

135-

01664/24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL VIRUS DE ANEMIA
 INFECCIOSA DEL POLLO EN MEXICO, REPRODUCCION DE
 LA ENFERMEDAD Y ENCUESTA SEROLOGICA EN PARVADAS
 COMERCIALES**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTADA POR

MVZ NESTOR LEDESMA MARTINEZ

ASESORES

DR. TAMAS FEHERVARI

MVZ M. en C. MA. TERESA CASAUBON HUGENIN



MEXICO, D. F.

1999

**TESIS CON
 FALLA DE OR. EN**



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.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Declaración	I
Dedicatorias	II
Agradecimientos	III
Resumen	IV
Summary	V
Tabla de contenido	VI
Lista de cuadros	VII
Lista de figuras	VIII
Lista de abreviaturas	IX
Introducción	1
Justificación	6
Objetivo general	6
Objetivos específicos	6
Material y métodos	7
Resultados	12
Discusión	21
Conclusiones	28
Literatura citada	29

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.- Características de los casos sospechosos de anemia infecciosa.

Cuadro 2.- Resultados del hematocrito de los casos sospechosos de anemia infecciosa.

Cuadro 3.- Resultados serológicos de casos de campo.

Cuadro 4.- Anatomopatología de casos de campo.

Cuadro 5.- Resumen de los resultados de casos de campo.

Cuadro 6.- Resultados del hematocrito y estudio serológico en la inoculación de pollitos LPE.

Cuadro 7.- Anatomopatología de las inoculaciones en pollitos LPE.

Cuadro 8.- Caracterización fisicoquímica del virus aislado en el caso 1.

Cuadro 9.- Resultados serológicos del experimento 1. Evaluación del potencial inmunodepresor.

Cuadro 10.- Resultados histopatológicos del experimento 1.

Cuadro 11.- Resultados serológicos del experimento 2. Evaluación del potencial inmunodepresor.

Cuadro 12.- Resultados histopatológicos del experimento 2, toma 1 (7 días).

Cuadro 13.- Resultados histopatológicos del experimento 2, toma 2 (14 días).

Cuadro 14.- Encuesta serológica para anemia infecciosa en México.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Diagrama de flujo para el aislamiento y caracterización del virus de anemia infecciosa y reproducción del cuadro.

Figura 2.- Hipoplasia de la bolsa de Fabricio. Caso 1. 150X H&E.

Figura 3.- Cuerpos de inclusión intranucleares en médula ósea. Caso 10 1500X H&E.

Figura 4.- Hematocrito de los pollos en la inoculación del caso 1.

Figura 5.- Aspecto de los pollos en la inoculación del caso 1.

Figura 6.- Médula ósea de los pollos en la inoculación del caso 1.

Figura 7.- Atrofia severa de timo en la inoculación del caso 10. 60X H&E.

Figura 8.- Microscopía electrónica del virus del caso 1. 31 000X Tinción con acetato de uranilo.

RESUMEN

LEDESMA MARTÍNEZ NESTOR: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS DE ANEMIA INFECCIOSA EN MÉXICO, REPRODUCCIÓN DE LA ENFERMEDAD Y ENCUESTA SEROLÓGICA EN PARVADAS COMERCIALES. Asesorado por Dr. Tamas Fehervari y MVZ M en C Ma. Teresa Casaubon Hugenin.

Los objetivos del presente estudio fueron aislar y caracterizar el virus de anemia infecciosa en México y realizar una encuesta serológica en parvadas comerciales.

A partir de los casos de diagnóstico que son remitidos al Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, se obtuvieron tres aislamientos del virus de anemia infecciosa, de pollos de engorda y pollas de reposición semipesadas. Los virus aislados reprodujeron el cuadro clínico y lesiones de anemia infecciosa cuando fueron inoculados en pollos libres de patógenos específicos y se multiplicaron en cultivos celulares MDCC-MSB1. El virus que mostró ser más patógeno en la inoculación de pollitos fué sometido a pruebas fisicoquímicas y resultó similar a la cepa de referencia Del Rose. La microscopía electrónica de sobrenadantes de cultivos celulares inoculados con este virus mostró partículas virales de 22 a 27 nm. El virus ocasionó una respuesta vacunal disminuida en pollitos LPE vacunados contra virus de ENC e IBF, pero las aves fueron resistentes al desafío con estos virus, por lo que aparentemente pudieran existir diferencias de patogenicidad con respecto a otros virus aislados en el mundo. La encuesta serológica reveló que el virus está distribuido ampliamente en México, por lo que esta enfermedad debe ser considerada como endémica y se deben tomar las medidas pertinentes para su control.

Palabras clave: Anemia infecciosa; virus; aislamiento; México

SUMMARY

LEDESMA MARTINEZ NESTOR: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CHICKEN INFECTIOUS ANEMIA VIRUS IN MEXICO, REPRODUCTION OF DISEASE AND SEROLOGICAL SURVEY IN COMMERCIAL FLOCKS

Under guidance of Dr. Tamas Fehervari and MVZ MC Ma. Teresa Casaubon Hugenin

The objectives of the present study were to isolate and characterize the chicken infectious anemia virus and to carry out a serological survey in commercial flocks in Mexico.

Three anemia virus isolates were obtained from different broiler and replacement chickens sent to the Department of Animal Production: Poultry, Faculty of Veterinary Medicine and zootechnique of the National Autonomous University of Mexico. The isolates grew in MDCC-MSB1 cell culture and generated signs and lesions in day-old SPF chicks, characteristics for infectious anemia. The most pathogen isolate was selected and its physicochemical properties were determined. Based on these properties, the strain showed similarities to the Del Rose isolate. The viruses were also studied by electron microscope using the negative staining method and the diameter of particles was found 22-27nm. Poorer immune response was measured in SPF chickens challenged previously with chicken anemia virus isolate then vaccinated separately with attenuated Newcastle disease and infectious bursal disease than in chicken vaccinated but not challenged, even if any chicks showed signs of anemia but seroconversion only. Thus apparently the pathogenicity of this virus may be considered to be different of those others isolated through out the world. The serological survey demonstrated that chicken infectious anemia is widely extended in Mexico therefore the disease should be considered endemic and appropriate measures are needed to bring it under control.

Keywords: Chicken infectious anemia virus; chicken; isolation; México.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AI	Anemia infecciosa
AP	Aglutinación en placa
BI	Bronquitis infecciosa
CAA	Chicken anemia agent
CAV	Chicken anemia virus
CID ₅₀ /ml	Dosis infectante en cultivo celular 50% por ml
CVP	Circovirus porcino
ELD ₅₀ /ml	Dosis letal para embrión de pollo 50% por ml
ELISA	Inmunoensayo absorbente ligado a enzimas
ENC	Enfermedad de Newcastle
G	Grupo vacunado y desafiado con IBF
GA	Grupo inoculado con virus de anemia, vacunado y desafiado con IBF
HI	Inhibición de la hemoaglutinación
IBF	Infección de la bolsa de Fabricio
IM	Intramuscular
kDa	Kilodaltones
LPE	Libres de patógenos específicos
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
N	Grupo vacunado y desafiado con virus de enfermedad de Newcastle
NA	Grupo inoculado con virus de anemia, vacunado y desafiado con ENC
rpm	Revoluciones por minuto
SCPA	Sin cambios patológicos aparentes
SP	<i>Salmonella</i> sp
TMG	Título medio geométrico
TN	Grupo desafiado con virus de ENC
VEPPP	Virus de enfermedad del pico y las plumas de los psitácidos
VSN	Virus suero neutralización

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS DE ANEMIA INFECCIOSA DEL POLLO EN MÉXICO, REPRODUCCIÓN DE LA ENFERMEDAD Y ENCUESTA SEROLÓGICA EN PARVADAS COMERCIALES

II. INTRODUCCIÓN

La anemia infecciosa del pollo (AI) es una enfermedad infecciosa viral que se caracteriza por producir anemia e inmunodepresión en pollos jóvenes, principalmente en aquéllos menores de 4 semanas.

HISTORIA

El primer aislamiento del agente causal se realizó en Japón en 1978 por Yuasa y col.(1) a partir de una vacuna contra enfermedad de Marek contaminada con el virus de reticuloendoteliosis y el agente de la anemia del pollo. Desde entonces se han realizado aislamientos en Alemania (2), Suecia (3), Australia (4), Canadá, Nueva Zelanda, Francia (5), Estados Unidos (6, 7), Argentina (8), Sudáfrica (9), Hungría (10), Brasil (11), Inglaterra (12), China (13) y México (14).

Durante muchos años, la enfermedad fue desconocida. Los primeros reportes hacían referencia de un agente filtrable, muy resistente al calor y solventes orgánicos, que no producía lesiones en embriones de pollo ni se replicaba en cultivos celulares convencionales como fibroblastos o células renales de pollo. Dada la naturaleza de este virus, los estudios sobre la patogenia y epizootiología de la enfermedad, no aportaron mucha información sino hasta principios de los años noventa, cuando la biología molecular (15), permitió la aplicación de técnicas de diagnóstico más eficientes y desarrollo de vacunas.

IMPORTANCIA

Esta enfermedad es importante principalmente desde tres puntos de vista.

a) Inmunológico, por inducir inmunodepresión que predispone a la parvada a la infección por otros agentes como virus respiratorios tales como coronavirus de la bronquitis infecciosa o paramixovirus de la enfermedad de Newcastle y otros virus inmunodepresores como virus de infección de la bolsa de Fabricio. También predispone a infecciones bacterianas por *E. Coli* o *Clostridium* sp. Por otra parte se reporta también una respuesta deficiente ante las vacunaciones (16, 17).

b) Económico, ya que en casos de infección subclínica, las pérdidas por bajo rendimiento de la parvada (pollos con diferentes pesos, mal emplume y pigmentación, conversión alimenticia alta) alcanzan hasta un 13% (18).

c) Cuando se presenta en forma clínica ocasiona mortalidad en aves jóvenes. Se han reportado mortalidades entre 10 y 20% y en algunas ocasiones hasta el 60% (5).

ETIOLOGÍA

El agente causal de la anemia infecciosa es conocido como virus de la anemia del pollo (5), virus de la anemia infecciosa del pollo (7), agente de la anemia del pollo (16) y CAA o CAV por sus siglas en inglés (chicken anemia agent o chicken anemia virus respectivamente) (1, 16, 17). Es un virus que se ha propuesto, junto con el circovirus porcino (CVP) y el virus de la enfermedad del pico y las plumas de los psitácidos (VEPPP), para ser clasificados en una nueva familia llamada tentativamente *Circoviridae* (19). Sin embargo, estudios posteriores muestran que el circovirus porcino, el virus de los psitácidos y el virus de la anemia infecciosa, no presentan similitud en la secuencia de bases, ni comparten determinantes antigénicos y por otra parte, en la microscopía electrónica el CVP y VEPPP parecen 30% más pequeños. Debido a estas diferencias, probablemente el virus de la anemia del pollo sea clasificado posteriormente como una nueva familia (15).

Es un virus ADN desnudo de una sola cadena de sentido negativo, circular, de 2298 a 2319 bases con varios segmentos de lectura abierta que codifican tres proteínas de 50.6 kDa (VP1), 24 kDa (VP2) y 13.6 kDa (VP3 o apotina) (15). Los estudios de microscopía electrónica muestran que la partícula viral puede presentar diversos diámetros, desde 19.1 nm (20) hasta 26.5 nm (21). Por ser un virus desnudo, es resistente a los solventes orgánicos como éter o cloroformo, temperaturas de 56°C a 70°C por 1 hora y desinfectantes comunes. También resiste el tratamiento con acetona al 90% por 24 horas (22), aunque puede ser inactivado si se expone al fenol al 50% por 5 minutos (1). Su densidad en cloruro de cesio es entre 1.36 y 1.37 g/ml (23).

Aparentemente, sólo existe un serotipo (5, 15), dado que no se han encontrado diferencias antigénicas entre los diferentes aislamientos de varias partes del mundo, usando anticuerpos policlonales (5, 24). Sin embargo, con anticuerpos monoclonales se han encontrado algunas diferencias, por lo que es probable que las cepas puedan diferir en patogenicidad (5).

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

A diferencia de otros virus que se pueden considerar como de aislamiento sencillo, el virus de anemia infecciosa presenta algunas dificultades. Se puede multiplicar en pollos de un día, cultivos

celulares y embriones de pollo (16, 25), pero dado que en los embriones no produce lesiones, ni se propaga en cultivos de células renales ni fibroblastos (1, 17, 23, 26), se prefiere el cultivo celular en líneas MDCC-MSB1 y MDCC-JP2 que son derivadas de tumores de bazo con enfermedad de Marek (20), o línea LSCC-1104B1 que deriva de tumores de leucosis linfoide(16). En las células MDCC-MSB1, el efecto citopático se manifiesta por hinchazón celular, lisis celular y conglomeración de células. Desafortunadamente, esto se presenta después de por lo menos 10 pases (16, 25). Considerando que los pases se realizan cada 48 a 72 horas, el aislamiento del virus por este método es muy lento (pueden requerirse hasta cuatro semanas dependiendo de las condiciones del cultivo).

