos aspectos de la nefrosis aviaria y de la enfermedad producida por el agente infeccioso de la bolsa de Fabricio en México. **Téc. Pec. en México** 98-104 1969.

14. Cosgrove, A.S.: An apparently new disease of chickens: Avian nephrosis. **Avian Dis.** 6:385-389 (1962)
15. Craft, D.W, Brown, J., Lukert, P.: Effects of standard and variant strains of infectious bursal disease virus on infections of chickens. **Am. J. Vet. Res.** 51: 1192 - 1197 (1990)
16. Daniel, W.W.: Bioestadística. 3a ed. **Limusa**, México D.F. 1987.
17. Dobos, P.: Peptide map comparison of the proteins of infectious bursal disease virus (IBDV) **Jour. Virol.** 32: 1046-1050 (1979).
18. Dobos, P., Hill, B.J., Hallet, R., Kells, D.T.C., Becht, H. Teninges, D.: Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes **Jour. Virol.** 32:593-605 (1979).
19. Ducatelle, R.V.A., Uyttebroeck, E., De Ruyne, L., Mast, J., Goddeeris, B., Desmidt, M., Deherdt, P.: Infectious bursal disease in Europe, consequences of changing epidemiological conditions. **Proceedings of International Poultry Symposium - Summit on Infectious Bursal Disease.** University of Georgia 1995, 10 - 13 Watt Publishing. Illinois (1995)
20. Ezeokoli, C.D., Ityondo, E.A., Nwannenna, A.I., Umoh, U: Immunosuppression and histopathological changes in the bursa of Fabricius associated with infectious bursal disease vaccination in chicken **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** 13: 181 -188 (1990)

21. Garvey, J.S.; Cremer, N.E., Sussdorf, D.H. *Methods in immunology*, 3a ed. **Benjamin/Cummings Pub.**, Massachusetts, USA 1977
22. Goodman, J.W.: *Inmunogenicidad y Especificidad Antigénica* *m* *Inmunología Básica y Clínica*. Editado por Stites, D.P., Stobo, J.D., Wells J.V. **El Manual Moderno**. 6a ed. 1988.
23. Guerrero, R.C.; Evaluación del daño bursal mediante el índice bursal, el rango tarso bursal y el estudio histopatológico en pollos de engorda vacunados contra Infección de Bolsa de Fabricio. Tesis de Licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot* Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., 1993.
24. Higashihara, M., Saijo, K., Fujisaki, Y., Matumoto, M.: Immunosuppressive effect of infectious bursal disease virus strains of variable virulence for chickens. **Vet. Microbiol.** 26: 241 - 248 (1991).
25. Hopkins, I.G., Edwards, K.R., Thornton, D.H.: Measurement of immunosuppression in chickens caused by infectious bursal disease vaccines using *Brucella abortus* strain 19. **Res. Vet. Sci.** 27: 260 -261 (1979)
26. Howie, R.I., Thorsen, J.: Identification of strain of infectious bursal disease virus isolated from mosquitoes. **J. Comp. Med.** 45:315- 320 (1981).
27. Inoue, M., Fukuda, M., Miyano, K.: Thymic lesions in chickens infected with infectious bursal virus. **Avian Dis.** 38:839-846 (1994).

28. Islam, M.R.: Pathology of infectious bursal disease reproduced experimentally with a very virulent Bangladesh isolate. **Proc. of the Forty-Fourth Western Poultry Disease Conference**. Sacramento Cal. 1995, 131, WPDC Davis CA. (1995).
29. Ismail, N.M., Saif, Y.M.: Immunogenicity of infectious bursal disease viruses in chickens. **Avian Dis.** 35: 460- 469 (1991).
30. Ivanyi, J., Morris, J.: Immunodeficiency in the chicken IV. An immunological study of infectious bursal disease. **Clin. Exp. immunol.** 23:154-165 (1976).
31. Jackwood, D.H; Saif, Y.M.: Antigenic diversity of infectious bursal disease virus. **Avian Dis.** 31:766-770 (1987) .
32. Jackwood, D.H, Saif, Y.M, Hughes, J.H.: Nucleic acid and structural protein of infectious bursal disease virus isolates belonging to serotypes I and II. **Avian Dis.** 28:990-1006 (1987).
33. Jackwood, D.J., Saif,, Y.M., Hughes, H.H.: Characteristics and serologic studies of two serotypes of infectious bursal disease virus in turkeys. **Avian Dis.** 26: 871-882 (1982).
34. Jackwood, D.J., Saif, Y.M. Prevalence of antibodies to infectious bursal disease virus serotypes Y and II in 75 Ohio chicken flocks. **Avian Dis.** 27:850-854 (1983)
35. Käufer Y., Weiss, E.: Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. **Infect. Immun.** 27: 364-367 (1980).

- 36.Kawamura, A.: Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications. 2a ed. **University of Tokyo Press**. Tokyo, Japon 1977.
- 37.Kibenge, F.S.B; Dhillon, A.S.: Serological studies with infectious bursal disease serotype 1 and variant viruses. Proc. Thirty-sixth Western Poultr. Dis. Conference, **American Association of Avian Pathologists** California 1987.
- 38.Kibenge, F.S.B.- Dhillon, A.S.; Russell, R.G.: Identification of serotype II infectious bursal disease virus proteins. **Avian Pathol.** 17:679-689 (1988).
- 39.Kouwenhoven B, Van den Bos.: Control of very virulent infectious bursal disease (Gumboro disease) in the Netherlands with more virulent vaccines. **Proceedings of International Poultry Symposium - Summit on Infectious Bursal Disease.** University of Georgia 1995, 29 - 32 Watt Publishing. Illinois (1995)
- 40.Lana, D.P.: Monoclonal antibodies to Newcastle virus and infectious bursal disease virus and their use in the diagnosis of disease. **Proceedings of Improved Diagnosis of Avian Diseases Using Molecular Biology, 129th American Veterinary Medical Association Meeting.** Boston, MA. . 1992, 50 - 53, American Association of Avian Pathologists.(1992).
- 41.Ley, D.H., Yamamoto, R., Bickford, A.A.: Immune-complex involvement in the pathogenesis of infectious bursal disease virus in chickens. **Avian Dis.** 23:219-224 (1978)

42. Lucio, B., Hitchner, S.B.: Infectious bursal disease emulsified vaccine: effect upon neutralizing antibody levels in the dam. **Avian Dis.** 23: 466- 478 (1979).
43. Lucio, B.; Hitchner, S.B.: Immunosuppression and active response induced by infectious bursal disease virus in chickens with passive antibodies. **Avian Dis.** 24:189-196 (1980)
44. Lukert, P.D.: Infectious bursal disease: Past, present and future. **Proceedings of International Poultry Symposium - Summit on Infectious Bursal Disease.** University of Georgia, 1995, 33 - 34 Watt Publishing. Illinois (1995).
45. Lukert, P.D.; Saif, Y.M.: Infectious bursal disease. *In: Diseases of Poultry.* Edited by Calnek, B.W. 648-663. **Iowa State University Press.** Ames, Iowa. 1991.
46. Luna, G.L.: Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3a ed. **Mc Graw-Hill Co.** NY. USA 1968.
47. Mazariegos, L.A., Lukert, P.D., Brown, J.: Pathogenicity and immunosuppressive properties of infectious bursal disease "intermediate" strains. **Avian Dis.** 34:203-208 (1990).
48. McAllister, J.C., Steelman, C.D., Newberry, N.L., Skeeles, J.K.: Isolation of infectious bursal disease virus from the Lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). **Poult. sci.** 74:45-49 (1995).

49. McFerran, J.B.; McNulty, M.S.; McKillop, E.R.; Connor, T.F.; McCracken, R.M.; Collins, D.S.; Allan, G.M.: Isolation and serological studies with infectious bursal disease from fowl, turkeys and ducks: Demonstration of a second serotype. **Avian Pathol.** 9:395-404 (1980)
50. McIroy, S.G., Goodall, E.A., McCracken, R.M.: Economic effects of subclinical infectious bursal disease on broiler production. **Avian Pathol.** 18: 465-480 (1989)
51. Munner, M.A.; Farah, I.O.; Newman, J.A., S.M.: immunosuppression in animals. **Br Vet. J.** 144:288-301 (1988).
52. Muskett, J.C.; Hopkins, J.G.; Edwards, K.R.; Thornton, D.H.: Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. **Vet Rec.** 14: 332-334 (1979).
53. Nakamura, T., Otaki, Y., Nunoya, T.: Immunosuppressive effect of a highly virulent infectious bursal disease virus isolated in Japan. **Avian Dis.** 36:891-896 (1992).
54. Naqi, S.A.: The immune system and its suppression by infectious bursal disease virus. **Vineland Update.** No. 17. Vineland Lab. March (1986).
55. Nick, H., Cursiefen, D., Becht, H.: Structural and growth characteristics of infectious bursal disease virus. **Jour. Virol.** 18:227-234 (1976).

