

DIAGNOSTICO DE LA HCI MEDIANTE EL METODO DE IMPRESIÓN DE ORGANOS (HIGADO) en los departamentos de Santa Cruz, Cochabamba y Tarija¹

Alcoba R. V. C.², Ardaya V. C.³, Castedo V. C.⁴
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

I. RESUMEN

Se realizó un trabajo de investigación con el objetivo de determinar la presencia de Hepatitis con Cuerpos de Inclusión a través de la Impresión de Órgano (hígado), para luego ser confirmado por el método definitivo de Histopatología, cuyas muestras son de los departamentos de Santa Cruz, Cochabamba y Tarija.

Se tomaron 303 muestras de animales sospechosos, las cuales se procesaron en ADA donde se empleó el método de Impresión de Órgano (hígado), luego estas mismas muestras se derivaron a LIDIVET para confirmar el diagnóstico mediante Histopatología.

Los resultados obtenidos en estas pruebas fueron: mediante la observación de Impresión se identificaron 124 positivos a HCI (40,9%). En la prueba confirmativa se identificaron 137 positivos a HCI (45,2%) de un total de 303 muestras.

Mediante el análisis Kappa se pudo observar que existe una concordancia altamente significativa ($p < 0,05$) entre el método de Impresión de Órgano e Histopatología con un valor Kappa de 0,805

De acuerdo al resultado estadístico el método de impresión de órgano empleado tiene una concordancia altamente significativa con el método Histopatológico.

1 Tesis de Grado presentada por Alcoba R. Verónica C., para obtener el Título de Médico Veterinario y Zootecnista

2 B/Las Misiones c/ San Silvestre Santa Cruz Bolivia

3 Médico Veterinario, Ardaya C. Jefe de Laboratorio de la Asociación Departamental de Avicultores, Santa Cruz-Bolivia.

4 Médico Veterinario, Castedo C. Jefe de Laboratorio de Diagnóstico Veterinario (LIDIVET) del área de Histopatología Aviar, Santa Cruz –Bolivia.

II. INTRODUCCIÓN

En nuestro medio la avicultura es una actividad que ha crecido notablemente, la cual ha ido adquiriendo una importancia socio-económica muy grande y es el rubro en el que mayores investigaciones se realizan, con el fin de lograr y disminuir los costos de producción. La explotación comercial de pollos de engorde constituye un aporte muy importante en el país y particularmente en el departamento de Santa Cruz.

La Hepatitis con cuerpo de inclusión (HCI), una enfermedad económicamente importante de pollos comerciales fue reportada por primera vez en los Estados Unidos de América en 1963. Posteriormente, esta enfermedad ha sido reconocida en numerosos países del mundo y continua siendo hoy en día un problema de salud aviar.

Los Adenovirus aviarios del grupo I (FAV, 12 serotipos) están asociados con o incriminados en brotes de HCI. El síndrome de Hidropericardio - hepatitis (SHH) fue reconocido por primera vez en 1985 en Pakistán y posteriormente resulto en una epizootia que causo la muerte de más de 100 millones de pollos de carne durante los años 1987 y 1988. El SHH es muy similar a la HCI y ha sido también asociado con los Adenovirus aviarios del grupo I.

El SHH también ha sido reportado en Irak, Kuwait e India. Un síndrome de enfermedad diagnósticamente similar al SHH ha sido observado por varios años en México y en países de América del sur como Perú, Chile y Colombia, pero no es comúnmente referido como HCI. La mortalidad resultante de este síndrome de enfermedad, ha sido reportada ser mas alta

que la producida por la HCl clásica y también se ha reportado una alta incidencia en Hidropericardio.

El primer reporte de HCl en México se produjo en 1974, se sustentó en hallazgos clínicos y patológicos característicos a la enfermedad en pollos de engorda de seis semanas de edad, procedentes de una granja que presentó un brote en el que la morbilidad fue del 2% y la mortalidad del 0,5%. Sin embargo a partir de 1989 la enfermedad cobró mayor importancia debido al incremento de su frecuencia y severidad con mortalidad hasta del 60%. Esta situación obligó a los laboratorios mexicanos como Avimex, a desarrollar vacunas inactivas de la HCl, para su uso en reproductoras y pollos de engorda, vacunas que también se usan en otros países Latinoamericanos como el Perú.

La Hepatitis con Cuerpos de Inclusión o Síndrome de Hidropericardio (HCl/SHP), es producida por diferentes serotipos de Adenovirus del grupo I. El genoma viral de estos virus está constituido por ADN de doble banda y las partículas virales completas miden entre 80 100 nm. De diámetro. La forma del virión es icosaédrica y su cápside está conformada por 252 capsómeros esféricos y elongados. Hasta el momento se reconocen 12 diferentes serotipos de Adenovirus del grupo I, mismos que pueden variar en virulencia y patogenicidad sin importar el serotipo aislado.

La presentación de Hepatitis con Cuerpos de Inclusión o Síndrome de Hidropericardio (HCl/SHP) se caracteriza por un inicio súbito de la mortalidad que alcanza su máximo nivel después de 3 a 4 días y suele suspenderse hacia el quinto día, pero a veces continúa durante 2 a 3 semanas. Las aves muestran signos clínicos como depresión, fiebre, postración y adoptan una posición de acurrucamiento con plumas erizadas y mueren dentro de un plazo de 48 horas o se recuperan. La infección de la

bolsa de Fabricio aumenta la patogenicidad de los Adenovirus aviarios y su capacidad para originar hepatitis y muerte se aumenta de manera considerable ante la presencia del agente de Anemia del Pollo.

Las lesiones principales se localizan en el hígado de las aves afectadas. A la necropsia se observa hepatomegalia, además el hígado está hinchado y friable, puede haber hemorragias petequiales o equimóticas subcapsulares mostrando zonas pálidas amarillentas difusas o focales, acompañado de hemorragias en los músculos esqueléticos. Dependiendo de la virulencia del Adenovirus involucrado, es común observar además, Hidropericardio y nefritis, lo que puede acentuarse ante la presencia de otros agentes patógenos o predisponentes, como son enfermedades bacterianas, virales, tóxicas o de estrés ambiental o de manejo.

En estudios histopatológicos de hígados se señala la presencia de cuerpos de inclusión en los hepatocitos, pudiendo, estas inclusiones, ser eosinófilas, grandes y redondas o de forma irregular en color pálido claro o a veces basófilas, lesión considerada patognomónica de la HCI/SHP, por lo tanto debe de valor diagnóstico para la enfermedad.

La Hepatitis con Cuerpos de Inclusión y el Síndrome de Hidropericardio – Hepatitis, continúan siendo un problema para los productores avícolas en todo el mundo, por la alta mortalidad resultante, a pesar de la diversidad de medidas de control practicadas.

En Bolivia, los Laboratorios de Patología Aviar de LIDIVECO en el departamento de Cochabamba, de LIDIVET y de la Asociación de Avicultores en Santa Cruz de la Sierra, cuyo radio de acción abarca casi el 98% de la Avicultura comercial boliviana, registra en sus informes la presencia de la enfermedad de Hepatitis con Cuerpos Inclusión que se introdujo a Bolivia en Diciembre del año 2002 de un lote procedente del Perú.

En consecuencia, por los antecedentes y justificativos mencionados nos propusimos realizar el presente trabajo de investigación teniendo en cuenta de que la enfermedad de HCI esta presente en nuestro país, evaluar un método de diagnostico directo como lo es la impresión de órganos en este caso (hígado), utilizando este método como una prueba cernidora, demostrando su utilidad al separar positivos de negativos de dicha enfermedad, para luego ser confirmadas por el método Histopatológico y así ver la concordancia que existe entre ambos métodos.

III. REVISIÓN BIBLIOGRAFÍA

3.1. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DEL HÍGADO DE LOS POLLOS

3.1.1. ANATOMÍA MACROSCÓPICA

En las aves, el hígado se halla en la zona de la cavidad toracoabdominal rodeando la punta del corazón. Se localiza en posición ventral y posterior al corazón y está cercanamente asociado con el proventrículo y el bazo. (BRADLEY Y GRAHAMME, 1985).

El hígado de los pollos es un órgano grande, pesa alrededor de 50 gr. Su color depende del estado nutricional del ave y aunque a menudo es de color chocolate, marrón oscuro, marrón rojizo o puede ser marrón claro o, si el ave consume una dieta rica en grasas, amarillo. (McLELLAND, 1997).

Poco después de la eclosión, los lóbulos hepáticos del pollito de un día de edad poseen un color amarillo brillante, gracias a los pigmentes que absorben junto con los lípidos del vitelo. El color va cambiando gradualmente hasta que, entre el octavo y el decimocuarto día de vida, alcanza el color marrón caoba del hígado adulto (NORTH y BELL, 1993).

Normalmente, los bordes de hígado son delgados y cortantes, pero si el hígado está agrandado pueden redondearse. Está dividido en dos lóbulos: el derecho es más grande que el izquierdo (de menor tamaño). De este último parte el conducto hepatoentérico, del derecho el hepatocístico que desemboca en la vesícula biliar, de donde parte el conducto cístico que desemboca en el tercio proximal del duodeno, cerca de la desembocadura del hepatoentérico (RIDEELL, 1987).

La vena cava caudal pasa a través de la parte craneal del lóbulo derecho y recibe las venas hepáticas. La vesícula biliar se halla en la superficie visceral del lóbulo derecho (BRADLEY y GRAHAME, 1985; MCLELLAND, 1997; NORTH y BELL, 1993; RIDDELL, C. 1987).

