



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO**

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

**ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO DEL TUBO DIGESTIVO DE AVES
DESAFIADAS CON VIRUS INMUNODEPRESIVOS**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

JULIETA RAMIREZ TORRES

TUTOR: Norma Calderón Apodaca
COMITÉ TUTORAL: Yolanda López Vidal
Tamas Fehervari Bone

México D. F.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

2005

NOMBRE: Julieta Ramirez Torres

FECHA: 07/11/05

FIRMA: [Signature]

M: 350673



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Departamento de Producción Animal Aves por haberme abierto sus puertas para realización de este trabajo

A los miembros del comité tutorial y jurado por la orientación brindada

Al Dr. Néstor Ledesma Martínez, al Dr. Rubén Merino Guzmán por su apertura a transmitir sus conocimientos

A la Dra. Aida Luna, al Sr. Juan Merino Baranda, a José G. González, por su gran ayuda para realizar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme aceptado en el programa de becas.

LISTA DE CONTENIDOS

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
LISTA DE CONTENIDOS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
ABSTRACT	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS PARTICULARES	11
HIPÓTESIS	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	39
LISTA DE ABREVIATURAS	41
LITERATURA CITADA	42

LISTA DE FIGURAS

GRÁFICA 1.0 Resultados prueba de ELISA antes desafío virus de la anemia infecciosa del pollo aves 14 días de edad

Página 49

GRÁFICA 2.0 Resultados prueba de ELISA antes desafío virus de la infección de la bolsa de Fabricio aves 10 días de edad.

Página 49

TABLA 1.1 Resultados aislamiento viral en embrión de pollo y del pase de membranas y líquido alantoideo en fibroblastos de embrión de pollo de muestras colectadas a los 5 días post – inoculación.

Página 50

TABLA 1.2 Resultados aislamiento viral en embrión de pollo y del pase de membranas y líquido alantoideo en fibroblastos de embrión de pollo de muestras colectadas a los 7 días post – inoculación.

Página 50

TABLA 1.3 Resultados aislamiento viral en embrión de pollo y del pase de membranas y líquido alantoideo en fibroblastos de embrión de pollo de muestras colectadas a los 14 días post – inoculación.

Página 51

TABLA 1.4 Resultados aislamiento viral en embrión de pollo y del pase de membranas y líquido alantoideo en fibroblastos de embrión de pollo de muestras colectadas a los 21 días post – inoculación.

Página 51

TABLA 1.5 Resultados aislamiento viral en embrión de pollo y del pase de membranas y líquido alantoideo en fibroblastos de embrión de pollo de muestras colectadas a los 28 días post – inoculación.

Página 52

TABLA 2.0 Resultados amplificación virus de anemia infecciosa del pollo.
Página 53

CUADRO 1.1 Número de aves con lesiones en proventrículo después de la infección con el virus de la enfermedad de Marek.
Página 54

CUADRO 1.2 Número de aves con lesiones en ventrículo gástrico después de la infección con el virus de la enfermedad de Marek.
Página 54

CUADRO 1.3 Número de aves con lesiones en tonsilas cecales después de la infección con el virus de la enfermedad de Marek.
Página 55

CUADRO 2.1 Número de aves con lesiones en proventrículo después de la infección con el virus de la anemia infecciosa del pollo.
Página 56

CUADRO 2.2 Número de aves con lesiones en duodeno después de la infección con el virus de la anemia infecciosa del pollo.
Página 57

CUADRO 2.3 Número de aves con lesiones en yeyuno después de la infección con el virus de la anemia infecciosa del pollo.
Página 57

CUADRO 2.4 Número de aves con lesiones en ileón después de la infección con el virus de la anemia infecciosa del pollo.
Página 58

CUADRO 2.5 Número de aves con lesiones en tonsilas cecales después de la infección con el virus de la anemia infecciosa del pollo

Página 58

CUADRO 3.1 Número de aves con lesiones en proventrículo después del desafío con el virus de infección de la bolsa de Fabricio.

Página 48

CUADRO 3.2 Número de aves con lesiones en tonsilas cecales después de la infección con el virus de la infección de la bolsa de Fabricio.

Página 48

FIGURA 1 A Membrana corialantoidea de embrión de pollo inoculado con macerado de tonsilas cecales colectadas a los 28 días post-inoculación.

Página 61

FIGURA 1B Membrana corialantoidea de embrión de pollo inoculado con macerado de divertículo de Meckel colectado a los 21 días post-inoculación.

Página 61

FIGURA 1 C. Cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo sin inocular.

Página 61

FIGURA 1 D. Cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo inoculados con membrana corioalantoidea de embrión de pollo inoculado con divertículo de Meckel colectado a los 5 días post – vacunación.

Página 61

FIGURA 1 E. Cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo inoculados con membrana corioalantoidea de embrión de pollo inoculado con tonsilas cecales colectadas a los 7 días post – vacunación.

Página 61

FIGURA 2 A Infiltrado linfocitario difuso en lámina propia de proventrículo de ave vacunada con el virus de la enfermedad de Marek 21 días post - vacunación. 50X. Tinción HE. Escala 257µm.

Página 62

FIGURA 2 B Acercamiento de Infiltrado linfocitario difuso en lámina propia de proventrículo de ave vacunada con el virus de la enfermedad de Marek 21 días post - vacunación 200X. Tinción HE. Escala 90 µm

Página 62

FIGURA 2 C Células blásticas en tonsilas cecales de ave vacunada con el virus de la enfermedad de Marek a los 21 días post- vacunación.400X.Tinción HE. Escala 26 µm.

Página 62

FIGURA 3 A. Infiltrado linfocitario difuso en lámina propia de proventrículo de ave desafiada con el virus de anemia infecciosa del pollo a los 14 días post – inoculación 50X. Tinción HE. Escala 180 µm

Página 63

FIGURA 3 B Hiperplasia placas de Peyer en lámina propia de duodeno de aves desafiadas con el virus de anemia infecciosa del pollo 28 días post – inoculación 50X Tinción HE. Escala 300 µm

Página 63

FIGURA 3 C Necrosis y apoptosis linfocitaria en lámina propia de duodeno de aves desafiadas con el virus de anemia infecciosa del pollo 28 días post – inoculación. 400X. Escala 60µm

Página 63

FIGURA 4 A Infiltrado linfocitario difuso, atrofia de las folias, edema y distensión de las glándulas, en lámina propia de proventrículo de ave desafiada con el virus de infección de la bolsa de Fabricio 6 días post – inoculación.100X. Tinción HE Escala 180µm.

Página 64

FIGURA 4 B Necrosis y apoptosis de tejido linfocitario en tonsila cecal de ave desafiada con el virus de la infección de la bolsa de Fabricio a los 4 días post-desafío 400X. Tinción HE. 69 µm

Página 64

ANATOMOPATHOLOGICAL STUDY OF GASTROINTESTINAL TRACT OF BIRDS CHALLENGED WITH THREE DIFFERENT IMMUNOSUPPRESSIVE VIRUSES

The objective of this study was to characterize the effect of Marek's disease virus (MDV), chicken infectious anemia virus (CIAV) and infectious bursal disease virus (IBF) in the digestive tract of broiler chickens through histological, virological and molecular studies (PCR).

225 Ross X Ross broiler chicks were used in the trial were divided into six groups, which were maintained in isolation units. Blood samples were collected before virus challenge for serological test to discard the presence of antibodies against the infectious agents to be tested. Group I was used to study the effects of MDV and for that purpose 30 birds (group a) were subcutaneously vaccinated with 1000 PFU/dose and 30 birds were left as control (group b) receiving by the same route 0.1 ml of saline solution.

Group II was used for studying CIAV effects. Thirtyfive, 14 days old chicks (group c) were inoculated intramuscularly with 0.2 ml of 1×10^4 CIAV cell culture and another 35 control birds (group d) were inoculated with 0.2 ml of saline solution by the same route.

Group III was used for studying IBF effects. Fortyfive one day old chicken (group e) were orally and ocular inoculated with $1 \times 10^{3.8}$ DIEP. Fortyfive birds were left as control (group f) and received by the same route saline solution. Five birds of group a and b were euthanized on 5, 7, 14, 21 and 28 post vaccination days. The same number of birds were euthanized in group c and d on 3, 7, 14, 21 and 28 post challenge days. And five birds from groups e and f were euthanized on 12 hrs; 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 days post – inoculation (PI).

Organs for histological and virological studies were obtained from all birds. Samples were collected from proventriculus (PV) gizzard (G), duodenum (D), yeyunum (Y), ileus (I), Meckel's diverticulum (M) and caecal tonsils (CT).

MDV was isolated from PV at days 7, 14, 21 and 28; from G at days 14, 21 y 28; from D at days 5, 7, 14; from Y at day 5; from I at days 7, 14, 28 from M at 5, 7, 21 y 28 days and from C at days 5, 7, 14 and 28.

Presence of CIAV was detected by PCR from D, Y and M at days 14, 21 and 28, from I at days 21 and 28; from C at days 14 and 21.

Histological study of MDV revealed lymphoproliferative changes in C, and inflammatory changes in PV.

In birds, infected with CIAV lesions were detected in most of samples of digestive tract characterized by lymphoid necrosis and apoptosis.

In birds, infected with IBDV lesions were detected in PV, and CT characterized by lymphoid necrosis and apoptosis, edema and distension of the glands. Despite that the viruses studied are not regarded as pathogenic for the digestive tract, it is evident that they are able to damage the immune system in this location.

Key words: Digestive tract, Marek's disease, chicken infectious anemia agent, infectious bursal disease

ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO DEL TUBO DIGESTIVO DE AVES DESFIADAS CON VIRUS INMUNODEPRESIVOS

El objetivo del presente estudio fue determinar mediante estudios histológicos, virológicos y moleculares (PCR) el efecto que tienen los virus de la Enfermedad de Marek (EM), virus de la anemia infecciosa del pollo (AI) e infección de la bolsa de Fabricio (IBF) en el tracto digestivo de las aves (TD).

Se utilizaron 225 aves comerciales de engorda Ross X Ross de 1 día de edad sin vacunar ni sexar divididas en 6 grupos. Se descartó la presencia de estos tres agentes y se realizaron pruebas serológicas para la detección de anticuerpos. Para el estudio de EM se formaron 2 grupos de 30 aves (a y b). El grupo a fue vacunado al día de edad vía subcutánea en el tercio medio posterior del cuello con 1000 unidades formadores de placas de herpesvirus de pavo y el grupo b recibió 0.1 ml de solución salina fisiológica (SSF) por la misma vía. Para AI se emplearon 70 aves divididas en dos grupos (c y d). A los 14 días de edad el grupo a fue desafiado con 1×10^4 DICC vía intramuscular; el grupo d recibió 0.2 ml de SSF por la misma vía. Para IBF se utilizaron 90 aves de 10 días de edad divididas en 2 grupos (e y f). El grupo e recibió $1 \times 10^{3.8}$ dosis infectante en embrión de pollo de virus cepa Edgar vía oral y ocular (0.25 ml por cada vía). Las aves testigos (grupo f) recibieron la misma cantidad de SSF por las mismas vías. Para EM (grupos a y b) las aves fueron sacrificadas en grupos de 5 los días 5, 7, 14, 21, 28 días post vacunación. Para AI las aves se sacrificaron los días 3, 5, 7, 14, 21, 28 post inoculación. Para IBF a las 12h, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 días PI. Las muestras tomadas para la identificación de estos tres virus e histopatología fueron proventrículo (PV), duodeno (D), yeyuno (Y), ileón (I), divertículo de Meckel (DM) y Tonsilas cecales (TC). El virus de EM pudo ser aislado de diferentes segmentos del tubo digestivo, los hallazgos patológicos se encontraron en PV y TC siendo principalmente de tipo proliferativo e inflamatorio. El virus de AI se identificó en diferentes segmentos del TD, los cambios patológicos observados fueron necrosis y apoptosis linfocitarias. El virus de IBF produjo edema, distensión de las glándulas, e infiltrado linfocitario en PV; en TC se encontró necrosis y apoptosis linfocitaria.

Se concluye que estos virus producen efectos patológicos en el tracto digestivo de las aves además de los órganos blancos descritos en la literatura.

Palabras claves: Tubo digestivo, enfermedad de Marek, Anemia Infecciosa, infección de la bolsa de Fabricio.

INTRODUCCIÓN

El tracto digestivo de las aves es un tubo revestido por células epiteliales especializadas que continúan con las capas epiteliales que cubren la piel, debido a esto el tracto digestivo se encuentra abierto al ambiente externo, a organismos y agentes tóxicos que son introducidos mediante la ingestión.

A lo largo del tubo digestivo las células epiteliales se diferencian en un gran número de células que poseen funciones especiales. Estas células forman una barrera semipermeable que selectivamente permite el tránsito de fluidos, electrolitos y nutrientes. Además de estas funciones, las células del tracto digestivo son parte de una barrera física continua que protege contra la entrada de materiales y organismos extraños dentro de la circulación sanguínea y el acceso a otros órganos (Hoerr J. F. 2003). La crianza comercial de aves nunca se encontrará libre de patógenos a pesar de los esfuerzos en bioseguridad para minimizar la exposición a estos agentes. Es probable que muchas aves sean expuestas a múltiples agentes patógenos a pesar de haber sido criadas bajo buenas prácticas de manejo y nutrición.

En la avicultura moderna existen enfermedades inmunodepresivas, que presentan cuadros clínicos bien definidos, tales como anemia infecciosa, enfermedad de Marek e infección de la bolsa de Fabricio.

Anemia infecciosa del pollo (AI)

La anemia infecciosa del pollo es una enfermedad provocada por un Gyrovirus. Este virus presenta simetría icosaédrica, con un diámetro de 18 – 26 nm, y un solo polipéptido (MW 50 000). Este virus posee ADN circular de una sola hebra con un tamaño de 2.1 – 2.3 Kb con coeficiente de sedimentación en gradientes de sacarosa isoquinética estimado entre 91 S (Gelderblom H. et al 1989; Mc Nulty et al. y Todd D. et al 1990). Este virus crece en varias líneas celulares derivadas de la enfermedad de Marek ó de tumores provocados por leucosis linfoide. No es un

virus hemoaglutinante y tanto en cultivos celulares como en células hematopoyéticas y linfoblastos tímicos puede producir cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (Goyro M. et al 1987; Yuasa. N. et al 1979).

