

Caracterización clínico-patológica de tres aislamientos del virus de la infección de la bolsa de Fabricio, obtenidos en granjas comerciales de pollo de engorda en México

Alejandro Banda Castro*
Juan Carlos Valladares de la Cruz**
Jaime Alonso Navarro Hernández***

Abstract

Three field isolates of infectious bursal disease virus (IBDV) were obtained from commercial broiler flocks in Mexico. Their antigenic properties were determined by antigen-capture-ELISA using monoclonal antibodies: B-29, R-63, BK-9, B-69 and 57. Virulence of the three isolates was evaluated in inoculated birds based on clinical signs, production of neutralizing antibodies against IBDV, mortality, bursa/body weight ratio, histological lesions, IBDV antigen permanence in lymphoid tissues and humoral response against *Brucella abortus* and red blood cells of sheep. Isolates P and G held the epitopes recognized by the monoclonal antibodies B-29, R-63 and B-69. These epitopes usually appear in classical IBDV strains, whereas isolate H was not recognized. The three isolates caused the subclinical form of IBD. Marked bursal atrophy with severe lymphocyte depletion was observed in inoculated birds. IBDV was detected by immunofluorescence up 14 days postinoculation, and antibody production between the first to the second week postinoculation. Although immunosuppression was not detected by the measurement of immune response towards antigens used, the eventual immunosuppressive effect by isolate H cannot be excluded. Finally, no difference of virulence among the three isolates was observed.

KEY WORDS: Infectious Bursal Disease Virus, Virulence, Field Isolates, Mexico.

Resumen

Se aislaron tres virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF) a partir de muestras obtenidas de muestras en granjas avícolas en México, aquéllos se denominaron H, P y G. Se determinaron sus propiedades antigénicas mediante la técnica de ELISA por captura de antígeno, utilizando los anticuerpos monoclonales (Mab) B-29, R-63, BK-9, B-69 y 57. Se evaluó su virulencia en aves inoculadas mediante la observación de signos clínicos, mortalidad, proporción del peso bursal con el peso corporal, lesiones microscópicas, persistencia de los virus en tejidos linfoides, serología contra VIBF y medición de la respuesta inmune hacia *Brucella abortus* y eritrocitos de ovino. Los virus P y G presentaron los epítopes reconocidos por los B-29, R-63 y B-69, que están presentes en las cepas clásicas de VIBF, el virus H no pudo ser reconocido por ningún Mab. Los tres aislamientos indujeron la presentación subclínica de la IBF en las aves inoculadas, se observó marcada atrofia bursal con depleción linfóide severa, persistencia del VIBF en bolsa hasta los catorce días posinoculación y seroconversión de las aves a partir de la segunda semana después de la inoculación. A pesar de que no se detectó plenamente un estado de inmunodepresión mediante la respuesta a los dos antígenos utilizados, no se puede descartar un eventual efecto inmunodepresor por el aislamiento "H". Tampoco se detectaron diferencias en la virulencia de los tres VIBF aislados.

PALABRAS CLAVE: Virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio, Virulencia, Aislamientos de Campo, México.

Recibido el 27 de abril de 1998 y aceptado el 16 de noviembre de 1998

*Departamento de Producción animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

**Productora de Alimentos Pecuarios de Nuevo León, S. A. Km 27.5, Carretera Monterrey-Salinas Victoria, Nuevo León, 65500, México.

***Departamento de Estadística y Genética, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

Introducción

La infección de la bolsa de Fabricio es una enfermedad aguda, altamente contagiosa, de aves jóvenes, causada por un virus de la familia Birnaviridae, caracterizada por afectar al sistema inmunocompetente, en especial a la bolsa de Fabricio (BF), lo que ocasiona un estado de inmunodepresión.¹ La virulencia y los efectos inmunodepresores del VIBF pueden variar dependiendo de la cepa del virus.² inclusive se aprecian grandes diferencias entre las cepas utilizadas como vacunas.^{3,4}

Las cepas de alta virulencia del VIBF inducen la presentación clínica de la enfermedad con alta morbilidad y mortalidad. Por otro lado, infecciones con virus menos virulentos pueden originar la forma subclínica con baja mortalidad.⁵ Se describen brotes donde únicamente se observa alteración en la ganancia de peso, o inclusive puede ocurrir la producción de anticuerpos sin la aparición de signos clínicos.⁶

Las cepas variantes antigénicas también difieren de las cepas clásicas con relación a sus características patogénicas, ya que no causan la enfermedad clínica en aves de cuatro a seis semanas de edad, no producen la mortalidad observada con algunas cepas clásicas, pero tienen alta capacidad para inducir inmunodepresión en las aves.^{7,8,9} Las lesiones producidas por estas variantes, se caracterizan por una rápida y severa atrofia de la bolsa acompañada de una mínima respuesta inflamatoria.^{2,8,9}

Por otro lado, en Europa, a partir de 1987 se han aislado cepas altamente virulentas del VIBF que se han denominado *very virulent infectious bursal disease virus* (vvIBDV), las cuales han originado problemas devastadores debido a la alta mortalidad. En la década de los noventa se han diseminado los brotes ocasionados por estas cepas, principalmente en Asia y África. Estas cepas corresponden al tipo clásico o estándar del serotipo 1.^{7,10} Al parecer, las cepas altamente virulentas del VIBF poseen mayor capacidad de inducir inmunodepresión, lo que aún no se ha determinado completamente.¹¹

El presente trabajo tiene como objetivo determinar las características clínico-patológicas y los efectos inmunodepresores de tres aislamientos de campo del VIBF en México.

Material y métodos

Cepa de VIBF de referencia

Se utilizó la cepa 73688 aislada por MC Peckham a partir de un brote de IBF en pollas de 16 semanas de edad, 12 con un título de $10^{2.8}$ DLEP_{50%}/ml.

Virus de campo de VIBF

Se obtuvieron tres virus de tres granjas ubicadas en

México: Huasca de Ocampo, Hidalgo (virus H), Perote, Veracruz (virus P) e Iguala, Guerrero (virus G), todos en México, dicha granjas presentaron serología positiva a la infección de la bolsa de Fabricio, a pesar de que no se aplicaba ninguna vacunación contra dicha enfermedad. El aislamiento viral¹² se realizó mediante la inoculación de macerados de bolsa de Fabricio, tonsilas cecales y bazo en embriones de pollo libres de patógenos (LPE),¹ observándose mortalidad y lesiones características del VIBF desde el primer pase.

Para descartar la posible presencia de los virus de Newcastle e influenza aviar, se realizó hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación a partir del líquido alantoideo. Para el caso de reovirus y adenovirus, se realizaron pruebas de precipitación en agar (PA) y virus-seroneutralización (VSN) con los macerados de tejidos embrionarios, la VSN se realizó en cultivos renales de embrión de pollo, utilizándose un antisero de reovirus para la cepa S1133 y de adenovirus grupo I, serotipo 1 (CELO) y serotipo 4.