Se reporta que algunos virus de anemia infecciosa no se propagan adecuadamente en las líneas celulares antes mencionadas (17), por lo que se puede utilizar el aislamiento en pollitos susceptibles. Cuando el aislamiento se realiza por inoculación intramuscular en aves libres de patógenos específicos (LPE) de un día, a las dos semanas postinoculación, el hematocrito de los pollos disminuye a menos de 27% y, se presenta atrofia de órganos linfoides y médula ósea. Si el inóculo tiene un título de virus muy bajo, la anemia y lesiones se producen hasta los 21 o 28 días postinoculación (25). Otra manera de producir el cuadro en aves LPE es inoculando los embriones de 6 días de edad en saco vitelino, éstos se dejan nacer y a los 7 días presentan el cuadro característico de anemia, para morir a las 2 semanas. Se reporta que las lesiones y cuadro son más severos cuando se infectan a las aves de esta manera (16). Un inconveniente de realizar el aislamiento en pollitos susceptibles es que debe realizarse en aves derivadas de parvadas LPE de las que se tiene la certeza de que son libres de virus de anemia, ya que se han reportado en varios lugares del mundo parvadas LPE positivas a anticuerpos contra este virus (27). El intentar un aislamiento en aves procedentes de estas parvadas, podría resultar en un falso negativo ya que la inmunidad materna podría proteger a los pollos.

La identificación del virus puede ser realizada por medio de inmunofluorescencia en tejidos en fresco o en cultivos celulares fijados con acetona; con inmunoperoxidasa en tejidos incluidos en parafina o en cultivos celulares fijados con acetona o alcohol (28, 29).

EPIZOOTIOLOGÍA

Hasta donde se sabe, sólo los pollos son susceptibles a la enfermedad (5). La infección se difunde por vía vertical u horizontal. En el caso de la infección vertical, las gallinas infectadas pueden eliminar el virus en el huevo durante 3 a 6 semanas (2). Cuando las reproductoras se infectan antes de la postura, la mortalidad y cuadro clínico en la progenie son menos severos, inclusive se presenta inmunidad que es transmitida al pollito, en cambio si la infección ocurre en el pico de postura o durante ésta, la progenie desarrolla el cuadro y elimina el virus, dando origen a la

infección horizontal. Se han reportado mortalidades en la progenie hasta del 50% cuando la infección ocurre en postura (17).

Dado que el virus es muy resistente al medio ambiente, así como a los desinfectantes y se transmite a través del huevo, es difícil su control. Ya se ha mencionado que existen reportes de detección de anticuerpos contra el virus, en parvadas que se consideraban libres de patógenos específicos (27). De modo que las vacunas producidas con huevos procedentes de estas parvadas estuvieron contaminadas con el virus. Probablemente estos factores y el hecho de que la enfermedad fue desconocida por mucho tiempo, contribuyeron a la diseminación mundial del virus (16).

CUADRO CLÍNICO

La presentación del cuadro depende de la vía de entrada del virus. En una misma parvada se pueden tener pollitos con y sin anticuerpos maternos, así como pollitos con y sin el virus, la proporción en que se encuentran éstos y agentes complicantes como otros virus y bacterias determinan la tasa de morbilidad y mortalidad. Por otra parte, la infección pura por virus de anemia infecciosa es rara en campo (17).

Si bien el virus puede infectar aves de cualquier edad (24, 26), la inmunodepresión, anemia y lesiones sólo se presentan en aves menores de cuatro semanas, cuando la infección fue por vía vertical, cuando se infectaron durante la primera semana de vida en ausencia de anticuerpos maternos o bien, cuando recibieron vacunas contaminadas con el virus (16).

En infecciones experimentales, la anemia (con hematocrito entre 6 y 27%) y lesiones se presentan entre los 8 y 14 días postinoculación y la mortalidad entre 12 y 14 días. En ausencia de infecciones secundarias, los pollos se recuperan en tres o cuatro semanas. Bajo condiciones de campo, no se conoce el período de incubación y los signos y lesiones pueden notarse desde los 12 días de edad, aunque son más aparentes en aves de tres y cuatro semanas (1, 5).

ANATOMOPATOLOGÍA

A la necropsia, las aves afectadas tienen timos pequeños, médula ósea de color rosa o amarillo, bolsa de Fabricio pequeña y translúcida. Han sido reportadas también hemorragias en hígado, mucosa del proventrículo y tejido subcutáneo (5,26,30).

La histopatología refleja los hallazgos de necropsia: se presenta atrofia de corteza de timo; bolsa de Fabricio con folículos linfoides pequeños, focos de necrosis dispersos, depleción linfoides e hiperplasia de células reticulares en la zona medular. En médula ósea, atrofia con focos de necrosis dispersos y sustitución por tejido adiposo. Después de 4 semanas postinoculación, se

presentan áreas de eritropoyesis y granulopoyesis. Se han reportado cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos en células de médula ósea y linfocitos de timo a los 8 días postinoculación (30, 31, 32).

DIAGNÓSTICO

El hematocrito y las lesiones a la necropsia e histopatología orientan el diagnóstico, sin embargo dado que la asociación con otros agentes es frecuente, se requiere la confirmación final por aislamiento.

Otras opciones son las técnicas de hibridación *in situ*, reacción en cadena de la polimerasa (33), microscopía electrónica (21) e inmunoperoxidasa (28, 29).

Se pueden detectar anticuerpos contra el virus de la anemia infecciosa en suero o yema mediante neutralización viral, Inmunofluorescencia indirecta y ELISA (34, 35).

TRATAMIENTO Y CONTROL

A la fecha no existe tratamiento contra esta enfermedad, por lo que se realiza la prevención y control mediante medidas sanitarias. Se han intentado vacunas en las reproductoras con buenos resultados hasta el momento (17, 36).

LA ENFERMEDAD EN MÉXICO

En México se tiene poca información de esta enfermedad. Valle y Lucio (14) lograron dos aislamientos que comparten características fisicoquímicas y serológicas descritas para el virus de anemia infecciosa y demostraron anticuerpos en reproductoras y pollos de engorda en los estados de Querétaro, Puebla, Hidalgo, Veracruz, Estado de México y Morelos. Ledesma *et al* (37) reportaron un cuadro clínico en pollos de engorda con lesiones descritas para anemia infecciosa.

En campo son frecuentes los reportes de parvadas con mal desempeño o respuesta pobre ante las vacunaciones.* En muchos de estos casos, no es posible demostrar la presencia del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (IBF) o micotoxinas, que son los inmunodepresores más comunes, por lo que es posible que el virus de la anemia infecciosa esté presente, pero no existen estudios donde se logre el aislamiento, caracterización del virus y replicación del cuadro. No se conoce además la distribución de parvadas comerciales seropositivas, en el resto de estados de la República Mexicana.

*Archivo de Diagnósticos del D.P.A.:AVES F.M.V.Z. U.N.A.M.

JUSTIFICACIÓN

Dado que en México, los casos de inmunodepresión son frecuentes y se tiene poca información sobre la anemia infecciosa que es reconocido en otros países como uno de los inmunodepresores más importantes, es necesario conocer si en estos casos el virus de la anemia infecciosa está involucrado; de ser así, es necesario conocer sus características, así como la distribución de parvadas comerciales seropositivas en la República.

OBJETIVO GENERAL

- 1.-Aislar y caracterizar el virus de la anemia infecciosa en México.
- 2.-Realizar una encuesta serológica en parvadas comerciales de México mediante la técnica de ELISA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.-Realizar el aislamiento del virus de la anemia infecciosa del pollo en México y comparar sus características con la cepa de referencia Del Rose.
- 2.-Determinar las características fisicoquímicas, morfológicas y de patogenicidad de aislamientos de campo del virus de la anemia infecciosa en México.
- 3.-Reproducir el cuadro clínico y lesiones a partir de inóculos de casos clínicos sospechosos de anemia infecciosa en México.
- 4.-Evaluar el potencial inmunodepresor del virus de la anemia infecciosa aislado en México, en presencia de infección por virus de enfermedad de Newcastle (ENC), IBF y vacunación contra ENC e IBF.
- 5.-Realizar una encuesta serológica en parvadas comerciales mediante la técnica de ELISA en varios estados de la República Mexicana.

III MATERIAL Y MÉTODOS

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE DE AI Y REPRODUCCIÓN DEL CUADRO

A partir de 11 casos sospechosos de anemia infecciosa remitidos al Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el período comprendido entre junio de 1997 y junio de 1998, se realizó el siguiente protocolo de investigación siguiendo el orden (Figura 1):

- a) Hematocrito.
- b) Estudio serológico para ENC, IBF, *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Salmonella* sp (SP), Bronquitis infecciosa (BI) y AI.
- c) Necropsia.
- d) Histopatología de órganos linfoides y médula ósea.
- e) Toma de muestras de órganos linfoides y médula ósea para detección del virus de la AI por inmunoperoxidasa indirecta.
- f) Toma de muestras de hígado y médula ósea para aislamiento viral en cultivo de células MDCC-MSB1 y pollitos LPE susceptibles de 1 día de edad

HEMATOCRITO

Se realizó la técnica de microhematocrito en tubo capilar heparinizado que se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. Las aves se consideraron como anémicas cuando presentaron hematocrito menor a 27% (1, 38).

ESTUDIO SEROLÓGICO

Para la detección de anticuerpos se emplearon las siguientes técnicas:

- ENC : Inhibición de la hemaglutinación (39).
- MG : Aglutinación en placa (*Mycoplasma gallisepticum* Antigen Nobilis © Intervet International B.V. Holland).
- MS : Aglutinación en placa (*Mycoplasma synoviae* Antigen Nobilis © Intervet International B.V. Boxmeer Holland).
- SP : Aglutinación en placa (Pulorum Stained Antigen K Polyvalent Solvay Animal Health Inc.).
- IBF : Virus suero neutralización (VSN) (39).
- BI : ELISA (KPL 548201).
- AI : ELISA (IDEXX Laboratories, Inc.).

NECROPSIA

Se utilizó la técnica descrita por Perrusquia y Paasch (40).

HISTOPATOLOGÍA

Se tomaron secciones de timo, bazo, bolsa de Fabricio y médula ósea, de 3 mm de espesor, que fueron fijadas en formalina durante 24 horas para su posterior proceso por la técnica de inclusión en parafina y tinción de hematoxilina-eosina (41).

INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA

Se utilizó en los órganos fijados en formol y cultivos de células MDCC-MSB1 inoculados con material sospechoso de contener virus de la AI, un juego de reactivos comercial de peroxidasa indirecta (Zymed Laboratories, Inc. San Francisco, CA, USA.) y un antisuero control positivo (SPAFAS USA).

PREPARACIÓN DE INÓCULOS

A partir de macerados de hígado y médula ósea, fueron preparadas suspensiones al 20% en PBS que se trataron con calor y cloroformo para eliminar virus extraños según los métodos estándar descritos por Rovozzo y Burke (42). Una vez preparadas se distribuyeron en alicuotas y fueron almacenadas a -70°C hasta su utilización.

CULTIVO E INOCULACIÓN DE CÉLULAS MDCC-MSB1

Se emplearon cultivos celulares MDCC-MSB1 multiplicados según la metodología descrita (20,43). Una botella de 5 ml con suspensión de células MDCC-MSB1 a una concentración de $3 \times 10^5/\text{ml}$ fue inoculada con 500 μl del inóculo descrito en el párrafo anterior y se incubó a 39°C en una atmósfera con 5% de CO_2 durante 48 horas. Se realizaron pases, transfiriendo 1 ml de cultivo inoculado, en 5 ml de medio fresco cada 48 horas, por lo menos 8 veces antes de intentar observar efecto citopático y antígeno viral por inmunoperoxidasa indirecta.

INOCULACIÓN DE POLLITOS SUSCEPTIBLES

Se utilizaron pollitos LPE de un día de edad, a los que se les proporcionó agua y alimento a libre acceso. Fueron inoculados con 200 μl del mismo inóculo que se usó en los cultivos celulares (25). La inoculación fue por vía IM en la pierna. Se utilizaron 10 pollos por cada inóculo y se tuvieron 10 pollos sin inocular como testigos negativos. Los grupos inoculados y testigos fueron alojados en unidades de aislamiento separadas. Se observaron durante 14 días, al término de los cuales se siguió el procedimiento descrito para casos sospechosos. Fueron considerados positivos cuando presentaron hematocrito menor a 27%, lesiones macro y microscópicas descritas para AI, se

detectó antígeno viral por medio de inmunoperoxidasa indirecta, se recuperó el virus en cultivos celulares y se detectaron anticuerpos por ELISA.

CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE DE AI

A partir de un aislamiento que mostró ser más patógeno en la inoculación de pollitos, tomando en cuenta signos clínicos, mortalidad y lesiones, fueron realizadas las pruebas a y b siguientes y se compararon con las características de la cepa de referencia Del Rose. Posteriormente se realizó la prueba c con el virus aislado:

- a) Microscopía electrónica.
- b) Caracterización fisicoquímica.
- c) Evaluación del potencial inmunodepresor.

a) MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

A partir de cultivos celulares positivos al virus de anemia infecciosa aislado, se fijaron células en glutaraldehído durante 24 horas, posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos y la pastilla celular se fijó por 48 horas a 4°C en Nacacodilato al 2% amortiguado. Las muestras fueron embebidas en agar-agar y se fijaron nuevamente en tetraóxido de osmio. Posteriormente se embebieron en resina Durcupan y se realizaron cortes ultrafinos para tinción con acetato de uranilo. Se utilizó un microscopio Philips EM 208 S.

b) CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA

Se realizaron los siguientes estudios mediante las técnicas descritas.