56. Okoye, J.O.A., Phil, M.: Infectious Bursal Disease of Chickens. **Vet. Bull.** 54: 425- 436 (1984)
57. Panigrahy, B, Misra, L.K., Adams, L.G.: Humoral and cell-mediated immune responses in chickens with Infectious Bursal Disease. **Vet. Microbiol.** 7: 383 - 387 (1982).
58. Pérez, M.V.M.; Ibarra, C.J.; Pérez M. A. Mengel- Whereat, S.A.; Savage P.K.; Snyder D.B.; Pérez B. R.: Detección de cepas variantes del virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio en tejidos infectados utilizando anticuerpos monoclonales y ELISA. **XX Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (Memorias)** Acapulco, Gro., 1995, 235 - 237, ANECA México, D.F. (1995).
59. Pleiman, M.C.; D'Ambrosio, D.; Cambier, C.J.: The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. **Immunol. Today** 15:393-399 (1994)
60. Riddell, C.: Avian Histopathology. **American Association of Avian Pathologists.** Pennsylvania USA 1987.
61. Rosales, A.G.; Villegas, P.; Lukert, P.D.; Fletcher, O.J.; Mohamed, M.A.; Brown, J.: Isolation, identification and pathogenicity of two field strains of infectious bursal disease virus. **Avian Dis** 33:35-41 (1989a).
62. Rosales, A. G., Villegas, P., Lukert, P.D., Fletcher, O.J., Brown, J.: Immunosuppressive potential and pathogenicity of a recent isolate of infectious bursal disease virus in commercial broiler chickens. **Avian Dis.** 33:724- 728 (1989b)

63. Rosales, A. G., Villegas, P., Lukert, P.D., Fletcher, O.J., Mohamed, M.A., Brown, J.: Pathogenicity of recent isolates of Infectious Bursal Disease Virus in specific-pathogen-free chickens: Protection conferred by an intermediate vaccine strain. **Avian Dis.** 33:729-734. (1989c).
64. Rosemberger, J.K.: El papel de la IBF en la inmunosupresión. **World Poultry** (Suplemento Gumboro). 7 (1995)
65. Rosemberger, J.K.: Infectious Bursal Disease. In A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Edited by Purchase, H.G. 165-166. **American Association of Avian Pathologists**, Pennsylvania, USA. 1989.
66. Rosemberger, J.K., Cloud, S.S., Clifford, C.A.: The interactive effects of chicken anemia virus, reovirus and infectious bursal disease virus infections in chickens. **Proceedings of International Poultry Symposium - Summit on Infectious Bursal Disease**. University of Georgia, 1995, 33 - 34 Watt Publishing. Illinois (1995).
67. Rosemberger, J.K., Gelb, J.: Response to several respiratory viruses as affected by infectious bursal disease virus. **Avian Dis.** 22: 95- 105 (1978).
68. Saif, Y.M.: Immunosuppression induced by infectious bursal disease virus. **Vet. Immunol. and immunopathol.** 30: 45-50 (1991).
69. Saif, Y.M.: Integrating old and new technologies. **Proc of World Summit Conference Infectious Bursal Disease**. University of Georgia 1995.

- 70.Sasipreeyajan, J.: Current situation of IBD in Thailand and the role of hot vaccines in control. **Proceedings of International Poultry Symposium - Summit on Infectious Bursal Disease.** University of Georgia, 1995, 56- 59 Watt Publishing, Illinois (1995).
- 71.Schat, K.A., Lucio, B., Carlisle, J.C.: Pathogenesis of Infectious Bursal Disease in Embryonally Bursectomized Chickens. **Avian Dis.** 25: 996 - 1004 (1981).
- 72.Schat, K.A.; Purchase, H.G.: Cell-culture methods. *In*: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Edited by Purchase, H.G. 167-175 **American Association of Avian Pathologists**, Pennsylvania, USA. 1989.
- 73.Sharma, J.M., Belzer, S., Rodenberg, J.: Characteristics of infectious bursal disease virus-induced immunodepression in chickens. **Proc. Forty-first Western Poultry Disease Sacramento Cal.** 1992. WPDC Davis CA. (1992)
- 74.Sharma, J.M.; Dohms, J.E; Metz, A.L.: Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of specific-pathogen-free chickens. **Avian Dis.** 33:112-124 (1989).
- 75.Sharma, J.M., Karaca, K., Pertile, T.: Virus-induced immunosuppression in chickens. **Poult. sci.** 73: 1082-1086 (1994).
- 76.Sharma, J.M., Rosemberger: Infectious bursal disease and reovirus infection of chickens: Immune responses and vaccine control. *In*: Avian Immunology: Basis and

Practice. Edited by Toivanen, A. and Toivanen, P. 143- 157 C.R.C. Press, Inc. USA. 1987.

77.Skeeles, J.K., Slavik, M.F., Beasley, J.N., Brown, A.H., Meinecke, C.F., Maruca, S. Welch. S.: An age-related coagulation disorder associated with experimental infection with infectious bursal disease virus. **Am. J. Vet. Res.** 41: 1458-1461 (1980).

78.Snyder, D.B.: Changes in the field status of infectious bursal disease virus. **Avian Pathol.** 19:419-423 (1990).

79.Snyder, D.B.; Lana, D.P.; Cho, B.R.; Marquardt, W.W.: Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with Monoclonal antibodies. **Avian Dis.** 32:527-534 (1988a).

80.Snyder, D.B., Lana, D.P., Savage, P.K., Yancey, F.S., Mengel, S.A., Marquardt, W.W.: Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: Evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. **Avian Dis.** 32: 535 -539 (1988b).

81.Tanimura, N., Tsukamoto, K., Nakamura, K., Narita, M., Maeda, M.: Assotiation between pathogenicity of infectious bursal disease virus and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry. **Avian Dis.** 39:9 - 20 (1995).

82. Todd, D., McNulty, M.S.: Biochemical studies with infectious bursal disease virus: comparison of some of its properties with infectious pancreatic necrosis virus. **Arch Virol.** 60:265-277 (1979).
83. Toivanen, P., Toivanen, A., Good, R.A.: Ontogeny of bursal function in chicken. I Embryonic stem cell for humoral immunity. **J. of Immunol.** 109: 1058-1070 (1972).
84. Valdez, I.L.E., Lucio, M.B., Antillón, R.A.: Estudio clínico-patológico y por inmunofluorescencia de la Infección de la bolsa de Fabricio. **Vet. Mex.** 2: 5 - 10 (1971).
85. Van Den Berg, T.P., Gonze, M., Meulemans, G.: Acute infectious bursal disease in poultry and characterisation of a highly virulent strain. **Avian Pathol.** 20: 133-143 (1991).
86. Van Der Sluis, W.: El virus de la infección de la bolsa de Fabricio: Destructor del sistema inmune. **World Poultry** (Suplemento Gumboro). 4-6 (1995).
87. Villegas, P., Purchase, H.G.: Titration of biological suspensions. In A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Edited by Purchase, H.G. 186-190. **American Association of Avian Pathologists**, Pennsylvania, USA. 1989.
88. Vindevogel, H., Gouffaux, M., Meulemans, G.: Maladie de Gumboro: Distribution et persistance du virus le poussin inoculé, études sur la transmission de la maladie. **Avian Pathol.** 5: 31 - 38 (1976).

89. Weinstock, D., Mc Ree, W.A., Suyeremoto, M.M., Ficken, M.D.: Late IBDV Challenge of a commercial broiler flock: immunologic assessment and performance. **Proc. of the Forty-Fourth Western Poultry Disease Conference.** Sacramento Cal. 1995, 59, WPDC Davis, CA. (1995).

90. Weisman, J.; Hitchner, S.B.: Virus-neutralization versus agar-precipitin test for detecting serologic response to infectious bursal disease virus. **Avian Dis.** 22: 598-603. (1978).

