



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

ESTUDIO DE PATOGENICIDAD DE TRES AISLAMIENTOS
MEXICANOS DEL VIRUS DE ANEMIA INFECCIOSA DEL POLLO
TITULADOS MEDIANTE DIFERENTES METODOS

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

MONICA MARIA ANDRADE MARTINEZ

TUTOR:

DR. TAMAS FEHERVARI BONE

COMITE TUTORAL:

**DR. VICTOR TENORIO GUTIERREZ
DR. JUAN ANTONIO MONTAÑO HIROSE**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**ESTUDIO DE PATOGENICIDAD DE TRES AISLAMIENTOS
MEXICANOS DEL VIRUS DE ANEMIA INFECCIOSA DEL POLLO
TITULADOS MEDIANTE DIFERENTES MÉTODOS**

Tesis presentada ante la
División de Estudios de Posgrado e Investigación

de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la
Universidad Nacional Autónoma de México

Para la obtención del grado

Maestro en Ciencias

por
Mónica María Andrade Martínez

Asesor

Dr. Tamas Fehervari

México, D.F.

2004

Nada ocurre que antes
no haya sido un sueño...

Carl Sandburg

Algunos hombres ven las cosas
como son y se preguntan por qué?
Otros sueñan con cosas que nunca
fueron y se preguntan por qué no?...

George Bernard Shaw

No vayas donde te lleva el camino.
Ve en cambio a donde no hay
camino y deja un sendero...

Ralph Waldo Emerson

DEDICATORIAS

A mis padres por que aunque no lo diga, el apoyo que me han brindado durante toda mi vida es lo que ha hecho que llegue a ser lo que ahora soy, un mejor ser humano, una mejor persona y una mejor profesionista.

A mis sobrinos (Jessi, Paco y Cas), por que toda su vida han visto que he tratado de superarme día con día y que solo superándose se puede llegar a ser mejor. Espero ser un buen ejemplo para ellos.

A dos pequeños seres que un día llegaran a iluminar mi vida, por quién he hecho todo durante mi vida profesional para poder darles lo mejor, por ellos que he tenido a bien o a mal tomar decisiones tratando de ser mejor para ellos. Como un ejemplo de que cada quién es lo que quiere ser y de que en esta vida la mayoría de las cosas las consigues luchando hasta el fin por ellas.

A ti Miguel, por que este trabajo no solo es mío sino tuyo también, por que fue un sueño de dos que por el momento solo uno lo cumplió. Sabes, siempre has creído en mí más de lo que yo misma lo he hecho. No se como agradecerte todo lo que has hecho por mí...

Para ti que dejaste de soñar. Los sueños se alcanzan tarde o temprano, la cuestión es perseverar y luchar hasta el final, no importa el tiempo ni todo lo que se ponga en contra, algún día conseguirás lo que deseas...

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por que de una u otra forma el me guía para poder llegar al final de cada uno de los caminos que ha trazado en mi vida, aunque a veces he tenido que dejar algo para poder lograrlo.

A mis padres, por enseñarme a nunca rendirme, a ver la vida tal como es y sobre todo por enseñarme que lo importante son las personas por si mismas no por lo que puedan llegar a ser profesionalmente.

A mi gran amigo y profesor, Nestor Ledesma. Sin tu ayuda no hubiera podido terminar este trabajo, solamente las personas más allegadas a mi saben lo mucho que me ayudaste, no solo por brindarme tu amistad sino sobre todo por tu paciencia y enseñanzas, realmente eres una persona extraordinaria ya que no todos tienen el don de transmitir lo que saben y tu siempre lo haces . Mil gracias por todo.

A ti que siempre estuviste a mi lado apoyándome y sobre todo por dejar que tomara mis propias alas para llegar más lejos, y por que tal vez al apoyarme tu mismo dejaste de cierta manera de realizar tus propios sueños. Los dos comenzamos este sueño, por fin lo logre, pero en el camino te perdí. Si algo aprendí durante este trabajo fue que no siempre se puede tener todo en la vida. Mil gracias por todo Miguel...

A ti Marcelo, por que al final de un camino que creía perdido siempre me diste animo para no rendirme, para llegar al final pasara lo que pasara. Por que llegaste en un momento en que no esperaba que llegara alguien. Mil Gracias...

A mis amigos, Lilia Castellanos, Mireya Ortiz, Teresa Olivares, José Gonzales, Jorge Alva, Aida Luna, Felipe Nuñez, Daniel Ortega, Christhian Shalaiko, Julieta Ramírez. Gonzalo Salazar, Guadalupe Alvarez que siempre tuvieron una palabra de aliento para que siguiera adelante.

A mi asesor, por tener la paciencia y creer que podía sacar este trabajo. Más vale tarde pero seguro.

Al Dr. Victor Tenorio por toda la paciencia que tuvo siempre con este trabajo, por todas sus enseñanzas y sobre todo por que siempre estuvo dispuesto a ayudarme en lo que fuera posible.

Al Dr. Juan Montaña, Dr. Enrique Aburto y a la Dra. Elizabeth Loza por sus comentarios para que este trabajo saliera mucho mejor.

A todos uds. que fueron mi familia por tanto tiempo, el personal académico, el administrativo, servicio social y estancias del Departamento de Producción Animal: Aves. Si pongo el nombre de cada uno no cabrían. Creo que sobran las palabras por que cada uno saben lo que significan para mí y lo mucho que los aprecio...

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Al proyecto PAPIIT IN204901, sin su apoyo económico no hubiera sido posible este trabajo.

RESUMEN

ANDRADE MARTÍNEZ MÓNICA MA. ESTUDIO DE PATOGENICIDAD DE TRES AISLAMIENTOS MEXICANOS DEL VIRUS DE ANEMIA INFECCIOSA DEL POLLO TITULADOS MEDIANTE DIFERENTES MÉTODOS. Asesorado por Dr. Tamas Fehervari.

Los objetivos del presente estudio fueron comparar varios métodos de titulación viral para tres aislamientos mexicanos del virus de anemia infecciosa del pollo y determinar si la dosis viral administrada en pollos libres de patógenos específicos influye sobre la patogenicidad del virus.

Tres diferentes aislamientos virales obtenidos del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, fueron titulados en cultivo celular, en pollos de 1 día de edad libres de patógenos específicos y por reacción en cadena de la polimerasa. Una vez comparados los tres métodos y ajustados los aislamientos a una dosis de 10^3 DIP₅₀, se procedió a realizar una prueba de patogenicidad en pollos libres de patógenos específicos de 1 día de edad. El aislamiento 01-366 fue el más patógeno de los tres, presentó los signos más evidentes de la enfermedad, tuvo mortalidad y fue el que ocasionó la atrofia de timo más severa. Los resultados del presente estudio confirman que los tres aislamientos del virus de anemia infecciosa del pollo utilizados difieren en patogenicidad, lo cual rechaza la teoría de que las diferencias de patogenicidad encontradas en estudios previos realizados con estos virus, se debían a la dosis utilizada y no a las características propias del virus. Se requieren más estudios para conocer si las diferencias de patogenicidad encontradas con estos virus se deben a diferencias en la estructura de la cápside como sucede con otros virus aviares.

Palabras clave: Anemia infecciosa del pollo, México, titulación, patogenicidad.

SUMMARY

ANDRADE MARTÍNEZ MÓNICA MA. PATHOGENICITY STUDY FROM THREE MEXICAN AISLAMENTS OF CHICKEN ANEMIA VIRUS TITULATED WITH THREE DIFFERENT METHODS.

Under guidance of Dr. Tamas Fehervari.

The objectives of the present study were to compare some methods of titration using three Mexican isolates of chicken anemia virus and determine if the pathogenicity of virus is influenced by the doses when it is administrated in specific pathogen free chickens.

Three different isolates obtained from the virus stock of the Department of Animal Production: Poultry of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootecniqe, National Autonomous University of Mexico, were titrated on cell culture and in one day old specific pathogen free chickens and were also submitted to polymerize chain reaction test. The titration methods were compared and viral isolations adjusted at 10^3 IDP₅₀ were inoculated in specific pathogen free chickens from one day for a probe of pathogenicity . The isolate 01-366 was considered as the most pathogen one because it caused most evident signs and most severe timic atrophy in the chicks, and it resulted even mortality. Results of the present study confirm that the three isolations of chicken anemia virus used differ from each other in pathogenicity, refusing the theory of pathogenic differences found in previously works with these virus must should at doses and not properly characteristics of the virus. More works should be done to know if pathogenic differences found amongst these isolates are related or not to the structural capsid differences like is known with other chicken virus.

Key words: chicken anemia virus, Mexico, titration, pathogenicity.

TABLA DE CONTENIDO

	<u>Página</u>
Dedicatorias	I
Agradecimientos	II
Resumen	III
Summary	IV
Tabla de contenido	V
Lista de cuadros	VI
Lista de figuras	VII
Lista de abreviaturas	VII
Introducción	1
Objetivo general	7
Objetivos particulares	7
Hipótesis	7
Material y métodos	8
Resultados	13
Discusión	16
Conclusiones	20
Literatura citada.	21

LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Signos presentes en aves LPE.....	25
Cuadro 2. Peso de aves LPE	25
Cuadro 3. Hematocrito de aves LPE.....	26
Cuadro 4. Coloración de la médula ósea.....	26
Cuadro 5. Título de anticuerpos	27
Cuadro 6. Atrofia de timo por dilución.....	27
Cuadro 7. Atrofia de timo por aislamiento.....	28
Cuadro 8. Resultados de la prueba de patogenicidad.....	29
Cuadro 9. Resultados de los diferentes métodos de titulación.....	29

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Cultivo de células MDCC-MSB1.....	30
Figura 2. PCR del VAIP aislamiento 01-374.....	31
Figura 3. PCR del VAIP aislamiento 01-353.....	32
Figura 4. PCR del VAIP aislamiento 01-366.....	33
Figura 5. Timos de aves LPE.....	34
Figura 6. Timo normal y con atrofia (histopatología).....	35
Figura 7. Médula ósea de aves LPE.....	36
Figura 8. Médula ósea normal y con atrofia (histopatología).....	37

LISTA DE ABREVIATURAS.

VAIP	Virus de anemia infecciosa del pollo.
LPE	Libre de patógenos específicos.
CC	Cultivos celulares.
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzimas.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
DPA: Aves	Departamento de producción animal: Aves.
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México.
A	01-374.
B	01-353.
C	01-366.
T	Testigo negativo.
DICC₅₀	Dosis media infectiva en cultivo celular.
DIP₅₀	Dosis media infectiva en pollo.
EDTA	Ácido tetra-ácetico etilendiamino.
SDS	Duodecil sulfato de sodio.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
dNTP's	dinucleótidos.
UV	Ultravioleta.
IM	Intramuscular.
HyE	Hematoxilina y Eosina.