- I. Determinación del tamaño por filtración (42)
- II. Sensibilidad al calor (42)
- III. Sensibilidad a solventes orgánicos (42)
- IV. Sensibilidad a pH 3 (42)

Se utilizaron 500 µl de cada virus tratado para inocular botellas con 5 ml de cultivos celulares MDCC-MSB1 a una concentración de 3×10^5 /ml que fueron incubadas a 39° C en una atmósfera con 5% de CO₂. Pasadas 48 horas, se fijaron las células con acetona para demostrar el virus con la prueba de inmunoperoxidasa.

c) EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INMUNODEPRESOR:

Experimento 1

50 pollos LPE de un día de edad se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos: dos de 20 pollos y uno de 10 pollos. Al primer día de edad, a un grupo de 20 pollos, denominado NA se les inoculó 200 µl de sobrenadante de cultivos celulares de 10^o pase con el virus aislado, una vez que las células fueron congeladas y descongeladas 3 veces y el sobrenadante fue centrifugado a 1200 rpm durante 10 minutos. La inoculación fue por vía IM. El segundo grupo de 20 pollos, denominado N no recibió el virus aislado. El grupo de 10 aves, denominado TN no recibió inoculación, ni del virus aislado, ni vacuna contra ENC. A los grupos NA y N se les aplicó a los 10 días de edad, una vacuna contra ENC ocular a base de virus activo cepa La Sota. A los 24 días de edad, se tomaron muestras de suero de todos los grupos para determinación de anticuerpos contra ENC por inhibición de la hemoaglutinación y AI por ELISA. Se desafiaron todos los grupos con la cepa Chimalhuacán del virus de ENC con dosis de 10⁶ ELD₅₀/ml. Se observaron durante 14 días y se registraron signos y lesiones. Al término del período de observación, se tomaron muestras de suero para detección de anticuerpos contra ENC y AI, y se llevó a cabo necropsia y toma de muestras para histopatología de encéfalo, proventrículo y órganos linfoides. Las medias geométricas de los títulos de anticuerpos contra ENC se compararon entre los grupos mediante análisis de varianza. Se consideró una significancia de 0.05. Se compararon las proporciones de pollos con signos (torticosis y diarrea) y lesiones (hemorragias en proventrículo y tonsilas cecales, encefalitis no supurativa, gliosis) de ENC y lesiones de anemia infecciosa (atrofia de timo, hipoplasia de bolsa de Fabricio y atrofia de médula ósea), entre los grupos mediante prueba de Kruskal-Wallis. Se consideró una significancia de 0.05 (44).

Experimento 2

50 pollos LPE de un día de edad se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos: dos de 20 pollos y uno de 10 pollos. Al primer día de edad, a un grupo de 20 pollos, denominado GA se les inoculó 200 µl de sobrenadante de cultivos celulares de 10^o pase con el virus aislado, una vez que las células fueron congeladas y descongeladas 3 veces y el sobrenadante fue centrifugado a 1200 rpm durante 10 minutos. La inoculación fue por vía IM. El segundo grupo de 20 pollos, denominado G no recibió el virus aislado. El grupo de 10 aves, denominado TG no recibió inoculación, ni del virus aislado, ni vacuna contra IBF. A los grupos GA y G se les aplicó a los 10 días de edad, una vacuna contra IBF ocular a base de virus activo cepa Lukert intermedia. A los 24 días de edad, se tomaron muestras de suero de todos los grupos para determinación de anticuerpos contra IBF por VSN y AI por ELISA. Se desafiaron todos los grupos con la cepa 73688 de virus de IBF con dosis de 10³ CID₅₀/ml por vía oral. Se observaron durante 14 días y se registraron signos y lesiones. A los 7 días postinoculación, se tomó la mitad de pollos de cada grupo y se tomaron muestras de suero para la determinación de anticuerpos contra IBF por VSN y AI mediante técnica de ELISA, se

les practicó necropsia y toma de muestras de órganos linfoides y médula ósea para histopatología. Al término del período de observación, se tomaron los pollos restantes y se llevó a cabo el mismo procedimiento que a los 7 días. Las medias geométricas de los títulos de anticuerpos contra IBF se compararon entre los grupos mediante análisis de varianza. Se consideró una significancia de 0.05. Se compararon las proporciones de pollos con signos (depresión, heces acuosas de color blanco, deshidratación) y lesiones (atrofia de bolsa de Fabricio y bursitis) de IBF a los 7 y 14 días y lesiones de anemia infecciosa (atrofia de timo, hipoplasia de bolsa de Fabricio y atrofia de médula ósea), entre los grupos mediante prueba de Kruskal-Wallis. Se consideró una significancia de 0.05 (44).

ENCUESTA SEROLÓGICA EN PARVADAS COMERCIALES

A partir de los sueros de pollos de engorda, gallinas de postura, pollas de reemplazo, reproductoras pesadas y aves de combate que son remitidos al laboratorio de diagnóstico del D.P.A.: AVES F.M.V.Z. U.N.A.M., se realizó prueba de ELISA con la mezcla de 5 sueros por caso, para detección de anticuerpos contra el virus de la AI. Se registró la procedencia de cada caso.

IV RESULTADOS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE

A partir de 11 casos con historia sospechosa de anemia infecciosa, se logró el aislamiento del virus en 3 de ellos. En 7 casos se observaron evidencias de enfermedad pero no se logró la confirmación final del aislamiento, mientras que un caso resultó negativo en todas las pruebas.

La mayor parte de los casos correspondieron a pollos de engorda de dos semanas, solamente tres fueron en pollas de reposición y uno en pollos de engorda de 4 semanas. A continuación, se presentan los resultados de cada caso. Las características de las parvadas en las que se llevó a cabo el protocolo de investigación se muestran en el cuadro número 1.

CASO 1

- **Hematocrito:** 23%.
- **ELISA para anemia infecciosa:** Positivo.
- **Estudio serológico para otros agentes:** Negativo a anticuerpos contra ENC, BI, *Mycoplasma synoviae*, *M gallisepticum* y *Salmonella* sp. 154 de media geométrica en ELISA para IBF.
- **Necropsia:** Timos y bolsa de Fabricio pequeños, bazo y médula ósea sin cambios patológicos aparentes.
- **Histopatología:** Timo con atrofia severa de corteza, bolsa de Fabricio con hipoplasia y apoptosis incrementada, el resto de los órganos sin lesiones significativas.
- **Inmunoperoxidasa indirecta en tejidos:** Negativo.
- **Aislamiento en cultivo celular MDCC-MSB1:** Positivo al 8º pase con efecto citopático.
- **RESULTADO FINAL:** POSITIVO.

CASO 2

- **Hematocrito:** 31%.
- **ELISA para anemia infecciosa:** Negativo.
- **Estudio serológico para otros agentes:** Negativo a anticuerpos contra ENC, BI, *Mycoplasma synoviae*, *M gallisepticum* y *Salmonella* sp. 230 de media geométrica en ELISA para IBF.
- **Necropsia:** Sin lesiones aparentes en órganos linfoides ni médula ósea.
- **Histopatología:** Atrofia de corteza de timo, hipoplasia de bolsa de Fabricio y atrofia de médula ósea.
- **Inmunoperoxidasa indirecta en tejidos:** Negativo.
- **Aislamiento en cultivo celular MDCC-MSB1:** Negativo.
- **RESULTADO FINAL:** NEGATIVO, sólo evidencia histopatológica.

CASO 3

- **Hematocrito:** 29%.
- **ELISA para anemia infecciosa:** Negativo.
- **Estudio serológico para otros agentes:** Negativo a anticuerpos contra ENC, BI, IBF, *Mycoplasma synoviae*, *M gallisepticum* y *Salmonella* sp.
- **Necropsia:** Timo pequeño, médula ósea de color rosa pálido, bolsa de Fabricio y bazo sin lesiones aparentes.
- **Histopatología:** Atrofia de médula ósea con proceso de regeneración, hipoplasia de bolsa de Fabricio y heterofilia intersticial en zona medular del timo.
- **Inmunoperoxidasa indirecta en tejidos:** Negativo.
- **Aislamiento en cultivo celular MDCC-MSB1:** Negativo.
- **RESULTADO FINAL:** NEGATIVO, sólo evidencia histopatológica.

CASO 4

- **Hematocrito:** 30.5%.
- **ELISA para anemia infecciosa:** Negativo.
- **Estudio serológico para otros agentes:** Negativo a anticuerpos contra, BI, *Mycoplasma synoviae*, *M gallisepticum* y *Salmonella* sp. 84.44 de media geométrica para anticuerpos contra ENC y 5700 de media geométrica de anticuerpos en ELISA para IBF.
- **Necropsia.** Sin lesiones aparentes en órganos linfoides ni médula ósea.
- **Histopatología:** Apoptosis incrementada y heterofilia intersticial en zona medular de timo, el resto de los órganos sin lesiones significativas.
- **Inmunoperoxidasa indirecta en tejidos:** Negativo.
- **Aislamiento en cultivo celular MDCC-MSB1:** Negativo.
- **RESULTADO FINAL:** NEGATIVO.

CASO 5

- **Hematocrito:** 29.8%.
- **ELISA para anemia infecciosa:** Positivo.
- **Estudio serológico para otros agentes:** Negativo a anticuerpos contra ENC, BI, *Mycoplasma synoviae*, *M gallisepticum* y *Salmonella* sp. 30 de media geométrica en ELISA para IBF.
- **Necropsia:** Sin lesiones aparentes en órganos linfoides ni médula ósea.
- **Histopatología:** Timo con atrofia de corteza, apoptosis incrementada y heterofilia intersticial en zona medular. Atrofia de médula ósea. Bazo y bolsa de Fabricio sin lesiones significativas.
- **Inmunoperoxidasa indirecta en tejidos:** Negativo.
- **Aislamiento en cultivo celular MDCC-MSB1:** Positivo al 8º pase.

- **RESULTADO FINAL: POSITIVO.**

CASO 6

- **Hematocrito: 29.8%.**
- **ELISA para anemia infecciosa: Positivo.**
- **Estudio serológico para otros agentes: Negativo a anticuerpos contra ENC, BI, *Mycoplasma synoviae*, *M gallisepticum* y *Salmonella* sp. 30 de media geométrica en ELISA para IBF.**
- **Necropsia: Sin lesiones aparentes en órganos linfoides ni médula ósea.**
- **Histopatología: Timo con apoptosis incrementada. Bolsa de Fabricio con hipoplasia y apoptosis incrementada. Atrofia de médula ósea. Bazo sin lesiones significativas.**
- **Inmunoperoxidasa indirecta en tejidos: Negativo.**
- **Aislamiento en cultivo celular MDCC-MSB1: Negativo.**
- **RESULTADO FINAL: NEGATIVO, sólo evidencia serológica e histopatológica.**

CASO 7

- **Hematocrito: 29.8%.**
- **ELISA para anemia infecciosa: Positivo.**
- **Estudio serológico para otros agentes: Negativo a anticuerpos contra ENC, BI, *Mycoplasma synoviae*, *M gallisepticum* y *Salmonella* sp. 30 de media geométrica en ELISA para IBF.**
- **Necropsia: Sin lesiones aparentes en órganos linfoides ni médula ósea.**
- **Histopatología: Atrofia de médula ósea. Bolsa de Fabricio con hipoplasia. El resto de los órganos sin lesiones significativas.**
- **Inmunoperoxidasa indirecta en tejidos: Negativo.**
- **Aislamiento en cultivo celular MDCC-MSB1: Negativo.**
- **RESULTADO FINAL: NEGATIVO, sólo evidencia serológica e histopatológica.**

CASO 8

- **Hematocrito: 29.8%.**
- **ELISA para anemia infecciosa: Positivo.**
- **Estudio serológico para otros agentes: Negativo a anticuerpos contra ENC, BI, *Mycoplasma synoviae*, *M gallisepticum* y *Salmonella* sp. 30 de media geométrica en ELISA para IBF.**
- **Necropsia: Sin lesiones aparentes en órganos linfoides ni médula ósea.**
- **Histopatología: Médula ósea con atrofia y proceso de regeneración. Sin lesiones significativas en el resto de los órganos.**
- **Inmunoperoxidasa indirecta en tejidos: Negativo.**
- **Aislamiento en cultivo celular MDCC-MSB1: Negativo.**

- **RESULTADO FINAL: NEGATIVO, sólo evidencia serológica e histopatológica**

CASO 9

- **Hematocrito: 29.8%.**
- **ELISA para anemia infecciosa: Positivo.**
- **Estudio serológico para otros agentes: Negativo a anticuerpos contra ENC, BI, *Mycoplasma synoviae*, *M gallisepticum* y *Salmonella* sp. 30 de media geométrica en ELISA para IBF.**
- **Necropsia: Sin lesiones significativas en órganos linfoides ni médula ósea.**
- **Histopatología: Bolsa de Fabricio con hipoplasia y apoptosis incrementada. Atrofia de médula ósea. Bazo y timo sin lesiones significativas.**
- **Inmunoperoxidasa indirecta en tejidos: Negativo.**
- **Aislamiento en cultivo celular MDCC-MSB1: Negativo.**
- **RESULTADO FINAL: NEGATIVO, sólo evidencia serológica e histopatológica.**

CASO 10

- **Hematocrito: 18.8%.**
- **ELISA para anemia infecciosa: Positivo.**
- **Estudio serológico para otros agentes: Negativo a anticuerpos contra ENC, BI, IBF, *Mycoplasma synoviae*, *M gallisepticum* y *Salmonella* sp.**
- **Necropsia: Bolsa de Fabricio pequeña, médula ósea amarilla. Timo y bazo sin lesiones aparentes.**
- **Histopatología: Timo con atrofia de corteza y apoptosis incrementada, bolsa de Fabricio con hipoplasia y apoptosis incrementada, médula ósea con atrofia, proceso de regeneración e inclusiones intranucleares eosinofílicas.**
- **Inmunoperoxidasa indirecta en tejidos: Negativo.**
- **Aislamiento en cultivo celular MDCC-MSB1: Positivo al 10º pase.**
- **RESULTADO FINAL: POSITIVO.**

CASO 11

- **Hematocrito: 25.5%.**
- **ELISA para anemia infecciosa: Positivo.**
- **Estudio serológico para otros agentes: Negativo a anticuerpos contra ENC, BI, *Mycoplasma synoviae*, *M gallisepticum* y *Salmonella* sp. 31 de media geométrica de anticuerpos contra IBF por ELISA.**
- **Necropsia: Sin lesiones aparentes en órganos linfoides y médula ósea.**
- **Histopatología: Sin lesiones significativas en órganos linfoides y médula ósea.**

- **Inmunoperoxidasa indirecta en tejidos: Negativo.**
- **Aislamiento en cultivo celular MDCC-MSB1: Negativo.**
- **RESULTADO FINAL: NEGATIVO, sólo evidencia serológica.**

Los resultados de hematocrito se resumen en el cuadro número 2, en tres casos el hematocrito fue inferior al 27%, en dos de estos casos se logró aislamiento y en uno, aunque se presentó anemia, la única evidencia de virus fue serológica.