3.1.2. ANATOMÍA MICROSCÓPICA.

En su estructura básica, el hígado de las aves es similar al de los mamíferos, pero no obstante presenta diferencia en ciertos detalles. La unidad del lobulillo, observada en algunos mamíferos como el cerdo, no aparece en las aves por falta de tabiques intercelulares, es decir, no existe la delimitación de lobulillos por septos de tejido conectivo. Por ello, en un corte observado con microscopio óptico se evidencia un estroma pobre y hay una masa homogénea de cordones hepáticos con elementos vasculares, conductos y sinusoides hepáticos distribuidos irregularmente (McLELLAND, 1995).

La clásica teoría de Elías aplicada para los vertebrados, describe que las placas predominantes de dos hepatocitos de espesor separan los sinusoides vecinos. Para los mamíferos y las aves superiores, estas placas se redujeron a solo un espesor de una célula hepática, mientras en las aves más primitivas estas placas eran de una a dos células según Hickney y Elías.

La superficie esta cubierta por una capa peritoneal de mesotelio. Por debajo de ella se dispone la cápsula de Glisson, de tejido conectivo denso, que se introduce en el parénquima hepático acompañando los vasos hepáticos portales. El grosor de la cápsula de Glisson es muy pobre; en consecuencia, el esqueleto de tejido conectivo esta reducido en todo el órgano y solamente

es bien visible cuando rodea los grandes vasos. Se encontró con pocas fibras elásticas entre el tejido conectivo del hígado (DELHON y Col. 1984).

El hígado como toda glándula, está formado por un parénquima y un estroma. El primero deriva del endodermo Intestinal y el segundo del mesodermo.

El estroma: El hígado está cubierto por una capa de células mesoteliales peritoneales aplanadas, por debajo se encuentra la cápsula de Glisson, cuyo grosor es muy pobre, en consecuencia el esqueleto de tejido está reducido en todo el órgano y solamente es bien visible cuando rodea los grandes vasos. Esta cápsula está formada por fibras colágenas y pocas fibras elásticas. A nivel del hilio el tejido conectivo de la cápsula se engrosa hacia el interior del órgano para unirse con el tejido conectivo más denso que rodea las ramas vasculares y biliares de los espacios interlobulillares. Este tejido provee una estructura de soporte interno para el parénquima hepático (McLELLAND, 1997).

El tejido conectivo que se encuentra dentro del lobulillo es una red de fibras reticulares situadas entre el endotelio sinusoidal y las placas de las células hepáticas. Las fibras reticulares sirven de apoyo al parénquima hepático. La cápsula contiene también troncos de nervios motores, fibras aisladas y receptores. El tejido interlobulillar y las trabéculas son escasas y difíciles de ver, salvo en el cerdo que tiene tabique de tejido conectivo fibroso bien destacados, que rodean a cada lobulillo hepático (NORTH y BELL, 1993).

La cápsula de Glisson es fibroelástica, no muy gruesa, y los tabiques que de ella salen son pocos y delgados. En los espacios porta se encuentran los mismos elementos que en los mamíferos, y presenta pequeños acúmulos de células linfoides alrededor de la triada portal, siendo menos común en otras

regiones del parénquima hepático. Los sinusoides están muy marcados y las células de Kupffer son evidentes. La estructura trabecular no es tan marcada como en los mamíferos (DELHON y Col. 1984; BRADLEY y GRAHAME, 1985).

Todo el parénquima situado entre el área portal y la vena central se compone de células dispuestas en placas o laminas ramificadas estas laminas tienen un grosor de una célula con la superficie libre de las mismas hacia los sinusoides.

Lobulillo hepático: la distribución del tejido conectivo determina la formación de unidades anatómicas denominadas lobulillos hepáticos. Cada lobulillo está formado por placas o laminas de cadenas de hepatocitos (trabéculas de Remark) estas se disponen radialmente alrededor de un espacio central dirigiéndose hacia la periferia. El espacio central es la vena central del lobulillo, a las que llegan los sinusoides ubicados entre las láminas del hepatocito. Contiene sangre proveniente de la vena porta y de la arteria hepática, que se ubican en el tejido conectivo perilobulillar, siendo bien visibles a nivel de los espacios porta o de Kiernam. Este lobulillo así descrito constituye el lobulillo anatómico o clásico (BRADLEY y GRAHAME, 1985).

Lobulillo portal: se define como la porción del parénquima hepático que vuelca su secreción en un conducto común. Así en este concepto de lobulillo, el centro o eje morfológico sería el espacio porta que contiene al conducto biliar. Las zonas vecinas del parénquima hepático comprendidas entre las venas centrales de tres lobulillos anatómicos vecinos que rodean el espacio porta completan la estructura, este lobulillo tiene una forma aproximadamente triangular donde la bilis fluye desde la periferia hacia el centro (DELHON y Col. 1984).

Las células hepáticas son poliédricas y angulares en forma. Es una célula más grande que las células hepáticas de los mamíferos. Posee núcleo grande y esférico, ocupa el tercio periférico de la célula, cuya base forma parte de la pared de los sinusoides. Los ápices de la célula parecen comunicarse con los canalículos biliares. El citoplasma celular es granular y su membrana no es muy notoria la disposición de las células es similar a las del hígado de los reptiles y es mas simple que en la de los mamíferos. Los cordones hepáticos forman columnas dispuestas en una forma tubular alrededor de una visible capilar biliar interlobular. En un corte transversal los cordones hepáticos tienen apariencia de alveolo formado por cuatro a cinco células. Es normal observar la presencia de vacuolas de grasa en los hepatocitos de los pollitos, durante la primera semana de vida, y de las gallinas, en etapa de postura (BRADLEY y GRAHAME, 1985).

3.1.3 FUNCIONES DEL HÍGADO.

El hígado es la glándula y el órgano mas voluminoso de la economía, representando entre el 2 y 5% del peso corporal. Es una glándula epitelial derivada del endodermo intestinal, la cual cumple una doble función: exocrina y endocrina. La primera se manifiesta por la elaboración de la bilis y la segunda por ser la célula hepática, el hepatocito, responsable de la metabolización de sustancias endógenas y exógenas de muy variada naturaleza.

La importancia que tiene el hígado respecto de la función orgánica se deduce, sin más de su peso y volumen, así como de su interposición en el sistema venoso visceral abdominal. La estructura se adapta a su multiplicidad funcional. Como órgano de reserva recibe de la vena porta las sustancias absorbidas por el aparato digestivo y las que de una manera normal se desintegran en el bazo.

Se caracteriza por una multiplicidad de funciones complejas, llevadas a cabo por el hepatocito y las células de Kupffer. Las primeras se ocupan de:

- excreción: productos de desecho;
- secreción: bilis;
- almacenamiento: lípidos, vitaminas A y B, glucógeno y proteínas;
- síntesis: fibrinógeno, globulinas, albúminas, protrombina, glucosa;
- destoxificación fármacos liposolubles;
- conjugación: sustancias toxicas, hormonas esteroides;
- esterificación: ácidos grasos libres a triglicéridos;
- metabolismo proteínas, carbohidratos, grasa hemoglobina, fármacos;
- hemopoyesis: en el embrión y potencialmente en el adulto.

Las células de Kupffer, integrantes del sistema mononuclear fagocítico, llevan a cabo una importante función al remover sustancias extrañas desde la sangre (DELHON y Col. 1984).

3.2 HEPATITIS CON CUERPOS DE INCLUSIÓN

3.2.1 RESEÑA HISTÓRICA

La hepatitis con cuerpos de inclusión fue descrita por primera vez por Hemboldt y Frazer en 1963 en los Estados Unidos de Norteamérica y ha sido reportada en otros países como Canadá, Reino Unido, Italia Japón, Australia Nueva Zelanda, Pakistán, Chile, Perú y México. Se han reportado a partir de los años 80 mortalidad hasta de 70% en brotes de campo denominados también Síndrome del Hidropericardio (SHP).

En México la HCI fue descrita por Antillón y Lucio en 1974. A partir de 1989 se observo mayor severidad y frecuencia en los botes en varios estados de la

Republica Mexicana. Gay y Col. En 1995, presentaron hallazgos en los cuales se determino la existencia de un Adenovirus Grupo I capaz de reproducir el cuadro de HCI/SHP, informando además de técnicas diagnosticas complementarias y el desarrollo de una vacuna inactivada para prevención de este padecimiento (BORREGO y Col. 1997).

Actualmente esta enfermedad es bien conocida en la India y en otros países asiáticos, así como en México y en varios otros países Latinoamericanos (PAÚL y Col. 1997).

Este padecimiento se ha diagnosticado en diversas partes del mundo, incluyendo Asia, Australia, Oriente Medio, Sudamérica y México (SOTO y GAY, 1997).

