



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
División de Estudios Profesionales

**Evaluación Serológica y Morfológica de la Respuesta
Inmune Humoral en Pollos de Engorda Vacunados a
los días 1 y 9 de Edad con dos Cepas Mediana-
mente Virulentas del Virus de la Infección de
la Bolsa de Fabricio.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
RODRIGO CASCANTE PEREZ

Asesores: M.V.Z., M. C. Víctor M. Petrone García
M.V.Z., PhD. Guillermo Téllez Isaías
M.V.Z., M. C. Rubén Merino Guzmán
M.V.Z., M. C. Xóchitl Hernández Velásco





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.

DEDICATORIA

A mi madre, Ivonne:

Me haz enseñado que solo con dedicación y esfuerzo saldremos adelante en todo momento; este es solo uno más de todos tus logros. estoy orgulloso de ti
Gracias por darme la vida

A mi abuela, Yvonne:

Tú al igual que una segunda madre me haz procurado y te haz preocupado por mi, gracias por haber estado ahí cuando te he necesitado

A mi abuelo, Camilo

Definitivamente, sin tu cariño, tu aliento y tu apoyo incondicional no hubiera logrado lo que hasta ahora. Gracias.

A Marisela, mi amor.

Me haz dado la oportunidad de compartir a tu lado alegrías y tristezas, hemos crecido juntos y hemos explorado la forma de cultivar un amor cada día más maduro y cada día más comprometido. Tu me haz hecho ser una mejor persona con tu sola presencia. Eres la razón más importante que tengo para suprarne.
Una cosa sigue siendo verdad aun te amo

A mi hermano, Alejandro

Tu eres la única persona con la que cuentas para obtener una vida llena de logros
Alguna vez leí ¡El que se rinde nunca triunfa, los triunfadores nunca se rinden!

A mi hermano, Gabriel:

Demuéstralos a todos y a ti mismo, que eres capaz de lograr las metas más altas y los sueños que siempre haz tenido presentes

A Camilo, Nieves, Guillermo, Carmen, Cecilia, Oscar, Elisa y Armando

Todos ustedes son parte importante de mi formación como persona en todo momento, ya que ustedes son excelentes personas y profesionistas

A Montserrat, Santiago, Sebastián, Adrián, Jorge Jonathan, Ariadna, Armando y Alonso

Han llenado mi vida de alegría y buenos momentos. Ustedes lograron ser los mejores en cualquier cosa que decidan hacer, solo si lo hacen con amor y dedicación

A las Familias Pérez Paredes e Higuareda Pérez.

Los buenos ejemplos, el constante apoyo y las alegrías en familia será algo que siempre les agradeceré

A la Familia Duarte Gutiérrez

Por permitirme ser parte de su familia

A Claudia García, Sandra Civit, Julián Pastrana, Manuel López, Pablo Aznavurian, Nicolás Cortés, Guillermo Castellanos, Miriam Alcántara, Fabiola Arroy, Alejandra Garay, Teresa López, Miguel Arias, Aura Bárcenas y Mauticio Rubio.

Los verdaderos amigos siempre estaremos juntos, aunque nuestras vidas nos lleven por caminos distintos

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor principal,
Dr. Víctor Petrone

Porque sin sus enseñanzas y su paciencia no habría podido realizar este trabajo, le agradezco su tiempo, su apoyo y su amistad

A mis asesores,
Dr. Guillermo Téllez, Dr. Rubén Merino y Dra. Xóchitl Hernández:

Son ustedes los cimientos y los pilares de este trabajo. les agradezco muchísimo.

A los miembros de mi jurado:
Dr. José Ramírez, Dr. Fernando Constantino, Dr. Tamas Fehervari y Dra. Gabriela Gómez

Por su valiosa contribución al enriquecer este trabajo

A los laboratorios,
Boehringer Ingelheim Vetmedica, S.A. de C.V. e Investigación Aplicada, S.A. de C.V.:

Por la donación del material biológico empleado en este trabajo.

A los académicos del Departamento de Producción Animal. Aves:

Dr. Carlos López Coello, Dra. Cecilia Rosario, Dra. Luz Ma. Charles, Dr. Benjamín Fuente, Dra. Magdalena Escorcía, Dra. Odette Urquiza, Dr. Gary García, Dr. José Antonio Quintana, Dra. Norma Calderón, Dr. Marco Juárez, Dr. Néstor Ledesma y Dra. Teresa Casaubón.

A mis amigos y compañeros del Departamento de Producción Animal: Aves:

Elizabeth Abrego, Donaji García, Mireya Ortiz, Francisco Ortiz, Julio Alfaro, Felipa Galindo, Laura Aviña, Gerardo Nava, Lilia Castellanos, Mónica Andrade, Daniel Ortega, Ruth Tejeda, Mireya Juárez, Juan Carlos Bahena, Ulises Revelo, Natanaci Méndez, Esmeralda Chápero, Ivonne Palomino, José González, Libia Gutiérrez, Sandra Guins, Judith Ferreira, Armando Esparza, Adriana Barri, Roberto Escamilla, José María Pérez Campos, Gonzalo Salazar, Cristian Carlin, Marcelo Peña, Sr. Rodrigo Merino y Sr. Adelfo.

A todos los alumnos, académicos y administrativos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia que fueron parte de mi formación profesional.

LISTA DE CONTENIDO

	<u>Página</u>
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
LISTA DE CONTENIDO	iv
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	v
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
JUSTIFICACIÓN	6
HIPÓTESIS	7
OBJETIVOS	8
MATERIAL Y MÉTODOS	9
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	22
LITERATURA CITADA	34
CUADROS	42
FIGURAS	44

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

- CUADRO 1:** Diseño experimental por grupos.
Pág. 42
- CUADRO 2:** Clasificación de lesiones histológicas en tejido linfóide de la bolsa cloacal.
Pág. 42
- CUADRO 3:** Clasificación de lesiones histológicas en tejido epitelial de la bolsa cloacal.
Pág. 42
- CUADRO 4:** Porcentaje de distribución de lesiones histológicas bursales y su severidad.
Pág. 42
- CUADRO 5:** Metodología integral: Diagnóstico histológico integral por grupo, de acuerdo con la calificación de severidad de las lesiones histológicas en bolsa cloacal.
Pág. 43
- CUADRO 6:** Metodología de evaluación por tejido: Diagnóstico histológico integral por grupo, de acuerdo con el porcentaje de las lesiones histológicas predominantes en tejido linfóide de bolsa cloacal.
Pág. 43
- CUADRO 7:** Metodología de evaluación por tejido: Diagnóstico histológico integral por grupo, de acuerdo con el porcentaje de las lesiones histológicas predominantes en tejido epitelial de bolsa cloacal.
Pág. 43
- FIGURA 1:** Títulos de anticuerpos contra IBF por etapa de manejo.
Pág. 44

FIGURA 2: Metodología integral. Severidad total de las lesiones histológicas en bolsa cloacal.

Pág. 45

FIGURA 3: Metodología integral. Lesiones histológicas de curso agudo en bolsa cloacal.

Pág. 46

FIGURA 4: Metodología de evaluación por tejido. Lesiones en tejido linfoide y epitelial de bolsa cloacal.

Pág. 47

FIGURA 5: Metodología de evaluación por tejido. Tipos de lesiones en tejido linfoide de bolsa cloacal.

Pág. 48

FIGURA 6: Metodología de evaluación por tejido. Curso de las lesiones en tejido linfoide de bolsa cloacal.

Pág. 49

FIGURA 7: Metodología de evaluación por tejido. Curso de las lesiones en tejido epitelial de bolsa cloacal.

Pág. 50

ABREVIATURAS

- **CV** Coeficiente de variación.
- **DICC₅₀** Dosis infecciosa en cultivo celular 50%.
- **DIEP₅₀** Dosis infecciosa en embrión de pollo 50%.
- **DPA: Aves** Departamento de producción animal: Aves.
- **ELISA** Prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas (Enzyme linked immunosorbent assay).
- **FMVZ** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- **H/E** Hematoxilina y eosina.
- **IB** Índice bursal.
- **IBF** Infección de la bolsa de Fabricio.
- **IgM** Inmunoglobulina M.
- **ILCC** Interlukert adaptada a cultivo celular.
- **ILEP** Interlukert adaptada a embrión de pollo.
- **MET** Metodología de evaluación por tejido para la cuantificación del curso, severidad y distribución de las lesiones histológicas bursales.
- **MI** Metodología integral para la cuantificación del curso, severidad y distribución de las lesiones histológicas bursales.
- **RTB** Rango tarso bursal.
- **S** Desviación estándar.
- **UNAM** Universidad Nacional Autónoma de México.
- **VIBF** Virus de la infección de la bolsa de Fabricio.
- **VSN** Virus suero neutralización.

RESUMEN

CASCANTE PÉREZ, RODRIGO. Evaluación serológica y morfológica de la respuesta inmune humoral en pollos de engorda vacunados a los días 1 y 9 de edad con dos cepas medianamente virulentas del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (bajo la dirección de MVZ MC Víctor Manuel Petrone García, MVZ PhD Guillermo Téllez Isaías, MVZ MC Rubén Merino Guzmán y MVZ MC Xochitl Hernández Velásco).

La infección de la bolsa de Fabricio (IBF) es una enfermedad altamente contagiosa causada por un virus del género *Birnavirus*. Los cuadros de inmunosupresión originados por el VIBF causan deficiencia en la respuesta inmune por anticuerpos vacunales y aumentan la susceptibilidad a enfermedades infecciosas secundarias. La determinación del tiempo apropiado para la inmunización activa de pollos de engorda varía desde el día 1 hasta las 2 ó 3 semanas de edad, de acuerdo con los títulos de anticuerpos maternos, la virulencia y el subtipo de la cepa causante de brotes en la región y de la cepa vacunal. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia en la respuesta inmune humoral de la vacunación a los días 1 y 9 de edad con dos cepas vacunales medianamente virulentas del VIBF en pollos de engorda convencionales, mediante ELISA, cambios bursales macroscópicos e histopatología. De la investigación realizada, se concluye que la vacunación a los días 1 y 9 de edad con ambas vacunas empleadas fueron muy similares, ya que en ambos casos, los títulos de anticuerpos posvacunales no se consideraron protectivos, los hallazgos macroscópicos fueron iguales y reflejaron lo observado en el análisis serológico, y por último, de manera global la evaluación de lesiones histológicas no mostró que la edad de vacunación o la vacuna empleada causaran más lesiones una u otra en la bolsa cloacal de las aves en este estudio.

Palabras claves: Virus de la infección de la bolsa de Fabricio, ELISA, hallazgos macroscópicos, histopatología.

INTRODUCCIÓN

La infección de la bolsa de Fabricio (IBF) es una enfermedad altamente contagiosa causada por un virus de la familia *Birnaviridae*, género *Birnavirus*. El virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF) se caracteriza por presentar tropismo por el tejido linfoide, principalmente el de la bolsa de Fabricio (bolsa cloacal). El VIBF causa lisis de las células precursoras de linfocitos B y de los linfocitos B que presentan moléculas IgM monomérica como receptores de membrana. Esta lisis ocasiona inmunosupresión en aves menores de cuatro semanas de edad. El VIBF afecta al sistema inmune celular, de manera transitoria y con menor magnitud que al sistema inmune humoral. La inmunidad humoral se ve afectada con mayor severidad, debido a que los linfocitos B con IgM monomérica como receptores de membrana, se encuentran en su mayoría en la bolsa cloacal. Cabe mencionar, que son los linfocitos B, los que dan origen a las células plasmáticas, las cuales producen anticuerpos.⁽¹⁻¹⁰⁾

Los cuadros de inmunosupresión originados por el VIBF causan deficiencia en la respuesta inmune por anticuerpos vacunales y aumentan la susceptibilidad a enfermedades infecciosas secundarias, lo que ocasiona malos parámetros productivos, aumento en la mortalidad en las parvadas comerciales y pérdidas económicas en la Industria avícola.^(6,11-13)

Con el propósito de transferir inmunidad pasiva a la progenie se vacuna a las aves reproductoras, estimulando la producción de anticuerpos contra IBF durante todo el período de producción de las reproductoras. Los calendarios de vacunación en las aves reproductoras se basa en el empleo de vacunas con virus activo modificado al inicio de la crianza y vacunas con virus inactivo en las últimas etapas de crianza y producción. La proporción de anticuerpos maternos que transfieren las

aves reproductoras a los pollos de engorda varía del 60 al 80% aproximadamente.⁽¹⁴⁾ La vida media de los anticuerpos maternos contra IBF es de 3 a 5 días, por lo que títulos de anticuerpos maternos de >3000 medidos mediante el sistema convencional KPL de ELISA al momento del nacimiento, son capaces de proteger a los pollitos durante las primeras 3 semanas de vida, que es la edad con mayor susceptibilidad a adquirir infecciones naturales de IBF.^(6,15)