INTRODUCCIÓN

La anemia infecciosa del pollo es una enfermedad viral de distribución mundial caracterizada por anemia debida a la atrofia de los tejidos hematopoyéticos e inmunodepresión como consecuencia de la atrofia del timo, de la médula ósea y de la bolsa de Fabricio. El virus de la anemia infecciosa del pollo (VAIP) fue descubierto en 1978 en Japón, a partir de una vacuna contra la enfermedad de Marek contaminada con el virus de la reticuloendoteliosis y el virus de la anemia del pollo.¹ Se le conoce como virus de la anemia infecciosa del pollo, virus de la anemia del pollo, agente de la anemia del pollo y CAA o CAV por sus siglas en inglés (chicken anemia agent o chicken anemia virus, respectivamente). Sólo el pollo es susceptible a la anemia infecciosa en forma natural.^{2,3}

El agente etiológico es un virus desnudo de una sola cadena de ADN de sentido negativo, circular de 2298 a 2319 bases, con varios marcos de lectura abierta que codifican 3 proteínas de 51.6 kDa (VP1), 24 kDa (VP2) y 13.6 kDa (VP3 o apoptina). Presenta un diámetro que varía de 19.1 nm a 25 nm y una densidad en cloruro de cesio de 1.33 a 1.34 g/ml.^{2,3,4,5} Se clasifica dentro de la familia *Circoviridae* género *Gyrovirus*.⁶

Es resistente a los solventes orgánicos como éter, cloroformo y desinfectantes comunes. Resiste el tratamiento con acetona al 90% durante 24 h, así como a pH de 3 durante tres horas. Es inactivado si se expone a soluciones de fenol al 50% durante 5 minutos, en glutaraldehído al 1%, betapropiolactona al 0.4%, formaldehído al 5% y los cultivos celulares infectados a soluciones de yodo o hipoclorito de sodio al 1%.^{2,3,7}

No se han encontrado diferencias antigénicas entre los diferentes aislamientos de varias partes del mundo usando anticuerpos policlonales, por lo que aparentemente sólo existe un serotipo; sin embargo, con anticuerpos monoclonales se han encontrado algunas diferencias.^{2,3,4} También se ha secuenciado el genoma de algunas cepas, encontrándose diferencias entre los aislamientos mediante secuenciación y patrones de restricción en segmentos amplificados por la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la proteína VP1 utilizando diferentes enzimas.^{8,9,10}

Estas diferencias han permitido separar los virus de anemia infecciosa en siete grupos en donde aún entre aislamientos de un mismo país se encuentran diferencias. Por otra parte se ha visto que mientras algunos virus se replican bien en las células MDCC-MSB-1, otros no lo hacen. Se piensa que estas diferencias podrían influir sobre la patogenicidad y virulencia del virus, por lo que la importancia de estas diferencias podría radicar en el uso de las cepas apatógenas como cepas vacunales.^{10,11,12}

La célula blanco del virus de anemia infecciosa del pollo es el linfocito T inmaduro CD4 y/o CD8 en donde el virus penetra a la célula y se multiplica en el núcleo.^{5,13} En condiciones de campo no se conoce el período de incubación. En infecciones experimentales en pollos de 1 día de edad, con inoculación intramuscular del virus hay viremia 24 h después, por lo que el virus puede ser aislado de cerebro, hígado, bazo, bolsa de Fabricio, médula ósea, heces, suero, timo y riñón. A los 7 días se alcanza el título más alto en todos los órganos y los primeros anticuerpos se detectan hasta los 14 días post-inoculación. En pollos inoculados a los 24 o 28 días de edad, se encuentran resultados parecidos a los anteriores, excepto porque el virus desaparece más rápidamente, no se aísla de cerebro ni de suero y los anticuerpos se detectan desde los 7 días.^{2,3,13,14} Se ha observado que aves inoculadas *in ovo* y al día de edad desarrollan una enfermedad más aguda que las aves inoculadas a los 14 o 21 días de edad. La transmisión de forma vertical del virus provoca una enfermedad más severa que la horizontal.^{13,14}

Los primeros signos clínicos generalmente aparecen al final de la segunda semana de vida, se presenta palidez (anemia), disminución en la ganancia de peso, depresión, anorexia y aumento en la mortalidad. El pico de la mortalidad ocurre 5 o 6 días después de que comienzan los signos y disminuye a niveles normales una semana después de que comenzaron las muertes. Se pueden presentar hemorragias en el músculo y en la piel, también lesiones focales principalmente en alas, cabeza, alrededor de la cloaca, a los lados del tórax y abdomen, en muslo, pierna y patas. La morbilidad es variable entre 20-60% y la mortalidad del 5 al 10%.^{2,3,15}

A la necropsia se observa atrofia de timos, médula ósea de color rosa o amarilla, bolsa de Fabricio pequeña y translúcida, palidez y aumento de tamaño del hígado y bazo, y en ocasiones equimosis y petequias en la superficie del corazón y en la mucosa del proventrículo.^{2,3,12,15}

El hematocrito se encuentra por debajo de 27% por lo que se observa anemia aplásica con una severidad variable. Los valores vuelven a la normalidad después de 30 días post-inoculación del virus en ausencia de infecciones secundarias.^{2,3,12}

Histológicamente se aprecia atrofia linfoide más severa en timo que en la bolsa de Fabricio. En la médula ósea hay aplasia y pérdida de las células eritrocíticas y granulocíticas, y en los espacios extravasculares sustitución por tejido adiposo. Existen informes de presencia de cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilicos en células de médula ósea y en linfocitos de timo a los 8 días post-inoculación.^{2,3,12,14,16}

Las lesiones a la necropsia, el hematocrito y la histopatología orientan el diagnóstico, sin embargo, dada la asociación frecuente con otros agentes, se requiere la confirmación final por aislamiento. El aislamiento del virus de anemia infecciosa presenta algunas dificultades, aunque puede multiplicarse en embriones de pollo, no produce lesiones; cuando se realiza en pollos libres de patógenos específicos (LPE) de 1 día de edad, se debe esperar por lo menos 14 días para la reproducción del cuadro clínico y las lesiones características.^{2,3}

Para el aislamiento en cultivo celular (CC) se utiliza la línea celular linfoblastoide MDCC-MSB1 que es constante y consiste en linfocitos de pollo transformados derivados de un tumor de linfocitos T de bazo de la enfermedad de Marek. Las células MDCC-MSB1 se caracterizan por ser linfocitos T cooperadores maduros (CD3+, CD4+, CD8-, TCR2+). El efecto citopático que ocasiona el virus en estas se manifiesta por hinchazón celular, lisis celular, así como conglomeración de células después de por lo menos 10 pases. Considerando que cada pase se realiza cada 48 a 72 horas, el aislamiento del virus por este medio es muy lento, además de que algunas cepas no se adaptan al CC.^{2,11,12,17}

Se puede diagnosticar demostrando la presencia de anticuerpos específicos mediante inmunofluorescencia indirecta (de suero, CC y de cortes histológicos de timo o hígado), neutralización viral o ELISA.^{2,3,15} Otra prueba para el diagnóstico de esta enfermedad es por PCR, que permite la detección del virus mediante la amplificación de un segmento de su ácido nucleico realizando el diagnóstico en un tiempo corto (2 días).^{18,19}

No existe tratamiento contra la anemia infecciosa, por lo que se necesitan incrementar las medidas sanitarias para prevenirla. Se han desarrollado vacunas atenuadas para su aplicación en reproductoras entre las 13 y 15 semanas de edad; de esta manera se asegura que las gallinas no se infecten durante la postura, evitando la transmisión a través del huevo. Estas vacunas nunca deben ser aplicadas en aves en producción por el riesgo de una transmisión vertical.¹⁵ También se han hecho investigaciones con vacunas inactivadas debido a que se ha observado que las atenuadas son inestables, existiendo la posibilidad de que recuperen su virulencia.²⁰ Por otra parte, se están desarrollando vacunas recombinantes a partir de un baculovirus que expresa las proteínas VP-1 y VP-2, ambas necesarias para la inducción de anticuerpos neutralizantes. Se ha demostrado que su aplicación en aves reproductoras induce anticuerpos que protegen a la progenie.²¹

Esta enfermedad es importante, principalmente, por inducir inmunodepresión, lo que predispone a la parvada a infecciones por otros agentes como virus respiratorios, virus inmunodepresores o bacterias y también se ha observado respuesta deficiente a las vacunas.^{13,22} Por otro lado hay pérdidas económicas en los casos de infección subclínica, donde las aves no muestran signos pero existe un bajo rendimiento de la parvada (pobre crecimiento, pollos con diferente peso, mal emplume y pigmentación) por lo que los parámetros productivos se ven afectados, además de los costos por el uso de antibióticos para el control de infecciones bacterianas secundarias. Cuando la enfermedad se presenta en forma clínica ocasiona mortalidad en aves jóvenes sobre todo cuando se asocia a otras enfermedades.^{13,23,24}

El primer reporte de la enfermedad en México fue por Valle y Lucio en 1993.²⁵ Ellos lograron dos aislamientos que comparten características fisicoquímicas y serológicas

descritas para el virus de la anemia infecciosa del pollo y demostraron la presencia de anticuerpos en reproductoras y pollos de engorda en los estados de Querétaro, Puebla, Hidalgo, Veracruz, Estado de México y Morelos.

Ledesma y colaboradores en 1998 lograron el aislamiento del virus a partir de reproductoras semipesadas y pollos de engorda, la repetición del cuadro clínico a partir de las cepas aisladas, así como la demostración del virus por microscopía electrónica e inmunoperoxidasa indirecta.²⁶

En una encuesta serológica realizada por el Laboratorio de Diagnóstico Aviar del Departamento de Producción Animal: Aves (DPA: Aves) en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), resultaron positivas a anemia infecciosa las siguientes entidades de la república: el Distrito Federal, Chiapas, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla y Veracruz. Las aves que presentaron un mayor índice de anticuerpos fueron los pollos de engorda. El hecho de encontrar anticuerpos en estados de la república tan distantes entre ellos como Nuevo León y Chiapas hace suponer que prácticamente todos los estados que tengan avicultura comercial sean positivos a la anemia infecciosa del pollo.²⁶

En estudios realizados en el DPA: Aves se observó un comportamiento diferente entre aislamientos al desafiar aves libres de patógenos específicos. Además en estudios llevados a cabo en asociación con otros virus como el de la enfermedad de Newcastle y de la infección de la bolsa de Fabricio, se observaron diferencias de virulencia.²⁷

Los VAIP aislados en México al ser inoculados en aves susceptibles producen cuadros con diferente severidad lo que sugiere que difieren en su patogenicidad; sin embargo, dado que en estos estudios no se utilizaron dosis virales estandarizadas, es posible que esto pudiera provocar que dosis bajas o altas pudieran haber influenciado en los signos clínicos, la severidad de las lesiones y el tiempo en que éstos se presentaron. El comportamiento de estos virus *in vitro* también indica diferencias entre los aislamientos, ya que mientras algunos aislamientos se multiplican bien en células MDCC-MSB1, otros no infectan estas células.

