

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

***CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA, BIOLÓGICA Y
MOLECULAR DE UN VIRUS DE LA INFECCIÓN DE LA
BOLSA DE FABRICO EN POLLO DE ENGORDA EN
MÉXICO, EN 2001.***

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL
P R E S E N T A
MVZ ENRIQUE OSCAR GARCIA VERA

COMITÉ TUTORIAL:

PRESIDENTE: M.V.Z. M.C VÍCTOR MANUEL PETRONE GARCIA
MVZ. Ph.D. FERNANDO CONSTANTINO CASAS
MVZ. Ph.D. ARIEL ORTIZ MUÑIZ
MVZ. Ph.D. LEOPOLDO PAASCH MARTINEZ
DVM. TAMAS FEHERVARI BONE

MÉXICO, D.F. 2004





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DECLARACIÓN

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

MVZ ENRIQUE OSCAR GARCIA VERA

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

NOMBRE: ENRIQUE OSCAR
GARCIA VERA

FECHA: 25-03-04

FIRMA: OSCAR VERA

DEDICATORIAS

**A mi esposa
A mis hijos
A mi madre
A mi Padre †
A mis hermanas**

Al Dr. Ernesto Cortés Miranda por permitir darme el privilegio de aprender a su lado la ciencia aviar

Al Dr. Víctor Petrone García por brindarme la oportunidad de continuar fortaleciendo mis conocimientos.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Por formarme profesionalmente.

Al CONACYT por su apoyo en el financiamiento de mi trabajo.

Al Dr. Ariel Ortiz Muñiz por guiarme en el fortalecimiento de mi formación profesional.

Al Dr. Fernando Constantino Casas por guiarme en el fortalecimiento de mi formación profesional.

Al Dr. Víctor Petrone García .Por ser mi tutor y apoyarme para continuar superándome.

Al Dr. Rodolfo Ramón M. Por su colaboración y coordinación para proporcionarme material biológico para este trabajo

Al Dr. Manuel Castañeda R. por su colaboración y coordinación para proporcionarme material biológico para este trabajo

Al Dr. José Luis Fuentes M. Por toda la ayuda brindada para hacer posible este trabajo.

Al Dr. Eduardo Lucio D. Por su valiosa cooperación, apoyo y brindarme las facilidades para llevar este trabajo.

Al Dr. Joaquín Chapa B. Por su valiosa cooperación, apoyo y brindarme las facilidades para llevar este trabajo.

A la MVZ Mireya Juárez y al MVZ Inkar Castellanos por su colaboración en la coordinación técnica y administrativa.

A la Sra. Mary Paz Soto González y Elvira Santana Villalpando por su colaboración administrativa.

Al personal del laboratorio de patología de Teca de Aguascalientes S.A. de C.V. por el apoyo en la realización de esta tesis.

RESUMEN

MVZ Enrique Oscar García Vera CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA, BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE UN VIRUS DE LA INFECCIÓN DE LA BOLSA DE FABRICIO EN POLLO DE ENGORDA EN MÉXICO (Bajo la dirección del **MVZ MC Víctor Petrone García, MVZ Ph.D. Fernando Constantino Casas, MVZ Ph.D. Ariel Ortiz Muñiz, MVZ Ph.D. Leopoldo Paasch Martínez y el DVM Tamas Fehervari Bone**).

Se realizó el aislamiento de un virus variante de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF) denominándosele cepa OGVP-UNAM a partir de muestras de granjas comerciales de pollo de engorda en el Altiplano de México. Se evidencio la existencia del VIBF midiendo la respuesta serológica con la técnica ELISA. Se encontraron cantidades de anticuerpos mayores utilizando gabinetes de trabajo ELISA IBD+ PROflok PLUS(r) en comparación al gabinete ELISA IBD Pro FLOK(r); sin embargo, ambos análisis de ELISA presentaron curvas similares de anticuerpos. La prueba de micro virus suero neutralización (MVSN) utilizando como antígeno una cepa convencional de VIBF, presentó escasa respuesta serológica, sin correlación con las ambas pruebas de ELISA. Por medio de la técnica de ELISA de captura (AC-ELISA) se detectó el VIBF, el cuál contiene el anticuerpo monoclonal (AcM) #8 y ausentes los B-29,R-63 y 69. También se aisló el virus en embrión de pollo libres de patógenos específicos, realizándose la caracterización biológica del virus y comparándolo con cepa clásica EDGAR por inoculación oral en pollitas libres de patógenos específicos y pollito de engorda comercial, no produciendo mortalidad o signos clínicos de la enfermedad. El índice bursal se deterioró con mayor severidad y más rápido con la cepa OGVP-UNAM, en comparación a la cepa EDGAR. En las lesiones microscópicas la cepa OGVP-UNAM produjo en los tres primeros días, más disminución del tejido linfoide y posteriormente mayor cantidad de células corticomedulares en comparación a la cepa EDGAR. En la caracterización molecular mediante el estudio del polimorfismo en los fragmentos de restricción, la cepa OGVP-UNAM tuvo un patrón molecular diferente a cepas vacunales y de campo hasta ahora conocidas.

Palabras clave: Infección de la bolsa de Fabricio, virus de la infección de la bolsa de Fabricio, aislamiento, caracterización, pollo de engorda.

SUMMARY

MVZ Enrique Oscar García Vera SEROLOGIC, BIOLOGIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS IN MEXICO BROILERS.

A variant virus of infectious bursal disease (VIBF) called OGVP-UNAM was isolated from commercial broiler chickens in a farm on the Mexican altiplan. The existence of virus infection was demonstrated by serology response through ELISA technique. Higher antibody level was found using cabinets of ELISA IBD+PRO flock PLPUS than with IBD Pro FLOK however similar curves of antibody level were obtained by both ELISA kits. Poor antibody response was detected with conventional VIBF in micro virus seroneutralization test without any correlation with both ELISA tests results. Using the method of ELISA capture test (AC-ELISA) the presence of VIBF was detected which contained monoclonal antibody (AcM) #8 with lack of B-29, R-63 and 69. The virus was isolated in specific pathogens free (SPF) chicken embryos as well and the isolate compared with classic EDGAR virus did not provoke neither mortality nor symptoms in both, SPF and commercial broiler chickens. Bursal index deteriorated with higher severity and quicker in time in case of OGVP-UNAM virus than with EDGAR strain. As far as the histopathology lesions are concerned, OGVP-UNAM virus caused more lymphoid tissue diminution in the first three days and later more quantity of corticomedular cells were observed than in case of EDGAR virus. The OGVP virus showed a molecular pattern different than the vaccine viruses used today in the field when the strain was characterized in its molecular structure through analysis of polymorphism in fragmentation of restriction.

Key words: Infectious bursal disease virus, isolation, characterization, broiler

CONTENIDO

Capitulo 1.0 INTRODUCCIÓN

- 1.1 Historia de la enfermedad**
- 1.2 Distribución geográfica**
- 1.3 Etiología de la IBF**
- 1.4 Propiedades antigénicas del VIBF**
- 1.5 Epizootiología**
- 1.6 Especies susceptibles**
- 1.7 Patogenia**
- 1.8 Características clínicas**
- 1.9 Lesiones macroscópicas**
- 1.10 Lesiones microscópicas**
- 1.11 Efectos inmunodepresores del VIBF**
- 1.12 Diagnóstico**
- 1.13 Prevención y control**
- 1.14 Objetivos**

Capitulo 2.0 MATERIAL y MÉTODOS

Capitulo 3.0 RESULTADOS

Capitulo 4.0 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Capitulo 5.0 LITERATURA CITADA

Capitulo 6.0 CUADROS

Capitulo 7.0 FIGURAS

LISTA DE CUADROS

- CUADRO 1.** MEDIAS DE TÍTULOS DE ANTICUERPOS CONTRA VIBF EN LA PRUEBA DE ELISA NORMAL IBD ProFLOK®.
- CUADRO 2.** MEDIAS DE TÍTULOS DE ANTICUERPOS CONTRA VIBF EN LA PRUEBA DE ELISA IBD+PROflok PLUS®.
- CUADRO 3.** TÍTULOS DE ANTICUERPOS CONTRA VIBF EN LA PRUEBA DE MICROVIRUSUERONEUTRALIZACIÓN.
- CUADRO 4.** CORRELACIÓN ENTRE PRUEBA ELISA Y PRUEBA VSN.
- CUADRO 5.** DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO EN BOLSA CLOACAL GRANJA A.
- CUADRO 6.** DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO EN BOLSA CLOACAL GRANJA B.
- CUADRO 7.** DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO EN BOLSA CLOACAL GRANJA C.
- CUADRO 8.** DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO EN BOLSA CLOACAL GRANJA D.
- CUADRO 9.** CALIFICACIÓN DEL PROMEDIO DE LESIONES EN TODOS LOS CURSOS.
- CUADRO 10.** CLASIFICACIÓN DE LESIONES HISTOLÓGICAS EN TEJIDO LINFOIDE DE LA BOLSA CLOACAL.
- CUADRO 11.** CLASIFICACIÓN DE LESIONES HISTOLÓGICAS EN TEJIDO EPITELIAL DE LA BOLSA CLOACAL.
- CUADRO 12.** PROMEDIO DE LA SEVERIDAD DE LESIONES HISTOLÓGICAS SEMANAL EN CADA EDAD EN BOLSA CLOACAL.
- CUADRO 13.** DETECCIÓN DE VIBF POR CAPTURA DE ANTIGENO MEDIANTE PRUEBA ELISA CON ANTICUERPO MONOCLONAL 8.

- CUADRO 14.** DETECCIÓN VIBF POR CAPTURA DE ANTIGENO MEDIANTE PRUEBA ELISA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES B69,R63 Y #10.
- CUADRO 15.** EXPRESIÓN DE ANTIGENOS EN CEPAS DEL VIBF EN PRUEBA DE CAPTURA ELISA.
- CUADRO 16 .** CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA. RESPUESTA SEROLÓGICA A LA PRUEBA ELISA.
- CUADRO 17.** CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA. RESPUESTA SEROLÓGICA A LA PRUEBA VSN.
- CUADRO 18.** CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA . INDICE BURSAL AVES ALPES Y POLLO DE ENGORDA.
- CUADRO 19.** CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA. DETERMINACIÓN DE PERSISTENCIA DEL VIBF EN TEJIDO BURSAL MEDIANTE ELISA DE CAPTURA AL ANTÍGENO # 8.
- CUADRO 20.** CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA. RE AISLAMIENTO DEL VIBF POST-DESAFIO.
- CUADRO 21.** CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.
- CUADRO 22.** IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE DIFERENTES CEPAS Y VACUNAS DEL VIBF.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR EL VIBF

FIGURA 2. COMPARATIVO MEDIA. EN EL PERIODO. TITULOS ACS. ELISA PLUS NORMAL.

FIGURA 3. TÍTULOS DE ANTICUERPOS CONTRA VIBF (VSN)

FIGURA 4. COMPARATIVO MEDIA DEL PERIODO DE 6 SEM ELISA VSN.

FIGURA 5. PORCENTAJE DE TEJIDO LINFOIDE EN AVES ALPES.

FIGURA 6. PORCENTAJE DE TEJIDO LINFOIDE EN POLLO DE ENGORDA.

FIGURA 7. PORCENTAJE DE CÉLULAS CORTICOMEDULARES ALPES.

FIGURA 8. PORCENTAJE DE CÉLULAS CORTICOMEDULARES POLLO DE ENGORDA.

CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA, BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE UN VIRUS DE LA INFECCIÓN DE LA BOLSA DE FABRICIO EN POLLO DE ENGORDA EN MÉXICO EN 2001

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia de la enfermedad

La infección de la bolsa de Fabricio (IBF), también llamada enfermedad de Gumboro se comunicó su existencia al final de la década de los 50' en Gumboro, Delaware E.U.A. y el reconocimiento de que el virus producía una enfermedad específica que afectaba a la bolsa cloacal (bolsa de Fabricio) de los pollos fue descrita por Crosgrave en el año de 1962.^{9,41, 69,39}

1.2 Distribución geográfica

La IBF ha sido reportada en la mayoría de las áreas avícolas del mundo. Después del primer brote identificado en Estados Unidos de América en el año de 1957, la enfermedad se ha descrito en Gran Bretaña, Italia, Austria, España, Japón, Zaire, Israel, Egipto y Zambia.^{39,53} A finales de la década de los 80' se informó de la existencia de cepas variantes en Estados Unidos de América, Canadá, Venezuela y Argentina, para 1987; los primeros casos de virus muy virulentos de la IBF (VV IBF) aparecen en Holanda, Bélgica e Inglaterra, pero no en América. Para 1989 se informó la presencia de esta enfermedad en Medio Oriente y África.^{24, 54} En México la enfermedad se presenta desde el año de 1962, en el Distrito Federal, Morelos, Edo. de México y en Sonora es descrito en el año de 1969⁷, para 1971 se realiza un seguimiento serológico en donde el 90.5 % de las aves, presentan anticuerpos contra cepas clásicas de IBF⁶⁷ y para el año de 1995 se realizan estudios en donde se reportan cepas del virus IBF compatibles con patrones antigénicos sugestivos de virus variantes.⁴⁴ Sin embargo, no existen reportes oficiales hasta el momento de la presencia de cepas variantes en México.

1.3 Etiología de la IBF

El virus causante de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF) es miembro de la familia Birnaviridae, su genoma consta de ARN de doble banda segmentada, es desnudo, con simetría icosaédrica y diámetro que varía de 55 a 65 nm. El genoma consta de dos segmentos, denominados A y B, el de mayor tamaño es el A el cual codifica para tres proteínas virales denominadas VP2, VP3 y VP4, el segmento B es pequeño y codifica para VP1.^{28,36,41}

La VP1 es la RNA polimerasa, la VP4 se presume que es una proteasa viral y el segmento VP2 contiene al menos tres epítomos independientes. Estos epítomos son bloqueados por anticuerpos, con lo que se produce neutralización viral. Estudios realizados, demuestran que cambios en la región VP2 están relacionadas con alteraciones en las propiedades antigénicas de las variantes del virus.^{14,31,16,46,47,73}

La proteína viral VP3 contiene primeramente al antígeno específico de grupo y la VP2 contiene al menos un mayor epítomo neutralizante que se usa para diferenciar entre los 2 serotipos del VIBF.^{11,16,32}

1.4 Propiedades antigénicas del VIBF

Se han descrito variaciones antigénicas entre virus de IBF, evidenciando la presencia de dos serotipos, denominándoseles serotipo 1 y serotipo 2. El serotipo 1 es patógeno para los pollos y cepas individuales difieren marcadamente en su virulencia, entre los virus de este serotipo se demostró variación antigénica entre cepas en donde trece cepas se agruparon en seis subtipos antigénicos²⁷ las variaciones más significativas se presentan en algunas cepas del serotipo 1 denominadas variantes antigénicas aisladas por Rosemberger⁵⁰ que a pesar de pertenecer al serotipo 1 resultaron antigenicamente diferentes a las cepas del VIBF conocidas como clásicas. Estudios realizados por Snyder *et al.*,^{57,58} determinaron la existencia del epítomo común en todas las cepas conocidas, denominándolo por el anticuerpo monoclonal R63 y el B69 solo se encontró en cepas clásicas convencionales del VIBF. El serotipo 2, aislado a partir de pavos es apatógeno para pollos y pavos,^{36,15,22} por lo que de acuerdo a su variación antigénica y virulencia las cepas del serotipo 1 pueden ser divididas en varios grupos: cepas clásicas: virulentas, intermedias, atenuadas; cepas variantes o también denominadas "calientes" y cepas muy virulentas.^{30,57,59}

Las cepas clásicas virulentas producen inflamación y severa necrosis linfoide de la bolsa de Fabricio, resultando en inmunosupresión, enfermedades secundarias y

moderada mortalidad. Las Cepas atenuadas son las que se han adaptado a líneas celulares, estas cepas se utilizan como vacunas y de acuerdo a su invasibilidad y lesiones que producen sobre la bolsa cloacal se les clasifican intermedias y suaves o frías.²⁰ Las cepas variantes fueron reconocidas por su habilidad para no ser neutralizadas por antisueros contra cepas clásicas, pollos afectados por estas cepas, se caracterizan por atrofia severa de la bolsa cloacal sin mostrar lesión de inflamación como se presenta en las infecciones por cepas clásicas^{2,3,10}. Las cepas muy virulentas son aquellas que aún en presencia de grandes niveles de anticuerpos maternos son capaces de producir hasta 60 y 100% de mortalidad, estas cepas causan típicas lesiones del VIBF y son antigénicamente similares a las cepas clásicas de IBF.^{5,41,27}

1.5 Epizootiología

La enfermedad es muy contagiosa y se difunde rápidamente entre aves afectadas y sanas. Se transmite principalmente por vía digestiva (agua, alimento contaminado y por contacto directo). Experimentalmente se ha transmitido por vía oral, intramuscular, subcutánea, endovenosa, ocular, intranasal, intracloacal e intracerebral. El virus puede permanecer en el alimento, cama, equipo y locales hasta 122 días, se ha demostrado que el *Alphitobius diaperinus* puede tener capacidad de transmitir la infección al ser ingeridos por las aves, el agente causal es eliminado en las heces de aves infectadas hasta por dos semanas.²⁰

1.6 Especies susceptibles

El VIBF afecta a todas las estirpes de pollos, siendo las aves de estirpes ligeras tipo "Leghorn" más susceptibles, se han informado infecciones naturales en pavos, patos y avestruces.⁴²