Existe evidencia que sugiere que únicamente hay un serotipo; aunque, las diferencias antigénicas entre aislamientos mediante estudios con anticuerpos monoclonales sugieren diferencias antigénicas (Chandratilleke D. et al 1991; McNulty M.S. et al 1990)

La enfermedad se caracteriza por producir anemia aplásica y atrofia linfoide generalizada con inmunosupresión concomitante.

Consecuentemente la anemia infecciosa se complica con infecciones secundarias bacterianas, fungóticas ó virales, el crecimiento de las aves es retardado y la mortalidad se encuentra generalmente entre un 10 y 20 % pero ocasionalmente puede alcanzar hasta un 60 % (Shat A. K. 2004.).

El virus de la anemia infecciosa puede diseminarse en forma horizontal y vertical. La transmisión a partir de huevos incubables es el medio más común de diseminación (Hoop R. K. 1992).

La transmisión por huevo únicamente ocurre de 8 a 14 días después de la infección experimental de gallinas, pero observaciones en campo indican que la infección vertical puede ocurrir durante un periodo de 3 – 9 semanas después de la exposición. El único signo específico de la infección es anemia, con un pico que alcanza su valor máximo entre 14 – 16 días después de la inoculación, con valores de 6 a 27 % (Shat A.2004.).

La lesión macroscópica más frecuente es la atrofia tímica; sin embargo, la atrofia de la medula ósea es la lesión más característica en los pollos afectados (Yuasa N. 1993)

Las lesiones histológicas en pollos anémicos son atrofia linfoide generalizada y depleción de la línea eritroide (Goyro M. et al. 1989; Pope C.1991).

En la médula ósea hay atrofia y aplasia; las línea hematopoyética se encuentra afectada (Shat A. 2004).

En aves inoculadas intramuscularmente al día de edad se observan cambios a partir del día 8 PI, el hematocrito se encuentra disminuido y el número de trombocitos, células blancas y rojas esta disminuido (Mc Nulty M. 1991) Los focos linfoides en el hígado, riñones, pulmones, proventrículo, duodeno, y tonsilas cecales se encuentran reducidos en tamaño y número de células que en los de las aves sanas (Goyro M., et al 1989)

Las epidemias de anemia infecciosa se encuentran frecuentemente asociadas al llamado síndrome hemorrágico con ó sin la concurrente dermatitis gangrenosa. Las lesiones que se observan en las aves son hemorragias subcutáneas e intramusculares (Vielitz E. et al 1988; Egström B. E. et al. 1984).

Es frecuente también encontrar equimosis en hígado, riñones, pulmones, proventriculo, duodeno, tonsilas cecales; las células hepáticas están hinchadas y los sinusoides hepáticos pueden estar dilatados (Goyro M. et al. 1989; Pope C.1991).

Infección de la bolsa de Fabricio (IBF)

La infección de la bolsa de Fabricio también conocida como enfermedad de Gumboro es una infección viral aguda, altamente contagiosa de pollos jóvenes. El virus de la IBF es miembro de la familia *Bimaviridae*, consta de ARN de doble banda segmentada, este virus presenta simetría icosaédrica, y un diámetro que varía de 55 – 65 nm (Dobos P. et al; Müller H. et al 1979).

Este virus está constituido por cuatro proteínas virales, que se denominan VP1, VP2, VP3 y VP4. Este virus es muy estable y puede permanecer en alojamientos

aviares indefinidamente, es resistente al éter y cloroformo, es estable a pH de 3 a 9.2 (Mc Ferran J.1993).

La enfermedad tiene dos formas de presentación, clínica y subclínica. Ambas están determinadas por la edad en la que ocurre la infección, la virulencia y la cepa así como el grado de inmunidad de las aves afectadas. Las células linfoides (especialmente las células B) son las células blanco. La bolsa cloacal es el órgano más afectado (Allan W. et al 1972).

El periodo de mayor susceptibilidad a la enfermedad clínica es entre las tres y seis semanas de edad. Las aves susceptibles menores de tres semanas de edad no presentan signos clínicos pero tienen infecciones subclínicas que son económicamente importantes como resultado de una inmunodepresión severa (Lukert P.et al 2004).

La inmunodepresión causada por esta enfermedad produce incremento en la susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas como, hepatitis con cuerpos de inclusión, laringotraqueítis infecciosa aviar, anemia infecciosa aviar, enfermedad respiratoria crónica complicada, enfermedad de Newcastle e infecciones por reovirus; asimismo, aumenta la susceptibilidad a *Salmonella sp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dermatitis gangrenosa e infecciones por *Eimeria sp* (Fartangher J.et al 1974)

La infección con el virus a una edad temprana compromete la respuesta humoral y local de las aves. La inmunodepresión parece ser resultado de un efecto directo (lisis de las células B ó de sus precursoras). El periodo de incubación es muy corto y los signos clínicos se observan al cabo de dos a tres días después de la exposición (Lukert P.et al 2004).

Uno de los primeros signos que se observan es la tendencia de algunas aves a picar sus propias cloacas. También se ha descrito diarrea blanquecina ó acuosa, anorexia, depresión, mal emplume, postración severa y finalmente la muerte

(Cosgrove A. 1962). Las aves afectadas pueden estar deshidratadas y en etapas terminales de la enfermedad, presentan hipotermia.

Enfermedad de Marek (EM)

La enfermedad de Marek es una enfermedad linfoproliferativa que afecta al sistema nervioso, y en mayor o menor grado otros órganos viscerales. Esta enfermedad es causada por un virus que se encuentra clasificado dentro del grupo de los herpesvirus, en este grupo se encuentran comprendidos tres distintos grupos con diferentes características biológicas; serotipo 1, 2, 3 respectivamente (Bullow V.V. et al y Bullow V.V et al 1975). La virulencia se encuentra asociada con el serotipo 1 dentro del cual se encuentran comprendidos varios patotipos:

El virus de la enfermedad de Marek es designado como Gallid herpesvirus 1, posee ADN de 60nm, de doble hebra, contenido en una cápsula que mide alrededor de 100 nm, posee simetría icosaédrica y es de naturaleza pleomórfica (Powell P. 1993).

En los últimos 50 años esta enfermedad ha provocado cuantiosas pérdidas económicas en la industria avícola. Desde los años setentas, la mayoría de las aves son vacunadas contra la enfermedad de Marek con el serotipo 1 atenuado o el herpesvirus de pavo. Desde el año de 1983, se usaron combinaciones bivalentes y polivalentes para proteger contra las cepas más virulentas de campo. Las vacunas son aplicadas a aves de un día de edad en embriones de 18 días de edad. Aunque la vacunación protege a las aves, esta enfermedad sigue siendo una de las principales enfermedades que afectan a las aves, debido al continuo aumento de la virulencia del virus de la enfermedad de Marek, debido probablemente a las fallas de la vacunación (Friedman A. et al 1992)

En general, los signos asociados con esta enfermedad son paresia asimétrica progresiva, y más tarde parálisis completa de una ó más extremidades. Los signos pueden variar de ave a ave, dependiendo de los nervios que se encuentren afectados, las aves también pueden presentar signos inespecíficos como pérdida

de peso, anorexia y diarrea, especialmente en las aves en las cuales el curso es prolongado (Witter L. R. et al 2004).

En casos agudos de esta enfermedad, los signos son mucho más explosivos e inicialmente son caracterizados por una alta proporción de aves con una severa depresión; días después, algunos animales desarrollan ataxia y subsecuentemente parálisis unilateral o bilateral de alguna de sus extremidades, otras pueden morir sin una enfermedad clínica extensa (Kenzy et al 1967).

La incidencia es muy variable, algunas aves que desarrollan signos pueden recuperarse de la enfermedad clínica (Powell P. 1993)pero generalmente la morbilidad es casi igual a la mortalidad, variando en aves no vacunadas de 25 – 30 % hasta un 60%. La transmisión de esta enfermedad puede ser directa ó indirecta, la diseminación del virus se lleva a cabo principalmente por la vía aérea. Aparentemente no existe la transmisión vertical y la transmisión a la progenie por contaminación externa del huevo es poco probable (Biggs P. et al 1967).

El periodo de incubación para la enfermedad producida experimentalmente está bien establecido; las manifestaciones clínicas tanto para la forma aguda como para la crónica se pueden observar de 8 a 18 días después de la inoculación (Witter L. et al 2004). Bajo condiciones de campo, puede presentarse una gran variación en el periodo de incubación de esta enfermedad, ya que existen una gran cantidad de factores involucrados, tales como la cepa utilizada, la dosis, estatus de inmunidad materna, ruta de infección, edad, raza y sexo. Los brotes pueden presentarse en aves de 3 a 4 semanas, las presentaciones mas severas empiezan desde las 8 – 9 semanas (Biggs P. et al 1967).

El tipo de lesiones más frecuente son las inflamatorias y las linfoproliferativas en diferentes órganos. Las lesiones en nervios son un hallazgo frecuente en aves afectadas, los tumores linfoides pueden ocurrir en uno ó varios órganos,

especialmente en ovarios, pulmones, corazón, mesenterio, riñón, hígado, bolsa, timo, glándulas adrenales, páncreas, proventrículo, intestino, iris, músculo esquelético y piel. En el caso del proventrículo; este se engrosa y adquiere una consistencia firme como resultado de infiltrados linfoides tumorales que varían de pequeños a grandes dentro y en medio de las glándulas (Witter L. et al 2004).

Estas enfermedades son conocidas desde hace muchos años y en la literatura se encuentran descritas las lesiones que producen sin embargo el efecto de estos virus no se conoce hasta después que se presentan los primeros signos clínicos y únicamente se describe el efecto que tienen sobre sus órganos blanco. Estas infecciones además de producir un efecto inmunodepresivo en el ave, podrían también producir lesiones en el tubo digestivo.

La infección de la bolsa de Fabricio, enfermedad de Marek y la anemia infecciosa del pollo tienen un gran impacto en la avicultura moderna. Hasta hace algunos años estas presentaban cuadros clínicos específicos y su efecto esta bien descrito en relación con los órganos blanco dónde actúan (Mc Nulty M.1991; Lukert P. et al 2004; Powell P. 1993)

No obstante de que se conocen los tiempos en los que aparecen las primeras lesiones, no se sabe que es lo que sucede en el ave antes de las primeras manifestaciones de la enfermedad. Resulta probable que estos virus antes de alcanzar sus órganos blanco afecten al tubo digestivo.

En los últimos diez años se ha observado que surgen cuadros clínicos diferentes donde se sospecha que los agentes antes mencionados tienen una participación importante provocando que su diagnóstico sea difícil y confuso (Goodwin M. 1996; Bayyari G. et al 1995; Huff G. et al 2001; Kouwenhoven B. et al 1978).

En situaciones de campo, estas infecciones se asocian con otros agentes infecciosos, factores nutricionales, ambientales y de manejo, haciendo difícil determinar la función primordial del virus de la enfermedad de Marek, el virus de la

anemia infecciosa del pollo y el virus de la infección de la bolsa de Fabricio en la ocurrencia natural de enfermedades gastrointestinales (Hoerr J. 2003). Adicionalmente las infecciones virales del tracto gastrointestinal probablemente son responsables del desarrollo de otras enfermedades extra gastrointestinales. El daño en la mucosa inducido por los virus favorece la entrada para otros patógenos como *Salmonella sp* y *Escherichia coli* cuyo daño también puede promover la adición de otros patógenos intestinales como resultado de la pérdida de los mecanismos de defensa como por ejemplo del glucocalix, la mucina y el microvilli. La mala absorción y la mala digestión que ocurren consecuentemente al daño inducido por los virus en la mucosa pueden resultar en deficiencias nutricionales especialmente en aquellas relacionadas con vitaminas liposolubles y minerales. Estas deficiencias pueden dañar el crecimiento y desarrollo de los órganos linfoides, particularmente de la bolsa de Fabricio y el timo. Este daño en los órganos linfoides resulta en deficiencia inmunológica e incremento en la susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas (Guy S. 1998).

La infección de las aves con estas enfermedades ha demostrado que económicamente tiene efectos negativos; Por ejemplo en el caso de anemia infecciosa, en parvadas en las cuales no se detectaron anticuerpos al sacrificio contra la anemia infecciosa del pollo hay una utilidad 13% neta mayor por cada 1000 aves, un índice de conversión alimenticia 2% mejor y un mayor peso corporal por ave, que en aves en las cuales se detectaron anticuerpos contra esta enfermedad al sacrificio (Mc Nulty M. S. 1991).

El presente estudio está orientado a estudiar las lesiones patológicas provocados por los virus de la enfermedad de Marek, virus de la anemia infecciosa del pollo e infección de la bolsa de Fabricio en el tubo digestivo. Para tal propósito se plantearon los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto patológico en el tubo digestivo causado por el virus de la enfermedad de Marek (EM), anemia infecciosa del pollo (AI) y virus de la infección de la bolsa de Fabricio (IBF) mediante estudios anatomopatológicos, virológicos y moleculares.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Identificar lesiones causadas por los tres agentes en distintas porciones del tubo digestivo; proventriculo, ventrículo gástrico, duodeno, yeyuno, ileón, divertículo de Meckel y tonsilas cecales a través de métodos de histológicos.

- b) Detectar la presencia de los tres agentes a través de métodos de aislamiento viral y biología molecular.

- c) Buscar y establecer un método práctico para detectar los agentes virales en el tubo digestivo.

HIPÓTESIS

Los virus de AI, EM e IBF producen efectos patológicos en el tubo digestivo de pollos de engorda que afectan sus funciones digestivas y sus mecanismos de defensa.

MATERIAL Y METODOS

Animales de experimentación:

Se utilizaron aves de engorda comerciales de estirpe Ross X Ross de un día de edad sin sexar ni vacunar. Previamente al desafío se realizó detección de anticuerpos contra estos tres agentes. Para la enfermedad de Marek se empleó la prueba precipitación en agar (AGP) Para en virus de la anemia infecciosa e infección de la bolsa de Fabricio se empleó la prueba de ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). Asimismo, se descartó la infección de las aves con estos tres agentes. Para constatar la ausencia del virus de la enfermedad de Marek se realizó aislamiento viral en embrión de pollo y cultivo celular; para la detección del virus de la anemia infecciosa del pollo se realizó prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y para la detección del virus de la infección de la bolsa de Fabricio se realizó la prueba transcriptasa reversa (RT - PCR).