La inmunización activa de los pollos de engorda se lleva a cabo con vacunas que contienen virus activo modificado; las cepas virales vacunales, así como las que producen infecciones naturales de IBF, se clasifican en 3 grupos de acuerdo con su virulencia: cepas de alta virulencia ("calientes"), cepas de mediana virulencia ("intermedias") y cepas avirulentas ("suaves").^(5,12,16-27)

Las cepas altamente virulentas producen atrofia bursal e inmunosupresión severa, por lo que son poco utilizadas como vacunas. Las cepas medianamente virulentas son variables respecto a su capacidad para causar atrofia bursal e inmunosupresión, así como para conferir buena inmunidad humoral activa a los pollos de engorda. Las cepas avirulentas no son inmunosupresoras, pero son fácilmente neutralizadas por los anticuerpos maternos, por lo que no confieren una inmunidad humoral activa adecuada.^(5,12,16-27)

Durante la inmunización activa de los pollos de engorda, la presencia de elevados títulos de anticuerpos maternos puede interferir con la respuesta vacunal, pero si se realiza la inmunización activa cuando los títulos de anticuerpos maternos son escasos, aumenta la posibilidad de que ocurra una infección natural por el VIBF antes de que la inmunización produzca títulos de anticuerpos que los protejan.⁽²⁷⁾

Para evaluar la virulencia del VIBF y la respuesta humoral contra el mismo, se

utiliza la combinación de los análisis patológico y serológico. Las lesiones macroscópicas de la bolsa cloacal se evalúan indirectamente mediante la determinación del índice bursal (IB), que es la proporción del peso de la bolsa cloacal con respecto al peso corporal.^(1,16,28-30) También, mediante la determinación del rango tarso bursal (RTB), que es la proporción de la longitud del metatarso con respecto al diámetro de la bolsa cloacal.^(13,16,23,31) El análisis histopatológico se utiliza para evaluar la severidad de las lesiones bursales y así, determinar la virulencia de diversas cepas vacunales del VIBF.^(11,16,21,24,27,28)

La metodología para cuantificar el curso, la severidad y la distribución de las lesiones bursales descrita por Casaubón y col^(32,33) es la más utilizada en México. Esta metodología tiene como principales ventajas el análisis integral y la cuantificación de las lesiones bursales, de tal modo que permite hacer un análisis aritmético y estadístico a partir de una variable cualitativa y descriptiva. Sin embargo, esta metodología no hace una evaluación por separado de las lesiones propias del tejido linfoide y del tejido epitelial de la bolsa cloacal; así como tampoco evalúa por separado las lesiones derivadas de necrosis, hiperplasia e inflamación en el tejido linfoide de la bolsa cloacal.^(32,33)

La prueba de neutralización viral (VSN) se utiliza para identificar anticuerpos neutralizantes contra los diferentes serotipos del VIBF, e incluso los subtipos antigénicos que hay dentro de cada serotipo, de tal modo que se puedan diferenciar e identificar los aislamientos virales a partir de infecciones naturales y cepas vacunales.⁽⁶⁾

ELISA es la técnica estándar comercial para medir los niveles de anticuerpos contra el VIBF; esta prueba se prefiere porque tiene la ventaja de ser rápida y adaptada a sistemas de cómputo, además de que facilita la interpretación de los resultados.

ELISA se emplea para evaluar la respuesta inmune humoral contra el VIBF. La realización de perfiles de anticuerpos en pollos de un día de edad, es útil para diseñar el programa de vacunación durante las primeras etapas de desarrollo de los pollos de engorda. Los títulos mínimos protectores de la prueba ELISA varían de acuerdo con el sistema y la marca comercial del paquete de análisis serológico empleado para su evaluación.^(5,14,15,34)

La determinación del tiempo apropiado para la inmunización activa de pollos de engorda varía desde el día 1 hasta las 2 ó 3 semanas de edad, de acuerdo con los títulos de anticuerpos maternos, la virulencia y el subtipo de la cepa causante de brotes en la región y de la cepa vacunal.^(5,6,16)

Con la finalidad de obtener vacunas de virus activo del VIBF; la adaptación y propagación de diversas cepas de este virus en embrión de pollo han mostrado cierta dificultad para la obtención de elevados títulos de virus dependiendo de los antecedentes epidemiológicos de la parvada de reproductores y la vía de inoculación en el embrión de pollo. Por otro lado, los títulos de virus obtenidos a partir de cultivos celulares de origen de embrión de pollo son más elevados, además de que dichos cultivos celulares son más sensibles al virus que el embrión de pollo, pero, se debe considerar que con la replicación *in vitro* se eleva la posibilidad del desarrollo de partículas virales defectuosas.⁽⁶⁾

Solano y col⁽³⁵⁾ mostraron que cuando se inició la inmunización contra IBF en los días 15 y 28 de edad, se detectaron mayores títulos de anticuerpos analizados mediante ELISA, como parte de una respuesta inmune humoral primaria, comparado con la primovacunación al día 1 de edad; esto pudo deberse a la presencia de títulos de anticuerpos maternos suficientes para neutralizar al virus vacunal, ya que después de administrar la vacuna, los títulos de anticuerpos

maternos en los pollos vacunados al día 1 de edad disminuyeron rápidamente; esto indica, que la vacunación temprana en las primeras 2 semanas de edad y ante altos títulos de anticuerpos, puede provocar la neutralización del virus vacunal y una respuesta inmune humoral primaria deficiente.⁽³⁵⁾

Giambrone y col⁽³⁶⁾ mostraron que la inmunización iniciada al día 1 de edad (en laboratorio) con virus activo modificado, seguida de una revacunación a los 18 días de edad con virus activo modificado y con un desafío a los 48 días de edad fue más efectiva para la prevención de IBF en pollos de engorda que la inmunización con virus inactivo, combinación de virus activo e inactivo, y la falta de vacunación; esto demuestra y confirma que la vacunación de pollos de engorda con virus activo modificado confiere mayores títulos de anticuerpos contra IBF que otros tipos de vacunas que se prefieren para su uso en aves reproductoras.⁽³⁶⁾

Por otro lado, Sánchez⁽²³⁾ informó que la vacunación al día 9 de edad con una cepa vacunal intermedia Lukert no produjo anticuerpos contra IBF en pollos de engorda comerciales.⁽²³⁾

JUSTIFICACIÓN

La diferencia en la respuesta inmune humoral a la vacunación contra el VIBF con dos cepas medianamente virulentas en pollos de engorda convencionales a los días 1 y 9 de edad, analizadas mediante ELISA, el índice bursal, el rango tarso bursal e histopatología de la bolsa cloacal, no ha sido estudiada de manera específica. Una investigación específica es importante, ya que se requiere conocer el momento adecuado para el inicio de la inmunización activa contra IBF en pollos de engorda, debido a que pueden ser afectados por el VIBF desde las primeras semanas de vida, mismas en las cuales los virus vacunales pueden ser neutralizados por los anticuerpos maternos presentes en la progenie procedente de parvadas de

reproductoras inmunizadas contra IBF.

Debido a que la metodología para cuantificar el curso, la severidad y la distribución de las lesiones bursales más utilizada en México, tiene la desventaja, de no evaluar por separado las lesiones propias del tejido linfoide y epitelial de la bolsa cloacal; y tampoco evaluar por separado las lesiones que se producen como consecuencia de necrosis, hiperplasia e inflamación en el tejido linfoide de la bolsa cloacal, se hace necesario el empleo de una metodología que analice tales diferencias. La evaluación de lesiones por tejido es importante, ya que los agentes etiológicos que lesionan la bolsa cloacal tienen distinta afinidad por los tejidos de este órgano; diferenciar las lesiones que se producen como consecuencia de necrosis, hiperplasia e inflamación, ayudará a evaluar el grado de inmunosupresión por el daño en el tejido linfoide y epitelial bursal de acuerdo con la severidad y el curso de cada tipo de lesión.

HIPÓTESIS

- No existe diferencia en la respuesta inmune humoral entre la vacunación con dos cepas medianamente virulentas del VIBF a los días 1 y 9 de edad en pollos de engorda convencionales, analizados mediante ELISA, cambios bursales macroscópicos e histopatología.
- Las dos cepas vacunales medianamente virulentas del VIBF confieren títulos de anticuerpos similares en pollos de engorda convencionales vacunados a los días 1 y 9 de edad, analizados mediante ELISA.
- La severidad de los cambios bursales macroscópicos (índice bursal y rango tarso bursal) y microscópicos (histopatología) son similares para las dos cepas vacunales

medianamente virulentas del VIBF en pollos de engorda convencionales vacunados a los días 1 y 9 de edad.

OBJETIVOS

- Evaluar la eficacia en la respuesta inmune humoral de la vacunación a los días 1 y 9 de edad con dos cepas vacunales medianamente virulentas del VIBF en pollos de engorda convencionales, mediante ELISA, cambios bursales macroscópicos e histopatología.
- Evaluar los títulos de anticuerpos que confieren dos cepas vacunales medianamente virulentas del VIBF en pollos de engorda convencionales vacunados a los días 1 y 9 de edad, analizados mediante ELISA.
- Evaluar la severidad de los cambios bursales macroscópicos (índice bursal y rango tarso bursal) y microscópicos (histopatología) ocasionados por la infección de dos cepas vacunales medianamente virulentas del VIBF en pollos de engorda convencionales vacunados a los días 1 y 9 de edad.
- Instrumentar una nueva metodología para la cuantificación de la severidad de las lesiones histológicas bursales que evalúe por separado las lesiones en el tejido linfóide y en el tejido epitelial de la bolsa cloacal, además de las lesiones que se producen como consecuencia de necrosis, hiperplasia e inflamación en el tejido linfóide de la bolsa cloacal.

MATERIAL Y MÉTODOS

INSTALACIONES

Se utilizaron cinco unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves (DPA: Aves), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D.F.

ANIMALES PARA EXPERIMENTACIÓN

Se utilizó una parvada mixta de 70 pollos de engorda convencionales de un día de edad. Las aves fueron originarias de una incubadora comercial del Altiplano Mexicano.

Las aves se mantuvieron bajo un sistema de crianza en piso con ambiente controlado. El agua y el alimento comercial para pollo de engorda se administraron a libre acceso.

VACUNAS

"Vacuna ILEP": Cepa vacunal intermedia del VIBF, Interlukert adaptada a embrión de pollo con título de 10^4 DIEP₅₀ (Boehringer Ingelheim Vetmedica, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco).

"Vacuna ILCC": Cepa vacunal intermedia del VIBF, Interlukert adaptada a la línea celular QT-35 con título de 10^4 DICC₅₀ (Boehringer Ingelheim Vetmedica, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco).

Las vacunas fueron reconstituidas a partir de virus vacunales liofilizados y diluyente.

CEPA VIRAL DE DESAFÍO

Cepa Edgar del VIBF con título de $10^{2.0}$ DIEP₅₀ (Investigación Aplicada, S.A. de C.V., Tehuacán, Puebla).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Las aves se dividieron de manera aleatoria simple en 6 grupos. Los grupos 1 y 2 fueron vacunados al día 1 de edad con las vacunas ILEP e ILCC, respectivamente; fueron desafiados al día 21 de edad con la cepa Edgar del VIBF, al igual que el grupo 3 (testigo); los pollos de los 3 grupos se les practicó la eutanasia al día 26 de edad. Los grupos A y B fueron vacunados al día 9 de edad con las vacunas ILEP e ILCC, respectivamente; fueron desafiados al día 29 de edad con la cepa Edgar del VIBF, al igual que el grupo C (testigo); los pollos de los 3 grupos se les practicó la eutanasia al día 34 de edad (Cuadro 1).

Vacunación. Las vacunas fueron administradas vía ocular, el volumen de vacuna empleado fue de 30 μ L por pollo; todos los pollos de los grupos 1 y 2 se vacunaron al día 1 de edad; por su parte, todos los pollos de los grupos A y B se vacunaron al día 9 de edad. Los pollos de los grupos 3 y C no se vacunaron, por lo que se emplearon como testigos; los pollos del grupo 3 fueron testigos de los grupos 1 y 2; los pollos del grupo C fueron testigos de los grupos A y B (Cuadro 1).

Desafío. El virus de desafío fue administrado vía ocular, el volumen de vacuna empleado fue de 60 μ L por pollo; todos los pollos de los grupos 1, 2, A y B fueron desafiados 20 días después de la vacunación. Los pollos del grupo 3 se desafiaron al mismo tiempo que los grupos 1 y 2. Los pollos del grupo C se desafiaron al mismo tiempo que los grupos A y B (Cuadro 1).

