

01674



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PATOGÉNESIS DE LAS HEMORRAGIAS EN AVES LEGHORN  
INFECTADAS CON LA CEPA 73688 DEL VIRUS  
DE INFECCIÓN DE LA BOLSA DE FABRICIO

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
P R E S E N T A :  
**ARACELI LIMA MELO**

TUTOR: NORMA CALDERÓN APODACA  
COMITÉ TUTORAL: TERESA I.FORTUOL  
TAMAS FEHERVARI



MÉXICO, D.F. MARZO 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIAS

A mis padres **Margarita** y **Enrique**, por el apoyo que siempre me han brindado en todos los momentos de mi vida.

A mis hermanas **Catalina** y **Guadalupe**, porque me han apoyado y siempre me dan ánimos para seguir.

A **Porfirio** y **Rodolfo**, que son parte de mi familia.

A mis sobrinas **Ma. Isabel**, **Estefanía** y el bebé que está por venir....

**GRACIAS POR SER MI FAMILIA...**

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Norma Calderón, Dr. Tamas Fehervari, Dra. Teresa Fortoul, Dra. Lucía Camacho y Dr. Enrique Aburto** por sus comentarios para mejorar este trabajo.

Al **Departamento de Producción Animal: Aves**, por el apoyo que me brindó durante el desarrollo del experimento.

Al **laboratorista José G. González** que colaboró conmigo para el procesamiento de las muestras de histopatología.

A la **M. en C. Patricia Bizarro** que me apoyó en el procesamiento de las muestras de microscopía electrónica de transmisión.

A mi mejor amiga **Dra. Guadalupe Ramírez**, que me ha brindado su amistad, apoyo en el transcurso de la maestría y durante todo el tiempo que la conozco.

A la **Dra. Eugenia Candanosa**, por su gran amistad y que siempre me anima a seguir adelante.

A la **MVZ Pilar Useche, MVZ Jesús Reyes y MVZ Liliana Rivera**, que participaron en parte de mi experimento.

A las **Químicas Rosalba Salcedo y Arlette Castillo**, por su colaboración en la investigación.

## RESUMEN

LIMA MELO ARACELI: PATOGÉNESIS DE LAS HEMORRAGIAS EN AVES LEGHORN INFECTADAS CON LA CEPA 73688 DEL VIBF. Tutor principal: Norma Calderón Apodaca. Comité tutorial: Teresa Imelda Fortoul van der Goes, Tamas Fehervari Bone.

Debido a la poca información que existe acerca de la patogenia de las hemorragias en la infección de la bolsa de Fabricio, se realizaron estudios en aves Leghorn, libres de patógenos específicos de 2 semanas de edad. Las aves fueron divididas en dos grupos, grupo 1: 21 aves infectadas con una dosis de 0.2 ml de la cepa 73688 del virus de IBF y grupo 2: 21 aves control, se les administró 0.2 ml de solución salina fisiológica, vía oral. Ambos grupos fueron divididos en 7 subgrupos, a los cuales se les realizaron muestreos a las 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 horas posinfección (hpi). Para el estudio hematológico, se obtuvo sangre completa con EDTA y para la evaluación del tiempo de protrombina se utilizó citrato de sodio. El estudio histopatológico, se realizó de muestras de médula ósea, riñón, bazo, hígado y bolsa de Fabricio, para microscopía electrónica de transmisión se evaluó médula ósea, riñón, hígado y bazo. No se encontraron alteraciones en eritrograma y trombocitos en las aves infectadas con el VIBF. En el leucograma, se observa una leucocitosis por heterofilia de las 24 a las 60 hpi, encontrándose diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) de las 24 a las 48 hpi. Con respecto a la determinación del tiempo de protrombina, se incrementó a partir de las 72 hpi en el grupo de aves infectadas con el VIBF, encontrándose diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) hasta las 96 hpi. Las lesiones en bolsa de Fabricio se presentaron desde las 24 hpi, quistes epiteliales multifocales, zonas de necrosis intrafolicular, infiltración de células mononucleares, necrosis linfocitaria y proliferación de tejido conectivo fibroso. En riñón se observó un infiltrado intersticial multifocal ligero de células mononucleares, principalmente en zonas perilobulares. En microscopía electrónica en riñón a partir de las 24 hpi se observó degeneración de células endoteliales de vasos peritubulares. A las 48 hpi se observó una intensa vacuolización de las células epiteliales en la zona basal adyacente al capilar peritubular. En glomerulo renal, se observó una fusión de los procesos citoplasmáticos de los podocitos y

degeneración hidrónica de las células endoteliales. Los demás órganos no presentaron cambios relevantes. Con el tiempo de protrombina prolongado, se concluye que existe un agotamiento en los factores de la coagulación, lo cual conlleva a una alteración en la hemostasia secundaria. Con los cambios que se presentaron en riñón por microscopia electrónica de transmisión, se podría sugerir que el VIBF, ocasiona problemas de glomerulonefritis. Así mismo, se sugiere que el virus de IBF de la cepa 73688 ocasiona lesión endotelial, lo que podría ser una de las causas de la alteración en el mecanismo de la coagulación, desencadenando las hemorragias.

**Palabras clave:** Infección de la bolsa de Fabricio, trombocitos, tiempo de protrombina, hemostasia.

## SUMMARY

Since there is little information about the pathogenesis of bleedings in infectious bursal disease, White Leghorn SPF, 2 week of age were used. Two groups were formed, group 1: 21 were infected with 0.2/birds of 73688 IBDV and group 2: 21 were control chickens with 0.2 ml of saline solution, both via oral. Both groups were divided into 7 subgroups, which were sampled at 24, 36, 48, 60, 72, 84 and 96 hours postinfection (hpi). Samples were kept with EDTA for the hemograma, blood samples used for the evaluation of coagulation, were treated with 3.8% sodium citrate. For histology, samples were taken from bone marrow, kidney, spleen, liver and the bursa of Fabricius. For transmission electron microscopy, bone marrow, kidney, liver and spleen were examined. No disturbances were found in erythrogram and thrombocytes of IBFV infected chickens. In the leukogram, heterophilia causing leukocytosis was seen in 24 out of the 60 hpi, with significant differences ( $P<0.01$ ) from 24 to 48 hpi. Regarding prothrombin time measurements, there was an increase as of 72 hpi in the group of IBDV infected chickens, finding a significant difference ( $P<0.01$ ) up to 96 hpi. The lesions in the bursa of Fabricius were present since 24 hpi, epithelial multifocal cysts, areas of intrafollicular necrosis, mononuclear cell infiltration, lymphocytic necrosis and proliferation of fibrous connective tissue. The kidney showed an interstitial multifocal light infiltrate of mononuclear cells, mainly in perilobar areas. Under electron microscopy, the kidney showed degeneration of endothelial cells of peritubular areas as of 24 hpi. At 48 hpi intense vacuolization of epithelial cells in the basal zone next to the peritubular capillary was seen. In the renal glomeruli, a fusion of cytoplasmatic processes of the podocytes and hydropic degeneration of endothelial cells was found. The remaining organs showed no relevant changes. With prolonged prothrombin time the conclusion is that there is a depletion of coagulation factors leading to a disturbance of secondary hemostasis. In view of the changes found in the kidney with transmission electron microscopy, it can be suggested that the IBFV causes glomerulonephritis problems. Moreover, it is suggested that 73688 IBFV causes endothelial lesion, which could be one of the reasons for a disturbance in the coagulation mechanism, resulting in bleedings.

**Key Words:** Infectious bursal disease, Thrombocytopenia, Prothrombin time, hemostasia.

## CONTENIDO

1. ANTECEDENTES	1
1.1 Características generales de la Infección de la bolsa de Fabricio	1
1.1.1 Definición	1
1.1.2 Etiología	1
1.1.3 Importancia económica	2
1.1.4 Distribución	2
1.1.5 Huéspedes y transmisión	3
1.1.6 Patogenia y signos clínicos	3
1.1.7 Lesiones macroscópicas	4
1.1.8 Lesiones microscópicas	4
1.2 Otras enfermedades aviares que cursan con hemorragias	6
2. INTRODUCCIÓN	8
2.1 Hemostasia primaria y secundaria aviar	8
2.1.1 Trombocito normal y sus funciones	8
2.1.2 El trombocito y sus alteraciones en hemorragias	9
2.1.3 Hemostasia secundaria aviar normal	9
2.1.4 Hemostasia secundaria aviar y sus alteraciones	10
2.2 Hipótesis	12
2.2.1 Objetivos	12
2.2.2 Objetivo general	12
2.2.3 Objetivos particulares	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1 Cepa de VIBF de referencia	13
3.2 Animales de experimentación y alojamiento	13
3.3 Diseño experimental	14
3.4 Estudio Hematológico	15
3.4.1 Determinación de hematócrito	15
3.4.2 Determinación de hemoglobina	15
3.4.3 Conteo de eritrocitos y leucocitos	15
3.4.4 Conteo diferencial	15

3.4.5 Estimación de trombocitos	16
3.5 Evaluación de hemostasia secundaria	16
3.5.1 Obtención de tromboplastina	16
3.5.2 Reconstitución del polvo de tromboplastina	16
3.6 Estudio histológico	17
3.7 Estudio ultraestructural	17
3.8 Análisis estadístico	17
4. RESULTADOS	18
4.1 Signos clínicos	18
4.2 Evaluación del hemograma y estimación de trombocitos	18
4.3 Evaluación de tiempo de protrombina	19
4.4 Hallazgos a la necropsia	20
4.5 Estudio histológico	20
4.5.1 Bolsa de Fabricio	20
4.5.2 Riñón	21
4.5.3 Bazo	21
4.5.4 Otros	21
4.6 Estudio ultraestructural	22
5. DISCUSIÓN	23
6. CONCLUSIONES	30
7. LITERATURA CITADA	31

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Género Birnavirus.

Figura 2. Trombocitos de ave. Tinción Wright. 1000x

Figura 3. a) Lesiones de BF de ave infectada a las 60 hpi. Quistes epiteliales, infiltrado de mononucleares y heterófilos. b) BF a las 72 hpi. Presencia de epitelio adenoide y atrofia folicular.

Fig. 4. BF de ave infectada a las 96 hpi. Atrofia folicular, infiltrado de células mononucleares, proliferación de tejido conectivo fibroso.

Fig. 5. Riñón de ave infectada a las 48 hpi. Se observa infiltrado focal de células mononucleares.

Fig. 6. Riñón de ave infectada a las 48 hpi. Se observa necrosis y degeneración hidrópica de células epiteliales de túmulos proximales y distales.

Fig. 7. Túbulo proximal de riñón de ave infectada a las 24 hpi. Se observa degeneración de células endoteliales de vasos peritubulares, con edema perinuclear y pérdida del citoplasma. MET, citrato de plomo y acetato de uranilo, 10 000X.

Fig. 8. Túbulo contorneado proximal a las 48 hpi. Intensa vacuolización de células epiteliales en la zona basal adyacente al capilar peritubular. MET, citrato de plomo y acetato de uranilo, 6400X.

Fig. 9. Glomérulo renal de ave infectada a las 48 hpi. Fusión de los procesos citoplasmáticos de los podocitos y degeneración hidrópica de las células endoteliales. MET, Citrato de plomo y acetato de uranilo, 10 080X.

Fig. 10. Túbulo proximal de riñón de ave infectada a las 72 hpi. Se aprecian escasas vacuolas apicales y mayor degeneración vacuolar del citoplasma basal adyacente al capilar peritubular. MET, citrato de plomo y acetato de uranilo. 5616X.

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Promedio de hematócrito de aves testigo y aves infectadas con la cepa 73688 del VIBF.

Gráfica 2. Promedio de trombocitos de aves testigo y aves infectadas con la cepa 73688 del VIBF.

Gráfica 3. Promedio de leucocitos de aves testigo y aves infectadas con la cepa 73688 del VIBF.

Gráfica 4. Promedio de heterófilos de aves testigo y aves infectadas con la cepa 73688 del VIBF.

Gráfica 5. Promedio de tiempo de protrombina de aves testigo y aves infectadas con la cepa 73688 del VIBF.

## **LISTA DE CUADROS**

Cuadro 1. Valores promedio y desviación estándar, del eritrograma y trombocitos de aves testigo y aves infectadas con la cepa 73688 del VIBF.

Cuadro 2. Valores promedio y desviación estándar, del leucograma de aves testigo y aves infectadas con la cepa 73688 del VIBF.

Cuadro 3. Valores promedio y desviación estándar, del tiempo de protrombina de aves testigo y aves infectadas con la cepa 73688 del VIBF.

## 1. ANTECEDENTES

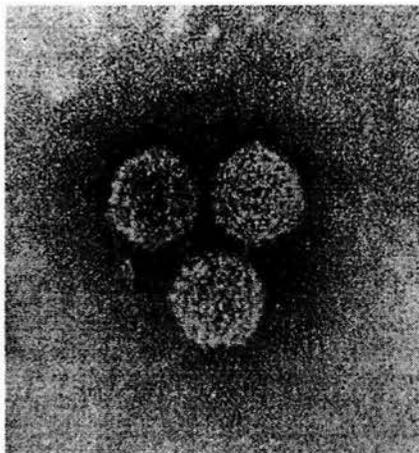
### 1.1 Características Generales de la Infección de la Bolsa de Fabricio

#### 1.1.1 Definición

La infección de la Bolsa de Fabricio (IBF) es una enfermedad viral que ocurre en aves jóvenes de 2 a 6 semanas de edad, las aves infectadas presentan diarrea, temblores, incoordinación, inflamación y atrofia de la bolsa de Fabricio. Es de alta morbilidad (100%) y baja mortalidad (20-30%) (Tsukamoto, 1995; Ley, 1983; Okoye, 1984).