La titulación de las suspensiones virales se realizó por inoculación en embriones de pollo LPE de las suspensiones virales. El número de DLEP_{50%}/ml se determinó mediante el método de Reed y Muench.¹³

Determinación de las características antigénicas de los VIBF

Se realizó la técnica de inmunoensayo de enzimas ligadas por captura de antígeno (AC-ELISA), utilizando cinco anticuerpos monoclonales (Mab) específicos para epítopes del VIBF** denominados B-29, R-63, BK-9, B-69, y 57.¹⁴

Aves de experimentación

Para este trabajo se usaron 620 pollos de engorda Arbor Acres X Arbor Acres no sexados, provenientes de una incubadora comercial, con un título medio geométrico de anticuerpos neutralizantes de origen materno contra VIBF de $10^{2.87}$

Caracterización de la virulencia de los aislamientos de VIBF

Las aves se asignaron de manera aleatoria en cinco grupos de 25 individuos con tres réplicas cada uno (grupo A = testigo no inoculado, B = grupo inoculado con la cepa 73688, C = grupo inoculado con aislamiento H, D = grupo inoculado con aislamiento P y E = grupo inoculado con aislamiento G). Los grupos fueron alojados en diferentes unidades de aislamiento.

Además del número de aves antes mencionado por unidad, se incluyeron adicionalmente dos lotes de 24 aves que se alojaron de manera separada y que se destinaron exclusivamente para evaluar la respuesta inmune hacia *Brucella abortus* y eritrocitos de ovino, se utilizó un lote para evaluar cada antígeno.

Los títulos de los fluidos para desafío de los aislamientos de VIBF H, P y G fueron $10^{2.8}$, $10^{3.0}$ y $10^{3.2}$ DLEP_{50%}/ml,

*Aves Libres de Patógenos Específicos, S. A. de C. V.,

** Proporcionados por Intervet México, S. A. de C. V.

respectivamente. La inoculación de las aves con los tres aislamientos de campo o con la cepa 73688 fue a los 17 días de edad por vía oral y con un volumen de inóculo de 0.2 ml por ave. Al grupo testigo se le administró 0.2 ml de caldo triptosa fosfatado. A partir de ese momento se observó diariamente la semiótica y se registró la mortalidad.

Se realizaron cinco muestreos, el primer muestreo se realizó un día antes de la inoculación a los 16 días de edad y después se realizaron muestreos a los 3, 7, 14, y 21 días posinoculación con VIBF. En cada muestreo se seleccionaron aleatoriamente doce aves de cada grupo (cuatro por cada réplica) que ya no fueron reemplazadas en el grupo correspondiente. La rutina incluyó la identificación individual de cada pollo, su pesaje y obtención de sangre sin anticoagulante para la posterior extracción de suero. Después las aves seleccionadas se sacrificaron mediante descarga eléctrica para realizar la necropsia, en primer lugar se extrajo completamente la BF para ser pesada, además se obtuvieron muestras de timo, tonsilas cecales, bazo, riñón y BF para realizar estudios de inmunofluorescencia e histopatología.

Para la evaluación de la virulencia de los tres aislamientos de campo de VIBF se consideraron los siguientes criterios. Medición de la respuesta inmune humoral hacia IBF por medio de la prueba de virus-seroneutralización (VSN)

Se midió la respuesta de anticuerpos contra IBF a nivel sérico por el método beta de VSN en cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo, según se describe en la literatura.¹⁵

Determinación del índice bursal (IB)

Se calculó el índice bursal que es la proporción de la bolsa de Fabricio con relación al peso corporal, tal como se describe en la literatura.⁶ Posteriormente, los índices bursales de cada ave se dividieron con el índice bursal promedio del grupo testigo no inoculado a lo que se denominó índice B:B. Se consideró atrofia bursal cuando se observaron en los grupos inoculados valores promedio de B:B menores a 0.70.¹⁶

Determinación de la persistencia del VIBF en tejidos por inmunofluorescencia (IF)

Se realizó la técnica indirecta de inmunofluorescencia¹⁷ en cortes de 4µ de espesor de los órganos congelados BF, bazo, timo, tonsilas cecales, hígado y riñón. Como anticuerpo primario se utilizó antisuero contra VIBF elaborado en conejos¹⁸ con

cada una de las tres siguientes cepas vacunales: Lukert, 325124 y Sal. 5 Como antisuero secundario se utilizó anti-IgG de conejo, elaborada en cabra y conjugada con isotiocianato de fluoresceína.⁶

La cuantificación de la inmunofluorescencia en los cortes se llevó a cabo según el siguiente criterio. 0 = Ausencia de células con IF; 1 = escasas células con IF; 2 = grupos de células con IF; 3 = abundantes del tejido con células con IF.

Evaluación histopatológica

Las porciones de órganos previamente fijadas en formalina amortiguada al 10% se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 4µ de espesor, para posteriormente ser procesadas con la técnica de hematoxilina-eosina (HE).¹⁹

Se hizo un estudio de las lesiones presentes en BF, bazo, timo, tonsilas cecales y riñón, en los diferentes muestreos. Únicamente se calificó la lesión en BF utilizando el siguiente criterio²⁰: 0 = Sin lesión; 1 = necrosis leve en folículos aislados; 2 = depleción linfóide moderada difusa o folículos aislados con depleción severa; 3 = depleción linfóide severa en más del 50% de los folículos; 4 = presencia únicamente del contorno de los folículos linfóides con sólo algunos linfocitos, aumento del tejido conectivo, presencia de quistes e hiperplasia del epitelio; 5 = pérdida completa de la arquitectura folicular con fibroplasia.

Medición de la respuesta humoral hacia antígenos timo-dependientes y timo-independientes

Las aves destinadas a la evaluación de la respuesta humoral timo-dependiente y timo-independiente se sometieron al siguiente esquema: A los seis días después de la inoculación con los cuatro diferentes VIBF, se inocularon las aves de manera intraperitoneal con un ml de suspensión de eritrocitos de ovino (EO) al 7% (inmunidad humoral timo-dependiente) o con *Brucella abortus* (Ba) (inmunidad humoral timo-independiente) cepa 19* con título de 3.6×10^9 bacterias viables por ml. De esta forma en cada unidad se incluyeron dos grupos de aves, un grupo inoculado con EO y otro con Ba.

Posteriormente, las aves se sangraron en dos ocasiones a los 7 y 14 días después de aplicados los dos antígenos para la obtención de suero, el cual se procesó posteriormente por microhemoaglutinación para evaluar la respuesta inmune por anticuerpos hacia EO y por microaglutinación para medir la respuesta hacia Ba. El procedimiento de ambas técnicas se realizó conforme a lo descrito anteriormente.²¹ En la microhemoaglutinación se utilizó como antígeno, suspensión de eritrocitos de ovino al 0.5% y para la microaglutinación se utilizó la cepa 1119-38 de *B. abortus*.

* Boeringher Ingelheim, S. A.

** Rhone Merieux.

***Bursine 2 Ford Dodge Animal Health.

****Anti-Rabbit IgG Whole molecule FITC Conjugate. Sigma Immunochemicals.

Análisis estadístico

El porcentaje de mortalidad por grupo se evaluó por la prueba de Ji-cuadrada.²² Con los datos del índice bursal se realizó análisis de varianza para determinar el efecto en cada grupo, se verificaron supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro y Wilks²² y homocedasticidad por la prueba de Bartlett,²² las comparaciones entre medias se realizaron por la prueba de Tukey²² a un nivel de significancia de 0.05.