Eutanasia. Se realizó 5 días después del desafío en todos los pollos de todos los

grupos. La eutanasia se realizó mediante la dislocación de las vértebras cervicales⁽³⁷⁾ (Cuadro 1).

TOMA DE MUESTRAS

Serología

Se tomaron muestras de suero sanguíneo para determinar los títulos de anticuerpos contra IBF mediante ELISA, se realizaron 3 tomas de suero en el caso de los grupos 1, 2 y 3; para los grupos A, B y C se realizaron 4 tomas de suero. Las tomas correspondieron a las mismas edades de la recepción de los pollitos en el DPA: Aves, la vacunación, el desafío y la eutanasia. En el caso de los grupos 3 y C (testigos), el título de anticuerpos contra IBF a la vacunación corresponde al día en que fueron vacunados los grupos de los cuales fueron testigo, es decir, los grupos 1 y 2 y los grupos A y B, respectivamente.

Toma 1. Al momento de la recepción de los pollos de 1 día de edad en el DPA: Aves, fueron sangrados 15 pollos de manera aleatoria, de los 70 recibidos.

Toma 2. Para los grupos 1, 2 y 3, el título de anticuerpos a la vacunación es el mismo que el obtenido a la recepción en los 15 pollos sangrados de manera aleatoria. Al momento de la vacunación, fueron sangrados todos los pollos de los grupos A, B y C.

Toma 3. Al momento del desafío de los pollos con el VIBF, fueron sangrados todos los pollos de todos los grupos.

Toma 4. Al momento de la eutanasia de los pollos desafiados, fueron sangrados todos los pollos de todos los grupos.

Las muestras de suero sanguíneo fueron colectadas mediante punción de la vena yugular con jeringa de 1ml y aguja calibre 29, en pollos menores a 1 semana de edad y mediante punción de la vena radial con jeringa de 3ml y aguja calibre 22, en pollos mayores a 1 semana de edad, como lo describen Rubio y Escalante.⁽³⁴⁾

Disección de Bolsas Cloacales

Después de la eutanasia, las bolsas cloacales fueron disecadas de los pollos de todos los grupos con el uso de tijeras y pinzas de disección.

Histopatología

Las bolsas cloacales de todos los pollos, se colocaron en formalina al 10% amortiguada, pH de 7.4 y fueron procesadas por las técnicas de inclusión en parafina y tinción de rutina H/E (hematoxilina y eosina).^(38,39)

EVALUACIÓN DE MUESTRAS

Serología

El suero sanguíneo de los pollos fue colectado para la detección de anticuerpos contra el VIBF mediante la prueba ELISA, usando el paquete comercial de análisis serológico "IBD ProFLOCK" (Synbiotics Corporation, San Diego, CA., U.S.A.), anteriormente llamado "KPL". Las muestras de suero sanguíneo fueron procesadas como lo describen Rubio y Escalante.⁽³⁴⁾

Hallazgos Macroscópicos

Se midió el diámetro de las bolsas cloacales y el largo de los metatarsos izquierdos utilizando un calibrador milimétrico; además, se midió el peso de los pollos y de las bolsas cloacales utilizando una báscula digital.

El índice bursal (IB) se calculó de acuerdo a lo descrito por Lucio y Hichtner^(10,41)

con la siguiente fórmula: $IB = (\text{Peso de la Bolsa Cloacal} \times 100) / \text{Peso Corporal}$.

El rango tarso bursal (RTB) se calculó mediante la técnica descrita por Rountree⁽²²⁾ con la siguiente fórmula: $RTB = (\text{Diámetro de la Bolsa Cloacal} \times 100) / \text{Largo del Metatarso}$.

Histopatología

Se evaluaron dos metodologías para la cuantificación de las lesiones bursales microscópicas; comparando la metodología integral (MI) descrita por Casaubón y col^(32,33), con una metodología de evaluación por tejido (MET), la cual evalúa por separado las lesiones en el tejido linfóide y en el tejido epitelial de la bolsa cloacal, además de las lesiones derivadas de necrosis, hiperplasia e inflamación en el tejido linfóide de la bolsa cloacal (Cuadros 2 y 3); la metodología de evaluación por tejido se describe a continuación.

Como ocurre con otros órganos, en una muestra de bolsa cloacal pueden observarse lesiones de diversos cursos (agudo, subagudo y crónico), por esta razón, en un principio las lesiones se evaluaron en conjunto independientemente del curso al que pertenecen. Posteriormente, el curso con mayor porcentaje de presentación de lesiones en las bolsas cloacales evaluadas, determinó el curso presente en las lesiones bursales en todos los pollos de todos los grupos. La severidad de las lesiones se evaluó de acuerdo con su porcentaje de distribución en los cortes histológicos.

La severidad de las lesiones se clasificó en: leve, leve a moderado, moderado, moderado a severo y severo, de acuerdo con su porcentaje de distribución en los cortes histológicos (Cuadro 4).

Con la metodología de evaluación por tejido (MET) para la cuantificación de lesiones histológicas bursales, se evaluaron 5 plicas por bolsa cloacal de manera aleatoria, de todos los pollos de todos los grupos. Con la metodología integral (MI) para la cuantificación de lesiones histológicas bursales descrita por Casaubón y col^(32,33), se evaluaron todas las bolsas cloacales de los pollos de todos los grupos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los títulos de anticuerpos analizados mediante ELISA se realizó análisis de varianza y las diferencias entre las medias fueron evaluadas mediante la prueba Tukey.⁽⁴²⁻⁴⁴⁾ En el análisis estadístico del índice bursal (IB) y del rango tarso bursal (RTB), se realizó la transformación de los datos a través del arcoseno de la raíz cuadrada; a los datos transformados se les aplicó análisis de varianza y las diferencias entre las medias fueron evaluadas mediante la prueba Tukey.⁽⁴²⁻⁴⁴⁾ Para la comparación de las medianas de las lesiones histológicas bursales evaluadas tanto por MI como por MET, se aplicó la prueba Kruskal-Wallis. Para comparar todos los grupos y las diferencias existentes entre cada grupo se utilizó la prueba U de Mann-Whitney.⁽⁴²⁻⁴⁴⁾ Se fijó el nivel de significancia en $P < 0.05$.

RESULTADOS

SEROLOGÍA

Toma 1. Se realizó al momento de la recepción de pollos de 1 día de edad en el DPA: Aves, en 15 pollos de manera aleatoria, de los 70 recibidos; los títulos de anticuerpos contra IBF no tuvieron diferencia significativa ($P>0.05$) ya que se trató de un solo grupo de pollos antes de formar los 6 grupos. (Figura 1).

Toma 2. Para los grupos 1, 2 y 3, el título de anticuerpos a la vacunación es el mismo que el obtenido a la recepción en los 15 pollos sangrados de manera aleatoria. En los grupos A, B y C, se realizó el día 9 de edad (momento de la vacunación) en todos los pollos de estos grupos. En los grupos 1, 2 y 3, los títulos de anticuerpos fueron significativamente mayores ($P<0.05$) que en los grupos A, B y C; los títulos de anticuerpos contra IBF en el grupo C fueron significativamente mayores ($P<0.05$) que en los grupos A y B; en el grupo A fueron significativamente mayores ($P<0.05$) con respecto al grupo B (Figura 1).

Toma 3. En los grupos 1, 2 y 3, se realizó al momento del desafío, el día 21 de edad en todos los pollos de estos grupos; en los grupos A, B y C, se realizó al momento del desafío, el día 29 de edad en todos los pollos de estos grupos; los títulos de anticuerpos contra IBF mostraron diferencia significativa ($P<0.05$) entre todos los grupos; en orden de mayor a menor, los títulos de anticuerpos en los grupos se observaron de la siguiente forma: grupos C, 2, 3, A, 1 y B (Figura 1).

Toma 4. En los grupos 1, 2 y 3, se realizó minutos antes de la eutanasia, el día 26 de edad en todos los pollos de estos grupos; en los grupos A, B y C, se realizó minutos antes de la eutanasia, el día 34 de edad en todos los pollos de estos grupos; los títulos de anticuerpos contra IBF mostraron diferencia significativa

($P < 0.05$) entre todos los grupos; en orden de mayor a menor, los títulos de anticuerpos en los grupos se observaron de la siguiente forma: grupos 3, B, A, 2, 1 y C (Figura 1).

HALLAZGOS MACROSCÓPICOS

En los grupos 1, 2 y 3, las mediciones para el cálculo del índice bursal y el rango tarso bursal se realizaron minutos después de la eutanasia, el día 26 de edad en todos los pollos de estos grupos; en los grupos A, B y C, se realizó minutos después de la eutanasia, el día 34 de edad en todos los pollos de estos grupos.

Índice Bursal. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los 6 grupos.

Rango Tarso Bursal. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los 6 grupos.

HISTOPATOLOGÍA DE BOLSA CLOACAL

En los grupos 1, 2 y 3, se realizó minutos después de la eutanasia, el día 26 de edad en todos los pollos: En los grupos A, B y C, se realizó de la misma manera, el día 34 de edad.

METODOLOGÍA INTEGRAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL CURSO, SEVERIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE LAS LESIONES HISTOLÓGICAS BURSALES.

Grupo 1. Bursitis subaguda moderada (severidad de 3.41) en 51.25% de los cortes revisados (Cuadro 5).

Grupo 2. Bursitis subaguda moderada (severidad de 3.19) en 47.50% de los cortes revisados (Cuadro 5).

Grupo 3. Bursitis subaguda moderada (severidad de 3.56) en 48.75% de los cortes revisados (Cuadro 5).

Grupo A. Bursitis subaguda moderada (severidad de 3.82) en 56.25% de los cortes revisados (Cuadro 5).

Grupo B. Bursitis subaguda moderada (severidad de 3.35) en 45.42% de los cortes revisados (Cuadro 5).

Grupo C. Bursitis subaguda moderada (severidad de 3.55) en 53.13% de los cortes revisados (Cuadro 5).

SEVERIDAD TOTAL DE LAS LESIONES HISTOLÓGICAS

La calificación de severidad de las lesiones en el grupo A fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que en los grupos 1 y 2; en los grupos 3 y A fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que en el grupo 2; entre el resto de los grupos, las lesiones histológicas bursales no fueron de severidad significativamente ($P > 0.05$) diferente (Figura 2).

LESIONES HISTOLÓGICAS DE CURSO AGUDO

La calificación de severidad de las lesiones de curso agudo en el grupo A fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que en los grupos C, 1, 2 y B; el grupo 3 también mostró diferencia significativamente ($P < 0.05$) mayor con los grupos 1, 2 y B; los grupos 1, 2 y C tuvieron calificación de severidad de las lesiones significativamente ($P < 0.05$) mayor que el grupo B; entre el resto de los grupos, las lesiones no fueron de severidad significativamente ($P > 0.05$) diferente (Figura 3).

LESIONES HISTOLÓGICAS DE CURSO SUBAGUDO Y CRÓNICO

No se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre la calificación de severidad de las lesiones de los 6 grupos.

METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN POR TEJIDO PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL CURSO, SEVERIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE LAS LESIONES HISTOLÓGICAS BURSALES.

Grupo 1. En el tejido linfóide de la bolsa cloacal predominaron las lesiones de curso subagudo con severidad de leve a moderada y las lesiones necróticas en 29.63 y 18.84% del tejido revisado respectivamente. En el tejido epitelial de la bolsa cloacal predominaron las lesiones de curso subagudo con severidad de leve a moderada en 21.10% del tejido revisado (Cuadros 6 y 7).

Grupo 2. En el tejido linfóide de la bolsa cloacal predominaron las lesiones de curso subagudo con severidad de leve a moderada y las lesiones necróticas en 36.12 y 27.00% del tejido revisado respectivamente. En el tejido epitelial de la bolsa cloacal predominaron las lesiones de curso agudo con severidad de leve a moderada en 25.05% del tejido revisado (Cuadros 6 y 7).

Grupo 3. En el tejido linfóide de la bolsa cloacal predominaron las lesiones de curso subagudo con severidad de leve a moderada y las lesiones necróticas en 35.60 y 22.44% del tejido revisado respectivamente. En el tejido epitelial de la bolsa cloacal predominaron las lesiones de curso agudo con severidad de leve a moderada en 20.24% del tejido revisado (Cuadros 6 y 7).

Grupo A. En el tejido linfóide de la bolsa cloacal predominaron las lesiones de curso subagudo con severidad moderada y las lesiones inflamatorias en 41.87 y 26.09% del tejido revisado respectivamente. En el tejido epitelial de la bolsa

cloacal predominaron las lesiones de curso subagudo con severidad de leve a moderada en 34.11% del tejido revisado (Cuadros 6 y 7).