#### 1.1.2 Etiología

El virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio (VIBF) es un miembro de la Familia Birnaviridae, esta familia tiene un solo género Birnavirus, en el que



se incluye además al virus de la necrosis pancreática de los peces, al virus Tellina, al virus de las ostras y al virus X de la mosca de la fruta entre otros (van den Berg, 2000; McFerran, 1993).

Este género se caracteriza por presentar dos segmentos de RNA, ser desnudo, tener simetría icosaédrica y un diámetro que varía de 55 a 65 nm.

Fig. 1. Género Birnavirus Luckert, 1997

Existen 2 serotipos del VIBF, el serotipo 1 el cual causa la enfermedad en las aves y el serotipo 2 el cual puede infectar aves y patos sin causar la enfermedad. Se sugiere que cepas altamente virulentas las cuales fueron descritas en Europa, son antigénicamente similares al virus de la cepa clásica (Luckert, 1997, 1993, Sharma, 1989; Sharma, 2000).

### **1.1.3 Importancia económica**

Las consecuencias económicas de esta enfermedad se asocian al estado de inmunosupresión, debido a que en aves infectadas, de tres semanas de edad o menos, se presenta hipogamaglobulinemia y producción de anticuerpos reducida, por lo cual se incrementa la susceptibilidad a enfermedades como enfermedad respiratoria crónica complicada, enfermedad de Newcastle, anemia infecciosa, salmonelosis y coccidiosis entre otras. Así mismo, existe retraso en el crecimiento, alteración de los parámetros productivos, decomisos en los rastros y disminución en la respuesta óptima en vacunaciones de rutina (Sharma, 1989; Confer, 1982; McIlroy, 1989; Banda, 1996).

### **1.1.4 Distribución**

Desde que se presentó el primer brote de IBF en EUA (1957), la enfermedad se ha manifestado en casi todo el mundo incluyendo Inglaterra, Alemania, Bélgica, Italia, España, Francia, Brasil, Israel, Egipto, Japón y México entre otros (Okoye, 1984; van den Berg, 2000).

En México se presenta desde 1962, en ese año se detectó en varias zonas del país como Xochimilco y Azcapotzalco, D.F.; Zintepec y Cuernavaca, Mor.; Texcoco, Cuautitlán y Tlalnepantla, Edo. de Méx.; Pachuca, Hgo. Y finalmente en Sonora, localizándose en Cd. Obregón y Guaymas (Correa, 1969). Un informe elaborado por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) y la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA) (1993), se describe la presencia de IBF en 18 estados de la República Mexicana.

### **1.1.5 Huéspedes y transmisión**

La enfermedad ha sido reportada entre los 10 días y las 20 semanas de edad, afecta a todas las estirpes de aves, sin embargo la estirpe White Leghorn presenta cuadros más severos. Otras aves como los pavos y los patos, pueden infectarse con el VIBF, pero no desarrollan signos clínicos de la enfermedad. Bajo condiciones naturales, la transmisión es a través de cama, ropa y alimento contaminado. No existe transmisión vertical. El VIBF es altamente resistente al medio ambiente contribuyendo a su persistencia en las casetas, se ha informado que puede permanecer viable hasta por 60 días en camas infectadas (McFerran, 1993, Lasher, 1994, Sharma, 2000).

### **1.1.6 Patogenia y signos clínicos**

Después de una infección oral, el virus se replica primariamente en linfocitos y macrófagos del intestino y posteriormente vía sanguínea se dirige a la bolsa de Fabricio donde se replica, el virus se disemina rápidamente en los folículos bursales y esta replicación causa una extensiva destrucción de corteza y médula de los folículos. Existe viremia 16 horas posinoculación (hpi), con replicación secundaria en otros órganos como bazo, timo, tonsilas cecales, riñón e hígado (van den Berg, 2000, Sharma, 2000).

El período de incubación es de 2 a 3 días, las aves presentan postración, anorexia, plumas erizadas y sucias, depresión, temblores, diarrea blanquecina o acuosa y algunas aves tienen tendencia a picotear sus propias cloacas. Cepas patógenas inducen severos signos clínicos seguidos de muerte, a los 3 días posinfección (Ley, 1983; Luckert, 1997; McFerran, 1993; Tsukamoto, 1995).

Así mismo, en la fase aguda de la enfermedad la necrosis ocasionada en la bolsa de Fabricio provoca la liberación de tromboplastina tisular activando la cascada de la coagulación, contribuyendo a la presencia de hemorragias diseminadas y consumo de factores de coagulación. Se ha descrito que 23 días posinfección existe marcada diatesis hemorrágica, encontrando que los factores de la coagulación II, V y VII están disminuidos colaborando con una posible coagulación intravascular diseminada (CID) (Okoye, 1984; Skeeles, 1980, van den Berg, 2000, Ley, 1983).

### **1.1.7 Lesiones macroscópicas**

Las principales lesiones en la bolsa de Fabricio, consisten en la presencia de edema, hemorragia y atrofia a los 3 a 4 días pi; en músculos pectoral profundo y del muslo se encuentran hemorragias equimóticas, así como en región inguinal y proventrículo. Otras lesiones son nefromegalia, acúmulo de uratos en riñón, esplenomegalia y lipidosis hepática (van den Berg, 2000, Okoye, 1984, Lasher, 1994).

### **1.1.8 Lesiones microscópicas**

Las lesiones en la bolsa de Fabricio son hiperemia, infiltración de heterófilos, hiperplasia de células dendríticas; marcada disminución de células foliculares linfoides con fibroplasia. Degeneración y necrosis en áreas medulares de folículos, desaparición de células linfoides, posterior a la reacción inflamatoria se presentan cavidades quísticas y tejido conjuntivo interfolicular (Craig, 1980; McFerran, 1993; Chen, 1997).

En bazo se presenta hemorragia, infiltración de heterófilos y necrosis celular; en riñón se encuentra atrofia de glomérulos, degeneración epitelial e infiltración de heterófilos; en timo se encuentra necrosis linfocítica a los tres días posinfección y en proventrículo se han reportado hemorragias (Craig, 1980; McFerran, 1993, Lasher, 1994).

Las cepas patógenas inducen severa depleción de células hematopoyéticas en la médula ósea, en donde se aprecia picnosis de los mielocitos heterófilos, y leucofagia, de 2 a 4 días posinfección (Inoue, 1999).

En la IBF la variación de las lesiones puede estar asociada a coagulopatías, que pueden favorecer la presentación de lesiones hemorrágicas, estas hemorragias diseminadas ocasionan trombocitopenia y tiempos de coagulación prolongados (Skeeles, 1980, Okoye, 1984; van den Berg, 2000).

## **1.2 Otras enfermedades aviares que cursan con hemorragias**

Enfermedades virales como la enfermedad de Newcastle causan alteraciones en la hemostasia en aves, debido a que cursan con hemorragias múltiples en diversos órganos y tejidos, ocasionando lesiones severas y generalizadas (Galindo, 2001).

Las cepas altamente patógenas de influenza aviar, causan hemorragias petequiales en mucosa del ventrículo, timo y otros órganos como corazón (Easterday, 1997, Ficken, 1996).

La anemia infecciosa ocasiona lesiones hemorrágicas subcutáneas e intramusculares y petequias en la mucosa del proventrículo, ocasionando trombocitopenia y tiempos de coagulación prolongados. Las lesiones endoteliales y el daño ocasionado al hígado causado directamente por el agente viral son importantes factores en la patogénesis de la diátesis hemorrágica. (von Bülow, 1997, Barnes, 1996).

La laringotraqueítis es una enfermedad que se caracteriza por presentar necrosis y hemorragias severas, principalmente en tracto respiratorio superior, como laringe y tráquea, llegando a formarse coágulos de sangre en la luz de la tráquea o una combinación de coágulos con excesiva cantidad de moco y tejido necrosado (Bagust, 1997, Ficken, 1996).

En la hepatitis con cuerpos de inclusión, se presentan hemorragias petequiales o equimóticas en hígado y músculo esquelético (McFerran, 1997).

El cólera aviar causado por *Pasteurella multocida*, es una enfermedad sistémica, en casos agudos se presentan hemorragias petequiales y equimóticas en diferentes órganos, y se ha demostrado depósito de fibrina intravascular en arterias, venas y capilares, por evaluación histológica, como consecuencia de CID (Nam-Yong P, 1982; Glisson, 1997).

La coccidiosis es una enfermedad que ocasiona hemorragias en intestino, provocando diarreas con sangre y alta mortalidad. Existen diferentes especies de *Eimeria* que ocasionan estas hemorragias petequiales en la mucosa intestinal y la localización de éstas depende de la localización específica de cada especie, siendo *E. tenella*, *E. máxima* e *E. necatrix* algunas de las más patógenas. La pérdida de sangre por intestino puede provocar que se presente una disminución en el contero de eritrocitos y determinación del hematócrito hasta en un 50% (McDougald, 1997, Goodwin, 1996).

Generalmente, las micotoxinas causan necrosis multifocal de hepatocitos y hemorragias multifocales, estas se pueden presentar en diferentes órganos incluyendo hígado y proventrículo (Hoerr, 1997, Goodwin, 1996).

Así como en otras enfermedades aviares que cursan con hemorragias la IBF ofrece una perspectiva de estudio, ya que la información acerca de estas hemorragias es escasa, por tanto el objetivo del presente trabajo es determinar el origen de estas hemorragias y su patogenia.

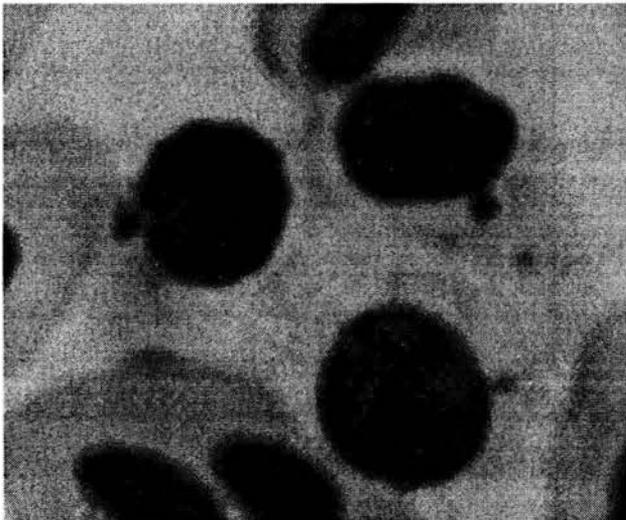
## 2. INTRODUCCIÓN

La presencia de hemorragias en aves es ocasionada por algunas enfermedades virales, bacterianas, toxinas y coccidias, las cuales ocasionan desórdenes en la coagulación, sin embargo existen pocos estudios al respecto.

### 2.1 Hemostasia primaria y secundaria aviar

#### 2.1.1 Trombocito normal y sus funciones

Los trombocitos en las aves también representan una célula blanco en la IBF (van den Berg, 2000), en un frotis con tinción de Wright (Fig. 2), estos son ligeramente más pequeños que los eritrocitos y presentan un núcleo



central redondo u ovalado, con una cromatina densa y un citoplasma pálido, con apariencia reticulada, a menudo con vacuolas y uno o más gránulos rojos. Su función consiste en participar en los procesos hemostáticos igual que en los mamíferos.

Fig. 2. Trombocitos de ave. Tinción Wright. 1000X

Los trombocitos de las aves tienen receptores para fibrinógeno, el cual actúa como un puente molecular para la agregación y que son activados en las alteraciones de la hemostasia primaria. Así mismo, los trombocitos en las aves tienen gran actividad fagocítica, lo cual es una diferencia importante en comparación con mamíferos, en donde las plaquetas solo están involucradas en el proceso de la coagulación (Campbell, 1995; Espada, 2000).

### **2.1.2 El trombocito y sus alteraciones en hemorragias**

En el síndrome hemorrágico de las aves los trombocitos generalmente son más circulares que los normales y ligeramente vacuolados, además de presentar proyecciones citoplasmáticas, lo cual les permite tener más contacto con la superficie endotelial lesionada, así mismo su agregación mediada por el fibrinógeno y otras sustancias como colágeno, serotonina y ácido araquidónico, provee una importante oclusión para reducir el daño en los vasos sanguíneos (van den Berg, 2000, Barnes, 1996).

### **2.1.3 Hemostasia secundaria aviar normal**

En el mecanismo de coagulación en las aves existen algunas diferencias con respecto a la de los mamíferos, ya que se menciona que el plasma de las aves carece de factor IX (Christmas) y del factor factor XII (Hageman) o bien no se presentan en cantidades significativas (Sturkie, 1986); por otro lado la fisiología de la coagulación sanguínea esta poco estudiada en aves (Espada, 2000).