Las aves se alojaron en las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, las aves fueron mantenidas en piso y alimentadas con alimento comercial y agua *ad libitum*. Las aves fueron observadas diariamente en busca de signos clínicos.

Se formaron seis grupos los cuales se mantuvieron aislados unos de otros.

Grupo I) Infectado con el virus de la enfermedad de Marek

Grupo II) Testigo para la enfermedad de Marek

Grupo III) Infectado con el virus de la infección de la bolsa de Fabricio.

Grupo IV) Testigo para la infección de la bolsa de Fabricio.

Grupo V) Infectado con el virus de anemia infecciosa

Grupo VI) Testigo para el virus de anemia infecciosa

Diseño experimental virus de la enfermedad de Marek:

Se utilizaron 60 pollos de engorda comerciales de un día de edad divididos en 2 grupos de 30 (grupo I) y (grupo II) los cuales permanecieron por 24 horas sin recibir tratamiento alguno para permitir su adaptación al medio.

Posteriormente, las aves fueron vacunadas con virus de la enfermedad de Marek en el tercio medio posterior del cuello con vacuna comercial liofilizada Serotipo 3 de herpesvirus de pavo con una concentración de 1000 UFP/dosis. La preparación de la vacuna se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante®.

La vacuna se preparó diluyendo una ampolleta liofilizada de 1000 dosis en 200 ml de diluyente estéril, equivaliendo 0.1 ml a una dosis de 1000/UFP. Simultáneamente a la vacunación de los pollos del grupo I (vacunado) con el virus EM; las aves del grupo II (testigo) recibieron 0.1ml de solución salina fisiológica (SSF) por la misma vía.

Después de la vacunación las aves fueron alimentadas con alimento comercial y agua *ad libitum*. Se realizó la observación diaria de las mismas. Las aves del grupo inoculado y del grupo testigo fueron sacrificadas en grupos de cinco por sobredosis de anestesia a los días 5, 7, 14, 21 y 28 días post – inoculación.

Estudio virológico

Para el estudio virológico fueron tomadas asépticamente muestras longitudinales de proventrículo (PV) y ventrículo gástrico (VG); muestras transversales de 1.5 cm de porción inicial de duodeno (D), yeyuno (Y) e ileon (I). El divertículo de Meckel (DM) fue colectado con una porción de intestino de 1.0 cm, ambas tonsilas cecales(TC) fueron tomadas transversalmente.

Las muestras tomadas para aislamiento viral fueron preservadas a – 85 ° C. Posteriormente fueron procesadas conforme al método empleado en el departamento de producción animal aves (Swayne E. et al 1996).

Las muestras fueron maceradas en un mortero estéril y homogenizadas con solución buferada de fosfatos (PBS) estéril en proporción 1: 10, fueron centrifugadas a 3000 rpm y el sobrenadante obtenido fue filtrado con una membrana de 0.45 μm y adicionado con antibiótico penicilina 100 000 UI/ml y estreptomicina 100mg/ml. El sobrenadante fue inoculado en embriones de pollo de 7 – 9 días de edad por la membrana corialantoidea. De los embriones que murieron dentro de las siguientes 24 horas se colectó líquido alantoideo para realizar pruebas de hemoaglutinación para descartar muerte provocada por virus hemaglutinantes, también se realizó siembra en agar sangre para descartar muerte por contaminación bacteriana. Después de 9 días de observación se colectó líquido alantoideo y se inspeccionaron las membranas para buscar placas. Posteriormente las membranas fueron maceradas junto con el líquido alantoideo en un mortero estéril y homogenizadas con PBS estéril, se centrifugaron a 3000 rpm y el sobrenadante obtenido fue filtrado con una membrana de 0.45 μm y adicionado con antibiótico penicilina 100 000 UI/ml y estreptomicina 100mg/ml. El sobrenadante obtenido fue inoculado en placas con cultivo celular primario de fibroblastos de pollo (25 μl por pozo) y mantenidos en una atmósfera con CO_2 al 5 % (Swayne E. et al 1996). El cultivo celular fue observado por nueve días para encontrar lesiones provocadas por el virus de la enfermedad de Marek.

Diseño experimental virus de anemia infecciosa del pollo

Se utilizaron 70 pollos de engorda de un día de edad las cuales permanecieron sin tratamiento alguno hasta los 14 días de edad.

Estas aves fueron inoculadas con una suspensión de 0.2 ml con una concentración de 1×10^4 dosis infectante cultivo celular DICC de virus de anemia infecciosa por vía intramuscular en la pechuga. El inóculo fue amablemente donado del cepario del doctor Néstor Ledesma Martínez Departamento de Producción Animal Aves. Después del desafío las aves fueron alimentadas con alimento comercial y agua *ad libitum*. Se realizó la observación diaria de las

mismas y fueron sacrificados en grupos de 5 aves los días 3, 5, 7, 14, 21 y 28 post inoculación. Para realizar pruebas de PCR fueron tomadas muestras longitudinales de proventrículo (PV) y ventrículo gástrico (VG); muestras transversales de 1.5 cm de porción inicial de duodeno (D), yeyuno (Y) e ileon (I). El divertículo de Meckel (DM) fue colectado con una porción de intestino de 1.0 cm, ambas tonsilas cecales (TC) fueron tomadas transversalmente.

Prueba de reacción en cadena de la polimerasa

A) Extracción de DNA

1. Los órganos fueron macerados en PBS estéril en proporción 2:10, posteriormente fueron centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos, se colectaron 250 μ l de sobrenadante y se incubaron toda la noche a 37° C con 250 μ l de 0.001M de EDTA – 0.01M de Tris- HCl (pH 8.0) (buffer TE) con dodecil sulfato de sodio (SDS 1%) y proteinasa K (1mg/ml)
2. Posteriormente se llevo a cabo la extracción con fenol - cloroformo-isoamílico (25:24:1) y cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1). El ADN se precipitó con etanol frío y después de concentrarlo fue resuspendido en agua DEPC y conservado a –20 ° C hasta su utilización.

B) PCR.

Los iniciadores fueron los siguientes: 5'- GAC TGT AAG ATG GCA AGAA CGA GCT C-3'(sentido) y 5'- GGCC TGAA AGG ATC CCT CAT TC – 3' (contrasentido) obtenidos de la secuencia de doble cadena replicativa de la cepa Cux – 1 que amplifican un fragmento de 675 pares de bases que codifican el gene

para la proteína VP1 (cápside del virus). método empleado en el Departamento de Producción Animal Aves; adaptado del método usado por Todd 1995.

La reacción se llevo a cabo en un termociclador (Termo Hybaid PCR Express) con 20 μ l de volumen de reacción conteniendo 3 μ l de ADN; 1x de buffer C 10X (Biotecnologías universitarias), dNTP'S mix 2mM (10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, pH 7.0, Biotecnologías Universitarias), iniciadores 2mM (BQ SS), Taq DNA polimerasa 5U/ml. (Amplificasa, Biotecnologías Universitarias 500U) y H₂O.

Las muestras se sometieron a 25 ciclos bajo las siguientes temperaturas y tiempos.

5 minutos a 94° C para desnaturalización inicial.

1 minuto a 94° C para desnaturalización

1 minuto a 64° C para alineamiento

5 minutos a 72° C para extensión

10 minutos a 72° C para extensión final

Posteriormente, los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80 voltios por 1 hora en una cámara de electroforesis (horizon 58 life technologies). Las bandas de ADN fueron teñidas con bromuro de etidio (1 μ g/ml) y visualizadas en un transiluminador UV. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb.

Diseño experimental correspondiente a la infección de la bolsa de Fabricio

Se utilizaron 90 pollos de engorda de un día de edad los cuales no recibieron tratamiento alguno hasta los 10 días de edad. Cuarenta y cinco aves fueron inoculadas con virus de la infección de la Bolsa de Fabricio cepa Edgar con una concentración de $1 \times 10^{3.8}$ DIEP se inocularon 400 μ l por vía ocular y 600 μ l por vía oral. (grupo V). Las aves testigo recibieron 400 μ l de SSF por vía ocular y 600 μ l vía oral (grupo VI).

Se sacrificaron 5 aves a las 12 hrs, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 días post – inoculación. Para el estudio molecular se tomaron fueron tomadas muestras longitudinales de proventrículo (PV) y ventrículo gástrico (VG); muestras transversales de 1.5 cm de porción inicial de duodeno (D), yeyuno (Y) e ileon (I). El divertículo de Meckel (DM) fue colectado con una porción de intestino de 1.0 cm, ambas tonsilas cecales(TC) fueron tomadas transversalmente..

RT-PCR

Extracción RNA

1. Se maceraron cada uno de los órganos en PBS esteril hasta obtener una pasta fina, posteriormente se mezclaron 50 – 100 mg con trizol ® (1:10).
2. La muestra se incubó muestra por 5' en hielo, se agregó de cloroformo concentrado 1:20, se centrifugó por 15' a 12 000 rpm.
3. Posteriormente la muestra fue precipitada con un volumen de isopropanol frío. y se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones.

4. La muestra fue lavada con un volumen de etanol al 75% y centrifugada de nuevo bajo las mismas condiciones.
5. La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas y se resuspendió en 30 μ l de agua DEPC y fue conservada a -20°C hasta su utilización.

Para la síntesis de cDNA se utilizaron los iniciadores 5' GGCCAGAGTCTACACCATAAC3' sentido y 5' CCGGATTATGTCTTTGAAGCC3' contrasentido para realizar la prueba de RT-PCR (Sapats I. et al2002)

La síntesis de cDNA se llevo a cabo en un termociclador (Gene amp 2004) en un volumen de reacción final de 20 μ l conteniendo 5 μ l de ARN, 1 μ l dNTP's mix 10 mM (10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, pH 7.0, Biotecnologías Universitarias), iniciadores 2mM, 5.5 μ l, 4 μ l buffer RT Revert aid ,1 μ l M- MuL V R – T, RT-multireverse aid 200U/ μ l, 1 μ l DTT, 0.5 μ l RNA inhib 40 U/ μ l.

Las temperaturas empleadas fueron 65°C 5', 4°C 5', 42°C 2', 4°C 5', 42°C 50', 70°C 15.

6. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador (Termo Hybaid PCR Express) con 20 μ l de volumen de reacción conteniendo 5 μ l de muestra de cADN 1x de buffer C 10X (Biotecnologías universitarias), dNTP'S mix 2mM (10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP), pH 7.0, Biotecnologías Universitarias), iniciadores 2mM, Cloruro de Magnesio 1.6 μ l, tritón 1 μ l, BSA 1 μ l, H₂O 5.9 μ l y Taq DNA polimerasa 5U/ml. (Amplificasa, Biotecnologías Universitarias 500 U) y H₂O.

Las muestras fueron sometidas a 35 ciclos bajo las siguientes temperaturas y tiempos:

5 minutos a 94° C para desnaturalización inicial.
1 minuto a 94° C para desnaturalización
1 minuto a 48° C para alineamiento
2 minutos a 72° C para extensión
10 minutos a 72° C para extensión final

9. Posteriormente, los productos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80 voltios por 1 hora en una cámara de electroforesis (horizon 58 life technologies). Las bandas de ADN fueron teñidas con bromuro de etidio (1 µg/ml) y visualizadas en un transiluminador UV. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb.

Diseño experimental estudio histológico

Simultáneamente a la toma de muestras para aislamiento viral o identificación por métodos moleculares se colectaron muestras longitudinales de proventrículo (PV) y ventrículo gástrico (VG); muestras transversales de 1.5 cm de porción inicial de duodeno (D), yeyuno (Y) e ileon (I). El divertículo de Meckel (DM) fue colectado con una porción de intestino de 1.0 cm, ambas tonsilas cecales (TC) fueron tomadas transversalmente.

Las muestras fueron fijadas en formalina al 10% amortiguada a pH de 7.2 para su posterior procesamiento según las técnicas empleadas en el Departamento de producción animal aves (Prophet E. et al 1995). Las muestras fueron cortadas en dos segmentos uno de aproximadamente 1 cm y el segundo de 0.5 cm, el primero fue incluido longitudinal y el segundo transversal. Las muestras fueron incluidas en parafina y cortadas a 4 micrómetros de espesor para su posterior tinción con la técnica de hematoxilina – eosina (HE).