Grupo B. En el tejido linfóide de la bolsa cloacal predominaron las lesiones de curso subagudo con severidad moderada y las lesiones necróticas en 42.78 y 29.27% del tejido revisado respectivamente. En el tejido epitelial de la bolsa cloacal predominaron las lesiones de curso subagudo con severidad de leve a moderada en 31.67% del tejido revisado (Cuadros 6 y 7).

Grupo C. En el tejido linfóide de la bolsa cloacal predominaron las lesiones de curso subagudo con severidad de leve a moderada y las lesiones necróticas en 34.24 y 25.76% del tejido revisado respectivamente. En el tejido epitelial de la bolsa cloacal predominaron las lesiones de curso crónico con severidad de leve a moderada en 28.08% del tejido revisado (Cuadros 6 y 7).

LESIONES HISTOLÓGICAS EN TEJIDO LINFOIDE

El porcentaje de severidad de las lesiones en el grupo 1 fue significativamente ($P < 0.05$) menor que en el resto de los grupos; los grupos 2, 3, A, B y C no tuvieron diferencia significativa ($P > 0.05$) entre ellos (Figura 4).

LESIONES HISTOLÓGICAS EN TEJIDO EPITELIAL

El porcentaje de severidad de las lesiones en el grupo 1 fue significativamente ($P < 0.05$) menor que en el resto de los grupos; los grupos 2, 3, A, B y C no tuvieron diferencia significativa ($P > 0.05$) entre ellos (Figura 4).

LESIONES HISTOLÓGICAS INFLAMATORIAS EN TEJIDO LINFOIDE

El grupo A tuvo un porcentaje de severidad de las lesiones inflamatorias significativamente ($P < 0.05$) mayor que en el resto de los grupos; los grupos 1, 2,

3, B y C no tuvieron diferencia significativa ($P > 0.05$) entre ellos (Figura 5).

LESIONES HISTOLÓGICAS HIPERPLÁSICAS EN TEJIDO LINFOIDE

El porcentaje de severidad de las lesiones hiperplásicas en el grupo B fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que en el resto de los grupos. El grupo C tuvo un porcentaje de severidad de las lesiones significativamente ($P < 0.05$) mayor que en los grupos 3 y A. El grupo 1 tuvo un porcentaje de severidad de las lesiones significativamente ($P < 0.05$) menor que en los demás grupos. No se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el resto de los grupos (Figura 5).

LESIONES HISTOLÓGICAS NECRÓTICAS EN TEJIDO LINFOIDE

El porcentaje de severidad de las lesiones necróticas en el grupo 1 fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que en el resto de los grupos. Los grupos 2 y B tuvieron porcentajes de severidad de las lesiones similares entre sí y significativamente ($P < 0.05$) mayores que los grupos 3 y A. No se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el resto de los grupos (Figura 5).

LESIONES HISTOLÓGICAS DE CURSO AGUDO EN TEJIDO LINFOIDE

El porcentaje de severidad de las lesiones de curso agudo en tejido linfóide en los grupos 2 y A fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que en el resto de los grupos, excepto en el grupo 3. Los grupos 1 y C tuvieron porcentajes de severidad de las lesiones significativamente ($P < 0.05$) mayores que el grupo B. No se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el resto de los grupos (Figura 6).

LESIONES HISTOLÓGICAS DE CURSO SUBAGUDO EN TEJIDO LINFOIDE

El porcentaje de severidad de las lesiones de curso subagudo en tejido linfóide en los grupos A y B fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que en el grupo 1. No se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el resto de los grupos (Figura 6).

LESIONES HISTOLÓGICAS DE CURSO CRÓNICO EN TEJIDO LINFOIDE

El porcentaje de severidad de las lesiones de curso crónico en tejido linfóide en el grupo B fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que en el resto de los grupos. En el grupo C el porcentaje de severidad de las lesiones fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que en los grupos 1, 2, 3 y A. El porcentaje de severidad de las lesiones en los grupos 3 y A fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que en el grupo 1. No se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el resto de los grupos (Figura 6).

LESIONES HISTOLÓGICAS DE CURSO AGUDO EN TEJIDO EPITELIAL

El porcentaje de severidad de las lesiones de curso agudo en tejido epitelial en el grupo 2 fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que en los grupos 1, A, B y C. Los grupos 3, 1 y A tuvieron un porcentaje de severidad de las lesiones significativamente ($P < 0.05$) mayor que en los grupos B y C. No se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el resto de los grupos. (Figura 7)

LESIONES HISTOLÓGICAS DE CURSO SUBAGUDO EN TEJIDO EPITELIAL

El porcentaje de severidad de las lesiones de curso subagudo en tejido epitelial en los grupos A y B fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que en los grupos 1, 2 y 3. No se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el resto de los grupos (Figura 7).

LESIONES HISTOLÓGICAS DE CURSO CRÓNICO EN TEJIDO EPITELIAL

El porcentaje de severidad de las lesiones de curso crónico en tejido epitelial en el grupo C fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que en los grupos 1, 2, A y B. Los grupos 2 y B tuvieron un porcentaje de severidad de las lesiones significativamente ($P < 0.05$) mayor que en los grupos 1 y A. El porcentaje de severidad de las lesiones del grupo A fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que en el grupo 1. No se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el resto de los grupos (Figura 7).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

SEROLOGÍA

A la recepción de los pollitos de 1 día de edad, los títulos de anticuerpos maternos contra IBF analizados mediante ELISA, entre los 6 grupos no tuvieron diferencia significativa, los títulos de anticuerpos se midieron en 15 pollos de manera aleatoria de los 70 pollos recibidos; el coeficiente de variación de 23.14%, indica que hubo una excelente uniformidad en los títulos de los anticuerpos maternos de acuerdo con lo mencionado por Rubio y col.⁽³⁴⁾

Al momento de la vacunación, los títulos de anticuerpos contra IBF de los grupos vacunados al día 1 de edad y su grupo testigo fueron mayores a los títulos de anticuerpos de los grupos vacunados al día 9 de edad y su respectivo grupo testigo; esto se debió al catabolismo que presentaron los anticuerpos maternos, los cuales tienen una vida media de 3 a 5 días⁽⁶⁾, por lo que pueden proteger a los pollitos hasta las primeras 3 semanas de vida⁽⁶⁾. En este caso, la vida media de los anticuerpos maternos fue de 7 días, aproximadamente. De acuerdo con Cursiefen y col⁽⁴⁵⁾ las parvadas se infectan con el VIBF de modo natural durante los días 7 y 14 de edad, lo cual depende del nivel de anticuerpos maternos presentes en los pollos y de los virus vacunales, ya que Rosales⁽⁴⁶⁾ cita que aunque el virus vacunal es poco virulento para los pollos, es capaz de causar lesiones. Entre los grupos que se vacunaron al día 9 de edad, el que se vacunó con ILEP, tuvo títulos de anticuerpos previos a la vacunación mayores que los títulos del grupo vacunado con ILCC; esta diferencia en el título de anticuerpos entre los pollos de ambos grupos, y de estos con los pollos de su grupo testigo, probablemente se deba a un efecto de la aleatoriedad al momento de formar los grupos o debido a un catabolismo poco uniforme de los anticuerpos maternos; lo que concuerda con Weisman y col⁽⁴⁷⁾,

quienes mencionan que los títulos de anticuerpos maternos son poco uniformes en pollos de engorda de una misma parvada.

Los títulos de anticuerpos observados 20 días después de la vacunación y al momento del desafío, tuvieron una disminución estadísticamente significativa en relación con los títulos observados previos a la vacunación; esto pudo deberse a que los títulos de anticuerpos maternos fueron suficientemente altos para neutralizar al virus vacunal, y de este modo interferir con la respuesta inmune humoral primaria contra ambos virus vacunales intermedios de IBF. De acuerdo con Rubio y col⁽³⁴⁾ un título protector de ELISA es de 3000 o más, utilizando el paquete comercial empleado en esta investigación. En esta investigación, los títulos de anticuerpos al momento de la vacunación fue de 8233 en los grupos 1 y 2, 2876 en el grupo A y 2070 en el grupo B. De acuerdo con Winterfield y col⁽⁴⁸⁾, algunas cepas vacunales no producen una respuesta inmune adecuada en presencia de altos niveles de anticuerpos maternos, lo cual coincide con lo encontrado en este estudio. A los 20 días después de la vacunación, a pesar de que se observaron diferencias significativas entre los títulos de anticuerpos de los 6 grupos, de modo práctico en granja, estas diferencias no serían significantes para proteger a los pollos con bajos títulos de anticuerpos contra IBF como los observados en este estudio.

Los títulos de anticuerpos observados 5 días después del desafío y al momento de la eutanasia, no tuvieron diferencia significativa con los títulos observados al momento del desafío; esto podría deberse a que ante una segunda inoculación con un virus de desafío en los grupos previamente vacunados a los días 1 y 9 de edad con una cepa intermedia de IBF, no hubo tiempo suficiente para producir una adecuada respuesta inmune secundaria. En una respuesta inmune humoral secundaria, la máxima producción de anticuerpos se presenta entre los días 2 y 7

posinoculación de acuerdo con Kuby⁽⁴⁹⁾. En el caso de los grupos testigo, se trató de una respuesta inmune humoral primaria, de este modo, para el momento de la eutanasia, aun no transcurría el tiempo suficiente para que se observara la máxima producción de anticuerpos contra IBF detectables por ELISA; de acuerdo con Kuby⁽⁴⁹⁾, esta producción máxima de anticuerpos ocurre entre los días 10 y 17 posinoculación. Por otro lado, al igual que lo ocurrido a los 20 días posvacunación; a los 5 días posdesafío, a pesar de que se observaron diferencias significativas entre los títulos de anticuerpos de los 6 grupos, de modo práctico en granja, estas diferencias no serían significantes para proteger a los pollos con bajos títulos de anticuerpos contra IBF como los observados en este estudio.

Los títulos de anticuerpos contra IBF detectados mediante ELISA, mostraron que la vacunación a los días 1 y 9 de edad con un virus intermedio de IBF, produjo títulos de anticuerpos de 235 y 62, considerados como no protectivos de acuerdo con Rubio y col⁽³⁴⁾; esto coincide con lo encontrado por Lukert⁽⁵⁰⁾, quien ante este resultado, sugiere que para evitar la neutralización debido a la presencia de altos niveles de anticuerpos maternos en pollos de engorda, se debe llevar a cabo un programa de vacunación múltiple: la primera vacunación se aplicaría al día de edad vía parenteral con un virus de virulencia intermedia, la segunda vacunación se administraría entre los días 7 y 9 de edad, por último y en caso de que el nivel de desafío en granja fuera muy alto, debería aplicarse una tercera vacunación entre los días 14 y 16 de edad; con este programa de vacunación se lograría una estimulación inmunológica e interferencia viral contra el virus que provoca la infección natural de manera temprana con la vacunación al día 1; también se obtendrían títulos de anticuerpos protectores después de la segunda y la tercera vacunación, cuando los títulos de anticuerpos maternos son bajos. Con respecto a esto, Merino y col⁽⁵¹⁾ encontraron que al vacunar pollos de engorda al día 6 de edad, el virus vacunal Lukert intermedio fue neutralizado por los anticuerpos

maternos, al igual que como sucedió en esta investigación; posteriormente, Merino y col⁽⁵¹⁾ volvieron a vacunar al día 16 de edad y se obtuvo un título de anticuerpos mediante ELISA considerado protectorio contra el VIBF.

De manera similar a lo ocurrido en este estudio, Solano y col⁽³⁵⁾ mostraron que la respuesta inmune humoral a la vacunación al día 1 de edad no produjo anticuerpos contra IBF en presencia de elevados títulos de anticuerpos maternos, comparado con la vacunación a los días 15 y 28 de edad donde se detectaron mayores títulos de anticuerpos analizados mediante ELISA; además, después de administrar la vacuna, los títulos de anticuerpos maternos en los pollos vacunados al día 1 de edad disminuyeron rápidamente. Por su parte, Sánchez⁽²³⁾ encontró que la vacunación al día 9 de edad con una cepa vacunal intermedia Lukert no produjo anticuerpos contra IBF, lo cual coincide con lo encontrado en este estudio.