Como el VAIP es uno de los inmunodepresores más importantes para la industria avícola y los virus aislados en México presentaron diferentes comportamientos tanto *in vitro* como *in vivo*, se requiere que estos virus sean titulados, para que una vez estandarizada la dosis del virus se lleven a cabo pruebas de patogenicidad.

Por otra parte la titulación del virus de anemia infecciosa es un proceso lento ya que se hacen diluciones dobles seriadas del virus, se tienen que propagar en CC, cambiarlas a medio nuevo y como mínimo realizar ocho pases del cultivo para poder obtener el título de infectividad.²⁸ Por esto se requiere desarrollar un método que sea más rápido, económico y confiable.

OBJETIVO GENERAL:

Comparar tres métodos de titulación viral y determinar si la dosis viral administrada del VAIP en pollos LPE influye sobre la presentación de las lesiones.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Obtener la dosis infectante en CC 50% (DICC₅₀) de tres diferentes aislamientos mexicanos mediante la técnica descrita por Goryo en 1987. ⁽¹⁵⁾
- ❖ Obtener la dosis infectante en pollo 50% (DIP₅₀) de los aislamientos en pollos LPE de 1 día de edad.
- ❖ Determinar la dosis infectante de los aislamientos por medio de la prueba de PCR.
- ❖ Comparar los resultados obtenidos en los diferentes métodos de titulación.
- ❖ Realizar una prueba de patogenicidad con estos aislamientos mexicanos de virus titulados.

HIPÓTESIS

La dosis viral inoculada a aves LPE así como las características del virus, influyen en la severidad de las lesiones producidas.

MATERIAL Y MÉTODOS

I.-Virus:

Se obtuvieron tres diferentes aislamientos virales del DPA: Aves de la FMVZ de la UNAM identificados como 01-374 (**A**), 01-353 (**B**) y 01-366 (**C**). El aislamiento **A** se realizó de pollos de engorda de 6 semanas de edad procedentes de Querétaro, el **B** de reproductoras pesadas de 10 semanas de edad de Zumpango, Estado de México y el aislamiento **C** de pollos de engorda de 6 semanas de edad de Xilotepec, Estado de México.

A partir de macerados de hígado y médula ósea, se prepararon suspensiones al 20% en medio McCoy's (GIBCO-BRL41300-070)-Leibovitz (GIBCO-BRL21500-079) que fueron tratados con calor y cloroformo para eliminar virus envueltos.²⁹ Se distribuyeron en alícuotas y fueron almacenados a -80°C hasta su utilización. Se utilizaron cultivos celulares MDCC-MSB1 sembrados a una concentración de 3×10^5 /ml colocados en placas para cultivo celular de 24 pozos de fondo plano. Los cultivos se inocularon con 100 μl de cada suspensión de virus y se incubaron a 40°C en una atmósfera de 5% de CO_2 durante 48 h. Después, se procedió a realizar pases, transfiriendo 100 μl de cultivo inoculado en 1 ml de medio nuevo cada 48 h mínimo ocho veces antes de empezar a ver efecto citopático en los cultivos. Además, se procedió a cotejar el resultado con la prueba de PCR para VAIP.

II.- Titulación del virus en cultivo celular.

1. Se utilizó el método de Goryo¹⁷ con modificaciones. A partir de los inóculos originales al 20%, de cada uno se realizaron diluciones décuples seriadas hasta 10^{-8} .
2. En 48 pozos de una microplaca de 96 pozos de fondo plano (NUNCLON, Delta Intermed Nunc, Dinamarca), se depositaron 200 μl /pozo de una suspensión de células MDCC-MSB1 a una concentración de 5×10^5 células/ml.

3. Se inocularon 5 pozos con 60 μl de cada dilución del virus, 5 pozos con inóculo sin diluir y 3 pozos se dejaron sin inocular (testigo negativo). Se utilizó una microplaca por cada aislamiento del virus y estos se incubaron a 40°C en una atmósfera de 5% de CO_2 durante dos a tres días.
4. Después de este período se transfirieron 60 μl de células en suspensión a pozos nuevos que contenían 200 μl de medio nuevo. El paso anterior se realizó 14 veces utilizando medio nuevo (pases del CC). Después del octavo pase se procedió a la lectura de las placas de CC cada vez que se realizó el pase.
5. Los títulos de infectividad fueron determinados por el color del medio de cultivo. Un pozo con medio de color rojo se tomó como positivo (+), los de color amarillo como negativo (-)*. A la vez que se observó el color del medio, se observó el efecto citopático en un microscopio invertido (Olympus, Tokio, Japón).
6. La evaluación se realizó por medio del método de Reed y Muench³⁰ y el título de infectividad obtenido se expresó como dosis media infectiva en cultivo celular (DICC_{50}).

III.-Titulación en pollos LPE de 1 día de edad.

1. Se hicieron 4 lotes de aves LPE de 1 día de edad identificados como **A**, **B**, **C** y **T**. Los tres primeros lotes conformados con seis grupos de 5 pollos cada uno y el último sólo con 5 pollos. Con cada una de las diluciones utilizadas para la titulación en CC, de cada aislamiento viral se inocularon 200 μl de cada dilución por vía intramuscular (IM) a 5 pollos (desde la dilución 10^{-1} hasta la 10^{-5}), además con el inóculo origen se inocularon 5 pollos y como testigo negativo 5 se dejaron sin inocular (lote **T**).
2. Las aves fueron alojadas en unidades de aislamiento del DPA: Aves de la FMVZ de la UNAM, se les suministro agua y alimento comercial de iniciación a libre acceso.

* Cuando las células crecen, aprovechan los nutrientes del medio secretando metabolitos que provocan que el medio se vuelva más ácido por lo cual se observa de color amarillo; cuando las células no se multiplican o mueren estos nutrientes no se aprovechan, no se producen metabolitos y por lo tanto el medio permanece del mismo color.

3. Las aves se observaron durante 14 días, se registraron los signos (palidez, anorexia, pluma erizada) y la mortalidad.
4. A los 14 días se sacrificaron las aves y se realizó la necropsia para observar las lesiones características que produce el virus (atrofia de timo y de médula ósea), así como evaluar hematocrito, determinar la cantidad de anticuerpos por medio de la prueba de ELISA (SYNBIOTICS Corporation, San Diego California USA.) y el registro del peso de los animales. Se consideró como positivo aquella ave que presentó atrofia de timo (relación corteza-médula) y como negativo aquella ave que no tuvo atrofia.
5. La evaluación se realizó por medio del método de Reed y Muench³⁰ y el título de infectividad se expresó como dosis media infectiva en pollo (DIP₅₀).

IV.- Titulación por medio de PCR.

A) Extracción del ADN.

1. A partir de las mismas diluciones utilizadas en la titulación en CC, se utilizaron 250 µl de cada dilución que fueron tratadas durante 2 horas a 37°C con 200µl de 0.001 M de EDTA-0.01 M de Tris-HCl (pH 8.0) (Tampón TE) con dodecil sulfato de sodio (SDS) (1%) y proteinasa K (1mg/ml).³¹
2. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).³²
3. Se precipitó con etanol frío y después de concentrarlo, fue resuspendido en agua destilada y conservado a -20°C hasta su utilización.

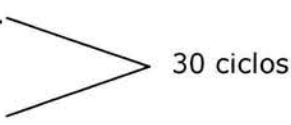
B) PCR.

Se usaron los iniciadores 5'-GAC TGT AAG ATG GCA AGA CGA GCT C-3' (sentido) y 5'-GGC TGA AGG ATC CCT CAT TC-3' (contrasentido) obtenidos de la secuencia de doble cadena replicativa de la cepa de referencia Cux-1³² aislada en Alemania. Estos amplifican un fragmento de 675 pares de bases que codifica el gene para la proteína VP1 (cápside del virus).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Termo Hybaid PCR Express) con 20 μ l de volumen de reacción conteniendo: 3 μ l de muestra de ADN, 1X de Buffer C 10X (Biotecnologías Universitarias), dNTP's mix 2 mM (10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, pH 7.0, Biotecnologías Universitarias), iniciadores 2mM (BQ SS), Taq DNA polimerasa 5 U/ml. (Amplificasa, Biotecnologías Universitarias 500U) y agua destilada.

El programa de amplificación fue:

94° C por 5 minutos desnaturalización inicial.
94° C 1 minuto desnaturalización.
64° C 1 minuto alineación.
72° C por 5 minutos extensión.
72° C por 10 minutos extensión final.



30 ciclos

Posteriormente, los productos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% a 90 voltios durante 1 hora en una cámara de electroforesis (Horizon 58 Life Technologies, USA). El gel fue teñido con bromuro de etidio (1 μ g/ ml) y las bandas de ADN fueron visualizadas en un transiluminador UV (UVP GIBCO-BRL, USA). Se utilizó un marcador de peso molecular de 123pb (GIBCO-BRL, USA). El título se interpretó considerando la última dilución donde se visualizo una banda de ADN.

V.- Prueba de patogenicidad.

Con el inóculo ajustado a una dosis de 10^3 DIP₅₀ de cada aislamiento utilizado, fueron inoculadas 10 aves LPE de 1 día de edad por vía IM por aislamiento, como testigo negativo se dejaron 10 pollos sin inocular. Los pollos inoculados y sin inocular fueron alojados en unidades de aislamiento separadas y se les suministró agua y alimento comercial de iniciación a libre acceso.