El diseño del estudio se realizó siguiendo la siguiente metodología para las tres enfermedades; se anotó el número de aves y el grado de las lesiones encontradas, asignándose con 1+ a las leves, 2+ moderadas y 3+ las severas. La clasificación de las estructuras histológicas se hizo según (Bacha 2001; Fredic L. et al 2001; Catroxt M. 1997)

I. Proventrículo

I.1 Mucosa

- I1.a Pérdida de continuidad del epitelio
- I1.b Necrosis epitelial
- I1.c Hemorragias
- I1.d Atrofia de las folias
- I1.e Edema

I.2 Lamina propria

- I.2a Infiltrado linfocitario difuso
- I.2b Infiltrado linfocitario multifocal
- I.2c Necrosis y apoptosis linfocitaria
- I.2d Infiltrado heterofílico
- I.2e Congestión
- I.2f Hemorragias

I.3 Glándulas Submucosas

- I.3a Descamación epitelial
- I.3b Necrosis epitelial
- I.3c Distensión de las glándulas
- I.3d Hiperplasia nodular linfoide
- I.3e Infiltrado linfocitario difuso
- I.3 f Infiltrado heterofílico

I.4 Muscular

- I.4a Infiltrado linfocitario
- I.4b Infiltrado heterofílico
- I.4c Hemorragias

I.5 Serosa

- I.5a Infiltrado linfocitario
- I.5b Infiltrado heterofílico
- I.5c Hemorragias

II Ventriculo gástrico

II. 1 Mucosa

- II.1a Erosiones capa de koilin
- II.1b Infiltrado linfocitario difuso
- II.1c Infiltrado linfocitario multifocal
- II.1d Infiltrado heterofílico

II.2 Lámina propria

- II.2a Infiltrado linfocitario difuso
- II.2b Infiltrado heterofílico
- II.2c Congestión
- II.2d Hemorragias

II.3. Submucosa

- II.3a Infiltrado linfocitario multifocal
- II.3b Infiltrado linfocitario difuso
- II.3c Infiltrado heterofílico

II.4. Muscular

- II.4.a Infiltrado linfocitario multifocal
- II.4.b Infiltrado linfocitario difuso
- II.4.c Infiltrado heterofílico
- II.4.e Hemorragias

II.5. Serosa

- II.5.a Infiltrado linfocitario
- II.5.b Infiltración heterofílica
- II.5.c Hemorragias

III Duodeno, yeyuno, ileón

III.1 Mucosa

- III.1a Atrofia de las vellosidades
- III.1b Necrosis epitelial
- III.1c Necrosis de las criptas
- III.1d Hiperplasia de las criptas

III.2 Lamina propria

- III.2a Infiltrado linfocitario multifocal
- III.2b Infiltrado linfocitario difuso
- III.2c Necrosis y apoptosis linfocitaria
- III.2.d Infiltrado heterofílico
- III.2.e Hiperplasia placas de Peyer
- III.2.f Congestión

III.3 Submucosa

- III.3a Infiltrado linfocitario multifocal
- III.3b Infiltrado linfocitario difuso

III.3c Infiltrado heterofílico

III.3e Congestión

III.3f Hemorragias

III.4 Muscular

III.4a Infiltración linfocitaria

III.4b Infiltración heterofílica

III.4c Hemorragias

III.5 Serosa

III.5a Infiltración linfocitaria

III.5b Infiltración heterofílica

III.5c Hemorragias

IV. Divertículo de Meckel

IV.1 Mucosa

IV.1a Atrofia de pliegues

IV.1b Necrosis epitelial

IV.2 Lamina propria

IV.2a Necrosis y apoptosis linfocitaria

IV.2b Infiltrado heterofílico

IV.3c Aumento de células blásticas.

IV.2d Congestión

IV.2e Hemorragias

IV.4 Muscular

IV.4a Infiltración linfocitaria

IV.4b Infiltración heterofílica

IV.4c Hemorragias

IV.5 Serosa

IV.5a Infiltración linfocitaria

IV.5b Infiltración heterofílica

V Tonsilas cecales

V.1 Mucosa

V.1a Atrofia de pliegues

V.1b Necrosis epitelial

V.2 Lamina propria

V.2a Necrosis y apoptosis

V.2b Infiltrado heterofílico multifocal

V.2c Infiltrado heterofílico difuso

V.2d Hiperplasia nódulos linfoides

V.3e Aumento de células blásticas.

V.2f Congestión

V.2g Hemorragias

V.4 Muscular

V.4a Infiltración linfocitaria

V.4b Infiltración heterofílica

V.4c Hemorragias

V.5 Serosa

V.5a Infiltración linfocitaria

V.5b Infiltración heterofílica

Pruebas serológicas:

Para la detección de anticuerpos contra la enfermedad de Marek se empleó la prueba de precipitación en agar, según el método de Villegas P. (2001).

Para la determinación de anticuerpos contra la anemia infecciosa y de la infección de la bolsa de Fabricio se empleó la prueba de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) Marca Symbiotics®. En esta prueba, los sueros diluidos con el amortiguador son agregados a la placa cubierta de antígeno, después de lavar el exceso, se agrega un conjugado obtenido de cabra anti inmunoglobulina de pollo ligado a peroxidasa, después de un periodo de incubación se lava el exceso y se agrega el sustrato, el cual contiene cromógeno que cambia de color en presencia de la enzima, posteriormente se agrega la solución stop y se lee en el lector de ELISAS de 405 a 410 nm.

RESULTADOS

ENFERMEDAD DE MAREK

Resultados antes tratamiento.

Las aves resultaron negativas a aislamiento viral en embrión de pollo y cultivo celular. No se detectaron anticuerpos contra este virus mediante precipitación en agar.

Resultados después tratamiento

Signos clínicos:

Las aves inoculadas no presentaron signos clínicos.

Hallazgos a la necropsia

No se encontraron alteraciones macroscópicas.

Estudio virológico

Al realizar la inspección de las membranas de los embriones inoculados con las muestras colectadas a los cinco días post – inoculación, únicamente en la muestra tomada de duodeno se observaron placas producidas por el virus de la enfermedad de Marek. En los cultivos inoculados con muestras tomadas de Y, DM y TC se observaron efectos citopáticos, tales como: células grandes, redondas y formación de sincitios (figura 1D). El resto de los órganos fueron negativos a aislamiento en embrión y cultivo celular (tabla 1.1).

Las membranas de los embriones inoculados con muestras de PV, D, I, DM colectadas al día 7 post – inoculación presentaron placas de diferentes tamaños. Las muestras colectadas de TC resultaron positivas en cultivo celular (figura 1E)

Las muestras colectadas de ventrículo gástrico y yeyuno resultaron negativas por los dos métodos (tabla 1.2). Las membranas de los embriones inoculados con muestras de PV, VG, I, colectadas a los 14 post – inoculación presentaron placas en las membranas corioalantoideas. Las muestras colectadas de tonsilas cecales y divertículo de Meckel resultaron positivas a la inoculación en cultivo celular. Las muestras de duodeno y yeyuno resultaron negativas por los dos métodos (tabla 1.3).

Las membranas de los embriones inoculados con muestras colectadas al día 21 post – inoculación de PV, VG y DM fueron positivas (figura 1 B). El resto de las muestras resultaron negativas por ambos métodos (tabla 1.4).

Las membranas de los embriones inoculados con muestras colectadas al día 28 de PV, VG, I, DM y TC resultaron positivas al aislamiento en embrión de pollo (figura 1 A), el resto de las muestras resultaron negativas por ambos métodos (tabla 1.5).

Estudio histológico

Las lesiones más relevantes fueron observadas en proventrículo y tonsilas cecales, se describen a continuación:

1. Proventrículo

La lesiones mas frecuentemente observadas en la mucosa fueron, atrofia de las folias de grado leve a partir de los cinco días post- inoculación. En la lámina

propria se observó infiltrado linfocitario difuso desde el día 5 post- inoculación hasta el día 28 de grado leve a moderado, con excepción del día 7.

En las glándulas submucosas se observó descamación epitelial a partir del día 5 y hasta el día 28. También se observó necrosis epitelial los días 21 y 28 e infiltrado linfocitario multifocal a partir del día siete hasta el día 28 PI. Todas las lesiones encontradas fueron de grado leve (cuadro 1.1).

II. Ventrículo gástrico

Los hallazgos más importantes en la mucosa fueron erosiones en la sustancia queratinoide. Después del día cinco PI hasta el día 28 PI, en la lámina propia se encontró infiltrado linfocitario difuso y congestión al día 28. Todos los hallazgos encontrados fueron de grado leve (cuadro 1.2).

III. Tonsilas cecales

A partir del cinco y a hasta el día 28 PI, se encontró infiltrado heterofílico, necrosis y apoptosis linfocitaria; presencia de células blásticas; también se observaron hemorragias en los pliegues los días 14 al 28 PI. La presencia de hiperplasia nodular linfoide fue común a partir del día 21 y hasta el día 28. Todos los hallazgos mencionados anteriormente fueron de grado leve. (cuadro 1.3)

En duodeno, yeyuno, ileon y divertículo de Meckel no se encontraron alteraciones patológicas.

Ninguno de los hallazgos histológicos antes descritos se encontraron en las aves testigo.

ANEMIA INFECCIOSA

Resultados antes del tratamiento:

Las aves resultaron negativas a identificación del agente. No se detectaron anticuerpos contra este virus mediante la técnica de ELISA. (gráfica 1.0)

Resultados después del tratamiento

Signos clínicos:

Las aves inoculadas no presentaron ningún signo clínico.

Hallazgos a la necropsia

No se encontraron alteraciones macroscópicas

PCR

Las tomas colectadas los días 3, 5, y 7 PI, de todos los órganos resultaron amplificaciones negativas. Las muestras de duodeno, yeyuno, divertículo de Meckel y tonsilas cecales colectadas a los 14 días post- inoculación resultaron positivas.

A los 21 días PI resultaron positivas las muestras colectadas de duodeno, yeyuno, ileon y divertículo de Meckel.

Las muestras colectadas de duodeno, yeyuno, ileon, divertículo de Meckel y tonsilas cecales resultaron positivas a los 28 días PI.

Los órganos en los cuales el virus pudo ser identificado de manera mas consistente fueron D, Y, DM y TC (Tabla 2.0)

Estudio histológico.

Los órganos colectados que presentaron alteraciones más importantes fueron proventriculo, duodeno, yeyuno, ileon y tonsilas cecales.

I. Proventrículo

En la lámina propia se observó prácticamente durante todo el experimento infiltrado linfocitario difuso de grado leve a moderado. Los días 21 y 28 post – inoculación (PI) se pudo observar necrosis y apoptosis linfocitaria, así como hiperplasia nodular linfoide, siendo estos hallazgos de grado leve.

En la submucosa se observó desde el día tres y hasta el 28 descamación epitelial, la cual varió de leve a moderada. (cuadro 2.1).

II. Duodeno

En la lámina propia durante todo el experimento se observó la presencia de infiltrado linfocitario difuso, estas lesiones se presentaron de grado leve a severo, siendo mas evidentes al final del experimento.

Asimismo, a partir del día cinco y hasta el 28 se encontró necrosis y apoptosis linfocitaria, estos hallazgos fueron de grado leve.

A partir del día siete y hasta el 28 se encontró hiperplasia de las placas de Peyer de grado leve (Cuadro 2.2).

III. Yeyuno

Se observó atrofia de las vellosidades a partir del día 14 y hasta el 28 de grado leve; además se observó en la lámina propia infiltrado linfoide difuso desde el día tres y hasta el 21 de grado leve a moderado; asimismo, a partir del día 7 y hasta el 28 se observó infiltrado heterofílico difuso y congestión de grado leve En las tomas realizadas los días 21 al 28 se encontró necrosis y apoptosis linfocitaria e hiperplasia de las placas de Peyer de grado leve (Cuadro 2.3).

III. Ileón

En la lámina propia se observó durante todo el experimento infiltrado linfocitario difuso de leve a severo; congestión del día 5 y hasta el 28 de grado leve a moderado; asimismo, se encontró necrosis y apoptosis leve e hiperplasia de las placas de Peyer a partir del día 21 y hasta el 28 , siendo estos dos hallazgos de grado leve.(cuadro 2.4).

IV Tonsilas cecales

Las lesiones encontradas fueron constantes durante todo el experimento, se observó necrosis y apoptosis del tejido linfoide, infiltrado heterofílico e hiperplasia nodular linfoide, siendo todas estas lesiones de grado leve.(2.5).

En ventrículo gástrico y divertículo de Meckel no se encontraron alteraciones patológicas.

Ninguno de los hallazgos histológicos anteriormente descritos se encontraron en las aves testigo

INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO

Resultados antes del tratamiento

Las aves resultaron negativas a la identificación del agente. Se detectaron anticuerpos contra este virus mediante la técnica de ELISA con una media de 5015 (gráfica 2).

Resultados después del tratamiento

Signos clínicos:

Las aves inoculadas presentaron depresión.

Hallazgos a la necropsia

No se encontraron alteraciones macroscópicas

RT-PCR

Las muestras procesadas desde la toma 1 hasta la toma del día 10 post – inoculación resultaron negativas.

Estudio histológico

I: Proventriculo

En la lámina propia se pudo observar durante todo el experimento infiltrado linfocitario difuso de grado leve a moderado, siendo más evidente al final del experimento. También se pudo observar infiltrado linfocitario multifocal a partir del día 3 y hasta el día 10, estos hallazgos fueron de grado leve.

Asimismo, se observó edema de grado leve durante todo el experimento.

En las glándulas se encontró distensión de leve a moderada durante todo el experimento (cuadro 3.1).

II. Tonsilas cecales

Se observó desde el día uno y hasta el 10, infiltrados heterofílicos difuso de grado leve También se observó necrosis y apoptosis leves durante los mismos días. A partir del día tres y hasta el día 10 se pudieron observar hemorragias de grado leve (3.2).

En ventrículo gástrico, duodeno, yeyuno, ileón y divertículo de Meckel no se encontraron alteraciones patológicas.

Ninguno de los hallazgos antes mencionados se encontraron en las aves testigo.

DISCUSION

El efecto de los virus inmunodepresivos en el tracto digestivo de las aves es poco conocido, existen reportes en los cuales se les asocia con cuadros inespecíficos, en algunas ocasiones se han aislado de heces de pollos en los cuales hay mala conversión alimenticia, inmunodepresión y trastornos digestivos. (Goodwin M. et al 1996)

En el presente estudio, se observó que después de la vacunación con el virus de la enfermedad de Marek, en órganos como proventriculo y tonsilas cecales, el virus se replica y estimula los mecanismos de defensa de estos órganos, produciendo en proventriculo infiltrados linfocitarios de tipo difuso y multifocal desde los 5 días PI y hasta el día 28 (cuadro 1.1). Asimismo, al igual que como sucede en los órganos blanco, el virus produce necrosis y apoptosis linfocitaria en tonsilas cecales (cuadro 1.3). El papel más importante del tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT) es el destruir los patógenos invasores en el portal de entrada para prevenir su diseminación e infección sistémica. Tomando en cuenta que más de la mitad del número total de linfocitos del MALT se encuentran contenidos dentro del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (Yun C. et al 2000) y considerando que dicho tracto es una portal de entrada para muchos patógenos económicamente importantes (Schat K. et al 1991) consideramos que el efecto patológico que produce en los diferentes segmentos del tracto digestivo compromete los mecanismos de defensa del intestino del ave.

Las tonsilas cecales son órganos linfomiéloides situados en la porción inicial de los ciegos aproximadamente a 4 a 18 mm del inicio de los sacos ciegos. Estos órganos se encuentran compuestos de tejido linfoide difuso y centros germinales (Glick B. Et al 1981). Las células presentes en las tonsilas cecales de aves al día de edad consisten en poblaciones linfocitos pequeños y medianos, linfoblastos, y

células plasmáticas inmaduras. A los cuatro días se presenta un incremento en el número de células el cual permanece constante hasta las 2 semanas, partir de este momento se considera que las tonsilas cecales han alcanzado su condición histológica adulta., a las 6 semanas de edad se puede observar un nuevo aumento en el número de células (Gómez del Moral M. et al 1998).