HALLAZGOS MACROSCÓPICOS

Los hallazgos macroscópicos en la bolsa cloacal de los grupos vacunados, se asociaron a la interacción del virus vacunal y el virus de desafío; en el caso de los grupos testigo, se asociaron solo al virus de desafío; esto debido a que tanto los virus vacunales como los virus desafío y los causantes de infecciones naturales generan lesiones bursales y atrofia bursal.^(52,53)

En este estudio, el IB no mostró diferencia significativa entre la vacunación a los días 1 y 9 de edad, con ambas vacunas; así como tampoco se encontró diferencia significativa entre los grupos vacunados y su respectivo grupo testigo. Butcher y col⁽⁵⁴⁾, Haffer⁽³⁰⁾ y Kuney y col⁽⁵⁵⁾ coinciden al mencionar que el IB proporciona información útil para determinar si existe alguna alteración en el desarrollo de la bolsa cloacal tomando como referencia el peso corporal. También afirman, que el IB permanece constante durante el periodo de crecimiento de las aves y la

variación natural en el tamaño de la bolsa cloacal se debe a factores tales como la estirpe, región de crianza de las aves, tipo de explotación y características propias en cada caso. Mazariegos y col⁽²⁷⁾ establecen que valores de IB de 0.23 o menos, pueden utilizarse como indicadores de atrofia; según lo anterior, en este estudio los grupos vacunados presentaron atrofia, la cual pudo deberse a la interacción del virus vacunal y el virus de desafío, o pudo deberse a que el virus vacunal no produjo una adecuada respuesta inmune que neutralizara al virus de desafío y evitara la atrofia bursal; en los grupos testigo el IB demuestra que el virus de desafío produjo atrofia bursal de acuerdo con Mazariegos y col⁽²⁷⁾.

Al igual que lo ocurrido con el IB, el RTB no mostró diferencia significativa entre la vacunación a los días 1 y 9 de edad, con ambas vacunas; así como tampoco se encontró diferencia significativa entre los grupos vacunados y su respectivo grupo testigo. Casaubón y col⁽³²⁾ mencionan que el uso del RTB es limitado, debido a que no permanece constante durante todo el período de crecimiento del ave, además de que el largo del metatarso puede variar por factores que no reflejan la condición del sistema inmune de las aves como la estirpe, sexo, edad y peso corporal. Rountree⁽²²⁾ menciona que los valores de RTB de 16.2 o menos, pueden utilizarse como indicadores de atrofia; de acuerdo con esto, en este estudio los promedios de los RTB de los pollos vacunados al día 1 de edad con ILEP y el grupo testigo de los pollos vacunados al día 9 de edad tuvieron valores menores de 16.2, es decir, los pollos de estos grupos presentaron atrofia bursal. En el grupo vacunado al día 1 de edad con ILEP pudo deberse a una interacción entre el virus vacunal y el virus de desafío, o pudo deberse a que el virus vacunal no produjo una adecuada respuesta inmune que neutralizara al virus de desafío y evitara la atrofia bursal. En el grupo testigo de los pollos vacunados al día 9 de edad el RTB muestra que el virus de desafío produjo atrofia bursal, ya que este grupo no fue vacunado

Guerrero⁽²⁸⁾ propone que el RTB puede ser un indicador útil con respecto al índice bursal, ya que encontró índices de correlación altos y homogéneos entre ambos parámetros. Por el contrario, los índices de correlación entre el IB y el RTB resultaron ser muy heterogéneos, en el estudio realizado por Banda⁽¹¹⁾, por lo que cuestiona el uso limitado del RTB. De igual manera, Santiago⁽⁵⁶⁾ obtuvo índices de correlación bajos y heterogéneos entre el IB y el RTB, por lo que menciona que no es útil usar el RTB para estimar el comportamiento del IB resulta cuestionable.

HISTOPATOLOGÍA DE BOLSA CLOACAL

Las lesiones histológicas de la bolsa cloacal en los grupos vacunados, se debieron a la interacción del virus vacunal y el virus de desafío; en el caso de los grupos testigo, se debieron solo al virus de desafío; esto debido a que tanto los virus vacunales como los virus desafío y los causantes de infecciones naturales generan lesiones bursales y atrofia bursal.^(52,53)

La severidad total de las lesiones histológicas en bolsa cloacal evaluadas mediante la MI, fue mayor en el grupo vacunado al día 9 de edad con ILEP con respecto a los grupos vacunados al día 1 de edad. En el caso de las lesiones evaluadas mediante la MET, la vacunación al día 9 de edad con ambas vacunas y la vacunación al día 1 de edad con ILCC, tienen una severidad de lesiones en tejido linfóide mayor que en el resto de los grupos; un resultado igual, se obtuvo al evaluar el tejido epitelial de la bolsa con la MET. Ambas metodologías coinciden, por lo tanto en que la vacunación a los 9 días de edad provocan mayor severidad de lesiones en la bolsa cloacal; contrario a lo encontrado en este estudio, Banda⁽¹¹⁾ menciona que conforme es mayor la edad de las aves cuando ocurre la infección con VIBF, son menos severas las lesiones bursales que provocan el efecto inmunodepresor de la enfermedad. Por su parte, Naqui⁽¹¹⁾ describe que si las aves

se infectan al día de edad la inmunodepresión es severa, si ocurre a los 7 días de edad es moderada y si ocurre entre los 14 y 21 días de edad es leve; esto no ocurrió en esta investigación con la cepa vacunal intermedia, ya que en todos los grupos, las lesiones predominantes tuvieron una severidad de leve a moderado y moderado, evaluadas por ambas metodologías. Al igual que como ocurrió en este estudio, Rosales y col⁽⁵⁸⁾ encontraron que en el quinto día posinfección, la atrofia fue evidente en aves inoculadas con la cepa Edgar.

En cuanto al curso de las lesiones en la bolsa cloacal evaluadas mediante la MI, el curso predominante en todos los grupos fue el subagudo con severidad de leve a moderado. La evaluación de las lesiones bursales mediante la MET en tejido linfoide fue similar, ya que en todos los grupos se encontraron mayores porcentajes de lesiones subagudas con severidad leve a moderada y moderada. En ambas metodologías, el resultado es similar a lo observado por Merino y col⁽⁵¹⁾, quienes mencionan que vacunaron pollos a los días 6 y 16 de edad, y al analizar las bolsas a los 24 días de edad, se observaron lesiones subagudas leves como consecuencia de la neutralización del primer virus vacunal por los anticuerpos maternos y la posterior replicación del segundo virus vacunal, el cual lesionó la bolsa cloacal. En el presente estudio el virus vacunal fue neutralizado por los anticuerpos maternos, y posteriormente el virus de desafío lesionó la bolsa cloacal provocando en todos los grupos bursitis subaguda de leve a moderada.

El curso de las lesiones en tejido epitelial evaluadas mediante la MET mostró que el grupo vacunado al día 1 con ILCC y su grupo testigo presentaron un mayor porcentaje de lesiones agudas leves a moderadas, por el contrario, el grupo testigo de los vacunados al día 9 de edad presentó un mayor porcentaje de lesiones crónicas con severidad leve a moderada, en el resto de los grupos predominaron las lesiones subagudas leves a moderadas. Con respecto a esto, no existen

informes donde se haya evaluado la severidad y el curso de las lesiones en el tejido epitelial de la bolsa cloacal. Craig y col⁽⁵⁹⁾ mencionan que mediante la observación microscópica de la bolsa se determina el tipo de lesión presente en el tejido y el tiempo aproximado de infección, de acuerdo con esto, en este estudio se identificó el tiempo aproximado de infección de acuerdo con el porcentaje y el curso de las lesiones predominantes en tejido linfóide y epitelial de la bolsa cloacal.

En este estudio se encontró que la cepa de desafío Edgar, provocó de manera predominante lesiones de curso subagudo; contrario a lo encontrado por Sivanandan y col⁽⁶⁰⁾, quienes mencionan que al análisis histopatológico lo más común es detectar lesiones crónicas en la bolsa cloacal de pollos infectados con el VIBF, las cuales producen cuadros clínicos más graves debido a la inmunosupresión que ocasionan.

Al evaluar el tipo de lesión en tejido linfóide utilizando la MET, se encontró que en el caso de las lesiones inflamatorias, solo en el grupo vacunado al día 9 de edad con ILEP predominaron las lesiones de este tipo; a pesar de que este fue el único grupo donde predominaron este tipo de lesiones, todos los grupos presentaron lesiones inflamatorias. De acuerdo con Shane⁽⁶¹⁾, las lesiones inflamatorias en la bolsa cloacal se aprecian entre 18 horas y 4 días posinfección, además Banda⁽¹¹⁾ al evaluar tres virus aislados de granjas en México encontró que las aves inoculadas con los tres aislamientos presentaron inflamación de leve a moderada hasta el día 21 posinoculación; lo que concuerda con la evaluación al día 5 posinfección, cuando se encontraron lesiones inflamatorias.

En cuanto a las lesiones hiperplásicas en tejido linfóide evaluadas mediante la MET, en ninguno de los grupos vacunados ni en sus grupos testigo este tipo de

lesión fue la predominante. En este estudio, al igual que como lo mencionan Cheville⁽⁶²⁾ y Ridell⁽⁶³⁾, la hiperplasia en las células dendríticas fue la más importante, por lo cual no se evaluó la hiperplasia de las células corticomedulares con el uso de la MET, aunque con el uso de la MI se evaluaron tanto la hiperplasia de células dendríticas como la hiperplasia de células corticomedulares. Por su parte, Banda⁽¹¹⁾ encontró en su investigación que la hiperplasia de células corticomedulares fue mayor en comparación con las dendríticas.

Por otro lado, las lesiones necróticas en tejido linfoide evaluadas con la MET fueron las de mayor porcentaje en todos los grupos excepto en el vacunado al día 9 de edad con ILEP. Lo encontrado por Banda⁽¹¹⁾ coincide con este estudio, ya que menciona que la necrosis de la bolsa de Fabricio es la lesión principal que provoca el VIBF, a su vez la necrosis provoca atrofia de este órgano. Rosales⁽⁴⁶⁾ menciona que la necrosis producida por el VIBF es más severa en las células blásticas o precursoras que en las células maduras, esto hace suponer que los pollos vacunados a una edad más temprana, deberían presentar lesiones necróticas más severas, contrario a esto, en este estudio no se observó diferencia entre los dos grupos vacunados al día 1 de edad y el grupo vacunado al día 9 con ILCC. La atrofia bursal es consecuencia directa de la necrosis en el tejido linfoide siendo evidente desde el día 1 posinfección de acuerdo con Cheville⁽⁶²⁾ y Ridell⁽⁶³⁾; por otro lado, Rosales y col⁽⁵⁸⁾ mencionan que en el quinto día posinfección, la atrofia es evidente en aves inoculadas con la cepa Edgar, como ocurrió en este estudio.

Casaubón y col⁽³⁷⁾ y Ruiz⁽⁶⁴⁾ mencionan que las lesiones microscópicas causadas por el VIBF no son patognomónicas, debido a que la reducción en la población linfoide y atrofia folicular se puede observar en la enfermedad de Marek, la reticuloendoteliosis, la enfermedad de Newcastle, deficiencia de ácido pantotémico, la intoxicación por nitrofurazona y la intoxicación por aflatoxinas. Además

Mazariegos y col⁽²⁷⁾ y Lucio y col⁽⁴⁰⁾ mencionan que el IBF no es la única causa de inmunodepresión por daño a la bolsa de Fabricio, por lo que debe relacionarse la inmunodepresión con los signos clínicos y las lesiones macroscópicas y microscópicas.

Contrario a lo ocurrido en este estudio, en que la atrofia bursal observada mediante la determinación del IB, el RTB y la evaluación histopatológica de las bolsas cloacales de los grupos vacunados y de sus respectivos grupos testigo, reflejaron el estado inmune humoral, ya que los títulos de anticuerpos contra IBF no se consideran protectivos. Sánchez⁽²³⁾ concluyó en su investigación que las lesiones bursales no reflejaron el estado inmune de las aves (títulos de anticuerpos), por lo que sugiere que el aspecto más importante para evaluar dicho estado inmune sea el seguimiento serológico. Santiago⁽⁵⁶⁾ también coincide con esto, al mencionar que la observación de lesiones microscópicas en la bolsa de Fabricio resulta de utilidad, pero no es concluyente por que debe relacionarse con los hallazgos en la evaluación serológica. Por su parte, Paasch⁽⁶⁵⁾ agrega que la desventaja de la evaluación histopatológica de la bolsa de Fabricio, es la baja capacidad para determinar si las lesiones fueron causadas por IBF o por otros agentes, para lo cual se sugiere el uso de la MET en conjunto con el conocimiento de la patogénesis y las lesiones provocadas en la bolsa cloacal por los diferentes agentes etiológicos que la afectan.