Los resultados serológicos de los casos estudiados se resumen en el cuadro número 3. En 8 casos resultó positivo a anticuerpos contra virus de anemia infecciosa. Los casos de aislamiento están incluidos entre los positivos por serología. El resto de los estudios serológicos mostró que en todos los casos las aves fueron seronegativas a *Mycoplasma*, *Salmonella*, virus de bronquitis infecciosa, virus de enfermedad de Newcastle y presentaron títulos bajos contra IBF, exceptuando el caso número 4 en donde las aves fueron de cuatro semanas y presentaron títulos de anticuerpos aceptables contra IBF y ENC considerando que son aves vacunadas.

Los resultados de necropsia e histopatología, se resumen en el cuadro número 4, a la necropsia, los casos 1, 3 y 10 presentaron timos pequeños, en dos de ellos se logró aislamiento, mientras que la bolsa de Fabricio sólo se apreció pequeña en dos casos, en los cuales se logró el aislamiento. La médula ósea, sólo resultó afectada en los casos 3 y 10 en donde presentó color rosa y amarillo respectivamente, se logró aislamiento en el caso de la médula amarilla. El resto de los órganos no presentaron lesiones aparentes.

En el estudio histopatológico, la lesión más frecuente fue la atrofia de médula ósea, que se presentó en 8 de 11 casos; en segundo lugar, la hipoplasia de bolsa de Fabricio (Figura 2) en 6 de 11 casos y en el timo la atrofia de corteza se presentó en 4 de 11 casos. En los tres casos en los que se logró aislamiento, estuvieron presentes las lesiones en médula ósea, bolsa de Fabricio y timo. Sólo en el caso 10 se observaron cuerpos de inclusión intranucleares en células de médula ósea (Figura 3).

Por otra parte, de los casos en los que no se logró el aislamiento, en dos de ellos (casos 2 y 3) hubo lesiones sugestivas de anemia, pero no serología positiva ni hematocrito bajo, mientras que en un caso no hubo lesiones (caso 11) y la única evidencia fue serológica. En cuatro casos, (casos 6, 7, 8 y 9), la serología e histopatología resultaron positivas, sin hematocrito bajo. Por último, sólo en un caso (caso 4) no hubo ninguna evidencia de anemia infecciosa a pesar de que la historia clínica así lo sugería.

En ninguno de los casos fue posible demostrar el virus de anemia infecciosa en los tejidos mediante la prueba de inmunoperoxidasa indirecta.

En la inoculación de células MDCC-MSB1 tres casos fueron positivos (1, 5 y 10), con efecto citopático a partir del 8° pase. En los 11 restantes, no hubo efecto citopático ni prueba de inmunoperoxidasa positiva aun en el 10° pase.

El cuadro 5 resume los resultados de todas las pruebas en cada caso.

REPRODUCCIÓN DEL CUADRO

En cuatro casos, fue posible la inoculación de pollos LPE (caso 1, 2, 3 y 10). Los resultados de hematocrito y serología se presentan en el cuadro número 6. Sólo en la inoculación del caso 1 se logró la reproducción del cuadro con hematocrito tan bajo como 18% (Figura 4), en el resto de los casos, el hematocrito fue superior al 27%. Los pollos en la inoculación del caso 1 presentaron aspecto pálido, con mal emplume y menor tamaño (Figura 5). En el estudio serológico, sólo la inoculación de los casos 1 y 10 resultó positivo a anticuerpos contra anemia infecciosa. Por otra parte, en las cuatro inoculaciones, no hubo anticuerpos contra los otros agentes del estudio.

Los resultados de necropsia, se presentan en el cuadro número 7. A la necropsia las inoculaciones de los casos 1 y 10 presentaron atrofia de timos. La médula ósea en la inoculación del caso 1, presentó color amarillo (Figura 6) y en el caso 10, colores rosa y amarillo. Las bolsas de Fabricio fueron pequeñas. En los casos 2 y 3, no hubo lesiones aparentes a la necropsia.

El estudio histopatológico, mostró atrofia de corteza de timo (Figura 7) en las inoculaciones de los casos 1 y 10, mientras que en médula ósea, la atrofia fue severa con proceso de regeneración. No fue posible la demostración del virus de anemia en los tejidos mediante la prueba de inmunoperoxidasa indirecta.

En la inoculación de células MDCC-MSB1 a partir de muestras de los pollos inoculados, se demostró el virus de anemia infecciosa en los casos 1 y 10, en muestras de 10° pase.

CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS AISLADO EN EL CASO No. 1

Microscopía electrónica

A partir de cultivos MDCC-MSB1 positivos al virus aislado en el caso 1, se fijaron células en glutaraldehído que se procesaron para ME. Se encontraron partículas virales en muestras de 10° pase, con diámetro de 22 a 27 nm, adyacentes a las membranas celulares y fueron más frecuentes y abundantes en aquellas células con mayor efecto citopático (Figura 8).

Caracterización fisicoquímica.

Los resultados de sensibilidad al calor, solventes orgánicos y resistencia a pH 3, así como la determinación del tamaño por filtración se muestran en el cuadro número 8. El virus aislado fue resistente al calor y cloroformo, así como al pH 3, por otra parte, pasó el filtro de 45 nm pero aparentemente no pasó el de 22 nm.

Evaluación del potencial inmunodepresor

Experimento 1

Todos los pollos del grupo TN, murieron a las 72 horas postinoculación. No hubo mortalidad ni signos clínicos de ENC o AI en los pollos de los grupos NA y N, en todo el período de observación. Los resultados serológicos se muestran en el cuadro número 9. A los 24 días de edad de los pollos que correspondió a la toma 1 y al día del desafío, los pollos del grupo TN fueron seronegativos a ENC y no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre los títulos de anticuerpos contra ENC entre los grupos NA y N. Todos los pollos fueron seronegativos a anemia infecciosa en ese día. A los 14 días postinoculación, que correspondió a la toma 2, se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los títulos de anticuerpos contra ENC entre los grupos NA y N siendo menor en el grupo NA. Por lo que respecta a anticuerpos contra anemia infecciosa, el grupo NA seroconvirtió, mientras que el grupo N permaneció negativo. No hubo muestras de serología del grupo TN a los 14 días, dado que todos los pollos murieron a las 72 horas.

En la necropsia de los pollos del grupo TN, la única lesión apreciada fue hemorragias amplias en mucosa de proventrículo en todos los pollos. A los 14 días postinoculación, no hubo lesiones aparentes de ENC en los grupos NA y N, las médulas óseas del grupo NA presentaron color amarillo en comparación con el grupo N en el que fueron rojas.

Los resultados del estudio histopatológico, se resumen en el cuadro número 10. No hubo lesiones de ENC en encéfalo y proventrículo. Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en cuanto a la atrofia de médula ósea, siendo mayor en el grupo NA. Contrario a lo esperado, el grupo N presentó más atrofia de corteza de timo que el grupo NA ($p < 0.05$). La bolsa de Fabricio, no presentó hipoplasia.

Experimento 2

No hubo mortalidad ni signos clínicos de IBF durante el período de observación en ninguno de los grupos.

Los resultados serológicos, se muestran en el cuadro número 11. A los 24 días de edad de los pollos, que correspondió a la toma 1 y al día del desafío, los pollos del grupo TG fueron seronegativos a IBF y no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p>0.05$) entre los títulos de anticuerpos contra IBF en los grupos GA y G. Todos los pollos fueron seronegativos a anemia infecciosa en ese día. A los 7 días postinoculación, que correspondió a la toma 2, no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p>0.05$) entre los títulos de anticuerpos contra IBF en los tres grupos. Los pollos permanecieron seronegativos a anemia infecciosa. A los 14 días postinoculación, que correspondió a la toma 3, se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) en los títulos de anticuerpos contra IBF en los 3 grupos siendo menores en el grupo NA y mayores en el grupo TG. Por lo que respecta a anticuerpos contra anemia infecciosa, el grupo NA seroconvirtió, mientras que los grupos TG y G permanecieron negativos.

En la necropsia, las bolsas de Fabricio del grupo TG fueron más pequeñas a los 7 y 14 días que en los grupos GA y G, las médulas óseas del grupo GA presentaron color amarillo en comparación con los grupos TG y G en el que fueron rojas. Esta diferencia fue más evidente a los 14 días postinoculación.

Los resultados del estudio histopatológico se resumen en los cuadros 12 y 13. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) entre los grupos G y GA en las lesiones en bolsa de Fabricio a los 7 y 14 días postinoculación; sí hubo diferencias con respecto al grupo testigo, en cuanto al grado de atrofia y lesión a tejido linfóide.

ENCUESTA SEROLOGICA EN PARVADAS COMERCIALES

Se obtuvieron muestras de suero de los estados de Chiapas, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nuevo León, Puebla, Veracruz y Distrito Federal. Los resultados de la encuesta serológica se muestran en el cuadro número 14, en donde se señala el fin zootécnico y los estados en que se obtuvo la muestra. La mayor parte de los casos correspondió a pollos de engorda y gallinas de postura. En los 10 estados en que se obtuvieron muestras, hubo serología positiva por lo menos en un tipo de aves. Con el tipo de prueba utilizado, no se obtiene un título, de modo que sólo se consideran como positivos aquellos pozos con una razón muestra a negativo menor o igual a 0.6.

V DISCUSIÓN

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE

Los resultados del presente estudio confirman la presencia del virus de anemia infecciosa del pollo en México. El sólo haber confirmado tres aislamientos en 11 casos sospechosos, coincide con los reportes previos en otras partes del mundo en cuanto a que el aislamiento no siempre es posible, aun cuando existan evidencias serológicas y anatomopatológicas (5, 16, 17).

La mayor parte de los casos estudiados, correspondió a pollos de engorda; sin embargo, uno de los aislamientos fue a partir de pollas de reposición semipesadas, a diferencia de la mayoría de los reportes en el mundo (4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14), en donde los aislamientos se logran principalmente en pollos de engorda o reproductoras pesadas. Aunque la infección puede darse en diferentes estirpes (5, 16), probablemente la escasez de reportes en aves diferentes de pollos de engorda, se deba a la velocidad de crecimiento de éstos, que hace más notorio el mal desempeño de la parvada.

Los 3 casos con aislamiento positivo provinieron del Estado de México (casos 1 y 5) y Morelos (caso 10), que son dos zonas importantes en producción avícola. Los primeros dos aislamientos en México, se llevaron a cabo a partir de pollos de engorda del estado de Veracruz y reproductoras pesadas del estado de Morelos(14). Es probable que en otros estados de la República esté presente el virus ya que se encontró serología positiva, sin embargo dada el área de influencia del laboratorio de la FMVZ UNAM y las restricciones para la movilización de aves, que están en vigor actualmente, no se obtuvieron muestras para aislamiento de otros estados.

Una vez confirmado el aislamiento, se llevó a cabo el estudio serológico de las madres resultando seropositivas a virus de anemia infecciosa en dos de los tres casos, de modo que probablemente una parte de la infección en la progenie de estos casos pudo ser vertical ya que la seroconversión, tarda tres semanas o más (5, 11). No se informaron anomalías en las reproductoras al igual que otros reportes de aislamientos (2, 18).

Aunque se ha señalado que la anemia no siempre se desarrolla (16, 17), en el presente estudio, en dos de los tres casos positivos al aislamiento, el hematocrito fue menor a 27%. En estos casos, los pollos remitidos al laboratorio fueron seleccionados por su aspecto pálido, bajo peso y mal emplume, lo cual, junto con el hematocrito fueron buenos indicadores de la enfermedad. Actualmente, son pocos los laboratorios a nivel nacional que realizan de rutina pruebas hematológicas en aves, por lo que es necesario que sean implementadas estas pruebas para el diagnóstico de anemia infecciosa y otras enfermedades.

En los casos clínicos, las lesiones macroscópicas más importantes fueron timos pequeños y médulas óseas amarillas o rosa pálido, mientras que a nivel microscópico fue la atrofia de médula ósea e hipoplasia de bolsa de Fabricio.

Resulta interesante el hecho de que aun cuando las bolsas de Fabricio no se apreciaron pequeñas en la necropsia, en el estudio histológico, los folículos linfoides fueron pequeños y no tenían la estructura característica, es decir, con delimitación entre corteza y médula. En el lugar que deberían ocupar los linfocitos se encontraron células pequeñas indiferenciadas. La bolsa de Fabricio en el pollito de un día es inmadura y completa su desarrollo durante las tres primeras semanas de vida (45), de modo que se consideró que las lesiones observadas corresponden a hipoplasia y no a atrofia como se menciona en la mayoría de los textos. Este tipo de lesión podría también indicar que la infección fue vertical, ya que si consideramos una infección horizontal el grado de hipoplasia sería menor dado que en los primeros días de vida del pollito, la bolsa de Fabricio tendría cierto grado de maduración. En todos los casos, es importante el estudio histopatológico, ya que lesiones como la hipoplasia de bolsa de Fabricio podrían pasar inadvertidas en la necropsia.

