

56  
20j



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**DIAGNOSTICO DE HEPATITIS CON CUERPOS  
DE INCLUSION MEDIANTE LA PRUEBA  
DE INMUNOFLUORESCENCIA**



**T E S I S**

Que para obtener el título de:  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P r e s e n t a :

**Miguel Angel Ceniceros Ruíz**

Asesores: MVZ Angel Retana Reyes  
MVZ José de Jesús Gómez Sánchez



**FALLA EN ORIGEN**



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 está 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.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	8
RESULTADOS.....	11
DISCUSION.....	12
FOTOS.....	16
LITERATURA CITADA.....	18

## RESUMEN

CENICEROS RUIZ MIGUEL ANGEL. DIAGNOSTICO DE HEPATITIS CON CUERPOS DE INCLUSION MEDIANTE LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA (bajo la dirección de : MVZ Angel Retana Reyes y MVZ Jose de Jesus Gómez Sánchez).

Se elaboró un conjugado para diagnóstico de Hepatitis con cuerpos de inclusión (HCI). Para ello se utilizaron 60 pollos de engorda comerciales los cuales permanecieron en unidades de aislamiento durante 59 días. A partir de la 2a. semana de edad, las aves fueron inmunizadas semanalmente con adenovirus tipo 1 obteniéndose un suero hiperinmune contra el virus utilizado. El suero obtenido, permitió la elaboración de un conjugado contra adenovirus tipo 1. Se realizaron ensayos para evaluar la especificidad del conjugado, usando como referencia 30 casos positivos a HCI diagnosticados por histopatología. Finalmente cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo fueron infectados con adenovirus tipo 1, realizando posteriormente la prueba de inmunofluorescencia en ellos, utilizando controles negativos. Los resultados muestran que la técnica de inmunofluorescencia es de gran confiabilidad para el diagnóstico de HCI.

## INTRODUCCION

La Hepatitis con corpúsculos de inclusión (HCI) es una enfermedad causada por un grupo de adenovirus aviaries, que se caracteriza por producir en las aves una súbita mortalidad, acompañada de postración y anemia. Al examen posmortem se observa un cuadro anémico-hemorrágico, hidropericardio, edema pulmonar, necrosis y un aspecto amarillento moteado del hígado principalmente. Al examen microscópico en los hepatocitos hay la formación de corpúsculos de inclusión intranucleares basófilos o eosinófilos (1,2,5,7,12).

Los adenovirus aviaries se clasifican en 3 grupos: grupo 1, (Celo, Phelps), el cual engloba 12 diferentes serotipos, los virus asociados con el síndrome de baja de postura y los virus asociados con la enteritis hemorrágica de los pavos (1,2,5,12,15).

El virus de la HCI pertenece al grupo 1 (Celo, Phelps). El virus puede hemoaglutinar eritrocitos de rata (1,9), es resistente al calor ( $56^{\circ}$  C por más de 60 minutos), resiste cambios de pH dentro de un rango de 3 a 9 y se mantiene estable en presencia de luz ultravioleta. Es un virus desnudo (sin cubierta) resistente a los solventes de los lípidos como el eter y el cloroformo, su genoma está constituido por ácido desoxirribonucleico (11,12,15).

La HCI es descrita por primera vez en 1963 por Helmboldt y Frazier (2,11,15). En México, Antillón y Lucio la reportan en 1974 y posteriormente se diagnostica en Nueva Zelanda 1977, Chile 1980 y Perú 1987 (1).

En nuestro país, el brote inicial reportado en 1974, presentó una mortalidad de 0.5% en la parvada problema. Sin embargo en la actualidad los brotes son más severos y las mortalidades acumuladas debido a la HCI, se han exacerbado (12,15).

Esta enfermedad se trasmite principalmente por vía transovárica y su patogenia no ha sido del todo estudiada (3,9,14).

El problema se ha extendido en diversos estados de la República Mexicana ( Edo. de México, Nuevo León, Coahuila, Guerrero, Hidalgo, Querétaro, Jalisco, Morelia, Puebla y Aguascalientes) y en los años de 1989 y 1990, comienza a incidir drásticamente en la productividad de las granjas donde se presenta (1).

La HCI ha sido relacionada con agentes inmunodepresores, con virus denominados adeno-asociados y, por su transmisión vertical, con la importación a gran escala de huevo fértil, posiblemente contaminado con este adenovirus (3,5,12).

Actualmente, la severidad y frecuencia de la HCI en nuestro país a ocasionado grandes pérdidas económicas, ya que inclusive en algunas granjas se han producido mortalidades acumuladas de hasta un 50% debido a este problema (12).