Entre abril de 1990 y marzo de 1994 se realizó, en el norte de la India, un estudio sobre la epidemiología de la Hepatitis con Cuerpos de Inclusión en aves de corral. Su propósito era evaluar el papel desempeñado por diversas variables en tanto que causas o factores determinantes de la gravedad de la enfermedad. Dos fueron las especies examinadas: el pollo de asar (broiler) y la codorniz japonesa. Pudo observarse que el factor asociado con mayor frecuencia a la IBH era la presencia de aflatoxinas en la dieta de los animales en cantidades superiores al nivel permisible, es decir 20 partes por billón. En muestras de hígado de las aves afectadas se aisló Adenovirus aviar-1. En el último año de estudio, varios brotes de IBH causaron lesiones características de la IBH, además de Hidropericardio (SINGH y Col. 1996)

El doctor R. K. McMillan describió un brote específico de Hepatitis con Cuerpos de Inclusión, transmitida verticalmente, en un complejo de pollos de engorda. Una granja específica de reproductoras estaba implicada en el asunto, lo que provoco lotes afectados de pollos de agosto de 1996 hasta la

recesión en marzo de 1997. Cuando se reconoció el problema de enero de 1997, se realizaron observaciones en las colocaciones de aves en casetas sencillas, a partir de la parvada sospechosa.

La Hepatitis con Cuerpos de Inclusión ocurrió en todo los lotes que se monitorearán, en contraste con la ausencia de HCI en pollitos extraídos de otras parvadas reproductoras. Se considero significativo que 4 de 7 parvadas afectada fuesen serológicamente negativas al Gumboro en recesión, indicando que la HCI clínica puede darse en ausencia de inmunosupresión de Gumboro. Un estudio serológico en 53 parvadas de reproductoras pesadas situadas en 29 granjas en Alberta mostró títulos elevados de Gumboro, congruente con la transferencia adecuada de anticuerpos maternos y la sólida exposición al virus de la Anemia de Pollos.

Un patrón variable de respuestas de anticuerpos se noto al aplicar la prueba de precipitación de gel agar (AGP) Adenoviral de grupo específico. Por lo general del 30 al 50% de los sueros de una parvada dieron positivo y solo 2 de las 29 granjas dieron negativo en la prueba de AGP Adenoviral. El autor concluyó que el Adenovirus transmitido verticalmente puede servir como patógeno primario, independientemente del Gumboro, lo que concuerda con observaciones hechas en Nueva Zelanda (SHANE, 1998).

En Chile, La Hepatitis con Cuerpos de Inclusión se reconoció por primera vez en 1968, a través de hallazgos de campo y de diagnóstico de laboratorio que relacionan los signos clínicos, las lesiones macroscópicas y las tasa de mortalidad del 20 al 50% en las parvadas de pollos de engorda. Las características típicas de la infección por HCI, como la describieron Humboldt y Frazier en los Estados Unidos (1963), se acompañaban de Hidropericardio notable y consistente, similar a los graves brotes reportados en Pakistán en 1985 a los que se ha llamado con el nombre hepatitis con Cuerpos de Inclusión o Síndrome de Hidropericardio (HCI/SHP). Durante la década de

los setenta, la industria de los pollos de engorda presento frecuentemente HCI/SHP. En la siguiente década se relacionaron varios brotes con ataques inmunosupresores, asociados predominantemente con la enfermedad de Bursitis Infecciosa (EBI) que estaba altamente diseminada entre la población avícola local.

Aunque el impacto principal de HCI/SHP lo resintió la industria del pollo de engorda, en 1986 los hallazgos de campo y los diagnósticos de laboratorio reportaron brotes de HCI en algunas parvadas de reproductoras al comenzar la producción de huevo, y con tasas de mortalidad del 4-7%. La progenie de la parvada afectada también presentaba brotes de HCI con tasa de mortalidad del 15-20%, en comparación con la progenie de reproductoras sanas, ofreciendo así evidencias circunstanciales de la transmisión vertical del virus. La HCI también afecto a parvadas de pollonas marrón, causando tasas de mortalidad del 7-14%. En 1987, los estudios experimentales con vacunas inactivas mostraron algunos efectos benéficos en evitar o reducir la mortalidad en algunas granjas, pero no en otras. Por otro lado, para 1995 la aplicación de desinfecciones estrictas de las casetas, periodos más largos entre parvadas, vacunación de pollos de engorda para la enfermedad de Marek y la prevención y control de EBI había reducido, pero no evitado, los índices de mortalidad a un 4 a 18% en las parvadas afectadas (HIDALGO, 2001).

Según informe de emergencia enviado a la Organización Internacional de Epizootias por la Dra. Luz Alba Cruz de Urbina, Subgerente de Prevención y Control del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), se ha detectado en Colombia la enfermedad conocida como “Hepatitis con Corpúsculos de Inclusión”, en una granja de pollos de engorde con 12 días de edad ubicada en el municipio de Sasaima, Departamento de Cundinamarca en el centro del país. Dentro de una población susceptible de 16.000 animales, se reportaron

3.200 casos de contagio y 800 muertes, sacrificándose los 15.200 animales restantes como medida de control (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO, 2001).

Identificación de la enfermedad en Bolivia

La enfermedad fue diagnosticada por primera vez en el departamento de Santa Cruz en el mes de Diciembre del año 2002 en una granja de aves reproductoras pesadas, importadas de un tercer país, ya que llamó la atención la elevada mortalidad y las claras lesiones a la necropsia, observándose principalmente hepatitis e hidropericardio (líquido amarillento hasta con 16 – 18 ml.) esta sospecha fue confirmada a través del estudio histopatológico en el laboratorio LIDIVET el cual emitió el diagnóstico final.

La Hepatitis con cuerpo de Inclusión (HCI) también conocida como Síndrome del Hidropericardio o enfermedad del Angara,

3.2.2 DEFINICION.

La Hepatitis con cuerpo de inclusión (HCI) es una infección Adenoviral de pollos jóvenes (3 a 15 semanas de edad, pero se observa mas frecuente en pollos de 4 a 8 semanas de edad), caracterizada por producir anemia, hemorragias e inmunodepresión. Debido a la anemia y hemorragias que producen también se llama anemia aplásica de las gallinas o anemia infecciosa (MOSQUEDA y LUCIO, 1985; WHITEMAN Y BICKFORD, 1983)

Hay evidencia conflictiva con relación a la función que cumplen los Adenovirus Grupo 1 de los pollos como patógenos primarios en la naturaleza, pero se dispone cada vez de mas pruebas de su participación como patógenos secundarios relacionados con otros virus, como el agente de la

anemia del pollo y de la infección de la Bolsa de Fabricio (McFERRAN, 1995).

Los Adenovirus aviarios del grupo 1 están ampliamente distribuidos en todo el mundo. Las especies aviares domesticas de todas edades son susceptibles, y otras especies aviares parecen serlo a infección con serotipos de pollo y probablemente también serotipos propios (McFERRAN, 1995)

La HCI es observada en aves (*Gallus*) jóvenes, especialmente en pollos de engorde, y a sido descrita en aves de una semana y más comúnmente entre 3 y 7 semanas de vida. También ha sido relatada en aves más viejas hasta 20 semanas de edad. En otras especies como palomas, la HCI resulta en hepatitis y pancreatitis. La HCI fue descrita en papagayos (*Psittaciformes*), Merlin y Falcones (*Falco sp.*) (DA SILVA MARTINS y Col. 2000).

En Sudamérica esta enfermedad estuvo presente desde los años 80, principalmente en Chile, Perú, Ecuador. Es una enfermedad que afecta principalmente al pollo de engorde a la edad de 3 a 7 semanas, con una duración de 2 semanas. (ADA, 2003).

La hepatitis a Cuerpo de Inclusión (HCI) es una enfermedad aguda que principalmente afecta a los pollos jóvenes y es causado por un Adenovirus, se caracteriza porque produce muerte súbitamente, es de curso corto, produce daño en el hígado, anemia, hemorragias petequiales y en caso del Síndrome de Hidropericardio (SHP) también se afecta el corazón y los pulmones. (TRUJILLO, 2003).

La hepatitis con Cuerpo de Inclusión o síndrome de Hidropericardio (HCI/SHP), es producida por diferentes serotipos de Adenovirus del grupo 1. el genoma viral de estos virus esta constituido por DNA de doble banda y las partículas virales completas miden entre 80 y 100 nm de diámetro. La forma

del virión es icosaédrica y su capsida está conformada por 252 capsómeros esféricos y alargados. Hasta el momento se reconocen 12 adenovirus del tipo 1. (GAY y Col, 1997).

3.2.3 IMPORTANCIA ECONOMICA

Radica principalmente en la disminución poblacional, con la mortalidad que varía del 2 al 60% y una morbilidad del 1 al 20% (ADA, 2003).

Esta enfermedad es de importancia económica ya que produce predisposición a otras enfermedades por la inmunodepresión, retraso en el crecimiento del ave, depresión en la conversión alimenticia y en la ganancia de peso, además de aumento de la mortalidad. (MOSQUEDA y LUCIO, 1985; DA SILVA MARTINS y Col. 2000)

3.2.4 ETIOLOGIA

La Hepatitis por Cuerpos de Inclusión es producida por un Desoxivirus (virus ADN) perteneciente a la familia de los Adenoviridae, Género Aviadenovirus y especie Virus de Hepatitis con Cuerpos de Inclusión, tipos 1-12. Se han agrupado los Adenovirus Aviarios por sus relaciones serológicas, su proliferación en cultivos de células y características de su ácido nucleico.

La HCI puede ser causada virtualmente por cualquier serotipo del aviadenovirus del grupo 1 del Gallus gallus domesticus. Algunas muestras del virus de la HCI (VHCI) mantienen especificidad en la especie del hospedero, los aislados de pavos.