En los mamíferos, la coagulación es una cascada de reacciones proteolíticas iniciadas en dos vías intrínseca y extrínseca, cuya finalidad es la formación de fibrina insoluble (vía común); en las aves se consideran más importantes la vía extrínseca y común para la formación de esta fibrina insoluble, debido a que carecen de algunos factores ya mencionados los cuales están involucrados en la vía intrínseca de la coagulación (Jain, 1993; Espada, 2000)

## 2.1.4 Hemostasia secundaria aviar y sus alteraciones

Las alteraciones en el mecanismo de la coagulación en las aves traen como consecuencia hemorragias diseminadas; en la infección de la bolsa de Fabricio, se han reportado hemorragias en músculos de aves inoculadas experimentalmente con VIBF y que murieron por diátesis hemorrágica. Estas hemorragias, pueden ser debidas a una CID ocasionando una disminución en los factores II, V y VII de la coagulación (Skeeles, 1980).

En otras enfermedades como en la micotoxicosis en patos, se ha observado tiempo de protrombina prolongado el cual se correlaciona con hipoprotrombinemia e hipofibrinogenemia, mientras que en pollos se induce una depleción de los factores II, VIII y IX. En coccidiosis causada por *Eimeria acervulina*, *E. necatrix* y *E. tenella* pueden inducir una gastroenteritis hemorrágica con una consecuente prolongación del tiempo de protrombina y reducida actividad del factor V (Espada, 2000).

Existen otras enfermedades además de las ya mencionadas, como enteritis hemorrágica por adenovirus en pavos, salmonelosis y virus de laringotraqueítis, que presentan hemorragias, sin embargo la patofisiología de estas ha sido poco estudiada (Riddell, 1999).

Con respecto a los mamíferos, las plaquetas y los factores de coagulación, se activan en los vasos sanguíneos lesionados por cambios estructurales dentro de los mismos y por sustancias liberadas hacia estos como consecuencia del daño tisular. El coagulo de fibrina es formado y se mantiene la integridad vascular y minimiza la pérdida de sangre, este coagulo es modificado por el sistema fibrinolítico y el tamaño del coagulo es controlado por anticoagulantes endógenos, como antitrombina III (Kirby, 2000).

Cuando estos cambios estructurales ocurren en múltiples vasos sanguíneos o cuando sustancias procoagulantes resultan de daño tisular y son liberados en cantidades importantes hacia la circulación, la coagulación ocurre rápidamente, resultando en microtrombos que obstruyen el flujo sanguíneo, denominándose coagulación intravascular diseminada (CID) (Kirby, 2000).

En algunas enfermedades virales, bacterianas y por toxinas en aves, se aprecian microtrombos diseminados, la liberación de mediadores químicos y tromboplastina tisular del tejido necrosado, productos de inflamación y endotoxinas se involucran en la patogénesis de CID (Espada, 2000).

Debido a la poca información del origen de las hemorragias en estas enfermedades, especialmente en IBF, el presente estudio tiene como objetivo determinar si el virus de la cepa 73688, ocasiona lesiones endoteliales y afecta células precursoras de los trombocitos en médula ósea, originando las hemorragias, dado que esta cepa se ha comprobado que ocasiona lesiones en la bolsa de Fabricio como quistes epiteliales, infiltración de células inflamatorias necrosis y hemorragias (Banda, 1996).

## **2.2 Hipótesis**

El virus de la infección de la bolsa de Fabricio infecta los trombocitos y sus precursores en médula ósea, entre otras células provocando una trombocitopenia aguda, lo cual aunado al agotamiento de los factores de la coagulación extrínseca da como consecuencia la presencia de hemorragias diseminadas.

### **2.2.1 Objetivos**

#### **2.2.2 Objetivo general**

Determinar el origen de las hemorragias en la Infección de la bolsa de Fabricio mediante estudios hematológicos, de microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión en riñón, hígado, bazo, bolsa de Fabricio y células hematopoyéticas de médula ósea.

#### **2.2.3 Objetivos particulares**

1. Evaluar el grado de trombocitopenia en aves infectadas con el virus de IBF.
2. Evaluar el agotamiento de factores de la coagulación extrínseca.
3. Evaluar el daño ocasionado en riñón, bazo, hígado, bolsa de Fabricio y células precursoras de los trombocitos en médula ósea, utilizando microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Cepa de VIBF de referencia.**

Se utilizó la cepa 73688 aislada por Banda en 1996, de un brote de IBF en México. Debido a que la cepa se encontraba a -83 C, antes de la inoculación se hicieron 3 pases ciegos en aves susceptibles. Se observaron lesiones a partir del segundo pase en bolsa de Fabricio.

#### **3.2 Animales de experimentación y alojamiento.**

Los estudios se realizaron en aves Leghorn, libres de patógenos específicos (ALPES)\*<sup>1</sup> de 2 semanas de edad y de ambos sexos. Las aves infectadas, así como las aves del grupo control se alojaron en diferentes unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo condiciones controladas y recibieron alimento comercial y agua de bebida a libre acceso.

---

<sup>1</sup> Aves Libres de Patógenos Específicos. S. A. de C. V. Tehuacan, Pue.

### **3.3 Diseño experimental.**

Las aves fueron divididas en dos grupos, Grupo 1: 21 aves infectadas y Grupo 2: 21 aves testigo. El grupo 1 se infectó con una dosis de 0.2 ml de la cepa 73688 del virus de IBF, vía oral y al grupo 2 se le administró 0.2 ml de solución salina fisiológica (SSF), misma vía. Ambos grupos fueron divididos en 7 subgrupos (cada uno con 3 aves), a los cuales se les realizaron muestreos a las 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 horas posinfección (hpi).

Para el estudio hematológico, se obtuvo 1 ml de sangre completa con EDTA (ác. etilendiaminotetracético), para la evaluación del tiempo de protrombina (TP), se obtuvo 1.8 ml de sangre con citrato de sodio al 3.8% en una proporción de 1:9, ambas muestras vía intracardíaca.

Después de la obtención de sangre, las aves se eutanasiaron con Anestésal®(Pfizer), se realizó la necropsia y se obtuvieron muestras para estudio histopatológico y de microscopía electrónica de transmisión.

Durante el período experimental, las aves se observaron dos veces al día, para detectar signología clínica asociada a la enfermedad.

### **3.4 Estudio Hematológico.**

#### **3.4.1 Determinación de hematócrito.**

Se determinó por medio del método de microhematócrito, en donde se llena  $\frac{3}{4}$  partes de un capilar, se centrifuga a 11000 rpm por 5 minutos y se lee en un lector de hematócrito, el resultado se divide entre 100 para obtener el valor en L/L (Campbell, 1995, Benjamín, 1991).

#### **3.4.2 Determinación de hemoglobina.**

Se utilizó el método de cianometahemoglobina, utilizando solución de Drabkin, después de la lisis de eritrocitos se utilizó centrifugación para remover los núcleos, la lectura se realizó en un espectrofotómetro (Ciba-Corning), el valor obtenido se comparó con una tabla de curva de calibración de hemoglobina, el valor se expresa en g/L (Benjamín, 1991).

#### **3.4.3 Conteo de eritrocitos y leucocitos.**

Se utilizó una pipeta para conteo de eritrocitos, utilizando la solución de Natt and Herrick's y un hemocitómetro. El conteo de eritrocitos es igual que en mamíferos y la unidad en la que se expresan es  $\times 10^{12}/L$ , mientras que en los leucocitos el conteo se realiza en todos los cuadrantes del hemocitómetro y el resultado se multiplica por 220 y se divide entre mil, lo que nos da un valor  $\times 10^9/L$  (Campbell, 1995, Latimer, 2000).

#### **3.4.4 Conteo diferencial.**

Se realizó en un frotis teñido con Wright, igual que en mamíferos (Benjamín, 1991).

### **3.4.5 Estimación de trombocitos.**

Se realizó en un frotis utilizando la tinción de Wright, se cuentan 5 campos y el promedio se multiplica por 3.5, el resultado se expresa  $\times 10^9/L$  (Campbell, 1995).

### **3.5 Evaluación de hemostasia secundaria.**

La sangre fue centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos, se separó el plasma y éste se congeló a  $-70^{\circ}C$ , posteriormente se determinó el tiempo de protrombina que evalúa los factores de la coagulación de vía extrínseca, en un coagulómetro (Trombotimer, Organon Teknika).

#### **3.5.1 Obtención de tromboplastina.**

Se utilizan 5 a 6 pollitos de 3 a 4 semanas de edad, se decapitan, se remueven los hemisferios cerebrales inmediatamente, se colocan en un mortero estéril frío y se maceran con acetona helada. Posteriormente se extrae la acetona con una bomba de presión negativa (3 veces). Se deseca el tejido cerebral toda la noche en el mortero. Esto se almacena si no es utilizado inmediatamente a  $-22^{\circ}C$  y dura activo por 17 semanas (Doerr, 1974).

#### **3.5.2 Reconstitución del polvo de tromboplastina.**

Se colocan 2.5 ml de cloruro de calcio al 0.025 M por 50 mg de polvo de cerebro de pollo a  $42^{\circ}C$ . Esta mezcla se incuba por 15 minutos agitando periódicamente, se centrifuga a 18000 rpm por 20 minutos y el sobrenadante se coloca en un tubo de ensaye, se añade un volumen igual de cloruro de calcio al 0.025 M y se mezcla. Esta preparación solo se puede conservar por 6 horas (Doerr, 1974).

El hemograma y tiempo de protrombina se procesaron en el Departamento de Patología: Sección Patología Clínica de la FMVZ, UNAM.

### **3.6 Estudio histológico.**

Se obtuvieron muestras de médula ósea de la porción proximal del fémur, riñón, bazo, hígado y bolsa de Fabricio para ser fijadas en formalina al 10%, amortiguada a pH de 7.2. Todas las muestras fueron incluidas en parafina y cortadas a 4 micrómetros de espesor para su posterior tinción con la técnica de Hematoxilina-Eosina. La evaluación de las lesiones se realizó en un microscopio óptico.

### **3.7 Estudio ultraestructural.**

Para la evaluación en microscopía electrónica se obtuvieron muestras de hígado, bazo, riñón y médula ósea. Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2.5%, amortiguado con cacodilato, pH 7.4 y fueron divididas en secciones de 3 a 5 mm, posfijadas en tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas, deshidratadas en series de concentración creciente de alcoholes e incluidas en Epon 812. Los cortes finos de 60 nm fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo de Reynold para ser observados y fotografiados en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 10.

### **3.8 Análisis Estadístico.**

Para todas las aves de estudio, se tomaron los parámetros del hemograma y tiempo de protrombina, se analizaron con una t de Student, se consideró una significancia estadística con  $P < 0.01$ .

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Signos Clínicos.**

El grupo de aves testigo no presentó signología durante todo el experimento. El signo clínico observado en el grupo infectado a partir de las 72 hpi, fue un ligero erizamiento de plumas, el cual se continuó hasta las 96 hpi.

### **4.2 Evaluación del hemograma y estimación de trombocitos**

De los resultados en el eritrograma (Cuadro 1) en los valores del hematócrito (Gráfica 1), se observó que en las aves infectadas con el VIBF se mantuvo sin cambios, excepto en el muestreo de las 96 hpi, en donde existe disminución. Así mismo los valores de la hemoglobina y de los eritrocitos, presentaron el mismo comportamiento que el hematócrito, encontrándose una diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) solo para los valores de hematócrito y hemoglobina en este muestreo.

Con respecto a los valores de los trombocitos (Cuadro 1), en el grupo de aves infectadas, se presentó una disminución a las 84 hpi (Gráfica 2), sin embargo no se encontró diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) en esta determinación.

En el leucograma (Cuadro 2), se observa que los valores de leucocitos (Gráfica 3), en el grupo de aves infectadas se encuentran incrementados desde las 24 hpi y se mantienen estos hasta las 60 hpi.

Así mismo, los valores de los heterófilos (Gráfica 4), se incrementaron a partir de las 24 hpi hasta las 60 hpi, en el grupo de aves infectadas. Sin embargo, en los incrementos de ambas determinaciones, solo se presentaron diferencias significativas ( $P < 0.01$ ), de las 24 hasta las 48 hpi.

En los valores de linfocitos, se observó un incremento en el grupo de aves infectadas a las 48 y 60 hpi, pero no se encontró diferencia significativa ( $P < 0.01$ ).

Los valores de monocitos, eosinófilos y basófilos no presentaron cambios relevantes en ambos grupos.

#### **4.3 Evaluación de tiempo de protrombina.**

De las 21 muestras de aves infectadas, 3 se coagularon por tanto en este apartado finalmente quedaron 18 muestras para evaluar el tiempo de protrombina.

En el tiempo de protrombina (Cuadro 3), se observó un incremento a partir de las 72 hasta las 96 hpi (Gráfica 5), en el grupo de aves infectadas, encontrándose solo diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) a las 96 hpi.

#### **4.4 Hallazgos en la necropsia.**

En el grupo de aves infectadas se observaron ligeras petequias en hígado y en la bolsa de Fabricio se presentó un ligero aumento de tamaño a partir de las 60 hpi. En riñón, hígado y bazo, no se observaron lesiones macroscópicas aparentes.