1.7 Patogenia

La vía de entrada principal del virus es la oral (Figura 1), después de cuatro a cinco horas, el virus se replica en células linfoides y macrófagos de intestino y a partir de ahí se disemina en especial en el órgano blanco que es la bolsa cloacal, ahí el virus se replica rápidamente y produciendo destrucción de linfocitos B de la bolsa. El periodo de incubación es entre tres y cuatro días.⁶⁰

1.8 Características clínicas

La enfermedad producida por el VIBF es altamente contagiosa en pollos jóvenes, la presentación clínica ocurre entre las 3 y 6 semanas de edad caracterizada por depresión, anorexia, erizamiento de las plumas, temores, postración, aumento de tamaño de la bolsa cloacal, hemorragias en músculo esquelético, diarrea y mortalidad. La presentación subclínica ocurre generalmente en pollos menores de 3 semanas de vida resultando en inmunodepresión, en donde se observa aumento de tamaño inicial de la bolsa cloacal y posteriormente disminución de tamaño.⁵¹

1.9 Lesiones macroscópicas

A la necropsia las aves están deshidratadas, existiendo petequias o equimosis en músculo esquelético, riñones aumentados de tamaño con presencia de uratos lo que es probablemente consecuencia de la deshidratación severa que sufren los animales afectados, mientras que las aves sacrificadas durante el curso de la enfermedad los riñones aparecen normales, la bolsa cloacal es el órgano blanco del virus, al tercer día de la infección comienza a incrementar su tamaño y peso alcanzando el doble de su tamaño, al cuarto día se inicia la disminución de tamaño de la bolsa para que al octavo día la bolsa tenga un tercio de su tamaño original, alrededor del tercer día de la infección el lumen de la bolsa contiene exudado de consistencia gelatinosa, amarillento y conforme pasa el tiempo toma apariencia caseosa, los pliegues o plicas de la bolsa cloacal al principio están prominentes y conforme avanza la infección estos pliegues disminuyen de tamaño, la mucosa puede tener petequias, equimosis y focos necróticos, el bazo se encuentra aumentado de tamaño y pueden existir focos grisáceos en su superficie. En la parte interna de la unión del proventrículo con la molleja pueden observarse hemorragias de tipo petequial.^{20,37}

1.10 Lesiones microscópicas

Las lesiones microscópicas producidas por el virus ocurren primeramente en estructuras linfoides como: bolsa cloacal donde las lesiones son más severas y evidentes, bazo, timo, glándula de Harder y tonsilas cecales.²⁰

Las lesiones presentes en los órganos afectados por el VIBF son:

1. Su serosa aparece engrosada existiendo algo de hiperemia e infiltración de heterófilos. En los folículos aparecen linfocitos con núcleos picnóticos, algunos

espacios vacíos entre el tejido conectivo y las células, posiblemente debido al edema.

2. El lumen contiene un pequeño acumulo de exudado compuesto por heterófilos, eritrocitos y unas cuantas células plasmáticas y macrófagos. El exudado es visto en la serosa, mientras que en los folículos existe una infiltración de heterófilos. La corteza y la médula de los folículos se hacen indistinguibles una de otra y las prolongaciones de la bolsa se atrofian.
3. Existe gran acumulo de exudado en el lumen de la bolsa compuesto por heterófilos en degeneración, algunos eritrocitos, células plasmáticas y macrófagos. Hay hiperemia e infiltración de heterófilos en los folículos y la médula de los mismos está libre de linfocitos, en algunos de ellos existe acumulo de eosinófilos.
4. Hay exudado del mismo tipo celular anteriormente mencionado, se observa edema en la serosa y submucosa y puede haber vacuolas en las prolongaciones. Debido a la ausencia total de linfocitos existe una proliferación del epitelio de la Bursa, produciéndose una estructura de apariencia glandular del epitelio columnar simple.

Bazo

Existe una pronunciada infiltración de heterófilos en los sinusoides; en ocasiones se observan algunas hemorragias y en los centros germinales existen restos celulares, núcleos picnóticos y material eosinófilo.

Timo

El timo en su corteza tiene algunas áreas con hiperemia importante. Presenta infiltración de heterófilos especialmente en médula, existiendo en la corteza disminución de linfocitos y agregaciones de restos celulares y núcleos y picnóticos.

Riñón

Las lesiones histológicas del riñón no son específicas y es probable que ocurran por la severa deshidratación que sufren los animales afectados, aunque se ha descrito glomérulo nefritis y vasculitis resultado de la formación de complejos inmunes, así como atrofia de glomérulos, edema e infiltración de heterófilos y leucocitos mononucleares.

Hígado

Puede existir una ligera infiltración perivascular de mononucleares.

Tonsilas cecales y glándula de Harder

Estos órganos exhiben alguna reacción celular en los estadios tempranos de la enfermedad, caracterizada por infiltrado de células plasmáticas.

1.11 Efectos inmunodepresores del VIBF

El VIBF es un agente inmunodepresor para las aves debido a su capacidad de causar necrosis y apoptosis de linfocitos B localizados en la bolsa cloacal, ocasionando atrofia del órgano, los efectos adversos sobre la inmunidad celular son mucho menos severos en comparación a la respuesta mediada por anticuerpos.^{52,61}

El VIBF es altamente contagioso e infecta preferentemente a los linfocitos B inmaduros que exhiben en su membrana IgM monoméricas de pollos, induciéndoles diferentes grados de inmunodepresión.⁵⁵

Debido a la inmunodepresión las aves presentan un incremento en susceptibilidad a las infecciones como lo son: *Salmonella enteritidis*, bronquitis infecciosa, *Escherichia coli*, reovirus, enfermedad de Newcastle, hepatitis con cuerpos de inclusión, coccidiosis.^{24,41,45}

La respuesta inmune a las vacunaciones se ve también afectada pues existe una disminución en la producción de anticuerpos y cuando la infección ocurre simultáneamente con otros agentes infecciosos se incrementa el problema patológico. La severidad de la inmunodepresión esta relacionada con la edad del ave al momento de la infección, si esta ocurre durante las dos primeras semanas de vida es mucho más severa que si ocurre después.^{37,62}

1.12 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad basado en signos clínicos es difícil, por lo que se tiene que recurrir a metodologías para poder realizar un diagnóstico preciso y estas están dirigidas a: detectar y cuantificar anticuerpos en el ave, el aislamiento del virus, detección del antígeno, identificación molecular y detección de lesiones histológicas en bolsa cloacal, así mismo existen técnicas auxiliares como la radioinmunodifusión y la inmunoelectroforesis.^{13,68}

Cuantificación de niveles de anticuerpos. Las dos técnicas más utilizadas son la técnica de virus-suero-neutralización (VSN)¹⁸ y la técnica de ELISA.^{22,23,35,63,64,65} La prueba de VSN es la prueba de "referencia", Mide anticuerpos que evitan la penetración celular del virus. La técnica se realiza por medio de dilución seriada de suero enfrentándolo a una cantidad conocida de virus (suero diluido-virus constante) en cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo. Considerándose como título al recíproco de la máxima dilución de suero que neutralizó en un 100% el efecto citopático provocado por el VIBF.⁴ En la prueba ELISA una micro placa adherida con antígeno de VIBF se le agrega una muestra de suero diluido de pollo que contenga anticuerpos contra el VIBF formara un complejo Ag-Ac, este complejo después de un periodo de incubación es enjuagada la micro placa para eliminar todo lo que no es complejo Ag-Ac y se le agrega el conjugado, compuesto de anticuerpos de cabra anti-IgG de pollo y una enzima, peroxidasa de rábano, el cual se unirá al complejo Ag-Ac existente previamente, después de un periodo de incubación el conjugado no unido es removido por un segundo paso de lavado. El substrato que contiene un cromógeno, ABTS es agregado y reaccionará con la enzima peroxidasa desarrollando un color que va de claro a azul-verdoso y este será directamente proporcional al nivel de anticuerpos contra el VIBF que contiene la muestra de suero sometida a esta prueba.^{8,39}

Aislamiento viral. Este se puede intentar en embriones de pollo a partir de muestras de bolsas cloacales y de bazo por vía de la membrana corioalantoidea. La muerte embrionaria ocurre entre 3 y 5 días postinoculación, las lesiones observadas en los embriones son: congestión y hemorragias cutáneas, esplenomegalia y necrosis hepática, en cultivo celular se utilizan células de bolsa cloacal de embrión de pollo, de riñón y fibroblastos, produciendo efecto citopático.⁴⁹

Detección de antígeno. Se puede detectar el antígeno por técnicas de: ELISA de captura, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.¹² La ELISA de captura se realiza en pozos de microplacas recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos, agregando un sobrenadante del triturado de bolsa cloacal. Si hay virus presente y este expresa el epítipo reconocido por el monoclonal adherido al pocito, el antígeno es capturado y después revelado al añadir un suero de pollo específico para el VIBF, seguido por el conjugado de compuesto de anticuerpos de cabra anti-IgG de pollo y una enzima, peroxidasa de rábano, el cual se unirá al

complejo Ag-Ac existente previamente, después de un periodo de incubación el conjugado no unido es removido por lavado. El substrato que contiene un cromógeno, ABTS es agregado y reaccionará con la enzima peroxidasa desarrollando un color que va de claro a azul-verdoso y éste será directamente proporcional al nivel de antígeno detectado.^{3,26,29,33,34,38}

Inmunohistoquímica. Esta técnica está basada en el uso de un marcador para detectar el antígeno de IBF a nivel celular en una variedad de muestras (incluyendo: monoestratos de cultivo celular, improntas, cortes histológicos), permitiendo *in situ* demostrar el agente o sus antígenos, dando un diagnóstico rápido y definitivo de la enfermedad. La técnica de inmunohistoquímica utiliza un complejo de avidina-biotina-peroxidasa y un anticuerpo monoclonal específico, entre tanto la prueba de inmunofluorescencia utiliza un conjugado con isothiocinato de fluoresceína.¹²

Caracterización molecular. Las técnicas actuales para tipificar VIBF incluyen la transcriptasa reversa (RT)/reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida del análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), esta prueba se basa en la amplificación de la secuencia de nucleótidos del genoma que codifica la región variable VP2, la sección amplificada es entonces examinada con 6 endonucleasas de restricción (Dra I, Sac I, Taq I, Sty I, BstNI y Ssp) que cortan el DNA amplificado, resultando en un número de fragmentos que pueden ser separados y visualizados por electroforesis.^{5,17,29,30,31,34,40,66}

Histopatología. La observación de lesiones microscópicas en la bolsa cloacal resultan de utilidad, si bien no son patognomónicas sí precisan patrones de comportamiento del virus durante su tiempo de replicación en la bolsa, definiéndonos el tiempo que ha transcurrido desde su entrada hasta el momento de su evolución, la metodología para evaluar el daño bursal analiza por separado las lesiones del tejido linfoide y el tejido epitelial de la bolsa cloacal, además de las lesiones derivadas de un proceso inflamatorio y de un proceso necrótico degenerativo en el tejido linfoide⁶.

1.13 Prevención y control

La prevención y control de esta enfermedad básicamente incluye medidas de bioseguridad y la vacunación. La vacunación se realiza de acuerdo al fin zootécnico de las aves, aplicando estas por diferentes vías de inoculación¹⁹ y se utilizan actualmente dos tipos: las vacunas a virus vivo y vacunas a virus muerto

emulsionado en aceite, las vacunas a virus vivo producen una respuesta inmune activa, estas, a su vez tienen diversos tipos, basadas en virulencia y patogenicidad de las cepas utilizadas, existiendo cepas de virulencia alta y virulencia intermedia, cepas clásicas y variantes, causando estas, diferentes grados de atrofia de la bolsa cloacal.^{21,42,43,70,71,72} No existe un programa de vacunación único para esta enfermedad, porque para establecer un programa depende mucho de la inmunidad pasiva de las aves jóvenes y de la uniformidad de anticuerpos entre las aves de la misma parvada, ya que algunas cepas vacúnales no producen una respuesta inmune adecuada en presencia de anticuerpos maternos y existen otras vacunas capaces de producir inmunodepresión si se aplican en pollos sin o bajos niveles de inmunidad y la existencia de cepas variantes que no son neutralizadas por las vacunas elaboradas con cepas clásicas. El otro tipo de vacuna utilizada son las inactivadas emulsionadas en vehículos oleosos, estas se utilizan habitualmente en aves reproductoras con el fin de reforzar primero vacunaciones a virus vivo y prolongar la presencia de anticuerpos a niveles altos durante su vida productiva de las reproductoras con el fin de transmitir inmunidad materna a su progenie. Estas vacunas pueden ser elaboradas con cepas clásicas y variantes del virus^{63,64,71}.

1.14 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar las características serológicas, biológicas y moleculares de un aislamiento de VIBF en parvadas comerciales de pollo de engorda de 1 a 6 semanas de edad sin vacunar VIBF en el altiplano de México.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la existencia del VIBF en campo.
 - 1.1. Realizar la detección y comparación de anticuerpos mediante dos gabinetes de diagnóstico de ELISA comerciales sensibilizado uno con VIBF propagado en cultivo celular de embrión de pollo y otro propagado en cultivo celular de bolsa cloacal en parvadas comerciales de pollo de engorda de 1 a 6 semanas de edad sin vacunar VIBF en el altiplano de México.
 - 1.2. Realizar la prueba de VSN en parvadas comerciales de pollo de engorda de 1 a 6 semanas de edad sin vacunar VIBF en el altiplano de México.

- 1.3. Comparar los títulos detectados con la prueba ELISA y con la prueba de VSN determinando cual de los 2 gabinetes de ELISA tiene un comportamiento más parecido a VSN en parvadas comerciales de pollo de engorda de 1 a 6 semanas de edad sin vacunar VIBF en el altiplano de México.
- 1.4. Determinar la presencia del antígeno del VIBF mediante la captura de antígeno por los anticuerpos monoclonales #8,B69,R63 y #10 utilizando la técnica ELISA en parvadas comerciales de pollo de engorda de 1 a 6 semanas de edad sin vacunar VIBF en el altiplano de México para diferenciar la presencia de una cepa clásica o cepa variante.
- 1.5. Cuantificar lesiones histológicas en la bolsa cloacal atribuibles a VIBF en parvadas comerciales de pollo de engorda de 1 a 6 semanas de edad sin vacunar VIBF en el altiplano de México.
- 1.6. Realizar el aislamiento del VIBF en parvadas comerciales de pollo de engorda de 1 a 6 semanas de edad sin vacunar VIBF en México.
2. Realizar la caracterización biológica del virus aislado, mediante el desafío en aves SPF y pollo de engorda proveniente de parvadas comerciales de pollo de engorda de 1 a 6 semanas de edad sin vacunar VIBF en México.
3. Realizar la caracterización molecular del VIBF aislado de parvadas comerciales de pollo de engorda de 1 a 6 semanas de edad sin vacunar VIBF en México mediante la técnica de RFLP.

HIPÓTESIS.

1. El gabinete de diagnóstico de ELISA (IBD+)® va a detectar títulos más altos de anticuerpos contra el VIBF en las parvadas comerciales de pollo de engorda de 1 a 6 semanas de edad sin vacunar VIBF en el altiplano de México.
2. El gabinete de diagnóstico de ELISA (IBD+)® tendrá similar comportamiento en la curva de anticuerpos comparado con la prueba de VSN.
3. El antígeno viral detectado por la prueba de ELISA de captura en pollos de engorda no vacunados con VIBF en el altiplano de México va corresponder a virus variante detectado por los anticuerpos monoclonales B69, R63 y #10.
4. El virus variante aislado en pollos de engorda no vacunados con VIBF produce lesiones leves en la bolsa cloacal.
5. El virus de las parvadas comerciales de pollo de engorda de 1 a 6 semanas de edad sin vacunar VIBF en México al caracterizarlo biológicamente producirá elevada mortalidad e inmunodepresión en las aves desafiadas.

Capítulo 2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Determinación de la existencia del VIBF en campo.

2.1.1 Aves para experimentación. Pollo de engorda estirpe Ross alojadas en 4 granjas comerciales identificadas como A, B, C y D, ubicadas en la misma región geográfica, procedentes de un lote único de reproductores, con inmunidad materna contra VIBF y NC, criados bajo condiciones convencionales, desde el 1° día hasta el día 42 de edad.

2.1.2. Programa de vacunación. En estas granjas las aves son vacunadas únicamente contra la enfermedad de Newcastle a los 8 días de edad, virus vivo cepa La Sota vía ocular y simultáneamente virus muerto emulsionado en aceite vía subcutánea. A los 21 días de edad se revacunó vía ocular con cepa La Sota.

2.1.3. Recolección de sueros. Se tomaron 18 sueros de pollo de engorda al azar por granja a las edades de 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días. Las muestras fueron tomadas mediante punción cardíaca y se extrajo entre 3 y 5 mL. de sangre por ave, lo cual será depositada en frascos limpios y secos, el frasco será cerrado y puesto en posición horizontal para facilitar la contracción del coágulo y poder obtener el suero, el suero fue almacenado a temperatura de -20°C hasta el final del período de obtención de todas las muestras (6 semanas) para analizar en un mismo proceso todos los sueros.

2.1.4. Recolección de bolsas cloacales para evaluación de alteraciones histológicas.

Se tomaron 5 bolsas cloacales por granja, con periodicidad semanal a las edades de 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días de edad. Las muestras se colocaron en formalina al 10% amortiguada a un pH de 7.5 en proporción 1 parte de tejido y 10 partes de formalina para su fijación y su posterior proceso.