Durante el desarrollo de las tonsilas cecales los primeros centros germinales son identificados histológicamente en pollos de 8 días de edad, aunque algunos otros autores los describen hasta las 2 semanas de edad (Jeurisen et al 1989). Estos centros germinales se encuentran formados generalmente por linfoblastos, algunos de estos centros germinales pueden estar completamente ó parcialmente rodeados por células reticulares, haciendo posible su diferenciación del resto del tejido linfoide (Olah I. et al 1979). En el presente estudio se observó una gran cantidad de células blásticas las cuales además de encontrarse en los centros germinales se encontraron dispersas en el tejido linfocitario difuso de las tonsilas. El aumento anormal de estas células blásticas similares a las que se presentan en la enfermedad de Marek y el corto tiempo post – inoculación en el que aparecen, sugieren a este órgano como posible lugar de origen de linfomas característicos de esta enfermedad. Teniendo en cuenta que las principales lesiones que sirven para el diagnóstico de esta enfermedad aparecen hasta 28 días después del desafío y de que la incidencia de lesiones en nervios es muy baja (Witter L. R. 2004); además de que las pruebas serológicas no poseen valor diagnóstico; y de que no detectan anticuerpos hasta después de 4 ó 5 semanas PI, podría considerarse a las tonsilas cecales como un órgano útil para el diagnóstico temprano de esta enfermedad.

Los resultados obtenidos del aislamiento del virus de la enfermedad de Marek demuestran que el virus puede ser aislado de diferentes segmentos del tracto digestivo de las aves a partir del día 5 y hasta el día 28, lo cual concuerda con los hallazgos de (Calnek B.W. et al 1969) quien por medio de inmunofluorescencia detectó antígenos en aves que fueron desafiadas al día de edad en esófago,

ingluvies, proventrículo, ventrículo gástrico, duodeno, divertículo de Meckel , ciego, recto, cloaca y tonsilas cecales. Asimismo, detectaron la presencia de infiltrados linfoides en diferentes segmentos del tracto gastrointestinal tales como esófago, ingluvies, y proventriculo. Cabe mencionar que en el experimento realizado por dichos autores, emplearon diversas vías de inoculación tales como: oral, nasal, intraabdominal, intravenosa y por el buche: aunque algunas fueron mas eficientes que otras para lograr la infección, la mayor parte de ellas fue eficiente para lograr la identificación del agente en los diferentes segmentos del tubo digestivo.

La correlación del hallazgo de lesiones en diversos segmentos del tracto digestivo así como el aislamiento del agente sugiere la importancia del tracto digestivo de las aves como un sitio importante para la replicación y diseminación de este virus, Asimismo, si los mecanismos de defensa del sistema inmune de las aves se encuentran deteriorados, es posible que otros agentes patógenos encuentren un portal de entrada para su diseminación.

En la avicultura a nivel mundial se emplean vacunas contra la enfermedad de Marek, prácticamente todas las aves se vacunan contra esta enfermedad. Existen algunos trabajos en los cuales la vacunación contra el virus de la enfermedad de Marek causa disfunción temporal de los linfocitos B y reduce la resistencia a la infección; en aves vacunadas al día de edad se observó que produce disfunción de la respuesta humoral, y hace a las aves mas sensibles a las infecciones bacterianas, la combinación entre una respuesta inmune inmadura y la aplicación de una vacuna dañina puede hacer mas sensibles a las aves a agentes patógenos ambientales, provocando que las aves vacunadas se encuentren inmunológicamente comprometidas (Friedman A. et al 1992).

En el estudio correspondiente a la anemia infecciosa, se observó que las tonsilas cecales fueron el órgano que reaccionó de manera mas temprana hacia esta enfermedad, ya que a partir de los 3 días post – inoculación se encontró

hiperplasia nodular linfoide, necrosis y apoptosis linfocitaria permaneciendo de manera constante hacia el final del experimento (cuadros 2.1 – 2.5). Este agente viral se recuperó a partir del día 14 post – inoculación y hasta el día 28 (tabla 2.0), siendo más frecuente su aislamiento hacia el final del experimento. Algunos autores mencionan que el virus es recuperado en aves desafiadas al día de edad por vía intramuscular, de hisopos cloacales a los cuatro, cinco, seis y siete días post – infección (De Herdt P. et al 2001).

Teniendo en cuenta que estas aves se encontraban en unidades de aislamiento y no bajo las condiciones de campo en las cuales las aves se encuentran expuestas a un sinnúmero de agentes patógenos, deducimos que la exposición de aves infectadas con este virus que viven bajo las condiciones de una explotación comercial en las cuales las aves se encuentran sometidas a estrés por hacinamiento y competencia por el alimento, podrían dar como resultado lesiones intestinales mas severas. En estudios realizados, se ha encontrado que en parvadas en las cuales se encontraron anticuerpos contra esta enfermedad hay una disminución en la ganancia de peso y aumento de decomisos al sacrificio en comparación con parvadas en las cuales no tienen anticuerpos contra esta enfermedad (Dren C. et al 2000).

Cuando la integridad del intestino se encuentra dañada, las aves no absorben los nutrientes que se les proporcionan, las aves por consiguiente se encuentran retrasadas en su crecimiento, hay desuniformidad en la parvada y presentan problemas de pigmentación deficiente.

En el presente estudio se observó que el virus de IBF produce lesiones en el tracto digestivo de las aves. En proventriculo las lesiones aparecieron a partir de las 12 horas post – inoculación. En tonsilas cecales se detectaron lesiones 12 horas después que en el proventriculo en ambos órganos permanecieron constantes hasta el final del experimento. Estas observaciones se relacionaron con los hallazgos de otros investigadores donde se encontraron que este virus fue capaz de producir lesiones que incluyen hemorragias, necrosis e infiltración heterofílica

en la mucosa proventricular de aves SPF (aves libres de patógenos) white leghorns, en broilers con inmunidad materna y en algunas porciones de intestinos de aves bursectomizadas en edad embrionaria (Skeeles, J et al 1998; Wilson M. 1996)

En algunos trabajos este virus se detectó en diferentes segmentos del tubo digestivo, se observó, que después de la inoculación oral se puede detectar el virus por inmunofluorescencia, al término de una hora, se encontró presente en macrófagos y tejido linfoide asociado al intestino de tonsilas cecales y ciego, después de 5 horas fue detectado además en duodeno y yeyuno, alcanzando una persistencia de hasta 18 hrs. en tonsilas cecales demostrando así que antes de alcanzar su órgano blanco que es la bolsa de Fabricio el virus se encuentra presente en el intestino (Müeller R. I. et al 1979). En el presente estudio, no se pudo identificar al virus de la infección de la bolsa de Fabricio en ninguna toma, debido probablemente a la presencia de anticuerpos maternos en las aves. Aunque estos anticuerpos no permitieron el aislamiento del virus, si fue posible observar en proventriculo infiltrados linfocitarios difusos y multifocales, edema y distensión de las glándulas; y en tonsilas cecales necrosis y apoptosis linfocitaria, hemorragias e infiltrado heterofílico difuso (cuadro 3.1 y 3.2).

En estudios realizados in vitro e in vivo el virus de IBF produce en los linfocitos depresión en las funciones migratorias, liberación de gránulos, degeneración celular y condensación de la cromatina; en el caso de los macrófagos causa lesiones clásicas de apoptosis, así como reducción en la capacidad de fagocitar y responder a la quimiotaxis. Tomando en cuenta el gran número de células fagocíticas que se encuentran en el tracto gastrointestinal, se sugiere que un defecto en la fagocitosis y en la presentación de antígenos puede ser otro mecanismo probable inmunosupresión.

La ocurrencia de estas infecciones está determinada por una variedad de factores que comprenden la edad, el estatus inmune de las aves afectadas y la virulencia de los virus involucrados

Conclusiones

En el presente estudio se demostró que el virus enfermedad de Marek presenta afinidad hacia el tracto digestivo de las aves.

El hallazgo histológico de células blásticas en las tonsilas cecales, sugiere que este órgano puede ser lugar de origen de linfomas característicos de la enfermedad de Marek.

Las tonsilas cecales son un órgano muy valioso para el diagnóstico de la enfermedad de Marek, ya que a partir del día 5 PI se detectaron cambios histológicos sugestivos de esta enfermedad, así como positividad al aislamiento viral.

El empleo de vacunas contra la enfermedad de Marek producen lesiones en diferentes segmentos del tubo digestivo.

El desafío de aves con cepas de campo de virus de la enfermedad de Marek puede producir lesiones mas severas que las presentadas con el virus vacunal.

Con respecto al virus de la anemia infecciosa del pollo; este produce necrosis y apoptosis del tejido linfoide del intestino, por lo que al estar dañados los mecanismos de defensa del intestino, las aves pueden encontrarse más susceptibles a otras infecciones que pudieran adquirir mediante la ingestión.

Además de las muestras enviadas como rutina para el aislamiento de anemia infecciosa tales como hígado, bazo, médula ósea entre otros; las tonsilas cecales también son un órgano importante para su aislamiento

El virus de la anemia infecciosa del pollo presentó una distribución más extensa, mientras que el virus de IBF se limitó a causar daño únicamente en proventriculo y tonsilas cecales, de manera muy similar al virus de la enfermedad de Marek, el cual además de los órganos mencionados, produjo lesiones en el ventrículo gástrico.

Cuando las lesiones aparecen en los diversos segmentos del tracto digestivo, permanecen de manera constante hasta el final de las observaciones.

Los órganos más severamente afectados de las aves desafiadas con estos tres virus inmunodepresores son el proventriculo y las tonsilas cecales.

En resumen, los daños histológicos en el tubo digestivo se las aves, en adición a otros factores tales como presencia de micotoxinas en el alimento, infecciones bacterianas, deficiencias nutricionales y estrés pueden llegar a producir cuadros clínicos complejos en los cuales resulta difícil determinar cual fue la raíz del problema.

En el presente estudio se comprobó que el efecto patológico que causan estos virus, no solo se limitan a los órganos descritos en la literatura tales como bolsa de Fabricio y timo, médula ósea entre otros, sino que también afectan el tubo digestivo.

LISTA DE ABREVIATURAS

TD	Tubo digestivo
EM	Enfermedad de Marek
AI	Anemia Infecciosa
IBF	Infección de la bolsa de Fabricio
UFP	Unidades formadoras de placas
PV	Proventrículo
VG	Ventrículo Gástrico
D	Duodeno
Y	Yeyuno
I	león
DM	Divertículo de Meckel
TC	Tonsilas cecales.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT	Transcriptasa reversa
SSF	Solución salina fisiológica.
DICC	Dosis infectante cultivo celular
RNA	Acido ribonucléico
DNA	Acido desoxirribonucléico
DIEP	Dosis infectante embrión de pollo
IM	Intramuscular
SC	Subcutánea
PBS	Solución buferada de fosfatos
EDTA	Etylenediaminetetracetic acid disodium salt
µl	microlitros
rpm	revoluciones por minuto
DEPC	Dietil-piretil-carbamato
UV	Ultravioleta
Kb	kilobase
RNA inhib	Inhibidores de rnasas
SSF	Solución salina fisiológica
SDS	Sodium dodecil sulfate solution
ELISA	Enzime linked Immunosorbent assay

REFERENCIAS

Hoerr J. Frederic. Intestinal integrity and the impact of losing it. Veterinary Diagnostic Laboratories, 2003 USA. <http://poultry-health.com/fora/inthelth/hoerr01.htm>

Gelderblom H., Kling S., Lurz R, Tischer I., Bülow V. Morphological characterization of chicken anaemia agent (CAA). Arch Virology 1989; 109: 10: 115-120.

Mc Nulty M. S., Curran W. L., Todd D., Mackie D. P. Chicken anaemia agent: and electron microscopic study. Avian Dis. 1990; 34: 736 – 743.

Todd D., Creenlan J. L., Mackie D.P., Rixon F., McNulty M.S., Purification and biochemical characterization of chicken infectious anaemia agent. J. Gen Virol 1990; 71: 819- 823.

Goryo M., Suwa T., Matsumoto S., Umemura T., Itakura C. Serial propagation and purification of chicken anaemia agent in MDCC – MSB1 cell line. Avian Pathology 1987; 16: 149 – 163

Yuasa N., Tniguchi T., Yoshida I. Isolation and some characteristics of an agent inducing anaemia in chicks. Avian Dis. 1979; 23: 366 – 385.

Mc Nulty, M.S., Curran W. L., Todd D. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies to chicken anemia agent. Avian Dis. 1990; 34: 736 – 743.

Chandratilleke D., O'Connell P., Schat A. K. Charecterization of proteins of chicken infectious anemia agent virus with monoclonal antibodies. Avian Dis 1991; 35: 854 – 862.

Shat A. Karel. Circovirus infections in Saif Y.M., Diseases of poultry 11^o Edition. Iowa state press. Blackwell publishing company. CD Rom Versión 2004.

Hoop R. K. Persistence and vertical transmission of chicken anaemia agent in experimentally infected laying hens. Avian Pathol. 1992; 21: 493 – 501.

Engström B. E., Luthman Y. Blue wing disease of chickens: signs, pathology and natural transmission Avian Pathol. 1984; 13: 1 – 12.

Vielitz E., Landgaf H. Anaemia – dermatitis of broilers: Field observations on its occurrence, transmission and prevention. Avian Pathol. 1988; 17: 113 – 120.

Yuasa N. Chicken infectious anaemia agent in Mc Ferran J. B., Mc Nulty M. S. Virus infections of birds. Veterinary research laboratory department of Agriculture North Ireland 1993

Goyro M., Suwa T., Umemura S. T., Itakura C., S. Yamashiro Histopathology of chicks inoculated with chicken anaemia agent (MSB1 – TK5803 strain). Avian Pathol. 1989; 16: 73 – 89.

Pope C. R., Chicken anaemia agent. Vet Immunol Immunopathol 1991; 30: 51 – 65.