#### **4.5 Estudio histológico**

##### **4.5.1 Bolsa de Fabricio.**

A las 24 hpi en el grupo de aves infectadas se observó la presencia de pequeños quistes epiteliales multifocales, algunas zonas de necrosis intrafolicular, infiltración de células mononucleares en el intersticio de las plicas bursales en grado ligero y edema intrafolicular, así como necrosis linfocitaria discreta.

A las 36 y 48 hpi, se presentó necrosis linfocitaria difusa severa y proliferación epitelial multifocal con infiltración de células mononucleares y heterófilos en el intersticio de las plicas bursales.

A las 60 y 72 hpi (Fig. 3), se observó una depleción linfocitaria folicular difusa severa, infiltración de células mononucleares y heterófilos en el intersticio de las plicas bursales, proliferación de tejido conectivo fibroso difuso severo, y presencia de epitelio adenoide, así como quistes epiteliales multifocales.

En las 84 y 96 hpi (Fig.4), se caracterizó por una atrofia de folículos linfoides, infiltración de heterófilos y células mononucleares en el intersticio de las plicas bursales, proliferación de tejido conectivo fibroso en abundante cantidad, con presencia de quistes foliculares multifocales y epitelio adenoide.

#### **4.5.2 Riñón.**

A partir de las 48 hpi, se observó infiltrado intersticial multifocal ligero de células mononucleares (Figura 5), principalmente en zonas perilobulares, así mismo se encontró degeneración hidrópica y necrosis de células epiteliales de túbulos contorneados distales y proximales (Figura 6).

#### **4.5.3 Bazo.**

Depleción linfocitaria difusa de grado entre ligero y moderado, así como una moderada congestión a partir de las 24 hpi.

#### **4.5.4 Otros.**

En hígado y en médula ósea, del grupo de aves infectadas no se observaron lesiones histológicas. Así mismo, en el grupo de aves testigo no se observaron lesiones en bazo, hígado, bolsa de Fabricio, médula ósea y riñón.

#### **4.6 Estudio ultraestructural**

En las aves del grupo testigo, no se presentaron cambios y en el grupo de aves infectadas en bazo, hígado y médula ósea, tampoco se presentaron lesiones.

En riñón a partir de las 24 hpi (Fig. 7), en el grupo de aves infectadas se observó degeneración de células endoteliales de vasos peritubulares, las cuales presentaron edema perinuclear y pérdida del citoplasma.

A las 48 hpi se observó (Fig. 8) se aprecia una intensa vacuolización de las células epiteliales de los túbulos, en la zona basal adyacente al capilar peritubular que difieren en su posición de las vacuolas apicales normales, sugiriendo un cambio degenerativo celular. En glomérulo renal (Fig. 9), se observó una fusión de los procesos citoplasmáticos de los podocitos y degeneración hidrópica de las células endoteliales.

A las 72 hpi, en túbulo proximal (Fig. 10) se observaron escasas vacuolas apicales sugiriendo una menor actividad de endocitosis y se aprecia una mayor degeneración vacuolar del citoplasma basal adyacente al capilar peritubular. Las lesiones en glomérulos fueron las mismas a partir de las 48 hpi.

## 5. DISCUSIÓN

La infección de la bolsa de Fabricio es una enfermedad importante, debido al estado de inmunosupresión que ocasiona en las aves y como consecuencia que éstas sean más susceptibles a otras enfermedades virales, bacterianas o parasitarias. Por otro lado, al ser una enfermedad que ocasiona hemorragias diseminadas, su estudio en este aspecto es valioso, ya que existe poca información al respecto.

El erizamiento de plumas observado en el grupo de aves infectadas, corresponde con lo informado en la literatura (Ley, 1983; van den Berg, 2000, McFerran, 1993). Es importante mencionar que la diferencia en la presentación de signos clínicos varía con la patogenicidad de la cepa del VIBF y el tiempo que se mantuvieron las aves en estudio, sin embargo Banda, (1996), tampoco encontró signología ni mortalidad asociada a la enfermedad a pesar de tener lesiones histológicas marcadas en la bolsa de Fabricio, causadas por la misma cepa, lo que sugiere que la cepa utilizada no es altamente patógena.

Con los resultados del hemograma en este estudio en lo que corresponde a hematócrito, eritrocitos y hemoglobina, no existieron cambios relevantes. La disminución que se presentó en el último muestreo en el hematócrito y hemoglobina, no llega a ser un cuadro de anemia, por lo tanto no se consideró un cambio importante en las aves infectadas. Se ha descrito, que cepas patógenas del VIBF inducen severa depleción de células hematopoyéticas en médula ósea (Inoue, 1999), debido a que el virus se replica en las células precursoras de la serie mieloide, lo que hace suponer que las aves presentan cuadros de leucopenia y heteropenia (Craig, 1980, Tsukamoto, 1995). Sin embargo no hay estudios específicos en lo relacionado a células hematopoyéticas eritroides, para considerar que el virus provoque en las aves una anemia, por destrucción de estas células precursoras.

Los trombocitos en las aves intervienen en los procesos de la coagulación, lo que hace suponer que cuando las aves infectadas con el VIBF presentan coagulopatías, debido a una trombocitopenia como consecuencia de un secuestro al desencadenarse CID, no hay reportes en donde se mencione que el virus ocasione daño a las células precursoras de trombocitos (tromboplastos), por lo tanto la trombocitopenia que se reporta en un estudio (Okoye, 1984), la cual se ha observado en aves infectadas con VIBF a los 2 y 3 días posinfección, se asocia al consumo en las hemorragias que se presentan en esta enfermedad.

En este estudio en los valores de trombocitos no se observó una disminución por lo tanto, no se presentó una trombocitopenia, esto se asocia a que la cepa 73688 utilizada no ocasionó cuadros de hemorragias y tampoco lesiones en tromboplastos en las aves infectadas, Okoye es el único autor que menciona trombocitopenia, sin embargo no menciona la cepa utilizada y por otro lado no hay otros estudios que mencionen este hallazgo en aves infectadas con el VIBF.

Al incremento de los leucocitos circulantes se le denomina leucocitosis, esta puede ser asociada a la liberación de catecolaminas o corticosteroides, denominándose leucocitosis fisiológica. Por otro lado, esta leucocitosis se asocia más frecuentemente a procesos de inflamación, lo cual ocurre principalmente en muchas enfermedades infecciosas en las aves, esta leucocitosis se da principalmente por un incremento de heterófilos (heterofilia), lo cual representa una respuesta inflamatoria inicial a un proceso patológico ocasionado por bacterias, hongos, virus, toxinas o parásitos (Campbell, 1995, Latimer, 2000).

En aves infectadas con el VIBF, se ha reportado leucocitosis por heterofilia a los 5 días posinfección (Okoye, 1984). En el presente estudio se observó una leucocitosis por heterofilia a las 24 y 60 hpi, la cual se relaciona con el proceso infeccioso inicial en las aves infectadas. La diferencia en la presentación de los cambios leucocitarios puede deberse principalmente al tipo de cepa utilizada en los diferentes estudios, sin embargo Okoye no menciona el tipo de cepa utilizada.

Al incremento de los linfocitos se le denomina linfocitosis, esta se presenta de manera secundaria a una estimulación antigénica, observada comúnmente en aves que tienen infecciones crónicas causadas por agentes virales o bacterianos (Campbell, 1995, Latimer, 2000), en este estudio se observó un incremento en los valores de linfocitos, sin embargo al no existir diferencias significativas no se considera una linfocitosis, lo cual puede estar asociado a que en las aves infectadas con esta cepa, no se presentó una infección crónica.

Para la evaluación de la hemostasia secundaria se requiere determinar los tiempos de coagulación como son: el tiempo de protrombina que evalúa la vía extrínseca de la coagulación y el tiempo de tromboplastina parcial, el cual evalúa la vía intrínseca. Como se mencionó anteriormente, en las aves la evaluación de la vía extrínseca es la más importante, debido a que carecen de algunos factores de la vía intrínseca como el factor IX y XII o se presentan en pequeña cantidad (Sturkie, 1986).

En aves sanas, se considera que los valores normales del tiempo de protrombina son menores a 12 segundos (Sturkie, 1986). En las aves que presentan enfermedades virales o bacterianas, que alteren el sistema de la coagulación, el tiempo de protrombina estará prolongado (Espada, 2000).

En aves infectadas con el VIBF se presentan hemorragias, las cuales se ha reportado que son debidas a deficiencias de los factores de la coagulación, específicamente los factores II, V y VII (Skeeles, 1980). En este estudio el tiempo de protrombina se prolongó en el grupo de aves infectadas a partir de las 72 hpi, sin embargo solo hasta las 96 hpi es significativo, por lo tanto a partir de este muestreo se consideró que el tiempo de protrombina está prolongado en estas aves, lo cual esta asociado a que existe un posible agotamiento de los factores de la coagulación de la vía extrínseca de manera incipiente, por lo cual no se vio reflejado con la presencia de hemorragias, así mismo debido a que no se presentó trombocitopenia en las aves infectadas y que los muestreos solo se realizaron hasta las 96 hpi, no hubo evidencias macroscópicas y microscópicas de alteraciones en la coagulación.

Quiao, 1997, reportó un tiempo de protrombina prolongado solo a las 24 y 48 hpi, utilizando aves de 50 días de edad, y evaluando sólo hasta las 72 hpi, sin embargo en esta investigación no se encontraron diferencias significativas. En otro estudio (Skeeles, 1980), se encontró tiempo de protrombina prolongado al tercer día posinoculación en aves de 42 días de edad, infectadas con el VIBF, encontrando diferencias significativas.

La variación de resultados en otras investigaciones y las encontradas en este estudio, podría estar asociado a la edad de las aves, a la cantidad de inóculo, tipo de cepa utilizada y a los tiempos en los que se realizaron las evaluaciones, ya que en otros estudios mencionados solo evaluaron hasta las 72 hpi, mientras que en este estudio las diferencias significativas se observaron hasta las 96 hpi.

Con respecto a los cambios histopatológicos que se observaron en la bolsa de Fabricio en el grupo de aves infectadas, concuerda con lo reportado por otros autores, en donde se han observado lesiones después de un día posinfección (Okoye, 1984), con presencia de necrosis cortical de linfocitos y depleción medular e infiltrado de células inflamatorias (Hiraga, 1994; Ley, 1983). Todas estas lesiones son debidas a la rápida replicación del virus, lo que ocasiona la destrucción de células linfoides con la consecuente inmunodepresión que sufren las aves, haciéndolas más susceptibles a otras enfermedades.

Así mismo, los cambios histopatológicos que se presentan en la bolsa de Fabricio desde las 24 hpi, coinciden con la leucocitosis por heterofilia que se presenta en el grupo de aves infectadas, como una respuesta inflamatoria inicial ocasionada por el virus.

El bazo se considera un tejido linfoide secundario en las aves, y por lo tanto es un órgano en donde el VIBF también se replica, ocasionando depleción linfocitaria e infiltrado de heterófilos y macrófagos (Hiraga, 1994; Ley 1983). Con respecto a los cambios encontrados en bazo en este estudio, en el grupo de aves infectadas concuerda con la literatura, solo que las lesiones histopatológicas fueron de grado ligero, esto es asociado a que el tipo de cepa utilizada no fue tan agresiva, para que ocasionara lesiones severas en bazo o incluso lesiones en otros órganos como hígado y médula ósea, en este estudio.

El riñón es un órgano en el cual el VIBF provoca lesiones como necrosis tubular, edema y un ocasional infiltrado de células mononucleares (Ley, 1983). Las lesiones observadas en este estudio en el grupo de aves infectadas coinciden con lo reportado en la literatura, sin embargo estas fueron lesiones de grado ligero por lo tanto no provocó alteración en la función renal. Esto puede ser relacionado al tiempo en el que se hicieron los muestreos, ya que algunos autores reportan lesiones histopatológicas de moderadas a severas a partir de los 6 y 7 días posinfección (Chen, 1997; Ley, 1983).

Existen pocos estudios en donde se evalúe el riñón por medio de microscopia electrónica de transmisión en aves infectadas con el VIBF. Puette, 1994 realiza un estudio para comparar ultraestructuralmente, riñones normales y afectados por diferentes etiologías, en donde observó por medio de microscopia electrónica de transmisión una glomerulonefritis, en las aves que presentaron lesiones histopatológicas asociadas a un proceso de inflamación, sin embargo no se incluye en este estudio aves que presentaran lesiones específicas por el VIBF.

Long-Ta, 1996 reporta lesiones por medio de microscopía electrónica de transmisión en aves infectadas con el VIBF, en donde observó necrosis de células, en órganos como riñón, hígado y bazo a las 12 y 24 hpi. En este estudio las lesiones que se observaron en riñón a partir de las 24 hpi, en el grupo de aves infectadas, sugiere una glomerulonefritis ya que se presentaron lesiones en glomérulos y túbulos proximales, en donde se aprecia daño endotelial. Estas lesiones ocasionadas por el VIBF, fueron de grado ligero, por lo tanto no existió daño en la función renal de las aves infectadas, esto podría estar asociado a que el tipo de cepa utilizada en este estudio no fue de alta patogenicidad y que probablemente el período de evaluación de las lesiones en este órgano fue hasta las 96 hpi.