Las calificaciones de lesiones histológicas, cantidad de células inmunofluorescentes y niveles de anticuerpos contra los diferentes VIBF, hacia EO y Ba, se evaluaron por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.²² La diferencia entre medias se determinó mediante la prueba de Wilcoxon-Mann Whitney²², también con un nivel de significancia de 0.05.

Previamente al análisis estadístico, los títulos de anticuerpos para VIBF, contra *B. abortus* y eritrocitos de ovino se transformaron en Log₁₀ (título + 1).

Resultados

Aislamiento viral en embriones de pollo

Durante el aislamiento en embriones de pollo libres de patógenos específicos se observó mortalidad embrionaria entre los tres y cinco días posinoculación y las lesiones encontradas en los embriones fueron congestión y hemorragia difusa de piel, edema en la región abdominal, falta de desarrollo y congestión de órganos internos. Para el grupo inoculado con el aislamiento H, se obtuvo una mortalidad de 77.78%, con el aislamiento P de 80% y con el aislamiento G de 66.67%. La mortalidad y las lesiones descritas anteriormente se observaron en el primer pase en embrión de pollo.

Determinación de las características antigénicas de los VIBF

La cepa 73688 y los aislamientos P y G, mostraron poseer los epítopes reconocidos por los B-29, R63 y B69. Sin embargo, el aislamiento H no fue reconocido por ninguno de los anticuerpos monoclonales utilizados.

Características clínicas de las aves inoculadas con VIBF

No se observaron signos de enfermedad en las aves de los cuatro grupos inoculados, así como en las del grupo testigo, solamente se observó desuniformidad en el desarrollo corporal que clínicamente fue muy evidente en el grupo inoculado con el virus H. Con relación al porcentaje de la mortalidad, se observaron los siguientes valores 9.33, 8.00, 10.67, 10.67 y 16, respectivamente, para los grupos testigo y desafiados con la cepa 73688, y con los virus H, P y G, no se observó diferencia

estadística significativa con la prueba de Ji-cuadrada ($P > 0.05$).

Proporción entre peso bursal y peso corporal

Los datos de índice bursal e índice B:B se muestran en el Cuadro 1. No se observaron alteraciones en el desarrollo de la BF en las aves del grupo testigo. La cepa 73688 indujo atrofia severa evidente desde el tercer día ($P < 0.05$). Los virus H, P y G indujeron atrofia, que se evidenció a los siete días. En los días 14 y 21 la atrofia bursal fue semejante para los cuatro grupos inoculados, ya que no se observaron diferencias estadísticas significativas.

Inmunofluorescencia

Bolsa de Fabricio

Los resultados acerca de la detección del antígeno viral por inmunofluorescencia indirecta se encuentran en el Cuadro 2. Se detectó presencia de antígeno viral desde los tres hasta los catorce días posinoculación. Se observó la mayor cantidad de células inmunofluorescentes en el tercer día posinoculación en los tres aislamientos de campo y en la cepa 73688. La inmunofluorescencia se observó en el citoplasma de las células de la corteza y médula de folículos linfoides, también se observaron células escasas distribuidas en el tejido conectivo de los tabiques interfoliculares.

Bazo

Los resultados de la inmunofluorescencia en el bazo se presentan en el Cuadro 3. Se presentaron indicios de virus del día tres al siete en los grupos inoculados con los aislamientos H y P y hasta el día 14 con la cepa 73688 y con el aislamiento G. La mayor cantidad de inmunofluorescencia ocurrió en el día tres.

Timo

Los resultados de inmunofluorescencia para el timo se muestran en el Cuadro 4. El antígeno viral fue evidente desde el día tres hasta el catorce en las aves inoculadas con la cepa 73688 y con los aislamientos P y G, con el aislamiento H se observó hasta el día siete. La mayor cantidad de aves que mostraron evidencia del antígeno se presentaron en el día tres.

Tonsilas cecales

La presencia del antígeno de VIBF abarcó del día tres hasta el siete en los grupos A, C y D, y hasta el día catorce únicamente en los grupos B (73688) y E (aislamiento "G"). No se observaron diferencias estadísticas significativas, tal como se puede ver en el Cuadro 5.

Cuadro 1											
ÍNDICES BURSALES (IB) PROMEDIO* E ÍNDICE B:B** EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DÍAS DE EDAD CON LA CEPA 73688 O CON TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DE VIBF											
Grupo	VIBF	Preinoculación***		Días después de la inoculación							
		3		7		14		21			
		IB	B:B	IB	B:B	IB	B:B	IB	B:B	IB	B:B
A	NINGUNO	2.660*	(1.00*)	2.765*	(1.00*)	2.872*	(1.00*)	2.687*	(1.00*)	2.610*	(1.00*)
B	73688	2.332*	(0.87*)	1.378 ^b	(0.49 ^b)	0.945*	(0.32 ^c)	0.907 ^b	(0.34 ^b)	0.815 ^b	(0.31 ^b)
C	Aisl. H	2.546*	(0.95*)	2.539*	(0.91*)	1.685 ^b	(0.58 ^b)	0.838 ^b	(0.31 ^b)	0.809 ^b	(0.31 ^b)
D	Aisl. P	2.716*	(1.02*)	2.642*	(0.95*)	1.232 ^b	(0.43 ^b)	0.844 ^b	(0.31 ^b)	0.774 ^b	(0.30 ^b)
E	Aisl. G	2.408*	(0.90*)	2.358*	(0.85*)	1.196 ^b	(0.42 ^b)	0.812 ^b	(0.30 ^b)	0.892 ^b	(0.34 ^b)

* IB = Peso bursal / peso corporal (n = 12).
 ** B:B = IB de cada pollo desafiado / IB promedio del grupo testigo.
 *** Valores determinados antes de la inoculación, a los 16 días de edad.
 Medias dentro de la misma columna con distinta literal son diferentes estadísticamente (P<0.05)

Cuadro 2											
NÚMERO DE AVES POSITIVAS A VIBF EN LA BOLSA DE FABRICIO Y VALORES PROMEDIO* SOBRE CANTIDAD DE CÉLULAS INMUNOFLUORESCENTES EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DÍAS DE EDAD CON LA CEPA 73688 O CON TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DE VIBF											
Grupo	VIBF	Preinoculación**		Días después de la inoculación							
		3		7		14		21			
		(+) / total	Puntuación	(+) / total	Puntuación	(+) / total	Puntuación	(+) / total	Puntuación	(+) / total	Puntuación
A	Ninguno	0 / 12	0*	0 / 12	0*	0 / 12	0*	0 / 12	0*	0 / 12	0*
B	73688	0 / 12	0*	11 / 11	1.72 ^b	2 / 12	0.16 ^b	3 / 12	0.25*	0 / 12	0*
C	Aisl. H	0 / 12	0*	10 / 12	1.58 ^b	6 / 12	0.50 ^b	4 / 9	0.44*	0 / 12	0*
D	Aisl. P	0 / 12	0*	11 / 11	2.18 ^b	7 / 12	0.58*	5 / 11	0.45*	0 / 12	0*
E	Aisl. G	0 / 12	0*	10 / 10	2.6*	5 / 12	0.41 ^b	2 / 11	0.18*	0 / 12	0*

* Promedio de calificaciones:
 1 = Escasas células inmunofluorescentes
 2 = Grupos de células inmunofluorescentes
 3 = Abundantes células inmunofluorescentes
 ** Valores determinados antes de la inoculación a los 16 días de edad.
 Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Riñón

Se detectó el antígeno del día tres al siete en los grupos inoculados con los virus "P" y "G", y hasta el día catorce en las aves inoculadas con la cepa 73688 y con el aislamiento "H". La frecuencia de aves con células positivas y la cantidad de las mismas en tejidos fue la menor en comparación con los demás órganos.