Mc Nulty M.S. Chicken anemia agent: a review. Avian Pathology. 1991; 20: 187 – 203.

Taniguchi T., Yuasa N., Maeda M., Horiuchi T., Hematopathological changes in death and moribund chicks induced by chicken anaemia agent. Natl. Ins. Anim. Health Q (jps) 1982; 22: 61 – 69.

Taniguchi T., Yuasa N., Maeda M., Horiuchi T. Chronological observations on hemato-pathological changes in chicks inoculated by chicken anaemia agent. *Natl Inst Anim Health Q (Jpn)* 1983; 23: 1 – 12.

Dobos P., Hill B. J., Hallet R., Kells D.T., Becht H., Teninges D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double – stranded RNA genomes. *J. Virol.* 1979; 32: 593 – 605.

Müller H., Scholtissek C., Blecht H. Genome of infectious bursal disease virus consists in two segments of double stranded RNA. *J. Virol.* 1979; 31: 584 – 589.

Mc Ferran J. B. Infectious bursal disease in Mc Ferran J. B., Mc Nulty M. S. *Virus infections of birds. Veterinary research laboratory department of Agriculture North Ireland* 1993

Allan W. H., Farangher J. T., Cullen G. A. Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease. *Vet. Rec.* 1972 90: 511 – 512.

Lukert P., Saif Y.M. Infectious bursal disease, in. Saif Y. M. *Diseases of poultry* 11^o Edition, Iowa state press. Blackwell publishing company. CD Rom Versión 2004.

Fartangher J.T., Alan W.H., Whyeth C. J. Immunosuppressive effect on infectious bursal agente on vaccination against Newcastle disease. *Vet. Rec.* 1974; 95: 385 – 388

Cosgrove A. S., An apparently new disease of chicken, avian nephrosis. *Avian diseases* 1962; 6: 385 – 389.

Bullow V.V., Biggs M. P. Differentiation between strains of Marek's disease virus and turkey herpesvirus by immunofluorescence assays. *Avian pathology* 1975; 4:133 – 146.

Bullow V.V., Biggs M. P Precipitating antibodies associated with Marek's disease viruses and herpesvirus of turkeys. *Avian pathology* 1975; 4: 147 – 162

Powell P.C., L. N. Payne Marek's disease virus in Mc Ferran J. B., Mc Nulty M. S. Virus infections of birds. Veterinary research laboratory department of Agriculture North Ireland 1993

Friedman A., Shalem – Meilin E., Séller E. D. Marek's disease vaccines cause temporary B lymphocyte dysfunction and reduce of resistance to infections in chicks. *Avian Pathology* 1992; 21: 621- 623.

Witter L. R, Schat A. K, Marek's disease in Saif Y.M., diseases of poultry 11° Edition, Iowa state press. Blackwell publishing company. CD Rom Versión 2004.

Kenzy S. G., Biggs P.M. Excretion of the Marek's disease agent by infected chickens. *Veterinary Record*. 1967, 80: 565 – 568.

Biggs, P.M. L. N. Payne. Studies on Marek's disease. I. Experimental transmission. *J Natl. Cancer Institute* 1967; 29: 267 – 280.

Goodwin M. A., Hafner S., Bounus D. I., Latimer K.S., Player E.C., Niagro F.D., Campagnoli R.P., Brown J. Viral proventriculitis in chickens. *Avian Pathology*. 1996; 25: 369- 379.

Bayyari G.R., Huff W. E., Balog J. M., Rath N.C., Beasley J. N. Experimental reproduction of proventriculitis using homogenates of proventricular tissue. *Poultry Science*. 1995; 74: 1799- 1809.

Huff, G. R., Newberry L. A., W. E. Viral and bacterial agents associated with experimental transmission of infectious proventriculitis. *Avian diseases* 2001; 45: 828- 843.

Kouwenhoven B., Davelaar F.G., Van Walsum J. Infectious Proventriculitis causing runting in broilers. *Avian Pathology* 1978; 7: 183- 187.

Guy S. James. Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry *Poultry Science* 1998; 77: 1166 – 1175.

Mc Nulty M. S., Mc Ilroy S. G., Bruce D.W. Economic effects of subclinical Chicken anemia agent infection in broiler chickens. *Avian diseases* 1991; 35: 263 – 268.

Swayne E. D., Charman Glisson J. R., James, E. Peerson., Reed M. Willie. In *American association of avian pathologist. Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathologist. 4th Edition. University of Pennsylvania (1996).*

Todd D. Connor, T. J. Calvet, V. M. Creelan J.L. Meehan, Mc Nulty M.S. Molecular cloning of an attenuated chicken anemia virus isolate following repeated cell culture passage. *Avian pathology*. 1995; 24:171 – 187.

Sapats, I. S., Ignjatovic J. Restriction fragment length polymorphism analysis of the VP2 gene of Australian strains of infectious bursal disease. *Avian Pathology*. 2002; 31: 6. 559 – 566.

Prophet E., Mills B, Arrington J., Leslie H., Sobin M. Métodos histotecnológicos. Instituto de patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América (AFIP) 1st Ed. Washington D. C. Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP). 1995

Bacha M. L., Bacha J. W. Atlas color de histología veterinaria Buenos Aires Argentina Interamericana Segunda edición 2001.

Aughey E., Frye L. Comparative veterinary histology with clinical correlates. Iowa State University. Second edition 2001.

Catroxto M. H. B., Lima M. A. I., Capellaro C. E. M. Histological aspects of the stomach (proventriculus and gizzard) of red – capped cardinal *Paroaria gularis gulari Linnaeus 1766* Revista chilena de anatomía 1997. 15; 1: 1- 11.

Villegas P. Laboratory Manual Avian Diseases Viruses. College of Veterinary Medicine. 1st Ed. Uninvestiy of Georgia 2001.

Yun C. H., Lillehoj H. S., Lillehoj E. P. Intestinal immune responses to coccidiosis. Developmental and comparative immunology. 2000; 24: 303 - 324.

Schat K., Myers T. Avian intestinal immunity. Crt. Rev poultry biol. 1991; 44:19-

Glick B., Holbrook K., Olah I. Perkins W., Stinson R. An electron and ligh microscope study of the caecal tonsil: The basic unit of the caecal tonsil. Developmental and Comparative Immunology 1982; 5: 95 – 104.

Jeurissen S. H., Janse E. M., Koch G., de Boer G. F. Posnatal development of the mucosa – associated lymphoid tissues in chickens. Cell Tissue Research 258; 119 – 129.

Olah I., Glick B. Structure of the germinal centers in the chicken caecal tonsil: Light and electron microscopic and autoradiographic studies. *Poultry science* 1978 58; 195 – 210.

Calnek B. W. S. B. Hitchner. Localization of viral antigen in chickens infected with Marek's disease herpesvirus. *Journal of National Cancer Institute*. 1969; 43: 4; 935 – 946.

Dren Cs. N, Kant A., Van Roozelaar D.J, Hartog L., .Noteborn H. M. Estudios on the patogenesis of chicken infectious anemia virus in six week old SPF chickens. *Acta Veterinaria Hungarica* 2000; 48: 4 455 – 467

Skeeles J. K; Newberry L. A., Beasley J. N., Hopkins B. A. Histologic comparison of lesions induced in the proventriculus and other areas of gastrointestinal tract of chickens experimentally infected with both classic and variant strains of infectious bursal disease virus. *Poultry Science* 1998; 77; suppl. 1: 133.

Wilson M. K., Newberry L. A., Skeeles J. K., J. N. Beasley, Bayyari G. L., Huff W. E., Mc New R. W., Hein R. G., Whitfill C. E., Haddad E. Infectious bursal disease virus induced proventriculitis in maternally immune broiler chickens In Proc. 45^o Western Poultry Disease Conference, Cancún México. 1996. Pp. 193 – 194.

Müller R. I., Weiss K., Reinacher M., Weiss E. Immunofluorescent studies of early virus propagation after oral infection with infectious bursal disease virus *Zentralbl Veterinaermed Med [B]* 1979; 26: 345 – 352.

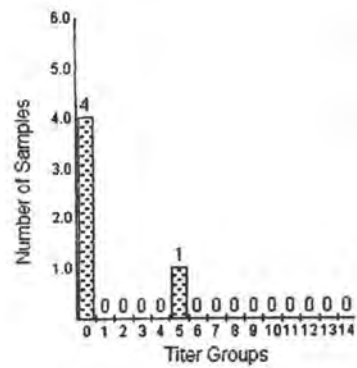
Resultado estudio serológico por prueba de ELISA

GRÁFICA 1.0 Resultados prueba de ELISA antes desafío virus de la anemia infecciosa del pollo aves 14 días de edad

Muestra	Título
1	0
2	3688
3	0
4	0
5	0
Media	738

Agent: CAV

Samples: 5
 Mean: 738
 GMT: 5
 StDev: 1,649
 %CV: 113.30

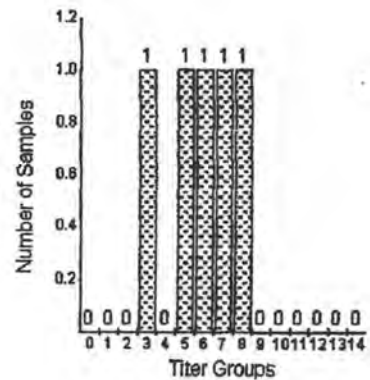


GRÁFICA 2.0 Resultados prueba de ELISA antes desafío virus de la infección de la bolsa de Fabricio aves 10 días de edad

Muestra	Título
1	4393
2	6014
3	2204
4	5347
5	7120
Media	5015

Agent: IBD

Samples: 5
 Mean: 5,015
 GMT: 4,668
 StDev: 1,859
 %CV: 32.58



AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE MAREK

Tabla 1.1 Resultados aislamiento viral en embrión de pollos y del pase de membranas y líquido alantoideo en fibroblastos de embrión de pollo.

Toma 5 días después de vacunación

Órgano	Inoculación en embrión de pollo (hallazgo de placas en membrana corioalantoidea)	Inoculación en cultivo celular de macerado de membranas corioalantoideas y líquido alantoideo
Proventrículo	-	-
Ventrículo gástrico	-	-
Duodeno	+	-
Yeyuno	-	+
Ileón	-	-
Divertículo de Meckel	-	+
Tonsilas cecales	-	+

Tabla 1.2 Resultados aislamiento viral en embrión de pollos y del pase de membranas y líquido alantoideo en fibroblastos de embrión de pollo.

Toma 7 días después de vacunación.

Órgano	Inoculación en embrión de pollo (hallazgo de placas en membrana corioalantoidea)	Inoculación en cultivo celular de macerado de membranas corioalantoideas y líquido alantoideo
Proventrículo	+	-
Ventrículo gástrico	-	-
Duodeno	+	-
Yeyuno	-	-
Ileón	+	-
Divertículo de Meckel	+	-
Tonsilas cecales	-	+

Tabla 1.3 Resultados aislamiento viral en embrión de pollos y del pase de membranas y líquido alantoideo en fibroblastos de embrión de pollo.

Toma 14 días después de la vacunación

Órgano	Inoculación en embrión de pollo (hallazgo de placas en membrana corioalantoidea)	Inoculación en cultivo celular de macerado de membranas corioalantoideas y líquido alantoideo
Proventrículo	+	-
Ventrículo gástrico	+	-
Duodeno	-	-
Yeyuno	-	-
Ileón	+	-
Divertículo de Meckel	-	+
Tonsilas cecales	-	+

Tabla 1.4 Resultados aislamiento viral en embrión de pollos y del pase de membranas y líquido alantoideo en fibroblastos de embrión de pollo.

Toma 21 días después de la vacunación

Órgano	Inoculación en embrión de pollo (hallazgo de placas en membrana corioalantoidea)	Inoculación en cultivo celular de macerado de membranas corioalantoideas y líquido alantoideo
Proventrículo	+	-
Ventrículo gástrico	+	-
Duodeno	-	-
Yeyuno	-	-
Ileón	-	-
Divertículo de Meckel	+	-
Tonsilas cecales	-	-

Tabla 1.5 Resultados aislamiento viral en embrión de pollos y del pase de membranas y líquido alantoideo en fibroblastos de embrión de pollo.