Es importante mencionar que el daño endotelial que se encontró en el riñón de las aves infectadas por el VIBF en este estudio, no había sido reportado por otros autores, así mismo que este daño fue manifiesto desde las primeras horas posinfección y que probablemente con el tiempo esto podría ocasionar alteraciones en la función renal de las aves.

Por otro lado, esto podría sugerir que si la cepa utilizada del VIBF en este estudio ocasionó lesión endotelial en riñón, es probable que las cepas altamente patógenas del VIBF ocasionen lesiones endoteliales en otros órganos, lo que conllevaría a una activación en la cascada de la coagulación y así desencadenar una coagulación intravascular diseminada, presentándose las hemorragias diseminadas que se describen en esta enfermedad, por lo tanto esto es un nuevo aporte en la patogénesis del VIBF.

Existen estudios en mamíferos con enfermedades virales que ocasionan lesión endotelial contribuyendo a alteraciones en la coagulación, por ejemplo el virus de la fiebre porcina clásica (Calderón, 1998) y el virus de hepatitis infecciosa canina (Holloway, 2000), entre otros, son virus que ocasionan lesión endotelial, contribuyendo a las hemorragias que se presentan en estas enfermedades, sin embargo en aves, no existen estudios en donde se evalúe específicamente lesión endotelial y que involucren cepas altamente patógenas, y además son muy pocos los estudios que se enfoquen a las alteraciones hemostáticas que se presentan en esta enfermedad.

## 6. CONCLUSIONES

1. Los hallazgos encontrados en este estudio demuestran que el VIBF de la cepa 73688, no ocasionó daño en precursores hematopoyéticos eritroides y mieloides en médula ósea, por lo cual no se presentó anemia y leucopenia, en las aves infectadas.
2. El VIBF de la cepa 73688, no provocó alteraciones en la hemostasia primaria por lo que no se presentó una trombocitopenia, dado que no existió daño en los tromboplastos, precursores de los trombocitos.
3. El tiempo de protrombina prolongado que se presentó en este estudio a las 96 hpi, sugiere un agotamiento inicial de los factores de la coagulación, por lo tanto la cepa 73688 afecta a la hemostasia secundaria, sin embargo al ser de manera inicial no fue suficiente para desencadenar hemorragias diseminadas en estas aves.
4. Se corroboró histopatológicamente que el VIBF de la cepa 73688, provocó lesiones en la bolsa de Fabricio, en el grupo de aves infectadas y que en otros órganos existieron lesiones de grado ligero como en riñón y bazo, mientras que en otros como médula ósea e hígado no existieron lesiones, por lo que se concluye que esta cepa no es altamente patógena.
5. Las lesiones en riñón observadas por microscopía electrónica de transmisión en las aves infectadas, sugieren glomerulonefritis, así mismo el daño endotelial que se observó puede sugerir que es uno de los desencadenantes en la alteración en el mecanismo de la coagulación y por lo tanto la causa de las hemorragias diseminadas que se reportan en las aves infectadas con el VIBF.

## 7. LITERATURA CITADA

Tsukamoto, K., Tanimura, N., Mase, M. and Imai, K. Comparison of virus replication efficiency in lymphoid tissues among three infectious bursal disease virus strains. 1995; 39:844-852.

Ley, D.H.; Yamamoto, K. and Bickford, A.A. The pathogenesis of infectious bursal disease: serologic, histopathologic, and clinical chemical observations. 1983; 54:425-436.

Okoye, J.O.A. Infectious bursal disease of chickens. 1984; 54:425-436.

Van den Berg, T.P. Acute infectious bursal disease in poultry: A review. 2000; 29:175-179.

McFerran, J.B. and McNulty, M.S. Virus Infections of Birds. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam 1993, (pp 213-228).

Lukert, P.D. and Saif, M. In: Calnek, B.W. Diseases of poultry. Tenth edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 1997: 721-738.

Sharma, J.M., Dohms, J.E. and Metz, A.L. Comparative Pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of Infectious Bursal Disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of Specific-Pathogen-Free Chickens. Avian Diseases. 1989; 33:112-124.

Confer, A.W. and MacWilliams, S.P.: Correlation of hematological changes and serum and monocyte inhibition with the early suppression of Phytohemagglutinin stimulation of lymphocytes in experimental Infectious Bursal Disease. Can. J. comp. Med. 1982; 46:169-175.

McIlroy, S.G.; Goodall, E.A. and McCracken, P.M.: Economic effects of subclinical infectious bursal disease on broiler production. *Avian Pathology*. 1989; 18:465-480.

Banda, C.A.: Obtención, serotipificación y caracterización de la virulencia de tres aislamientos de campo del virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio (VIBF) en México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 1996.

Correa, G.P.: Algunos aspectos de la nefrosis aviaria y de la enfermedad producida por el agente infeccioso de la Bolsa de Fabricio en México. *Téc. Pec. En México*. 1969. 98-104.

ANECA – SARH. Situación epidemiológica de las principales enfermedades de las aves en México. XVIII Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (Memorias) Cancún, Q.R. 362-385. ANECA, México. 1993.

Lasher, H.N. and Shane S.M.: Infectious bursal disease. *World's Poultry Science Journal*. 1994; 50:133-166.

Sharma, JM; Kim, IJ; Rautenschelein, S; Yeh, HY: Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Development and Comparative Immunology*. 2000; 24:223-235.

Skeeles, J.K.; Slavick, M.; Beasley, J.N.; Brown, A.H. and Meinecke, C.F. An age-related Coagulation Disorder Associated with Experimental Infection with Infectious Bursal Disease Virus. *Am. J. Vet. Res.* 1980; 41:1458-1461.

Craig, W.H., Brewer, R.N. and Allen, E. Studies on infectious bursal disease in chickens. 2. Scoring microscopic lesions in the bursa of fabricius, thymus, spleen, and kidney in gnotobiotic and battery reared white Leghorns experimentally infected with Infectious Bursal Disease Virus. *Poultry Science*. 1980; 59:1006-1017.

Chen, BY and Ictakura, C: Histopatology and immunohistochemistry of renal lesions due to avian infectious bronchitis virus in chicks uninoculated and previously inoculated with highly virulent infectious bursal disease virus. *Avian Pathology*. 1997; 26:607-624.

Inoue, M., Fujita, A. and Maeda, K. Lysis of mielocitos in chickens infected with Infectious Bursal Disease Virus. *Vet. Pathol*. 1999; 36:146-151.

Galindo, M.F.: Patogénesis de las hemorragias en la enfermedad de Newcastle. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2001.

Easterday, B.C., Hindshaw, V.S. and Halvorson, D.A. In: Calnek, B.W. *Diseases of poultry*. Tenth edition. Iowa State University Press, Amex, Iowa, USA. 1997: 583-605.

Ficken, M.D. In: Ridell, C.: *Avian Histopathology*. American 2<sup>nd</sup> ed. Pennsylvania: Association of Avian Pathologists. 1996:89-109.

Von Bülow, V. and Schat, K.A. In: Calnek, B.W. *Diseases of poultry*. Tenth edition. Iowa State University Press, Amex, Iowa, USA. 1997: 739-756.

Barnes, H.J. In: Ridell, C.: *Avian Histopathology*. American 2<sup>nd</sup> ed. Pennsylvania: Association of Avian Pathologists. 1996:1-16.

Bagust, F.J. and Guy, J.S. In: Calnek, B.W. *Diseases of poultry*. Tenth edition. Iowa State University Press, Amex, Iowa, USA. 1997: 527-539.

McFerran, J.B. In: Calnek, B.W. *Diseases of poultry*. Tenth edition. Iowa State University Press, Amex, Iowa, USA. 1997: 607-620.

Nam-Yong, P. Disseminated intravascular coagulation in experimental fowl cholera of chickens. *Korean J. Vet. Res*. 1982; 22:211-219.

Glisson, J.R. In: Calnek, B.W. Diseases of poultry. Tenth edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 1997: 143-159.

McDougald, L.R. In: Calnek, B.W. Diseases of poultry. Tenth edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 1997: 865-883.

Goodwin, M.A. In: Ridell, C.: Avian Histopathology. American 2<sup>nd</sup> ed. Pennsylvania: Association of Avian Pathologists. 1996:111-141.

Hoerr, J.F. In: Calnek, B.W. Diseases of poultry. Tenth edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 1997: 951-978.

Campbell, T.W. Avian Hematology and Cytology. Second edition. Iowa State University Press/Ames. 1995.

Espada, I. In: Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and Jain, N.C. Schalm's. Veterinary Hematology. Fifth edition. Lippincott Williams and Wilkins. 2000: 552-555:

Sturkie, D.P., Griminger, P. Body fluids: blood. In: Sturkie, D.P. editor. Avian Physiology. New York. Springer-verlag. 1986, 102-129.

Jain, N.C.: Essentials of veterinary hematology. Lea and Febiger. Pennsylvania, USA. 1993.

Ridell, C.: Avian Histopathology. American 2<sup>nd</sup> ed. Pennsylvania: Association of Avian Pathologists. 1996.

Kirby, R. and Rudloff, E. In: Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and Jain, N.C. Schalm's. Veterinary Hematology. Fifth edition. Lippincott Williams and Wilkins. 2000: 581-587.

Benjamín, M.M. Manual de Patología Clínica en Veterinaria. Limusa. 1991.

Latimer, K.S. and Bienzle, D. In: Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and Jain, N.C. Schalm's. Veterinary Hematology. Fifth edition. Lippincott Williams and Wilkins. 2000: 417-432.

Doerr, J.A., Wyatt, R.D. and Hamilton, P.B.: Investigation and Standardization of Prothrombin Times in Chickens. Poultry Science. 1975; 54: 969-980.

Qiao, J.; Hu, L.S.; Chen, M.Y. and Zhao, L.H: Studies on blood coagulation dynamics in experimental infectious bursal disease. Acta Vet. et Zoot. Sin. 1997; 28:444-447.

Hiraga, M., Nunoya, T.; Otaki, Y.; Tajima, M.; Saito, T. And Toshihiro, N.: Pathogenesis of highly virulent infectious bursal disease virus infection in intact and bursectomized chickens. J. Vet. Med. Sci. 1994, 56:1057-1063.

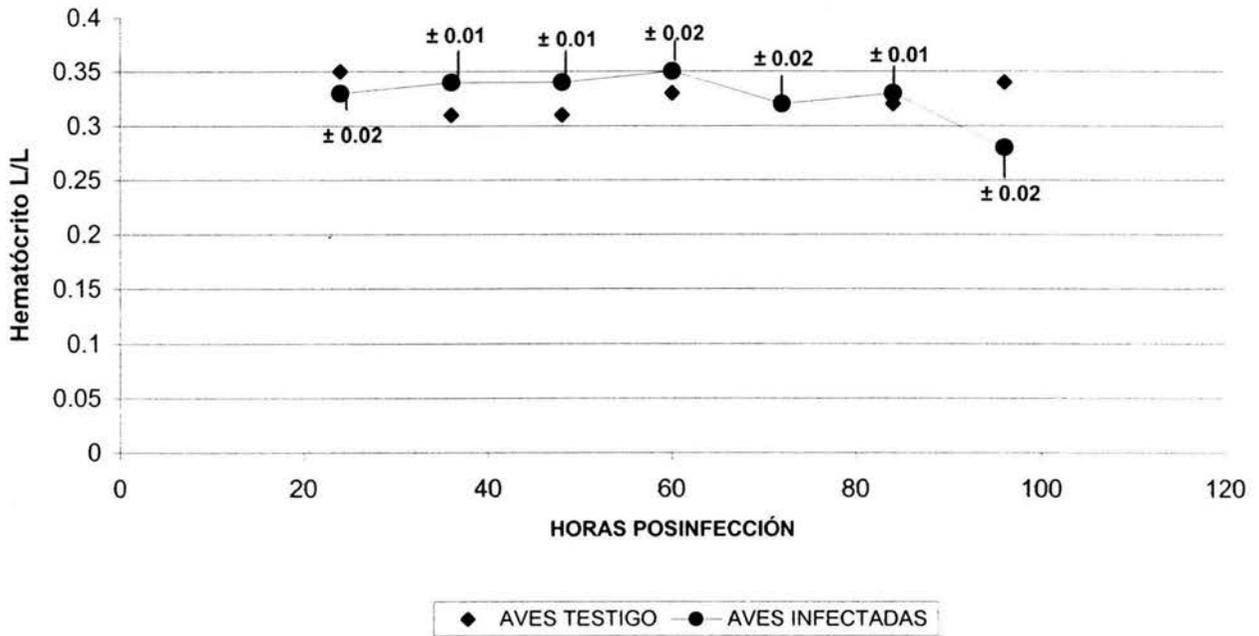
Puette, M., Crowell, A. and Hafner, W.S.: Ultrastructural examination and cell count determinations of avian glomeruli from grossly normal and grossly swollen kidney of broilers at slaughter. Avian Diseases. 1994; 38:515-522.

Long-Ta; Cheng-XZ; Zhao-S: Pathological dynamics observations of infectious bursal disease in chicks. Chinese J. of Vet. Sci. and Tech. 1996; 26:22-23.