Grupo A (testigo)

Los tejidos de las aves pertenecientes al grupo no

presentaron indicio de inmunofluorescencia específica durante el transcurso de todo el experimento.

Evaluación del grado de lesión bursal

Las calificaciones promedio de las lesiones histológicas se presentan en el Cuadro 6. El grupo A presentó el grado de lesión más bajo y mostró oscilaciones alrededor del valor 1 durante todo el experimento.

En el grupo B, inoculado con la cepa 73688, se presentaron más rápidamente lesiones severas, ya que en los días tres y siete se obtuvieron las calificaciones

Cuadro 3											
NÚMERO DE AVES POSITIVAS A VIBF EN EL BAZO Y VALORES PROMEDIO* SOBRE CANTIDAD DE CÉLULAS INMUNOFLUORESCENTES EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DÍAS DE EDAD CON LA CEPA 73688 O CON TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DE VIBF											
Grupo	VIBF	Preinoculación**	Días después de la inoculación								
			3	7	14	21					
		(+) / total	Puntuación	(+) / total	Puntuación	(+) / total	Puntuación	(+) / total	Puntuación	(+) / total	Puntuación
A	NINGUNO	0 / 12	0*	0 / 12	0*	0 / 12	0*	0 / 12	0*	0 / 12	0*
B	73688	0 / 12	0*	5 / 12	0.41*	3 / 12	0.25*	2 / 12	0.16*	0 / 12	0*
C	Aisl. H	0 / 12	0*	6 / 12	0.50*	2 / 10	0.20*	0 / 12	0*	0 / 12	0*
D	Aisl. P	0 / 12	0*	6 / 12	0.50*	1 / 12	0.08*	0 / 12	0*	0 / 12	0*
E	Aisl. G	0 / 12	0*	5 / 12	0.50*	4 / 12	0.33*	3 / 12	0.25*	0 / 12	0*
* Promedio de calificaciones: 1 = Escasas células inmunofluorescentes 2 = Grupos de células inmunofluorescentes 3 = Abundantes células inmunofluorescentes											
** Valores determinados antes de la inoculación a los 16 días de edad.											
Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05)											

Cuadro 4											
NÚMERO DE AVES POSITIVAS A VIBF EN EL TIMO Y VALORES PROMEDIO* SOBRE CANTIDAD DE CÉLULAS INMUNOFLUORESCENTES EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DÍAS DE EDAD CON LA CEPA 73688 O CON TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DE VIBF											
Grupo	VIBF	Preinoculación**		Días después de la inoculación							
				3	7	14	21				
		(+) / total	Puntuación	(+) / total	Puntuación	(+) / total	Puntuación	(+) / total	Puntuación	(+) / total	Puntuación
A	NINGUNO	0 / 12	0*	0 / 12	0*	0 / 12	0*	0 / 12	0*	0 / 12	0*
B	73688	0 / 12	0*	5 / 12	0.41*	3 / 12	0.25*	1 / 12	0.08*	0 / 12	0*
C	Aisl. H	0 / 12	0*	3 / 11	0.27*	2 / 11	0.18*	0 / 12	0*	0 / 12	0*
D	Aisl. P	0 / 12	0*	3 / 10	0.30*	0 / 12	0*	1 / 12	0.08*	0 / 12	0*
E	Aisl. G	0 / 12	0*	3 / 11	0.27*	0 / 12	0*	2 / 12	0.16*	0 / 12	0*

* Promedio de calificaciones:
1 = Escasas células inmunofluorescentes
2 = Grupos de células inmunofluorescentes
3 = Abundantes células inmunofluorescentes

** Valores determinados antes de la inoculación a los 16 días de edad.

Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

más altas (3.75 y 4.00, respectivamente) con diferencia estadística significativa únicamente para el tercer día; sin embargo, el grado de lesión disminuyó en el día 14 (2.25), siendo el más bajo de los grupos inoculados; finalmente en el día 21 se incrementó nuevamente a 3.16.

Las lesiones producidas por los tres virus de campo alcanzaron su máxima calificación en el día siete, disminuyendo lentamente con el aislamiento G. La severidad de la lesión se incrementó más lentamente en el

grupo C (aislamiento H) con su nivel máximo en el día siete (3.75) y con disminución a los días 14 y 21 (2.83 y 2.66, respectivamente).

De la observación histológica de otros órganos linfoides se notifica apoptosis leve en folículos linfoides de neoformación, ubicados en timo, bazo y tonsilas cecales; en riñón se observó nefrosis tubular difusa leve. Estos hallazgos fueron comunes a los cinco grupos y permanecieron constantes durante todo el experimento.

Cuadro 5											
NÚMERO DE AVES POSITIVAS A VIBF EN TONSILAS CECALES Y VALORES PROMEDIO* SOBRE CANTIDAD DE CÉLULAS INMUNOFLUORESCENTES EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DÍAS DE EDAD CON LA CEPA 73688 O CON TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DE VIBF											
Grupo	VIBF	Preinoculación**	Días después de la inoculación								
			3	7	14		21				
			(+) / total Puntuación	(+) / total Puntuación	(+) / total Puntuación	(+) / total Puntuación	(+) / total Puntuación	(+) / total Puntuación	(+) / total Puntuación	(+) / total Puntuación	Puntuación
A	NINGUNO	0 / 12	0*	0 / 12	0*	0 / 12	0*	0 / 12	0*	0 / 12	0*
B	73688	0 / 12	0*	7 / 12	0.75*	4 / 12	0.33*	1 / 12	0.08*	0 / 12	0*
C	Aisl. H	0 / 12	0*	6 / 11	0.63*	3 / 11	0.27*	0 / 12	0*	0 / 12	0*
D	Aisl. P	0 / 12	0*	6 / 12	0.50*	2 / 12	0.16*	0 / 12	0*	0 / 12	0*
E	Aisl. G	0 / 12	0*	4 / 12	0.41*	1 / 12	0.08*	3 / 10	0.30*	0 / 12	0*

* Promedio de calificaciones:

- 1 = Escasas células inmunofluorescentes
- 2 = Grupos de células inmunofluorescentes
- 3 = Abundantes células inmunofluorescentes