Los pollos se observaron durante 14 días, se registró la presencia de signos y muertes. Al terminar este período se pesaron las aves y fueron tomadas muestras de sangre para realizar el hematocrito así como para determinar anticuerpos mediante la prueba ELISA. A la necropsia se evaluó el tamaño de los timos con un vernier, y se observó el aspecto (coloración) de la médula ósea. Después se tomaron muestras de estos mismos órganos los cuales se fijaron en formalina tamponada al 10%. Posteriormente

fue llevado a cabo el proceso de inclusión en parafina, se realizaron los cortes y fueron teñidos con H y E para realizar el estudio histopatológico, durante el cual se evaluó el tamaño de la corteza y de la médula de los timos. Estos fueron medidos con el objetivo 10X (microscopio óptico Olympus, Tokio, Japón) y una retícula ocular. La atrofia de la médula ósea se evaluó asignando un valor numérico a la lesión presente, normal = 0 cuando el órgano no se encuentra afectado, leve = 1 cuando el órgano presentaba menos del 20% de aplasia y depresión de las células eritrocíticas y granulocíticas además de sustitución por tejido adiposo en los espacios extravasculares, y presencia de acúmulos linfoides en el órgano, moderado = 2 cuando el órgano presentaba de 20 a 40%; y severo = 3 cuando se presentaban en más del 50% del órgano.

VI.- Análisis estadístico de los resultados.

Los pesos, el hematocrito, la ELISA, el tamaño de los timos y la relación corteza médula fueron comparados mediante análisis de varianza con significancia $p < 0.05$ y la proporción de la atrofia de médula ósea mediante Kruskal-Wallis con significancia $p < 0.05$, utilizando el paquete de diseños experimentales, versión 2.5 de la Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León.

RESULTADOS

1.-Titulación en cultivo celular:

En el inóculo **A** se obtuvo un título de $10^{2.7}$ DICC₅₀, en el **B** de $10^{1.5}$ DICC₅₀ y en el **C** fue de $10^{4.3}$ DICC₅₀. (Figura 1)

2.-Titulación en pollos LPE de 1 día de edad.

Se presentaron signos (palidez y anorexia) en las aves inoculadas con las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} del grupo **C**, en el caso del grupo **A** y **B** se observó en menor grado sólo en las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} . (Cuadro 1)

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el grupo testigo y los grupos inoculados con las diferentes diluciones de los aislamientos en el peso y hematocrito de las aves. Se encontró peso menor a 68 g en el grupo **A** en el origen (52.5 g) y la primera dilución (51.6g), y en el grupo **C** en la primera dilución (58.3 g) (Cuadro 2). El grupo **C** presentó hematocrito menor a 37% en las 3 primeras diluciones, mientras que en los otros 2 grupos inoculados sólo se observó en la primera dilución siendo este no tan severo como el del grupo **C**. (Cuadro 3)

A la necropsia se observaron médulas óseas amarillas en las 3 primeras diluciones del grupo **C**, seguido por el grupo **A** que se observó en las tres primeras diluciones mientras que en el grupo **B** sólo se presentó en la primera dilución. (Cuadro 4) Con la prueba ELISA (Cuadro 5) se encontró anticuerpos contra el VAIP en el inóculo **A** en el origen y la primera dilución, en el **C** desde el origen hasta la dilución 10^{-3} y en el grupo **B** y testigos no se encontraron anticuerpos.

En el examen histológico se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en atrofia de timo (relación corteza-médula) entre las diferentes diluciones de los grupos. En la dilución 10^{-1} y 10^{-2} **todos** los grupos fueron diferentes al grupo testigo, en la 10^{-3} los grupos **A** (5.4 mm) y **C** (3.5 mm) presentaron mayor atrofia que el **B** (1.15 cm). En la dilución 10^{-4} el grupo **A** (8.5 mm) y **C** (3.7 mm) fueron diferentes

al grupo testigo y en la 10^{-5} sólo el grupo **C** (7.8 mm) fue diferente al grupo testigo. Los resultados se resumen en el cuadro 6.

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la atrofia de timo (relación corteza-médula) entre los grupos inoculados, el grupo **A** presentó una atrofia moderada comparada con el grupo **C** que presentó la atrofia más severa, el grupo **B** presentó la atrofia más leve de los 3 grupos inoculados. (Cuadro 7)

Basándose en los signos (Cuadro 1), los valores promedio del hematocrito (Cuadro 3), las lesiones histológicas encontradas en el timo (Cuadro 6 y 7) y el aspecto de la médula ósea a la necropsia (Cuadro 4), se obtuvo en el grupo **A** un título de $10^{3.3}$ DIP_{50'} en el **B** de $10^{3.1}$ DIP₅₀ y en el **C** de $10^{5.5}$ DIP₅₀.

III.- Titulación por medio de PCR.

En el inóculo **A** se observaron bandas de ADN hasta la dilución 10^{-3} (Figura 2), en el inóculo **B** hasta la dilución 10^{-2} (Figura 3) y en el inóculo **C** hasta la dilución 10^{-5} . (Figura 4).

IV:- Prueba de Patogenicidad.

El inóculo **C** presentó los signos más evidentes de la enfermedad (anorexia y palidez) en el 90% de las aves inoculadas e incluso causó muertes (Cuadro 7), en comparación con los otros 2 grupos inoculados. En la prueba ELISA, se encontraron anticuerpos contra el VAIP en los grupos **A** y **C**, en el grupo **B** y en los testigos no se encontraron anticuerpos. Por lo que respecta a la coloración de la médula ósea se encontró médula ósea pálida en los 3 grupos inoculados. (Figura 5)

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el grupo testigo y los grupos inoculados en el peso, donde el grupo **C** tuvo el menor peso de todos (92 g comparado con los demás que fluctuó entre 100 y 114 g.) En el hematocrito hubo diferencias entre el grupo **T** y los tres grupos inoculados siendo el grupo **A** quién presenta el más bajo de todos (20.6%.) En el tamaño de timo los grupos **A** y **C** presentaron el tamaño más pequeño (1.2 y 1.1 mm en promedio

respectivamente, Figura 6). En la atrofia de timo los grupos **B** y **C** presentaron la atrofia más severa (0.017 y 0.012 respectivamente) (Figura 7), y por lo que respecta a la coloración en la médula ósea el grupo **C** presentó las médulas más amarillas en comparación con los otros grupos (Figura 8), y microscópicamente el grupo **B** presentó la atrofia más severa en relación a los otros dos grupos inoculados cuya atrofia fue moderada.(Cuadro 8, Figura 9)

DISCUSIÓN.

Este es el primer trabajo en México que compara la titulación del VAIP por diferentes métodos. Los resultados obtenidos en la titulación en CC en el presente estudio muestran que es un proceso lento debido a que el título se obtuvo hasta el pase número 14, en comparación con la inoculación en aves LPE y con la prueba de PCR, en donde el título se obtuvo en un tiempo menor.

Por otra parte Coombes y col.³³ así como Calnek y col.³⁴ señalan que a pesar de que las células MDCC-MSB1 son el sustrato preferido para infecciones *in vitro* para muchas cepas del VAIP, algunas cepas de este virus no infectan a estas células, y otras lo hacen de forma escasa. Además Coombes y col.³³ y Todd y col.³⁵ señalan que el número de pases en el que se encuentra la línea celular afecta el crecimiento del virus, ya que se ha observado que cuando las células tienen un número de pases mayor, el crecimiento de estas es menor e incluso comienzan a morir sin razón aparente. Por estos motivos, este método no es muy conveniente para titular el VAIP.

En trabajos realizados anteriormente^{28,36,37} el VAIP se adapta al CC antes de comenzar la titulación, mientras que en el presente estudio los aislamientos virales se utilizaron sin un pase previo. Por otra parte algunos estudios^{14,17,28,37} titulan el virus con el método de Yuasa,³⁶ que fundamenta la titulación sólo en el cambio de color del medio; el presente trabajo se basa además en la observación del efecto citopático. En este estudio comenzó a verse cambio en el color del medio y efecto citopático en el inóculo **C** desde el 6to pase, a diferencia de lo encontrado por McNulty y col.²⁸, Yuasa e Imai³⁷ y Todd y col.³⁸ que realizaron pases previos a los virus y vieron cambio en el color del medio en la dilución más alta a partir del noveno.

Este trabajo es el primero que titula el VAIP en Aves LPE de 1 día de edad. No se encontró ningún trabajo previo en donde se titule con aves, este método es conveniente debido a que los pollos son el huésped natural del virus, pero es costoso

por que las aves tienen que ser libres de anticuerpos contra VAIP, además de contar con instalaciones especiales para mantenerlos.

En el presente estudio se observó que a mayor dilución del virus, los signos y las lesiones ocasionadas fueron menores, lo cual concuerda con lo encontrado por Rosenberger¹⁴ pero difiere con lo encontrado por Yuasa³⁷, esto probablemente se debe a que Yuasa utilizó el sobrenadante del virus adaptado a cultivo celular y no diluciones del inóculo. Se observó que los diferentes aislamientos inoculados a la misma dilución causaron diferente grado de anemia, de atrofia de timo (relación corteza-médula) y de atrofia de médula ósea.

El aislamiento **C** resultó el más virulento debido a que los signos y las lesiones se presentaron aún en las diluciones mayores del virus, incluso este aislamiento causó muertes a diferencia de los otros. Se encontró sólo en la primer dilución, menor peso en las aves inoculadas con los diferentes aislamientos del VAIP, lo cual concuerda con McIlroy³⁹ y Lamichhane⁴⁰ quienes mencionan cierto grado de variación en el peso de las aves infectadas con el VAIP en relación con las aves que no están infectadas.

También se observó que no todos los virus desarrollaron una buena respuesta de anticuerpos como fue el caso del aislamiento **B**, a pesar de que el virus estaba presente por PCR y por las lesiones encontradas en las aves, este no fue un buen inmunógeno para inducir anticuerpos que fueran detectados mediante la prueba ELISA, aunque Michalski⁴¹ señala que esta prueba no detecta anticuerpos entre las 2 y 3 semanas posteriores a la infección.

Al realizar la comparación de la titulación en CC con la de pollos LPE de 1 día de edad, se observa que es más sensible en pollos debido a que las aves son el huésped natural del virus, en cambio en la titulación en CC el virus se tiene que adaptar a las células para poder infectarlas. La prueba de PCR es específica y más rápida,^(18,19) cualquier aislamiento del VAIP se puede titular aunque no se multiplique en CC y no se requieren animales susceptibles, lo que lo hace más confiable.

En el presente estudio comparando los 3 métodos de titulación, los resultados obtenidos sugieren que los títulos que se acercan más entre sí, fueron el obtenido con la titulación en pollos LPE y el método molecular. La importancia de encontrar un método de titulación rápido y sencillo para este virus radica en que actualmente se realiza en CC, como este es un método lento ocasiona que las investigaciones de campo o en la elaboración de vacunas tarden más tiempo, considerando que el tiempo de producción de las aves es muy rápido no resulta conveniente utilizar este método, por otra parte si se encontrara alguna cepa apatógena o con muy baja patogenicidad que no crezca en CC, no podría titularse por este método.