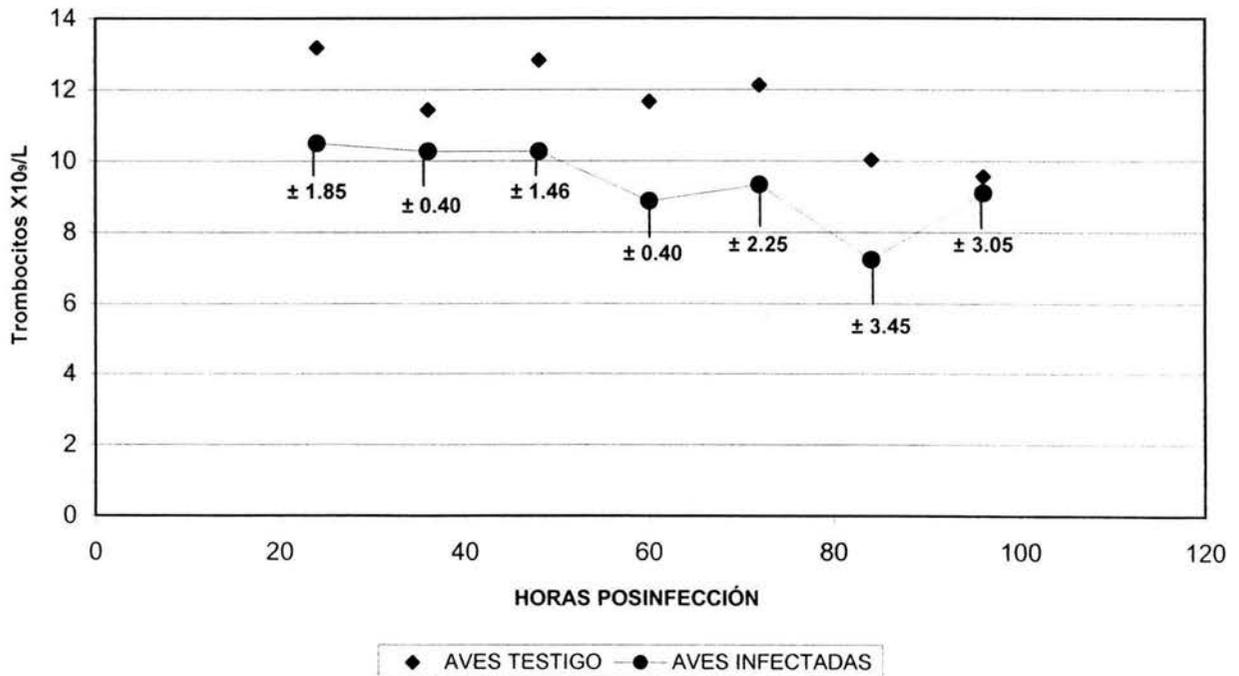
Calderón, A.N.: Patogénesis de la diátesis hemorrágica en la fiebre porcina clásica aguda. México, 1998. (Tesis Doctorado, FMVZ-UNAM).

Holloway, S.A. In: Day, M, Mackin, A. and Littlewood, J. Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine. British Small Animal Veterinary Association. 2000:253-260.

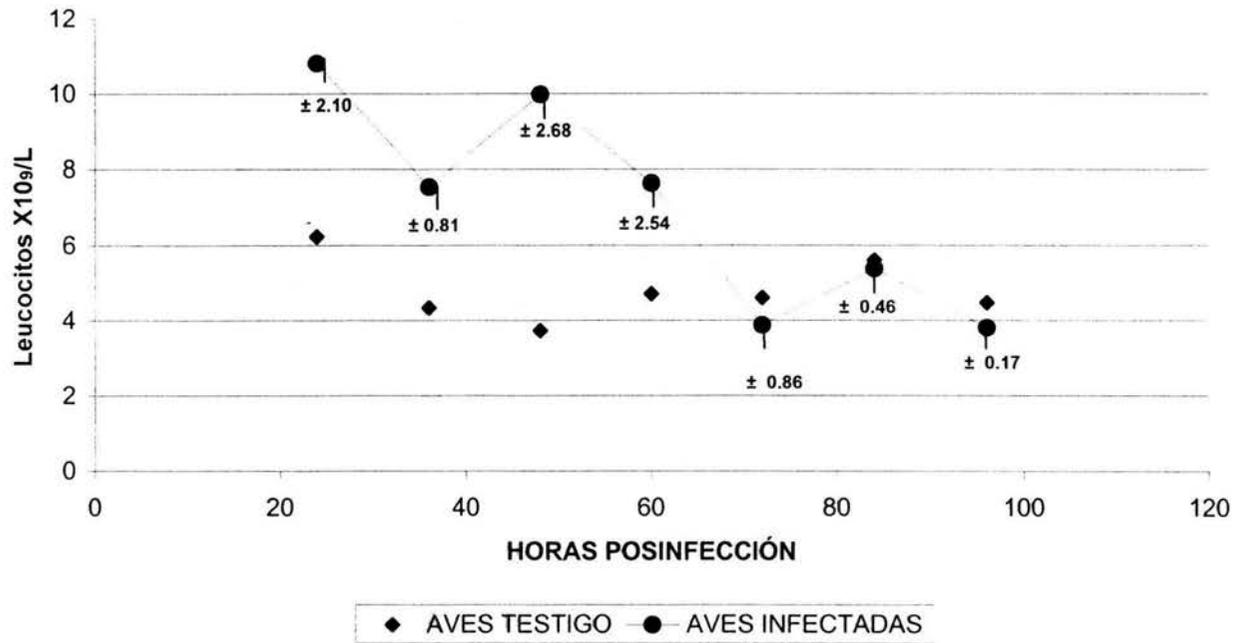
**GRÁFICA 1. PROMEDIO DE HEMATÓCRITO DE AVES TESTIGO Y AVES INFECTADAS CON LA CEPA 73688 DEL VIBF**



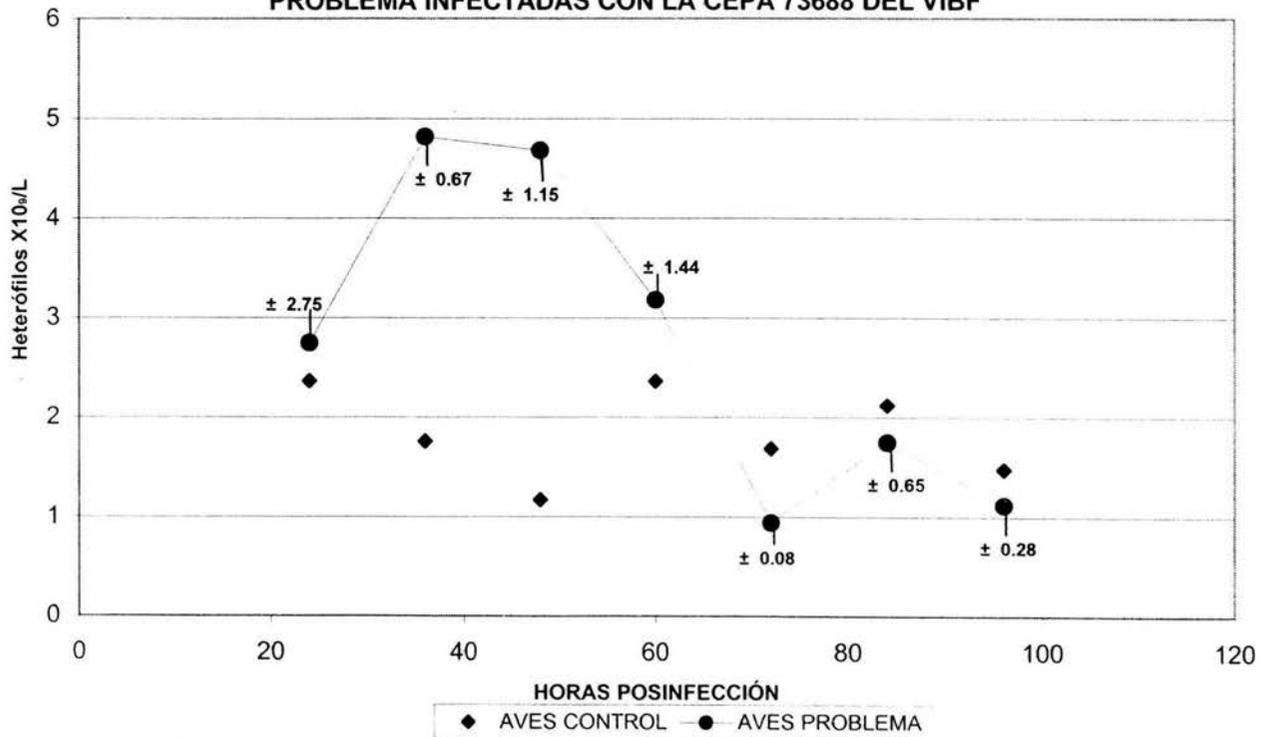
**GRÁFICA 2. PROMEDIO DE TROMBOCITOS DE AVES TESTIGO Y AVES INFECTADAS CON LA CEPA 73688 DEL VIBF**



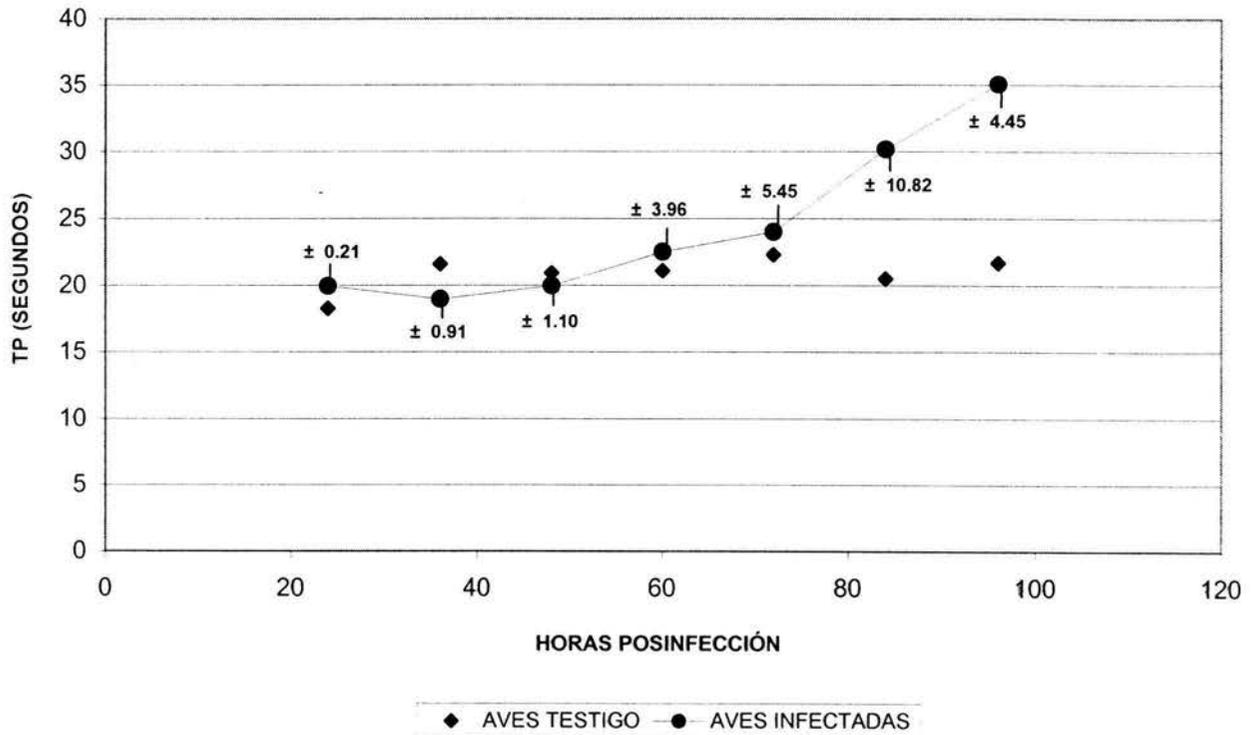
**GRÁFICA 3. PROMEDIO DE LEUCOCITOS DE AVES TESTIGO Y AVES INFECTADAS CON LA CEPA 73688 DEL VIBF**



**GRÁFICA 4. PROMEDIO DE HETERÓFILOS DE AVES CONTROL Y AVES PROBLEMA INFECTADAS CON LA CEPA 73688 DEL VIBF**



GRÁFICA 5. PROMEDIO DE TIEMPO DE PROTROMBINA (TP) DE AVES TESTIGO Y DE AVES INFECTADAS CON LA CEPA 73688 DEL VIBF



**Cuadro 1. Valores promedio y desviación estándar, del eritrograma y trombocitos de aves testigo y aves infectadas con la cepa 73688 del VIBF**