Toma 28 días post- vacunación

Órgano	Inoculación en embrión de pollo (hallazgo de placas en membrana corioalantoidea)	Inoculación en cultivo celular de macerado de membranas corioalantoideas y líquido alantoideo
Proventrículo	+	-
Ventrículo gástrico	+	-
Duodeno	-	-
Yeyuno	-	-
Ileón	+	-
Divertículo de Meckel	+	-
Tonsilas cecales	+	-

Tabla 2.0 Resultados amplificación del virus de anemia infecciosa

Órgano y número de días post-inoculación	ResultadoPCR
Proventrículo ¹⁴	-
Ventrículo gástrico ¹⁴	-
Duodeno¹⁴	+
Yeyuno¹⁴	+
Ileón ¹⁴	-
Divertículo de Meckel¹⁴	+
Tonsilas cecales¹⁴	+
Proventrículo ²¹	-
Ventrículo gástrico ²¹	-
Duodeno²¹	+
Yeyuno²¹	+
Ileón²¹	+
Divertículo de Meckel²¹	+
Tonsilas cecales ²¹	-
Proventrículo ²⁸	-
Ventrículo gástrico ²⁸	-
Duodeno²⁸	+
Yeyuno²⁸	+
Ileón²⁸	+
Divertículo de Meckel²⁸	+
Tonsilas cecales²⁸	+

Cuadro 1.1. Número de aves con lesiones en proventrículo después de la infección con el virus de la enfermedad de Marek

Hallazgos histopatológicos	Día 5 pi	Día 7 pi	Día 14 pi	Día 21 pi	Día 28 pi
Mucosa					
Necrosis epitelial	0/5	0/5	0/5	2/5 ¹⁺	0/5
Hemorragias	2/5 ¹⁺	0/5	0/5	0/5	0/5
Atrofia de las folias	3/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	3/5 ¹⁺	3/5 ¹⁺
Lámina propia					
Infiltrado linfocitario difuso	1/5 ¹⁺	0/5	5/5 ¹⁺	2/5 ²⁺ 1/5 ¹⁺	3/5 ²⁺ 1/5 ¹⁺
Glándulas submucosas					
Descamación epitelial	2/5 ¹⁺	2/5 ¹⁺	3/5 ¹⁺	2/5	2/5 ¹⁺
Necrosis epitelial	0/5	0/5	0/5	1/5 ¹⁺	3/5 ¹⁺
Infiltrado linfocitario multifocal	0/5	2/5 ¹⁺	2/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	4/5 ¹⁺

Nota: 1+ leve

2+moderado

3+severo

Cuadro 1.2. Número de aves con lesiones en ventrículo gástrico después de la infección con el virus de la enfermedad de Marek

Hallazgos histopatológicos Día 5 pi Día 7 pi Día 14 pi Día 21 pi Día 28 pi

Mucosa

Erosiones capa de queratina	1/5 ¹⁺	3/5 ¹⁺	5/5 ¹⁺	5/5 ¹⁺	5/5 ¹⁺
Infiltrado linfocitario difuso	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5 ¹⁺
Congestión	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5 ¹⁺

Nota: 1+ leve

2+ moderado

3+ severo

Cuadro 1.3 Número de aves con lesiones en tonsilas cecales después de la infección con el virus de la enfermedad de Marek

Hallazgos histopatológicos	Día 5pi	Día 7 pi	Día 14 pi	Día 21pi	Día 28
Infiltrado heterofílico	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺
Necrosis y apoptosis	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺
Presencia de células blásticas	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺
Hemorragias en los pliegues	0/2	0/2	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺
Presencia de múltiples nódulos linfoides	0/2	0/2	0/2	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺

Nota: 1+ leve

2+ moderado

3+ severo

Cuadro 2.1. Número de aves con lesiones en proventrículo después de la infección con el virus de la anemia infecciosa

<u>Hallazgos histopatológicos</u>	<u>Día 3 pi</u>	<u>Día 5 pi</u>	<u>Día 7 pi</u>	<u>Día 14 pi</u>	<u>Día 21 pi</u>	<u>Día 28 pi</u>
Lámina propia						
Infiltrado linfocitario difuso	5/5 ¹⁺	5/5 ¹⁺	5/5 ¹⁺	3/5 ¹⁺ 1/5 ²⁺	1/5 ²⁺ 2/5 ¹⁺	5/5 ¹⁺
Necrosis y apoptosis linfoide	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5 ¹⁺	2/5 ¹⁺
Presencia de nódulos linfoide	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5 ¹⁺	2/5 ¹⁺
Glándulas submucosas						
Descamación epitelial	3/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺ 1/5 ²⁺	4/5 ¹⁺	2/5 ¹⁺	2/5 ¹⁺	3/5 ¹⁺

Nota: 1+ leve

2+ moderado

3+ severo

Cuadro 2.2 Número de aves con lesiones en duodeno después de la infección con el virus de la anemia infecciosa

Hallazgos histopatológicos	Día 3 pi	Día 5 pi	Día 7 pi	Día 14 pi	Día 21 pi	Día 28 pi
----------------------------	----------	----------	----------	-----------	-----------	-----------

Lamina propria

Infiltrado linfocitario difuso	3/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	1/5 ²⁺	1/5 ¹⁺	4/5 ¹⁺	3/5 ³⁺
Necrosis y apoptosis	0/5	2/5 ¹⁺	3/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	3/5 ¹⁺
Hiperplasia placas de Peyer	0/5	0/5	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺

Nota: 1+ leve

2+moderado

3+severo

Cuadro 2.3. Número de aves con lesiones en yeyuno después de la infección con el virus de la anemia infecciosa

Hallazgos histopatológicos	Día 3 pi	Día 5 pi	Día 7 pi	Día 14 pi	Día 21pi	Día 28pi
----------------------------	----------	----------	----------	-----------	----------	----------

Mucosa

Atrofia de las vellosidades	0/5	0/5	0/5	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺
-----------------------------	-----	-----	-----	-------------------	-------------------	-------------------

Lamina propria

Infiltrado linfocitario difuso	3/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	1/5 ²⁺	3/5 ¹⁺	4/5 ¹⁺	3/5 ¹⁺
Infiltrado heterofílico difuso	0/5	0/5	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺
Congestión	0/5	0/5	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺
Necrosis y apoptosis	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺
Hiperplasia placas de Peyer	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺

Nota: 1+ leve

2+moderado

3+severo

Cuadro 2.4 Número de aves con lesiones en Ileón después de la infección con el virus de la anemia infecciosa

Hallazgos histopatológicos	Día 3 pi	Día 5 pi	Día 7 pi	Día 14 pi	Día 21 pi	Día 28 pi
Lámina propia						
Infiltrado linfocitario difuso	3/5 ¹⁺	2/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	2/5 ¹⁺ 1/5 ²⁺ 1/5 ³⁺	2/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺ 1/5 ²⁺
Congestión	0/5	4/5 ¹⁺	2/5 ¹⁺	2/5 ¹⁺	1/5 ²⁺	1/5 ¹⁺
Necrosis y apoptosis	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺
Hiperplasia linfoide placas de Peyer	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺

Nota: 1+ leve

2+ moderado

3+ severo

Cuadro 2.5 Número de aves con lesiones en tonsilas cecales después de la infección con el virus de anemia infecciosa

Hallazgos histopatológicos	Día 3 pi	Día 5 pi	Día 7 pi	Día 14pi	Día 21	Día28
Necrosis y apoptosis	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺
Infiltrado heterofilico	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺
Hiperplasia nodular linfoide	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺

Nota :1+ leve

2+ moderado

3+ severo

Cuadro 3.1. Número de aves con lesiones en proventrículo después de la infección con el virus de la infección de la bolsa de Fabricio.

Hallazgos histopatológicos	12 hpi	Día 1 pi	Día 2 pi	Día 3 pi	Día 4 pi	Día 6 pi	Día 8	Día 10
Lámina propia								
Infiltrado linfocitario difuso	1/5 ¹⁺	3/5 ¹⁺	4/5 ¹⁺	2/5 ¹⁺	4/5 ²⁺	2/5 ¹⁺	3/5 ¹⁺ 2/5 ²⁺	2/5 ¹⁺ 2/5 ²⁺
Infiltración linfocitaria Multifocal	0/5	0/5	0/5	2/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺
Edema	5/5 ¹⁺	5/5 ¹	4/5 ¹	3/5 ¹	2/5 ¹	3/5 ¹	3/5 ¹	4/5 ¹
Glándulas submucosas								
Distensión de las glándulas	1/5 ¹⁺ 4/5 ²⁺	0/5	2/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	2/5 ¹⁺	3/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺	1/5 ¹⁺

Necrosis y apoptosis

Nota: 1+ leve

2+ moderado

3+ severo

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Cuadro 3.2 Número de aves con lesiones en tonsilas cecales después de la infección de la bolsa de Fabricio

Hallazgos histopatológicos	12 hpi	Día 1 pi	Día 2 pi	Día 3 pi	Día 4 pi	Día 6 pi	Día 8	Día 10
Infiltrado heterofílico difuso	0/5	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ²⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺
Necrosis y apoptosis	0/5	2/2 ¹⁺	2/2 ¹	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺
Hemorragias	0/5	0/5	0/5	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺	2/2 ¹⁺

Nota: 1+ leve

2+ moderado

3+ severo



FIGURA 1 A Membrana corioalantoidea de embrión de pollo inoculado con macerado de tonsilas cecales colectadas a los 28 días post-inoculación.



FIGURA 1 B Membrana corioalantoidea de embrión de pollo inoculado con macerado de divertículo de Meckel colectadas a los 21 días post-inoculación.

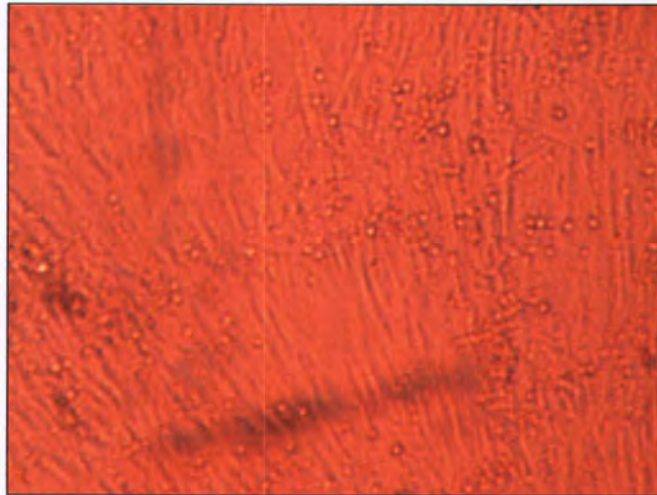


FIGURA 1 C. Cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo sin inocular

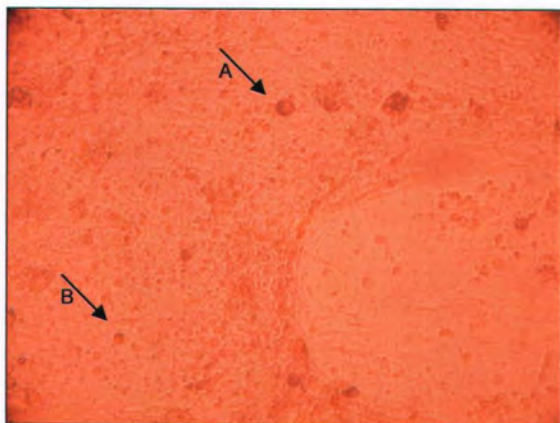


FIGURA 1 D. Cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo inoculados con membrana corioalantoidea de embrión de pollo inoculado con divertículo de Meckel colectado a los 5 días post - vacunación. Células características enfermedad de Marek flechas A y B

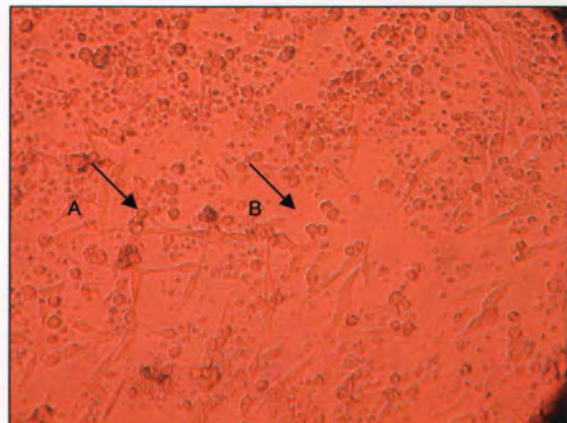


FIGURA 1 E. Cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo inoculados con membrana corioalantoidea de embrión de pollo inoculado con tonsilas cecales colectadas a los 7 días post - vacunación Células características enfermedad de Marek flechas A y B.

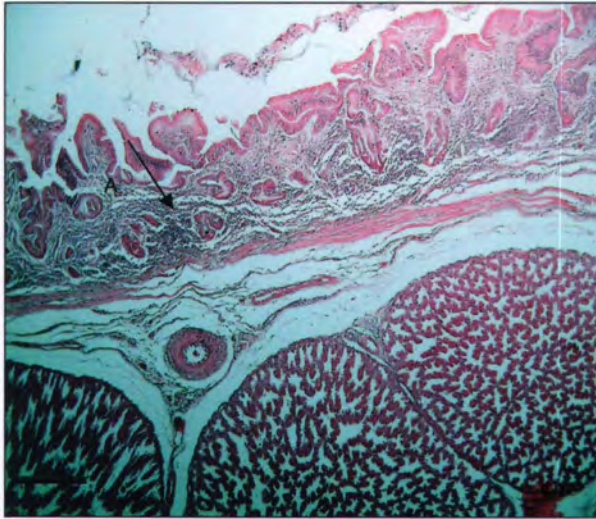


FIGURA 2 A Infiltrado linfocitario difuso en lámina propia de proventrículo de ave vacunada con el virus de la enfermedad de Marek 21 días post - vacunación (flecha). 50X. Tinción HE. Escala 257µm

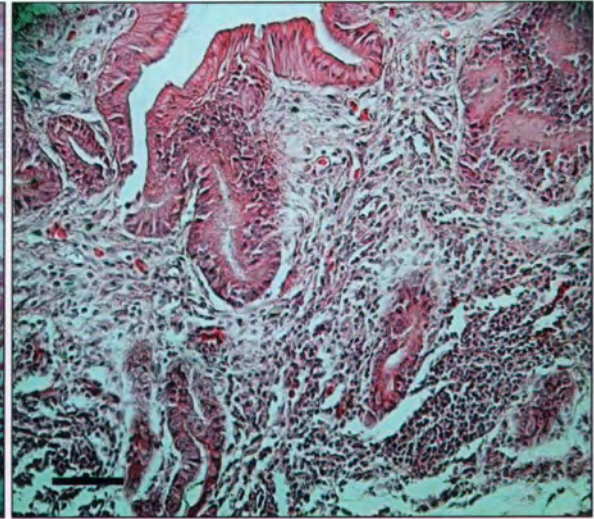


FIGURA 2 B Acercamiento de Infiltrado linfocitario difuso en lámina propia de proventrículo de ave vacunada con el virus de la enfermedad de Marek 21 días post - vacunación 200X. Tinción HE. Escala 90 µm

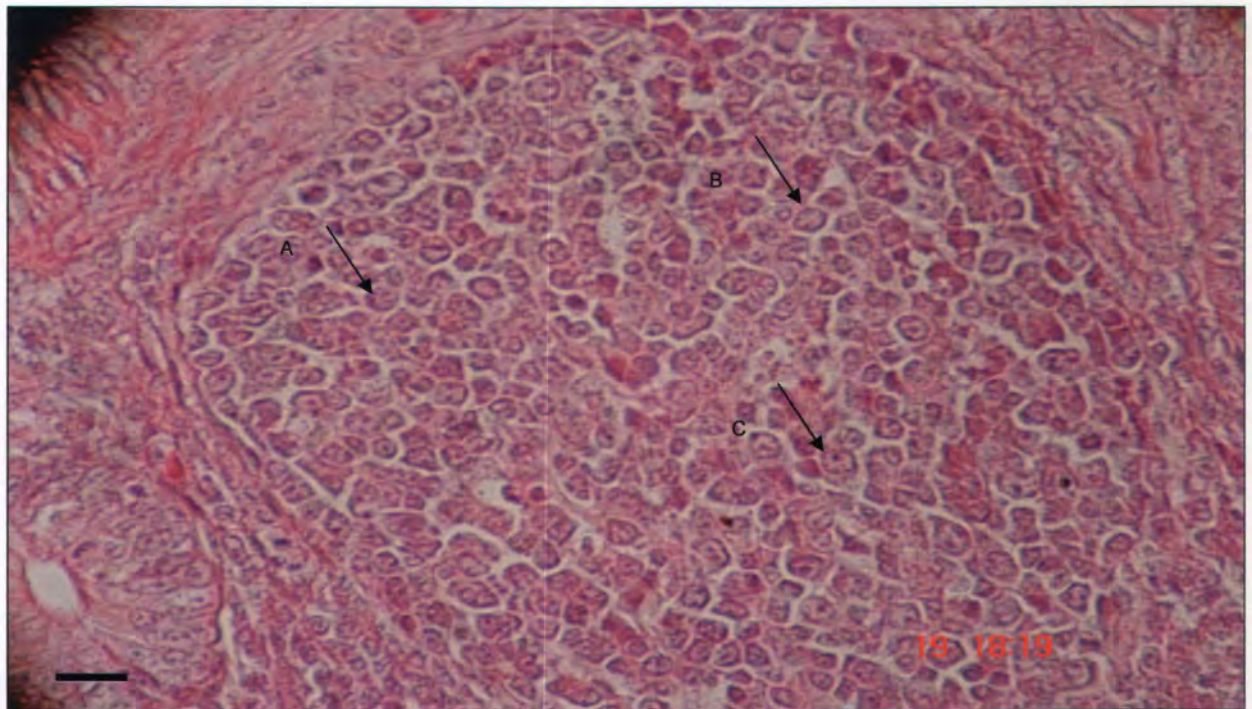


FIGURA 2 C Células blásticas en tonsilas cecales de ave vacunada con el virus de la enfermedad de Marek a los 21 días post- vacunación (flechas A; B; C) 400X. Tinción HE. Escala 26 µm.