** Valores determinados antes de la inoculación a los 16 días de edad.

Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Cuadro 6						
CALIFICACIONES PROMEDIO* DE LESIONES HISTOLÓGICAS EN LA BOLSA DE FABRICIO EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DÍAS DE EDAD CON LA CEPA 73688 O CON TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DE VIBF						
Grupo	VIBF	Preinoculación**	Días después de la inoculación			
			3	7	14	21
A	NINGUNO	0.58 ^b	1.25 ^a	0.66 ^b	1.08 ^d	1.25 ^a
B	73688	0.91 ^{ab}	3.75 ^a	4.00 ^a	2.25 ^c	3.16 ^b
C	Aisl. H	1.00 ^a	2.66 ^b	3.75 ^a	2.83 ^b	2.66 ^b
D	Aisl. P	1.00 ^a	2.91 ^b	3.75 ^a	3.00 ^b	3.91 ^a
E	Aisl. G	1.08 ^a	3.00 ^b	3.91 ^a	3.75 ^a	3.33 ^b

* Promedio de calificaciones:
0 = Sin lesión.
1 = Necrosis leve en folículos aislados.
2 = Depleción linfóide moderada difusa o folículos aislados con depleción severa.
3 = Depleción linfóide severa en más del 50% de los folículos.
4 = Presencia únicamente del contorno de los folículos linfoides con sólo algunos linfocitos, aumento del tejido conectivo, presencia de quistes e hiperplasia del epitelio.
5 = Pérdida completa de la arquitectura folicular con fibroplasia.

** Valores determinados antes de la inoculación a los 16 días de edad.

Medias dentro de la misma columna con distinta literal son diferentes estadísticamente (P<0.05)

Medición de la respuesta inmune hacia el virus de la infección de bolsa de Fabricio (VIBF)

Los títulos medios geométricos expresados en log₁₀ se muestran en el Cuadro 7. Antes de la inoculación, no existieron diferencias entre los grupos A, B, C y D.

El grupo A no inoculado presentó una disminución gradual en los niveles de anticuerpos a lo largo de los diferentes muestreos, llegando a cero en el día veintiuno. En los grupos inoculados se observó a partir del día siete posinoculación un ascenso de los anticuerpos en los grupos inoculados con los virus 73688 y G, y a los 14 días a las aves infectadas con los virus H y P; sin embargo, no se apreciaron diferencias entre los cuatro grupos durante

Cuadro 7

TÍTULOS MEDIOS GEOMÉTRICOS* DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA VIBF EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DÍAS DE EDAD CON LA CEPA 73688 O CON TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DE VIBF.

Grupo	VIBF	Preinoculación**	Días después de la inoculación			
			3	7	14	21
A	NINGUNO	1.1774 ± 0.62 *	0.7719 ± 0.69 *	0.7492 ± 0.68 *	0.4573 ± 0.57 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
B	73688	1.3105 ± 0.48 *	0.1969 ± 0.46 *	0.5294 ± 0.69 *	1.6194 ± 0.48 *	2.4085 ± 0.79 *
C	Aisl. H	1.3853 ± 0.59 *	0.6625 ± 0.71 ^{ab}	0.4805 ± 0.60 *	1.7375 ± 0.36 *	2.5570 ± 0.73 *
D	Aisl. P	1.4473 ± 0.35 *	0.4909 ± 0.77 ^{abc}	0.4571 ± 0.57 *	1.6811 ± 0.77 *	2.014 ± 0.69 *
E	Aisl. G	0.5041 ± 0.62 ^b	0.2836 ± 0.51 ^{bc}	0.5047 ± 0.64 *	1.3970 ± 0.75 *	2.0859 ± 0.54 *

* Media geométrica de títulos transformados Log₁₀ (Título + 1) obtenidos por virus-seroneutralización (n = 12).

** Valores determinados antes de la inoculación a los 16 días de edad.

Medias dentro de la misma columna con distinta literal son diferentes estadísticamente (P<0.05)

Cuadro 8

TÍTULOS MEDIOS GEOMÉTRICOS* DE ANTICUERPOS CONTRA ERITROCITOS DE OVINO** (EO) Y CONTRA *Brucella abortus**** EN AVES INOCULADAS A LOS 17 DÍAS DE EDAD CON LA CEPA 73688 O CON TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DE VIBF

Grupo	VIBF	Títulos de anticuerpos posinoculación							
		7 Días				14 Días			
		EO	n	Ba	n	EO	n	Ba	n
A	NINGUNO	0.56 ± 0.48 ^{ab}	24	2.11 ± 0.26 ^{ab}	20	0.26 ± 0.30 *	21	2.01 ± 0.33 *	21
B	73688	0.40 ± 0.42 ^b	21	1.98 ± 0.39 ^b	20	0.27 ± 0.42*	21	0.88 ± 0.95 ^c	22
C	Aisl. H	0.33 ± 0.33 ^b	24	2.00 ± 0.49 ^{ab}	24	0.26 ± 0.52*	22	1.77 ± 0.44 ^b	21
D	Aisl. P	0.84 ± 0.62*	23	2.18 ± 0.45 ^{ab}	23	0.33 ± 0.42*	23	2.07 ± 0.49 *	23
E	Aisl. G	0.48 ± 0.43 ^b	23	2.20 ± 0.35 *	23	0.18 ± 0.26*	17	2.14 ± 0.44 a	24

* Media geométrica de títulos transformados Log₁₀ (Título + 1) obtenidos por microhemoaglutinación.

** Las aves fueron inoculadas con 1 ml de EO al 7% seis días después de la inoculación con VIBF.

*** Las aves fueron inoculadas con 1 ml de *Brucella abortus* con título de 3.6 × 10⁶ seis días después de la inoculación con VIBF.

Medias dentro de la misma columna con distinta literal son diferentes estadísticamente (P<0.05).

los diferentes muestreos posinoculación a partir de los siete días.

Medición de la respuesta a la aplicación de eritrocitos de ovino y de *Brucella abortus*

Los títulos medios geométricos de las aves inoculadas con EO y con Ba expresados en Log₁₀ se muestran en el Cuadro 8.

Para el caso de los anticuerpos contra EO, se observaron

diferencias estadísticas significativas únicamente en el día siete posinmunización, disminuyendo los títulos al día 14 posinoculación. El grupo D (aislamiento "P") presentó los títulos más altos, con 0.84 y 0.33 para los días siete y catorce, respectivamente. El valor más bajo se presentó en el grupo C (aislamiento "H") con 0.33 en el día siete y el grupo E (aislamiento "G"), con 0.18 en el día catorce.

Con relación a la respuesta contra *Brucella abortus*, en el día siete se observaron títulos muy parecidos entre los grupos, inclusive no se obtuvieron diferencias estadísticas importantes. Al día catorce los grupos inoculados con la cepa 73688 y con el aislamiento H fueron los más bajos,

con diferencias estadísticas significativas.