Este trabajo es el primero en México que evalúa el grado de patogenicidad de algunos aislamientos del VAIP, aunque previamente los aislamientos utilizados mostraron diferencias de patogenicidad²⁷ no utilizaron dosis estandarizadas del virus, mientras que en este estudio al ser inoculadas con la misma dosis y bajo las mismas condiciones, se encontraron diferencias en la patogenicidad de estos aislamientos lo cual difiere con lo encontrado por McNulty y col.²⁸ y Todd y col.³⁷ Las diferencias de patogenicidad encontradas por estos autores pudieran deberse a que utilizaron el sobrenadante del virus adaptado a CC para inocular las aves y no un macerado. Además estos trabajos sólo basaron el grado de patogenicidad en la capacidad del virus de producir anemia y como se menciona en estudios posteriores, no todos los virus tienen la capacidad de producir anemia, pero sí atrofia de timo.^{5,13}

Por otra parte, al utilizar virus adaptados a CC y al tener éstos características de linfocitos T maduros, es posible que los virus sean menos capaces de replicarse en células precursoras eritroblastoides, por esto causan anemia en menor grado.³⁵ En otros estudios donde se evalúa la patogenicidad de algunas cepas, aunque no se compararon con otras se menciona que la patogenicidad de la cepa es dosis dependiente, además de depender de la susceptibilidad y del estado inmunológico del ave así como de la vía de inoculación del virus.^{14,38,41,42}

El criterio utilizado en este trabajo para evaluar el grado de patogenicidad no sólo fue la capacidad del virus de producir anemia, sino también mediciones macroscópicas y microscópicas de timo para determinar la atrofia del mismo, así como la evaluación de la atrofia de médula ósea macro y microscópicamente, a diferencia de otros trabajos que asignaron un valor numérico a las lesiones microscópicas encontradas.^{38,41,42}

Con los resultados obtenidos en la prueba de patogenicidad, se puede inferir que el aislamiento **C** fue el más patógeno debido a que produjo el mayor porcentaje de signos, causó muertes y aunque no causó el menor hematocrito, sí presentó la atrofia de timo más severa de los 3 aislamientos.

El hecho de encontrar diferencias de patogenicidad entre los aislamientos explica las diferencias de virulencia encontradas en estudios previos con estos mismos aislamientos.

CONCLUSIONES.

- Aunque la titulación en pollos es el mejor método debido a que todos los VAIP ocasionan lesiones, es costoso porque se necesita que las aves utilizadas sean libres de anticuerpos contra el VAIP, además de contar con instalaciones especiales para mantenerlos.
- La titulación en cultivo celular para el VAIP es un buen método si a la vez de evaluar el cambio en el color del medio se observa el efecto citopático que ocasiona el virus, funciona sólo para aquellos virus que se replican en estos cultivos ya que no todos los virus lo hacen en células MDCC-MSB1, por otra parte es un proceso lento debido a que el virus se tiene que adaptar a las células.
- El PCR permite una titulación más rápida, específica y sensible ya que detecta el ADN del virus aun en concentraciones bajas. Este método es efectivo, más simple y fácil de desarrollar si se cuenta con el equipo necesario para hacer PCR.
- Es importante titular un VAIP cuando se inocula en aves susceptibles para repetir el cuadro de la enfermedad, ya que la cantidad de virus a inocular influye en la presencia de signos y lesiones que presenten los animales.
- Los resultados del presente estudio confirman que los 3 aislamientos del VAIP utilizados difieren en patogenicidad, lo cual confirma la hipótesis de que se debían a la dosis utilizada y a las características propias del virus. Se requieren más estudios para conocer si las diferencias de patogenicidad encontradas en estos virus se deben a diferencias en la estructura de la cápside como sucede con otros virus aviares.

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. McNulty MS. Chicken anemia agent: a review. *Avian Pathol* 1991; 20:187-203.
3. Pope RC. Chicken anemia agent. *Vet Immun & Immun* 1991; 30: 51-65.
4. Chandratilleke D, O'Connell P and Schat AK. Characterization of proteins of chicken infectious anemia virus with monoclonal antibodies. *Avian Dis* 1991; 35:854-862.
5. Noteborn MHM and Koch G. Chicken anemia virus infection: molecular basis of pathogenicity. *Avian Pathol* 1995; 24:11-31.
6. Pringle CR. Virus Taxonomy at the Xith International Congress of Virology, Sydney, Australia 1999. *Arch Virol* 1999; 144: 2065-2070.
7. Yuasa N. Effect of chemicals on the infectivity of chicken anemia virus. *Avian Pathol* 1992; 21: 315-319.
8. Renshaw RW, Soine C, Weinkle T, O'Connell PH, Ohashi K, Watson S, Lucio B, Harrington and Schat KA. A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. *Jour Vir* 1996; 70: 8872-8878.
9. Todd D, Creelan JL, Mackie DP, Rixon F and McNulty S. Purification and biochemical characterization of chicken anemia agent. *Jour Gen Virol* 1990; 71: 819-823.
10. Kato A, Fujino M, Nakamura T, Ishihama A and Otaki Y. Gene organization of chicken anemia virus. *Viro* 1995; 209:480-488.
11. Scott ANJ, Connor TJ, Creelan JL. McNulty and Todd D. Antigenicity and pathogenicity characteristics of molecularly cloned chicken anemia virus isolates obtained after multiple cell cultures passages. *Arch Virol* 1999; 144: 1961-1975.
12. McNulty MS. Chicken anaemia virus- a glimpse of the future. *Brit Poult Scien* 1997; 38: 7-13.
13. Adair BM. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Devel & Comp Immun* 2000; 24:547-255.
14. Rosenberger JK and Cloud S. The effects of age, route of exposure, and co-infection with infectious bursal disease virus on the pathogenicity and transmissibility of chicken anemia agent (CAA). *Avian Dis* 1989; 33: 753-759.
15. Rosales G. Update: Infectious Chicken Anemia. *Broi & Breed Health*. 1996.

16. Goryo M, Suwa T, Umemura T, Itakura C and Yamachiro S. Histopathology of chicks inoculated with chicken anemia agent (MSB1-TK5803 strain). *Avian Pathol* 1989; 18: 73-89.
17. Goryo M, Suwa T, Matsumoto S, Umemura T and Itakura C. Serial propagation and purification of chicken anemia agent in MDCC-MSB1 cell line. *Avian Pathol* 1987; 16: 149-163.
18. Noteborn MHM, Verschueren CAJ, Van Roozelaar DJ, Veldkamp S, Van der Eb AJ and De Boer GF. Detection of chicken anemia virus by DNA hybridization and polymerase chain reaction. *Avian Pathol* 1992; 21: 107-118.
19. Tham KM and Stanislawek WL. Polymerase chain reaction amplification for direct detection of chicken anemia virus DNA in tissues and sera. *Avian Dis* 1992; 36:1000-1006.
20. Pages-Monte A, Saub N, Artigas C and Espuña E. Experimental evaluation of inactivated vaccine against chicken anemia virus. *Avian Pathol* 1997; 26:721-729.
21. Noteborn MH, Verschueren CA, Koch G and Van der Eb AJ. Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope. *Jour Gen Vir* 1998; 79: 3073-3077.
22. McConell CDG, Adair BM and McNulty MS. Effects of chicken anemia virus on cell-mediated immune function in chickens exposed to the virus by a natural route. *Avian Dis* 1993; 37: 366-374.
23. 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.
24. Hagood LT, Kelly TF, Wright JC and Hoerr FJ. Evaluation of Chicken infectious anemia virus and associated risk factors with disease and production losses in broilers. *Avian Dis* 2000 44: 803-808.
25. 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 Anual ANECA*; 1993 mayo 5-9; Cancún QuintanaRoo, México D.F. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 1993:328-335.
26. Ledesma N, Fehervari T, Casaubon MT, Lucio E and Ratz F. Chicken infectious anemia in México: virus identification and serology survey. *Avian Dis* 2001; 45: 788-796.

27. Ledesma MN, Fehervari T, Casaubon HMT y Lucio DE. Efecto del virus de anemia infecciosa del pollo aislado en México sobre la vacunación y desafío con virus de enfermedad de Newcastle e infección de la bolsa de Fabricio. Memorias de la XXIV Convención Anual ANECA; 1999 mayo 5-8; León Guanajuato, México D.F. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 1999:177-182.
28. McNulty MS, Connor TJ and McNeilly F. Influence of dose on experimental anemia due to chicken anemia agent. *Avian Pathol* 1990; 19: 167-171.
29. Roovozzo GC and Burke CN. A manual of basic virological techniques. New Jersey Practice-Hall Inc. 1973.
30. Woolcock RP, Wyeth JP, Yamamoto R and Yoder WH Jr. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. USA 226pp.
31. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. 1982. Cold Spring Harbor laboratory. 545 pp.
32. Todd D, Mawhinney KA and McNulty MS. Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1661-1666.
33. Coombes AL and Crawford GR. Recommended storage and resuscitation conditions for the MDCC.MSB1 cell line. *Avian Dis* 1998; 42: 168-172.
34. Calnek BW, Lucio-Martínez B, Cardona C, Harris RW, Schat KA, and Buscaglia C. Comparative susceptibility of Marek's Disease Cell Lines to Chicken Infectious Anemia Virus. *Avian Dis* 2000; 44: 114-124.
35. Todd D, Connor TJ, Creelan JL, Borghmans BJ, Calvert VM, and McNulty MS. Effect of multiple cell culture passages on the biological behavior of chicken anemia virus. *Avian Pathol* 1998; 27: 74-79.
36. Yuasa N. Propagation and infectivity titration of the Gifu-1 strain of chicken anemia agent in a cell line (MDDC-MSB1) derived from Marek's disease lymphoma. *Natl Inst Anim Health Q (Jpn)* 1983; 23: 13-20.
37. Yuasa N and Imai K. Pathogenicity and antigenicity of eleven isolates of chicken anemia agent (CAA). *Avian Pathol* 1986; 15: 639-645.
38. Todd D, Connor TJ, Calvert VM, Creelan JL, Meehan BM and McNulty MS. Molecular cloning of an attenuated chicken anemia virus isolate following repeated cell culture passage. *Avian Pathol* 1995; 24: 171-187

39. McIlroy SG, McNulty MS, Bruce DW, Smyth JA, Goodal EA, and Alcorn MJ. Economic Effects of clinical chicken anemia agent infection on profitable broiler production. *Avian Dis* 1992; 36:566-574.
40. Lamichhane CM, Snyder DB, Goodwin MA, Mengel SA, Brown J and Dickson TG. Pathogenicity of CL'1 chicken anemia agent. *Avian Dis* 1991; 35: 515-522.
41. Michalski WP, O'Rourke D and Bagust TJ. Chicken anaemia virus antibody ELISA: problems with non-specific reactions. *Avian Pathol* 1996; 25: 245-254.
42. Toro H, Ramirez AM, and Larenas J. Pathogenicity of chicken anemia virus (isolate 10343) for young and older chickens. *Avian Pathol* 1997; 26: 485-499.