2.1.5. Recolección de bolsas cloacales detección del antígeno mediante la prueba de ELISA de captura.

Se tomaron 15 bolsas cloacales por granja, con periodicidad semanal a las edades de: 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días de edad. Las muestras fueron recolectadas de pollos sacrificados por dislocación cervical, tomando la bolsa cloacal y manteniéndola en congelación a -20°C hasta su proceso.

2.1.6. Recolección de órganos para el aislamiento viral del virus de IBF.

Se recolectaron a los 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días de edad los órganos a partir de 10 aves sacrificadas por dislocación cervical tomando: bolsa cloacal, bazo, tonsilas cecales, proventrículo y timo, almacenándose a -20°C para su posterior

procesamiento, el aislamiento se realizará en embrión de pollo de acuerdo a Rosemberger.⁴⁹

2.1.7. Lugar de realización de análisis de laboratorio.

Todas las pruebas de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Patología de Tecaa de Aguascalientes S.A. de C.V., a excepción de la caracterización molecular que se realizó en en IDEXX LABORATORIES (Westbrook, ME 04092 USA).

2.1.8. Determinación de los títulos de anticuerpos contra el VIBF, en suero por la técnica de ELISA. Pruebas de gabinete ELISA para diagnóstico contra VIBF obtenidos comercialmente, IBD+ PROflok PLUS[®] y IBD ProFLOK[®] (Synbiotics Corporation San Diego CA, USA).

La prueba de ELISA se llevó a cabo de acuerdo a Snyder, *et al.* Las microplacas se leyeron a 405 nm con un lector ELISA BIOTEK[®] mod. mx80. Los valores de densidad óptica se convertirán en títulos ELISA, con el software ProFILE[®] (Synbiotics Corporation San Diego, CA. USA).

2.1.9. Determinación de títulos de anticuerpos mediante la técnica de VSN. La realización de la técnica de VSN se realizó mediante el método beta (suero diluido - virus constante) en cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo, con la cepa Lukert del VIBF. Se consideró como título al recíproco de la máxima dilución de suero que neutralizó en un 100% el efecto citopático provocado por el VIBF.

2.1.10. Determinación de las características antigénicas del VIBF mediante la captura de antígeno por la técnica ELISA.

Se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante con gabinetes de trabajo de captura de ELISA para diagnóstico de VIBF obtenidos comercialmente que contiene el anticuerpo monoclonal 8, SCREENING IBD kitt[®] (Synbiotics Corporation San Diego CA, USA) y el IBDV TYPING KIT[®] (Synbiotics Corporation San Diego CA, USA) el cuál contiene los anticuerpos monoclonales B69, R63 y #10. La prueba de ELISA se llevó a cabo de acuerdo a Lamichhane, *et al*³⁸. Las micro placas se leerán a 405 nm con un lector ELISA BIOTEK R mod. mx80.

2.1.11. Evaluación de alteraciones histológicas en bolsa cloacal.

Las bolsas cloacales fueron procesadas y coloreadas con la tinción de hematoxilina-eosina. La evaluación de lesiones se realizó de acuerdo a Cascante y Petrone⁶.

2.1.12. Realización del aislamiento del virus de IBF de campo.

Se realizó el aislamiento a partir de los órganos recolectados: bolsa cloacal, bazo, tonsilas cecales, proventrículo y timo, de acuerdo a Rosenberger.⁴⁹

2.2. Caracterización biológica del aislamiento del VIBF.

Se realizó la caracterización biológica del aislamiento viral en aves susceptibles alojadas en baterías, inoculando pollos de engorda comerciales sanos y pollos ALPES con el virus aislado, para evaluar perfiles serológicos, lesiones microscópicas y estado inmunológico de las aves ocasionados por el VIBF, con el siguiente diseño experimental.

Objetivo.

Determinar la respuesta biológica en aves libres de patógenos específicos y en pollo de engorda de una cepa de VIBF aislada a partir de pollos comerciales no vacunados contra VIBF.

Objetivos específicos.

- Obtener la signología clínica y mortalidad en pollos de engorda y libres de patógenos específicos desafiados con la cepa Edgar y la Cepa OGVP-UNAM.
- Obtener títulos de anticuerpos en los días 7, 14 y 21 días posdesafío por medio de la técnica de ELISA y Virus suero neutralización en pollos de engorda y libres de patógenos específicos.
- Obtener la relación del peso de la bolsa de Fabricio entre el peso corporal (índice bursal) de pollos de engorda y libres de patógenos específicos a los 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15 y 20 días posinoculación.
- Determinar la persistencia del VIBF en tejido bursal mediante ELISA de captura en pollos de engorda y libres de patógenos específicos a los 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15 y 20 días posinoculación.
- Describir los hallazgos histológicos de bolsa cloacal en pollos de engorda y libres de patógenos específicos a los 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15 y 20 días posinoculación.
- Realizar el re aislamiento del VIBF a partir de bolsas cloacales de aves inoculadas.

Hipótesis

- Los pollos de engorda y libres de patógenos específicos de 15 días edad desafiados con la Cepa OGVP-UNAM tendrán menor índice bursal que los desafiados con la cepa Edgar.
- Los pollos de engorda y libres de patógenos específicos de 15 días de edad desafiados con Cepa OGVP-UNAM tendrán menores lesiones bursales que los pollos desafiados con la cepa Edgar.
- Los pollos de engorda y libres de patógenos específicos de 15 días de edad desafiados con la Cepa OGVP-UNAM tendrán menos títulos de anticuerpos que los pollos desafiados con la cepa EDGAR.
- En pollos de engorda y libres de patógenos específicos de 15 días de edad desafiados con Cepa OGVP-UNAM se capturará el antígeno de VIBF durante los 20 días posdesafío.
- En pollos de engorda y libres de patógenos específicos de 15 días de edad desafiados con Cepa OGVP-UNAM se re aislará el virus durante los 20 días posdesafío.

2.2.1 MATERIAL Y MÉTODOS

Pollos para experimentación. Se utilizaron 144 pollitos, sin sexar libres de patógenos específicos (ALPES), de un día de edad (Aves Libres de Patógenos Específicos S.A. de C.V.) y 144 pollitos de engorda con inmunidad materna contra VIBF, sin sexar, de un día de edad provenientes de una incubadora comercial alojadas en baterías.

Inóculos

Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS).

La PBS se elaboró de acuerdo a Beard *et al.* ⁴

Cepa Edgar del VIBF (Edgar-IBF)

La cepa Edgar-IBF (Lab. IASA, Tehuacan, Puebla, México), tendrá título de $10^{3.5}$ DLEP/50% /0.1 mL.

La cepa OGVP-UNAM se le denominó al aislamiento viral de campo del VIBF obtenido a partir de pollo de engorda. El título de la cepa que se empleó fue de $10^{3.5}$ DLEP/50%/0.1 mL.

Diseño de tratamientos.

Se formaron de manera aleatoria 3 grupos de pollitos sin sexar ALPES y tres grupos de pollitos de engorda. Cada grupo integrado por 3 replicas de 45 pollitos; alojando a cada replica en una bateria desde el primer día de edad y hasta los 36 días de edad de las aves, según el siguiente diseño de tratamientos:

- GRUPO I: Pollitos origen ALPES inoculados con PBS (Testigo Negativo).
- GRUPO II: Pollitos origen ALPES inoculados con cepa Edgar-IBF (Testigo positivo).
- GRUPO III: Pollitos origen ALPES inoculado con cepa OGVP-UNAM .
- GRUPO A: Pollito de engorda inoculados con PBS (Testigo Negativo).
- GRUPO B: Pollitos engorda inoculados con cepa Edgar-IBF (Testigo positivo).
- GRUPO C: Pollitos engorda inoculado con cepa OGVP-UNAM .

Los pollos de cada tratamiento se inocularon a los 15 días de edad con 0.2 mL. de inóculo por medio de sonda esofágica.

2.2.2 Recolección de sueros para análisis de ELISA y MVSN.

Se tomaron 10 sueros de cada tratamiento al azar a los 0, 7, 14 y 21 días posinoculación. Las muestras fueron tomadas mediante punción cardiaca y se extrajo entre 1 y 3 mL de sangre por ave, la cual será depositada en frascos limpios y secos, el frasco fue cerrado y puesto en posición horizontal para facilitar la contracción del coágulo y poder obtener el suero, el suero fue almacenado a temperatura de -20° C hasta el final del período de obtención de todas las muestras (3 semanas) para que en un mismo proceso analizar todos los sueros.

2.2.3 Recolección de la bolsa cloacal* (B C) para determinar índice bursal.

Se tomaron 5 aves de cada tratamiento, se sacrificaron por dislocación cervical a las edades de 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15 y 20 días posinoculación.

*Estas mismas bolsas cloacales sirvieron para el resto de las evaluaciones donde se requería la bolsa cloacal.

2.2.4 Recolección de bolsas cloacales para detección del antígeno mediante la prueba de ELISA de captura.

Se tomo un tercio de la bolsa cloacal de 5 aves sacrificadas por dislocación de la nuca de cada tratamiento a los 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15 y 20 días post inoculación y manteniéndolas en congelación a -20° C hasta su proceso.

2.2.5 Recolección de bolsa cloacal para evaluación de alteraciones histológicas.

Se tomaron 5 aves de cada tratamiento, se sacrificaron por dislocación cervical con periodicidad semanal a las edades de 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15 y 20 días posinoculación la bolsa cloacal de cada ave. Las muestras se colocarán en formalina al 10% bufferada a un pH de 7.5, en proporción 1 parte de tejido y 10 partes de formalina para su fijación y su posterior proceso.

2.2.6 Recolección de bolsa cloacal para el reaislamiento viral del VIBF.

Se recolectaron a los 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15 y 20 días post inoculación de cada grupo, a partir de 5 aves sacrificadas por dislocación cervical tomando: un tercio de la bolsa cloacal almacenándose a -20°C para su posterior procesamiento, el aislamiento se realizo en embrión de pollo de acuerdo a Rosenberger.⁴⁹

2.2.7 Determinación de los títulos de anticuerpos contra el VIBF, en suero por la técnica de ELISA.

Pruebas de gabinete ELISA para diagnóstico contra VIBF obtenidos comercialmente, IBD+ PROFlok PLUS[®] y IBD ProFLOK[®] (Synbiotics Corporation San Diego CA, USA).

La prueba de ELISA se llevo a cabo de acuerdo a Snyder, *et al.* Las micro placas se leerán a 405 nm con un lector ELISA BIOTEK[®] mod. mx80. Los valores de densidad óptica se convertirán en títulos ELISA, con el software ProFILE[®] (Synbiotics Corporation San Diego, CA. USA).

2.2.8 Determinación de títulos de anticuerpos mediante la técnica de VSN.

La realización de la técnica de VSN se realizo mediante el método beta (suero diluido - virus constante) en cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo, con la cepa Lukert del VIBF y la cepa OGVP-UNAM. Se considero como título al recíproco de la máxima dilución de suero que neutralizó en un 100% el efecto citopático provocado por el VIBF.

2.2.9 Determinación del índice bursal.

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

IB= Peso de la bolsa cloacal (g) X 1000

Peso corporal (g)

2.2.10 Determinación de la persistencia del VIBF en tejido bursal mediante la captura de antígeno por la técnica ELISA.

Se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante con gabinetes de trabajo de captura de ELISA para diagnóstico de VIBF obtenidos comercialmente que contiene el anticuerpo monoclonal 8, SCREENING IBD kit[®] (Synbiotics Corporation San Diego CA, USA) y el IBDV TYPING KIT[®] (Synbiotics Corporation San Diego CA, USA) el cuál contiene los anticuerpos monoclonales B69, R63 y #10. La prueba de ELISA se llevó a cabo de acuerdo a Lamichhane, *et al*³⁸. Las microplacas se leyeron a 405 nm con un lector ELISA BIOTEK R mod. mx80.

2.2.11 Evaluación de alteraciones histológicas en órganos.

Los órganos fueron procesados y coloreados con la tinción de hematoxilina-eosina.

Para la evaluación en el caso de la bolsa cloacal se procedió a obtener el porcentaje de tejido linfóide, para esto se realizaron mediciones en el microscopio del corte histológico de cada bolsa cloacal, primero se midió el diámetro bursal, después se hizo lo mismo con la luz del órgano, la relación de estos dio como resultado un porcentaje que indicó la relación de tejido linfóide y el espacio en la luz del órgano. Las plicas bursales se midieron en ancho y largo, de forma individual se hizo lo mismo con 5 folículos linfoides.

2.2.12 Realización del aislamiento del virus de IBF.

Se realizó el aislamiento a partir de los órganos recolectados: bolsa cloacal, bazo, tonsilas cecales, proventrículo y timo, de acuerdo a Rosemberger.⁴⁹

2.3. Caracterización molecular del VIBF

La muestra de virus se colocó en una solución de fenol para biología molecular (Ameresco cat.30175, Solon Ohio 44139) para su análisis molecular por medio de la técnica de reacción en cadena por la polimerasa/transcriptasa reversa con endonucleasas de restricción (RT/PCR-RFLP), utilizando las enzimas de restricción Ssp 1, BstN1 y Mbo1 de acuerdo a Jackwood (31).

Capítulo 3. RESULTADOS

3.1. Determinación de los títulos de anticuerpos en suero contra el VIBF mediante dos pruebas de gabinete de ELISA.

Monitoreo 1.

Se realizó a los siete días de edad en las granjas A, B, C y D. Los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron en niveles entre 5660 y 9051 para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS®, existiendo diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las granjas A, B y C, pero no existió diferencia significativa entre las granjas B y D ($P < 0.05$) (Cuadro 1).

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron en niveles entre 2179 y 4489, existiendo diferencia significativa entre las granjas A, B y D ($P < 0.05$), las granjas C y A mostraron diferencia significativa entre ellas ($P > 0.05$), tampoco no existió diferencia significativa entre las granjas B y C con D ($P > 0.05$) (Cuadros 1 y 2)

Monitoreo 2.

Se realizó a los 14 días de edad, los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron en niveles entre 3839 y 6689 para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS®, existiendo diferencia significativa de las granjas B y D, con las granjas A y C ($P < 0.05$).

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron en niveles entre 1070 y 2523, encontrándose diferencia significativa de los títulos de anticuerpos entre las 4 granjas, B, C y D ($P < 0.05$), pero no existió diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las granjas A y C (Cuadros 1 y 2).

Monitoreo 3

Se realizó a los 21 días de edad, detectando un nivel de anticuerpos entre 1346 y 2475 para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS®, no encontrándose diferencia significativa entre las 4 granjas ($P > 0.05$).

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron en niveles entre 212 y 1571, no encontrándose diferencia significativa entre las granjas A y B ($P > 0.05$); sin embargo, si se encontraron ($P < 0.05$) entre las granjas C y D (Cuadros 1 y 2).

Monitoreo 4.

Se realizó a los 28 días de edad, detectando nivel de anticuerpos entre 2171 y 4401 para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS®, existiendo diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las granjas B, C y D, la granja A no mostró diferencia significativa entre las granjas B y C ($P > 0.05$).

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron en niveles entre 2240 y 3143, encontrándose diferencia significativa ($P < 0.05$) de los títulos de anticuerpos de las granjas A, B y C con la granja D (Cuadros 1 y 2)

Monitoreo 5.

Se realizó a los 35 días de edad, detectando un nivel de anticuerpos entre 4490 y 7829 para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS®, no encontrándose diferencia significativa de los títulos de anticuerpos de las granjas B, C y D ($P > 0.05$), la granja A presentó diferencia significativa de los títulos de anticuerpos con las granjas B, C y D ($P < 0.05$)

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron en niveles entre 3226 y 4253, existiendo diferencia significativa ($P < 0.05$) de las granjas A, B y C con la granja D (Cuadros 1, 2 y figura 2).

Monitoreo 6.

Se realizó a los 42 días de edad. Para el gabinete ELISA IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron en niveles entre 3854 y 7197, existiendo diferencia significativa en las medias entre las granjas A, B y C ($P < 0.05$), la granja B y D no mostraron diferencia significativa ($P > 0.05$) entre ellas.

En el caso del gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS®, los niveles de anticuerpos detectados se encontraron entre 9959 y 11201 no encontrándose diferencia significativa entre las 4 granjas ($P < 0.05$) (Cuadros 1 y 2) (Figura 2).

3.2. Determinación de títulos de anticuerpos mediante la técnica de VSN.

Monitoreo 1.

Se realizó a los siete días de edad en las granjas A, B, C y D. Los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron en niveles promedio geométrico entre 1.63 y 2.29 encontrándose diferencia significativa de los títulos de anticuerpos

entre las granjas A, B y C ($P < 0.05$), la granja D no mostró diferencia significativa entre las granjas B y C ($P > 0.05$) (Cuadro 3).

Monitoreo 2.

Se realizó a los 14 días de edad. Los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron en niveles promedio geométrico entre 1.62 y 2.26 encontrándose diferencia significativa de los títulos de anticuerpos entre las granjas A, B y D ($P < 0.05$), entre la granja A y C no se encontró diferencia significativa de títulos de anticuerpos ($P > 0.05$) (Cuadro 3).

Monitoreo 3.

Se realizó a los 21 días de edad, los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron en niveles promedio geométrico entre 1.62 y 2.07 encontrándose diferencia significativa de los títulos de anticuerpos entre el grupo de granjas A, C con las granjas B y D ($P < 0.05$) (Cuadro 3).

Monitoreo 4.

