

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD
ANIMAL**

**PATOGENESIS DE LAS HEMORRAGIAS EN AVES LEGHORN
INFECTADAS CON EL VIRUS H5N2 DE INFLUENZA AVIAR
DE ALTA PATOGENICIDAD**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

MARIA DE GUADALUPE RAMIREZ DIAZ

TUTOR:

NORMA LETICIA CALDERON APODACA

COMITE TUTORAL:

TAMAS FEHERVARI BONE

TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

MEXICO, D.F.

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 la persona que ha llenado de luz y alegría mi vida y que me ha hecho creer que las cosas pueden ser diferentes en este mundo... Con un amor especial, para ti mi preciosa hija, **DIANA ISABEL RAMÍREZ DÍAZ**.

A mis padres **MA. ISABEL DIAZ CORTÉS Y MARTÍN RAMÍREZ MAYORAL**, por su gran apoyo y sus consejos, porque sin Ustedes este proyecto no hubiera llegado a su fin... Muchas gracias.

Con cariño para ti **LUIS ANTONIO CALZADA NOVA**, por los conocimientos y las experiencias que me regalaste... Gracias por la fortuna de haberte conocido.

A mis hermanos **MA. ISABEL Y MARTÍN** por el cariño de siempre.

Con un amor especial para la persona que complementa mi vida y porque su sola presencia llena de gozo mi corazón.... Para ti **LORENZO GÓMEZ CÁRDENAS**, por la suerte de estar en el mismo camino.

A mis amigos **Myrna Romano Osuna, Pilar Useche Castro, Araceli Lima M., Eugenia Candanosa A., Jesús Reyes M, Leticia Vázquez M...** Por la suerte de compartir grandes momentos con Ustedes.

A la vida, por las grandes cosas que me ha regalado...

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. **Norma Calderón Apodaca**, mi tutora

Al comité tutorial:

Dr. **Enrique Aburto Fernández**

Dra. **Teresa Fortoul Van Der Goes**

Dr. **Tamas Fehervari Bone**

Dra. **Lucia Angélica García Camacho**

A la M en C **Patricia Bizarro**, por su apoyo en la preparación de las muestras de microscopía electrónica.

Al MVZ **Antonio Morilla González** por su apoyo durante el desarrollo de la investigación.

Al **Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Pecuarias (INIFAP)**, por las instalaciones prestadas.

A mi "**Alma Mater**"... Por las oportunidades que me ha brindado

A la MVZ **Liliana Rivera Ramírez** y **Octavio Lara Arenas** por la ayuda prestada en el material multimedia.

Al laboratorista **José G. González**, por su colaboración en la preparación del material histopatológico.

A las QFB **Rosalba Salcedo Elisea** y **QBP Arlette Castillo Mata**, por la ayuda brindada.

RESUMEN

Ramírez Díaz María de Guadalupe: PATOGÉNESIS DE LAS HEMORRAGIAS EN AVES LEGHORN INFECTADAS CON EL VIRUS H5N2 DE INFLUENZA AVIAR DE ALTA PATOGENICIDAD. Tutor principal: Norma Leticia Calderón Apodaca. Comité tutorial: Tamas Fehervari Bone, Teresa Imelda Fortoul van der Goes.

La influenza aviar (IA) de alta patogenicidad es una enfermedad que se caracteriza por presentar alta mortalidad y hemorragias en diversos órganos. Con el objeto de obtener mayor información acerca de la patogenia de las hemorragias en aves con IA, se realizaron estudios hematológicos, de coagulación, histológicos y ultraestructurales de 42 aves libres de patógenos específicos, infectadas experimentalmente por vía oral con 10^6 DLEP₅₀/ml de la cepa viral A/CK/Querétaro/14588-19/95 H5N2 de alta patogenicidad; se incluyeron 9 aves testigos. Las aves se sacrificaron a las 24 horas posinfección (hpi) y posteriormente a intervalos de 12 hpi. Se observó una disminución significativa del número de trombocitos a partir de las 24 hpi; el tiempo de protrombina (TP) no presentó diferencia significativa. También se observó leucocitosis por incremento de heterófilos a partir de las 36 hpi y de monocitos a las 60 hpi ($P < 0.01$). Histológicamente en médula ósea se observó hiperplasia hematopoyética a partir de las 48 hpi, que involucraba todas las líneas celulares; en riñón se presentó focos hemorrágicos a las 60 hpi, mientras que en encéfalo y proventrículo los focos hemorrágicos fueron evidentes a partir de las 36 hpi; en pulmón se observó hemorragia multifocal y neumonía intersticial. Ultraestructuralmente, el riñón fue el único órgano que presentó lesión endotelial, ya que se observó edema de células endoteliales a partir de las 24 hpi; en pulmón se observó vacuolización de las células epiteliales a partir de las 24 hpi, con proliferación de tejido fibroso; en los demás órganos no se presentaron cambios. Los resultados de este estudio demostraron que el virus de IA ocasiona trombocitopenia desde las primeras horas posinfección, que aunada a las lesiones endoteliales son la principal causa de las hemorragias en las aves infectadas con IA. Se descartó una alteración de la hemostasia secundaria por no presentarse cambios en el TP durante el estudio.