Se han realizado pruebas de neutralización y se han reconocido 12 serotipos aviares, pero sin duda hay más aislamiento pero no clasificados todavía. Hay múltiples serotipos distintos que se han relacionado con brotes naturales de

HCI. Entre los registrados se encuentran F4 y F8. Algunos investigadores han tenido éxito en la reproducción de lesiones hepáticas con inclusiones intranucleares basófilas después de la inoculación parenteral de pollitos pequeños. (McFERRAN y Col, 1995).

Varios investigadores han comparado las cepas mediante pruebas de neutralización. Hay acuerdo acerca del número de serotipos o especies, pero cierto desacuerdo en las designaciones de los serotipos. Se han reconocido 12 serotipos aviares, pero sin duda hay más aislamiento pero no clasificados todavía. Hay múltiples serotipos distintos que se han relacionado con brotes naturales de HCI. Entre los registrados se encuentran F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10. Algunos investigadores han tenido éxito en la reproducción de lesiones hepáticas con inclusión intranucleares basófilas después de la inoculación parenteral de pollitos pequeños (McFERRAN; 1995; MOHANTY y DUTTA, 1988; WHITEMAN y BICKFORD, 1983; ZARZUELO, 1982; DA SILVA MARTINS y Col., 2000)

Los Adenovirus tienden a la especificidad de hospedero y a permanecer en un ambiente contaminado. Se replican en el núcleo de las células afectadas y generalmente producen grandes corpúsculos de inclusión intranucleares; todos los Adenovirus son resistentes a solventes lipídicos tales como el éter, cloroformo, desoxicolato sodico, tripsina, fenol al 2% y alcohol al 50%. Son resistentes a variaciones del pH entre 3 y 9.

Se inactivan con formaldehído a concentración de 1:1000 y compuestos yodados, se inhiben por los inhibidores de DNA IuDr y BuDR y son resistentes a muchos otros desinfectantes. Aunque se acepta que en general, se inactivan los Adenovirus en solución acuosa a 56 C durante 30 minutos, y que la estabilidad al calor se reduce por iones bivalentes, los Adenovirus aviares muestran mayor variabilidad y parece que son más resistentes al calor (MCFERRAN, 1995; WHITEMAN y BICKFORD, 1983).

3.2.5 PATOGENIE Y EPIZOOTIOLOGIA.

Los diversos virus de HCI están diseminados en la avicultura industrial. Los Adenovirus de *Gallus* fueron aislados también de pavo, palomas, periquitos australianos y patos (*Anas platyrhynchos*). Partículas semejantes a los Adenovirus fueron encontradas en tejidos de falcones, (*Falco sp*), gaviotas (*Larus argentatus*) y otras aves marinas y varios spitacicos.

Anticuerpos específicos para el VHCI están diseminados en las aves domesticas (*Gallus, Meleagris, Phasianus, Coturnix, Colinus, Anas y Anser*) y salvajes. Los estudios indican que los virus de *Gallus* (F1 a F12) son originarios probablemente de faisanes y gallina de Angola (*Numida numida*). Generalmente con el manejo de lotes de diferentes orígenes mantenidos próximos o mezclados se promueve un intercambio de virus resultando, en la madurez sexual, que las aves ya estén infectadas con los 12 serotipos. Es común una infección con mas de un serotipo en un mismo individuo, que puede ser resultados de una baja protección cruzada.

La transmisión vertical ocurre por vía transovariana, en huevos fértiles o no, alcanzando, de la matriz infectada al embrión. La transmisión horizontal se da directamente, principalmente después de contaminación por heces (fecal - oral), o indirectamente, por equipamientos de personal (especialmente pies sucios) contaminados. Todas las secreciones pueden estar infectadas. Los aerosoles respiratorios tienen menor importancia y pueden requerir mucha proximidad.

Las infecciones horizontales de pollitos susceptibles ocurren principalmente en cortas distancias y la forma aerógena es de lenta diseminación (semanas).

Las matrices infectadas transmiten la infección verticalmente (es muy importante), pudiendo resultar en embriones con anticuerpos maternos y con

virus en los pollitos, la disminución de los niveles de anticuerpos maternos ocurre como promedio dentro de 2 – 4 semanas, permitiendo la reactivación del virus.

La infección natural resulta en replicación intestinal del VHCl y excreción en las heces. En los pollos el pico de producción de virus ocurre normalmente entre las 4 – 6 semanas de edad. En ponedoras, el pico ocurre entre las 5 a 9 semanas. Con la ocurrencia de la enfermedad clínica, la infección se disemina, alcanzando al hígado como también hay replicación respiratoria (nasal y traqueal) y renal. La patogenicidad varía con la muestra y el título de virus, variando para algunas muestras de 4 a más de 300.00 dosis infecciosas de cultivos de tejidos como dosis mínimas necesarias para causar mortalidad. Las diferencias de patogenicidad pueden ser grandes, hasta entre muestras del mismo serotipo. (MORALES y Col, 1994).

La edad del ave interfiere también en la patogenicidad, que puede resultar, después de la inoculación parenteral con algunas muestras, en mortalidad al primer día, pero al décimo día de edad. Los pollos de engorde han sido más comúnmente afectados. Las aves infectadas se convierten portadoras vitalicias. La reactivación viral es periódica, con excreción en las heces, lo que resulta en los reproductores de transmisión vertical.

La enfermedad clínica es muy rara y contrasta con la alta diseminación del VHCl. La HCl está comúnmente asociada a una coinfección como agente infeccioso que potencializa la vida del VHCl, especialmente inmunodepresores, como los virus de la enfermedad de Gumboro (VDIB) y de la anemia de las gallinas (DA SILVA MARTINS y Col. 2000).

Debido a que no está bien establecida la función de los Adenovirus del tipo 1 como patógenos primarios, los factores que determinan la patogenicidad no están claros. Hay indicaciones de que distintos serotipos, y aun cepas con el mismo serotipo, pueden variar en su capacidad para provocar enfermedades y muerte. En muchos estudios la vía de inoculación ha sido en extremo importante; muchos aislamientos no provocan enfermedad cuando se administran por vías naturales o por propagación directa, pero son altamente patógenos cuando se administran por inyección parenteral. Esto sugiere que muchos Adenovirus son patógenos potenciales y requiere de algún otro agente para que les permita ocasionar enfermedad. Además la edad del ave es importante. Así, ha sido posible provocar mortalidad en polluelos de un día de inyección, pero no en aves de 10 días de edad. La virulencia puede relacionarse con la cepa de virus, edad del ave y título, con variación de la dosis mortal mínima de >300.000 a 4 dosis infecciosas 50% de cultivo de tejidos.

La infección de la Bolsa de Fabricio aumenta la patogenicidad de los Adenovirus aviares y su capacidad para originar hepatitis y muerte se aumento de manera considerable con la presencia del agente de la anemia del pollo (CAA del ingles, chicken anemia agent) (McFERRAN, 1995)

Los Adenovirus del pollo se encuentran en todas partes en las aves como se demuestra por múltiples estudios de anticuerpos y por los índices altos de aislamiento de Adenovirus de muestras tomadas de aves normales y enfermas. Además de infectar pollos, los serotipos de Adenovirus aviares se han recuperado de pavos, pichones, periquitos de Australia y patos silvestres y es probable que algunos aislados de aves domesticas procedan de gallinas de Guinea y de faisanes.

La transmisión más importante es a través del huevo (transmisión vertical). Los Adenovirus se transmiten a través del embrión y a menudo se desenmascaran en cultivos celulares preparados con embriones de pollos y pollitos de parvadas infectadas. Esta ha sido una de las motivaciones mayores para establecer parvadas libres de patógenos específicos (SPF de inglés specific-pathogen-free). Hay evidencia de que la infección de Adenovirus puede permanecer latente y sin detectarse por una prueba de inmunodifusión doble durante cuando menos una generación en una parvada SPF.

Aunque se han aislado Adenovirus desde el primer día de vida, los virus se excretan normalmente a partir de la tercera semana. En pollos de engorda, el nivel máximo de excreción se encontró entre 4 y 6 semanas de vida. En reemplazos de ponedoras, la excreción de virus llegó al máximo entre 5 y 9 semanas, pero aun se estaba en 70 % después de 14 semanas.

Se supone que el estrés de la producción de huevo o las concentraciones elevadas de hormonas sexuales ocasionan reactivación del virus. Esto naturalmente asegura una transmisión máxima en el huevo a la generación siguiente. El ave infectada puede transmitir el virus a su progenie durante un periodo de 2 a 3 meses. El pollito infectado puede transmitir el virus a otros pollos. El virus es muy resistente al medio ambiente por lo que se transmite fácilmente por el equipo alimento, agua, personal y fomites contaminadas (transmisión horizontal) (McFERRAN, 1995; MOSQUEDA y LUCIO, 1985).

La propagación horizontal también es importante. El virus se encuentra presente en las heces, en la mucosa traqueal y nasal y en los riñones. Por lo tanto, se puede transmitir el virus por todas las excreciones, aunque los títulos mas elevados estén en las heces. Hay un patrón juvenil y un patrón adulto de excreción. Así, un ave de 35 días de edad, que muestra el patrón

adulto, tiene un título máximo más bajo de virus fecal, con una declinación más temprana en los títulos de virus y excreta durante un periodo más corto que un pollito recién nacido, que inhibe el patrón juvenil. La propagación horizontal parece ser de manera principal por contacto directo fecal, pero también por contacto aéreo a distancia corta, con una propagación lenta que requiere semanas para llevarse a cabo. La propagación aérea entre las granjas no parece ser destacada, pero la propagación por medio de fomites, personal y transporte, puede ser importante. (McFERRAN, 1995)

Existen evidencias de que algunas parvadas que sufren la enfermedad están inmunológicamente deficientes ya que fueron expuestas con anterioridad a la enfermedad infecciosa de la Bolsa de Fabricio. Los pollos infectados eliminan Adenovirus en las heces durante unas cuantas semanas y la infección se disemina lentamente en la parvada. El virus es resistente a muchos cambios del medio ambiente y puede ser diseminado fácilmente a través de objetos o mecánicamente.