El método de diagnóstico más común de la HCI ha sido el método histopatológico mediante la observación de los corpúsculos de inclusión intranucleares basófilos o eosinófilos en los hepatocitos. Sin embargo, la HCI puede ser diagnosticada además por otras técnicas; como serían las serológicas o por medio del aislamiento viral en aves susceptibles, embrión de pollo y cultivo de tejidos (9,10,19).

Cada prueba tiene cualidades específicas relacionadas con su sensibilidad, especificidad, rapidéz y economía (4,16). De ahí, que sea necesario evaluar las diversas técnicas alternativas en diagnóstico y entre ellas la opción que representa la inmunofluorescencia en el diagnóstico oportuno de la HCI.

Desde que ésta enfermedad se describió en el año de 1963, se utilizaron técnicas histopatológicas para su diagnóstico, ya que existe una lesión patognomónica constituida por corpúsculos de inclusión intranucleares basófilos o eosinófilos en el hepatocito (2,5,13,15). Sin embargo, ésta prueba de diagnóstico es lenta y no siempre precisa, ya que en diversos estadios de la enfermedad pueden no aparecer los corpúsculos de inclusión intranucleares

normalmente característicos de esta enfermedad (15). Así mismo dichos corpúsculos de inclusión pudieran estar producidos por algún otro virus asociado\*.

Otra forma de diagnosticar la HCI es por medio del aislamiento del adenovirus en embrión de pollo al ser inoculado principalmente por la vía del saco vitelino (2,10,19). La técnica tiene la desventaja de que se requieren varios pases "ciegos" en diferentes embriones antes de que las lesiones se manifiesten (19). Esto trae como consecuencia que la prueba también sea lenta y costosa.

Las opciones siguientes son las pruebas serológicas, como la virus-suero neutralización en cultivo celular (10). Esta prueba es muy sensible para titular anticuerpos en el suero, pero ésto no siempre indica que la enfermedad esté en curso, además se requiere montar la infraestructura para el cultivo celular, por lo que también se convierte en una prueba de costo elevado (4).

Otra alternativa es la detección de anticuerpos por medio de la prueba de inmunoensayo con enzimas asociadas (ELISA), la cual es poco específica y además requiere de reactivos y equipo costoso (18).

\* Dr Ricardo Cuetos. Comunicación personal.



Recientemente Van Der Hurk detectó un adenovirus del grupo II mediante la técnica de inmunofluorescencia en leucocitos de pollo y pavo (17).

La técnica de inmunofluorescencia se ha venido utilizando en el diagnóstico de enfermedades virales en nuestro país. La prueba es altamente específica, detecta el antígeno (virus) mediante un anticuerpo específico marcado con un fluorocromo (5,16). Además tiene la ventaja de reaccionar inclusive ante una mínima cantidad de antígeno, es rápida, y en cualquier laboratorio se puede implementar, siempre y cuando se cuente con un microscopio de fluorescencia y el conjugado correspondiente (16,17).

#### HIPOTESIS

La prueba de inmunofluorescencia directa, puede confirmar el diagnóstico de HCI de una manera rápida y precisa en comparación con la prueba histopatológica.

## OBJETIVO

Utilizar la prueba de inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de la HCI.

MATERIAL Y METODOS

Preparación de antisuero.

Se elaboró un suero hiperinmune contra un adenovirus tipo 1\*, Para ello se utilizaron 60 pollos de engorda los cuales permanecieron en completo aislamiento; omitiendo la aplicación de vacunas o tratamiento alguno.

Paralelamente se elaboró un suero hiperinmune contra gammaglobulina de ave. Para lo cual fueron utilizados 2 conejos los cuales se mantuvieron en una unidad de aislamiento.

Los pollos fueron criados hasta los 59 días de edad, siendo a las dos semanas (día cero) cuando se comenzó a aplicar el siguiente calendario de inmunización:

Se aplicó 1.0 ml de virus inactivado con formól, obtenido de embrión de pollo sin purificar, por vía subcutánea, a los 0, 7, 14, y 21 días, posteriormente a los 30 días se inoculó 1.0 ml del virus activo por vía intramuscular en la región de la pechuga.

Así mismo, se aplicó el mismo esquema de inmunización en

\* Donado gentilmente por el Departamento de Virología e inmunología de la FMVZ UNAM. Título de 10<sup>4.5</sup> DICT 50%

conejos, los cuales recibieron semanalmente 2 ml de gammaglobulina de ave por vía intraperitoneal, durante 4 semanas.