La vacunación de pollos de engorda a los días 1 y 9 de edad con una cepa intermedia de VIBF, es una alternativa para el inicio de la inmunización activa, sobre todo en granjas con exposición temprana al virus causante de infecciones naturales; ya que los anticuerpos maternos neutralizan a este virus y el virus vacunal promueve la interferencia viral contra el mismo de acuerdo a lo mencionado por Kuby⁽⁴⁹⁾. A pesar de que no se observó una producción de

anticuerpos en títulos protectivos después de la vacunación, es muy probable que el sistema inmune de las aves se sensibilizó contra los antígenos del VIBF y ante una segunda vacunación, podrían observarse títulos de anticuerpos protectivos como lo observaron Lukert⁽⁵⁰⁾ y Merino y col⁽⁵¹⁾ en sus respectivas investigaciones.

De la investigación realizada, se puede concluir que la vacunación de pollos de engorda a los días 1 y 9 de edad con una cepa intermedia de VIBF, es una alternativa para el inicio de la inmunización activa, sobre todo en granjas con exposición temprana al virus causante de infecciones naturales; ya que los anticuerpos maternos neutralizan a este virus y el virus vacunal promueve la interferencia viral contra el mismo de acuerdo a lo mencionado por Kuby⁽⁴⁹⁾. A pesar de que no se observó una producción de anticuerpos en títulos protectivos después de la vacunación, es muy probable que el sistema inmune de las aves se sensibilizó contra los antígenos del VIBF y ante una segunda vacunación, podrían observarse títulos de anticuerpos protectivos como lo observaron Lukert⁽⁵⁰⁾ y Merino y col⁽⁵¹⁾ en sus respectivas investigaciones.

En este estudio, tanto el IB como el RTB de los grupos vacunados a los días 1 y 9 de edad con cepas Lukert intermedias del VIBF, son coincidentes con el análisis histopatológico de la bolsa cloacal. Los hallazgos macroscópicos y el análisis histopatológico muestran que en el caso de los 4 grupos vacunados, las bolsas cloacales presentaron diversos grados de atrofia, aunado a esto, el análisis serológico mostró que no hubo una respuesta inmune humoral por efecto de la vacunación que pudiera constatarse por la producción de anticuerpos contra IBF. Los grupos testigo tuvieron hallazgos macroscópicos e histológicos coincidentes, ya que ambos mostraron la presencia de atrofia bursal como resultado de las lesiones causadas por el virus de desafío. Contrario a lo encontrado en este estudio, tanto Banda⁽¹¹⁾ como Sánchez⁽²¹⁾ coinciden en mencionar que el IB, el RTB y el estudio

de las lesiones histológicas en bolsa cloacal pueden ser insuficientes y no reflejar el estado inmune de las aves. Banda⁽¹¹⁾ menciona que aunque se observen alteraciones importantes en el sistema linfoide, eso no significa un daño funcional en la respuesta inmune tanto humoral como celular; Sánchez⁽²³⁾ considera que el seguimiento serológico es el aspecto más importante para conocer el estado inmunológico de las aves.

Con fines de investigación, la MET es una metodología que tiene como principal ventaja, proporcionar información detallada y evaluar de manera específica las lesiones histológicas en la bolsa cloacal, por lo que su empleo es útil para conocer la predominancia de las diversas lesiones que se pueden observar en la bolsa cloacal, de acuerdo con el porcentaje de presentación de estas. La MET tiene como principal desventaja que a diferencia de la MI, es una metodología que puede requerir mayor inversión de tiempo para su realización, pero esta no es razón suficiente para considerarla menos práctica, ya que proporciona mayor cantidad y variedad de información. El conocimiento de los porcentajes de presentación de las diversas lesiones en la bolsa cloacal, permite evaluar la virulencia de los diversos agentes etiológicos en este órgano.

La vacunación a los días 1 y 9 de edad con ambas vacunas empleadas fueron muy similares, ya que en ambos casos, los títulos de anticuerpos posvacunales no se consideraron protectivos, los hallazgos macroscópicos fueron iguales y reflejaron lo observado en el análisis serológico, y por último, de manera global la evaluación de lesiones histológicas no mostró que la edad de vacunación o la vacuna empleada causaran más lesiones una u otra en la bolsa cloacal de las aves en este estudio.

LITERATURA CITADA

1. Edwards KR, Muskett JC, Thorton DH. Duration of immunosuppression caused by a vaccine strain of infectious bursal disease virus. *Res Vet Sci* 1992; 32: 79-83.
2. Faragher JT, Wyeth PJ. Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease. *Vet Rec* 1984; 95: 385-388.
3. Graham HP. Evaluation of immune competence, factors causing immunosuppression. *Poult Dig* 1983; 42: 18-23.
4. Kumar SDV, Rao AT. Complement levels in chicks infected with infectious bursal disease virus. *Indian J Vet* 1991; 68: 1012-1014.
5. Lucio DE. La infección de la bolsa de Fabricio. *Memorias de II Jornada Médico Avícola*; 1991; México (D.F.) México. 1991: 108-117.
6. Lukert PD, Saif YM. Infectious bursal disease. In: Calnek BW, editor. *Diseases of Poultry*. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1991: 648-663.
7. McFerran JB. Infectious Bursal Disease. In: McFerran JB, McNulty MS; editors. *Virus Infections of Birds*. Series: Horzinek MC; series editor. *Virus Infection of Vertebrates*. Volume 4. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publisher B.V. 1993: 213 - 228.
8. Quiroz MA. Factores que causan inmunosupresión en las aves y su impacto económico. *Memorias de III Seminario Avícola Clientes Intervet: Enfermedades Infecciosas Inmunodepresoras*; 1999; México (D.F.) México. Intervet México, S.A. de C.V. 1999: 12 - 18.
9. Saif YM. Immunosuppression induced by infectious bursal disease virus. *Vet Immunol Immunopathol* 1991; 30: 45-50.
10. Sharma JM, Dohms JE, Metz AL. Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis* 1989; 33: 112-124.

11. Banda A. Obtención, serotipificación y caracterización de la virulencia de tres aislamientos de campo del virus de la infección de la bolsa de Fabricio IBF en México (tesis de maestría). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.
12. Craft DW, Brown J, Lukert P. Effects of standard and variant strains of infectious bursal disease virus on infections of chickens. *Am J Vet Res* 1990; 51: 1192-1197.
13. Glisson JR. Efecto de la Inmunosupresión sobre otras Enfermedades. Memorias de III Seminario Avícola Clientes Intervet: Enfermedades Infecciosas; 1999; México (D.F.) México. Intervet México, S.A. de C.V. 1999: 19 - 27.
14. Banda A. Enfermedades Inmunosupresoras de Etiología Viral. Memorias de Diplomado en Producción Avícola; Módulo IV: Clínica y Terapéutica de la Aves, 2000, 19 al 24 de junio; México (D.F.) México. División de Educación Continua y Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 2000: 51-56.
15. Choreño TJ. Determinación de virulencia de 4 aislamientos del virus de la Infección de la bolsa de Fabricio (tesis de licenciatura). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1993.
16. Denise H, Thorton, Pattison M. Comparison of vaccines against Infectious bursal disease. *J Comp Path* 1975; 85: 597-610.
17. Giambrone J. Gumboro vaccines, Hart-hitting advice. *Broiler Industry* 1983; October: 80-87.
18. Hein R. Estrategias para controlar el efecto de inmunosupresión causado por el virus de la Infección de la bolsa de Fabricio. Memorias de III Seminario Avícola Clientes Intervet: Enfermedades Infecciosas, 1999; México (D.F.) México. Intervet México, S.A. de C.V. 1999: 28 - 31.

19. Klaus O. Prevención de la infección de la bolsa de Fabricio (Enfermedad de Gumboro) por medio de vacunas inactivadas. Trad. Márquez, M.A. Memorias de I Seminario sobre la prevención y control de la infección de la bolsa de Fabricio; 1983; México (D.F.) México. México (D.F.) Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, A.C. 1983.
20. Manakhly EM, Bekheit AB. The Pathology of broilers experimentally infected with infectious bursal disease virus and vaccinated against Newcastle. *Egyptian J Comp Path Clin Pathol* 1992; 5: 55-64.
21. Naqi SA, Millar DL, Grumbles LC. An evaluation of three commercially available infectious bursal disease immunization. *Avian Dis* 1980; 24: 233-240.
22. Rountree JL. The technique for quantification of thymus, bursa and bone marrow and other changes. Program Consultant Avian Health and Management. Litchfield, ME., U.S.A.; 1985.
23. Sánchez CA. Evaluación de dos cepas vacunales del virus de la infección de la bolsa de Fabricio, en pollos de engorda comerciales (tesis de maestría). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1994.
24. Tierce JF. Performance of Leyer-type chickens as related to body conformation and composition a static analysis of shanh length and body weight at 20 weeks of age. *Poul Sci* 1985; 64: 605-609.
25. Winterfield RD, Thacker HL. Immune response and pathogenicity of different strain of infectious bursal disease virus applied as vaccine. *Avian Dis* 1978; 22: 721-731.
26. Winterfield RD, Dhillon AS, Thacker HL. Characteristic of apparent derivatives of the 2512 strain of Infectious bursal disease virus when used as vaccine. *Avian Dis* 1981; 25: 900-910.
27. Mazariegos LA, Lukert PD, Brown J. Pathogenicity and immunosuppressive properties of Infectious bursal disease "intermediate" strains. *Avian Dis* 1990; 34: 203-208.

28. Guerrero R. Evaluación del daño bursal mediante el Índice Bursal, el Rango Tarso Bursal y el estudio Histopatológico en pollos de engorda vacunados contra la Infección de la bolsa de Fabricio (tesis de licenciatura). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1993.
29. Douglas BG. Causas y evaluación de la inmunosupresión. Memorias de IV Congreso Nacional de Avicultura; 1992. Caraballeda (Venezuela). 1992: 1-9.
30. Haffer K. Field studies of the 2512 strain of infectious bursal disease. Avian Dis 1982; 26: 78-83.
31. Abasiokong SF. Early prediction of performance in broilers: relationship between length of tarsometatarsus and weight gain. Br Poult Sci 1986; 27: 345-347.
32. Casaubón M, Altamirano R, Valladares JC. Metodología para cuantificación del curso, severidad y distribución de las lesiones bursales. Memorias de IV Jornada Médico Avícola; 1993; México (D.F.) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 1993.
33. Casaubón MT, Altamirano R, Valladares JC. Importancia de la cuantificación de severidad de lesiones bursales en el diagnóstico diferencial de respuesta vacunal e infección de campo por birnavirus. Memorias de XVIII Convención Nacional ANECA; 1993, 5 al 9 de mayo. Cancún (Quintana Roo) México. México (D.F.) Asociación Nacional de Ciencias Avícolas de México, A.C., 1993: 42 - 48.
34. Rubio ME, Escalante ML. Interpretación de Resultados Obtenidos Mediante la Técnica de ELISA en el Diagnóstico Aviar. México, D.F.: División de Educación Continua y Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; 1993: 1-5.
35. Solano W, Giambone JJ, Williams JC, Lauerman LH, Panangala VS, Garces C. Effect of maternal antibody in timing of initial vaccination of young white leghorn chickens against Infectious Bursal Disease Virus. Avian Dis 1985; 30: 648-652.

36. Giambrone JJ, Clay RP. Vaccination of day-old broiler chicks against Newcastle Disease and Infectious Bursal Disease using commercial live and/or inactivated vaccines. *AAES J* 1986; 12: 86970.
37. Andrews EJ, Bennett BT, Clark JD, Houpt KA, Pascoe PJ, Robinson GW, Boyce JR. 1993 Report of the AVMA Panel on Euthanasia: American Veterinary Medical Association. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 202: 229 – 249.
38. Allen TC. Hematoxilina y Eosina. In: Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. editores. *Métodos histotecnológicos*. Washington, D.C.: Instituto de Patología de las fuerzas armadas de los E.U.A., 1995.
39. Armed Forced Institute of Pathology. *Manual of Histologic staining Methods*. 3rd ed. N.Y.: McGraw Hill, 1968.
40. Lucio B, Hitchner SB. Immunosuppression and active response induced by infectious bursal disease virus in chickens with passive antibodies. *Avian Dis* 1980; 24: 189-196.
41. Lucio B, Hitchner SB. Infectious bursal disease emulsified vaccine: effect upon neutralizing antibody levles in the dam. *Avian Dis* 1979; 23: 466-478.
42. Marriot FHC. *The Interpretation of Multiples Observations*. Londres, U.K.: Academic Press, 1974.
43. Méndez RI. *Modelos Estadísticos Lineales*. 2^a edición. México, D.F.: CONACYT, 1981.
44. Daniel W. *Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud*. 3^a ed. México, D.F.: Limusa, 1987.
45. Cursiefen D, Vielitz E, Landgraf H, Becht H. Evaluation af a vaccina against infectious bursal disease in field trials. *Avian Path* 1979; 8: 341-351.
46. Rosales AG. Control actual de la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio. *Memorias de Seminario Internacional AMEVEA, Universidad de Georgia*; 1994. Athens (Georgia) E.U.A. 1994.