La mayoría de las parvadas comercialmente poseen anticuerpos de Adenovirus aviar lo que conduce a creer que la infección está ampliamente diseminada y es generalmente inaparente. Parvadas con infección inaparente pueden ser fuente de diseminación a otras parvadas. (WHITEMAN y BICKFORD, 1983)

La infección clínica puede producirse como consecuencia de factores de estrés desconocidos que actúan sobre el animal y hacen posible la acción de un virus existente ya en el interior del organismo. Las aves adultas actúan como portadoras sanas del virus, la transmisión se realiza a través de las vías digestivas, respiratorias y a través de los huevos (ZARZUELO, 1982).

Se considera que la enfermedad se puede transmitir verticalmente a través del huevo y horizontalmente por medio del agua, alimento, fomites (secreciones, orines y estiércol), contaminado por heces de animales enfermos. Generalmente es una enfermedad de difusión rápida. (MEDIIVILLA, 1991)

La transmisión principal es por vía horizontal, las aves enfermas eliminan el virus al medio ambiente a través de las heces y este es propagado por el aire, agua alimento contaminado, movimiento de materiales, movimiento de equipos de avícolas y desplazamiento de personas. El brote ocurre frecuentemente con algunas condiciones predisponentes como la presencia de Gumboro y Anemia Infecciosa. El virus es extremadamente resistente y mantiene su efectividad por varios meses en las instalaciones sin la presencia de aves. Las medidas de higiene y desinfección solo reducen la concentración viral y retardan el contacto con el huésped. (SAAED, 1994).

Es una enfermedad de difusión rápida entre la parvada y se transmite en dos formas: Vertical, los Adenovirus pueden permanecer latentes en la parvada de reproductoras hasta la aparición de la madures, donde después se puede transmitir el virus en forma vertical después de periodos de inmunosupresión o estrés a través del huevo (embrión). Horizontal, particularmente entre parvadas de granjas, de edades múltiples, por medio de agua, alimento, secreciones de heces de animales enfermos esparcidos, por aire (vientos), movimientos de materiales avícolas y desplazamiento de personas. (ADA, 2003).

3.2.6 SIGNOS CLINICOS.

La HCI surge rápidamente y se caracteriza por súbito aumento de mortalidad, alcanzando entre 10 y 30 % durante tres a cuatro días, depresión en la conversión alimenticia y en la ganancia de peso. Entre los signos

comúnmente observables se incluye postración, agachamiento, plumas erizadas, anemia e ictericia (DA SILVA MARTINS y Col. 2000)

El periodo de incubación es de 24 a 48 horas después de la infección por vías naturales. Se encontró que la inmunosupresión producida por la bolsa de Fabricio (IBF) ayudo a los virus en la producción de HCI. Cuando se infectan aves tanto con CAA como con Adenovirus, hay un aumento en la incidencia de hepatitis y muerte (McFERRAN, 1995)

La HCI se caracteriza por inicio súbito de mortalidad que alcanza su máximo nivel después de 3 a 4 días y suele suspenderse el 5to día, pero a veces continua durante 2 a 3 semanas. La morbilidad es baja y las aves enfermas adoptan una posición de acurrucamiento con plumas erizadas y mueren dentro de un plazo de 48 horas o se recuperan. La mortalidad puede llegar a 10% y en ocasiones hasta 30 %. Se observa normalmente en aves productoras de carne de 3 a 7 semanas de edad, pero se ha comunicado en aves tan jóvenes como de siete días y tan viejas como de 20 semana. Hay evidencia de enfermedad en operaciones integradas de pollo de engorda de ciertas parvadas de reproductoras (McFERRAN, 1995; MOSQUEDA y LUCIO, 1985).

La HCI se difunde rápidamente en la parvada causando una súbita elevación de la mortalidad. La enfermedad se presenta con mas frecuencia en pollos de engorda entre 5 a 7 semanas de edad, generalmente después de un brote de enfermedad de Gumboro o después de otro padecimiento que ocasione inmunodepresión, lo que parece ser una condición indispensable para la presentación de HCI (MOSQUEDA y LUCIO, 1985).

Los signos más comunes son depresión, plumas erizadas, poliuria, diarrea, acurrucamiento, anemia, ictericia y aumento de la mortalidad. Puede haber palidez de la cresta, barbilla y piel de la cara. Las aves afectadas muestran

depresión e indiferencia. (WHITEMAN y BICHFORD, 1983; McFERRAN, 1995; MOSQUEDA y LUCIO, 1985)

La presentación de HCI/SHP se caracteriza por signos clínicos como depresión, fiebre, postración e incremento en la mortalidad alta. (ADA, 2003).

La HCI se caracteriza por inicio abrupto de mortalidad, entre los 3 a 5 días, pero en algunos casos sigue por 2 a 3 semanas. La morbilidad es baja; los pollos enfermos se quedan encogidos y con las plumas erizadas, mueren dentro de 48 horas o se recuperan. (MORALES Y CARDOSO, 1994).

3.2.7 LESIONES MACROSCOPICAS.

Entre las lesiones mas comúnmente observadas se incluyen hemorragias de hígado y músculos (especialmente cuando el hígado esta aumentado de tamaño y con hemorragias también en m ósculos especialmente cuando están asociadas a la enfermedad de Gumboro y/o anemia de las gallinas) e hipoplasia de la medula ósea (enfermedad hepatomielopoyética, posiblemente debido a la presencia de la anemia en las gallinas).

El hígado se encuentra pálido, aumentado de volumen y friable, con hemorragias de tipo petequial o equimótica (DA SILVA MARTINS y Col. 2000).

La piel esta pálida y puede estar icterica con presencia de hemorragias, especialmente sobre las piernas y pechugas internamente se presentan hemorragias generalmente en los músculos esqueléticos y por debajo de las membranas serosas. Las lesiones principales son hígados pálidos, friables e hinchados. Pueden haber hemorragias petequiales y equimóticas subcapsulares y en el parénquima del hígado y en los músculos esqueléticos.

El hígado inflamado e hinchado puede presentar áreas focales moteadas (rojo amarillentas). Los riñones pueden estar pálidos e hinchados y contener hemorragias corticales (McFERRAN, 1995; MOSQUEDA y LUCIO, 1985; WHITEMAN y BICKFORD, 1983).

Se observa hemorragias subcutáneas en diversos grados, sangre acuosa, hepatitis (hígado amarillento o bronceado), hidropericardio, bazo pequeño, medula ósea pálida, riñones pálidos inflamados y hemorrágicos. (ADA, 2003).

La medula ósea se observa frecuentemente pálida, la sangre pierde viscosidad y esta acuosa. El líquido del pericardio generalmente aumenta, pudiendo encontrarse manchas grises o blancas sobre el corazón. (WHITEMAN y BICKFORD, 1983).

Las lesiones macroscópicas incluyen la presencia de abundante líquido amarillo pajizo en el saco pericárdico, congestión generalizada y con un hígado aumentado de tamaño, pálido y friable. (HIDALGO y Col. 2001).

3.2.8 LESIONES MICROSCOPICAS.

A la histopatología se observan inclusiones intranucleares basofílicas en los hepatocitos, que contienen partículas virales. Las inclusiones intranucleares eosinófilas son también encontradas, pero contienen material granular y fibrilar. Las inclusiones son circundadas típicamente por un halo claro. (DA SILVA MARTINS y Col. 2000).

Las lesiones histopatológicas en el corazón y pulmón consisten de edema, degeneración y necrosis con moderada infiltración de células mononucleares. Se observa disociación de los sinusoides y cordones hepáticos, vacuolización de hepatocitos, degeneración grasa y la presencia de cuerpos de Inclusión

Intranucleares basófilos y eosinófilos en hepatocitos en el hígado. (MOHANTY y Col, 1988).

Los cambios más significativos son encontrados en el hígado y son: corpúsculos de inclusión intranucleares en los hepatocitos que pueden considerarse como una lesión patognomónica, estas inclusiones pueden ser eosinófilas, grandes y redondas o de forma irregular en color pálido claro o a veces basófilas. Existe aplasia o hipoplasia de la medula ósea (MOSQUEDA Y LUCIO, 1985; WHITEMAN Y BICKFORD, 1983; McFERRAN, 1995).

Las lesiones observadas son: distensión del saco pericárdico con abundante fluido seroso amarillento, congestión generalizada y edema pulmonar con la presencia de exudado seroso en la cavidad torácica, aumento del volumen del hígado (se observa parches amarillentos o color rojizo oscuro) y la presencia de puntillero hemorrágico, muestran necrosis del miocardio y hepatitis, hemorragias petequiales en el pericardio bajo la cápsula del hígado, esplenomegalia, atrofia del timo y de la bolsa de Fabricio, severa lesión renal con los riñones aumentados de tamaño, pálidos y con acumulación de curatos. (ADA, 2003).