Se realizó a los 28 días de edad, los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron en niveles promedio geométrico entre 1.62 y 1.99 encontrándose diferencia significativa de los títulos de anticuerpos en la granja A ($P < 0.05$) pero no hubo diferencia cuando se le comparo con la granja C ($P > 0.05$), igualmente las granjas B, C y D no se encontró diferencia significativa entre ellas ($P > 0.05$) (Cuadro 3).

Monitoreo 5.

Se realizó a los 35 días de edad, los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron en niveles promedio geométrico entre 1.79 y 2.20, no encontrándose diferencia significativa de los títulos de anticuerpos entre las cuatro granjas ($P > 0.05$) (Cuadro 3).

Monitoreo 6.

Se realizó a los 42 días de edad, los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron en niveles promedio geométrico entre 1.78 y 1.99, no encontrándose diferencia significativa de los títulos de anticuerpos entre las cuatro granjas ($P > 0.05$) (Cuadro 3).

3.3. Comparación de títulos obtenidos entre prueba ELISA y prueba de VSN.

Los títulos de anticuerpos obtenidos en las pruebas de ELISA y VSN, fueron sometidos a la prueba de correlación, primeramente se realizó entre los dos gabinetes de prueba ELISA IBD+ PROflok PLUS[®] con la prueba ELISA IBD ProFLOK[®].

Posteriormente se realizó la comparación entre ellas con la prueba de VSN. (Figuras 3 y 4)

Existió una correlación alta de 0.77 entre los dos gabinetes de prueba ELISA IBD+ PROflok PLUS[®] y ELISA IBD ProFLOK[®].

La correlación entre la prueba ELISA (IBD + PROflok PLUS[®] e IBD ProFLOK[®]) y prueba de VSN fue baja apenas de 0.15 y 0.12 respectivamente (Cuadro 4).

3.4. Evaluación de alteraciones histológicas en bolsa cloacal.

GRANJA A

Las lesiones significativas detectadas en la bolsa cloacal fueron a partir de los 21 días de edad, predominando las lesiones de curso agudo, con severidad leve en el 61% de la bolsa cloacal, para el día 28 las lesiones predominantes fueron las de curso subagudo con severidad moderada en el 75% de la bolsa cloacal, para el día 35 las lesiones predominantes fueron las lesiones de curso subagudo, de severidad moderada en el 86% de la bolsa cloacal y en el monitoreo de 42 días predominaron lesiones de curso crónico en grado moderado en el 83% de la bolsa cloacal (Cuadro 5).

GRANJA B

Las lesiones detectadas en la bolsa cloacal fueron a partir del monitoreo de los 21 días fueron lesiones de curso agudo, con severidad moderada en el 68% de la bolsa cloacal, en el monitoreo del día 28 las lesiones predominantes fueron las de curso subagudo con severidad moderada en el 82% de la bolsa cloacal, en el monitoreo del día 35 de edad, las lesiones predominantes fueron las lesiones de curso subagudo, de severidad moderada en el 81% de la bolsa cloacal y en el monitoreo de 42 días de edad, las lesiones predominantes fueron las lesiones de curso subagudo, de severidad severa en el 97% de la bolsa cloacal (Cuadro 6).

GRANJA C

Las lesiones detectadas en la bolsa cloacal fueron a partir del monitoreo de los 21 días fueron lesiones de curso agudo, con severidad leve en el 60% de la bolsa

cloacal, en el monitoreo del día 28 las lesiones predominantes fueron las de curso subagudo con severidad moderada en el 76% de la bolsa cloacal, en el monitoreo del día 35 de edad, las lesiones predominantes fueron las lesiones de curso subagudo, de severidad severa en el 69% de la bolsa cloacal y en el monitoreo de 42 días de edad, las lesiones predominantes fueron las lesiones de curso crónico, de severidad moderada en el 85% de la bolsa cloacal (Cuadro 7).

GRANJA D

Las lesiones detectadas en la bolsa cloacal fueron a partir de los 21 días de edad, predominando las lesiones de curso agudo, con severidad leve en el 54% de la bolsa cloacal, para el día 28 las lesiones predominantes fueron las de curso subagudo con severidad leve en el 54% de la bolsa cloacal, para el día 35 predominaron lesiones de curso subagudo, de severidad moderada en el 83% de la bolsa cloacal y en el monitoreo de 42 días predominaron lesiones de tipo crónico de severidad moderada en el 75% de la bolsa cloacal (Cuadro 8).

SEVERIDAD TOTAL DE LESIONES HISTOLÓGICAS.

Las calificaciones de severidad de las lesiones en tejido linfoide y tejido epitelial en la bolsa cloacal, de acuerdo a la clasificación del promedio de lesiones realizado en cada semana de edad, en las cuatro granjas (Figura 6), indicó que la severidad de lesiones no tuvieron diferencia significativa entre ellas por edad de muestreo. ($P < 0.05$), (Cuadros 9, 10, 11 y 12).

3.5. Determinación de las características antigénicas del virus de la infección de la bolsa de Fabricio mediante la captura de antígeno.

En las granjas A y C se detectó mediante la captura de antígeno reacción con el anticuerpo monoclonal 8, en el monitoreo de los 21 días para la granja C y a los 14 días para la granja A (Cuadro 13).

Captura de antígeno con los anticuerpo monoclonal anticuerpos monoclonales B69, R63 y #10.

Se sometieron al análisis las dos muestras positivas al antígeno 8, el de la granja A, 14 días de edad y el de la granja C 21 días de edad.

El análisis de captura de antígeno con los anticuerpos monoclonales B69, R63 y #10 resultaron positivos para la granja C edad de monitoreo 21 días y la muestra

de la granja A resulto negativa para los anticuerpos monoclonales B69, R63 y #10, edad de monitoreo 14 días (Cuadros 14 y 15).

3.6. Realización del aislamiento del VIBF.

Se observó mortalidad embrionaria entre el tercer y quinto día de incubación a partir de dos muestras tomadas a partir de bolsa cloacal identificadas como Gja. A 14 días y Gja. C 21 días detectándose las siguientes lesiones en los embriones:

Hemorragias en piel e hígado.

Hígado con focos necróticos.

Bazo pálido.

Membrana corioalantoidea con petequias.

A partir de los órganos de estos embriones: hígado y bolsa cloacal se inoculan en aves ALPES de 14 días de edad y después de 72 hrs son sacrificadas y se toman las bolsas cloacales para histología para determinar lesiones histológicas y el líquido alantoideo para realizar la prueba de inmunodifusión en agar resultando positiva la prueba a VIBF y la histología detecta lesiones en la bolsa cloacal, adicionalmente también se sometió a prueba de captura de antígeno a los dos virus, comprobándose que el virus de la Gja. A 14 días corresponde a una cepa negativa para los anticuerpos monoclonales B69, R63 y #10 y la granja C 21 días correspondió a la cepa clásica del VIBF.

3.7. Caracterización biológica del aislamiento del VIBF.

Considerando que se logró aislar dos virus y para efecto de este trabajo se realizó la caracterización de un solo VIBF, se seleccionó el virus de la granja A 14 días denominándosele cepa OGVP-UNAM.

3.7.1 Signos clínicos y mortalidad.

AVES ALPES

No se observaron signos de la enfermedad en el grupo inoculado con la cepa Edgar ni en el grupo inoculado con la cepa OGVP-UNAM.

El número de aves muertas fue de 1 ave del grupo testigo negativo al día 3 posinoculación, presentando ascitis.

AVES POLLO DE ENGORDA

No se observaron signos de la enfermedad en el grupo inoculado con la cepa Edgar ni en el grupo inoculado con la cepa OGVP-UNAM.

El número de aves muertas fue de 2 aves en el grupo testigo negativo al día 3 y 19 posinoculación, presentando ascitis y retraso, en el grupo Edgar hubo un ave muerta por asfixia.

3.7.2 Determinación de los títulos de anticuerpos en suero contra el VIBF desafiado por la técnica de ELISA .

GRUPO I: Pollitos origen ALPES inoculados con PBS (Testigo negativo).

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® y IBD ProFLOK® no se detectaron anticuerpos contra el VIBF en el monitoreo previo a la inoculación, ni muestreos realizados a los 7,14 y 21 días post inoculación.

GRUPO II: Pollitos origen ALPES inoculados con cepa Edgar-IBF (Testigo positivo).

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® y IBD ProFLOK® no se detectaron anticuerpos contra el VIBF en el monitoreo realizado previo a la inoculación.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® el monitoreo realizado a los siete días post inoculación indico que los títulos de anticuerpos contra el VIBF tuvieron un título promedio de 3864, con coeficiente de variación de 29.79%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 755 y coeficiente de variación de 52.75 %.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® el monitoreo realizado a los 14 días postinoculación indico que los títulos promedio de anticuerpos contra el VIBF detectados fue de 6713, con coeficiente de variación de 18.19%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 935 y coeficiente de variación de 41.61 %.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® el monitoreo realizado a los 21 días postinoculación indico que los títulos promedio de anticuerpos contra el VIBF detectados fue de 8367, con coeficiente de variación de 24.16%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 1054 y coeficiente de variación de 70.09 %.

GRUPO III: Pollitos origen ALPES inoculado con cepa OGVP-UNAM.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® y IBD ProFLOK® no se detectaron anticuerpos contra el VIBF en el monitoreo previo a la inoculación.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® el monitoreo realizado a los

siete días postinoculación indico que los títulos de anticuerpos contra el VIBF tuvieron un título promedio de 2994, con coeficiente de variación de 35.16%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 655 y coeficiente de variación de 40.86 %.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® el monitoreo realizado a los 14 días postinoculación indico que los títulos promedio de anticuerpos contra el VIBF detectados fue de 5437, con coeficiente de variación de 27.29%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 1442 y coeficiente de variación de 42.91%.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® el monitoreo realizado a los 21 días postinoculación indico que los títulos promedio de anticuerpos contra el VIBF detectados fue de 9262, con coeficiente de variación de 18.46%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 1409 y coeficiente de variación de 30.55% (Cuadro 16)

GRUPO A: Pollito de engorda inoculados con PBS (Testigo negativo).

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® el monitoreo realizado al día previo a la inoculación indico que los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detecto un título promedio de 3801, con coeficiente de variación de 27.90%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 1158 y coeficiente de variación de 41.22 %.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® el monitoreo realizado a los siete días post inoculación indico que los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detecto un título promedio de 2837, con coeficiente de variación de 28.00%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 129 y coeficiente de variación de 49.40 %.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® el monitoreo realizado a los 14 días post inoculación indico que los títulos promedio de anticuerpos contra el VIBF detectados fue de 2512, con coeficiente de variación de 59.80%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 1151 y coeficiente de variación de 15.52 %.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® el monitoreo realizado a los 21 días postinoculación indico que los títulos promedio de anticuerpos contra el VIBF detectados fue de 1879, con coeficiente de variación de 86.47%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 80 y coeficiente de variación de 109.85 %.

GRUPO B: Pollitos engorda inoculados con cepa Edgar-IBF (Testigo positivo).

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® el monitoreo realizado al día previo a la inoculación indico que los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detecto un título promedio de 3801, con coeficiente de variación de 27.90%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 1158 y coeficiente de variación de 41.22 %.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® el monitoreo realizado a los siete días post inoculación indico que los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detecto un título promedio de 4176, con coeficiente de variación de 40.98%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 404 y coeficiente de variación de 24.35 %.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® el monitoreo realizado a los 14 días postinoculación indico que los títulos promedio de anticuerpos contra el VIBF detectados fue de 9409, con coeficiente de variación de 16.31%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 1848 y coeficiente de variación de 32.57 %.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® el monitoreo realizado a los 21 días postinoculación indico que los títulos promedio de anticuerpos contra el VIBF detectados fue de 10056, con coeficiente de variación de 17.56%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 2383 y coeficiente de variación de 19.03 %.

GRUPO C: Pollitos engorda inoculado con cepa OGVP-UNAM.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® el monitoreo realizado al día previo a la inoculación indico que los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detecto un título promedio de 3801, con coeficiente de variación de 27.90%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 1158 y coeficiente de variación de 41.22 %.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® el monitoreo realizado a los siete días post inoculación indico que los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detecto un título promedio de 3950, con coeficiente de variación de 33.23%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 680 y coeficiente de variación de 22.13 %.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROFlok PLUS® el monitoreo realizado a los 14 días postinoculación indico que los títulos promedio de anticuerpos contra el VIBF detectados fue de 5466, con coeficiente de variación de 15.87%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 1576 y coeficiente de variación de 20.61 %.

Para el gabinete ELISA IBD+ PROFlok PLUS® el monitoreo realizado a los 21 días postinoculación indico que los títulos promedio de anticuerpos contra el VIBF detectados fue de 8567, con coeficiente de variación de 15.60%.

Para el gabinete IBD ProFLOK® los títulos de anticuerpos contra el VIBF se detectaron un título promedio de 2582 y coeficiente de variación de 20.34% (Cuadro 16)

3.7.3 Determinación de títulos de anticuerpos mediante la técnica de MVSN.

GRUPO I: Pollitos origen ALPES inoculados con PBS (Testigo negativo).

Los monitoreos realizados a los 0, 7,14 y 21 días posinoculación resultaron negativos a anticuerpos.

GRUPO II: Pollitos origen ALPES inoculados con cepa Edgar-IBF (Testigo positivo).

La media geométrica obtenida a los 7 días fue de 2.20, a los 14 días fue de 1.94 y a los 21 días posinoculación fue de 2.24.

GRUPO III: Pollitos origen ALPES inoculado con cepa OGVP-UNAM.

La media geométrica obtenida a los 7 días fue de 2.20, a los 14 días fue de 1.9 y a los 21 días posinoculación fue de 1.93 (Cuadro 17).

GRUPO A: Pollito de engorda inoculados con PBS (Testigo negativo).

La media geométrica obtenida a los 7 días fue de 1.9, a los 14 días fue de 1.9 y a los 21 días posinoculación fue de 1.9.

GRUPO B: Pollitos engorda inoculados con cepa Edgar-IBF (Testigo positivo).

La media geométrica obtenida a los 7 días fue de 1.9, a los 14 días fue de 1.93 y a los 21 días posinoculación fue de 2.32.

GRUPO C: Pollitos engorda inoculado con cepa OGVP-UNAM.

La media geométrica obtenida a los 7 días fue de 1.9, a los 14 días fue de 1.9 y a los 21 días posinoculación fue de 1.9 (Cuadro 17).

3.7.4 Obtención del índice bursal

AVES ALPES

GRUPO I (Testigo negativo). Se detecta un incremento gradual en el índice bursal durante todos los monitoreos realizados desde el día cero hasta el 20 posinoculación, obteniéndose al día 0 un índice bursal de 2.8 y finalizando con un índice bursal a los 20 días de 3.6.

GRUPO II: Pollitos origen ALPES inoculados con cepa Edgar-IBF (Testigo positivo).

En el día cero se obtiene un índice bursal de 2.8, al día siguiente de la inoculación el índice bursal aumenta a 4.5 y a partir del segundo día posinoculación se detecta una disminución gradual del índice bursal de 3.7 hasta el día 20 posinoculación de 0.9.

GRUPO III: Pollitos origen ALPES inoculado con cepa OGVP-UNAM. En el día cero se obtiene un índice bursal de 2.8, al día siguiente de la inoculación el índice bursal aumenta a 4.2 y a partir del segundo día posinoculación se detecta una disminución gradual del índice bursal de 3.4 hasta el día 20 posinoculación de 0.9. (Cuadro 18).

AVES POLLO DE ENGORDA

GRUPO A: Pollito de engorda inoculados con PBS (Testigo negativo).

Se detecta un índice bursal de 1.2 el día 0, para el día 2 aumenta a 2.5 y a partir del día 3 el índice disminuye gradualmente a 2.0 y para el día 20 es de 0.7.

GRUPO B: Pollitos engorda inoculados con cepa Edgar-IBF (Testigo positivo). En el día cero se obtiene un índice bursal de 1.2, al día siguiente de la inoculación el índice bursal aumenta a 1.6 y a partir del segundo día posinoculación se detecta una disminución gradual del índice bursal a 1.7 hasta el día 20 posinoculación de 0.6.

GRUPO C: Pollitos engorda inoculado con cepa OGVP-UNAM. En el día cero se obtiene un índice bursal de 1.2, al día siguiente de la inoculación el índice bursal

aumenta a 1.9 y a partir del segundo día posinoculación se detecta una disminución gradual del índice bursal de 1.7 hasta el día 20 posinoculación de 0.7. (Cuadro 18).

3.7.5 Determinación de persistencia de antígeno, del VIBF en tejido bursal mediante ELISA de captura.

AVES ALPES

GRUPO I: Pollitos origen ALPES inoculados con PBS (Testigo negativo). No se detecta antígeno del VIBF en el tejido de la bolsa cloacal.

GRUPO II: Pollitos origen ALPES inoculados con cepa Edgar-IBF (Testigo positivo). Se detecta antígeno del VIBF a partir de los días 1,2,3 y 5 posinoculación en el 100% de las muestras trabajadas y para el día 10 posinoculación se detecta antígeno en el 60% de las muestras, en el día 15 se detecta en el 40% de las muestras y el día 20 posinoculación no se detecto antígeno.

GRUPO III: Pollitos origen ALPES inoculado con cepa OGVP-UNAM.

Se detecta antígeno del VIBF a partir de los días 1,2,3 y 5 posinoculación en el 100% de las muestras trabajadas y para el día 10 en el 80 % de las muestras, al día 15 posinoculación se detecta antígeno en el 40% de las muestras, en el día 20 post inoculación se detecto en el 20 % de las muestras (Cuadro 19).