47. Weisman J, Hitchner SB. Virus-neutralización versus agar-precipitin test for detecting serologic response to infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1978; 22: 598-603.
48. Winterfield RW, Thacker HL. Immune response and pathogenicity of different strains of infectious bursal disease applied as vaccines. *Avian Dis* 1978; 22: 721-731.
49. Kuby J. *Immunology*. Third edition. New York, U.S.A.: W.H. Freeman and Company, 1997.
50. Lukert PD. El uso de vacunas vivas contra la enfermedad de Gumboro en presencia de anticuerpos maternos. No. 36. VINELAND UPDATE. Vineland, New Jersey, E.U.A.: VINELAND Laboratories.
51. Merino R, Cabriales J. Medición de anticuerpos maternos y de la respuesta a la vacunación contra la infección de la bolsa de Fabricio en pollos de engorda y pollas de reemplazo con el uso de una prueba ELISA y análisis histológico. Memorias de XXVI Convención Nacional ANECA; 2001, 25 al 28 de abril. Acapulco (Guerrero) México. México (D.F.) Asociación Nacional de Ciencias Avícolas de México, A.C., 2001. (En impresión).
52. Rosenberg J. Recognizing and diagnosis immunosuppressive disorders in broilers. *Poul Dig* 1992; 51: 12-14.
53. Naqui SA. Inmunogenicidad y patogenicidad de diferentes cepas del virus de la infección de la bolsa de Fabricio usadas como vacunas. Memorias de 29th Western Poultry Disease Conference; April 1980. Acapulco (Guerrero) México. 1980; 30-34.
54. Butcher GD, Harms RH, Winterfield RW. Relationship between delayed onset of egg production and involution of the bursa of Fabricius in white leghorn chickens. *Avian Dis* 1989; 33: 361-364.

55. Kunej DR, Bickford AA, Bell DD. Significance of bursal size survey. *Memorias de 29th Western Poultry Diseases Conference; 1980, abril. Acapulco (Guerrero) México. 1980: 43-46.*
56. Santiago R. Comparación entre los títulos de anticuerpos contra la infección de la bolsa de Fabrico a nivel sérico y en glándula de Harder en pollos de engorda vacunados por vía oral u ocular en condiciones experimentales (tesis de licenciatura). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1998.
57. Naqui SA. *The immune system and its suppression by infectious bursal disease virus.* No. 17. VINELAND UPDATE. Vineland, New Jersey, E.U.A.: VINELAND Laboratories.
58. Rosales AG, Villegas P, Lukert PD, Fletcher OJ, Mohamed MA, Brown J. Pathogenicity of recent isolates of infectious bursal disease virus in specific-pathogen-free chickens: protection conferred by an intermediate vaccine strain. *Avian Dis* 1989; 33: 729-734.
59. Craig W, Brewer A, Edgar S. Studies of infectious bursal disease in chickens: Effect of infectious bursal disease in gnotobiotic and battery raised white leghorn. *Poultry Sci* 1980; 59: 1006-1017.
60. Sivanandan V, Maheswaran D. Assay of immunocompetence in infectious bursal disease. *Memorias de 29th Western Poultry Disease Conference; April 1980. Acapulco (Guerrero) México. 1980; 47-49.*
61. Shane SM. La enfermedad de Gumboro en el pollo de engorda. *Memorias de V Curso de Actualización AVIMEX; 1993. México (D.F.) México, 1993.*
62. Cheville NF. Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen and thymus in the chicken. *Am J Pathol* 1967; 51: 527-551.
63. Ridell C. *Avian Histopathology.* Pennsylvania, USA.: American Association of Avian Pathologists, 1987.

64. Ruiz GV. Nosología de la bolsa de Fabricio. Memorias de la II Jornada Médico Avícola; 1991. México (D.F.) México. 1991; 98-107.
65. Paasch ML. Secuencia de la presentación de lesiones histopatológicas en bolsas de Fabricio de aves afectadas con infección de bolsa de Fabricio. México, D.F.: Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México A.C. y Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1983.

CUADROS

CUADRO 1.

DISEÑO EXPERIMENTAL POR GRUPOS

GRUPO	NO. DE POLLOS	VACUNA	VACUNACIÓN (DÍA DE EDAD)	DESAFÍO (DÍA DE EDAD)	EUTANASIA (DÍA DE EDAD)
1	15	ILEP ¹	1	21	26
2	15	ILCC ²	1	21	26
3	5	*	*	21	26
A	15	ILEP	9	29	34
B	15	ILCC	9	29	34
C	5	*	*	29	34

¹ ILEP = Interlukert adaptada a embrión de pollo.

² ILCC = Interlukert adaptada a la línea celular QT-35.

* Testigos.

CUADRO 2.

CLASIFICACIÓN DE LESIONES HISTOLÓGICAS EN TEJIDO LINFOIDE DE LA BOLSA CLOACAL

	CURSO AGUDO	CURSO SUBAGUDO	CURSO CRÓNICO
NECROSIS	- Apoptosis y necrosis linfoide.	- Atrofia linfoide.	- Atrofia folicular. - Quistes intrafoliculares.
HIPERPLASIA		- Hiperplasia de células dendríticas.	
INFLAMACIÓN	- Congestión y hemorragia. - Exudado seroso. - Infiltración por linfocitos.	- Combinación de las lesiones de los cursos agudo y crónico.	- Fibrosis.

CUADRO 3.

CLASIFICACIÓN DE LESIONES HISTOLÓGICAS EN TEJIDO EPITELIAL DE LA BOLSA CLOACAL

CURSO AGUDO	CURSO SUBAGUDO	CURSO CRÓNICO
- Necrosis epitelial.	- Hiperplasia epitelial. - Quistes epiteliales.	- Aspecto adenoide.

CUADRO 4.

PORCENTAJE DE DISTRIBUCIÓN DE LESIONES HISTOLÓGICAS BURSALES Y SU SEVERIDAD

% DE DISTRIBUCIÓN	SEVERIDAD
0	Sin Cambios Patológicos Aparentes
1 al 20	Leve
21 al 40	Leve a Moderado
41 al 60	Moderado
61 al 80	Moderado a Severo
81 al 100	Severo

CUADRO 5.

METODOLOGÍA INTEGRAL: DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO INTEGRAL POR GRUPO, DE ACUERDO CON LA CALIFICACIÓN DE SEVERIDAD DE LAS LESIONES HISTOLÓGICAS EN BOLSA CLOACAL

GRUPO	CALIFICACIÓN	CURSO	SEVERIDAD	PORCENTAJE DE LESIÓN
1	3.41	Subagudo	Moderada	51.25
2	3.19	Subagudo	Moderada	47.50
3	3.56	Subagudo	Moderada	48.75
A	3.82	Subagudo	Moderada	56.25
B	3.35	Subagudo	Moderada	45.42
C	3.55	Subagudo	Moderada	53.13

CUADRO 6.

METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN POR TEJIDO: DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO INTEGRAL POR GRUPO, DE ACUERDO CON EL PORCENTAJE DE LAS LESIONES HISTOLÓGICAS PREDOMINANTES EN TEJIDO LINFOIDE DE BOLSA CLOACAL

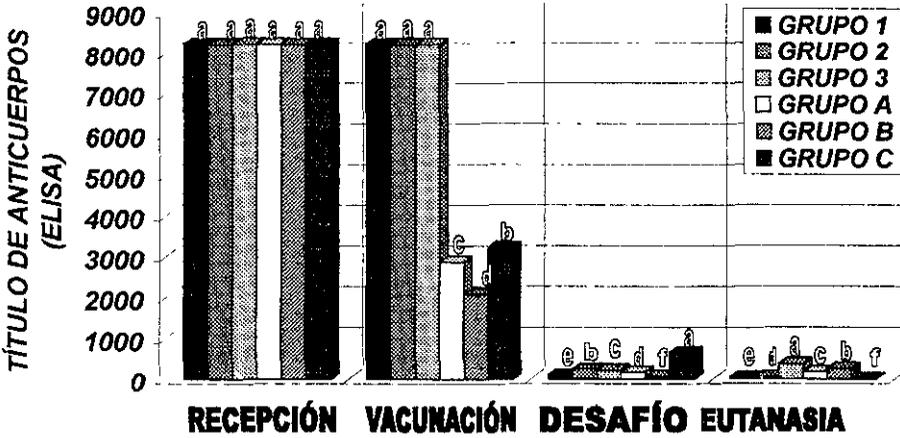
GRUPO	CURSO PREDOMINANTE	SEVERIDAD	PORCENTAJE	TIPO DE LESIÓN PREDOMINANTE	PORCENTAJE
1	Subagudo	Leve a Moderada	29.63	Necróticas	18.84
2	Subagudo	Leve a Moderada	36.12	Necróticas	27.00
3	Subagudo	Leve a Moderada	35.60	Necróticas	22.44
A	Subagudo	Moderada	41.87	Inflamatorias	26.09
B	Subagudo	Moderada	42.78	Necróticas	29.27
C	Subagudo	Leve a Moderada	34.24	Necróticas	25.76

CUADRO 7.

METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN POR TEJIDO: DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO INTEGRAL POR GRUPO, DE ACUERDO CON EL PORCENTAJE DE LAS LESIONES HISTOLÓGICAS PREDOMINANTES EN TEJIDO EPITELIAL DE BOLSA CLOACAL

GRUPO	CURSO PREDOMINANTE	SEVERIDAD	PORCENTAJE
1	Subagudo	Leve a Moderada	21.10
2	Agudo	Leve a Moderada	25.05
3	Agudo	Leve a Moderada	20.24
A	Subagudo	Leve a Moderada	34.11
B	Subagudo	Leve a Moderada	31.67
C	Crónico	Leve a Moderada	28.08

FIGURA 1: TÍTULOS DE ANTICUERPOS CONTRA VIBF POR ETAPA DE MANEJO.



GRUPO	RECEPCIÓN			VACUNACIÓN		
	Edad (días)	Media \pm S ¹	CV (%) ²	Edad (días)	Media \pm S	CV (%)
1	1	8233.25 \pm 1904.85 ^a	23.14	1	8233.25 \pm 1904.85 ^a	23.14
2	1	8233.25 \pm 1904.85 ^a	23.14	1	8233.25 \pm 1904.85 ^a	23.14
3	1	8233.25 \pm 1904.85 ^a	23.14	*	8233.25 \pm 1904.85 ^a	23.14
A	1	8233.25 \pm 1904.85 ^a	23.14	9	2876.10 \pm 1466.13 ^c	50.98
B	1	8233.25 \pm 1904.85 ^a	23.14	9	2070.10 \pm 881.55 ^d	42.59
C	1	8233.25 \pm 1904.85 ^a	23.14	*	3220.14 \pm 1526.23 ^b	47.40
GRUPO	DESAFÍO			EUTANASIA		
	Edad (días)	Media \pm S	CV (%)	Edad (días)	Media \pm S	CV (%)
1	21	97.67 \pm 247.61 ^c	253.52	26	28.90 \pm 129.24 ^c	447.21
2	21	235.3 \pm 511.79 ^b	217.45	26	39.59 \pm 163.23 ^d	412.31
3	21	207.57 \pm 549.18 ^c	264.58	26	364.50 \pm 577.22 ^a	158.44
A	29	166.38 \pm 472.34 ^d	283.90	34	170.79 \pm 341.95 ^c	200.22
B	29	62.78 \pm 182.73 ^f	291.07	34	251.44 \pm 458.39 ^b	182.30
C	29	646.75 \pm 395.90 ^d	61.21	34	0 \pm 0 ^f	0