3.2.9 DIAGNOSTICO.

Diagnostico presuntivo.

El rápido incremento de la mortalidad en parvadas jóvenes y en crecimiento acompañado de una baja morbilidad son sugestivas de Hepatitis con Cuerpos de Inclusión. También son de ayuda las lesiones macroscópicas típicas y la historia de brotes anteriores en la zona (WHITEMAN Y BICKFORD, 1983; DA SILVA MARTINS y Col. 2000).

Diagnostico definitivo

Histopatología

La histopatología puede confirmar el diagnóstico, con la demostración de inclusiones intranucleares eosinofílicas o basofílicas, consideradas como lesiones patognomónicas en el hígado coloreado por H-E, observando la presencia de cambios microscópicos típicos en el hígado, especialmente los corpúsculos de inclusión intranucleares en hepatocitos (MOSQUEDA y LUCIO, 1985; WHITEMAN y BICKFORD, 1983; DA SILVA MARTINS y Col. 2000).

Los diagnósticos de HCI es difícil detectar por tratar de una enfermedad con varios agentes etiológicos. El examen de histopatología nos revela con mucha eficacia la presencia de Corpúsculos de Inclusión intranucleares en las células del hígado del ave. (CUBILLOS, 1996).

La lesión más característica de la enfermedad se encuentra en el hígado y guarda relación con la presencia de Cuerpos de Inclusión Intranucleares basófilos en los hepatocitos, necrosis difusa y vacuolización de las células hepáticas apreciándose también disociación de los cordones hepáticos e hiperplasia en los conductos biliares y células de Buffer. (TALAVERA, 1995)

Aislamiento e Identificación del virus

El cuadro clínico y las lesiones son indicativos para la sospecha de la enfermedad, los Adenovirus pueden ser aislados en cultivos en monocamadas de hígados, o de riñones de embriones de gallina SPF.

CELO (tipo1) y Tipton (tipo5) pueden ser cultivados en embriones de 9 a 11 días de incubación, el cultivo e identificación de los Adenovirus del tipo 1 tiene importancia experimental pero no tiene valor diagnóstico, considerando la diseminación de esos agentes. Los cultivos son examinados para observar la presencia de corpúsculos de inclusión intranucleares después de la coloración de hematoxilina-eosina (H-E) o revelación con anticuerpo

marcado. Los anticuerpos marcados contra Aviadenovirus Grupo pueden ser detectados por inmunodifusión contra pool de antígenos de tres serotipos. Inmunofluorescencia y ELISA son pruebas consideradas sensibles y confiables. Los anticuerpos serotipo específico pueden ser detectados por pruebas de neutralización o ELISA.

Los resultados de detección de anticuerpos son de difícil interpretación debida a la alta diseminación de los VHCl, tanto en aves saludables como en aves enfermas. La histopatología puede ser auxiliar en el diagnóstico, con la demostración de inclusiones intranucleares en el hígado coloreado por H-E o anticuerpos marcados con fluoresceína (Inmunofluorescencia) o enzima (inmunoenzimática) (DA SILVA MARTINS y Col. 2000)

Las muestras preferidas son hígados de aves sospechosas, que pueden prepararse como una suspensión al 10% e inocularse ya sea a células de hígado de embrión de pollo o a células de riñón de pollo, en los que se realiza dos pasajes ciegos de siete días de duración cada uno. Una vez que se aísla un agente en cultivo de células, el método más fácil para confirmar que es un Adenovirus es teñir las células con un antisuero marcado con un colorante fluorescente. El examen directo de lisado celular en el microscopio electrónico también proporciona una respuesta rápida y positiva y tiene la ventaja adicional de que además pueden detectarse parvovirus. Si es que están presentes. Si no se dispone de estas técnicas, entonces la tinción con hematoxilina y eosina de las capas unicelulares demostrara la presencia de inclusiones basófilas intranucleares. Para identificar un serotipo es necesario practicar pruebas de virus de neutralización con el aislamiento enfrentando el aislamiento con los antisueros estándar de preferencia de todos los serotipos conocidos (McFERRAN, 1995; COWEN y Col. 1978)

Serología.

Pueden detectarse anticuerpos contra el antígeno de grupo mediante el empleo de la prueba de inmunodifusión doble, pero esta sensibilidad aparente en los brotes naturales se debe muchas veces a una infección múltiple con serotipos de Adenovirus y no puede usarse como base para la detección de infección en las parvadas libre de patógenos específicos. Sin embargo, se ha demostrado que si se usa un antígeno trivalente que incorpora tres serotipos de Adenovirus, la prueba de inmunodifusión es sensible. La prueba inmunofluorescente indirecta es mucho más sensible, rápida y barata: No obstante requiere destreza en su interpretación. ELISA se ha empleado para detectar anticuerpos de grupo, y es sensible y barata. El problema principal con cualquier prueba serológica para Adenovirus consiste en la interpretación de los resultados, porque los anticuerpos están distribuidos tan ampliamente en aves tanto sanas como enfermas, que muchas de ellas están infectadas con varios serotipos. Por lo tanto, la presencia de anticuerpo no da una indicación del estado de la inmunidad local en la superficie de las mucosas (McFERRAN, 1995).

Impresión de Organos.

El diagnóstico de impresión de órganos se puede hacer con base en las lesiones macroscópicas post mortem. La presencia de corpúsculos de inclusión en el hígado e hidropericardio en el corazón, apoyan al diagnóstico clínico. El tejido hepático necrótico debe colocarse entre dos porta objetos, se fijan por calor y se tiñen por el método de GRAM (CALNEK, 2000).

3.2.10 DIAGNOSTICO DIFERENCIAL.

Por anemia y hemorragias que produce la HCI puede confundirse con otras enfermedades que configuran el Síndrome Anémico Hemorrágico:

- Por las lesiones hepáticas con hepatitis Vibrionica

- Por hemorragias musculares con: Gumboro, Síndrome hemorrágico, Intoxicación por sulfas, deficiencia de Vitamina K.
- Por la atrofia de la bolsa de Fabricio con Gumboro.
- Por sintomatología inespecífica con: Micotoxicosis, Coccidiosis y Gumboro. (TRUJILLO, 2003).

Intoxicación por sulfas.

Las hemorragias en el tejido subcutáneo y músculos, así como las hemorragias y color amarillento del hígado pueden hacer pensar en HCl, sin embargo, los infartos en el bazo no son característicos en la HCl y si lo son en la intoxicación por sulfas.

Aflatoxicosis.

Las lesiones entre Aflatoxicosis y HCl son tan parecidas que se requiere de un examen histopatológico para diferenciarlas, siendo la lesión característica de la aflatoxicosis la hiperplasia de los conductos biliares y la de la HCl los corpúsculos de inclusión.

Enfermedad de Gumboro (IBF)

La IBF aparece en la mayoría de las lesiones de HCl, con la excepción de las lesiones en el hígado que nos permite diferenciarlas. Recordemos, sin embargo, que con mucha frecuencia IBF precede y es necesaria para el desarrollo de HCl (MOSQUEDA y LUCIO, 1985; WHITEMAN y BICKFORD, 1983).

3.2.11 PREVENCIÓN Y CONTROL.

Como se conoce que tanto la Infección de la Bolsa de Fabricio como la anemia Infecciosa de los pollos potencializan la patogenicidad de los

Adenovirus, el primer paso debe ser controlar o eliminar ambas enfermedades (VILLEGAS, 2002)

Los Adenovirus son resistentes y aunque es posible eliminarlos de la mayor parte de las casetas con ambiente controlado que tienen pisos y paredes impermeables, y que pueden hacerse a prueba de aire, el valor del intento de erradicación de los Adenovirus de las parvadas comerciales es cuestionable. Esto se debe a que el virus se está propagando verticalmente de manera tan extensa a través de huevos embrionados, que los virus se introducirían a la parvada siguiente y, por lo tanto, sería necesario iniciar el control desde los reproductores primarios. Además, la experiencia con parvadas libres de patógenos específicos ha indicado que la propagación horizontal sería un problema de orden mayor y sería en extremo difícil evitar que se infectara una parvada comercial (McFERRAN, 1995).

Debido a que el virus de la Hepatitis con Cuerpos de Inclusión se transmite a través del huevo, los huevos provenientes de parvadas de reproductoras cuya progenie ha presentado consistentemente hepatitis con cuerpos de inclusión no deberán utilizarse para la incubación (WHITEMAN y BICKFORD, 1983)

La aplicación de medidas cuarentenarias y las buenas prácticas sanitarias parecen ser la mejor defensa contra la infección. Se debe evitar la presencia de las aves silvestres en las instalaciones avícolas ya que existe la posibilidad de que estas sirvan como propagadoras del virus (WHITEMAN y BICKFORD, 1983).

Entre otras medidas sanitarias, se recomienda no usar la cama más de un ciclo productivo, criar aves de una misma edad, mantener prácticas de limpieza estricta y desinfección correcta (MOSQUEDA y LUCIO, 1985).

Por la multiplicidad de serotipos no se cuenta con una vacuna adecuada. La vacunación contra la enfermedad de Gumboro en las reproductoras es el método más práctico para prevenir la hepatitis con cuerpos de inclusión.

Existe suficiente evidencia de que los Adenovirus causan la Hepatitis con Cuerpos de Inclusión en aves que padecen inmunodepresión como consecuencia de la infección con el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio (MOSQUEDA y LUCIO, 1985; WHITEMAN y BICKFORD, 1983).