Sólo en el caso 10 se observaron cuerpos de inclusión intranucleares en células de médula ósea. En infecciones experimentales al primer día de edad, se reporta la observación de los cuerpos de inclusión entre los 8 y 12 días postinoculación (30, 31, 32), por lo que es probable que en este caso la infección haya sido horizontal durante la primera semana de vida, considerando que fueron aves de dos semanas y que las madres resultaron seronegativas a AI en el estudio serológico. Esta es una de las formas de llegar al diagnóstico, sin embargo se requiere que el examen de los pollos sea en el momento en que los cuerpos de inclusión estén presentes y esto no siempre es posible.

En los casos en los que no se logró aislamiento, pero hubo evidencias serológicas o histopatológicas, probablemente intervinieron factores tales como la edad de los pollos, selección de la muestra, vía de infección etc. Estos factores pudieron haber ocasionado que al momento de tomar la muestra el virus no estuviera presente o se encontrara en una concentración muy baja, lo que dificultó el aislamiento. En esos casos, es conveniente realizar un estudio más amplio y solicitar más muestra. Por otra parte, en los casos 6, 7, 8 y 9 en donde hubo evidencia serológica e histopatológica pero no se logró aislamiento en células MSB1, se debe considerar que algunos virus de anemia infecciosa no son capaces de infectar estas células (17) y en estos casos no fue posible la inoculación de pollitos. Si el virus de anemia infecciosa estuvo presente y tuvo esta característica, no fue posible demostrarlo. Ante esta problemática, quizá el mejor método de aislamiento sea la inoculación de pollitos (1, 5, 6, 11), aunque se requiere que éstos sean LPE certificados como libres de virus de AI o anticuerpos y disponer de unidades de aislamiento adecuadas para tener la seguridad de que las lesiones observadas son provocadas por el inóculo

administrado. Estas condiciones no se pueden tener en todos los laboratorios de diagnóstico del país.

En ninguno de los casos de campo fue posible la demostración de antígeno viral en los tejidos incluidos en parafina mediante la técnica de estreptoavidina-peroxidasa. Son varios los factores que pudieron influir, entre ellos la concentración viral al momento de tomar la muestra, ya que la concentración máxima se registra entre los 5 y 9 días postinoculación, suponiendo una infección al primer día de edad (28, 29, 32) y los casos de aislamiento positivo fueron a partir de pollos de dos semanas. Por otra parte, en los estudios cronológicos de la infección por virus de anemia se utilizaron cortes por congelación, improntas de tejido fijadas con acetona, fijador de Bouin, o formalina buferada con un tiempo máximo de fijación de 6 horas (32). En el presente estudio, se utilizó formalina amortiguada durante 24 horas y cortes a partir de muestras incluidas en parafina, considerando una mejor conservación de la arquitectura del tejido, lo que permitió una buena apreciación de las lesiones, pero que probablemente disminuyó la inmunoreactividad del virus a pesar del uso de proteasa para la recuperación de antígenos (46). Por último, la solución descalcificante, utilizada para facilitar el corte de tibiotarsos con médula ósea, pudo también desnaturalizar al antígeno (32).

Aunque la inoculación de células MDCC-MSB1 permitió tres aislamientos, el método resultó lento en comparación con la inoculación de pollitos susceptibles. En dos de los aislamientos, el efecto citopático se manifestó desde el 8° pase y en uno hasta el 10°. La prueba de inmunoperoxidasa en los cultivos celulares de 8° y 10° pases, a diferencia de lo ocurrido en los tejidos en parafina, sí permitió la demostración del virus. En este caso, los cultivos fueron fijados en acetona, que se indica como uno de los mejores fijadores para la conservación del virus. Sin embargo se debe tener precaución con este procedimiento ya que el virus permanece viable en las células aun fijadas (22). La reacción fue más evidente en aquellas células con mayor efecto citopático, que si bien no es patognomónico del virus de anemia infecciosa, en conjunto con la reacción de inmunoperoxidasa positiva permitió un diagnóstico confiable. El antígeno se detectó principalmente en el citoplasma y en menor proporción en el núcleo, lo que coincide parcialmente con el estudio de Hoop y Reece (28), en el que utilizando peroxidasa y suero policlonal producido en conejo no encontraron diferencias entre la tinción en núcleo y citoplasma, pero difiere con los estudios de inmunofluorescencia, en los que la reacción positiva se ubicó principalmente en el núcleo. La diferencia probablemente se deba al tipo de anticuerpos utilizados, ya que en los estudios de inmunofluorescencia se utilizaron anticuerpos monoclonales contra una fracción del virus, mientras que el antisuero policlonal producido en pollos LPE de SPAFAS está dirigido contra diferentes partes del virión, que durante la replicación se pueden encontrar tanto en el núcleo como en el citoplasma.

REPRODUCCIÓN DEL CUADRO

La inoculación de pollitos LPE susceptibles reprodujo en dos casos las lesiones macro y microscópicas características de anemia infecciosa reportadas por otros autores, como atrofia de timo y médula ósea e hipoplasia de bolsa de Fabricio (1, 7, 30, 31, 32). Sin embargo, no se encontraron hemorragias en músculos, necrosis hepática, erosiones en molleja ni necrosis del ala que son otras condiciones descritas (1, 24, 26), por lo que pudiera pensarse en diferencias de patogenicidad. Algunos autores mencionan diferencias de patogenicidad entre los diferentes aislamientos (16, 24). En nuestro estudio, en uno de los dos casos en los que la inoculación de pollitos LPE fue exitosa, el cuadro clínico observado fue más severo, por lo que pudiera pensarse que los dos virus aislados difieren en su patogenicidad, sin embargo, no recibieron una dosis estandarizada de virus dadas las dificultades de titulación, por lo que una dosis baja de virus pudo influir sobre el grado de lesiones y el tiempo en que éstas se presentaron.

En estos casos, tampoco fue posible la detección de antígeno viral en tejidos incluidos en parafina mediante la técnica de inmunoperoxidasa. Posiblemente intervinieron los mismos factores que en el estudio de los casos clínicos discutidos con anterioridad.

La inoculación de cultivos celulares a partir de macerados de hígado y médula ósea de los pollos inoculados resultó positiva en los dos casos en los que previamente se encontraron lesiones, lo cual confirmó el aislamiento del virus en los dos casos. En el caso 1 se pudo demostrar el antígeno desde el 6° pase. Resulta evidente, que la inoculación de pollitos es el mejor método para aislamiento debido a que requiere menor tiempo y que los virus se multiplican mejor en el huésped natural, sin embargo es recomendable la confirmación por medio de cultivos celulares y métodos inmunoquímicos.

CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS AISLADO EN EL CASO No. 1

ESTUDIOS FISICOQUÍMICOS

Las características fisicoquímicas del virus aislado en el caso 1 son similares a las de la cepa de referencia Del Rose del virus de AI (SPAFAS; Storrs, Com.). El virus fue resistente al calor, cloroformo, pH 3 y pasó por el filtro de 45 nm. Al parecer, el virus no pasó el filtro de 22 nm, ya que no se detectó antígeno viral en los cultivos inoculados con el filtrado. Dado que los cultivos celulares producen un título viral bajo (16, 36), y que al ser filtrado se retiene una parte importante de virus en la membrana, es posible que la cantidad de virus en el filtrado haya sido tan pequeña, que no se detectó en el cultivo celular. Ahora bien, en la cepa de referencia, probablemente la cantidad de virus haya sido mayor, por tener más pases en cultivo celular y aun al perder cierta cantidad de virus en el filtrado, éste alcanzó para ser detectado por inmunohistoquímica. Se reporta

que la infectividad del virus disminuye notablemente cuando es filtrado a través de membranas de 25 nm. (47). Por otra parte, también es posible que el virus aislado sea en verdad mayor que 22 nm pero menor que 45 nm. En la literatura se mencionan diferentes diámetros para el virus, desde 19 nm hasta 26 nm, pero existe la hipótesis de que esas diferencias tengan relación con el método de tinción utilizado. Por otra parte, se han encontrado dos diferentes tipos de partículas virales señaladas como partículas tipo I y II (esférica e icosaédrica respectivamente) (5, 21), lo que también pudiera tener relación con los resultados obtenidos.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

En el estudio de microscopía electrónica el diámetro aparente en las partículas virales encontradas fue de 22 a 27 nm lo cual concuerda con los hallazgos de McNulty (21) al utilizar tinción de acetato de uranilo y difiere con los hallazgos de Goryo que encontró partículas de 19.1 nm al utilizar ácido fosfotungstico (20). Por otra parte, con relación al estudio de McNulty, difiere parcialmente en la localización ya que en nuestro estudio las partículas se encontraron principalmente adyacentes a las membranas celulares de aquellas células con mayor daño, mientras que McNulty les encontró principalmente en el núcleo y adyacentes a microfilamentos cercanos a la membrana celular. Las diferencias observadas pudieran tener relación con las cepas utilizadas ya que McNulty utilizó la cepa Cuxhaven-1. Por otra parte, la observación en ese estudio se realizó a 24 y 48 horas postinoculación y en nuestro estudio a las 72 horas, lo que quizá permitió un mayor efecto citopático.

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INMUNODEPRESOR

Los resultados obtenidos sugieren en primera instancia que el virus de anemia en los experimentos es poco patógeno, ya que las aves resistieron el desafío con virus de ENC y no se presentaron diferencias en cuanto a las lesiones de IBF, sin embargo, el hecho de que se vio afectada la inmunidad humoral y que las aves tardaron 38 días en seroconvertir para anemia infecciosa y tener lesiones en médula ósea, sugiere que otros factores pudieran estar involucrados. En el caso de ENC, concuerda con lo descrito por Box *et al* (48) que señalan haber observado, en aves seropositivas a virus de AI, una respuesta vacunal disminuida contra una vacuna inactivada, pero difiere a lo reportado por Boer *et al* (49) que no encontraron diferencias entre aves con y sin inoculación de virus de anemia en cuanto a títulos de anticuerpos contra ENC cuando fueron vacunadas con un virus atenuado. En algunas enfermedades los títulos de anticuerpos no tienen una relación estrecha con el nivel de protección ante un desafío y es la inmunidad celular la que determina la protección (50, 51). Es probable que en nuestro caso, la resistencia al desafío se haya

debido a este mecanismo de inmunidad, pero se requieren mas estudios para demostrarlo. Por otra parte, en el caso de IBF, también el nivel de anticuerpos contra esta enfermedad fue menor en el grupo inoculado con virus de anemia con respecto a los otros dos grupos, sin embargo, a pesar de eso las lesiones de IBF sólo estuvieron presentes en el grupo sin virus de anemia y sin vacuna.

Si bien existen reportes de diferencias de patogenicidad (15, 24) entre los diferentes aislamientos de virus de anemia en el mundo, también existe la hipótesis de que la cantidad de virus en el inóculo tenga relación con las diferencias observadas (16, 17, 24). En el presente estudio, es posible que una dosis baja de virus de anemia tenga relación con los resultados observados, ya que se utilizó el sobrenadante de cultivos celulares de 10⁹ pase y se ha reportado que los cultivos celulares producen un título viral más bajo en comparación con la inoculación de pollos (16, 36). No fue posible la titulación de los virus obtenidos en cultivo celular dadas las características del virus y las dificultades de la técnica. Cuando la cantidad de virus en el inóculo es baja, el desarrollo del cuadro de anemia se retrasa o no sucede. En apoyo a esta hipótesis, la seroconversión a virus de anemia en los grupos NA y GA se presentó hasta los 38 días de edad y aunque no se encontraron lesiones de anemia en órganos linfoides, sí hubo atrofia de médula ósea. Si la cantidad de virus de AI fue baja, probablemente la vacunación y desafío con virus de ENC e IBF pudo favorecer la multiplicación de virus de AI, que probablemente inició en forma tardía, provocando una respuesta menor a la vacunación pero sin una inmunodepresión tan grave como para no resistir un desafío. Otra hipótesis para el comportamiento del virus de anemia en este estudio es su atenuación mediante los pases en cultivo celular. Es conocido que algunos virus se adaptan al embrión o al cultivo celular, disminuyendo su virulencia para los pollos (52, 53). En el caso del virus de anemia existe controversia en este punto, ya que algunos autores reportan atenuación a los 12 pases en cultivo (16, 17) mientras que otros no encuentran evidencia de atenuación hasta 19 o 40 pases (17, 20).

Por otra parte, si existen diferencias de patogenicidad como lo sugieren los estudios de biología molecular (15), estos virus podrían ser usados para el desarrollo de vacunas.

En el presente estudio sólo se utilizó una vacuna atenuada de ENC o IBF y su correspondiente virus de desafío por experimento, pero en el campo las aves están expuestas a muchos otros agentes bacterianos y virales, tanto de campo como vacunales, de modo que la inmunodepresión por virus de anemia, aun siendo leve o tardía, probablemente es un factor importante en los cuadros observados en campo de parvadas con mal desempeño.

ENCUESTA SEROLÓGICA EN PARVADAS COMERCIALES

Los resultados de la encuesta serológica sugieren que el virus de anemia infecciosa está ampliamente difundido en la República Mexicana, ya que hubo serología positiva por lo menos en un tipo de parvada comercial en los 10 estados en los que fue posible la obtención de muestra. La mayor parte de las muestras correspondieron a pollos de engorda y gallinas de postura y en cuatro estados fue posible la obtención de muestras de reproductoras.