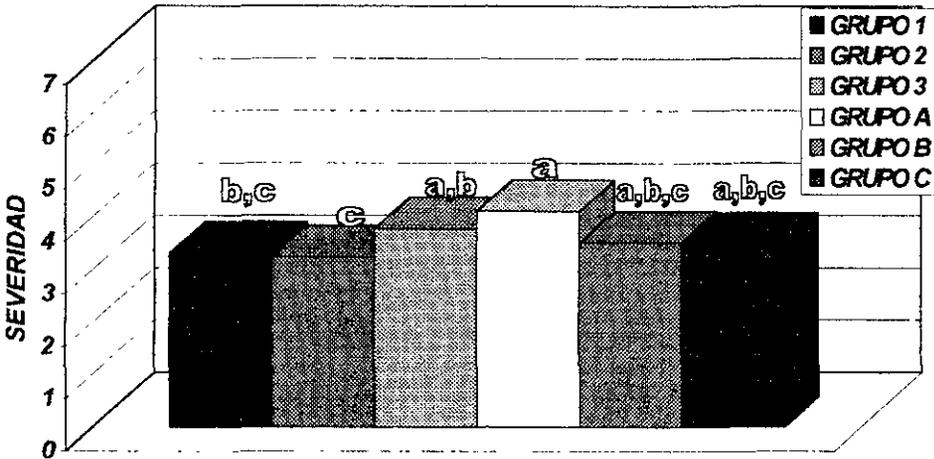
Media \pm Desviación Estándar

Coefficiente de Variación

Los grupos 3 y C son grupos testigo, por lo que no se vacunaron

letras distintas señalan diferencia significativa dentro de un cuadro (P<0.05)

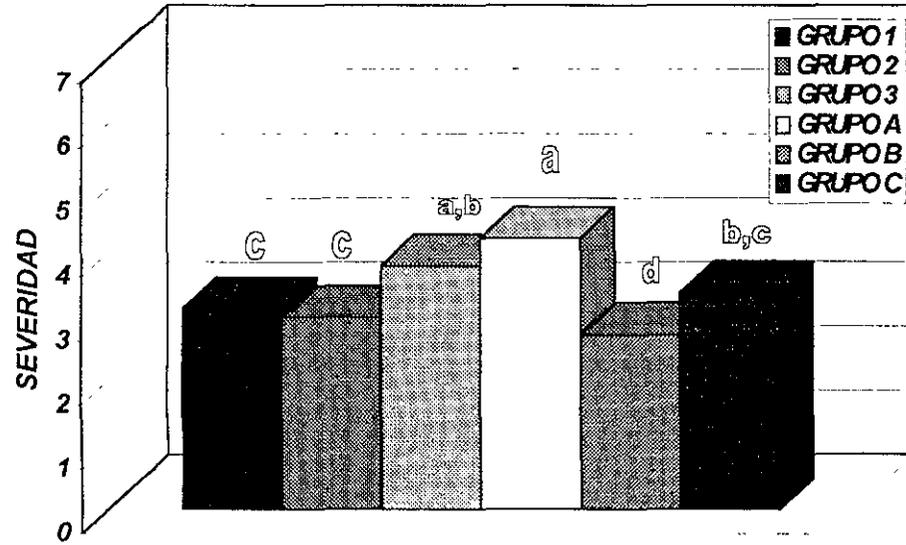
**FIGURA 2: METODOLOGÍA INTEGRAL
SEVERIDAD TOTAL DE LAS LESIONES HISTOLÓGICAS
EN BOLSA CLOACAL**



GRUPO	Mediana
1	3.33 ^{b,c}
2	3.27 ^c
3	3.80 ^{a,b}
A	4.13 ^a
B	3.53 ^{a,b,c}
C	3.50 ^{a,b,c}

Literales distintas señalan diferencia significativa dentro de un cuadro ($P < 0.05$).

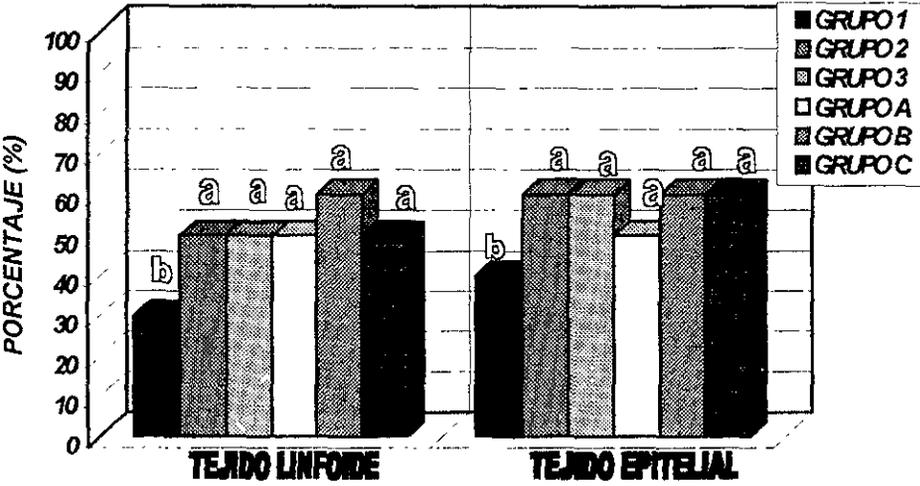
**FIGURA 3: METODOLOGÍA INTEGRAL
LESIONES HISTOLÓGICAS
DE CURSO AGUDO EN BOLSA CLOACAL**



GRUPO	CURSO AGUDO
	Mediana
1	3.13 ^c
2	3.00 ^c
3	3.80 ^{a,b}
A	4.23 ^a
B	2.73 ^d
C	3.38 ^{b,c}

Letras distintas señalan diferencia significativa dentro de un cuadro ($P < 0.05$)

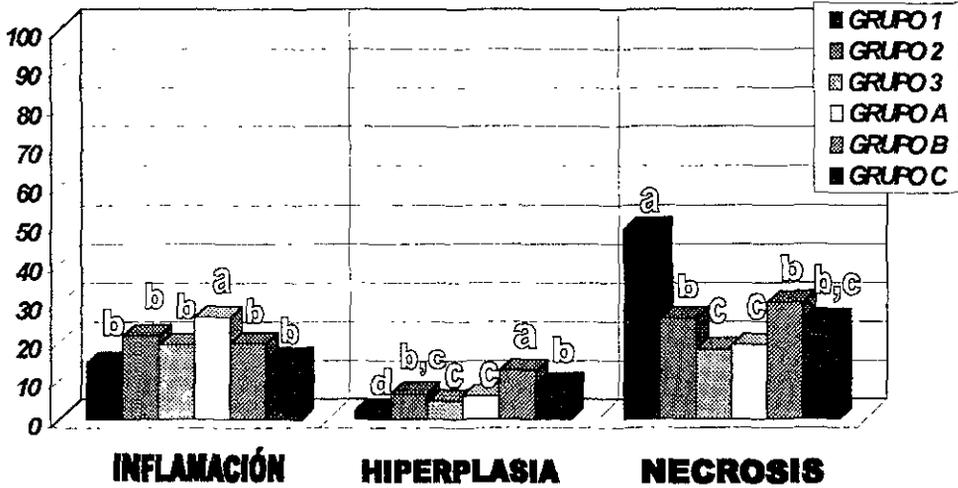
**FIGURA 4: METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN POR TEJIDO
 LESIONES EN TEJIDO LINFOIDE Y EPITELIAL
 DE BOLSA CLOACAL**



GRUPO	TEJIDO LINFOIDE	TEJIDO EPITELIAL
	Mediana	Mediana
1	30.00 ^b	40.00 ^b
2	50.00 ^a	60.00 ^a
3	50.00 ^a	60.00 ^a
A	50.00 ^a	50.00 ^a
B	60.00 ^a	60.00 ^a
C	50.00 ^a	60.00 ^a

Literales distintas señalan diferencia significativa dentro de un cuadro ($P < 0.05$)

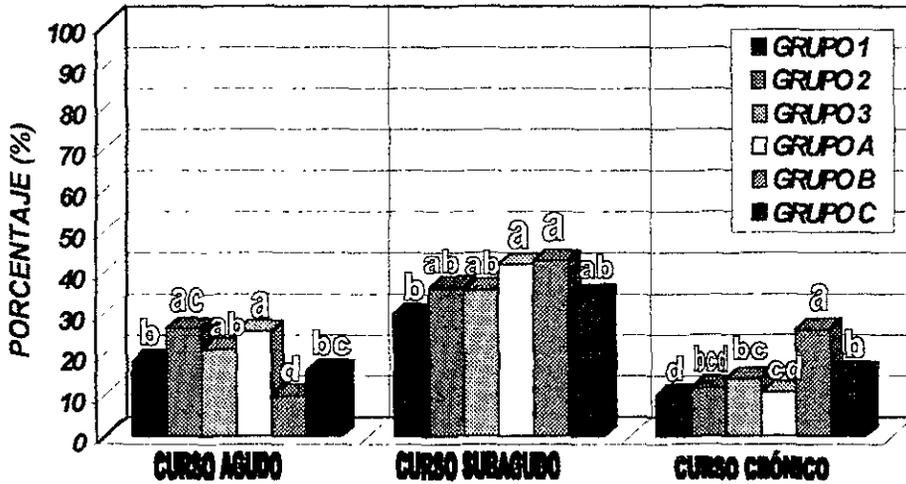
**FIGURA 5: METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN POR TEJIDO
TIPOS DE LESIONES EN TEJIDO LINFOIDE
DE BOLSA CLOACAL**



GRUPO	INFLAMACIÓN	HIPERPLASIA	NECROSIS
	Mediana	Mediana	Mediana
1	14.40 ^b	2.20 ^d	49.11 ^a
2	21.60 ^b	6.50 ^{b,c}	26.00 ^b
3	19.20 ^b	4.80 ^c	18.00 ^c
A	26.40 ^a	6.00 ^c	19.20 ^c
B	19.60 ^b	12.60 ^a	30.10 ^b
C	15.50 ^b	9.00 ^b	25.50 ^{b,c}

Letras distintas señalan diferencia significativa dentro de un cuadro ($P < 0.05$)

**FIGURA 6: METODOLOGÍA DE ANÁLISIS POR TEJIDO
CURSO DE LAS LESIONES EN TEJIDO LINFOIDE**

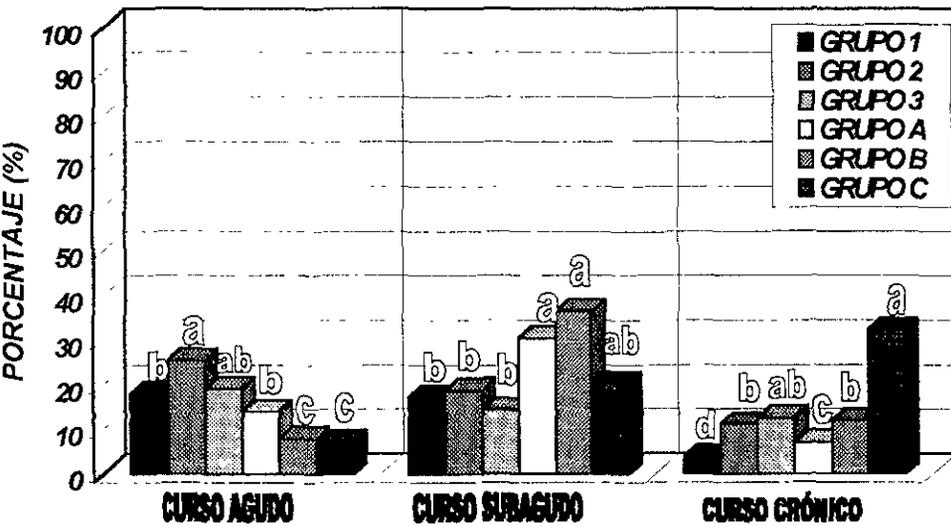


GRUPO	CURSO AGUDO	CURSO SUBAGUDO	CURSO CRÓNICO
	Mediana	Mediana	Mediana
1	15.00 ^b	23.40 ^b	8.10 ^d
2	28.00 ^a	38.00 ^{a,b}	9.10 ^{c,d}
3	20.40 ^{a,b}	38.00 ^{a,b}	9.60 ^c
A	27.60 ^a	42.50 ^a	10.40 ^c
B	9.60 ^c	46.80 ^a	28.00 ^a
C	17.00 ^b	34.50 ^{a,b}	14.00 ^b

Literales distintas señalan diferencia significativa dentro de un cuadro ($P < 0.05$).

INSTITUTO VETERINARIO
DE LA ESTACION

**FIGURA 7: METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN POR TEJIDO
CURSO DE LAS LESIONES EN TEJIDO EPITELIAL
DE BOLSA CLOACAL**



GRUPO	CURSO AGUDO	CURSO SUBAGUDO	CURSO CRÓNICO
	Mediana ^a	Mediana	Mediana
1	18.00 ^b	17.20 ^b	3.80 ^d
2	25.50 ^a	18.80 ^b	11.20 ^b
3	19.20 ^{a,b}	14.40 ^b	12.00 ^{a,b}
A	14.00 ^b	30.50 ^a	7.20 ^c
B	8.00 ^c	36.60 ^a	12.00 ^b
C	7.20 ^c	20.40 ^{a,b}	32.40 ^a

Literales distintas señalan diferencia significativa dentro de un cuadro ($P < 0.05$).