No existe tratamiento efectivo en pollos con hepatitis con cuerpos de inclusión. Sin embargo es conveniente la utilización de antibióticos, para impedir complicaciones bacteriales secundarias. El buen manejo y los cuidados generales disminuyen la mortalidad (ZARZUELO, 1982; WHITEMAN y BICKFORD, 1983).

Medidas de prevención.

- Barreras naturales o artificiales que permitan filtrar el ingreso de roedores.
- Implementar controles sanitarios en los ingresos y salidas del plantel avícola, mediante puntos de desinfección y control sanitario.
- Prohibir el ingreso del personal extraño a las instalaciones (implementar duchas y ropa para visitas).
- Los galpones deben estar protegidos contra el ingreso de aves y roedores (así mismo se debe tomar control en los depósitos de alimentos).
- Todo equipo ingresado al plantel avícola debe ser desinfectado y fumigado
- Debe evitarse el traslado de equipos y herramientas entre galpones (estos deberán estar debidamente identificados).

- Debe evitarse la presencia de animales domésticos en el interior de la granja.

Medidas de control.

- Las granjas comerciales deben estar a 2 Km de distancia entre una y otra.
- Extremar la limpieza y desinfección en áreas donde hubo presencia de brotes de HCI.
- Verificar la calidad del alimento.
- Efectuar un control de endoparásitos e insectos.
- Instaurar un horno para el manejo de aves muertas.
- Realizar un estricto control de roedores.
- Monitorear el ingreso y salida de los vehículos.
- Organizar y monitorear la correcta limpieza y desinfección de galpones.
- Revisar permanentemente el programa de vacunación contra HCI y Gumboro con su proveedor.
- Es necesario conocer la calidad del agua de bebida existente en la zona.
- Incorporar control de personal y visitas a la granja. (WHITEMAN y BICKFORD, 1983)

3.3 Técnica histológica

Las técnicas histológicas comprenden todos los procedimientos especiales a los que se someten las muestras o tejidos para su posterior estudio al microscopio, Estos procedimientos se inician con:

La práctica de fijación, que consiste en: a) La obtención del material después del sacrificio y necropsia de los animales, b) Elección de la sustancia Fijadora según el estudio que se realizara, c) Tamaño de las

muestras a fijar de 1 cm. de espesor, d) Volumen del Fijador entre 40 a 50 veces de las piezas y e) Tiempo de Fijación, dependiente de penetración de la sustancia fijadora, en este caso entre 24 a 48 horas.

Obtención de los cortes histológicos previa inclusión en parafina.

Con la finalidad de obtener muestras lo suficientemente delgadas y uniformes para que los rayos luminosos puedan penetrarla para obtener una imagen microscópica adecuada, se deben cortar las muestras fijadas a 5 micras de espesor utilizando un Micrótopo de deslizamiento. Para conseguir que la muestra fijadas adquieran la consistencia mas favorable y uniforme para posibilitar la obtención de cortes histológicos a través del Micrótopo, se procede a incluirlas en parafina, para ello se realizan los siguientes pasos: a) Deshidratación de las muestras utilizando alcohol etílico de graduación ascendente, b) Impregnación por un solvente de la parafina, para facilitar la penetración de la parafina en la muestra y c) Penetración de la parafina liquida al a muestra mientras se encuentra en una estufa a 56 C y la posterior formación del bloque de parafina conteniendo el tejido.

Coloración con Hematoxilina - Eosina. Con la finalidad de facilitar la diferenciación de las estructuras microscópicas que conforman los tejidos, se recurre al empleo sucesivo de soluciones colorantes seleccionadas que tiñan selectivamente dichas estructuras. La técnica de coloración con Hematoxilina Eosina incluye los siguientes pasos:

1. Extensión y adhesión de los cortes al portaobjeto
2. Desparafinización o eliminación de la parafina
3. Hidratación de la muestra
4. Coloración con una laca de Hematoxilina, mediante coloración progresiva
5. Viraje, para neutralizar la acidez del hemalumbre

6. Coloración por la Eosina al 1% mediante coloración regresiva
7. Diferenciación
8. Aclaración o diafanización, para conferir al tejido un índice de refracción semejante al del vidrio
9. Montaje con un cubreobjeto para proteger al tejido coloreado y garantizar su conservación (DIFIORE, 1981)

3.4. TÉCNICA DE IMPRESIÓN DE ORGANO (Hígado)

Seguido de la inspección macroscópica se procede a:

1. Tomar con una pinza diente de ratón la parte mas afectada del hígado, se procede a cortar el tejido hepático aproximadamente 1 cm. de grosor.
2. Luego sosteniendo con la misma pinza, tratar de secar en lo posible la sangre que fluye normalmente, mediante impresiones sobre un papel absorbente.
3. A continuación se procede a hacer las impresiones sobre un porta objeto limpio y desprovisto de grasa, haciendo cuidadosamente una serie de impresiones y levantándola sin ningún deslizamiento lateral. Las impresiones deben de hacerse donde la superficie del corte.
4. Hacer al menos 3 a 4 impresiones sobre cada lámina comenzando en un extremo y terminando en el otro.
5. secar al aire durante unos minutos las impresiones realizadas.
6. seguidamente se procede a colorear las laminas secas, para ello se utiliza la coloración de GRAM
7. una vez teñido se espera 5 minutos a que seque completamente.
8. luego del secado se lleva al microscopio para ello se coloca aceite de inmersión y llevamos al objetivo 100x, seguidamente se procede a observar y ubicar los corpúsculos de inclusión.

IV MATERIAL Y METODOS.

4.1 MATERIAL

4.1.1 Localización del área de estudio.

Este trabajo se llevo a cabo de muestras que llegaron al Laboratorio de granjas de pollos parrilleros ubicadas en el área avícola de los departamentos de Santa Cruz, Cochabamba y Tarija, Bolivia, realizando necropsia y tomando muestras de hígado para proceder a la impresión como prueba directa y la conservación de una porción de la misma muestra de tejido para el estudio histopatológico.

4.1.2 Unidad Muestral.

Para esta investigación se tomaron muestras de hígado de aves sospechosas a la enfermedad de HCI que los avicultores enviaban al laboratorio para confirmar o descartar la presencia de dicha enfermedad.

4.2 METODOS

4.2.1 Método Directo Impresión de Organo (hígado).

En el laboratorio de Patología Aviar de la Asociación Departamental de Avicultores (ADA) se realizó la técnica de impresión de órganos (hígado) en una lamina.

Primeros se procedió al sacrificio de las aves y siguiendo técnicas apropiadas de necropsia, luego se tomaron las muestras de hígado para realizar el proceso de impresión del mismo en un porta objeto limpio, seguidamente luego de que secaron las impresiones realizadas (por lo menos 3 impresiones del mismo hígado), se procede a la coloración GRAM,

se espera que sequen durante 5 minutos, luego se proceden a observar al microscopio para ello se coloca aceite de inmersión y llevamos al objetivo 100x, seguidamente se procede a observar y ubicar los corpúsculos de inclusión.

4.2.2 Método de Laboratorio.

De las mismos cortes de hígado que se hicieron las improntas fueron fijadas en formol bufferado al 10% durante 24 a 48 horas.

El tamaño de cada muestra de hígado fue de 1 cm. Las muestras fijadas correctamente identificadas se trasladaron al Laboratorio de Histopatología de LIDIVET.

En el Laboratorio de Histopatología, las muestras fijadas se procesaron siguiendo técnicas histológicas rutinarias, que consistieron en: obtención de cortes histológicos de 5 micras de espesor previa inclusión en parafina, coloración con hematoxilina – Eosina. Posteriormente, las muestras coloreadas fueron observadas en un microscopio óptico para evaluar las estructuras hepáticas. Para tal efecto se empleo un microscopio óptico binocular OLIMPUS, (DI FIORE, 1981).

4.2.3 Método Estadístico.

Concordancia entre histopatología Vs. Prueba de directa (Impresión de órgano)

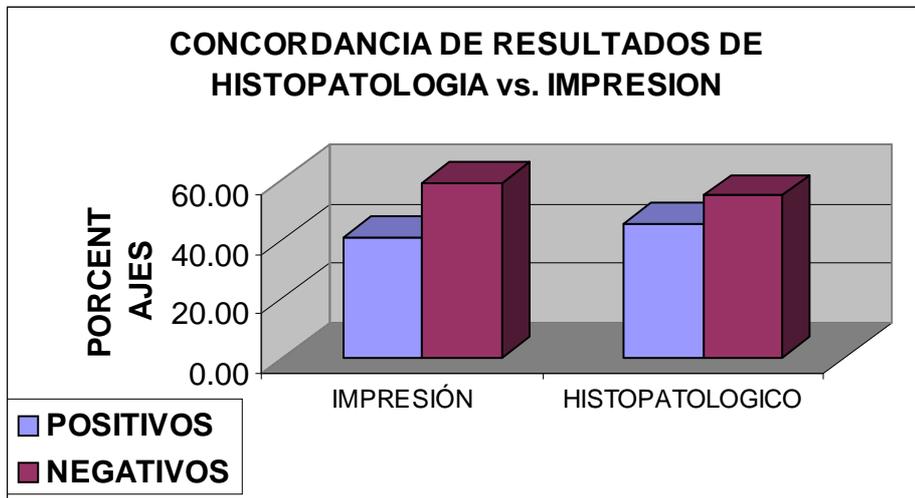
Evaluación de sensibilidad y especificidad de la prueba Cernidora o "Screening".