Cuadro 1.

Signos observados en pollos LPE, inoculados con diferentes diluciones de tres aislamientos del VAIP.

Diluciones	Palidez %				Anorexia %				Mortalidad %			
	A	B	C	T	A	B	C	T	A	B	C	T
Origen	50	50	--	0	50	50	--	0	0	0	--	0
10 ⁻¹	40	20	100		20	20	100	-	0	0	40	
10 ⁻²	40	0	100		0	0	100		0	0	20	
10 ⁻³	0	0	40		0	0	60		0	0	0	
10 ⁻⁴	0	0	0		0	0	0		0	0	0	
10 ⁻⁵	--	--	0		--	--	0		0	0	0	

-- No se trabajo.

Cuadro 2.

Peso promedio (g) de pollos LPE, inoculados con diferentes diluciones de 3 aislamientos del VAIP.

Dilución	A	B	C	T
Origen	52.5 ^d	66.25 ^b	--	68 ^a
10⁻¹	51.6 ^d	62.5 ^c	58.3 ^c	
10⁻²	70 ^a	65 ^b	68.7 ^a	
10⁻³	63.3 ^b	58.75 ^c	64 ^b	
10⁻⁴	63.3 ^b	65 ^b	78 ^a	
10⁻⁵			78 ^a	

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

-- No se trabajo

Cuadro 3.

Hematocrito promedio (%) de pollos LPE, inoculados con diferentes diluciones de 3 aislamientos del VAIP.

Dilución	A	B	C	T
Origen	29.6 ^c	38.5 ^a	--	40.0 ^a
10 ⁻¹	30.3 ^c	35.0 ^b	22.0 ^d	
10 ⁻²	37.0 ^b	40.0 ^a	26.7 ^d	
10 ⁻³	37.2 ^b	40.3 ^a	30.8 ^c	
10 ⁻⁴	37.0 ^b	39.5 ^a	37.0 ^b	
10 ⁻⁵	41.0 ^a	43.7 ^a	42.6 ^a	

* Valor normal del hematocrito 35-55%

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

-- No se trabajó.

Cuadro 4.

Coloración de la médula ósea de pollos LPE, inoculados con diferentes diluciones de 3 aislamientos del VAIP.

Dilución	<i>SIN CAMBIO%</i>				<i>PÁLIDA%</i>				<i>AMARILLA%</i>			
	A	B	C	T	A	B	C	T	A	B	C	T
Origen	0	40	--	100	20	20	--	0	80	40	--	0
10⁻¹	0	20	0		20	20	0		80	60	100	
10⁻²	20	40	0		20	40	20		60	20	80	
10⁻³	20	80	20		20	0	20		60	20	60	
10⁻⁴	80	100	60		20	0	40		0	0	0	
10⁻⁵	--	--	80		--	--	20		--	--	0	

-- No se trabajó.

Cuadro 5.

Promedio de anticuerpos detectados por medio de la prueba ELISA, en pollos LPE inoculados con diferentes diluciones de 3 aislamientos del VAIP.

Dilución	A	B	C	T
Origen	1949	0	4697	0
10⁻¹	1747	0	13152	
10⁻²	0	0	2332	
10⁻³	0	0	1575	
10⁻⁴	0	0	0	
10⁻⁵	0	0	0	

Cuadro 6.

Atrofia de Timo (relación corteza-médula) por dilución, de pollos LPE inoculados con diferentes diluciones de 3 aislamientos del VAIP.

Dilución	A	B	C	T
Origen	0.15:1 ^c	0.49:1 ^b	--	1.79:1 ^a
10 ⁻¹	0.21:1 ^c	0.65:1 ^b	0.05:1 ^d	1.79:1 ^a
10 ⁻²	0.48:1 ^c	0.97:1 ^b	0.11:1 ^d	1.79:1 ^a
10 ⁻³	0.54:1 ^c	1.15:1 ^b	0.35:1 ^c	1.79:1 ^a
10 ⁻⁴	0.85:1 ^b	1.43:1 ^a	0.37:1 ^c	1.79:1 ^a
10 ⁻⁵	1.48:1 ^a	1.57:1 ^a	0.78:1 ^b	1.79:1 ^a

Literales diferentes dentro de la misma fila indican diferencia estadísticamente significativa P (<0.05%) entre los grupos.

-- No se trabajó.

Cuadro 7.

Atrofia de Timo (relación corteza-médula) por aislamiento, de pollos LPE inoculados con diferentes diluciones de 3 aislamientos del VAIP.

Aislamiento	A	B	C	T
Promedio*	0.61:1 ^c	1.04:1 ^b	0.33:1 ^d	1.79:1 ^a

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

*Promedio de las lesiones presentadas con las diferentes diluciones.

Cuadro 8.

Descripción de los resultados obtenidos en la prueba de patogenicidad en pollos LPE inoculados con 3 aislamientos del VAIP con una dosis de 10³(DIP₅₀)

	T	A	B	C
Signos (palidez y anorexia %)	0	30	20	90
Mortalidad (%)	0	0	0	10
Peso (g)	110 ^a	100 ^a	114 ^a	92 ^b
Hematocrito (%)	39.2 ^a	20.6 ^b	21.2 ^b	23 ^b
ELISA (promedio de anticuerpos)	0 ^b	2142 ^a	0 ^b	2257 ^a
Tamaño de timo (mm)	5 ^a	1.2 ^c	2.0 ^b	1.1 ^c
Atrofia de Timo (relación corteza-médula)	1.8:1 ^a	0.13:1 ^b	0.017:1 ^c	0.012:1 ^c
Coloración de la médula ósea.	Normal	Pálida (60%)	Pálida (50%)	Pálida (100%)
Médula ósea (Atrofia)	Normal ^a	Moderada ^b	Severa ^b	Moderada ^b

Literales diferentes dentro de la misma fila indican diferencia estadísticamente significativa P (<0.05%) entre los grupos.

Cuadro 9.

Comparación de los diferentes métodos de titulación utilizados para titular 3 aislamientos mexicanos del VAIP.

Método de Titulación	A	B	C
Cultivo Celular	$10^{2.7}$	$10^{1.5}$	$10^{4.3}$
Pollos LPE	$10^{3.3}$	$10^{3.1}$	$10^{5.5}$
PCR	10^3	10^2	10^5

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

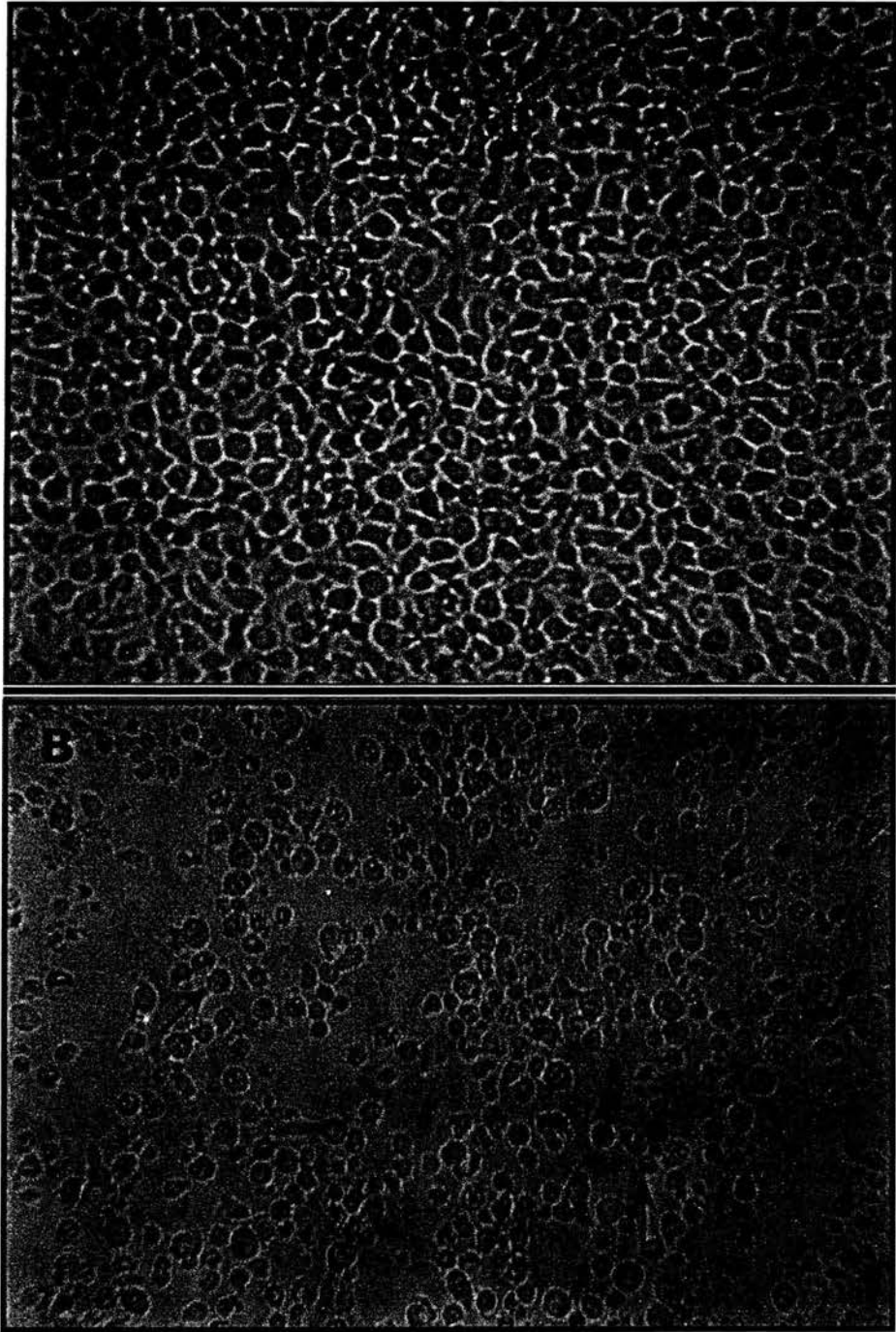


Figura 1: Cultivo de células MDCC-MSB1 **A)** Células sin inocular **B)** Células inoculadas con un aislamiento mexicano del VAIP. → Células con cuerpos apoptóticos.