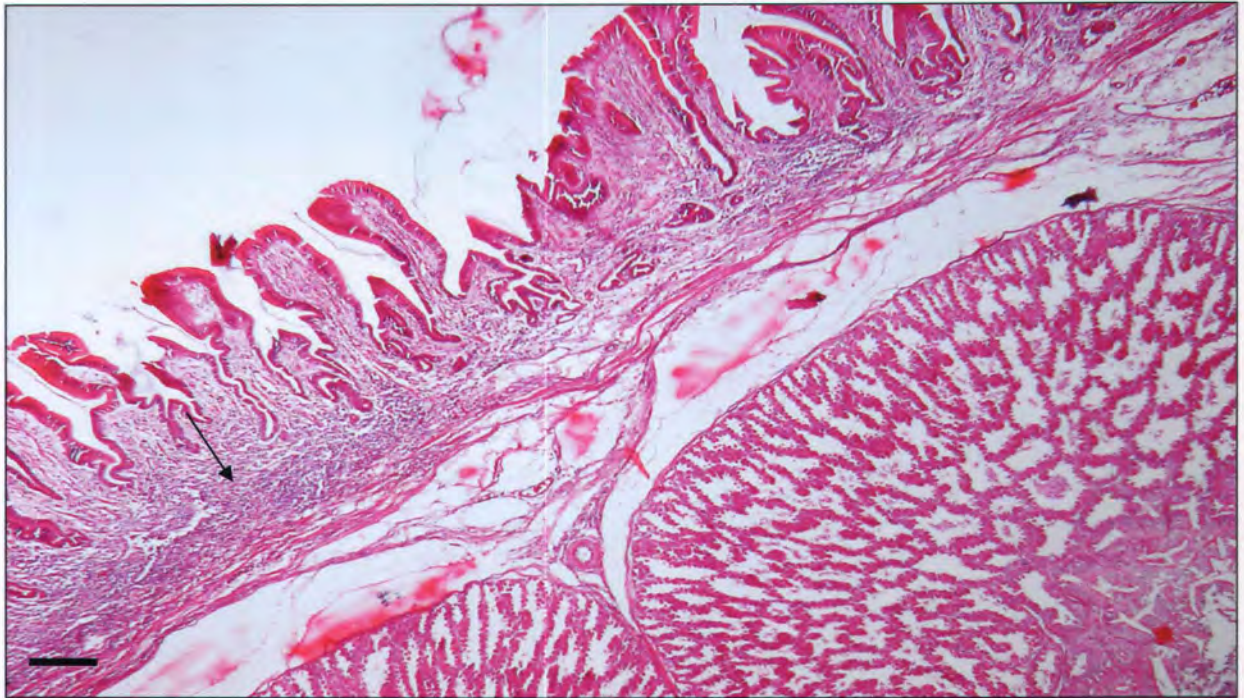


FIGURA 3 A. Infiltrado linfocitario difuso en lámina propia de proventrículo de ave desafiada con el virus de anemia infecciosa del pollo a los 14 días post – inoculación (flecha) 50X. Tinción HE. Escala 180 μ m

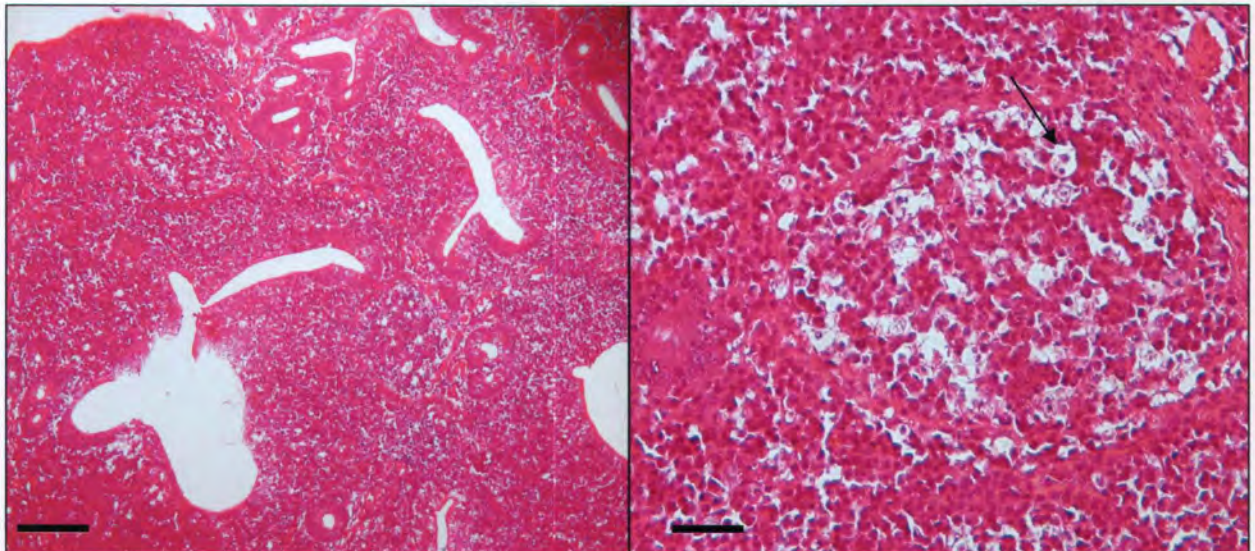


FIGURA 3 B Hiperplasia placas de Peyer en lámina propia de duodeno de aves desafiadas con el virus de anemia infecciosa del pollo 28 días post – inoculación 50X Tinción HE. Escala 300 μ m

FIGURA 3 C Necrosis y apoptosis linfocitaria en lámina propia de duodeno de aves desafiadas con el virus de anemia infecciosa del pollo 28 días post – inoculación (flecha) 400X.Tinción HE. Escala 60 μ m

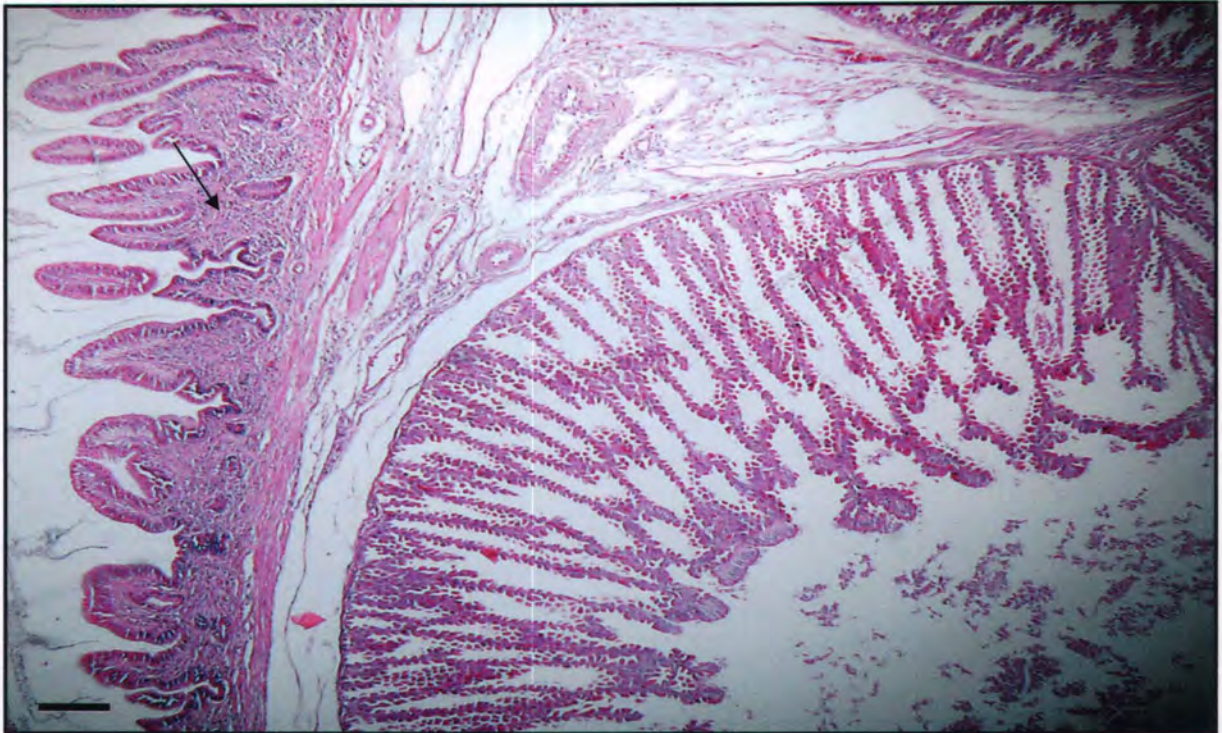


FIGURA 4 A Infiltrado linfocitario difuso, atrofia de las folias, edema y distensión de las glándulas, en lámina propia de proventriculo de ave desafiada con el virus de infección de la bolsa de Fabricio 6 días post – inoculación.100X. Tinción HE Escala 180µm

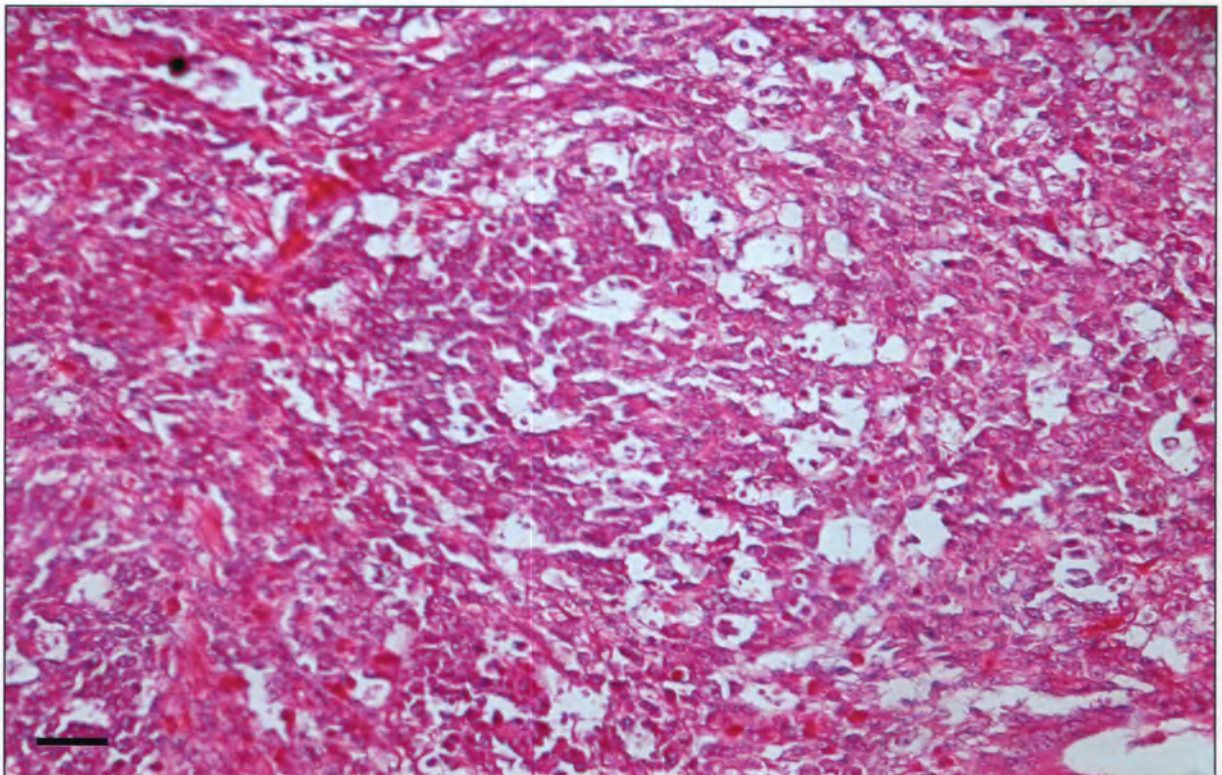


FIGURA 4 B Necrosis y apoptosis de tejido linfocitario en tonsila cecal de ave desafiada con el virus de la infección de la bolsa de Fabricio a los 4 días post- desafío 400X. Tinción HE.Escala 69 µm