A los 45 días después de la primera inmunización los conejos y las aves se sangraron en "blanco" para obtener el suero al cual se le determinó la presencia de anticuerpos mediante la prueba de inmunodifusión doble en agar descrita por Hudson (6) y la prueba de seroneutralización en cultivo de tejidos (10)

#### Elaboración de conjugado

Se procedió a precipitar las inmunoglobulinas del suero obtenido mediante la utilización de solución saturada de sulfato de amonio. Posteriormente se dializó hasta eliminar el sulfato de amonio y se evaluó la concentración protéica por espectrofotometría (6). Se conjugaron las inmunoglobulinas con isotiocianato de fluoresceína, eliminándose el colorante no conjugado mediante columna de sephadex G-25. Se absorbió la inmunofluorescencia inespecífica, pasando el conjugado por polvo de hígado de conejo. Posteriormente se evaluó el conjugado obtenido siguiendo la técnica descrita por Hudson (6).

#### Muestras

Se examinaron 30 muestras de hígado provenientes de las 16 aves que murieron durante el experimento y 14 casos clínicos que presentaron lesiones a la necropsia sugestivas a HCl. Parte de

las cuales se colectaron en frascos con formol al 10% para histopatología y otra parte de estos, se conservaron a  $-20^{\circ}$  C para obtener cortes por congelación de  $4\mu$  en el crióstato\* e improntas que fueron empleadas para la prueba de inmunofluorescencia.

### Histopatología

Las muestras fijadas y conservadas en formól fueron procesadas para su examen microscópico, mediante la técnica de hematoxilina-eosina descrita por Junqueira y Carneiro (7).

### Prueba directa de inmunofluorescencia

Se llevo a cabo la prueba de anticuerpos fluorescentes siguiendo el método descrito por Hudson (6). Se confirmó la presencia de corpúsculos de inclusión intranucleares simultaneamente por histopatología. Se manejaron control positivo y negativo.

Para la observación de las laminillas se utilizó un fotomicroscopio CARL ZEISS modelo III de epifluorescencia equipado con lámpara de mercurio HB 050W marca Osram, luz de excitación azul-violeta, filtro excitador BP 400-440, divisor cromático FT 460, filtro supresor LP 470, oculares gran angular WA 10X, objetivo de inmersión en aceite 40X diafragma y multiplicador de imágenes 1:25.

\*Microtomo-crióstato (Minotome). TM-Shewood Medical

Una vez desafiadas las aves con virus virulento a las dos semanas comenzaron a morir por HCI, murieron un total de 16 aves en un período de 12 días. Las lesiones observadas en las aves muertas coincidieron prácticamente en su totalidad con las indicadas para esta enfermedad. Se observó marcado hidropericardio acompañado de hemorragias musculares, edema pulmonar, hepatomegalia con puntilleo amarillento y hemorragias subcapsulares, esplenomegalia, y nefromegalia.

Con el suero obtenido, se elaboró un conjugado siguiendo la técnica previamente descrita por Hudson (6). El título del conjugado fue 1/64.

Se realizó la prueba de inmunofluorescencia para comparar los casos positivos por histopatología; resultando igualmente positivos por inmunofluorescencia.

Se evaluaron 30 casos positivos confirmados mediante histopatología y resultaron igualmente positivos en la prueba de inmunofluorescencia. Así mismo, se evaluaron 10 casos negativos a histopatología, mismos que resultaron negativos a la prueba de inmunofluorescencia. El cultivo de tejidos de fibroblastos de embrión de pollo inoculado con virus procedente de casos clínicos positivos a HCI, mostró fluorescencia en el núcleo celular, mientras que los cultivos control, no inoculados, no presentaron fluorescencia específica.

Debido a que se requería de un máximo de anticuerpos en el suero, las aves fueron desafiadas con virus virulento activo ya que esto elevaría más aún los niveles de inmunoglobulinas en las aves que sobrevivieran al desafío (16).

Durante el desafío, se pudo observar que después de 15 días, se presentaron las primeras lesiones de HCI en las aves, acortandose el período de incubación del virus señalado por la literatura de 4 semanas (5). Esto debido muy probablemente a que se inoculó al virus por vía intramuscular, llegando este inmediatamente a sangre y al órgano blanco (hígado) de la enfermedad.

Las aves no padecieron ninguna otra enfermedad adicional durante el desarrollo del experimento. Así mismo, los parámetros de producción obtenidos fueron los promedio para pollo de engorda lo cual indicó un desarrollo normal de las aves durante el experimento.