91. Winterfield, R.W.; Thacker, H.L.: Immune response and pathogenicity of different strains of infectious bursal disease applied as vaccines. **Avian Dis.** 22:721-731 (1978).

CUADRO 1.- INFORMACIÓN RELACIONADA A LAS OCHO GRANJAS MUESTREADAS

Lugar	Raza o Estirpe	Edad (Días)	Detección Antígeno VIBF por IF¹	Detección Lesiones Microscópicas	Serología VIBF²	Problemas presentes en la explotación
Atotonilco, Mor.	Indian River-Peterson	14	Positivo	NR ³	Positivo	Ninguno
Huasca, Hgo.	Arbor Acres	42	Positivo	Positivo	Positivo	Ninguno
Iguala, Gro.	Hubbard	42	Positivo	Positivo	Positivo	Ninguno
Perote, Ver.	Arbor Acres	32	Positivo	Positivo	Positivo	Respiratorios
Teoloyucan, Méx.	Arbor Acres	28	Positivo	Positivo	Positivo	Ninguno
Texcoco, Méx.	Rhode Island	28	Positivo	Positivo	Positivo	Respiratorios
Zumpango, Méx.	Indian River-Peterson	17	Positivo	NR	Positivo	Ninguno
Zumpango, Méx.	Indian River-Peterson	21	Positivo	NR	Positivo	Ninguno

¹ IF = Inmunofluorescencia indirecta. Determinada a partir de muestras de BF de las aves muestreadas.

² VIBF = Virus de infección de la bolsa de Fabricio

³ NR = No realizado

CUADRO 2.- DETERMINACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DE VIBF

DISEÑO EXPERIMENTAL

Grupo	Virus ¹	N ²	EO ³	Ba ⁴
A	Ninguno	75	24	25
B	73688	75	21	22
C	Aisl. H ⁵	75	25	25
D	Aisl. P ⁶	75	23	24
F	Aisl. G ⁷	75	24	24

¹ Inoculados por vía oral a los 17 días de edad.

² No de aves para determinación de peso corporal, índice bursal, rango tarso-bursal, inmunidad hacia VIBF, inmunofluorescencia e histopatología.

³ EO = No. de aves para medición de respuesta hacia antígenos T-dependiente. Inoculadas intraperitonealmente con 1 ml de suspensión de eritrocitos de ovino al 7% a los 6 días postinoculación VIBF

⁴ Ba = No. de aves para medición de la respuesta hacia antígeno T-independiente. Inoculadas intraperitonealmente con 1 ml de suspensión de *Brucella abortus* cepa 19 con título de 3.6×10^9 a los 6 días postinoculación VIBF

⁵ Obtenido en Huasca de Ocampo, Hgo.

⁶ Obtenido en Perote, Ver.

⁷ Obtenido en Iguala, Gro.

CUADRO 3.- AISLAMIENTO DEL VIBF Y MORTALIDAD EMBRIONARIA POSTINOCULACION A PARTIR DE OCHO MUESTRAS PROCEDENTES DE GRANJAS EN MÉXICO

Lugar	Muertos / Total	Porcentaje
Atotonilco, Mor.	0 / 6	0.00
Huasca, Hgo.	7 / 9	77.78
Iguala, Gro.	4 / 6	66.67
Perote, Ver.	4 / 5	80.00
Teoloyucan, Méx.	0 / 5	0.00
Texcoco, Méx.	1 / 5	20.00
Zumpango, Méx.	0 / 5	0.00
Zumpango, Méx.	0 / 4	0.00

CUADRO 4.- EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DIAS DE EDAD

MORTALIDAD TOTAL

Grupo	VIRUS	No. Muertes / Total	%
A	NINGUNO	7 / 75	9.33
B	73688	6 / 75	8.00
C	Aisl. H.	8 / 75	10.67
D	Aisl. P.	8 / 75	10.67
E	Aisl. G.	12 / 75	16.00

CUADRO 5.- EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DIAS DE EDAD

PESOS PROMEDIO¹

Grupo	VIBF	Preinoculación ²	Días después de la inoculación			
			3	7	14	21
A	NINGUNO	376.67 ± 34.79b	573.75 ± 49.50a	755.00 ± 68.62a	1231.67 ± 141.01a	1689.17 ± 96.64a
B	73688	375.83 ± 18.44b	516.25 ± 39.32b	737.08 ± 79.41ab	1174.17 ± 131.18 a	1621.67 ± 99.25a
C	Aisl. H	425.42 ± 21.16a	578.75 ± 59.28a	726.67 ± 68.83ab	1158.33 ± 104.91a	1550.00 ± 208.60a
D	Aisl. P	436.67 ± 39.04a	580.83 ± 51.34a	676.67 ± 61.95b	1193.75 ± 130.30a	1618.33 ± 154.42a
E	Aisl. G	446.67 ± 32.91a	607.08 ± 44.59a	785.42 ± 50.29a	1223.73 ± 127.17a	1624.58 ± 143.98a

¹ Peso promedio expresado en gramos ± desviación estándar (n = 12)

² Valores determinado antes de la inoculación, a los 16 días de edad.

Medias dentro de la misma columna con distinta literal son diferentes estadísticamente (P<0.05)

CUADRO 6.- EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DIAS DE EDAD

PESOS BURSALES PROMEDIO¹

Grupo	VIBF	Preinoculación ²	Días después de la inoculación			
			3	7	14	21
A	NINGUNO	1.000 ± 0.21ab	1.583 ± 0.41a	2.192 ± 0.87 a	3.317 ± 0.96a	4.450 ± 1.60a
B	73688	0.8750 ± 0.17b	0.708 ± 0.12 b	0.700 ± 0.18 c	1.067 ± 0.21b	1.292 ± 0.69b
C	Aisl. H	1.0833 ± 0.26ab	1.483 ± 0.46 a	1.233 ± 0.55b	0.983 ± 0.35b	1.275 ± 0.39b
D	Aisl. P	1.1833 ± 0.17a	1.533 ± 0.31a	0.825 ± 0.11bc	1.000 ± 0.26 b	1.250 ± 0.30b
E	Aisl. G	1.0750 ± 0.32ab	1.442 ± 0.64a	0.933 ± 0.26 bc	0.992 ± 0.16b	1.458 ± 0.53b

¹ Peso promedio expresado en gramos ± desviación estándar (n = 12)

² Valores determinados antes de la inoculación, a los 16 días de edad.

Medias dentro de la misma columna con distinta literal son diferentes estadísticamente (P<0.05)

CUADRO 7.- EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DIAS DE EDAD

ÍNDICES BURSALES (IB) PROMEDIO¹ E INDICE B:B²

Grupo	VIBF	Días después de la inoculación									
		Preinoculación ³		3		7		14		21	
		IB	B:B	IB	B:B	IB	B:B	IB	B:B	IB	B:B
A	NINGUNO	2.660a	(1.00a)	2.765a	(1.00a)	2.872a	(1.00a)	2.687a	(1.00a)	2.610a	(1.00a)
B	73688	2.332a	(0.87a)	1.378b	(0.49b)	0.945c	(0.32c)	0.907b	(0.34b)	0.815b	(0.31b)
C	Aisl. H	2.546a	(0.95a)	2.539a	(0.91a)	1.685b	(0.58b)	0.838b	(0.31b)	0.809b	(0.31b)
D	Aisl. P	2.716a	(1.02a)	2.642a	(0.95a)	1.232bc	(0.43bc)	0.844b	(0.31b)	0.774b	(0.30b)
E	Aisl. G	2.408a	(0.90a)	2.358a	(0.85a)	1.196bc	(0.42bc)	0.812b	(0.30b)	0.892b	(0.34b)

¹ IB = Peso bursal / peso corporal. (n = 12)

² B:B = IB de cada pollo desafiado / IB promedio del grupo testigo

³ Valores determinados antes de la inoculación, a los 16 días de edad.