V RESULTADOS

En el presente estudio se realizó el diagnóstico de la enfermedad de HCI a través del método de Impresión de órgano e Histopatológico, para identificar por medio de estas pruebas animales positivos a HCI, teniendo en cuenta que la prueba de Histopatología es la prueba de oro (gold estándar). Grafico 1.

De 303 muestras sospechosa por ambos métodos se diagnosticaron como positivas el 40,9% (124/303) mediante el método de impresión de órgano el 45,2% de positivos mediante Histopatología (cuadro 1)

GRAFICO 1



HISTOPATOLOGÍA: 137/303 45,2%

IMPRESIÓN: 124/303 40,9%

CUADRO 1
RESULTADOS DE LAS DOS PRUEBAS A HCI.

METODO	N° POSITIVOS	%
Histopatológico	137	45,2
Impresión	124	40,9
TOTAL	303	

Por el método de Histopatológico dieron positivos 137/303 muestras.

Y en cuanto a Impresión de órgano (hígado) dieron positivos 124/303 muestras.

5.1.- CONCORDANCIA DE RESULTADOS ENTRE LOS METODOS HISTOPATOLOGICO VS. IMPRESIÓN DE ORGANO.

El cuadro 2 muestra la distribución de resultados obtenidos en ambos métodos. Donde se puede observar un 90,43% de concordancia de resultados positivos y negativos.

Esta es una concordancia casi perfecta, altamente significativa $P < 0,05$, por el valor estadístico Kappa de 0,805 (IC 95% 0,738-0,873)

ESTIMACIÓN DE LOS VALORES DE EFICIENCIA DEL METODO DE IMPRESIÓN DE ÓRGANO (hígado)

La sensibilidad de esta prueba nos muestra el 84,67% de verdaderos positivos, esto quiere decir que de cada 100 animales sospechosos a HCI esta prueba detecta 85 animales positivos a la enfermedad.

La especificidad de la prueba es de 95,18% verdaderos negativos, lo cual nos dice que de cada 100 animales sospechosos, 95 animales son realmente negativos que no están afectados por la enfermedad.

Debemos de tener en cuenta de que nuestra prueba de oro es Histopatología, la cual reconfirma el diagnostico, ya que muestra la lesión patognomónica de la enfermedad (corpúsculos de inclusión)

VI DISCUSION

La Hepatitis con cuerpos de Inclusión es una enfermedad que puede ser diagnosticada definitivamente por la observación de las inclusiones basófilas en las células hepáticas, estas lesiones pueden ser eosinofilas, grandes y redondas de forma irregular en color pálido claro o a veces basofilas. MOSQUEDA y LUCIO, 1985; WHITEMAN y BICKFORD, 1983; McFERRAN, 1995.

Según MOSQUEDA y LUCIO, 1985; DA SILVA MARTINS y COL., 2000. La técnica Histopatológica puede ser auxiliar en el diagnostico con la demostración de inclusiones intranucleares eosinofilas o basofilas en el hígado coloreado con hematoxilina – Eosina, observando la presencia de lesiones microscópicas típicas en el hígado, especialmente los Corpúsculos de Inclusion intranucleares en hepatocitos que puede considerarse como una lesión patognomónica de la enfermedad de HCI.

En el presente estudio se encontraron casos positivos a HCI mediante la demostración de las inclusiones intranucleares siguiendo el método de las impresiones con los cortes de tejido hepático y con los cortes histologicos. Por el método de impresión de órgano positivos a HCI fueron 124/303 muestras y en la técnica histopatológica los positivos fueron 137/303 del total de las muestras.

VII CONCLUSIONES

Llegamos a la siguiente conclusión: de que 303 muestras de hígado, 137 dieron positivas (45.2%) a histopatología, y 124 dieron positivas (40.9%) a impresión de órgano, estadísticamente lo cual nos da una concordancia altamente significativa ($P < 0,05$) entre los métodos de histopatología e impresión de órganos.

Los resultados obtenidos nos indican que podemos realizar el diagnóstico rápido de HCI mediante la impresión de órgano o prueba cernidora (screening), para luego confirmar los positivos a través del estudio Histopatológico.

El análisis epidemiológico de la HCI en el área avícola de los departamentos de Santa Cruz, Cochabamba y Tarija, ha tenido como punto de partida un estudio retrospectivo.

Comprendida entre enero del 2003 y septiembre del 2004, cuyas muestras fueron decepcionadas en el Laboratorio de la ADA y reconfirmadas por el Histopatológico en el LIDIVET el cual emitió el resultado final dando como conclusión de que si, el método de impresión puede ser usada como una prueba cernidora (screening).

Al si encontrarse lesiones compatibles con la Hepatitis con Cuerpos de Inclusión, podemos sostener que dicha enfermedad si esta presente en nuestra en nuestro medio.

Los factores que predisponen a las aves a contraer la enfermedad son la inmunosupresión

III BIBLIOGRAFÍA

- ADA (Asociación de Avicultores de Santa Cruz), Información técnica, 2003.
- BORREGO, E. J. L. Y Col. 1997. El Control de la Hepatitis con cuerpos de Inclusión a través de la Vacunación de aves reproductoras. En Memorias XV Congreso Latinoamericano de Avicultura. Editorial UNA y ALA. Cancún, Quintana Roo – México. pp. 30 – 32.
- BRADLEY, O. CH. y T. GRAHAME. 1985. The structure of the fowl. Fourth Edition. Oliver and boyd. Edinburgh and London. Pp. 47 – 48.
- COWEN, B. S. y Col. 1978. An Adenovirus survey of poultry flocks during the Growing and laying periods. Avian Diseases. Volumen 22. pp. 115 - 121.
- COWEN, B. S. y LADONNA, M. G. 1999. Aspectos Comparativos de Adenovirus Aviares asociados con Hepatitis con Cuerpos de Inclusión y el síndrome De Hepatitis con hidropericardio en pollos. En Memorias XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura. Editorial APA y ALA. Lima – Perú. pp. 260 – 264.
- DA SILVA MARTINS, N. R, DE RESENDE, J. S. y JORGE, M. A. 2000. Adenoviroses, Reoviroses e Rotaviroses. En: Berchieri Junior, A. y Macari, M. Doencas das Aves. FACTA-Fundacao APINCO de Ciencia e Tecnologia Avícolas. Campinas - S. P. –Brasil. pp. 317 – 320.
- DELHON, G. y Col. 1984. Lecciones de Histología Veterinaria Vol. 5: Aparato Digestivo comparado, estómago de los monogástricos, preestómagos, Aves, glándulas anexas. Tercera Edición. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires – Argentina. pp. 82 – 95.
- DI FIORE, M. S. H. 1981. Diagnóstico Histológico. 8va. Edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires – Argentina. pp. 15 – 25.
- GAY, G. M. y Col. 1997. Hepatitis con cuerpos de Inclusión o síndrome de Hidropericardio, etiología y diagnóstico, a 3 años de investigación en México. En Memorias XV Congreso Latinoamericano de Avicultura. Editorial UNA y ALA. Cancún, Quintana Roo – México. pp. 126 – 131.

- HIDALGO, H. 2001 Como enfrenta Chile a la Bronquitis Infecciosa y a la Hepatitis con Cuerpos de Inclusión. Avícolas. Industria Avícola. Edición. Latinoamericana de Poultri International. Watt Poultri. Illinois – EUA. Volumen 48, Número 4, pp. 24 – 27.
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. 2001. Hepatitis Aviar. Sacrificados en Colombia 16.000 pollos por contagio. Agroandino, Paris.
- McFERRAN, J. E. 1995. Infecciones por Adenovirus (Grupo 1) de los pollos.
- CALNEK, B. W. y Col. Enfermedades de las aves. 1ra. Edición en Español traducido de la novena Edición en ingles por Mérito, J. J. y Martínez, H. A. F. El Manual Moderno, S. A. de C. V. México D. F. – México. pp. 677 – 690.
- McLELLAND, J. 1995. Atlas en Color De Anatomía de las Aves. Interamericana – McGraw-Hill. Madrid – España. pp. 58 – 60.
- MOHANTY, S. E. y DUTTA, S. K. 1988. Virología Veterinaria. Traducido por Colchero, A. F. 1ra. Edición en Español. Nueva Editorial Interamericana. México D. F. – México. pp. 270 – 271.
- MOSQUEDA, T. A. y LUCIO, M. B. 1985. Enfermedades Comunes de las Aves Domésticas. Primera. Edición Universidad Autónoma de México. México D. F. – México. pp. 69 – 72.
- NORTH, M. O. Y BELL, D. D. 1993. Manual de Producción Avícola. Tercera Edición. Editorial El Manual Moderno, S. A. De C. V. Mexico, D. F. – Mexico. pp. 18-21.
- WHITEMAN, C. E. y BICKFORD, A. A. 1983. Manula de Enfermedades de las Aves. Segunda Edición. Traducido por H. A. MEDINA. American Association of avian pathologists. Pennsylvania – USA. pp. 29-33.
- ZARZUELO, P. E. 1982. Vademécum de la Patología Infecciosa de las Aves Domesticas. Primera Edición. Editorial Aedos. Barcelona – España. pp. 148 -152.