Durante el proceso de elaboración de conjugados existen varios pasos en los cuales se pueden cometer errores, ya sea desde la preparación del antígeno, calendario de inmunización, eventualidades patológicas durante el experimento, sangrado incorrecto de los animales, y manejo inadecuado del suero; tanto antes y durante el proceso de elaboración del conjugado.

Es determinante el control del pH y la temperatura los cuales deben permanecer constantes durante todo el proceso de elaboración del conjugado. Mas aún cuando se utiliza suero de ave, por ser este más sensible a todos los cambios medio ambientales. En el caso de suero de conejo este requiere los mismos cuidados solo que el comportamiento de las inmunoglobulinas en esta especie es más estable y se logra terminar el conjugado con muy buenos niveles de anticuerpos por ello es el suero que más se utiliza (16).

Durante el proceso de evaluación del conjugado se observaron precipitaciones que se corrigieron parcialmente con la centrifugación y filtración del conjugado. También se optó por pasarlo en polvo de hígado de conejo para eliminar la fluorescencia inespecífica.

Finalmente se elaboró un cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo para infectarlo con adenovirus tipo 1 para con ello evaluar en definitiva el conjugado obtenido ya que solo debería fluorecer el núcleo contaminado.

Posteriormente habiendo eliminado en gran parte la inmunofluorescencia inespecífica, se trabajaron las muestras positivas a HCI por histopatología. Las 30 muestras trabajadas presentaron inmunofluorescencia. Sin embargo, en futuros trabajos se deberán utilizar muestras sugestivas a HCI, incluso aquellas



que hubieran sido negativas por histopatología ya que en este trabajo, solo se utilizaron 30 muestras, de las cuales 16 habían sido inoculadas con el virus utilizado para la elaboración del conjugado y las restantes 14 fueron tomadas de brotes severos de la enfermedad. Dado la sensibilidad de la prueba sería factible detectar concentraciones mínimas de antígeno viral incluso antes de que se produjeran lesiones. Para ello será necesario estandarizar la técnica e implementarla como prueba rutinaria de diagnóstico de la HCI.

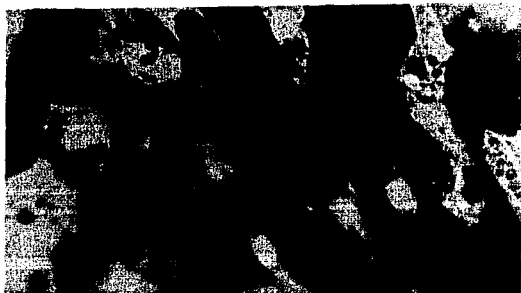
Al evaluar el diagnóstico mediante la inmunofluorescencia comparandolo este con la prueba histopatológica, se pudo observar que la prueba de inmunofluorescencia, tiene varias ventajas en relación a la segunda. El resultado se obtiene en dos horas y manejandose los controles positivos y negativos adecuadamente, se tiene la certeza de la veracidad en el diagnóstico.

Se debe considerar que la histopatología se basa en la lesión considerada como patognomónica de la enfermedad, los corpúsculos de inclusión. Sin embargo, se desconoce si esta lesión realmente es producida por un adenovirus, ya que existen otros virus, los denominados adeno-asociados que pudieran estar involucrados; como es el caso del virus de la anemia infecciosa por ejemplo (8,15,14). Para dilucidar esto, es necesario realizar estudios de la patogenia de la enfermedad así como descartar la posibilidad de alguna asociación viral que enmascare al verdadero

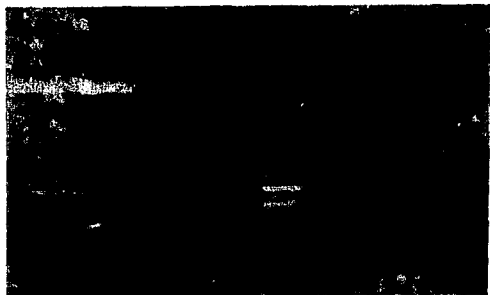
agente causal. Esto debido a que la enfermedad en la actualidad no coincide con la descrita originalmente por Helmboldt y Frazier en 1963 (2,11,15). Así mismo deberá reproducirse el cuadro bajo condiciones y variables totalmente controladas.