Medias dentro de la misma columna con distinta literal son diferentes estadísticamente (P<0.05)

CUADRO 8.- EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DIAS DE EDAD

RANGOS TARSO BURSALES (RTB) PROMEDIO¹

Grupo	VIBF	Preinoculación ²	Días después de la inoculación			
			3	7	14	21
A	NINGUNO	0.20972 ± 0.03a	0.2187 ± 0.02 a	0.21667 ± 0.03a	0.2028 ± 0.04a	0.20426 ± 0.03 a
B	73688	0.19637 ± 0.02a	0.1624 ± 0.02b	0.14287 ± 0.02b	0.1336 ± 0.04 b	0.13144 ± 0.02b
C	Aisl. H	0.21116 ± 0.02a	0.2024 ± 0.02a	0.16032 ± 0.03b	0.1273 ± 0.02b	0.12462 ± 0.02b
D	Aisl. P	0.21073 ± 0.02a	0.2077 ± 0.03a	0.14744 ± 0.01b	0.1252 ± 0.01b	0.12621 ± 0.01b
E	Aisl. G	0.20266 ± 0.02a	0.1912 ± 0.03ab	0.14458 ± 0.03b	0.1214 ± 0.01b	0.12137 ± 0.02b

¹ RTB = Diámetro bursal / largo de tarso promedio. (n = 12)

² Valores determinados antes de la inoculación, a los 16 días de edad.

Medias dentro de la misma columna con distinta literal son diferentes estadísticamente (P<0.05)

CUADRO 9.- EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN AVES INOCULAS A LOS 17 DIAS DE EDAD

COEFICIENTES DE CORRELACIÓN (r) Y DE DETERMINACIÓN (r²) ENTRE IB Y RTB

Grupo	VIBF	Días después de la inoculación									
		Preinoculación ¹		3		7		14		21	
		r	r ²	r	r ²	r	r ²	r	r ²	r	r ²
A	NINGUNO	0.6633	0.4400	0.3827	0.1465	0.8115	0.6586	0.8296	0.6883	0.6986	0.4881
B	73688	-0.0097	0.0001	0.8093	0.6550	0.6946	0.4825	0.0264	0.0007	0.4642	0.2155
C	Aisl. H	0.7042	0.4960	0.8364	0.6996	0.9693	0.9396	0.8230	0.6774	0.6312	0.3985
D	Aisl. P	0.1064	0.0113	0.6909	0.4774	0.1621	0.0263	0.5524	0.3051	0.1557	0.0243
E	Aisl. G	0.5424	0.2943	0.5545	0.3075	0.7524	0.5661	0.4718	0.2226	0.8865	0.7860

¹ Valores determinados antes de la inoculación, a los 16 días de edad.

CUADRO 10 .- EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DIAS DE EDAD

NUMERO DE AVES POSITIVAS A VIBF EN LA BOLSA DE FABRICIO Y VALORES PROMEDIO¹ SOBRE CANTIDAD DE CÉLULAS INMUNOFLUORESCENTES

Grupo	VIBF	Preinoculación ²		Días después de la inoculación							
		(+) / total	Puntuación	3		7		14		21	
A	NINGUNO	0 / 12	0a	0 / 12	0c	0 / 12	0c	0 / 12	0a	0 / 12	0a
B	73688	0 / 12	0a	11 / 11	1.72b	2 / 12	0.16bc	3 / 12	0.25a	0 / 12	0a
C	Aisl. H	0 / 12	0a	10 / 12	1.58b	6 / 12	0.50ab	4 / 9	0.44a	0 / 12	0a
D	Aisl. P	0 / 12	0a	11 / 11	2.18ab	7 / 12	0.58a	5 / 11	0.45a	0 / 12	0a
E	Aisl. G	0 / 12	0a	10 / 10	2.6a	5 / 12	0.41ab	2 / 11	0.18a	0 / 12	0a

¹ Promedio de calificaciones:

1 = Escasas células inmnofluorescentes

2 = Grupos de células inmunofluorescentes

3 = Abundantes células inmunofluorescentes

² Valores determinados antes de la inoculación a los 16 días de edad.

Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

CUADRO 11 .- EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DIAS DE EDAD

NUMERO DE AVES POSITIVAS A VIBF EN EL BAZO Y VALORES PROMEDIO¹ SOBRE CANTIDAD DE CÉLULAS INMUNOFLUORESCENTES

Grupo	VIBF	Preinoculación ²		Días después de la inoculación							
		(+) / total	Puntuación	3		7		14		21	
A	NINGUNO	0 / 12	0a	0 / 12	0b	0 / 12	0a	0 / 12	0a	0 / 12	0a
B	73688	0 / 12	0a	5 / 12	0.41 a	3 / 12	0.25a	2 / 12	0.16a	0 / 12	0a
C	Aisl. H	0 / 12	0a	6 / 12	0.50a	2 / 10	0.20a	0 / 12	0a	0 / 12	0a
D	Aisl. P	0 / 12	0a	6 / 12	0.50a	1 / 12	0.08a	0 / 12	0a	0 / 12	0a
E	Aisl. G	0 / 12	0a	5 / 12	0.50a	4 / 12	0.33a	3 / 12	0.25a	0 / 12	0a

¹ Promedio de calificaciones:

1 = Escasas células inmnofluorescentes

2 = Grupos de células inmunofluorescentes

3 = Abundantes células inmunofluorescentes

² Valores determinados antes de la inoculación a los 16 días de edad.

Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

CUADRO 12 .- EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DIAS DE EDAD

NUMERO DE AVES POSITIVAS A VIBF EN EL TIMO Y VALORES PROMEDIO¹ SOBRE CANTIDAD DE CÉLULAS INMUNOFLUORESCENTES

Grupo	VIBF	Preinoculación ²		Días después de la inoculación									
		(+) / total	Puntuación	3		7		14		21			
A	NINGUNO	0 / 12	0a	0 / 12	0a	0 / 12	0a	0 / 12	0a	0 / 12	0a	0 / 12	0a
B	73688	0 / 12	0a	5 / 12	0.41a	3 / 12	0.25a	1 / 12	0.08a	0 / 12	0a	0 / 12	0a
C	Aisl. H	0 / 12	0a	3 / 11	0.27a	2 / 11	0.18a	0 / 12	0a	0 / 12	0a	0 / 12	0a
D	Aisl. P	0 / 12	0a	3 / 10	0.30a	0 / 12	0a	1 / 12	0.08a	0 / 12	0a	0 / 12	0a
E	Aisl. G	0 / 12	0a	3 / 11	0.27a	0 / 12	0a	2 / 12	0.16a	0 / 12	0a	0 / 12	0a

¹ Promedio de calificaciones:

1 = Escasas células inmunofluorescentes

2 = Grupos de células inmunofluorescentes

3 = Abundantes células inmunofluorescentes

² Valores determinados antes de la inoculación a los 16 días de edad.

Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

CUADRO 13 .- EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DIAS DE EDAD

NUMERO DE AVES POSITIVAS A VIBF EN TONSILAS CECALES Y VALORES PROMEDIO¹ SOBRE CANTIDAD DE CÉLULAS INMUNOFLUORESCENTES

Grupo	VIBF	Preinoculación ²		Días después de la inoculación									
		(+)/total	Puntuación	3		7		14		21			
A	NINGUNO	0 / 12	0a	0 / 12	0b	0 / 12	0a	0 / 12	0a	0 / 12	0a	0 / 12	0a
B	73688	0 / 12	0a	7 / 12	0.75a	4 / 12	0.33a	1 / 12	0.08a	0 / 12	0a	0 / 12	0a
C	Aisl. H	0 / 12	0a	6 / 11	0.63a	3 / 11	0.27a	0 / 12	0a	0 / 12	0a	0 / 12	0a
D	Aisl. P	0 / 12	0a	6 / 12	0.50a	2 / 12	0.16a	0 / 12	0a	0 / 12	0a	0 / 12	0a
E	Aisl. G	0 / 12	0a	4 / 12	0.41a	1 / 12	0.08a	3 / 10	0.30a	0 / 12	0a	0 / 12	0a

¹ Promedio de calificaciones:

- 1 = Escasas células inmnofluorescentes
- 2 = Grupos de células inmunofluorescentes
- 3 = Abundantes células inmunofluorescentes

² Valores determinados antes de la inoculación a los 16 días de edad.

Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

CUADRO 14 .- EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DIAS DE EDAD

NUMERO DE AVES POSITIVAS A VIBF EN EL RIÑÓN Y VALORES PROMEDIO¹ SOBRE CANTIDAD DE CÉLULAS INMUNOFLUORESCENTES

Grupo	VIBF	Preinoculación ²		Días después de la inoculación							
		(+) / total	Puntuación	3		7		14		21	
				(+) / total	Puntuación	(+) / total	Puntuación	(+) / total	Puntuación	(+) / total	Puntuación
A	NINGUNO	0 / 12	0a	0 / 12	0a	0 / 12	0a	0 / 12	0a	0 / 12	0a
B	73688	0 / 12	0a	4 / 12	0.33a	0 / 12	0a	2 / 12	0.16a	0 / 12	0a
C	Aisl. H	0 / 12	0a	4 / 12	0.50a	1 / 12	0.16a	2 / 12	0.16a	0 / 12	0a
D	Aisl. P	0 / 12	0a	2 / 12	0.16a	1 / 11	0.09a	0 / 12	0a	0 / 12	0a
E	Aisl. G	0 / 12	0a	3 / 12	0.25a	1 / 12	0.08a	0 / 11	0a	0 / 12	0a

¹ Promedio de calificaciones:

1 = Escasas células inmnofluorescentes

2 = Grupos de células inmunofluorescentes

3 = Abundantes células inmunofluorescentes

² Valores determinados antes de la inoculación a los 16 días de edad.

Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

TABLA 15 .- EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DIAS DE EDAD

CALIFICACIONES PROMEDIO¹ DE LESIONES HISTOLÓGICAS EN LA BOLSA DE FABRICIO.

Grupo	VIBF	Preinoculación ²	Días después de la inoculación			
			3	7	14	21
A	NINGUNO	0.58b	1.25c	0.66b	1.08d	1.25c
B	73688	0.91ab	3.75a	4.00a	2.25c	3.16b
C	Aisl. H	1.00a	2.66b	3.75a	2.83b	2.66b
D	Aisl. P	1.00a	2.91b	3.75a	3.00b	3.91a
E	Aisl. G	1.08a	3.00b	3.91a	3.75a	3.33b

¹ Promedio de calificaciones:

0 = Sin lesión.

1 = Necrosis leve en folículos aislados.

2 = Depleción linfoide moderada difusa o folículos aislados con depleción severa.

3 = Depleción linfoide severa en mas del 50% de los folículos.

4 = Presencia únicamente del contorno de los folículos linfoides con sólo algunos linfocitos, aumento del tejido conectivo, presencia de quistes e hiperplasia del epitelio.

5 = Pérdida completa de la arquitectura folicular con fibroplasia.

² Valores determinados antes de la inoculación a los 16 días de edad.

Medias dentro de la misma columna con distinta literal son diferentes estadísticamente (P<0.05)

CUADRO 16.- EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DIAS DE EDAD

TÍTULOS MEDIOS GEOMÉTRICOS DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA VIBF

Grupo	VIBF	Preinoculación ²	Días después de la inoculación			
			3	7	14	21
A	NINGUNO	1.1774 ± 0.62 a	0.7719 ± 0.69 a	0.7492 ± 0.68 a	0.4573 ± 0.57 b	0.00 ± 0.00 b
B	73688	1.3105 ± 0.48 a	0.1969 ± 0.46 c	0.5294 ± 0.69 a	1.6194 ± 0.48 a	2.4085 ± 0.79 a
C	Aisl. H	1.3853 ± 0.59 a	0.6625 ± 0.71 ab	0.4805 ± 0.60 a	1.7375 ± 0.36 a	2.5570 ± 0.73 a
D	Aisl. P	1.4473 ± 0.35 a	0.4909 ± 0.77abc	0.4571 ± 0.57 a	1.6811 ± 0.77 a	2.014 ± 0.69 a
E	Aisl. G	0.5041 ± 0.62b	0.2836 ± 0.51 bc	0.5047 ± 0.64 a	1.3970 ± 0.75 a	2.0859 ± 0.54 a

¹ Media geométrica de títulos transformados $\text{Log}_{10}(\text{Título} + 1)$ obtenidos por virus-suero neutralización (n = 12)

² Valores determinados antes de la inoculación a los 16 días de edad.

Medias dentro de la misma columna con distinta literal son diferentes estadísticamente ($P < 0.05$)

CUADRO 17.- EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DIAS DE EDAD

TÍTULOS MEDIOS GEOMÉTRICOS¹ DE ANTICUERPOS CONTRA ERITROCITOS DE OVINO (EO)

Grupo	VIBF	Títulos de anticuerpos postinoculación de EO ²			
		7 Días	n	14 Días	n
A	NINGUNO	0.56 ± 0.48ab	24	0.26 ± 0.30 a	21
B	73688	0.40 ± 0.42b	21	0.27 ± 0.42a	21
C	Aisl. H	0.33 ± 0.33b	24	0.26 ± 0.52a	22
D	Aisl. P	0.84 ± 0.62a	23	0.33 ± 0.42a	23
E	Aisl. G	0.48 ± 0.43b	23	0.18 ± 0.26a	17

¹ Media geométrica de títulos transformados $\text{Log}_{10}(\text{Título} + 1)$ obtenidos por microhemoaglutinación

² Las aves fueron inoculadas con 1ml de EO al 7% seis días después de la inoculación con VIBF.

Medias dentro de la misma columna con distinta literal son diferentes estadísticamente ($P < 0.05$)

CUADRO 18 .- EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DIAS DE EDAD

TÍTULOS MEDIOS GEOMÉTRICOS¹ DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella abortus* (Ba) EN

Grupo	VIBF	Títulos de anticuerpos postinoculación de Ba ²			
		7 Días	n	14 Días	n
A	NINGUNO	2.11 ± 0.26 ab	20	2.01 ± 0.33 a	21
B	73688	1.98 ± 0.39 b	20	0.88 ± 0.95 c	22
C	Aisl. H	2.00 ± 0.49 ab	24	1.77 ± 0.44 b	21
D	Aisl. P	2.18 ± 0.45 ab	23	2.07 ± 0.49 a	23
E	Aisl. G	2.20 ± 0.35 a	23	2.14 ± 0.44 a	24

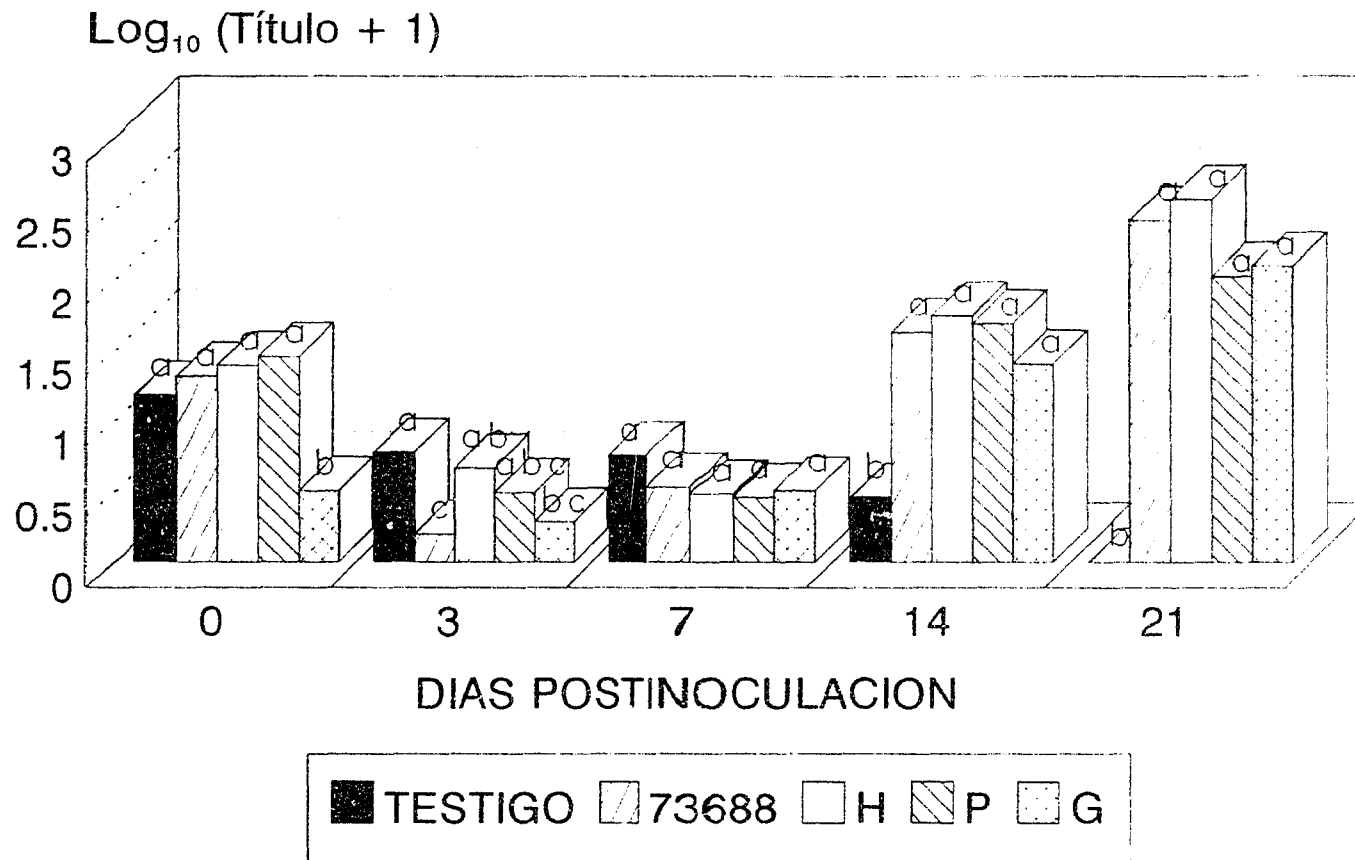
¹ Media geométrica de títulos transformados $\text{Log}_{10}(\text{Título} + 1)$ obtenidos por microaglutinación