	HPI	Hematócrito L/L	Hemoglobina g/L	Eritrocitos X10 <sup>12</sup> /L	Trombocitos X10 <sup>9</sup> /L
Grupo de aves testigo  n = 21	24	0.35 ± 0.04	102.0 ± 14.53	2.00 ± 0.21	13.18 ± 5.56
	36	0.31 ± 0.01	102.0 ± 9.54	1.97 ± 0.15	11.43 ± 2.25
	48	0.31 ± 0.02	101.0 ± 6.93	1.67 ± 0.29	12.83 ± 2.91
	60	0.33 ± 0.01	94.0 ± 9.64	2.00 ± 0.52	11.67 ± 2.25
	72	0.32 ± 0.01	105.0 ± 0.06	1.95 ± 0.22	12.13 ± 0.81
	84	0.32 ± 0.01	106.0 ± 5.57	1.73 ± 0.35	10.03 ± 1.07
	96	0.34 ± 0.02	112.0 ± 6.93	1.80 ± 0.26	9.57 ± 1.07
Grupo de aves infectadas  n = 21	24	0.33 ± 0.02	96.67 ± 3.51	2.27 ± 0.15	10.50 ± 1.85
	36	0.34 ± 0.01	92.33 ± 8.02	2.07 ± 0.21	10.27 ± 0.40
	48	0.34 ± 0.01	96.67 ± 3.51	2.24 ± 0.32	10.27 ± 1.46
	60	0.35 ± 0.02	104.00 ± 6.24	2.10 ± 0.20	8.87 ± 0.40
	72	0.32 ± 0.02	91.00 ± 3.46	2.33 ± 0.06	9.33 ± 2.25
	84	0.33 ± 0.01	94.33 ± 10.21	1.88 ± 0.13	7.23 ± 3.45
	96	<b>0.28 ± 0.02</b>	<b>70.00 ± 21.66</b>	1.76 ± 0.31	9.10 ± 3.05

Diferencia significativa (P<0.01)

**Cuadro 3. Valores promedio y desviación estándar, del tiempo de protrombina de aves testigo y aves infectadas con la cepa 73688 del VIBF**

	HPI	Tiempo de Protrombina
Grupo de aves testigo n = 21	24	18.27 ± 1.44
	36	21.60 ± 2.08
	48	±20.93 ± 3.13
	60	21.10 ± 1.08
	72	22.30 ± 2.10
	84	20.50 ± 3.41
	96	21.70 ± 3.70
Grupo de aves infectadas n = 18	24	19.95 ± 0.21
	36	18.97 ± 0.91
	48	19.97 ± 1.10
	60	22.53 ± 3.96
	72	24.00 ± 5.45
	84	30.15 ± 10.82
	96	<b>35.05 ± 4.45</b>

**Diferencia significativa (P<0.01)**

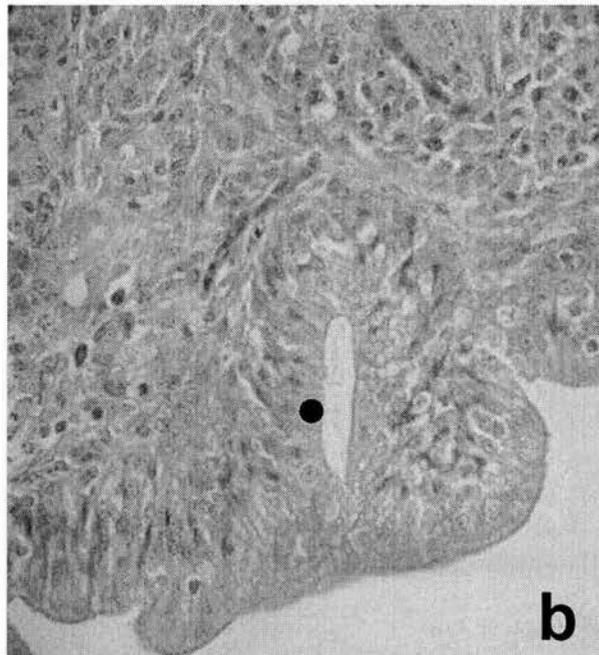
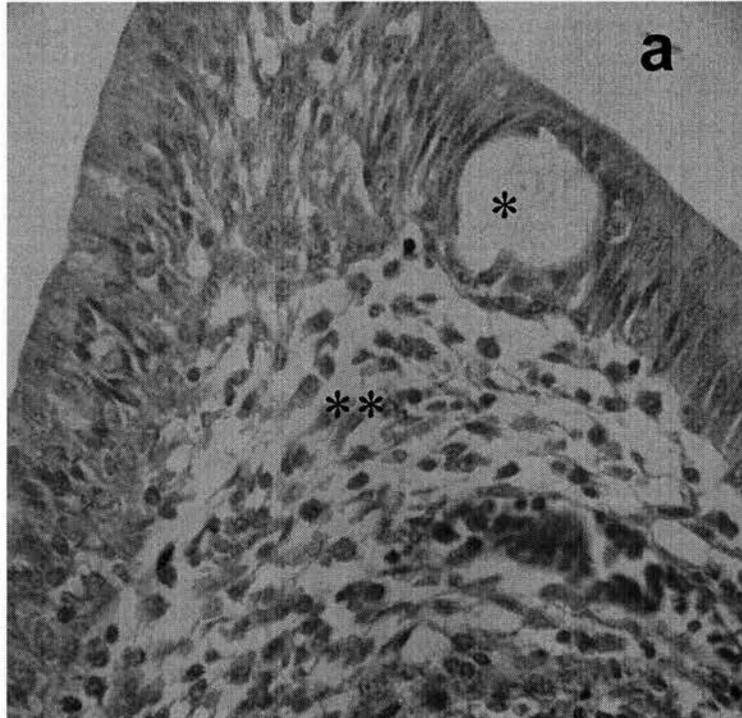


Fig. 3. a) Lesiones de bolsa de Fabricio de ave infectada a las 60 hpi. Quistes epiteliales (\*), infiltrado de mononucleares y heterófilos (\*\*). b) Bolsa de Fabricio a las 72 hpi. Presencia de epitelio adenoide (•).

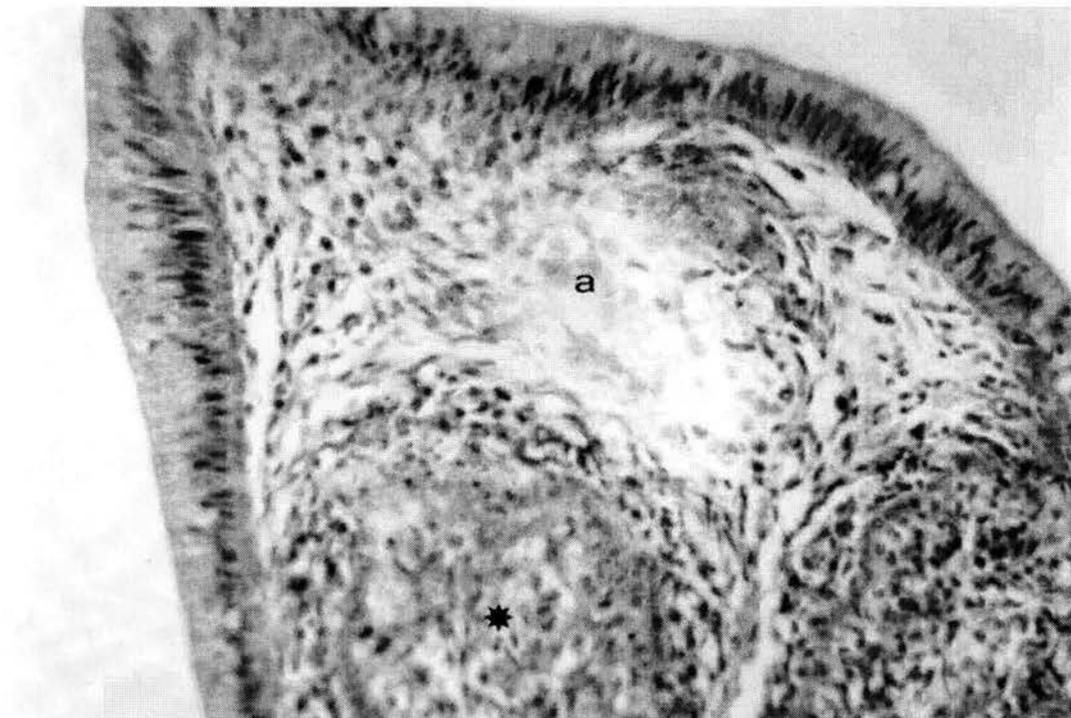


Fig. 4. Bolsa de Fabricio de ave infectada a las 96 hpi. Atrofia folicular (\*) e infiltrado de células mononucleares, proliferación de tejido conectivo fibroso (a).

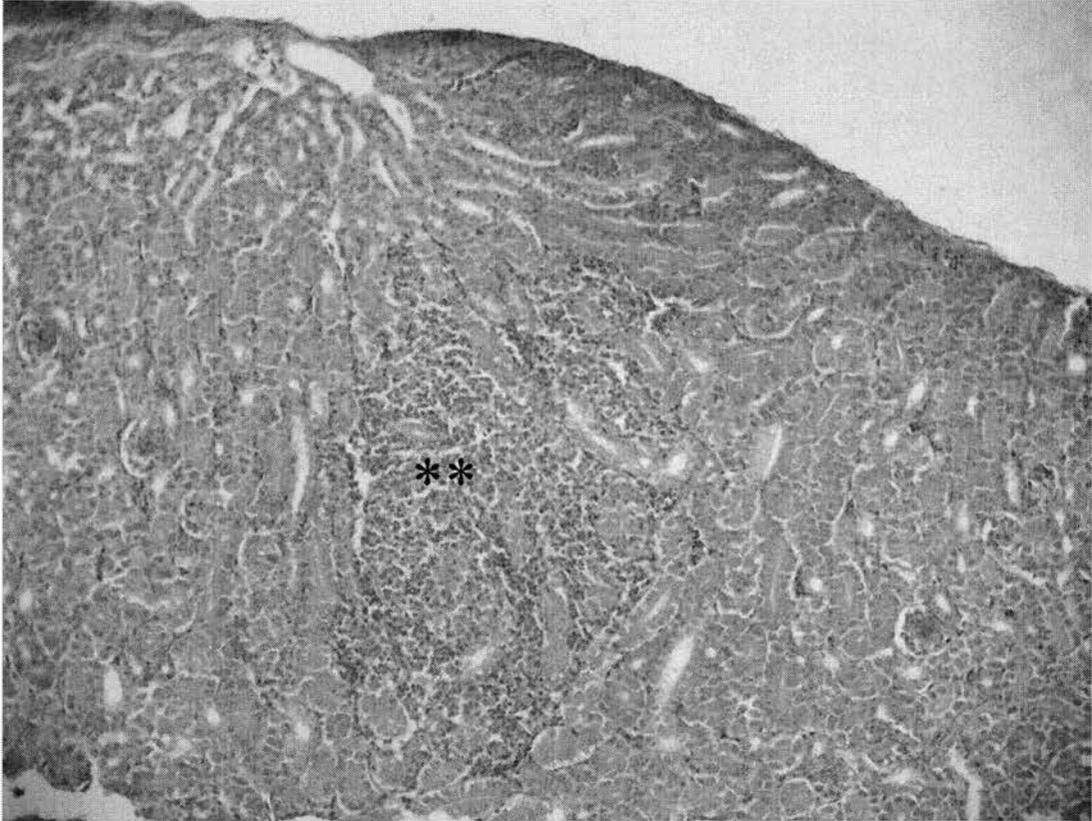


Fig. 5. Riñón de ave infectada a las 48 hpi. Se observa infiltrado focal de células mononucleares (\*\*).

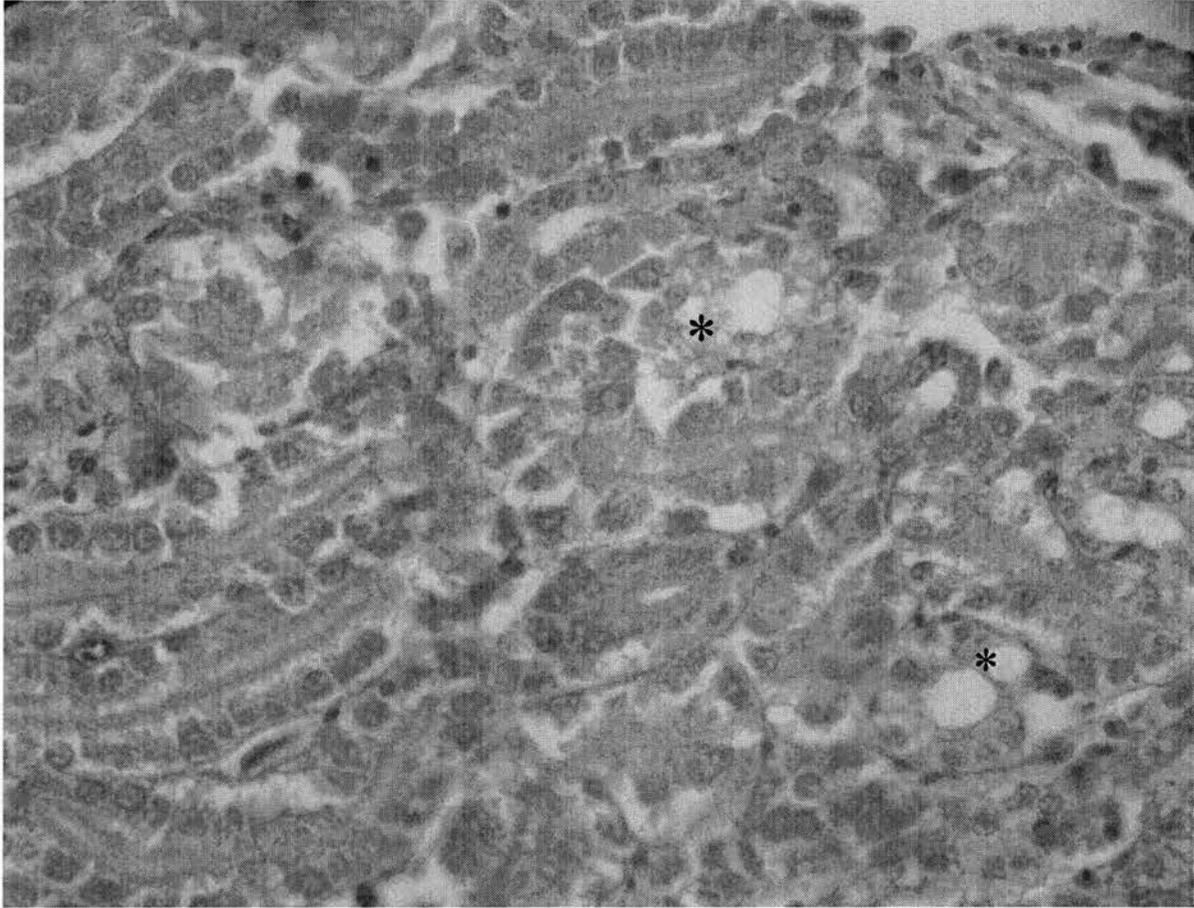


Fig. 6. Riñón de ave infectada a las 48 hpi. Se observa necrosis y degeneración hidrópica (\*) de células epiteliales de túbulo proximales y distales.