Discusión

En el presente estudio se obtuvieron tres aislamientos de VIBF a partir de granjas sin antecedentes de vacunación, pero serología positiva a la IBF por VSN y con lesiones microscópicas en BF de algunos animales estudiados. Las lesiones embrionarias observadas durante el proceso de aislamiento en este trabajo, coinciden con lo observado por Hitchner²³, quien menciona que la mayor mortalidad ocurre entre los tres y cinco días después de la inoculación; por otra parte, describe la presencia de congestión y hemorragias cutáneas, edema de la región abdominal. Sin embargo, en este estudio no se observaron palidez ni necrosis hepática.

Es posible realizar la diferenciación entre cepas variantes y clásicas de VIBF con el uso de anticuerpos monoclonales con especificidad para la proteína VP2, por medio ensayos de fijación primaria o por virus neutralización.²⁴ Snyder *et al.*²⁵ elaboraron un panel de nueve anticuerpos monoclonales para epítopes del VIBF (B29, 8, 179, BK-44, R63, B69, 42, BK-9 y 57), de los cuales siete tienen capacidad neutralizante, siendo el R63 y el B69 los que poseen dicha propiedad con mayor intensidad. Mediante la técnica de ELISA por captura de antígeno se demostró que todas las cepas clásicas examinadas poseen el sitio B69, mientras que la variante Delaware, aislada en 1985, y la GLS carecen de los sitios definidos por los R63 y B69.⁹

En el presente estudio, los aislamientos "P" y "G" mostraron poseer los epítopes definidos por los anticuerpos B29, R63 y B69, que están presentes en las cepas clásicas de VIBF. Sin embargo, las propiedades antigénicas del aislamiento "H" no pudieron ser identificadas con el ensayo utilizado, por lo que se requiere completar su identificación. Por la falta de reacción ante dichos anticuerpos el aislamiento "H" puede tratarse de un virus diferente de los comunes. Para poder caracterizar completamente a los aislamientos es necesario determinar la relación antigénica con otras cepas de VIBF, incluyendo las cepas vacunales.

A pesar de presentarse una atrofia bursal marcada con depleción severa con los aislamientos "H", "P" y "G", no se presentó semiótica clínica sugestiva ni mortalidad, las lesiones presentes en las aves muertas durante este estudio no son indicativas de que el VIBF fue la causa de la muerte. Una condición similar fue descrita por Weinstock *et al.*,²⁶ quienes describen la presencia de lesiones microscópicas en BF, pero sin una alteración clínica en las aves durante un brote de IBF en una explotación de pollo de engorda de cuatro semanas.

El desarrollo de la bolsa se determinó por el índice bursal, en este estudio el grupo B presentó atrofia macroscópica severa evidente desde el tercer día con un valor de B:B de 0.49; sin embargo, es recomendable realizar observaciones en bolsas de aves inoculadas con dicha cepa en los días uno y dos después de la inoculación para determinar el tiempo en el cual se produce aumento de

volumen bursal por inflamación aguda. Los tres aislamientos indujeron atrofia a partir del séptimo día. Las cepas variantes de VIBF no producen inflamación; por lo tanto, no se observa aumento de tamaño bursal y provocan rápidamente atrofia de la BF, características que mencionan varios autores.^{1,8,9} Con la cepa 73688 se presentó un comportamiento patológico similar a las cepas variantes de VIBF; sin embargo, sus características antigénicas corresponden a los de una cepa clásica.

Lucio y Hitchner,²⁷ utilizando aves White Leghorn, observaron valores de B:B de 0.2 a los catorce días posinoculación utilizando la cepa 73688 de VIBF. La presentación de atrofia se ha descrito por otros autores, como Rosales *et al.*,²⁸ quienes mencionan que la atrofia fue evidente desde el quinto día en aves inoculadas con las cepas Edgar, U-28 y la variante A, ya que redujeron el valor de B:B a 0.55. En aves de cuatro semanas de edad, la cepa U-28 redujo el tamaño bursal en 75% después de siete días posinoculación.²⁹

El antígeno del VIBF fue detectado por inmunofluorescencia indirecta en BF, timo, bazo, tonsilas cecales y riñón. La mayor cantidad de antígeno se presentó en la BF y la frecuencia e intensidad fue considerablemente menor en otros órganos. Estos resultados son similares a los descritos por Schat *et al.*,³⁰ quienes al inocular aves White Leghorn con la cepa 73688 observaron células positivas en la BF, bazo, tonsilas cecales y timo. También observaron que la cantidad máxima de antígeno en BF se presentó entre los dos y cuatro días posinoculación y permaneció la presencia de células inmunofluorescentes hasta los 18 días.

En un estudio similar a éste, realizado por Valdez *et al.*,³¹ utilizando la cepa 2512, se observó la presencia del antígeno por inmunofluorescencia directa en la BF, bazo, timo, riñón, proventrículo, molleja y duodeno, detectándose en la bolsa desde las 24 horas hasta los nueve días. En el bazo y el timo únicamente se detectó antígeno a las 24 horas y a los seis días, respectivamente. Las tonsilas cecales fueron positivas del segundo al noveno días, excepto por el día sexto.

Vindevogel *et al.*,³² por su parte, describen que únicamente detectaron VIBF en la BF, donde fue encontrado durante diez días; las más altas concentraciones virales ocurrieron entre los días cuarto y quinto. Cheville,³³ por su parte, describe que se observó fluorescencia desde el segundo día hasta el día sexto después de la inoculación. Por otra parte, Sharma *et al.*⁸ no pudieron detectar el antígeno viral en cortes por congelación de timo inoculados con la cepa IM. Sin embargo, Inoue *et al.*,³⁴ detectaron antígeno en el timo a los siete días mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Becht³⁵ propuso que el desarrollo de los signos clínicos de IBF se puede relacionar con la velocidad de replicación del virus en los linfocitos bursales. Por otra parte, Tanimura *et al.*³⁶ concluyeron que la virulencia de las cepas de campo del VIBF se correlaciona con la producción de lesiones en los órganos linfopoyéticos diferentes a la bolsa y que puede asociarse con la distribución del antígeno en esos órganos.

En concordancia con lo anterior, Tsukamoto *et al.*,³⁷ al inocular la cepa de alta patogenicidad Ehime/91, observaron altos títulos virales en BF de 1 a 3 días después de la inoculación, así como detectaron un número alto de células positivas al antígeno por inmunohistoquímica en el timo, bazo y médula ósea. Por el contrario, con la cepa de baja patogenicidad J1, únicamente se determinó en la bolsa de Fabricio el antígeno viral de manera importante. Estos autores discuten que existen diferencias en la replicación viral en otros tejidos linfoides diferentes de la bolsa de Fabricio, de acuerdo con la patogenicidad de la cepa de VIBF. Además sugieren que no solamente la bolsa sino otros tejidos linfoides pueden modificar la virulencia de las diferentes cepas de VIBF.

En este trabajo se observó que la cantidad de células con inmunofluorescencia en BF fue menos abundante en las aves inoculadas con la 73688, lo que puede explicarse por la depleción linfóide severa. Sin embargo, es recomendable realizar estudios con muestreos más frecuentes.