² Las aves fueron inoculadas con 1ml de *Brucella abortus* con título de 3.6×10^9 seis días después de la inoculación con VIBF.

Medias dentro de la misma columna con distinta literal son diferentes estadísticamente ($P < 0.05$)

Gráfica 1 TITULOS MEDIOS GEOMETRICOS¹

ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES VIBF



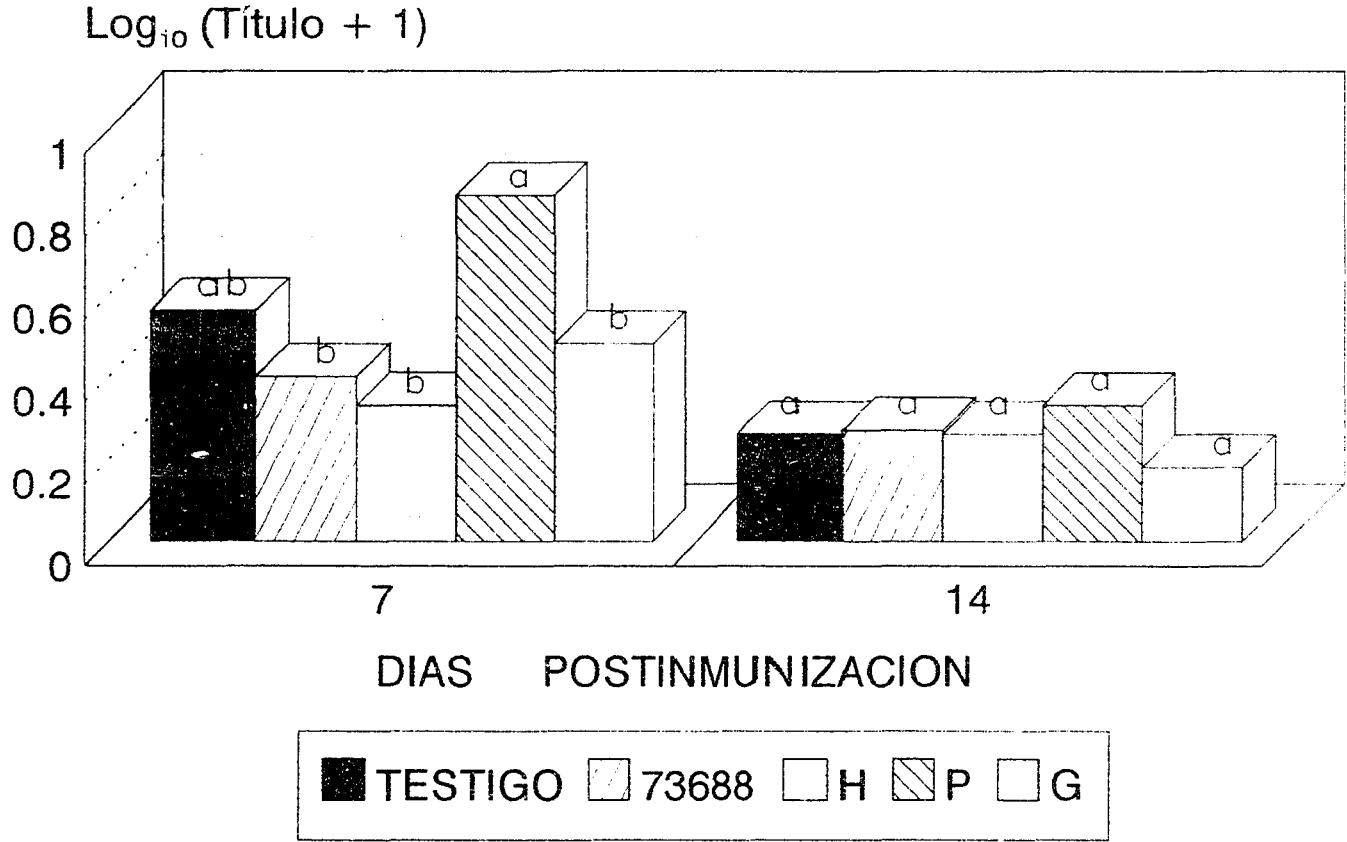
¹ Transformados Log₁₀ (Título + 1)

Aves inoculadas a los 17 días de edad

Medias con distinta literal son diferentes estadísticamente (P < 0.05)

GRAFICA 2 TITULOS MEDIOS GEOMETRICOS¹

ANTICUERPOS HEMOAGLUTINANTES ERITROCITOS DE OVINO



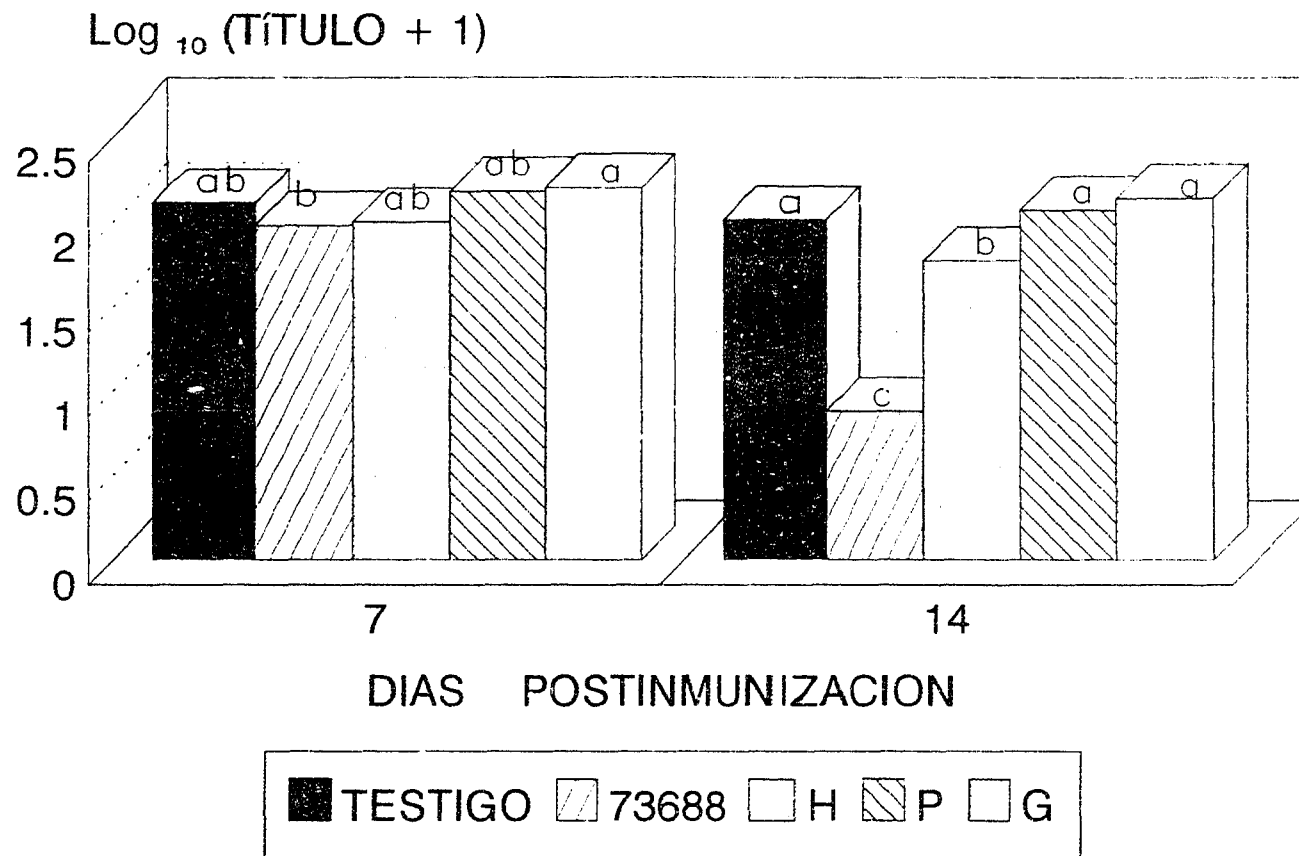
LAS AVES SE INMUNIZARON A LOS SEIS DIAS POSTDESAFIO DE VIBF

¹ TRANSFORMACION Log₁₀ (TITULO + 1)