Se ha encontrado que la presencia de anticuerpos contra virus de anemia infecciosa tiene relación con una menor eficiencia productiva (18) y una respuesta vacunal inadecuada. Por otra parte, las reproductoras positivas a anticuerpos contra anemia infecciosa y que no eliminan el virus, proporcionan inmunidad materna al pollo de engorda. Considerando que todas las reproductoras de este estudio fueron positivas por vía natural (ya que no existen por el momento vacunas en México), es recomendable el uso de vacunas inactivadas en las reproductoras durante la época de crianza, para asegurar que el virus no infecte naturalmente durante la postura y así empezar a controlar la diseminación del virus.

En el estudio previo realizado por Valle y Lucio (14) los estados con serología positiva fueron del centro del país: Puebla, Hidalgo, Morelos, Estado de México, Veracruz y Querétaro. En nuestro estudio, los mismos estados resultaron positivos con excepción de Querétaro en donde no fue posible obtener muestra, y se agregaron a la lista de positivos estados al norte, sur y occidente de la República, como Nuevo León, Chiapas, Jalisco y Guerrero, por lo que probablemente en el resto de los estados con avicultura comercial también exista serología positiva y por ende el virus de anemia infecciosa.

VI CONCLUSIONES

- 1.- Los resultados del presente estudio confirman la presencia del virus de anemia infecciosa en México, por lo que esta enfermedad debe ser considerada como endémica.
- 2.- Los virus aislados en México presentan las mismas características fisicoquímicas y estructurales que los virus de anemia infecciosa conocidos en el mundo.
- 3.- Aunque aparentemente el virus de AI en México es poco patógeno, la infección temprana y la asociación con otros agentes pueden ser responsables de los cuadros observados en el campo.
- 4.- Dado que no existe vacunación en México contra anemia infecciosa, la mejor forma de diagnóstico para la mayoría de los laboratorios es, por el momento, la combinación de serología y anatomopatología, sin embargo, se debe considerar que el diagnóstico concluyente es el aislamiento.
- 5.- Aunque la inoculación de pollitos LPE es el mejor método de aislamiento, se requieren de unidades de aislamiento adecuadas y pollitos LPE certificados como libres de AI. Por otra parte, los cultivos celulares, aunque son relativamente sencillos de manejar una vez que la línea celular se ha establecido, requieren de mucho tiempo para obtener un resultado, en comparación con la inoculación de pollitos.
- 6.- Por el momento, la mayoría de los laboratorios de diagnóstico del país no cuentan con todos los elementos necesarios para el aislamiento del virus, por lo que se deben implementar las medidas necesarias para un mejor conocimiento y control de la enfermedad en México.
- 7.- Debido a que el virus de anemia infecciosa es un inmunodepresor importante en otros países y que aparentemente está ampliamente difundido en México, se requieren más estudios sobre los virus aislados en México y sus asociaciones con otros agentes.

VII LITERATURA CITADA

- 1 Yuasa N, Taniguchi T and Yoshida I. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. *Avian Dis* 1979; 23: 366-385.
- 2 Vielitz E and Landgraf H. Anaemia-dermatitis of broilers: Field observations on its occurrence, transmission y prevention. *Avian Pathol* 1988; 17: 113-120.
- 3 Engström BE, Fossum O and Luthman M. Blue wing disease of chickens: Experimental infection with a swedish isolate of chicken anaemia agent and an avian reovirus. *Avian Pathol* 1988; 17: 33-50.
- 4 Firth GA and Imai K. Isolation of chicken anaemia agent from australian poultry. *Aust Vet J* 1990; 67: 301-302.
- 5 Bülow VV and Schat K. Infectious anemia. *In: Calnek BW, Hoffstad S, Barnes HN, Reid WN and Yoder HW, editors. Diseases of poultry 10th ed. Ames Iowa: Iowa State University Press, 1997: 739-756.*
- 6 Rosemberg JK and Cloud SS. The isolation and characterization of chicken anemia agent (CAA) from broilers in the United States. *Avian Dis* 1989, 33: 707-713.
- 7 Lucio B, Schat KA and Shivaprasad HL. Identification of the chicken anemia agent, reproduction of the disease, and serological survey in the United States. *Avian Dis* 1990; 34: 146-153.
- 8 Buscaglia C, Crosetti CF and Nervi P. Chicken infectious anemia in Argentina. *Proceedings of the forty-two Western Poultry Disease Conference; 1993 march 1-3; Sacramento, (California), USA: Western Poultry Disease Conference, 1993: 68-70.*
- 9 Witch JV and Maharaj SB. Chicken anaemia agent in South Africa. *Vet Rec* 1993; 133: 147-148.
- 10 Farkas T, Provazsán J, Dobos-Kovács M, Sággy E, Németh I and Drén Cs. Isolation of chicken anaemia virus from broiler chickens in Hungary. *Magyar Állatorvosok Lapja* 1991; 46: 661-668.
- 11 Brentano L, Mores N, Wentz I, Chandratilleke D and Schat KA. Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil. *Avian Dis* 1991; 35: 793-800.

- 12 McNulty MS Connor TJ and McNeilly F. Preliminary characterization of isolates of chicken anaemia agent infection in broiler chickens the United Kindom. *Avian Pathol* 1990; 19: 67-63.
- 13 Zhou W, Shen B, Yang B, Han S, Eii L, Xiao B and Zhou J. Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in China. *Avian Dis* 1997; 41: 361-364.
- 14 Valle VMN y Lucio DE. Demostración de la presencia de anticuerpos y del virus de la anemia infecciosa en México por medio de la prueba de inmunoperoxidasa indirecta. *Memorias de la XVIII Convención Nacional ANECA*; 1993 mayo 5-9; Cancun, (Quintana Roo), México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 1993: 328-335.
- 15 Noteborn MH and Koch G. Chicken anaemia virus infection: molecular basis of pathogenicity. *Avian Pathol* 1995; 24: 11-31.
- 16 McNulty MS. Chicken anaemia agent: a review. *Avian Pathol* 1991; 20: 187-203.
- 17 Lucio B. Anemia infecciosa aviar. *Memorias del VIII Seminario internacional de patología aviar*. 1994 junio 6-10; Athens, (Georgia), EUA: Universidad de Georgia, 1994: 486-506.
- 18 McNulty MS, McIlroy SG, Bruce DW and Todd D. Economic effects of subclinical chicken anemia agent infection in broiler chickens. *Avian Dis* 1991; 35: 263-268.
- 19 Studdert MJ. *Circoviridae: new viruses of pigs, parrots and chickens*. *Aust Vet J* 1993; 70: 121-122.
- 20 Goyro M, Suwa T, Matsumoto S, Umemura T and Itakura C. Serial propagation and purification of chicken anaemia agent in MDCC-MSB1 cell line. *Avian Pathol* 1987; 16: 149-163.
- 21 McNulty MS, Curran WL, Todd D and Mackie DP. Chicken anemia agent: an electron microscopic study. *Avian Dis* 1990; 34: 736-743.
- 22 Taylor S. The effect of acetone on the viability of chicken anemia agent. *Avian Dis* 1992; 36: 753-754.
- 23 Todd D, Creelan JL, Mackie DP, Rixon F and McNulty MS. Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent. *J Gen Virol* 1990; 71: 819-823.

- 24 Yuasa N and Imai K. Pathogenicity and antigenicity of eleven isolates of chicken anaemia agent (CAA). *Avian Pathol* 1986; 15: 639-645.
- 25 McNulty MS. Chicken anemia agent. *In*: Chairman HG, Arp LH, Domermuth CH and Pearson JE, editors. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 2nd ed. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologist, 1989: 108-109.
- 26 Goyro M, Sugimura S, Matsumoto S, Umemura T and Itakura C. Isolation of an agent inducing chicken anaemia. *Avian Pathol* 1985; 14: 483-496.
- 27 McNulty MS, Connor TJ and McNeilly F. A survey of specific pathogen-free chickens flocks for antibodies to chicken anaemia agent, avian nephritis virus and group A rotavirus. *Avian Pathol* 1989; 18: 215-220.
- 28 Hopp RK and Reece RL. The use of immunofluorescence and immunoperoxidase staining in the studying the pathogenesis of chicken anaemia agent in experimentally infected chickens. *Avian Pathol* 1991; 20: 349-356.
- 29 McNeilly F, Allan GM, Moffett DA and McNulty MS. Detection of chicken anaemia agent in chickens by immunofluorescence and immunoperoxidase staining. *Avian Pathol* 1991; 20: 125-132.
- 30 Chapa BJ y Lucio DE. Descripción de lesiones macroscópicas y microscópicas en aves libres de patógenos específicos inoculadas con el virus de la anemia infecciosa. Memorias de la XVIII Convención Nacional ANECA; 1993 mayo 5-9; Cancun, (Quintana Roo), México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 1993: 49-56.
- 31 Goyro M, Suwa T, Umemura T, Itakura C and Yamashiro S. Histopathology of chicks inoculated with chicken anaemia agent (MSB1-TK5803 strain). *Avian Pathol* 1989; 18: 73-89.
- 32 Smyth JA, Moffett DA, McNulty MS, Todd D and Mackie DP. A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chicken anemia virus infection at one day of age. *Avian Dis* 1993; 37: 324-338.
- 33 Noteborn M, Verschuieren J, Roozelaar S, Veldkamp J and Boer F. Detection of chicken anaemia virus by DNA hybridisation and polymerase chain reaction. *Avian Pathol* 1992; 21: 107-108.

- 36 Pages-Manté A, Saubi N, artigas C and España E. Experimental evaluation of an inactivated vaccine against chicken anaemia virus. *Avian Pathol* 1997; 26: 721-729.
- 34 Otaki Y, Saito K, Tajima M and Normura Y. Detection of antibody to chicken anaemia agent: a comparison of three serological tests. *Avian Pathol* 1991; 20: 315-324.
- 35 Yuasa N, Imai K and Tezuka H. Survey of antibody against chicken anaemia agent (CAA) by an indirect immunofluorescent antibody technique in breeder flocks in Japan. *Avian Pathol* 1985; 14: 521-530.
- 37 Ledesma MN, Casaubon HMT, Quintana LA, Del Río JC y Petrone VM. Caso clínico de anemia en pollos de engorda Avian Farm de 4 semanas. Memorias de la XXI Convención ANECA y Proceedings of forty-fifth Western Poultry Disease Conference. 1996 mayo 1-5; Cancun, (Quintana Roo), México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y Western Poultry Disease Conference, 1996: 331-333.
- 38 Campbell TW. *Avian hematology and cytology*. Ames Iowa: Iowa State University Press, 1988.
- 39 Beard CW. Serologic procedures. In: Chairman HG, Arp LH, Domermuth CH and Pearson JE, editors. *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*. 3rd ed. Pennsylvania. American association of avian pathologist, 1989: 192-200.
- 40 Perrusquia MT y Paasch ML. *Necropsias de las Aves*. México: Trillas, 1985.
- 41 Estrada FE, Peralta ZL y Rivas MP. *Manual de técnicas histológicas*. México: AGT Editor SA, 1982.
- 42 Rovozzo GC and Burke CN. *A manual of basic virological techniques*. New Jersey: Prentice-Hall Inc, 1973.
- 43 Coombes AL and Crawford GR. Recommended storage and resuscitation conditions for the MDCC-MSB1 cell line. *Avian Dis.* 1998; 42: 168-172.
- 44 Daniel EW. *Bioestadística*. México: Limusa, 1984.
- 45 Ridell C. *Avian Histopathology USA: The American Association of Avian Pathologist*. 1987.

- 46 Banda CV y Valero EG. Inmunohistoquímica diagnóstica. Memorias del curso sobre Inmunohistoquímica; 1997 octubre; México (DF): Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios AC. 1997:1-10.
- 47 Yuasa N. Chicken Anaemia Agent. In: McFerran JB and McNulty MS editors. Virus Infections of Birds. USA: Elsevier Science Publiser. 1993: 167-175.
- 48 Box PG, Holmes HC, Bushell AC and Finney PM. Impaired resoponse to killed Newcastle disease vaccine in chickens possesing circulating antibody to chicken anaemia agent. Avian Pathol 1988; 17: 713-723.
- 49 Boer GF, Van Roozelaar DJ, Moormann RJ, Jeurisen SHM, Van Den Wijngaard JC, Hilbink F and Koch G. Interaction between chicken anaemia virus and live Newcastle disease vaccine. Avian Pathol 1994; 23: 263-275
- 50 Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxovirus infections. In: Calnek BW, Hoffstad S, Barnes HN, Reid WN and Yoder HW, editors. Diseases of poultry 10th ed. Ames Iowa: Iowa State University Press, 1997: 541-569.
- 51 Palacios MR, Rodríguez VH, Ceron HM y García-García J. Evaluación de 7 vacunas comerciales de influenza aviar. Memorias de la XXI Convención ANECA y Proccedings of forty-fifth Western Poultry Disease Conference. 1996 mayo 1-5; Cancun, (Quintana Roo), México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y Western Poultry Disease Conference, 1996. 38-40.
52. McMartin DA Infectious bronchitis In: McFerran JB and McNulty MS editors. Virus Infections of Birds USA: Elsevier Science Publiser. 1993: 249-275
- 53 Jordan FTW. Infectious laryngotracheitis. In: McFerran JB and McNulty MS editors. Virus Infections of Birds. USA: Elsevier Science Publiser. 1993: 19-35.