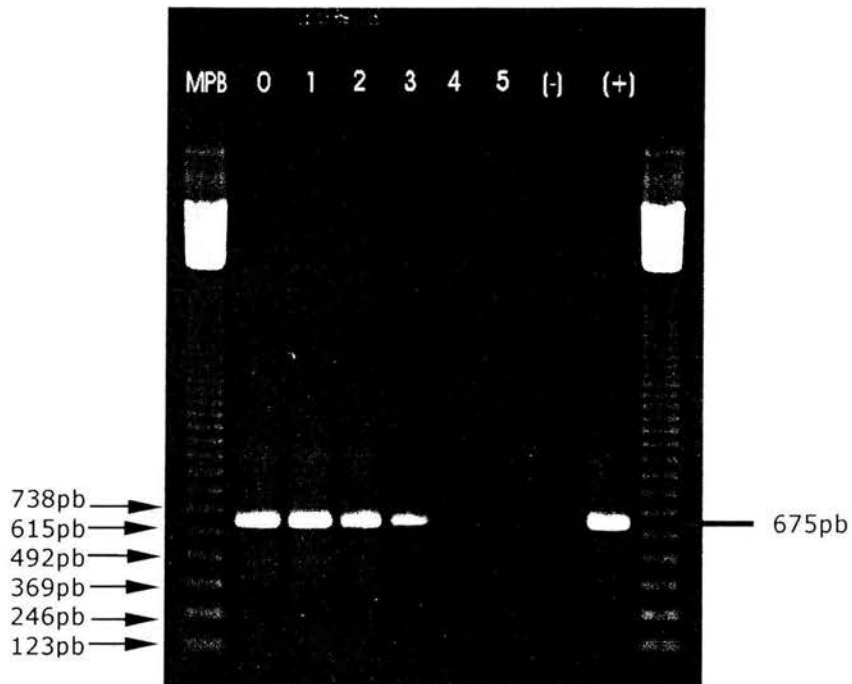


Figura 2: Gel de agarosa al 2% mostrando un fragmento de ADN de diferentes diluciones del aislamiento **A** (01-374) del VAIP, correspondiente al gen que codifica para la cápside. Carril 1:**MPB** Marcador de 123 pares de bases, carril 2:**0** sin diluir, carril 3:**1** dilución 10^{-1} , carril 4:**2** dilución 10^{-2} , carril 5:**3** dilución 10^{-3} , carril 6:**4** dilución 10^{-4} , carril 7:**5** dilución 10^{-5} , carril 8:**(-)** testigo negativo, carril 9:**(+)** testigo positivo, carril 10: **MPB**.

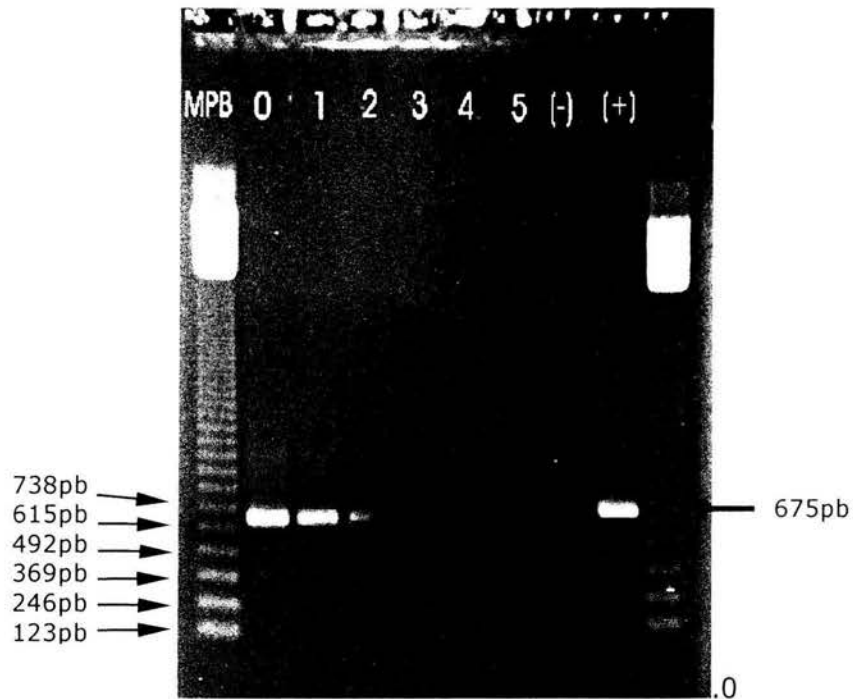


Figura 3: Gel de agarosa al 2% mostrando un fragmento de DNA de diferentes diluciones del aislamiento **B** (01-353) del VAIP, correspondiente al gen que codifica para la cápside. Carril 1:**MPB** Marcador de 123 pares de bases, carril 2:**0** sin diluir, carril 3:**1** dilución 10^{-1} , carril 4:**2** dilución 10^{-2} , carril 5:**3** dilución 10^{-3} , carril 6:**4** dilución 10^{-4} , carril 7:**5** dilución 10^{-5} , carril 8:**(-)** testigo negativo, carril 9:**(+)** testigo positivo, carril 10: **MPB**.

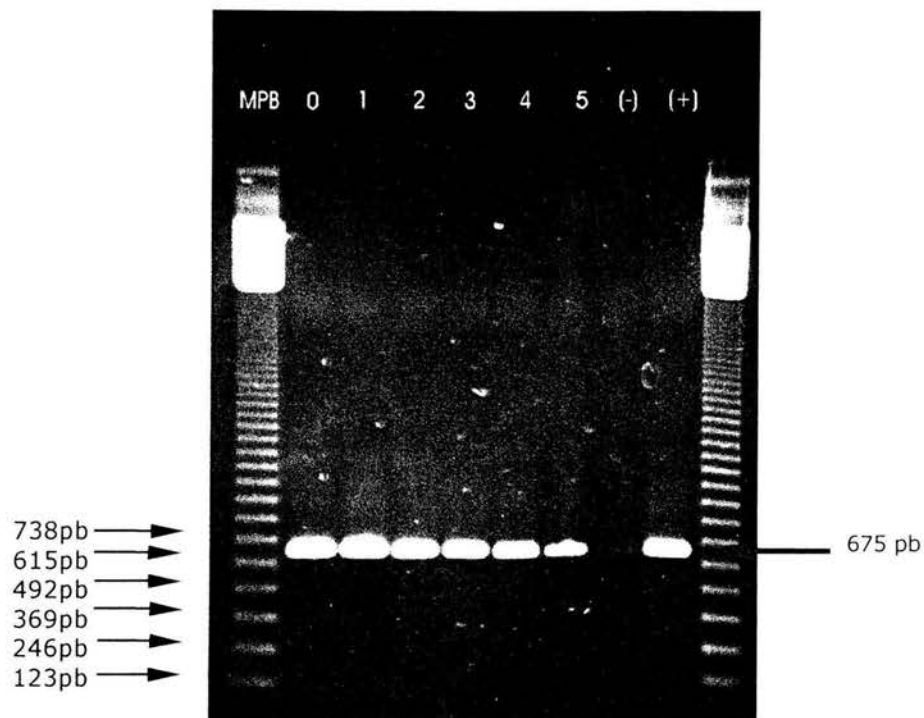


Figura 4: Gel de agarosa al 2% mostrando un fragmento de DNA de diferentes diluciones del aislamiento **C** (01-366) del VAIP, correspondiente al gen que codifica para la cápside. Carril 1:**MPB** Marcador de 123 pares de bases, carril 2:**0** sin diluir, carril 3:**1** dilución 10^{-1} , carril 4:**2** dilución 10^{-2} , carril 5:**3** dilución 10^{-3} , carril 6:**4** dilución 10^{-4} , carril 7:**5** dilución 10^{-5} , carril 8:**(-)** testigo negativo, carril 9:**(+)** testigo positivo, carril 10: **MPB**.

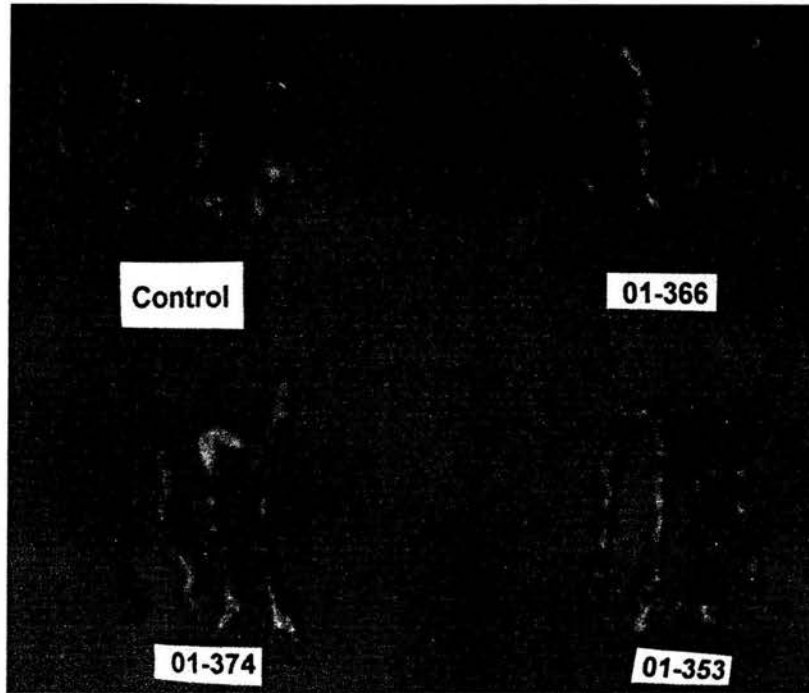


Figura 5: Timos de aves LPE de 14 días de edad inoculadas con una dosis de 10^3 DIP₅₀ de 3 aislamientos mexicanos del VAIP. 01-374(A), 01-353(B), 01-366(C), Control (T).