Medias con distinta literal son diferentes estadísticamente (P<0.05)

GRAFICA 3. TITULOS MEDIOS GEOMETRICOS¹

ANTICUERPOS AGLUTINANTES *Brucella abortus*



LAS AVES FUERON INMUNIZADAS A LOS SEIS DIAS POSTDESAFIO DE VIBF

¹ TRANSFORMACION Log₁₀ (TÍTULO + 1)

Medias con distinta literal son diferentes estadísticamente (P < 0.05)

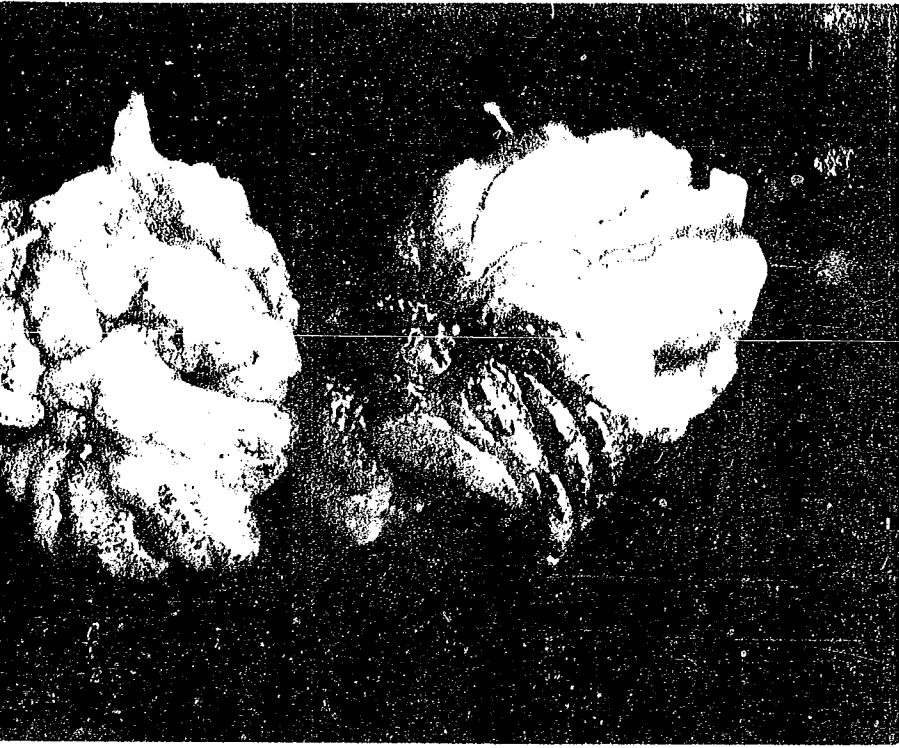


FIGURA 1

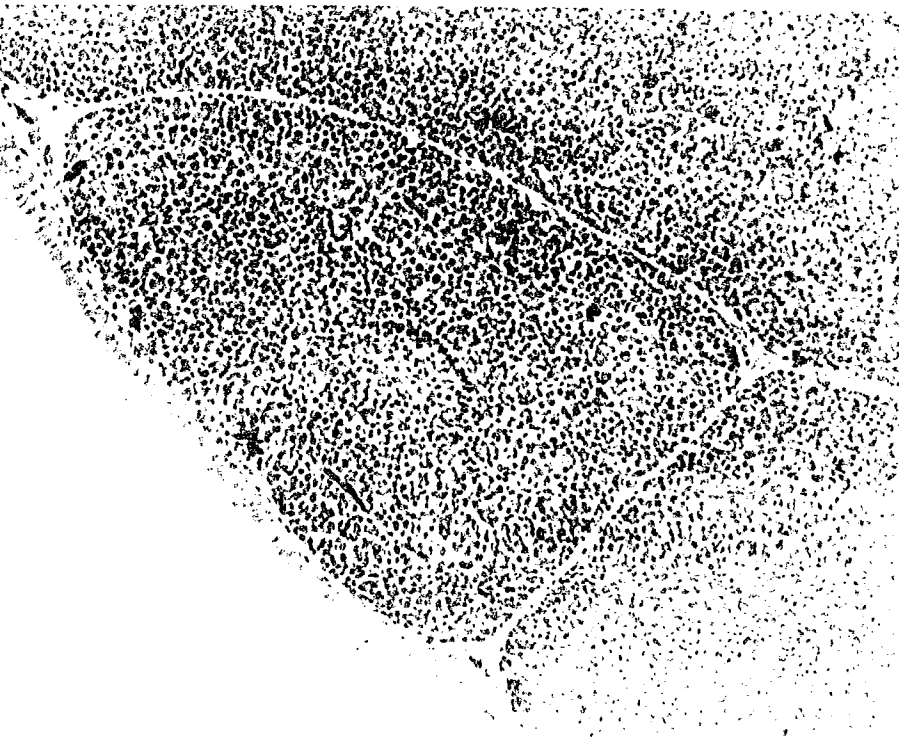


FIGURA 2

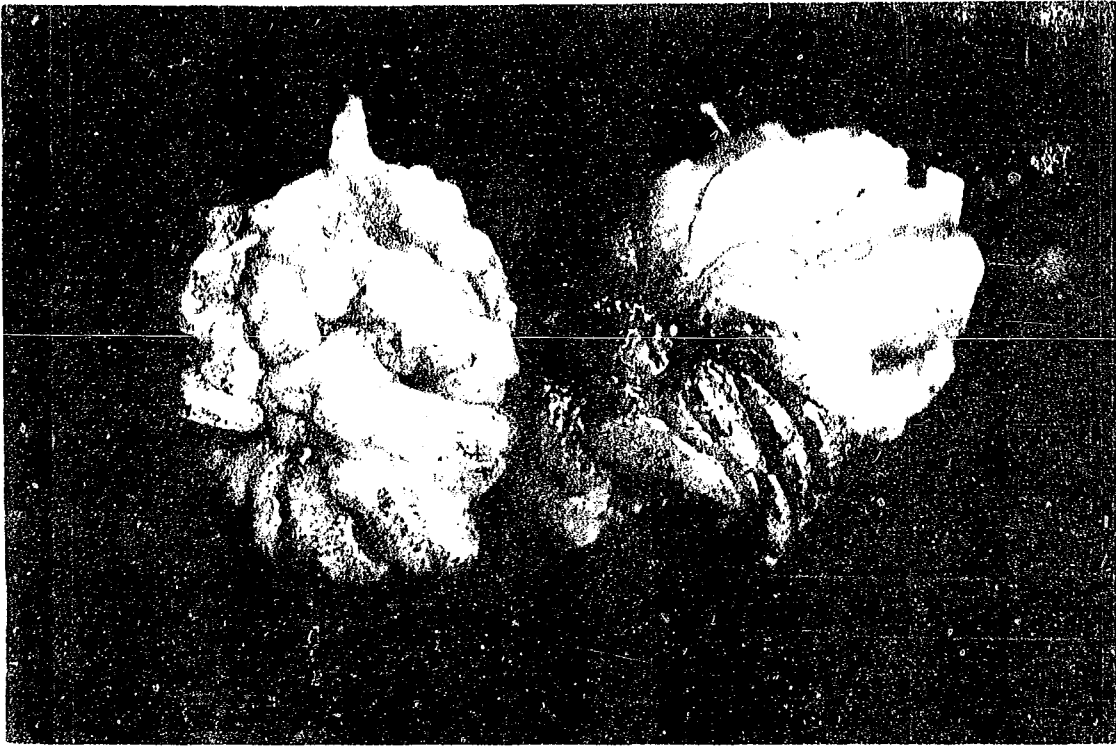


FIGURA 1



FIGURA 2

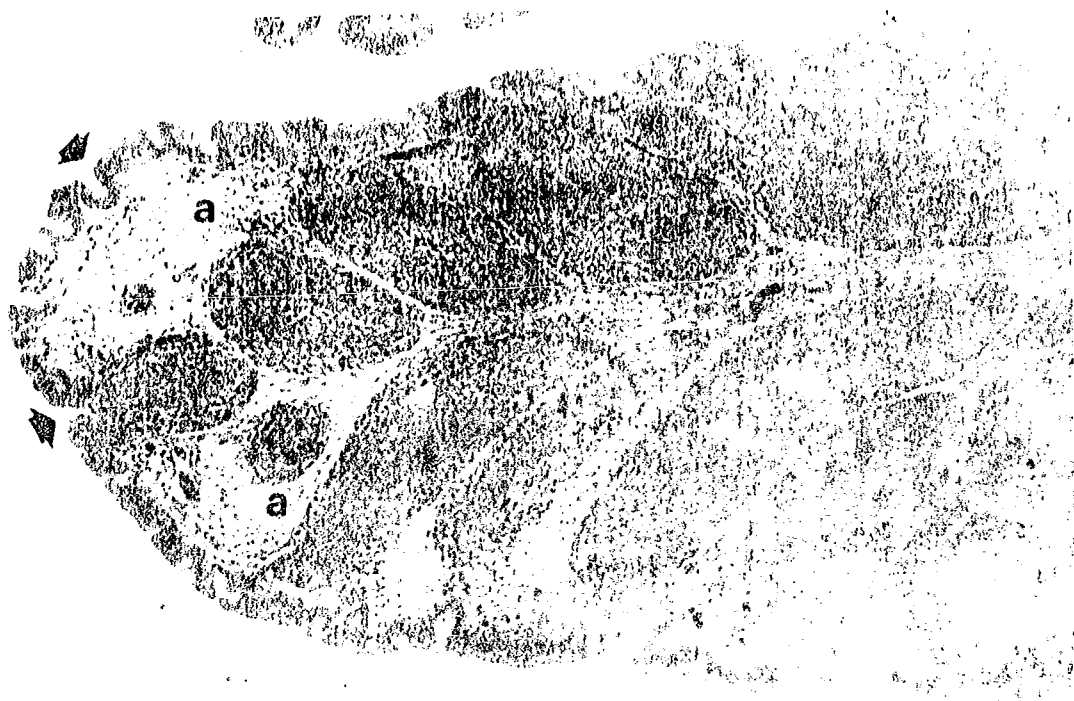


FIGURA 3

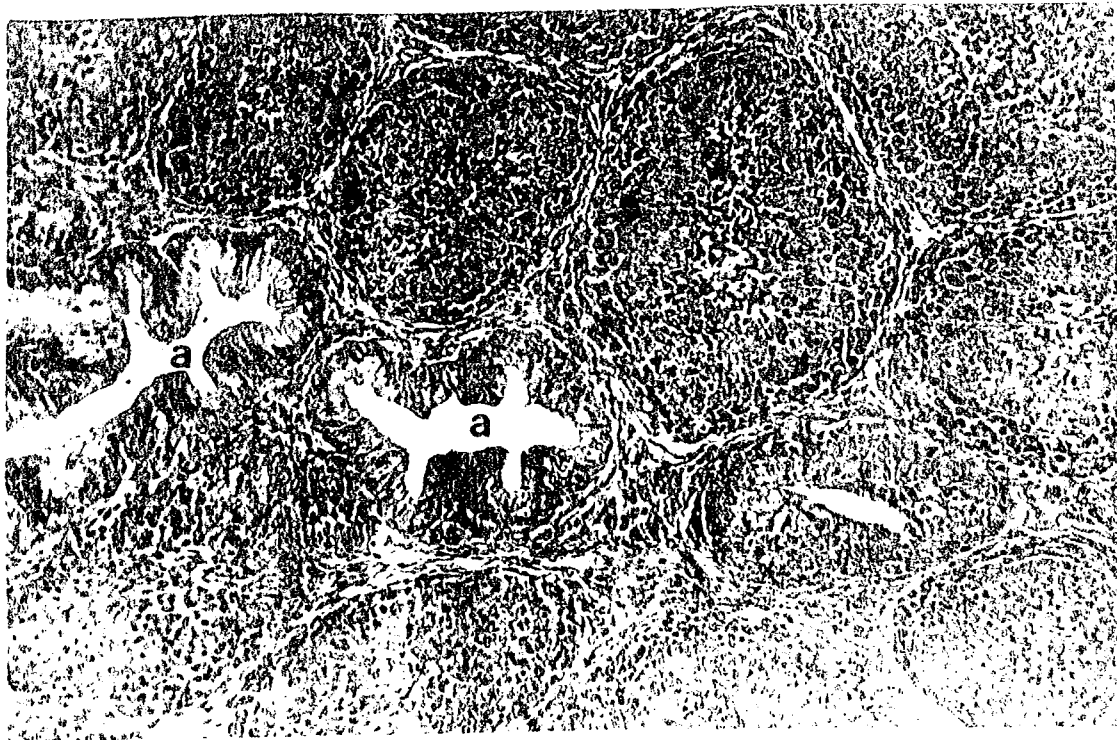


FIGURA 4



FIGURA 5

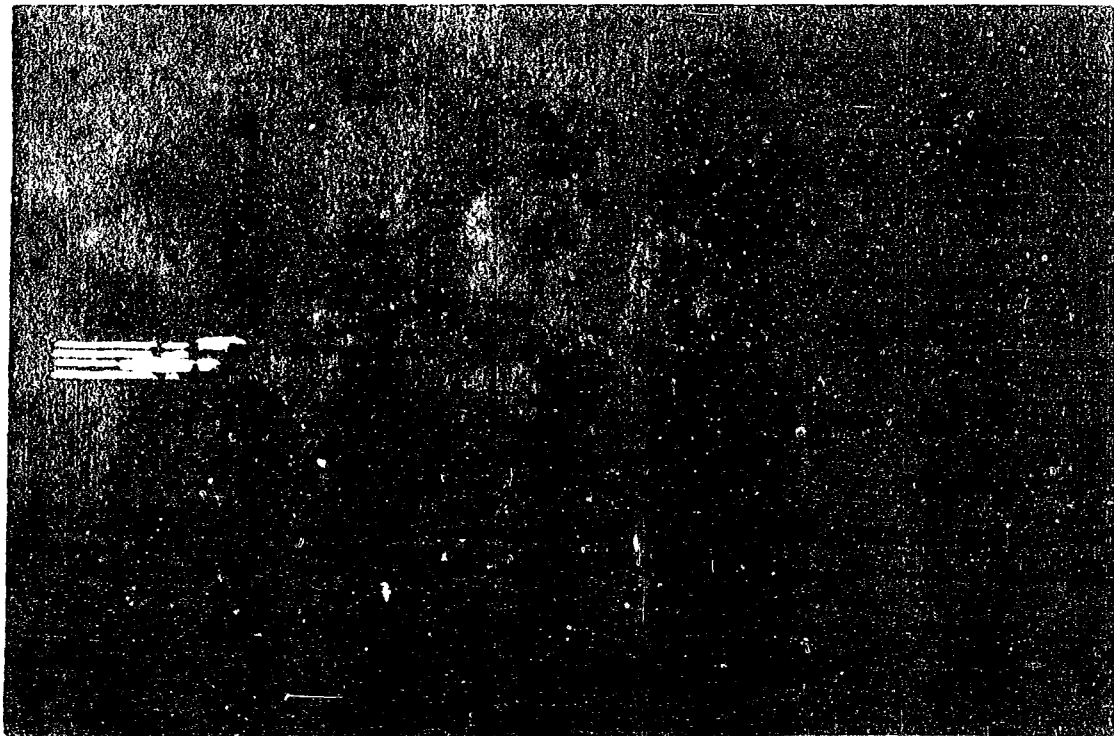


FIGURA 6