Por otro lado, aunque no se observaron diferencias estadísticas en la cantidad de células inmunofluorescentes entre los grupos, el aislamiento "G" fue el que indujo mayor cantidad de células inmunofluorescentes en BF al tercer día, y en bazo a los siete y catorce días, además de que permaneció más tiempo en mayor número de órganos. Con relación a las lesiones observadas con los aislamientos "H", "P" y "G" no existieron diferencias en las lesiones observadas, aunque sí se observó variación en el desarrollo de las mismas; sin embargo, fueron semejantes a lo que previamente han descrito otros autores.^{33,38} En este contexto, con dichos virus el proceso de fibroplasia fue mínimo y se presentó rápidamente repoblación linfóide. Por otra parte, los mismos autores mencionan que la hiperplasia de las células reticulares es importante; sin embargo, en este trabajo, la hiperplasia de las células corticomedulares fue más importante en comparación con las reticulares. Se ha detectado que las cepas variantes de VIBF inducen rápidamente atrofia bursal y una inflamación pasajera o ausente. Las bolsas de las aves inoculadas con los tres aislamientos presentaron inflamación serosa con células mononucleares de leve a moderada que persistió hasta el día 21 posinoculación, además la atrofia se observó a partir del día siete posinoculación, condición similar al comportamiento de las cepas clásicas o estándar.

Sharma *et al.*³⁹ describen que ciertas cepas virulentas de VIBF pueden causar lesiones extensivas en el timo de aves afectadas. De igual manera, observó que la cepa IM producía necrosis linfóide cortical de leve a moderada, y atrofia cortical moderada en comparación con la variante A.⁸ Por su parte, Inoue *et al.*³⁴ observaron depleción cortical marcada en el timo de aves inoculadas con la cepa altamente virulenta HP-2.

La ausencia de lesiones importantes en el bazo, timo, tonsilas cecales y riñón, además de la escasa presencia de células inmunofluorescentes, puede atribuirse a la baja virulencia de los tres aislamientos, de acuerdo con lo propuesto por otros investigadores.^{36,37}

En este trabajo se consideró el estudio de los títulos contra *B. abortus*, como una medida de la actividad de los linfocitos B, ya que cierto tipo de moléculas pueden ser inmunogénicas sin la participación aparente de los linfocitos T. Tales moléculas parece que están capacitadas para estimular de manera directa a los linfocitos B. Como una característica importante de su estructura es que están formados por unidades repetidas, tal como ocurre con los polisacáridos bacterianos.⁴⁰

Estudios previos han definido los efectos inmunodepresores del virus de VIBF sobre la respuesta inmune hacia *B. abortus*. Sharma *et al.*⁸ inocularon aves LPE con la cepa IM y la variante A (VA) y midieron la respuesta a dicho antígeno. Aunque se presentaron bajos títulos en todos los pollos contra ese antígeno, fueron aparentes las diferencias entre las medias, porque en las aves infectadas los títulos medios de anticuerpos fueron menores en comparación con las aves no inoculadas, aunque únicamente en el grupo inoculado con la cepa IM de IBF la diferencia fue estadísticamente significativa sólo en la respuesta primaria.

En otro estudio realizado por Craft *et al.*,⁴¹ observaron que únicamente la cepa Edgar produjo depresión de la respuesta inmune contra *B. abortus*, condición que no ocurrió con la variante A. Finalmente, Hopkins *et al.*⁴² informaron que la vacunación contra la IBF deprimió la respuesta a dicho antígeno; además sugieren que la medición de la respuesta humoral hacia este antígeno puede ser útil como una prueba para medir posibles estados de inmunodepresión en condiciones de campo donde no es posible aplicar agentes patógenos o la presencia de anticuerpos maternos puede interferir con la respuesta a patógenos aviares. En este trabajo se observó disminución en la respuesta a *B. abortus* en el grupo B inoculado con la cepa 73688 a los siete y catorce días. Los efectos inmunodepresores de esta cepa ya han sido descritos anteriormente, en un trabajo realizado por Lucio y Hitchner.²⁷

El ensayo de anticuerpos contra EO puede indicar indirectamente una depresión de la actividad de las células T, pero debe considerarse que mide únicamente su efecto sobre la producción de anticuerpos.⁴¹

Por los resultados en los títulos de Ba y EO de este trabajo, es difícil determinar completamente la inducción de un estado de inmunodepresión en las aves por los cuatro VIBF inoculados. Esto se debe a que los grupos D (aislamiento "P") y E (aislamiento "G") presentaron una respuesta de anticuerpos mayor hacia Ba en comparación con el grupo testigo. Para el caso de eritrocitos de ovino, las aves inoculadas con el aislamiento "P" también presentaron un título medio mayor que en el grupo testigo. Sin embargo, no puede descartarse totalmente el posible efecto inmunodepresor del aislamiento "H"; ya que indujo el nivel más bajo de anticuerpos contra *B. abortus* de entre los tres aislamientos de campo a los catorce días con diferencia estadística significativa. En la respuesta inmune contra eritrocitos de ovino, aunque no se determinó diferencia estadística también se presentó el nivel más bajo de anticuerpos a los siete días en las aves inoculadas con el virus "H".

De ser cierto lo anterior, los resultados de este trabajo parecen indicar que la respuesta humoral T independiente resultó más afectada en comparación con la respuesta T dependiente, por lo que es recomendable realizar más experimentos para determinar cuál de las dos respuestas resulta con mayor afección.

Con base en los resultados de este trabajo, los tres aislamientos indujeron la forma subclínica de IBF con evidente atrofia bursal con depleción linfocítica severa e inducción de la respuesta inmune hacia VIBF. Los tres aislamientos mostraron mayor afinidad de replicación a la BF y menor en otros tejidos linfoides, lo que es compatible con las cepas de baja virulencia. Con relación a sus características antigénicas, dos resultaron compatibles con las cepas clásicas de VIBF, falta caracterizar completamente al virus H. Finalmente, a pesar de no presentarse una afección muy evidente en la respuesta inmune hacia los antígenos utilizados, no puede descartarse un eventual efecto inmunodepresor con el aislamiento H.

Agradecimientos

Este trabajo tuvo financiamiento del Programa de Apoyo a la Investigación de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se agradece a los laboratorios Investigación Aplicada, S.A. de C.V., y a Servicios Profesionales Técnicos de Puebla, el apoyo técnico brindado.

Referencias

1. Lukert PD, Saif YM. Infectious bursal disease. In: Calnek BW, editor. Diseases of poultry. Ames (IA): Iowa State University Press, 1991:648-663.
2. Saif YM. Immunosuppression induced by infectious bursal disease virus. Vet Immunol Immunopathol 1991;30:45-50.
3. Winterfield RW, Thacker HL. Immune response and pathogenicity of different strains of infectious bursal disease applied as vaccines. Avian Dis 1978;22:721-731.
4. Mazariegos LA, Lukert PD, Brown J. Pathogenicity and immunosuppressive properties of infectious bursal disease "intermediate" strains. Avian Dis 1990;34:203-208.
5. Rosenberger JK. El papel de la IBF en la inmunosupresión. World Poultry 1995; (Suplemento Gumboro):7.
6. Van der Sluis W. El virus de la infección de la bolsa de Fabricio: destructor del sistema inmune. World Poultry 1995; (Suplemento Gumboro):4-6.
7. Lukert PD. Infectious bursal disease: Past, present and future. Proceedings of the International Poultry Symposium Summit on Infectious Bursal Disease; 1995 April 3-4; Athens (GA). Athens (GA): University of Georgia, 1995:33-34.
8. Sharma JM, Dohms JE, Metz AL. Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1

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.