CUADRO NO.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS CASOS SOSPECHOSOS DE ANEMIA INFECCIOSA

CASO	FUNCION ZOOTÉCNICA	EDAD	ESTIRPE	INCUBADORA	PROCEDENCIA	NO. AVES	AISLAMIENTO
1	Reposición	13 días	Rhode Island	Propia Morelos	Toluca Edo. Mex.	10 000	Positivo
2	Reposición	6 días	Rhode Island	Propia Morelos	E.Zapata Edo. Mex.	5 000	Negativo
3	Reposición	6 días	Rhode Island	Propia Morelos	E.Zapata Edo. Mex.	5 000	Negativo
4	Pollo de Engorda	28 días	Arbor acres	Edo de México	Texcoco Edo. Mex.	60 000	Negativo
5	Pollo de Engorda	14 días	Avian Farms	Cuautla Morelos	Amecameca Edo. Mex.	20	Positivo
6	Pollo de Engorda	14 días	Avian Farms	Cuautla Morelos	Amecameca Edo. Mex.	20	Negativo
7	Pollo de Engorda	14 días	Avian Farms	Cuautla Morelos	Amecameca Edo. Mex.	20	Negativo
8	Pollo de Engorda	14 días	Avian Farms	Cuautla Morelos	Amecameca Edo. Mex.	20	Negativo
9	Pollo de Engorda	14 días	Avian Farms	Cuautla Morelos	Amecameca Edo. Mex.	20	Negativo
10	Pollo de Engorda	14 días	Hubbard	Morelos	Yautepec Morelos	48 000	Positivo
11	Pollo de Engorda	14 días	NID	Morelos	Iguala Guerrero	10 000	Negativo

**CUADRO No. 2 RESULTADOS DE HEMATOCRITO
DE LOS CASOS SOSPECHOSOS DE ANEMIA INFECCIOSA**

CASO	HEMATOCRITO	RESULTADO
1*	23%	+
2	31%	-
3	29%	-
4	30.50%	-
5*	29.80%	-
6	29.80%	-
7	29.80%	-
8	29.80%	-
9	29.80%	-
10*	18.80%	+
11	25.50%	-

*** CASOS CON AISLAMIENTO POSITIVO**

CUADRO NO. 3 RESULTADOS SEROLÓGICOS DE CASOS DE CAMPO

CASO	ELISA CAV	ELISA IBF	ELISA BI	HI-ENC	AP MG	AP-MS	AP-SP
1*	+	154	0	0	-	-	-
2	-	230	0	3.03	-	-	-
3	-	0	0	0	-	-	-
4	-	5744	3	84.44	-	-	-
5*	+	30	0	2	-	-	-
6	+	30	0	2	-	-	-
7	+	30	0	2	-	-	-
8	+	30	0	2	-	-	-
9	+	30	0	2	-	-	-
10*	+	9	0	0	-	-	-
11	+	31	0	2.8	-	-	-

* CASOS CON AISLAMIENTO POSITIVO

CUADRO NO. 4 ANATOMOPATOLOGÍA DE CASOS DE CAMPO

			CASOS											
	ÓRGANO	LESIONES	1	2	3	4	5*	6	7	8	9	10*	11	
NECROPSIA	TIMO	PEQUEÑO	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	
		SCPA	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
	BOLSA DE FABRICIO	PEQUEÑA	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
		SCPA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BAZO	PEQUEÑO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		SCPA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	MÉDULA ÓSEA	AMARILLA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
		ROSA	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		SCPA	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	HISTOPATOLOGÍA	TIMO	HETEROFILIA INTERSTICIAL	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ATROFIA DE CORTEZA			+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
INCLUSIONES			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
APOPTOSIS INCREMENTADA			-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
BOLSA DE FABRICIO		HIPOPLASIA	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-
		APOPTOSIS INCREMENTADA	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
BAZO		HETEROFILIA INTERSTICIAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		DEPLESION LINFOIDE	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		NECROSIS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MÉDULA ÓSEA		NECROSIS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ATROFIA (ADIPOSIS)	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	
	INCLUSIONES	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
	PROCESO DE REGENERACIÓN	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	

* CASOS CON AISLAMIENTO POSITIVO

CUADRO NO. 5 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE CASOS DE CAMPO

CASO	NECROPSIA	HISTOPATOLOGIA	SEROLOGIA	HEMATOCRITO	AISLAMIENTO	INOCULACIÓN
1	+	+	+	+	+	+
2	-	+	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-----
5	-	+	+	-	+	-----
6	-	+	+	-	-	-----
7	-	+	+	-	-	-----
8	-	+	+	-	-	-----
9	-	+	+	-	-	-----
10	+	+	+	+	+	+
11	-	-	+	-	-	-----

**CUADRO NO. 6 RESULTADOS DEL HEMATOCRITO Y ESTUDIO SEROLÓGICO EN
LA INOCULACIÓN DE POLLITOS LPE**

CASO	HEMATOCRITO	ELISA CAV	ELISA IBF	ELISA BI	HI-ENC	AP-SP	AP-MG	AP-MS
1	18.00%	+	0	0	0	-	-	-
TESTIGO	34.42%	-	0	0	0	-	-	-
2	37.10%	-	0	0	0	-	-	-
TESTIGO	37.90%	-	0	0	0	-	-	-
3	33.70%	-	0	0	0	-	-	-
TESTIGO	37.90%	-	0	0	0	-	-	-
10	34.43%	+	0	0	0	-	-	-
TESTIGO	41.00%	-	0	0	0	-	-	-

CUADRO NO. 7 ANATOMOPATOLOGÍA DE LAS INOCULACIONES DE POLLITOS LPE

			CASOS							
ORGANO	LESIONES	1	TESTIGO	2	TESTIGO	3	TESTIGO	10	TESTIGO	
NECROPSIA	TIMO	PEQUEÑO	-	-	-	-	-	-	-	
		SCPA	+	+	+	+	+	+	+	
	BOLSA DE FABRICIO	PEQUEÑA	-	-	-	-	-	-	-	
		SCPA	+	+	+	+	+	+	+	
	BAZO	PEQUEÑO	-	-	-	-	-	-	-	
		SCPA	+	+	+	+	+	+	+	
	MÉDULA ÓSEA	AMARILLA	-	-	-	-	-	-	-	
		ROSA	-	-	-	-	-	-	-	
		ROJA	+	+	+	+	+	+	+	
HISTOPATOLOGÍA	TIMO	HETEROFILIA INTERSTICIAL	+	+	+	+	+	+	+	
		ATROFIA DE CORTEZA	+	-	-	-	-	-	-	
		INCLUSIONES	-	-	-	-	-	-	-	
		APOPTOSIS INCREMENTADA	-	+	-	+	+	+	-	
	BOLSA DE FABRICIO	HIPOPLASIA	-	-	-	-	-	-	-	
		APOPTOSIS INCREMENTADA	+	+	+	+	+	+	+	
	BAZO	HETEROFILIA INTERSTICIAL	-	-	+	-	+	+	-	
		DEPLESION LINFOIDE	+	-	-	-	-	-	-	
		NECROSIS	-	-	-	-	-	-	-	
	MÉDULA ÓSEA	NECROSIS	-	-	-	-	-	-	-	
		ATROFIA (ADIPOSIS)	+	-	-	-	-	-	+	
		INCLUSIONES	-	-	-	-	-	-	-	
PROCESO DE REGENERACIÓN		+	-	+	-	-	-	+		

CUADRO NO. 8 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL VIRUS AISLADO EN EL CASO 1

PRUEBA	VIRUS AISLADO	VIRUS DE REFERENCIA
SENSIBILIDAD AL CALOR	RESISTENTE	RESISTENTE
SENSIBILIDAD A CLOROFORMO	RESISTENTE	RESISTENTE
SENSIBILIDAD A pH 3	RESISTENTE	RESISTENTE
FILTRACIÓN POR 0.22	NEGATIVO	POSITIVO
FILTRACIÓN POR 0.45	POSITIVO	POSITIVO

CUADRO NO. 9 RESULTADOS SEROLÓGICOS DEL EXPERIMENTO 1. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INMUNODEPRESOR

GRUPO	TOMA 1 (DESAFIO)		TOMA 2 (14 DIAS POSTDESAFIO)	
	HI-ENC	ELISA AI	HI-ENC	ELISA AI
TESTIGO	1:0 6/6 TMG 0 b	NEGATIVO	---	---
N	1:8 1/10 1:16 3/10 1:32 4/10 1:64 1/10 1:128 1/10 TMG 27.85 a	NEGATIVO	1:64 1/17 1:128 7/17 1:256 3/17 1:1024 3/17 1:2048 1/17 1:4096 2/17 TMG 354.73 a	NEGATIVO
NA	1:8 1/12 1:16 1/12 1:32 6/12 1:64 4/12 TMG 33.9 a	NEGATIVO	1:32 1/19 1:64 9/19 1:128 5/19 1:256 3/19 1:4096 1/19 TMG 114.73 b	POSITIVO

LITERALES DIFERENTES INDICAN DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA (P<0.05)
 TMG. TÍTULO MEDIO GEOMÉTRICO

CUADRO NO. 10 RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DEL EXPERIMENTO 1

	GRUPO N										GRUPO NA											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
ENCEFALO																						
Encefalitis no supurativa	0	0	0	0	0	0					0	0	0	0	0	0						
Gliosis	0	0	0	0	0	0					0	0	0	0	0	0						
PROVENTRICULO																						
Proventriculitis no supurativa	0	0	0	0	0	0					0	0	0	0	0	0						
Hemorragias	0	0	0	0	0	0					0	0	0	0	0	0						
Necrosis	0	0	0	0	0	0					0	0	0	0	0	0						
TIMO																						
Heterofilia en zona medular *	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	b	1	2	0	1	0	1	2	0	1	0	a
Atrofia de corteza *	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	a	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	b
Apoptosis incrementada	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	2	2	1	1		
BOLSA DE FABRICIO																						
Hipoplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MEDULA ÓSEA																						
Atrofia (adiposis) *	1	2	2	1	2	2	b				3	3	2	3	3	3	a					
Proceso de regeneración	0	1	1	0	0	0					0	0	0	0	0	0						
Acumulos amplios de eritroblastos	0	1	1	0	0	0					0	1	1	3	3	2						
Cantidad de granulocitos	3	0	2	2	3	2					1	2	1	3	3	2						
Cantidad de tejido linfoide	0	3	3	1	2	0					0	0	0	0	0	0						

* Literales diferentes, indican diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre los dos grupos.

0 Sin lesión o nulo

1 Leve o escaso

2 Moderado

3 Severo o abundante

CUADRO NO. 11 RESULTADOS SEROLÓGICOS DEL EXPERIMENTO 2 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INMUNODEPRESOR

GRUPO	TOMA 1 (DESAFIO)		TOMA 2 (7 DÍAS)		TOMA 3 (14 DÍAS)	
	VSN-IBF	ELISA AI	VSN-IBF	ELISA AI	VSN-IBF	ELISA AI
TESTIGO	1:0 6/6 TMG 0 b	NEGATIVO	1:0 1/5 1:20 3/5 1:40 1/5 TMG 12.61 a	NEGATIVO	1:640 1/2 1:2560 1/2 TMG 1280 a	NEGATIVO
G	1:0 9/11 1:10 3/10 1:40 2/10 1:80 1/10 TMG 6.46 a	NEGATIVO	1:0 1/10 1:10 2/10 1:20 5/10 1:320 2/10 TMG 22.46 a	NEGATIVO	1:20 1/12 1:40 4/12 1:80 3/12 1:160 2/12 1:320 2/12 TMG 79.99 b	NEGATIVO
GA	1:0 9/11 1:40 2/11 TMG 1.9 ab	NEGATIVO	1:0 4/10 1:10 5/10 1:20 1/10 TMG 4.26 a	NEGATIVO	1:10 2/10 1:20 6/10 1:40 1/10 1:160 1/10 TMG 22.97 c	POSITIVO

LITERALES DIFERENTES, INDICAN DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA (P < 0.05)

TMG. TÍTULO MEDIO GEOMÉTRICO

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

CUADRO NO. 12 RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DEL EXPERIMENTO 2, TOMA 1 (7 DÍAS)

	GRUPO TG					GRUPO G									GRUPO GA								
TÍPO	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Heterofilia en zona medular	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	2	0
Atrofia de corteza	2	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Apoptosis incrementada *	0	2	2	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BOLSA DE FABRICIO	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
AGUDAS																							
Edema	0	0	0	3	0	0	0	3	1	0	3	0	1	3	1	0	2	3	2	3	1	0	3
Infiltración leucocitaria	0	0	0	3	1	0	0	1	0	1	1	2	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
Necrosis/Apoptosis *	0	0	0	0	0	3	3	2	2	2	2	2	2	3	1	1	0	1	2	0	0	0	0
SUBAGUDAS																							
Depleción de zona medular *	3	3	3	3	3	2	3	2	2	3	1	3	1	2	1	1	1	2	1	0	1	2	1
Atrofia de zona cortical	3	2	2	3	3	0	0	0	2	2	2	3	0	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2
CRÓNICAS																							
Hiperplasia de células reticulares *	3	2	3	3	3	1	0	0	1	1	1	2	2	2	1	1	0	0	0	0	1	1	1
Hiperplasia de células corticomedulares	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrosis *	1	1	2	2	2	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
% DE TEJIDO LINFOIDE FUNCIONAL *	0	0	0	0	0	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	3
MÉDULA ÓSEA	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6						
Atrofia (adiposis) *	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3						
Proceso de regeneración	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0						
Acumulos amplios de eritroblastos	0	0	0	2	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	2	0						
Cantidad de granulocitos	2	3	3	3	3	3	1	3	1	0	0	2	2	1	1	2	0						
Cantidad de tejido linfoide *	2	3	3	3	3	0	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0						

* Literales diferentes, indican diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05) entre los grupos.