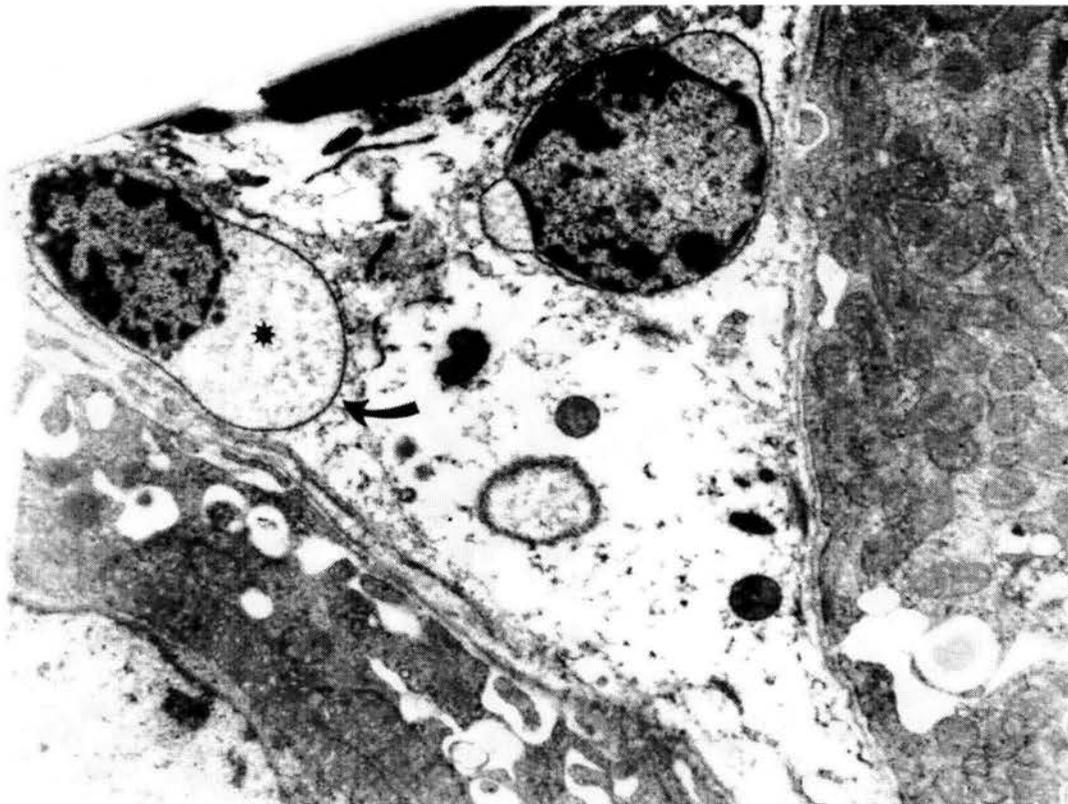


Fig. 7. Túbulo proximal de riñón de ave infectada a las 24 hpi. Se observa degeneración de células endoteliales (flecha) de vasos peritubulares, con edema perinuclear y pérdida del citoplasma (\*). MET, citrato de plomo y acetato de uranilo. 10 000X

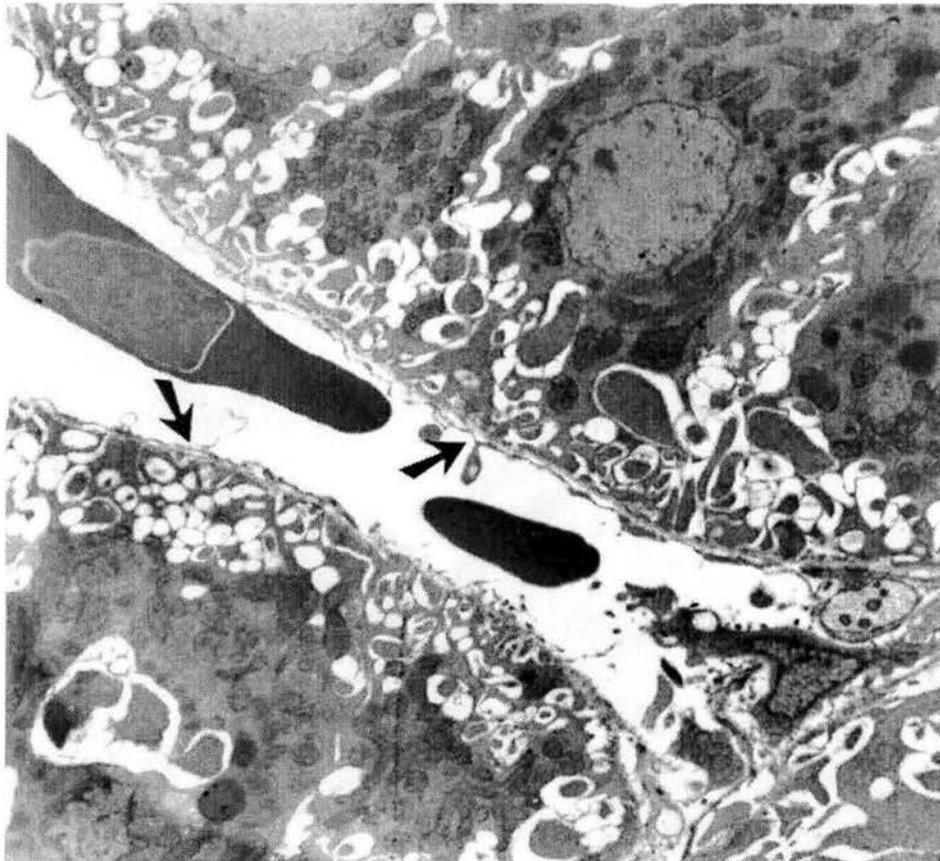


Fig. 8. Túbulo contorneado proximal a las 48 hpi. Intensa vacuolización de células epiteliales (flechas) en la zona basal adyacente al capilar peritubular. MET, citrato de plomo y acetato de uracilo. 6400X

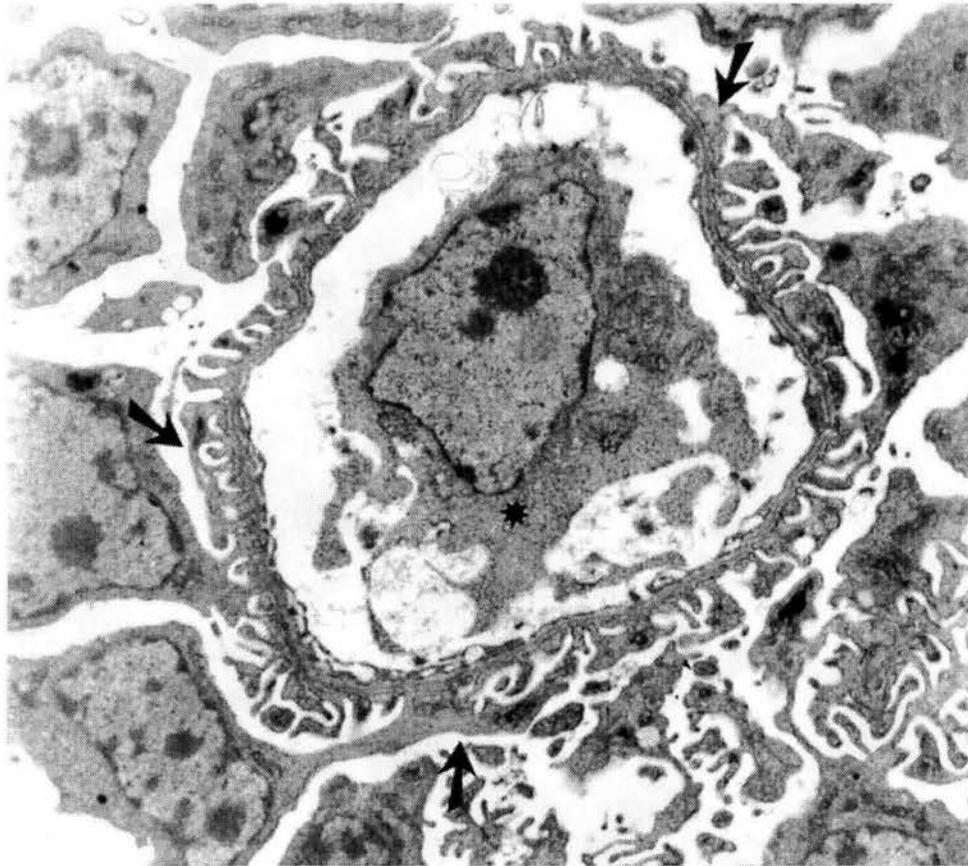


Fig. 9. Glomérulo renal de ave infectada a las 48 hpi. Se observa fusión de los procesos citoplasmáticos de los podocitos (flechas) y degeneración hidrópica de las células endoteliales (\*). MET, citrato de plomo y acetato de uranilo. 10 080X.

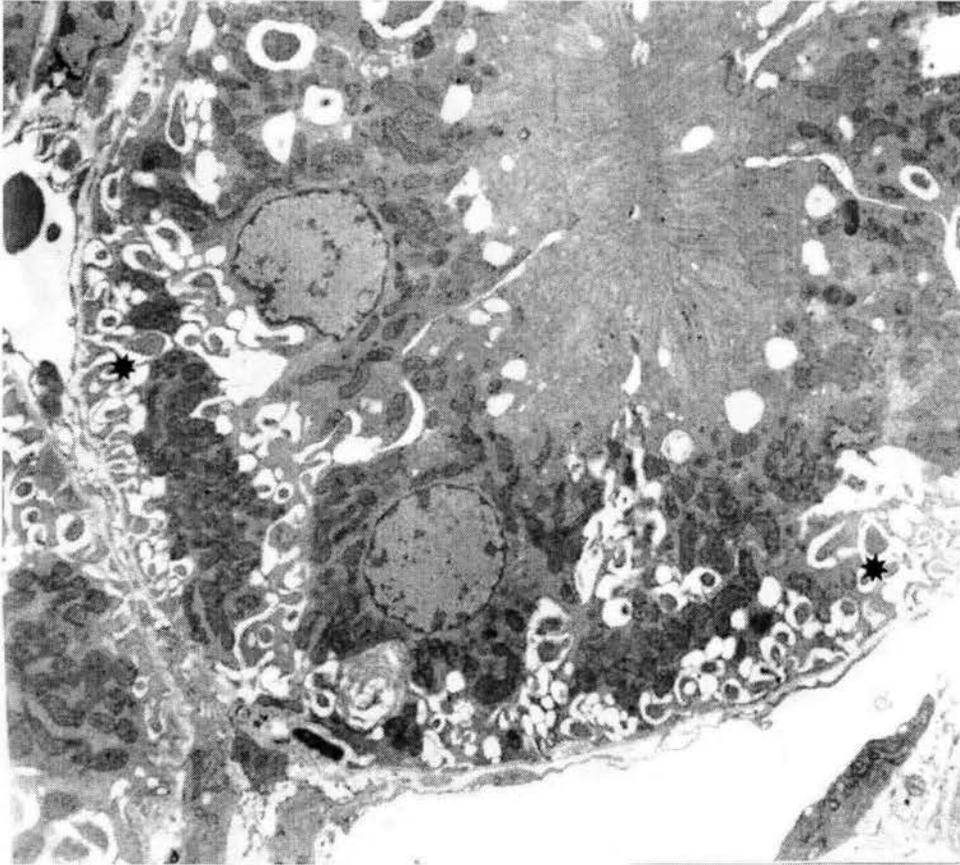


Fig. 10. Túbulo proximal de riñón de ave infectada a las 72 hpi. Se aprecian escasas vacuolas apicales (\*) y mayor degeneración vacuolar del citoplasma basal adyacente al capilar peritubular. MET, Citrato de plomo y acetato de uranilo. 5 616X