AVES POLLO DE ENGORDA

GRUPO A: Pollito de engorda inoculados con PBS (Testigo negativo).

No se detecta antígeno del VIBF en el tejido de la bolsa cloacal.

GRUPO B: Pollitos engorda inoculados con cepa Edgar-IBF (Testigo positivo).

Se detecta antígeno del VIBF a partir del día 1 en el 80% de las muestras, a los días 2 y 3 post inoculación en el 60% de las muestras trabajadas y para los días 5 y 10 en el 40 % de las muestras, en los días 15 y 20 posinoculación no se detecto antígeno.

GRUPO C: Pollitos engorda inoculado con cepa OGVP-UNAM.

Se detecta antígeno del VIBF a partir del día 1 al 3 en el 100% de las muestras, para los días 5 y 10 en el 60 % de las muestras, en los días 15 y 20 posinoculación se detecto antígeno en el 40% de las muestras (Cuadro 19).

3.7.6 Evaluación Histológica

GRUPO TESTIGO.

No presento alteraciones en la morfología histológica.

Porcentaje de tejido linfoide en folias

AVES ALPES

Las aves inoculadas con la cepa Edgar y OGVP-UNAM al día 1 PI exhiben menor % de tejido linfoide sin presentar diferencia estadística significativa entre ellos ($p>0.05$). Al día 2 PI se observa reducción en las aves inoculadas con la cepa OGVP-UNAM con diferencia significativa ($p>0.05$) con respecto al grupo testigo y al inoculado con la cepa Edgar, a los 3, 5, 10 y 15 días PI se observa disminución en el % de tejido linfoide en las aves inoculadas con la cepa Edgar y OGVP-UNAM presentándose diferencia estadística significativa entre ellos (Figuras 5).

POLLO DE ENGORDA

Al día 2 PI se observa reducción en el % de tejido linfoide en las aves inoculadas con la cepa OGVP-UNAM con diferencia significativa ($p>0.05$) en relación a los demás grupos. Al día 10 PI se observa una reducción sin diferencia significativa ($p>0.05$) entre los grupos inoculados con la cepa Edgar y la cepa OGVP-UNAM. A los días 3, 5 y 15 PI se observa reducción del % de tejido linfoide con diferencia estadística significativa entre las aves inoculadas con las cepas Edgar y OGVP-UNAM (Figuras 6).

Porcentaje de células corticomedulares

AVES ALPES

Al día 1 PI se observa un incremento de células corticomedulares en los folículos linfoides de las aves inoculadas con las cepas Edgar y OGVP-UNAM, sin diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre estos. A los días 3 y 10 PI se observa un incremento en el grupo inoculado con la cepa OGVP-UNAM con

diferencia significativa ($p>0.05$) con respecto a los demás grupos (Figura 7). Los días 2, 5 y 15 PI se observa un incremento en los grupos inoculados con la cepa Edgar y OGVP-UNAM con diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre ellos.

POLLO DE ENGORDA

En los grupos inoculados con la cepa Edgar y OGVP-UNAM se observa un aumento en el porcentaje de células corticomedulares en los días 2, 3, 5 y 10 PI con diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre ellos (Figura 8).

3.7.7 Reaislamiento Viral

AVES ALPES

GRUPO I (Testigo negativo) :

No se aisló VIBF en el tejido de la bolsa cloacal.

GRUPO II: Pollitos origen ALPES inoculados con cepa Edgar-IBF (Testigo positivo). Se detecta VIBF en los días 1, 3, 5, y 10 posinoculación, en los días 15 y 20 posinoculación no se aisló.

GRUPO III: Pollitos origen ALPES inoculado con cepa OGVP-UNAM.

Se detecta VIBF en los días 1, 3, 5, y 10 posinoculación, en los días 15 y 20 posinoculación no se aisló (Cuadro 20).

AVES POLLO DE ENGORDA

GRUPO A: Pollito de engorda inoculados con PBS (Testigo negativo).

No se aisló VIBF en el tejido de la bolsa cloacal.

GRUPO B: Pollitos engorda inoculados con cepa Edgar-IBF (Testigo positivo).

Se detecta VIBF en los días 1, 3, 5, y 10 posinoculación, en los días 15 y 20 posinoculación no se aisló.

GRUPO C: Pollitos engorda inoculado con cepa OGVP-UNAM.

Se detecta VIBF en los días 1, 3, 5, y 10 posinoculación, en los días 15 y 20 posinoculación no se aisló (Cuadro 20).

3.8 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

El estudio del polimorfismo en el largo de los segmentos de restricción utilizando la enzima Ssp 1 no se observaron bandas, al utilizar la enzima BstN1 se observaron 3 bandas, la primera de 370 kilopares de bases (Kpb), la segunda de 172 Kpb y la tercera de 119 Kpb. Al someter el segmento original amplificado a la digestión con la enzima Mbo 1 se observaron 3 fragmentos, el primero de 229 Kpb, el segundo de 200 Kpb y el tercero de 180 Kpb (Cuadros 21 y 22).

Capítulo 4.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1. Determinación de los títulos de anticuerpos en suero contra el VIBF, mediante dos pruebas de gabinete de ELISA.

En este estudio se tuvo evidencia serológica de la presencia del VIBF en las cuatro granjas estudiadas sin antecedentes de vacunación en los últimos 3 años contra VIBF.

Se detecto y confirmo lo descrito por Cosenza⁸ que las lecturas de títulos de anticuerpos y los coeficientes de variación obtenidos, son mayores en la prueba de gabinete ELISA IBD+ PROflok PLUS® que con la prueba de gabinete ELISA IBD ProFLOK®.

En este seguimiento se detecta serológicamente evidencia que la infección ocurre en el momento de mas bajo nivel de anticuerpos que fue a los 21 días de edad y que de acuerdo a Lukert P.D y M. Saif⁴¹ la producción de anticuerpos se inicia 72 hrs posdesafío, se detecta en el monitoreo de 28 días el incremento de anticuerpos.

4.2. Determinación de títulos de anticuerpos mediante la técnica de VSN.

Los títulos de anticuerpos detectados durante los 6 muestreos no presentan un incremento significativo de tal manera que no existió diferencia significativa en las cuatro granjas, lo que indica que la prueba de VSN no fue capaz de demostrar el incremento de anticuerpos a partir de los 28 días de edad como lo demostró la prueba ELISA.

4.3. Comparación de entre los dos gabinetes de prueba ELISA y prueba de VSN.

Los títulos de anticuerpos obtenidos entre los dos kits de prueba ELISA tuvieron una alta correlación entre ellas, se encontró que el kitt de prueba IBD+ PROflok PLUS® genera títulos y coeficientes de variación más altos que IBD ProFLOK® consistentemente, por lo que más que una propiedad para detectar el tipo de anticuerpos "protectores" como lo describe Cosenza⁸ es una característica del kitt de prueba IBD+ PROflok PLUS® al generar los reportes.

La baja correlación obtenida entre títulos detectados por la prueba ELISA y VSN, puede ser debido al tipo de antígeno utilizado en la prueba para realizar la VSN como lo menciona Jackwood, D.J.³⁵

4.4. Evaluación de alteraciones histológicas en bolsa cloacal.

Las observaciones histológicas en la bolsa cloacal indican cambios en su estructura en forma significativa a partir de los 21 días de edad en las cuatro granjas monitoreadas, estas alteraciones de acuerdo a Shane M.S.^{53,54} se detectan entre 18 hrs y 4 días post infección, por lo que para este estudio se identifica que el tiempo de infección por el VIBF en granjas fue entre la edad de 17 y 21 días de edad.

Estas lesiones van evolucionando de un curso agudo a curso crónico en un periodo de tres semanas, con un patrón muy estable de severidad moderada de las lesiones en las cuatro granjas, esto puede atribuirse a las características de virulencia del VIBF, de acuerdo a lo informado por Yamaguchi⁷¹.

Es evidente que existe diferencia en el comportamiento biológico de la cepa variante OGVP-UNAM con respecto a la cepa convencional Edgar, aun en aves sin anticuerpos, como es el caso de los pollos ALPES; en donde se puede observar que existen diferencias en el % de tejido linfoide afectado al día 2 y 10 PI y que el % de células corticomedulares siempre es mayor en la cepa OGVP-UNAM. En el caso de los pollos de engorda es importante mencionar el papel que juegan los anticuerpos maternos⁴¹ con los que cuentan ya que estos son capaces de neutralizar al virus de la cepa convencional pero no así al virus de la cepa variante, por lo que los cambios en la cepa variante se observan en el caso del índice bursal desde los 5 días PI y en la cepa Edgar hasta los 10 días PI y que hay mayor porcentaje de tejido linfoide afectado en la cepa variante que en la convencional.

4.5. Determinación de las características antigénicas del VIBF mediante la captura de antígeno.

Snyder⁵⁸ demostró que todas las cepas clásicas poseen el epítipo B69 y que cepas variantes carecían de los epítipes R63 y B69.

En este estudio el aislamiento de la granja C mostró poseer epítopes definidos por los anticuerpos monoclonales B69, R63 y B69, que están presentes en las cepas clásicas de VIBF, entre tanto el aislamiento de la granja A no presentó los epítopes definidos por los anticuerpos monoclonales B69, R63 y B69, lo que no descarta que sea una variante.

4.6. Realización del aislamiento del VIBF.

En el presente estudio se aíslan dos virus a partir de cuatro granjas, las lesiones observadas en los embriones coinciden con lo indicado por Rosenberger⁴⁹ que menciona la presencia de congestión, hemorragias cutáneas, focos necróticos en hígado y hemorragias en la membrana corioalantoidea.

4.7. Caracterización biológica del aislamiento del VIBF.

4.7.1 Signos clínicos y mortalidad.

No se observaron signos de la enfermedad en los diferentes grupos de aves inoculados con la cepa Edgar ni en el grupo inoculado con la cepa OGVP-UNAM, así como tampoco mortalidad, pero sí existiendo atrofia de bolsas cloacales, condición similar descrita por Rosales⁴⁸ quien aisló dos virus que no produjeron mortalidad ni signos clínicos pero sí atrofia de la bolsa cloacal.

No se cumplió la hipótesis que la cepa OGVP-UNAM produciría elevada mortalidad e inmunodepresión en aves desafiadas.

4.7.2 Determinación de los títulos de anticuerpos en suero contra el VIBF desafiado por la técnica de ELISA.

Los perfiles serológicos obtenidos entre pollitos origen ALPES y pollitos de engorda inoculados con las cepas Edgar y OGVP-UNAM presentaron diferencias en perfiles serológicos, siendo mayores para la cepa Edgar que para la cepa OGVP-UNAM, confirmando la hipótesis planteada y confirmando lo descrito por Cosenza⁸ que las lecturas de títulos de anticuerpos y los coeficientes de variación obtenidos, son mayores en la prueba de gabinete ELISA IBD+ PROFLOK PLUS® por ser capaz de detectar tanto cepas clásicas como variantes, que con la prueba de gabinete ELISA IBD ProFLOK®, el hallazgo también detectado fue la respuesta serológica más rápida en aves ALPES que en aves pollo de engorda comercial, este hallazgo es debido a la presencia de inmunidad materna en estos últimos, condición similar descrita por Luckert⁴¹

4.7.3 Determinación de títulos de anticuerpos mediante la técnica de VSN.

Se encontró diferencia entre los perfiles serológicos en los grupos desafiados con la cepa OGVP-UNAM que con la cepa Edgar, siendo con esta última mayor los títulos, esta condición similar lo describe Jackwood²⁹ que indica que existe respuesta diferente en los títulos de IBF cuando se utilizan antígenos de prueba heterólogos en la prueba de VSN, en este caso se utilizó la cepa EDGAR como antígeno, lo que comprueba lo encontrado por este autor y que es necesario realizar la prueba de VSN con la cepa OGVPUNAM para evaluar los títulos con el antígeno homólogo.

4.7.4 Obtención del índice bursal

Existió diferencia significativa por tipo de aves, siendo las aves de engorda en presentar menor índice bursal que las aves ALPES.

La disminución del índice bursal en aves ALPES fue evidente a partir del día 5 post inoculación en la cepa OGVP-UNAM y en la cepa Edgar hasta el día 10 posinoculación, este hallazgo cumplió la hipótesis que pollos desafiados con cepa OGVP-UNAM tendrían menor índice bursal que los desafiados con la cepa Edgar, por el contrario en aves pollo de engorda el índice bursal fue menor desde el primer día posinoculación para ambas cepas, hallazgo que no corresponde a la infección de una cepa clásica como es la Edgar en el grupo respectivo y para el grupo de la cepa OGVP-UNAM su comportamiento se compara al de una cepa variante pues estas no producen aumento de la bolsa cloacal y provocan rápidamente la atrofia de la bolsa, esta característica mencionada por Lukert⁴¹ y Sharma⁵⁵.

4.7.5 Determinación de persistencia del antígeno del VIBF en tejido bursal mediante ELISA de captura.

En el grupo de aves ALPES inoculado con la cepa Edgar se capturo el antígeno del día 1-15 posinoculación y la cepa OGVP-UNAM se detecto del día 1-20 posinoculación, entre tanto en el grupo de aves pollo de engorda el la cepa Edgar

se capturo únicamente el virus durante los primeros 10 días posinoculación y en la cepa OGVP-UNAM se capturo del día 1-20 día posinoculación, estas diferencias se atribuyen a que la inmunidad materna que tenía el pollo de engorda neutralizo al virus inoculado correspondiente a una cepa clásica como es la Edgar y en el grupo inoculado con la cepa OGVP-UNAM los anticuerpos no neutralizaron en la misma forma a este tipo de virus, lo que hizo posible la presencia del virus para su captura por más tiempo, se comprobó la hipótesis que en pollos de engorda y libres de patógenos específicos de 15 días de edad desafiados con Cepa OGVP-UNAM se capturará el antígeno de VIBF durante los 20 días posdesafío. Sharma⁵⁶ describe que logro capturar el VIBF tanto cepa clásica como variante únicamente hasta el día 10 pos inoculación.

4.7.6 Evaluación Histológica Cepa EDGAR

Se detecta la recuperación de tejido linfoide TL de las aves pollo de engorda inoculados con la cepa Edgar partir del día 15 posinoculación, situación similar descrita por In-Jeong Kim²⁵ el cual encontró que el tejido linfoide se recuperaba después de la infección por el VIBF.

La cepa Edgar VIBF tiene la capacidad de producir daño el cual estimula a las células corticomedulares (CCM) a aumentar de número, siendo más evidentes en las aves ALPES, ya que si bien no se alcanzan niveles mas altos que los observados en las aves PE, si se observa que estos son mas homogéneos a lo largo del experimento, no siendo así en los PE con una recuperación linfoide desde el día 15 del % TL y el % CCM/folículo desciende hasta 16.75 el día 20 posinoculación, esto por efecto de la protección de los títulos de anticuerpos contra el VIBF, que limitaron el efecto de cepa Edgar VIBF en los folículos de las bolsas cloacales y permitiendo una recuperación mas rápida del tejido linfoide de los folículos bursales.

Cepa OGVP-UNAM

Existe reducción del % TL mucho mayor en comparación a la cepa Edgar, sin presentar una recuperación del TL durante el tiempo que duro el experimento. Las aves PE presentan un daño en el TL menor que las aves ALPES, por la presencia de anticuerpos capaces de limitar a la cepa OGVP-UNAM, pero no tan eficientemente como para la cepa Edgar.

La diferencia entre ambas repeticiones es probable que se deba a la presencia de anticuerpos que bloquean parcialmente al VIBF cepa OGVP en las aves pollo de engorda, pero en menor grado que a la cepa Edgar, los anticuerpos protegen de una manera no eficiente, y hacen que la infección afecte al TL situación similar también reportada por Lukert⁴¹. Es muy evidente la diferencia que muestra la cepa OGVP-UNAM en el incremento de células corticomedulares en comparación a la cepa EDGAR.

La hipótesis planteada de que los pollos de engorda y libres de patógenos específicos desafiados con Cepa OGVP-UNAM tendrán menores lesiones bursales que los pollos desafiados con la cepa Edgar, no se cumplió ya que los resultados obtenidos fueron que la Cepa OGVP-UNAM manifestó mayor lesiones bursales que los pollos desafiados con la cepa Edgar.

4.7.7 Re aislamiento Viral

Se encontró diferencias entre los días transcurridos posinoculación para recuperar a cada una de las cepas, la Cepa Edgar tuvo un periodo más corto de recuperación máximo de 15 días en aves ALPES y únicamente 10 días en pollo de engorda esta diferencia es explicada por la presencia de inmunidad materna en el pollito de engorda, en tanto en la cepa OGVP-UNAM esta pudo recuperarse por más tiempo como 20 días posinoculación tanto en pollito ALPES como en pollito de engorda debido a que la inmunidad del pollito de engorda no fue capaz de neutralizar el virus eficientemente como lo fue con la cepa Edgar, Abdel¹ describe haber aislado hasta el día 7 días posinoculación el VIBF en pollo de engorda y en aves ALPES hasta el día 14.

4.8 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

El VIBF cepa OGVP contenía un patrón único de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, comparando con el de las cepas de virus y cepas vacunales del VIBF hasta el momento conocidos de acuerdo a los estudios de Jackwood (31), y por lo tanto no se pudo clasificar en ninguno de los 5 grupos moleculares en los cuales se clasifican los VIBF, indicando que este VIBF aislado en México es diferente y esto sugiere que las cepas de VIBF mutan en aves alojadas comercialmente, la relación antigénica de este virus con cepas de vacunas es desconocido y se comprueba que este virus es responsable de los

cuadros subclínicos vistos en las aves de donde se realizó este estudio pues a pesar de la inmunidad materna que tenían las aves estas sufrían los cuadros de inmunosupresión subclínica por VIBF, pues los anticuerpos maternos son originados por vacunas producidas a partir de cepas clásicas y no son capaces de proteger contra el virus variante detectado.