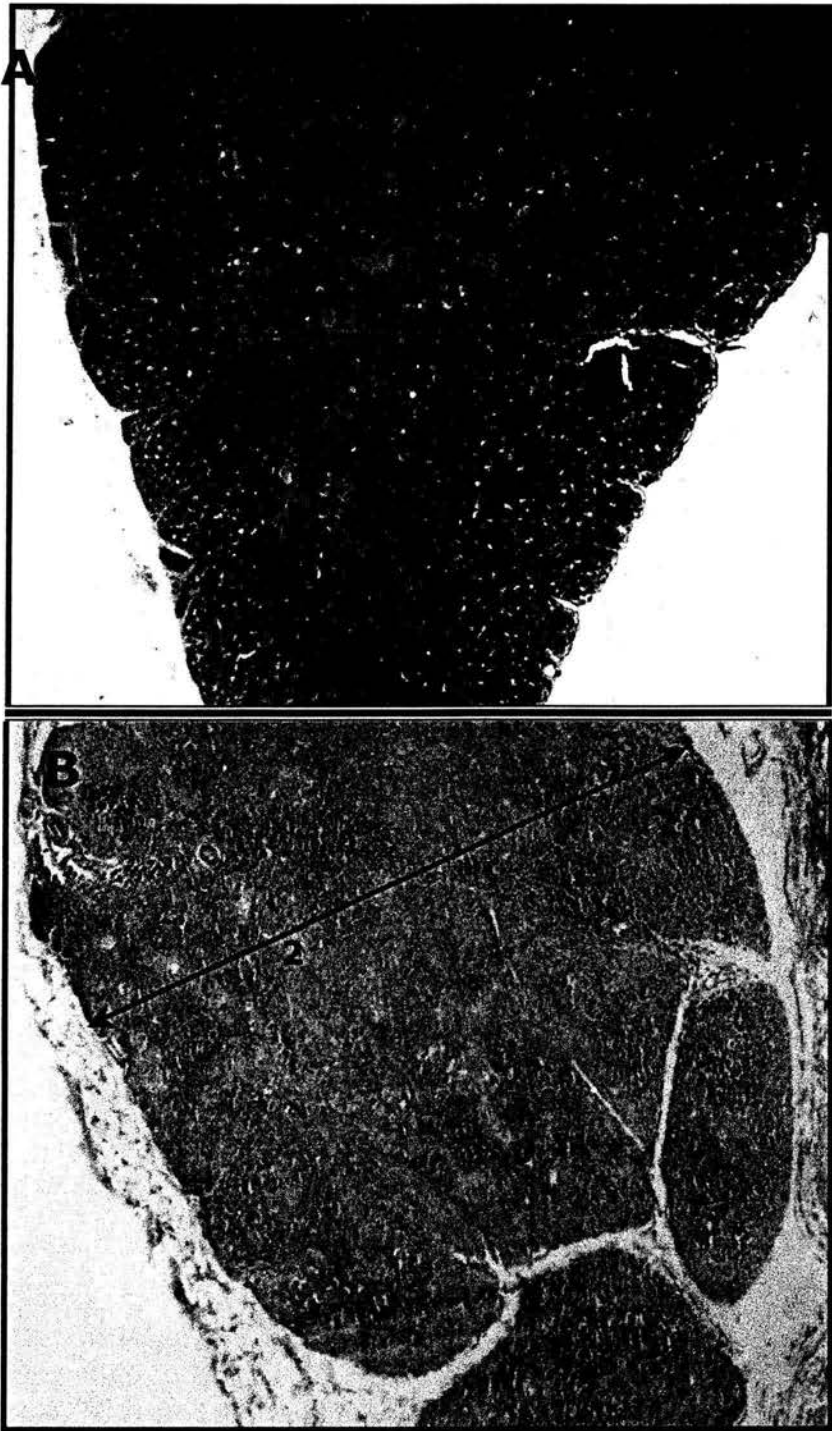


Figura 6: **A)** Timo normal de ave testigo. 40X HyE **B)**Timo con atrofia severa de corteza de un ave inoculada con el aislamiento C. 40X HyE corteza del timo **(1)**, médula del timo **(2)**.

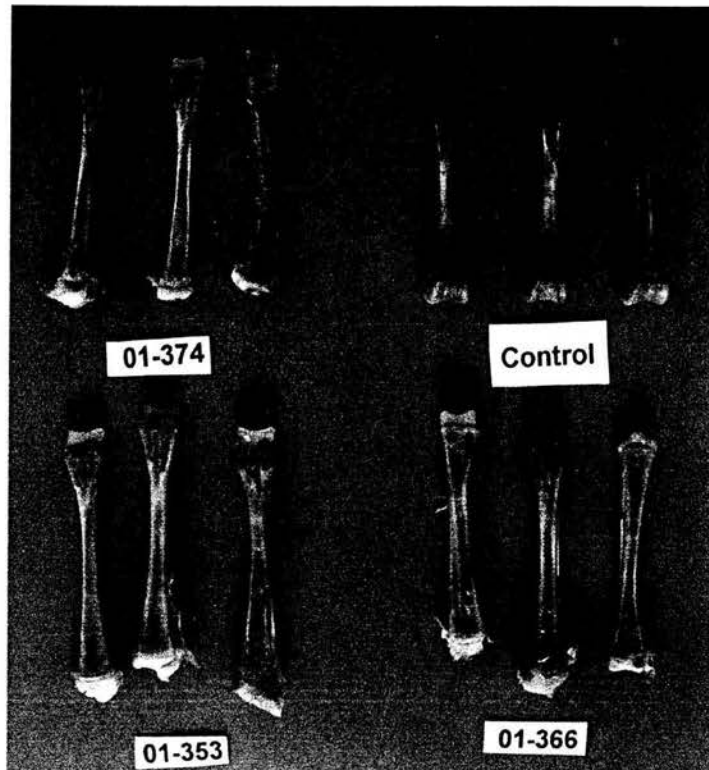


Figura 7: Médulas óseas de aves LPE de 14 días de edad inoculadas con una dosis de 10^3 DIP de 3 aislamientos mexicanos del VAIP. 01-374(A), 01-353(B), 01-366(C), Control (T).

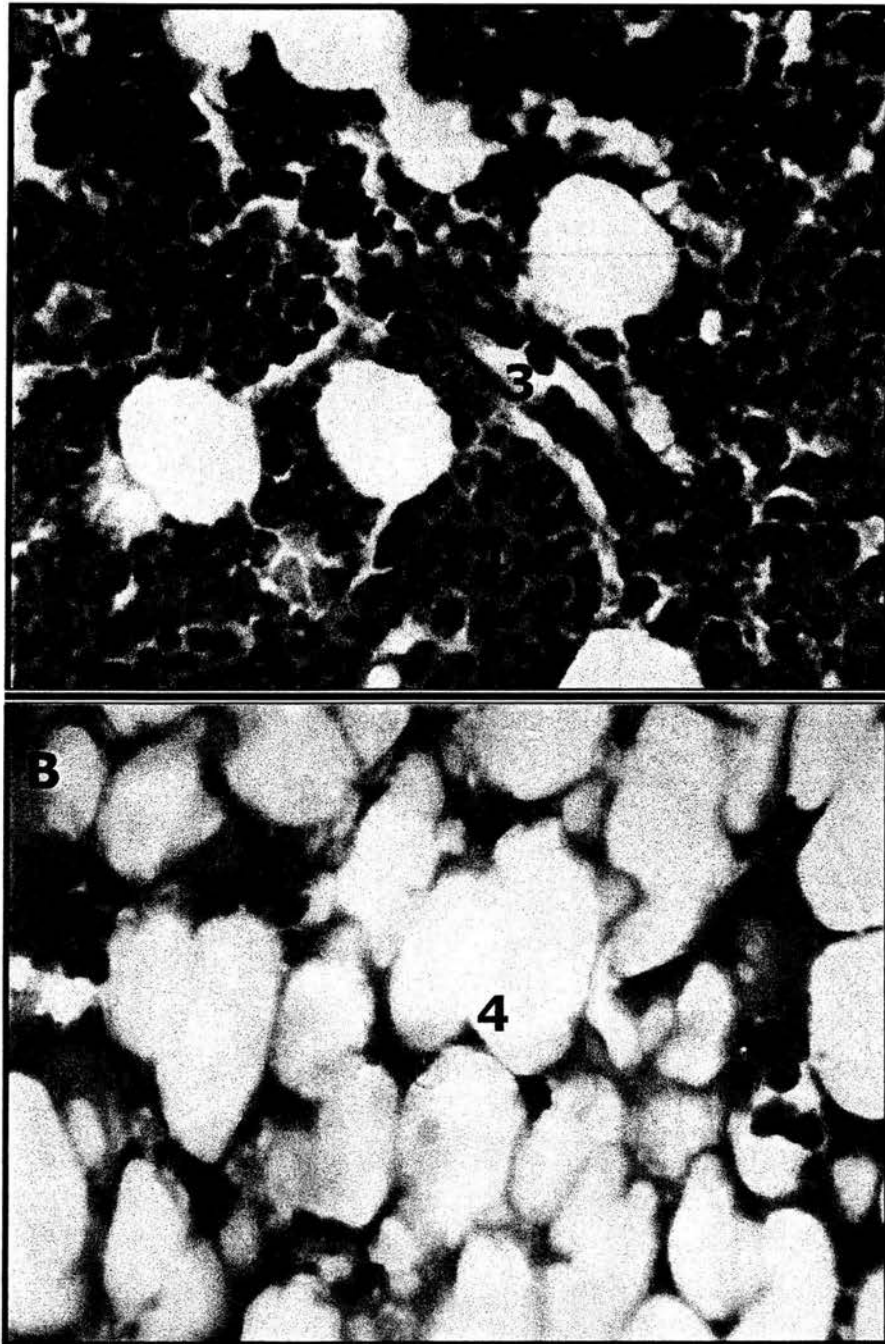


Figura 8: **A)** Médula ósea normal de ave testigo 100X HyE **B)** médula ósea con atrofia severa de un ave inoculada con el aislamiento A 100X HyE zona de eritropoyesis **(1)**, zona de granulopoyesis **(2)**, seno vascular **(3)**, sustitución por tejido adiposo **(4)**.

Dentro de veinte años te sentirás
más frustrado por las cosas que no
has hecho que por las que has
hecho. Por lo tanto suelta las
amarras y aléjate del puerto
seguro. Captura los vientos
más favorables en tus velas.
Explora. Sueña. Descubre...

Mark Twain

No necesitas ser grande para
empezar, pero necesitas empezar
para ser grande.
Las personas suelen convertirse
en lo que creen ser. Si yo creo que
no puedo hacer algo, me
convierto en incapaz de hacerlo.
Pero cuando creo que puedo,
adquiero la capacidad de hacerlo
aún si antes no la tenía...

Mahatma Gandhi