0 Sin lesión o nulo

1 Leve o escaso

2 Moderado

3 Severo o abundante

CUADRO NO. 13 RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DEL EXPERIMENTO 2, TOMA 2 (14 DÍAS)

	GRUPO TG			GRUPO G									GRUPO GA											
TMO	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8					
Heterofilia en zona medular *	0	1	0	ab	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	a			
Atrofia de corteza	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0					
Apoptosis incrementada	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0					
BOLSA DE FABRICIO	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
AGUDAS																								
Edema *	0	0	0	b	0	1	3	3	3	2	2	2	2	a	1	2	3	0	2	3	2	1	1	a
Infiltración leucocitaria *	3	3	3	a	0	1	1	1	1	1	1	1	1	b	2	1	1	1	1	1	2	2	2	b
Necrosis/Apoptosis	0	0	0	2	0	2	2	2	3	1	2	1	3	2	0	1	2	1	1	2	3			
SUBAGUDAS																								
Depleción de zona medular *	3	3	3	a	2	1	1	1	3	2	1	2	2	b	1	0	1	3	1	1	1	1	2	b
Atrofia de zona cortical *	3	3	3	a	1	2	2	2	2	2	2	2	2	b	2	2	2	2	2	2	2	2	2	b
CRÓNICAS																								
Hiperplasia de células reticulares *	3	3	3	a	0	1	1	1	2	0	1	0	0	b	0	0	1	1	0	1	1	0	0	b
Hiperplasia de células corticomedulares	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Fibrosis *	3	3	3	a	1	1	1	1	0	0	0	0	0	b	0	0	0	0	0	1	1	1	1	b
% DE TEJIDO LINFOIDE FUNCIONAL *	0	0	0	b	3	3	3	3	3	3	3	3	3	a	3	3	3	3	3	3	3	3	3	a
MÉDULA ÓSEA	1	2	3	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6									
Atrofia (adiposis) *	1	2	1	b	1	2	2	2	2	2	ab	2	3	3	3	2	3	a						
Proceso de regeneración	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0									
Acumulaciones amplias de eritroblastos	0	0	0	2	0	0	1	2	1	1	1	1	1	2	1									
Cantidad de granulocitos *	3	3	3	a	3	2	2	2	2	2	a	2	1	1	1	2	1	b						
Cantidad de tejido linfoide	2	0	1	0	0	0	1	2	3	0	1	0	0	0	1									

* Literales diferentes indican diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05) entre los grupos.

0 Sin lesión o nulo

1 Leve o escaso

2 Moderado

3 Severo o abundante

CUADRO NO. 14 ENCUESTA SEROLÓGICA PARA ANEMIA INFECCIOSA EN MÉXICO

ESTADO	POLLO DE ENGORDA	GALLINA DE POSTURA	REPRODUCTORA PESADA	REPRODUCTORA LIGERA	POLLA DE REPOSICIÓN	AVES DE COMBATE
DISTRITO FEDERAL	XX	XX				XX
CHIAPAS			XX			
ESTADO DE MÉXICO	XX	XX	XX	XX	XX	XX
GUERRERO	XX					
HIDALGO		XX			XX	
JALISCO	XX	XX				
MORELOS	XX		XX			
NUEVO LEÓN	XX		XX			
PUEBLA	XX	XX				
VERACRUZ	XX					

XX SEROLOGÍA POSITIVA

FIGURA 1 DIAGRAMA DE FLUJO PARA AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS DE ANEMIA INFECCIOSA Y REPRODUCCIÓN DEL CUADRO

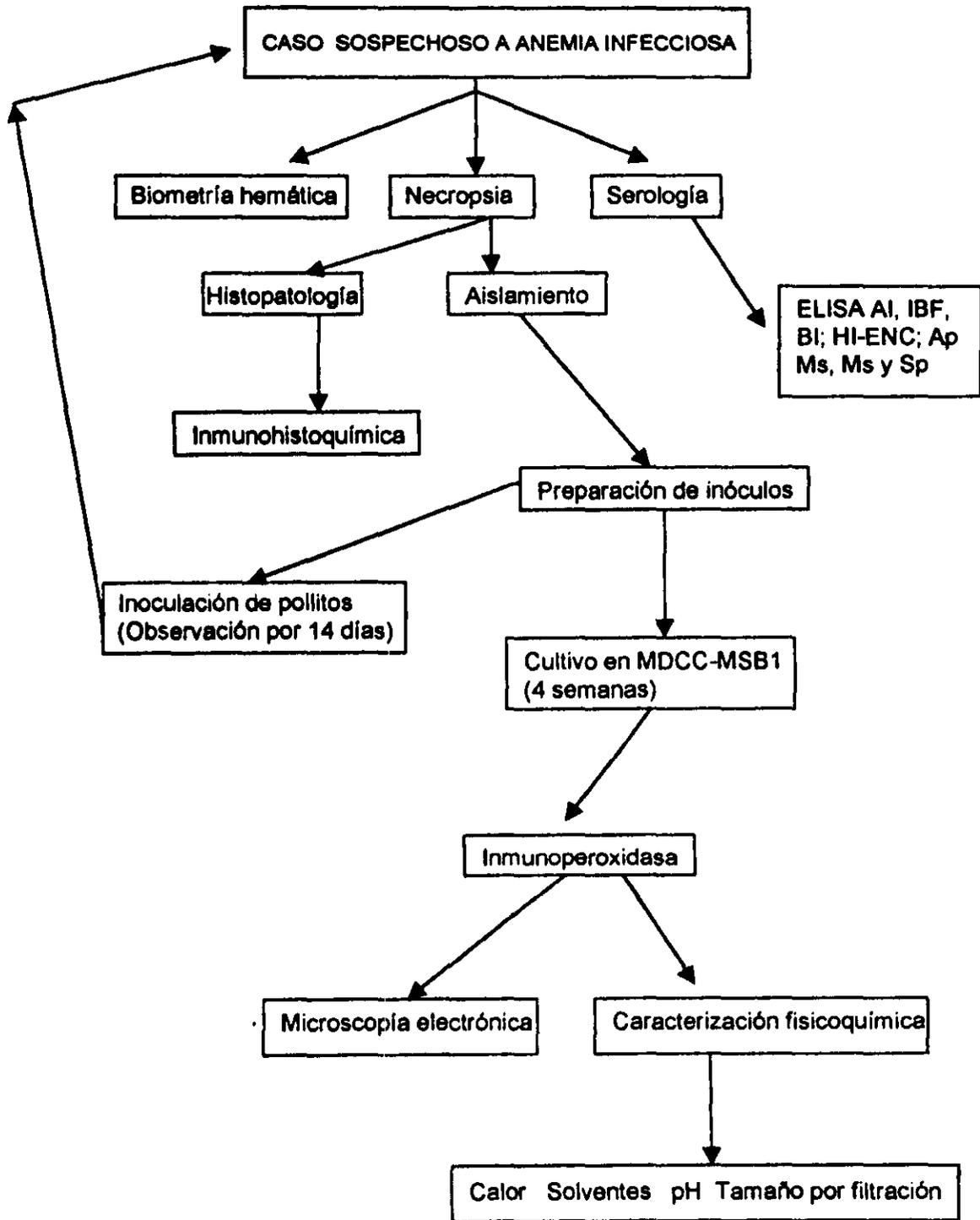




Figura 2. - Hipoplasia de la bolsa de Fabricio. Caso 1. 150X H&E.



Figura 3. - Cuerpos de inclusión intranucleares en médula ósea. Caso 10. 1500X H&E.

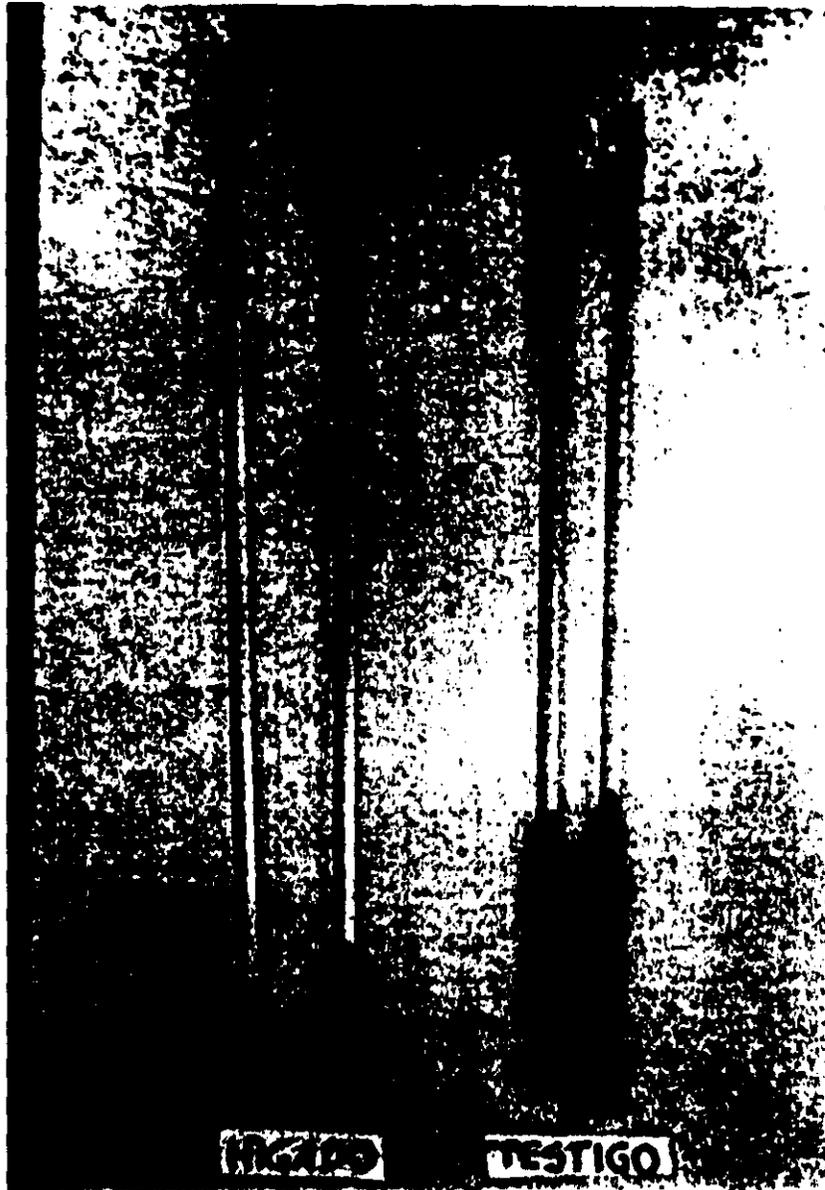


Figura 4.- Hematocrito de los pollos en la inoculación del caso 1.



Figura 5.- Aspecto de los pollos en la inoculación del caso 1



Figura 6 - Médula ósea de los pollos en la inoculación del caso 1



Figura 5.- Aspecto de los pollos en la inoculación del caso 1



Figura 6 - Médula ósea de los pollos en la inoculación del caso 1



Figura 7. - Atrofia severa de timo en la inoculación del caso 10 60X H&E

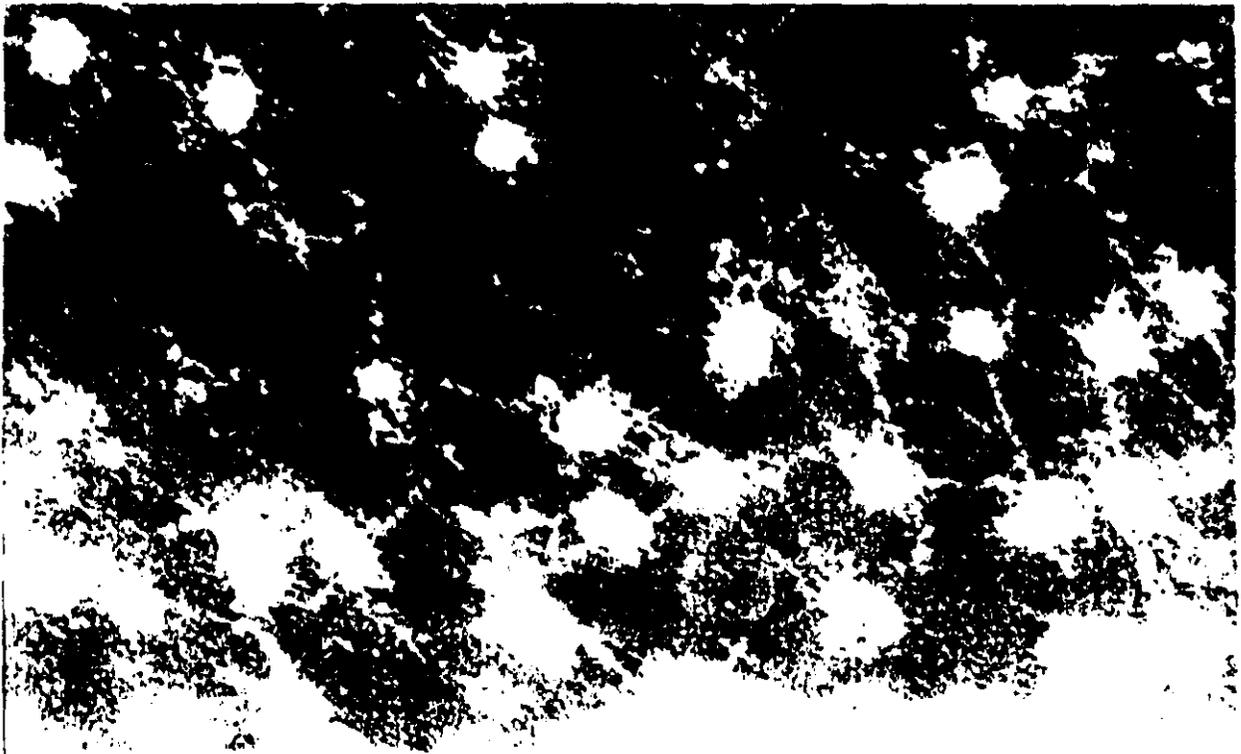


Figura 8 - Microscopia electrónica del virus del caso 1 31 000X Tinción con acetato de uranilo