Capítulo 5. LITERATURA CITADA

1. Abdel GA, Saif YM. Detection and persistence of infectious bursal disease virus in specific pathogen-free and commercial broiler chickens. *Avian Dis* 2001; 45:646-654.
2. Bayyary GR, Story JD, Beasley JN, Skeeles JK. Antigenic characterization of an Arkansas isolate of infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1996; 40:588-599.
3. Bayyary GR, Story JD, Beasley JN, Skeeles JK. Pathogenicity studies of an Arkansas variant infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1996;40:516-532.
4. Beard CN. Serologic. In: A Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Purchase HG, editor. American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania, USA, Fourth Edition, 1998:255-266.
5. Cao YC, Yeung WS, Law MM, Bi YZ, Leung FC, Lim BL. Molecular characterization of seven chinese isolates of infectious bursal disease virus: Classical, Very Virulent, and Variant Strains. *Avian Dis* 1998;42:340-351.
6. Cascante R.P. Evaluación serológica y morfológica de la respuesta humoral en pollos de engorda vacunados a los 1 y 9 de edad con dos cepas medianamente virulentas del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (tesis de licenciatura). México (D.F) : UNAM,2001.
7. Correa GP. Algunos aspectos de la nefrosis aviaria y la enfermedad producida por el agente infeccioso de la bolsa de Fabricio en México. En: Tec. Pec. Méx. INIPMéx 1969:98-104.
8. Cosenza H. Avances en el serodiagnóstico de Gumboro. *Boletín de Synbiotics Corporation* 1999.
9. Cosgrove AS. An apparently new disease of chickens avian nefrosis. *Avian Dis* 1962 ;VI :3-38.
10. Cruz-Coy J, Giambrone JJ, Panangala VS. Production and characterization of monoclonal antibodies against variant a infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1993;7:406-411.
11. Chen HY, Zhou Q, Zhang MF, Giambrone JJ. Sequence analysis of the vp2 hypervariable region of nine infectious bursal diseases virus isolates from mainland china. *Avian Dis* 1998;42:762-769.
12. Cho BR, Snyder DB, Lana DP, Marquardt WW. An Immunoperoxidase monoclonal antibody stain for rapid diagnosis of infectious bursal disease. *Avian Dis* 1987;31:538-545.
13. Dhinakar R, Jayakumar GV, Thagavelu A, Koteeswaran A, Venugopalan AT. Immunorheophoresis for the diagnosis of infectious bursal disease. *Avian Dis* 1998;42:388-392.
14. Dormitorio TV, Giambrone JJ, Duck LW. Sequence comparisons of the variable vp2 region of eight infectious bursal disease virus isolates. *Avian Dis* 1997;41:36-44.

15. Dybing JK, Jackwood DJ. Antigenic and immunogenic properties of baculovirus-expressed infectious bursal disease viral proteins. *Avian Dis* 1998;42:80-91.
16. Dybing JK, Jackwood DJ. Expression of md infectious bursal disease viral protein in baculovirus. *Avian Dis* 1997;41:617-626.
17. Dybing JK, Jackwood DJ. Restriction analysis of the md infectious bursal disease virus strain. *Avian Dis* 1996;40:931-937.
18. Fahey KJ, McWaters P, Brown MA, Erny K, Murphy VJ, Hewish DR. Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. *Avian Dis* 1991;35:365-373.
19. Gagic M, Catherine AS, Sharma JM. In ovo vaccination of specific-pathogen-free chickens with vaccines containing multiple agents. *Avian Dis* 1999;43:293-301.
20. Garcia, V.E. Aspectos clínicos e histopatológicos en la prevención de la infección de la bolsa de Fabricio (tesis de licenciatura). Cuautitlán (México) México: FESC UNAM, 1985.
21. Hassan MK, Nielsen CK, Ward LA, Jackwood DJ, Saif YM. Antigenicity, pathogenicity, and immunogenicity of small and large plaque infectious bursal disease virus clones. *Avian Dis* 1996;40:832-836.
22. Hassan MK, Al-Natour M, Ward LA, Saif YM. Pathogenicity, attenuation, and immunogenicity of infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1996;40:567-571.
23. Hassan MK, Saif YM, Shawky S. Comparison between antigen-capture elisa and conventional methods used for titration of infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1996;40:562-566.
24. Hirai KS, Kawamoto E, Taguchi F, Kim ST, Chang CN, Iritani Y. The inmunosupresivo effect of infectious bursal diseases virus in chickens. *Avian Dis* 1974;18:50-57.
25. In-Jeong K, Maja G, Jagdev M, Sharma. Recovery of antibody –producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1999;43:401-413.
26. Jackwood DJ, Jackwood RJ. Infectious bursal diseases viruses: molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype I viruses. *Avian Dis* 1994;38:531-537.
27. Jackwood DH, Saif YM. Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis* 1987;31:766-770.
28. Jackwood DJ, Sommer SE. Genetic heterogeneity in the vp2 gene of infectious bursal disease viruses detected in commercially reared chickens. *Avian Dis* 1998;42:321-339.
29. Jackwood DJ, Nielsen CK. Detection of infectious bursal disease viruses in commercially reared chickens using the reverse transcriptase/polymerase chain reaction-restriction endonuclease assay. *Avian Dis* 1997;41:137-143.

30. Jackwood DJ, Jackwood RJ. Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. *Avian Dis* 1997;41:97-104.
31. Jackwood DJ, Sommer SE. Restriction fragment length polymorphisms in the vp2 gene of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis* 1997;41:627-637.
32. Jackwood DJ, Sommer SE. Restriction fragment length polymorphisms in the vp2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States. *Avian Dis* 1999;43:310-314.
33. Jackwood DJ, Kibenge FS, Mercado CC. The use of biotin-labeled cDNA probes for the detection of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*. 1990;34:129-136.
34. Jackwood DJ, Hanes G, Heins MS. Infectious bursal disease viral RNA amplification using RT-PCR from bursa tissue following phenol: chloroform inactivation of the virus. *Avian Dis* 1996;40:457-460.
35. Jackwood DJ, Sommer SE, Odor E. Correlation of enzyme-linked immunosorbent assay titers with protection against infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1999;43:189-197.
36. Jackwood DJ, Saif YM, Hughes H. Nucleic acid and structural proteins of infectious bursal disease virus isolates belonging to serotypes I and II. *Avian Dis* 1984;28:990-1006.
37. Kim IJ, Maja G, Sharma JM. Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1999;43:401-413.
38. Lamichhane CM, Jerome L, Adenikinju B. ELISA for the detection and differentiation of infectious bursal disease virus. 49th Western Poultry Disease Conference. Sacramento, CA, 2000.
39. Lasher HN, Davis VS. History of infectious bursal disease in the U.S.A. the first two decades. *Avian Dis* 1997;41:11-19.
40. Liu X, Giambone JJ, Dormitorio T. Simplified sample processing combined with a sensitive nested polymerase chain reaction assay for detection of infectious bursal disease virus in the bursa of Fabricius. *Avian Dis* 1998;42:480-485.
41. Lukert PD, Saif M. Infectious bursal diseases. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, editors. *Diseases of Poultry* 10th Edition, Iowa: Iowa State University Press, 1997: 721-738.
42. Lukert, PD: Infectious bursal disease: Past, present and future. Proceedings of International Poultry Symposium-Summit on Infectious Bursal Disease. University of Georgia, 1995;33-34 Watt publishing Illinois.
43. Mohamed, KH, Saif YM. Influence of the host system on the pathogenicity, immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1996;40:553-561.

44. Pérez MV, Ibarra CJ, Pérez MA Mengel-Whereat S, Savage PK, Snyder DB, Pérez BR. Detección de cepas variantes del virus de la infección de la bolsa de Fabricio en tejidos infectados utilizando anticuerpos monoclonales y elisa. Memorias de XX Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas; mayo 1-5; Acapulco (Guerrero) México. México (DF):Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 1995;235-237.
45. Phillips RA, Opitz HM. Pathogenicity and persistence of salmonella enteritidis and egg contamination in normal and infectious bursal disease virus-infected leghorn chicks. *Avian Dis* 1995;39:778-787.
46. Pitcovski JD, Di-Castro YS, Azriel AB, Gutter EY, Michael A, Krispel S, Levi BZ. Insect cell-derived vp2 of infectious bursal disease virus confers protection against the disease in chickens. *Avian Dis* 1996;40:753-761.
47. Pitcovski JD, Goldberg BZ, Levi BZ, Di-Castro YS, Azriel AB, Krispel ST. Coding region of segment a sequence of a very virulent isolate of ibdv-comparison with isolates from different countries and virulence. *Avian Dis* 1998;42:497-506.
48. Rosales AG, Villegas PN, Luckert PD, Fletcher OJ, Brown J. Isolation, identification and pathogenicity of two field strains of infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1989;33: 35-41.
49. Rosemberger JK, Saif YM, Jackwood DJ. Infectious bursal disease In: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MR, Pearson JE, Reed WM, editors. Isolation and identification of avian pathogens. Pennsylvania: The American Association of Avian Pathologists, 1998: 215-218.
50. Rosenberger JK, Cloud SS. Isolation and characterization of variant infectious bursal diseases viruses. *J Am Vet Med Assoc* 1986;189:357.
51. Sellers HS, Villegas PN, Seal BS, Jackwood DJ. Antigenic and molecular characterization of three infectious bursal disease virus field isolates. *Avian Dis* 1999;43:198-206.
52. Shakya S, Joshi RK, Gupta N, Chauhan HV. Organ culture of chicken bursa as a model to study the pathogenicity of infectious bursal disease virus isolates. *Avian Dis* 1999;43:167-171.
53. Shane MS. La enfermedad de Gumboro en pollo de engorda. Memorias V Curso Avimex México 1993 julio;México (DF): Laboratorios AVIMEX SA, 1993:15-20.
54. Shane M.S. Programa de prevención y control de la infección de la bolsa de Fabricio, en condiciones de campo. Memorias V Curso Avimex México 1993 julio;México (DF): Laboratorios AVIMEX SA, 1993: 45-51.
55. Sharma JM, Dohms JE, Metz AL. Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis* 1989;33:112-124.

56. Sharma JM, Dohms JE, Walser M, Snyder DB. Presence of lesions without virus replication in the thymus of chickens exposed to infectious bursal disease virus . Avian Dis 1993;37:741-748.
57. Snyder D.B, Lana DP, Cho BR, Marquardt VW. Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. Avian Dis 1988;32:527-534.
58. Snyder D.B, Lana DP, Savage PK, Yancey FS, Mengel SA, and V.W. Marquardt VW. Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. Avian Dis 1988;32:535-539.
59. Tanimura N, Sharma JM. Appearance of t cell in the bursa of Fabricius and cecal tonsils during the acute phase of infectious bursal disease virus infection in chickens. Avian Dis 1997;41:638-645.
60. Tanimura NK, Tsukamoto K, Takamura MN, Maeda M. Association between pathogenicity of infectious bursal diseases virus and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry. Avian Dis 1995;39:9-20.
61. Tham, K.M. and C.D. Moon. Apoptosis in Cell Cultures Induced by Infectious Bursal Disease Virus Following in Vitro Infection. Avian Dis.1995;40:109-113.
62. Thompson GH, Mohammed BB, Naqi S. Systemic and local antibody responses to infectious bronchitis virus in chickens inoculated with infectious bursal disease virus and control chickens. Avian Dis 1997;41:519-527.
63. Tsukamoto K, Tanimura N, Mase K, Imai K. Comparison of virus replication efficiency in lymphoid tissues among three infectious bursal disease virus strains. Avian Dis 1995;39:844-852.
64. Tsukamoto K, Tanimura N, Kakita S, Ota K, Mase M, Imai K, Hihara H. Efficacy of three live vaccines against highly virulent infectious bursal diseases virus in chickens with or without maternal antibodies. Avian Dis 1995;39:218-229.
65. Tsukamoto K, Matsumura T, Mase, Imai K. A highly sensitive, broad-spectrum infectivity assay for infectious bursal diseases virus. Avian Dis 1995;39:575-586.
66. Ture O, Saif YM, Jackwood DJ. Restriction fragment length polymorphism analysis of highly virulent strains of infectious bursal disease viruses from Holland, Turkey, and Taiwan. Avian Dis 1998;42:470-479.
67. Valdés IL, Lucio DE, Antillón RA. Estudio clínico-patológico y por inmunofluorescencia de la bolsa de Fabricio. Vet Mex 1971;2:5-10 .
68. Whetzel PL, Jackwood DJ. Comparison of neutralizing epitopes among infectious bursal diseases viruses using radioimmunoprecipitation. Avian Dis 1995;39:499-506.
69. Winterfield RW, Hitchner SB. Etiology of infectious nephrosis – nephritis syndrome of chickens. AmJ Vet Res 1969;1273-1279.

70. Yamaguchi, T, Setiyono A, Kobayashi M, Takigami S, Hand F, Hirai K. Infectious bursal disease live vaccines: changes in the virus population during serial passage in chickens and chicken embryo fibroblast cells. *Avian Dis* 2000;44:284-290.
71. Yamaguchi T, Kondo T, Inhosima Y, Ogawa M, M Miyoshi M, Masegi T, Fukushi H, Hirai K. In Vitro attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus: some characteristics of attenuated strains. *Avian Dis* 1996;40:501-509.
72. Yehuda H, Pitcovski J, Michael A, Gutter B, Goldway M. viral protein 1 sequence analysis of three infectious bursal disease virus strains: a very virulent virus, its attenuated form, and an attenuated vaccine. *Avian Dis* 1999;43:55-64.
73. Yu L, . Song K, Zhang Y, Deng R. Cloning and expression of the vp2 gene of an infectious bursal diseases virus. *Avian Dis* 2000;44:170-178.

Capítulo 6. CUADROS

CUADRO 1

MEDIAS DE TÍTULOS DE ANTICUERPOS CONTRA VIBF EN LA PRUEBA DE ELISA NORMAL IBD ProFLOK®

GRANJA	EDAD(DÍAS)	MEDIA \pm S ¹	C.V(%)
A	7	2179 \pm 645.37 ^c	29.61
B	7	4489 \pm 1386.06 ^a	30.87
C	7	4050 \pm 1060.31 ^{ab}	26.18
D	7	3329 \pm 1296.32 ^b	38.94
A	14	1492 \pm 317.91 ^c	21.30
B	14	2523 \pm 934.49 ^a	37.03
C	14	1070 \pm 261.30 ^c	24.42
D	14	2052 \pm 734.68 ^b	35.80
A	21	1571 \pm 643.75 ^a	40.97
B	21	1173 \pm 729.61 ^a	62.20
C	21	212 \pm 313.81 ^c	148.0
D	21	665 \pm 513.80 ^b	77.26
A	28	3097 \pm 667.94 ^a	21.56
B	28	2569 \pm 1081.36 ^{ab}	42.09
C	28	3143 \pm 1017.64 ^a	34.09
D	28	2240 \pm 634.81 ^b	28.33
A	35	4253 \pm 552.85 ^a	12.99
B	35	3479 \pm 1077.31 ^{ab}	30.96
C	35	3976 \pm 1162.54 ^{ab}	29.23
D	35	3226 \pm 1354.99 ^b	42.0
A	42	7197 \pm 1012.81 ^a	14.07
B	42	5679 \pm 1098.18 ^b	19.33
C	42	3854 \pm 947.99 ^c	24.59
D	42	5731 \pm 1791.81 ^b	31.26

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

1Media + Desviación estándar

2Coeficiente de Variación

CUADRO 2

MEDIAS DE TÍTULOS DE ANTICUERPOS CONTRA VIBF EN LA PRUEBA DE ELISA IBD+ PROFLOK PLUS®

GRANJA	EDAD(DÍAS)	MEDIA + S ¹	C.V.(%)	
B	A	7	5660 + 1226.16 ^c	21.66
	B	7	7776 + 1754.73 ^b	22.56
	C	7	9051 + 1156.36 ^a	12.77
	D	7	7375 + 1230.56 ^b	16.68
A	14	4803 + 1112.62 ^b	23.16	
B	14	6689 + 1864.79 ^a	27.87	
C	14	3839 + 1198.75 ^b	31.22	
D	14	6185 + 1230.56 ^a	19.89	
A	21	2037 + 1583.93 ^a	77.75	
B	21	2475 + 1476.66 ^a	59.66	
C	21	1346 + 759.17 ^a	56.40	
D	21	2373 + 1121.90 ^a	47.27	
A	28	3542 + 2033.58 ^{ab}	57.41	
B	28	3295 + 924.74 ^b	28.06	
C	28	4401 + 1502.24 ^a	34.13	
D	28	2171 + 589.03 ^c	27.13	
A	35	7829 + 1891.79 ^a	24.16	
B	35	4490 + 1362.42 ^b	30.34	
C	35	5832 + 2291.40 ^b	39.29	
D	35	5813 + 2738.35 ^b	47.10	
A	42	11201 + 782.84 ^a	6.98	
B	42	10712 + 2667.56 ^a	24.90	
C	42	10117 + 1353.50 ^a	13.37	
D	42	9959 + 2139.93 ^a	21.48	