9. Snyder DB. Changes in the field status of infectious bursal disease virus. Avian Pathol 1990;19:419-423.
10. Kouwenhoven B, Bos VJ. Control of very virulent infectious bursal disease (Gumboro disease) in the Netherlands with more virulent vaccines. Proceedings of the International Poultry Symposium Summit on Infectious Bursal Disease; 1995 April 3-4; Athens (GA). Athens (GA): University of Georgia, 1995:29-32.
11. Ducatelle RVA, Uytendaele E, De Ruysse L, Mast J, Goddeeris B, Desmidt M et al. Infectious bursal disease in Europe, consequences of changing epidemiological conditions. Proceedings of the International Poultry Symposium Summit on Infectious Bursal Disease; 1995 April 3-4; Athens (GA). Athens (GA): University of Georgia, 1995:10-13.
12. Senne DA. Virus propagation in embryonating eggs. In: Purchase HG, Arp LH, Domermuth CH, Pearson JE, editors. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Kennett Square (PA): American Association of Avian Pathologists, 1989:179-181.
13. Villegas P, Purchase HG. Titration of biological suspensions. In: Purchase HG, Arp LH, Domermuth CH, Pearson JE, editors. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Kennett Square (PA): American Association of Avian Pathologists, 1989:186-190.
14. Snyder DB, Lana DP, Savage PK, Yancey FS, Mengel SA, Marquardt WW. 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.
15. Beard CW. Serologic procedures. In: Purchase HG, Arp LH, Domermuth CH, Pearson JE, editors. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Kennett Square (PA): American Association of Avian Pathologists, 1989:192-200.
16. Lucio B, Hitchner SB. Infectious bursal disease emulsified vaccine: effect upon neutralizing antibody levels in the dam. Avian Dis 1979;23:466-478.
17. Kawamura A. Fluorescent antibody techniques and their applications. 2nd ed. Tokyo, Japan: University of Tokyo Press, 1977.
18. Allan GM, McNulty MS, Connor TJ, McCracken RM, McFerran JB. Rapid diagnosis of infectious bursal disease infection by immunofluorescence on clinical material. Avian Pathol 1980;13:419-427.
19. Luna GL. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1968.
20. Muskett JC, Hopkins JG, Edwards KR, Thornton DH. Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. Vet Rec 1979;14:332

-334.

21. Toivanen P, Toivanen A, Good RA. Ontogeny of bursal function in chicken. I Embryonic stem cell for Humoral immunity. *J Immunol* 1972;109:1058-1070.
22. Steel RGD, Torrie JH. Bioestadística. Principios y procedimientos. México (DF): McGraw-Hill, 1988.
23. Hitchner SB. Infectivity of infectious bursal disease virus for embrionating eggs. *Poultry Sci* 1970;49:511-516.
24. Lana DP. Monoclonal antibodies to Newcastle virus and infectious bursal disease virus and their use in the diagnosis of disease. Proceedings of Improved diagnosis of Avian Diseases Using Molecular Biology of the 129th American Veterinary Medical Association Meeting; 1992 August 2; Boston (MA). Boston (MA): American Association of Avian Pathologists, 1992:50-53.
25. Snyder DB, Lana DP, Cho BR, Marquardt WW. Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. *Avian Dis* 1988;32:527-534.
26. Weinstock D, McRee WA, Suyeremoto MM, Ficken MD. Late IBDV challenge of a commercial broiler flock: immunologic assessment and performance. Proceedings of the 44th Western Poultry Disease Conference; 1995 March 5-7. Sacramento (CA). Davis (CA): Western Poultry Disease Conference, 1995:59.
27. Lucio B, Hitchner SB. Immunosuppression and active response induced by infectious bursal disease virus in chickens with passive antibodies. *Avian Dis* 1980;24:189-196.
28. Rosales AG, Villegas P, Lukert PD, Fletcher OJ, Mohamed MA, Brown J. Pathogenicity of recent isolates of infectious bursal disease virus in specific-pathogen-free chickens: protection conferred by an intermediate vaccine strain. *Avian Dis* 1989;33:729-734.
29. Rosales AG, Villegas P, Lukert PD, Fletcher OJ, Mohamed MA, Brown J. Isolation, identification and pathogenicity of two field strains of infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1989;33:35-41.
30. Schat KA, Lucio B, Carlisle JC. Pathogenesis of infectious bursal disease in embryonally bursectomized chickens. *Avian Dis* 1981;25:996-1004.
31. Valdez ILE, Lucio MB, Antillón RA. Estudio clínico-patológico y por inmunofluorescencia de la infección de la bolsa de Fabricio. *Vet Méx* 1971;2:5-10.
32. Vindevogel H, Gouffaux M, Meulemans G. Maladie de Gumboro: Distribution et persistance du virus de poussin inoculé, études sur la transmission de la maladie. *Avian Pathol* 1976;5:31-38.
33. Cheville NF. Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen, and thymus of the chicken. *Am J Pathol* 1967;51:527-551.
34. noue M, Fukuda M, Miyano K. Thymic lesions in chickens infected with infectious bursal virus. *Avian Dis* 1994;38:839-846.
35. Becht H. Infectious bursal disease virus. *Curr Topics Microbiol Immunol* 1980;90:107-121.
36. Tanimura N, Tsukamoto K, Nakamura K, Narita M, Maeda M. Association between pathogenicity of infectious bursal disease virus and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry. *Avian Dis* 1995;39:9-20.
37. Tsukamoto K, Tanimura N, Mase M, Imai K. Comparison of virus replication efficiency in lymphoid tissues among three infectious bursal disease virus strain *Avian Dis* 1995;39:844-852.
38. Riddell C. Avian histopathology. Kennett Square (PA): American Association of Avian Pathologists, 1987.
39. Sharma JM, Belzer S, Rodenberg J. Characteristics of infectious bursal disease virus-induced immunodepression in chickens. Proceedings of the 41st Western Poultry Disease Conference; 1992 March 3- 5. Sacramento (CA). Davis (CA): Western Poultry Disease Conference, 1992:54.
40. Goodman JW. Inmunogenicidad y especificidad antigénica. En: Stites DP, Stobo JD, Well JV, editores. *Inmunología básica y clínica*. México (DF): El Manual Moderno, 1988:17-23.
41. Craft DW, Brown J, Lukert P. Effects of standard and variant strains of infectious bursal disease virus on infections of chickens. *Am J Vet Res* 1990;51:1192-1197.
42. Hopkins IG, Edwards KR, Thornton DH. Measurement of immunosuppression in chickens caused by infectious bursal disease vaccines using Brucella abortus strain 19. *Res Vet Sci* 1979;27:260-261.