En cultivo de tejidos, tampoco se puede descartar la presencia de otro agente viral, ya que si bien, en el cultivo se inoculó solo el virus de la HCI. El inóculo podría haber estado contaminado con algún virus asociado. Además de que desde un principio, el antígeno utilizado para la inmunización de las aves fue obtenido de embrión de pollo, el cual pudo haber estado contaminado con otro virus y por lo tanto, el conjugado estaría reaccionando también contra éste antígeno "desconocido".

La prueba de inmunofluorescencia resulto ser, en comparación con la histopatología, un método alternativo de diagnóstico para la HCI. Sin embargo, la prueba deberá ser estandarizada para su correcta interpretación, utilizando la mayor cantidad de controles posibles.



La fotografía muestra cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo, en algunas células, se puede observar inmunofluorescencia en el núcleo celular, (flechas) la cual está dada por la presencia de partículas virales en el núcleo.



Cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo negativo a la prueba de inmunofluorescencia.



En la fotografía se observan corpúsculos de inclusión intranucleares fluorescentes (flechas), en un corte por congelación de hígado.



La fotografía muestra una ausencia de fluorescencia nuclear en un corte de hígado negativo a HCl.

## LITERATURA CITADA

- 1.- Altamirano R., Ramírez H., Retana A.: Hepatitis con cuerpos de inclusión y su relación con altas mortalidades en el pollo de engorda en México. XV Convención Nacional ANECA, Cancún México: 279-287, 1990.
- 2.- Antillón A., Lucio B.: Inclusion body hepatitis in Mexico. Avian Dis. 19: 195-197, 1975.
- 3.- Christensen N. H., Saifudin: A primary epidemic of inclusion body hepatitis in broilers. Avian Dis. 33: 622-630, 1989.
- 4.- Cowen B. S.: Chicken embryo propagation of type I avian adenoviruses. Avian Dis. 32: 347-352, 1988.
- 5.- Hofstad M. S.: Diseases of Poultry. 8th ed. Iowa State, University Press, Ames, Iowa 1984.
- 6.- Hudson, L. and Hay, F. C.: Practical Immunology. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, London, England, 1980.
- 7.- Junqueira L. C., Carneiro J.: Histología básica 2a. ed. Salvat Editores Barcelona (España) 1981.

- 8.- Klopp S., Rosenberg J. K., Krauss W. C.: Diagnosis of inclusion body hepatitis an hemorrhagic anemia syndrome in Delmarva broiler chickens. Avian Dis. 19: 608-611, 1975.
- 9.- Mc ferran.: Immunity to adenoviruses. In: Avian Immunity. British Poultry Science, Ltd., Edinburg, P. 187-203, 1981.
- 10.- Montgomery R.D.: Certain parameters of the virus serum neutralization response of chickens exposed to an inclusion body hepatitis virus agent. Avian Dis. 18: 623-626, 1974.
- 11.- Otsuki K., Tsubokura M., Yamamoto H., Imamura M. Sakagami Y., Saio H., Hosakawa D.: Some properties of avian adenoviruses isolated from chickens with inclusion body hepatitis in Japan. Avian Dis. 20: 693-705, 1976.
- 12.- Ramírez J.H., Altamirano R.R.: Hepatitis con cuerpos de inclusión. Memorias de la primera jornada médico avícola FMVZ- ANECA MEXICO: 236-241, 1990.
- 13.- Reece R.I., Grix D.C., Barr D.A.: An unusual case of inclusion body hepatitis in a cockerel. Avian Dis. 30: 224-227, 1986.
- 14.- Sadasiv E.C., Piela T.H., Chang P.W.: Detection of latent avian adenovirus- associated virus proteins in chicken cells. Avian Dis. 33: 125-133, 1989.

- 15.- Rosenberger J.K., Eckroade R.J., Klopp S., Krauss W.C.: Characterization of several viruses isolated from chickens with inclusion body hepatitis and aplastic anemia. Avian Dis. 18: 399-409, 1974.
- 16.- Tizard I.: Inmunologia Veterinaria 3a. ed. Nueva Editorial Interamericana México D.F. 1989.
- 17.- Van Der Hurk J.V.: Propagation of group II avian-adenoviruses in turkey and chicken leukocytes. Avian Dis. 34: 12-25, 1990.
- 18.- Van Der Hurk J.V.: Efficacy of avirulent hemorrhagic enteritis virus propagated in turkey leukocyte cultures for vaccination against hemorrhagic enteritis in turkeys. Avian Dis. 34: 26-35, 1990.
- 19.- Winterfield R.W., Fadly A.M., Hoerr F.J.: Immunization of chickens against adenovirus infection. Poultry Science. 56: 1481-1486, 1977.