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

¹Media + Desviación estándar

²Coficiente de Variación

CUADRO 3

TÍTULOS DE ANTICUERPOS CONTRA VIBF EN LA PRUEBA DE MICROVIRUSUERONEUTRALIZACIÓN

GRANJA	EDAD(DÍAS)	MEDIA + S ¹	C.V.(%) ²
A	7	1.63 + 0.15 ^c	9.20
B	7	2.00 + 0.40 ^b	20.00
C	7	2.29 + 0.35 ^a	15.28
D	7	2.13 + 0.43 ^{ab}	20.18
A	14	1.62 + 0.07 ^c	4.32
B	14	2.26 + 0.47 ^a	20.79
C	14	1.60 + 0 ^c	0
D	14	2.20 + 0.35 ^b	15.90
A	21	1.60 + 0.07 ^b	4.37
B	21	2.07 + 0.37 ^a	17.87
C	21	1.62 + 0.07 ^b	4.32
D	21	1.98 + 0.40 ^a	20.20
A	28	1.60 + 0 ^b	0
B	28	1.85 + 0.34 ^a	18.37
C	28	1.78 + 0.43 ^{ab}	24.15
D	28	1.99 + 0.31 ^a	15.57
A	35	2.20 + 0.49 ^a	22.27
B	35	1.79 + 0.34 ^a	18.99
C	35	1.90 + 0.49 ^a	25.78
D	35	1.97 + 0.33 ^a	16.75
A	42	1.99 + 0.31 ^a	15.57
B	42	1.95 + 0.34 ^a	17.43
C	42	1.83 + 0.44 ^a	24.04
D	42	1.78 + 0.24 ^a	13.48

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

¹Media + Desviación estándar

²Coefficiente de Variación

CUADRO 4**CORRELACIÓN ENTRE PRUEBA ELISA Y PRUEBA VSN**

ARREGLO	C. CORRELACION
ELISA IBD+ PROflok PLUS® con la prueba ELISA IBD ProFLOK®	0.77
ELISA IBD+ PROflok PLUS® con la prueba VSN	0.15
ELISA IBD ProFLOK® con la prueba VSN	0.12

CUADRO 5**DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO EN BOLSA CLOACAL
GRANJA A**

EDAD	CALIFICACION	CURSO	SEVERIDAD	%DE LESION EN BOLSA
7 DIAS	0.18	AGUDO	POCO SIGNIFICATIVO	10.0%
14 DIAS	0.25	AGUDO	POCO SIGNIFICATIVO	25.3%
21 DIAS	1.68	AGUDO	LEVE	61.0%
28 DIAS	3.13	SUBAGUDO	MODERADA	75.0%
35 DIAS	3.82	SUBAGUDO	MODERADA	86%
42 DIAS	4.51	CRONICA	MODERADA	83%

CUADRO 6**DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO EN BOLSA CLOACAL
GRANJA B**

EDAD	CALIFICACIÓN	CURSO	SEVERIDAD	%DE LESION EN BOLSA
7 DIAS	0.05	AGUDO	POCO SIGNIFICATIVO	2.0%
14 DIAS	.173	AGUDO	POCO SIGNIFICATIVO	8.0%
21 DIAS	2.4	AGUDO	MODERADO	68.0%
28 DIAS	3.64	SUBAGUDO	MODERADO	82.0%
35 DIAS	3.98	SUBAGUDO	MODERADO	81.0%
42 DIAS	4.86	SUBAGUDO	SEVERO	97.0%

CUADRO 7**DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO EN BOLSA CLOACAL
GRANJA C**

EDAD	CALIFICACIÓN	CURSO	SEVERIDAD	% DE LESION EN BOLSA
7 DIAS	0.02	AGUDO	POCO SIGNIFICATIVO	1.0%
14 DIAS	.29	AGUDO	POCO SIGNIFICATIVO	12.0%
21 DIAS	1.91	AGUDO	LEVE	60.0%
28 DIAS	3.77	SUBAGUDO	MODERADO	76.0%
35 DIAS	4.19	SUBAGUDO	SEVERO	69.0%
42 DIAS	4.85	CRONICO	MODERADO	85.0%

CUADRO 8**DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO EN BOLSA CLOACAL
GRANJA D**

EDAD	CALIFICACIÓN	CURSO	SEVERIDAD	% DE LESION EN BOLSA
7 DIAS	0.08	AGUDO	POCO SIGNIFICATIVO	3.0%
14 DIAS	.21	AGUDO	POCO SIGNIFICATIVO	8.0%
21 DIAS	1.88	AGUDO	LEVE	54.0%
28 DIAS	1.94	SUBAGUDO	LEVE	54.0%
35 DIAS	3.32	SUBAGUDO	MODERADO	83.0%
42 DIAS	3.30	CRONICO	MODERADO	75.0%

CUADRO 9**CALIFICACIÓN DEL PROMEDIO DE LESIONES EN TODOS
LOS CURSOS**

VALOR	CALIFICACION
0 a 1	POCO SIGNIFICATIVA
1 a 2	LEVE
2.1 a 4.5	MODERADA
4.6 a 7	SEVERA

CUADRO 10**CLASIFICACIÓN DE LESIONES HISTOLÓGICAS EN TEJIDO LINFOIDE DE LA BOLSA CLOACAL**

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

CUADRO 11**CLASIFICACIÓN DE LESIONES HISTOLÓGICAS EN TEJIDO EPITELIAL DE LA BOLSA CLOACAL**

CURSO AGUDO	CURSO SUBAGUDO	CURSO CRONICO
-Necrosis epitelial	-Hiperplasia epitelial -Quistes epiteliales	-Aspecto adenoide

CUADRO 12**PROMEDIO DE LA SEVERIDAD DE LESIONES HISTOLÓGICAS SEMANAL EN CADA EDAD EN BOLSA CLOACAL.**

EDAD	GRANJA A	GRANJA B	GRANJA C	GRANJA D	PROMEDIO
7 DIAS	0.19 ^a	0.05 ^a	0.03 ^a	0.08 ^a	0.087
14 DIAS	0.25 ^a	0.17 ^a	0.29 ^a	0.21 ^a	0.23
21 DIAS	1.68 ^a	2.40 ^a	1.91 ^a	1.88 ^a	1.96
28 DIAS	3.13 ^a	3.64 ^a	3.77 ^a	1.94 ^a	3.12
35 DIAS	3.82 ^a	4.30 ^a	4.19 ^a	3.32 ^a	3.90
42 DIAS	4.59 ^a	4.86 ^a	3.43 ^a	3.30 ^a	4.04

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

CUADRO 13**DETECCIÓN DE VIBF POR CAPTURA DE ANTÍGENO MEDIANTE PRUEBA ELISA CON ANTICUERPO MONOCLONAL 8**

EDAD	GRANJA A	GRANJA B	GRANJA C	GRANJA D
7 DIAS	0.257 ^{ab}	0.293	0.324	0.249
14 DIAS	0.746	0.312	0.535	0.519
21 DIAS	0.464	0.363	0.839	0.379
28 DIAS	0.427	0.246	0.501	0.278
35 DIAS	0.321	0.311	0.211	0.454
42 DIAS	0.208	0.126	0.375	0.332

^a Expresado en densidades ópticas

^b Densidades ópticas iguales o mayores a 0.60 se consideran resultados positivos

CUADRO 14**DETECCIÓN VIBF POR CAPTURA DE ANTÍGENO MEDIANTE PRUEBA ELISA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES B69,R63 Y #10.**

MUESTRA	Ac.M B69	Ac.M R63	Ac.M #10	INTERPRETACION
Granja A, 14 días.	0.16	0.18	0.19	Cepa variante
Granja C 21 días	0.65	0.66	0.71	Cepa Clásica

^a Expresado en densidades ópticas

^b Densidades ópticas iguales o mayores a 0.60 se consideran resultados positivos

CUADRO 15**EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS EN CEPAS DEL VIBF EN PRUEBA DE CAPTURA ELISA**

Cepa	Anticuerpos monoclonales			
	8	B 69	R 63	# 10
Clásica	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Variante E /Del	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
Variante GLS	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO

CUADRO 16

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA RESPUESTA SEROLÓGICA A LA PRUEBA ELISA

RESPUESTA SEROLÓGICA AVES ALPES A PRUEBA ELISA PLUS+ Y ELISA*						
EDAD POSINOCULACIÓN	GPO. TESTIGO +	GPO. TESTIGO*	C. EDGAR +	C. EDGAR *	C. OGVP UNAM +	C. OGVP UNAM *
0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	3864 ^a	755 ^b	2994 ^a	655 ^b
14	0	0	6713 ^a	935 ^b	5437 ^a	1442 ^b
21	0	0	8367 ^a	1054 ^b	9262 ^a	1409 ^b

^a Literales distintas indican diferencia significativa dentro de un cuadro(P<0.05)

RESPUESTA SEROLÓGICA POLLO DE ENGORDA A PRUEBA ELISA PLUS Y ELISA						
EDAD POSINOCULACION	GPO TESTIGO	GPO. TESTIGO	C. EDGAR +	C. EDGAR *	C. OGVPUNAM +	C. OGVP *
0	3801	1158	3801 ^a	1158 ^b	3801 ^a	1158 ^b
7	2837	2710	4176 ^a	404 ^b	3950 ^a	680 ^b
14	2512	1291	9409 ^a	1848 ^b	5466 ^a	1576 ^b
21	1879	80	10056 ^a	2383 ^b	8567 ^a	2582 ^b

^a Literales distintas indican diferencia significativa dentro de un cuadro(P<0.05)

+ IBD+ PROflok PLUS® (Synbiotics Corporation San Diego CA, USA).

* IBD ProFLOK® (Synbiotics Corporation San Diego CA, USA).

CUADRO 17

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA RESPUESTA SEROLÓGICA A LA PRUEBA VSN

RESPUESTA SEROLÓGICA AVES ALPES A PRUEBA VSN			
DÍAS POSINOCULACIÓN	GPO TESTIGO	C. EDGAR	C. OGVP
0	0	0	0
7	0	2.2 ^a	2.2 ^a
14	0	1.94 ^a	1.9 ^a
21	0	2.24 ^a	1.93 ^a

^a Literales distintas indican diferencia significativa dentro de un cuadro (P<0.05)
Media geométrica de títulos transformados Log10 (título +1) obtenidos por virus-suero neutralización

RESPUESTA SEROLÓGICA EN POLLO DE ENGORDA A PRUEBA VSN			
DÍAS POSINOCULACIÓN	GPO TESTIGO	C. EDGAR	C. OGVP UNAM
0	2.2 ^a	2.2 ^a	2.2 ^a
7	2.2 ^a	1.9 ^a	1.9 ^a
14	1.9 ^a	1.93 ^a	1.9 ^a
21	1.93 ^a	2.32 ^a	1.9 ^a

^a Literales distintas indican diferencia significativa dentro de un cuadro (P<0.05)
Media geométrica de títulos transformados Log10 (título +1) obtenidos por virus-suero neutralización

CUADRO 18

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA. ÍNDICE BURSAL.

INDICE BURSAL AVES ALPES			
DIAS POSINOCULACIÓN	GPO TESTIGO	C. EDGAR	C. OGVP UNAM
0	2.8 ^a	2.8 ^a	2.8 ^a
1	2.4 ^a	4.5 ^b	4.2 ^b
2	2.7 ^a	3.7 ^b	3.4 ^b
3	3.1 ^a	2.9 ^a	2.4 ^b
5	2.6 ^a	1.8 ^b	1.4 ^b
10	3.2 ^a	1.2 ^b	1.4 ^b
15	4 ^a	1.3 ^b	1.2 ^b
20	3.6 ^a	0.9 ^b	0.96 ^b

INDICE BURSAL POLLO DE ENGORDA			
DIAS POSINOCULACIÓN	GPO TESTIGO	C. EDGAR	C. OGVP UNAM
0	1.2 ^a	1.2 ^a	1.2 ^a
1	1.8 ^a	1.5 ^a	1.9 ^a
2	2.5 ^a	1.7 ^a	1.7 ^a
3	2 ^a	1.9 ^a	1.8 ^a
5	1.8 ^a	1.9 ^a	1.9 ^a
10	1.9 ^b	1.3 ^a	0.9 ^a
15	1.5 ^b	0.7 ^a	0.5 ^a
20	0.6 ^a	0.6 ^a	0.7 ^a

CUADRO 19

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

Determinación de persistencia del VIBF en tejido bursal mediante ELISA de captura al antígeno # 8.

DETERMINACIÓN ANTIGENO VIBF EN BOLSA CLOACAL POR ELISA DE CAPTURA						
DIAS POS INOCULACION	AVES ALPES			POLLO DE ENGORDA		
	GPO TESTIGO	C. EDGAR	C. OGVP UNAM	GPO TESTIGO	C. EDGAR	C. OGVP UNAM
0	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
1	NEGATIVO	100 ^{a)}	100	NEGATIVO	80	100
2	NEGATIVO	100	100	NEGATIVO	60	100
3	NEGATIVO	100	100	NEGATIVO	60	100
5	NEGATIVO	100	100	NEGATIVO	40	60
10	NEGATIVO	60	80	NEGATIVO	40	60
15	NEGATIVO	40	40	NEGATIVO	NEGATIVO	40
20	NEGATIVO	NEGATIVO	20	NEGATIVO	NEGATIVO	40

^{a)} Cantidad expresada en porcentaje (número de bolsas cloacales positivas a antígeno VIBF/ número de bolsas cloacales totales X 100)

CUADRO 20

CARACTERIZACION BIOLÓGICA
Re aislamiento del VIBF POST-DESAFIO

RE AISLAMIENTO DEL VIBF POST DESAFIO						
DIAS POST INOCULACION	AVES ALPES			POLLO DE ENGORDA		
	GPO TESTIGO	C. EDGAR	C. OGVPUNAM	GPO TESTIGO	C. EDGAR	C. OGVPUNAM
0	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
1	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
2	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
3	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
5	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
10	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
15	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
20	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO

CUADRO 21
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

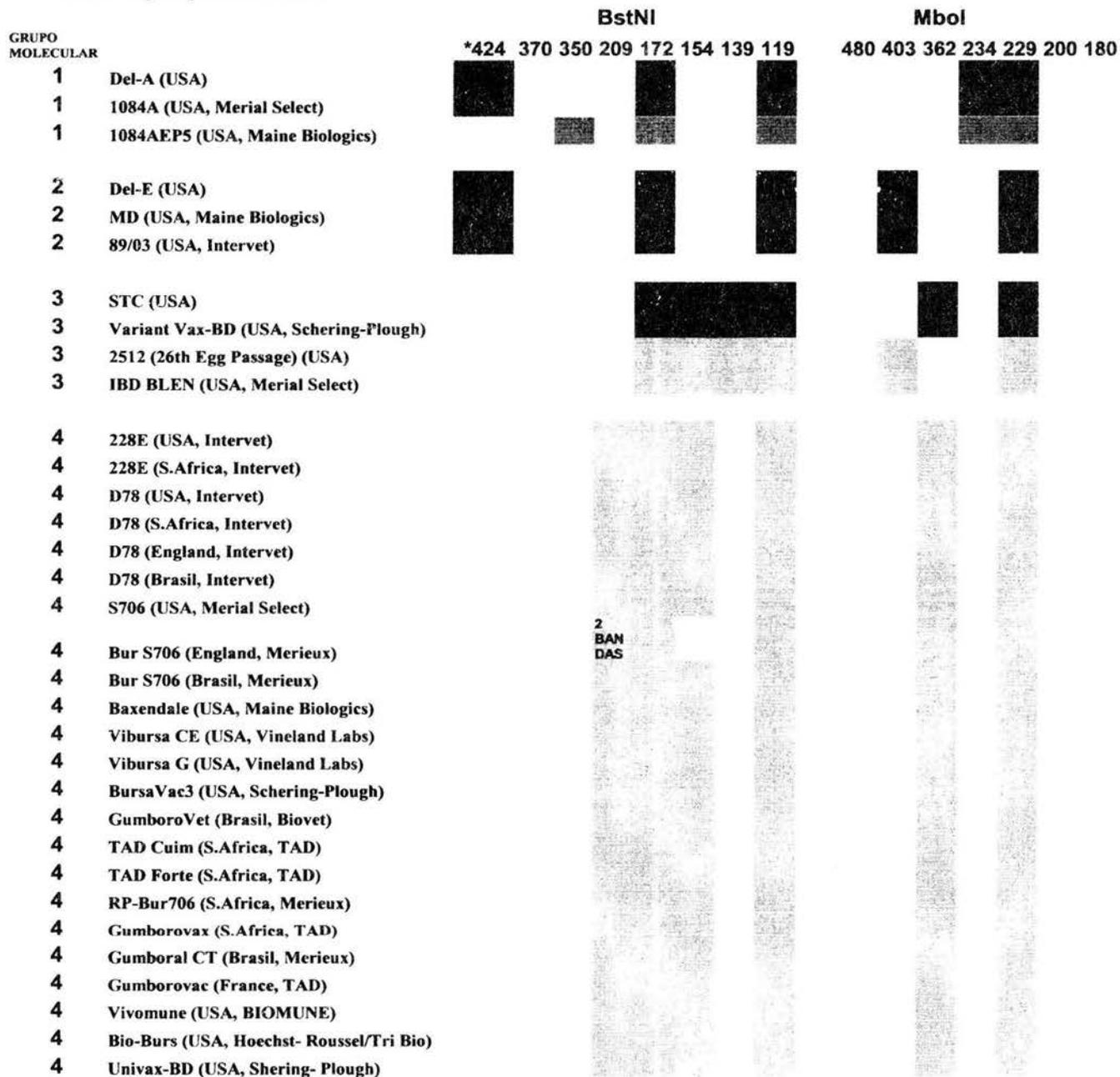
58

CEPA	RT/PCR Resultado	Ssp1	Patrón BstN 1							Patrón Mbo 1								
			424	370	350	209	172	154	139	119	480	403	362	234	229	200	180	
EDGAR	Positivo	Negativo	Banda					Banda		Banda		Banda				Banda		
OGVP	Positivo	Negativo	Banda					Banda		Banda						Banda	Banda	Banda

CUADRO N° 22

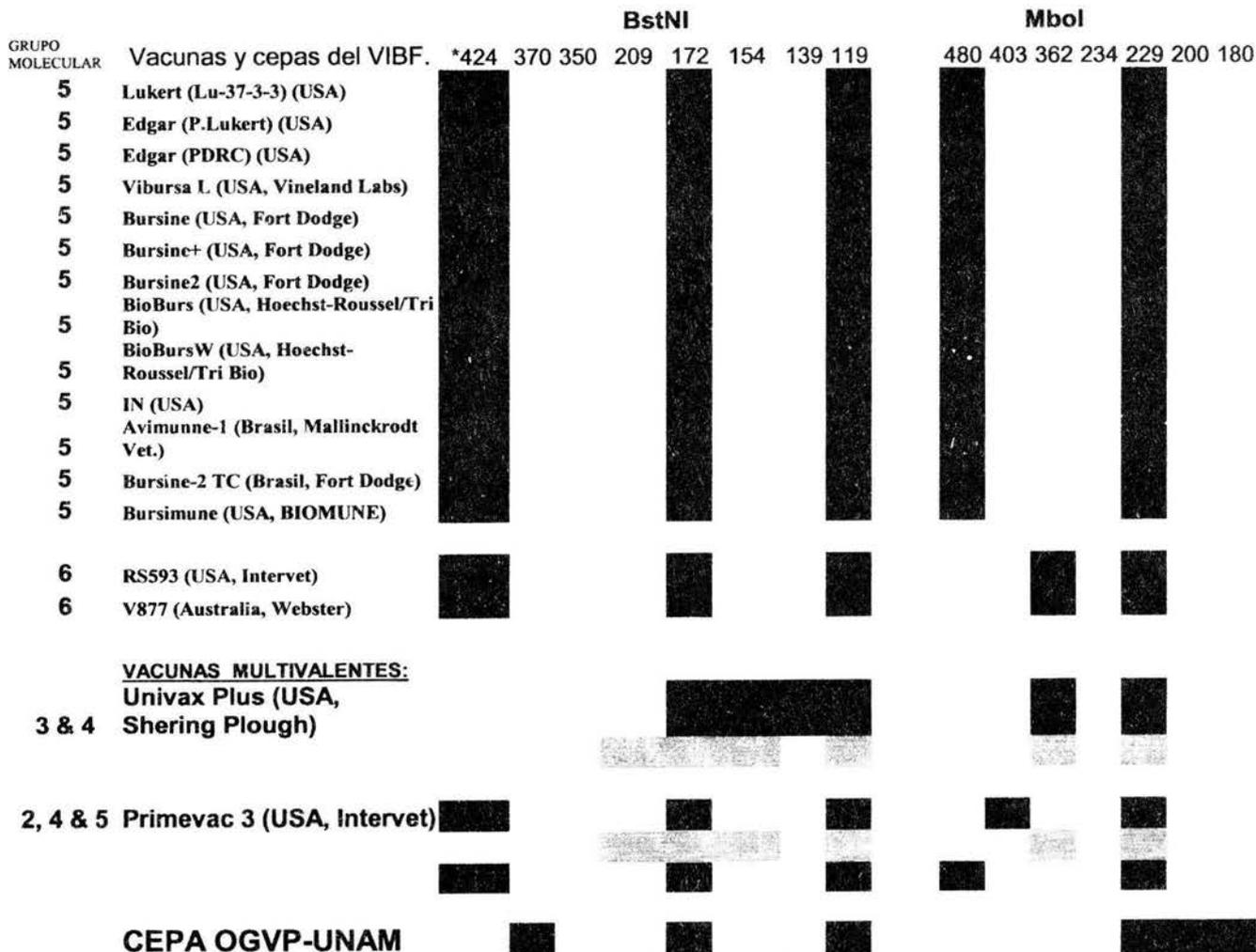
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE DIFERENTES CEPAS Y VACUNAS DEL VIBF

Resultados de RT/PCR-RFLP probados para vacunas y cepas del VIBF.



2
BAN
DAS

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA



*Los valores indican la longitud en los pares de bases de los fragmentos de restricción. Los cuadros coloreados indican la presencia de un fragmento de restricción resultado de la digestión con la enzima BstNI o MboI.

Figura 1. Patogenia de la infección por el VIBF

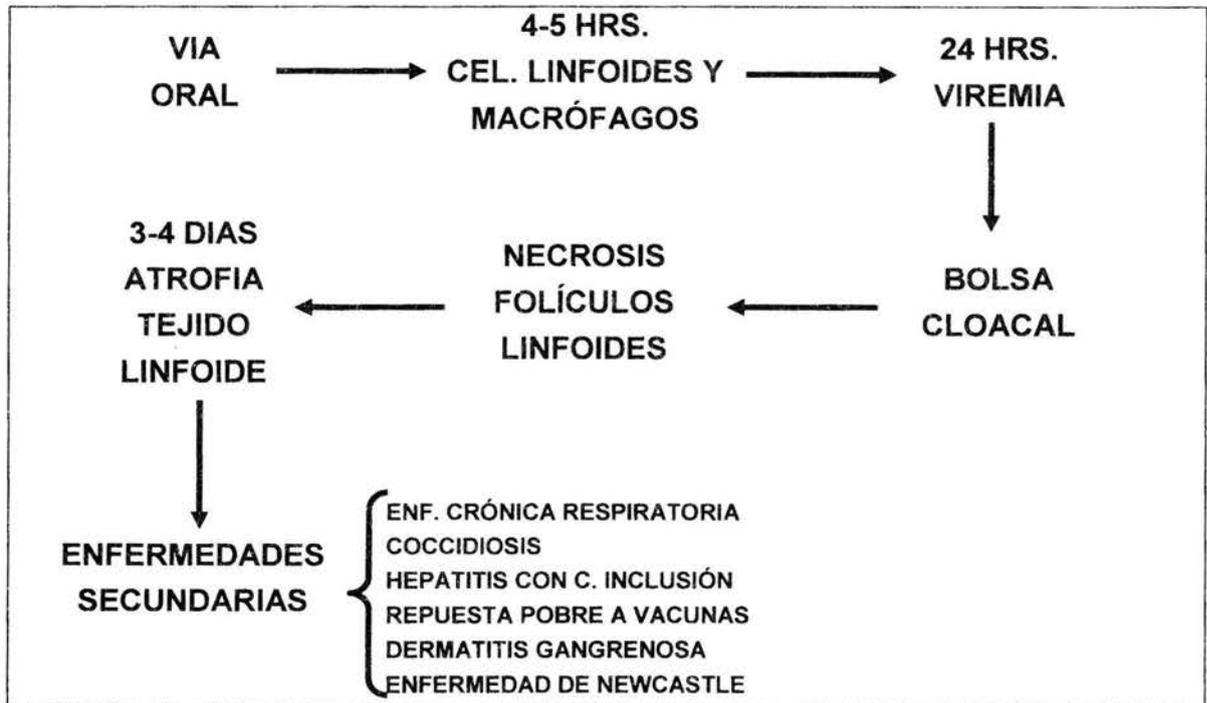


FIGURA 2

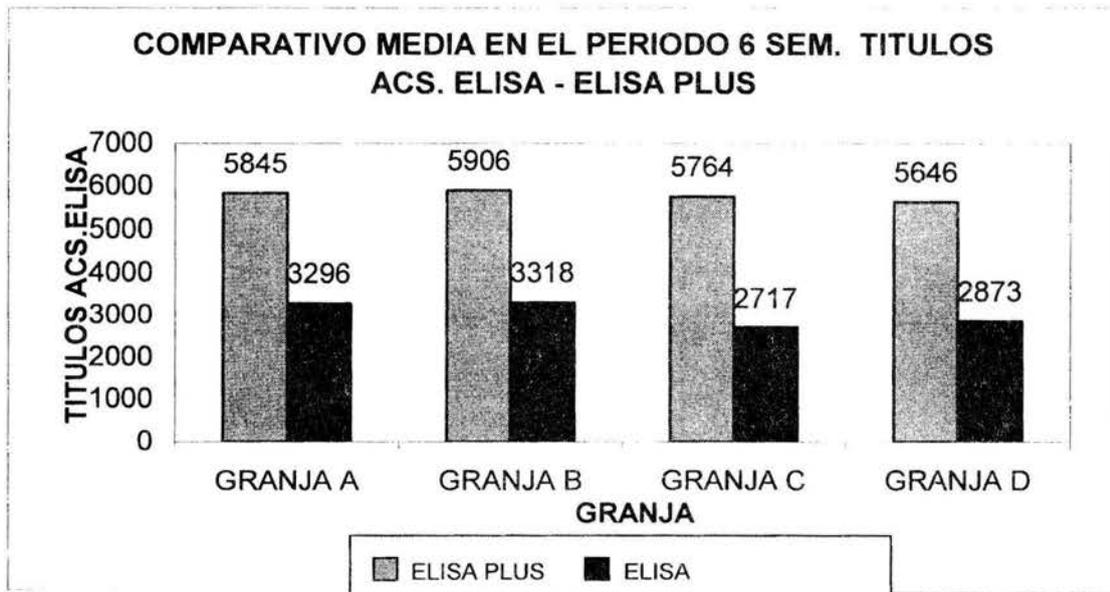


FIGURA 3

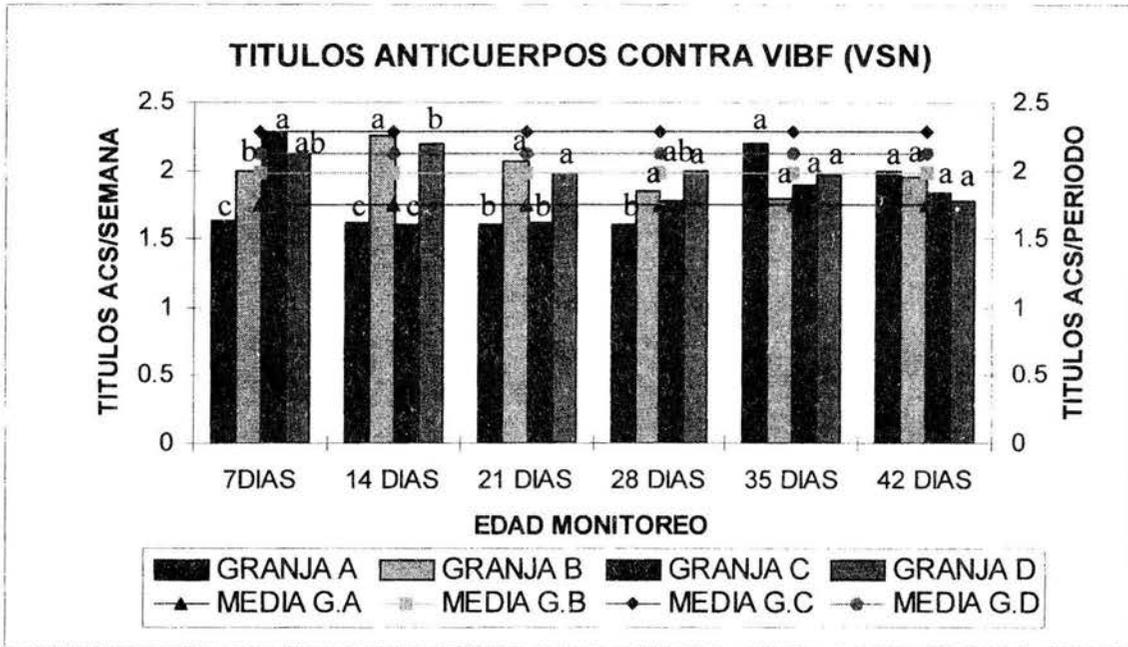


FIGURA 4

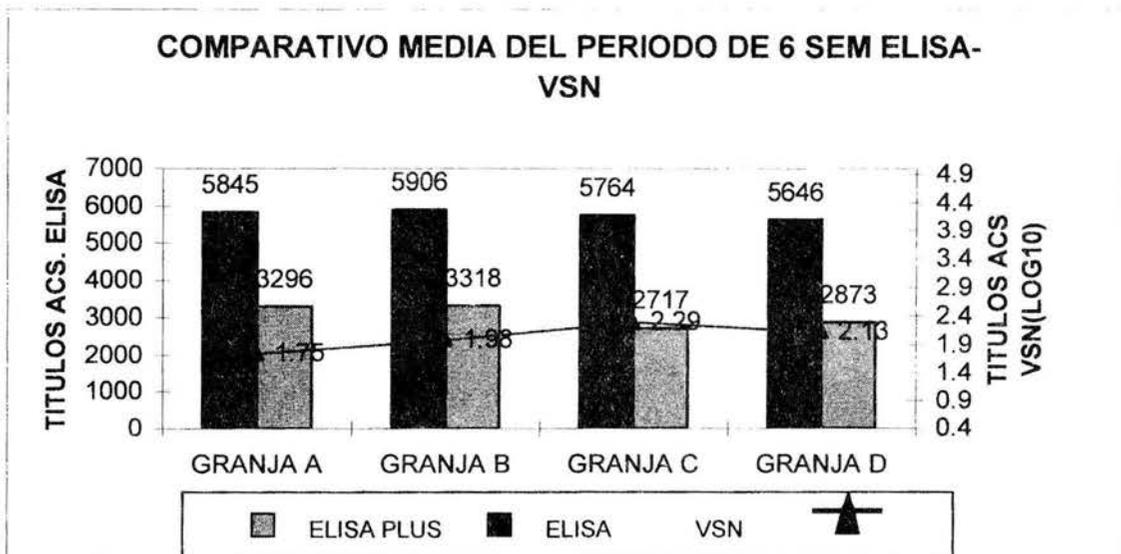


FIGURA 5

% DE TEJIDO LINFOIDE EN AVES ALPES

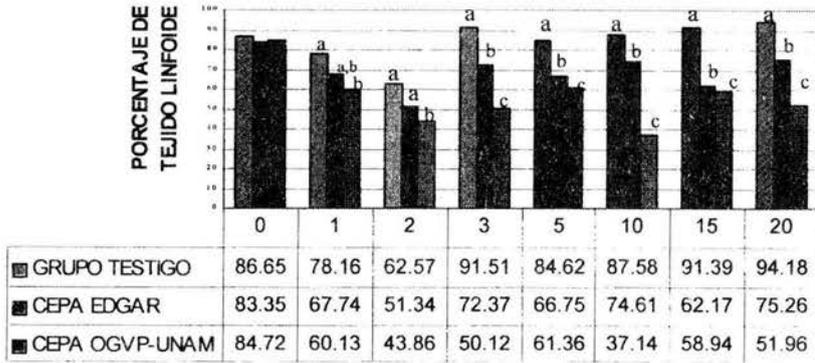


FIGURA 6

% DE TEJIDO LINFOIDE EN POLLO DE ENGORDA

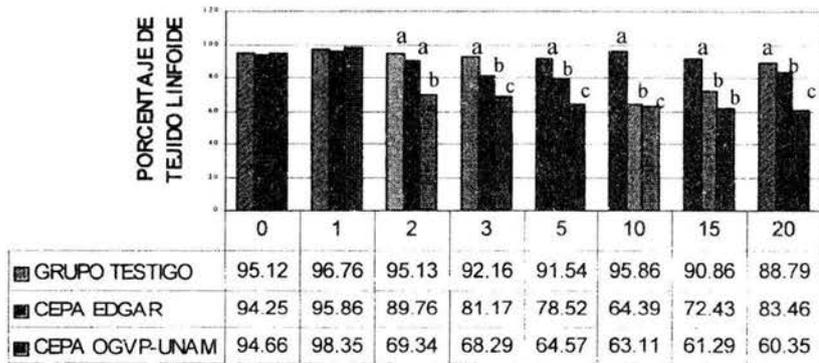


FIGURA 7

PORCENTAJE DE CÉLULAS CORTICOMEDULARES EN POLLOS ALPES

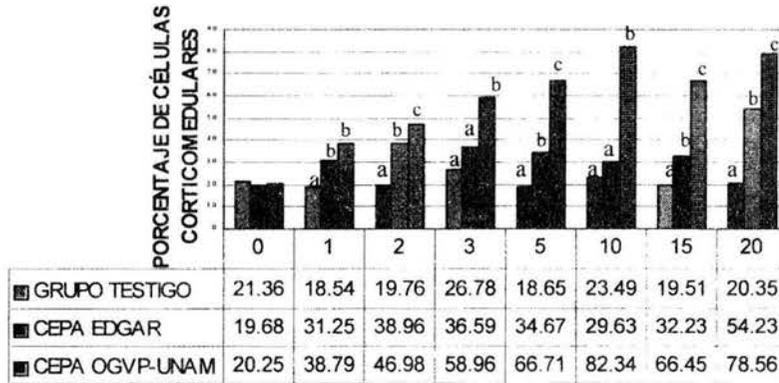


FIGURA 8

PORCENTAJE DE CÉLULAS CORTICOMEDULARES EN POLLO DE ENGORDA