Palabras clave: Influenza aviar, hemorragias, trombocitos, hemostasia

SUMMARY

Ramírez Díaz María de Guadalupe: PATHOGENESIS OF LEGHORN BIRDS INFECTED WITH HIGHLY PATHOGENIC H5N2 AVIAN INFLUENZA. Main Mentor: Norma Leticia Calderón Apodaca. Mentor Committee: Tamas Fehervari Bone, Teresa Imelda Fortoul van der Goes.

Highly pathogenic avian influenza (AI) is a disease that causes high mortality and bleeding in several organs. To obtain more information about pathogenicity of bleedings in bird with AI, hematology, coagulation, histology and ultrastructural tests were made in 42 birds free of specific pathogens and experimentally infected through the oral route with 10^6 DLEP₅₀/ml of the A/CK/Querétaro/14588-19/95 H5N2 highly pathogenic viral strain; including 9 control birds. The birds were sacrificed at 24 hours post infection (hpi) and subsequently at 12 hpi intervals. A significant decrease in the number of thrombocytes as of 24 hpi was noted; prothrombin time (PT) showed no significant difference. Also, leukocytosis was found with heterophile increase as of 36 hpi and monocyte increase at 60 hpi ($P < 0.01$). Bone marrow histology showed hematopoietic hyperplasia as of 48 hpi involving all cell lines; the kidney showed hemorrhagic foci at 60 hpi, while the brain and proventricle had hemorrhagic foci evident as of 35 hpi; interstitial pneumonia was found in the lung in addition to multifocal hemorrhage. Ultrastructurally, the kidney was the only organ with endothelial lesion, since edema was found in endothelial cells as of 24 hpi. Also, vacuolization of tubular epithelial cells was found; vacuolization of epithelial cells was seen in lung as of 24 hpi with fibrous tissue fibrosis and heterophiles. No changes were found in the remaining organs. Results of this study showed that the IA virus causes thrombocytopenia from the first hours after the infection, which in addition to the endothelial lesions is the main cause of bleedings in IA infected birds. A secondary hemostasis disturbance was ruled out since no changes in TP were present during the study

Key words: Avian influenza, bleedings (hemorrhage), thrombocytes, hemostasis.

CONTENIDO

	PAGINA
Introducción.....	1
Revisión de las características generales de influenza aviar.....	2
Otras enfermedades aviares que cursan con hemorragias.....	7
Hemostasia en los mamíferos y en las aves.....	8
Objetivo.....	10
Hipótesis.....	10
Material y métodos.....	11
Análisis estadístico.....	14
Resultados.....	15
Discusión	20
Conclusiones.....	26
Literatura citada.....	27

LISTA DE CUADROS

CUADRO I. Resultados del hematócrito (HT), hemoglobina (HB) y de eritrocitos (GR) en sangre de aves y testigo e infectadas con el virus de Influenza Aviar H5N2 de alta patogenicidad (Media \pm Desviación estándar).

CUADRO II. Resultados del conteo de leucocitos y cifras absolutas en sangre de aves testigo e infectadas con el virus de Influenza Aviar H5N2 de alta patogenicidad (Media \pm Desviación estándar).

Cuadro III. Resultados del los valores promedio \pm DE de trombocitos de aves testigo e infectadas con la cepa de influenza aviar H5N2 (título 10^6 DLEP_{50/ml}) de alta patogenicidad.

Cuadro IV. Resultado promedio \pm DE del tiempo de protrombina de aves testigo e infectadas con la cepa de influenza aviar H5N2 (título 10^6 DLEP_{50/ml}) de alta patogenicidad.

Cuadro V. Reaislamiento viral y porcentaje de positividad a la hemoaglutinación en aves testigo e infectadas con el virus H5N2 de influenza aviar de alta patogenicidad.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pulmón de ave desafiada a las 60 hpi con la cepa H5N2 de Influenza aviar de alta patogenicidad. Neumonía intersticial moderada.

Figura 2. Médula ósea de ave desafiada a las 48 hpi con la cepa H5N2 de alta patogenicidad. Nódulo de hiperplasia linfocitaria.

Figura 3. Médula ósea de ave desafiada a las 72 hpi con la cepa H5N2 de alta patogenicidad. Hiperplasia hematopoyética.

PATOGÉNESIS DE LAS HEMORRAGIAS EN AVES LEGHORN INFECTADAS CON EL VIRUS H5N2 DE INFLUENZA AVIAR DE ALTA PATOGENICIDAD

INTRODUCCIÓN

La avicultura mexicana contribuye aproximadamente con el 55% de la producción pecuaria nacional, colocándola en el primer lugar del sector pecuario. La avicultura, al igual que otras actividades pecuarias, está constantemente amenazada por enfermedades infectocontagiosas, dentro de estas se encuentra la Influenza Aviar, que puede comportarse como una enfermedad de alta patogenicidad, con alta mortalidad, provocando severas pérdidas económicas a los avicultores. (DINESA,1996)

Dentro de las pérdidas económicas que ocasiona el virus altamente patógeno de la Influenza Aviar se encuentra la muerte de las aves, que puede estar ocasionada por la presencia de hemorragias, e estas son consideradas una característica común e importante de la enfermedad. Las hemorragias han sido asociadas a replicación viral primaria en células del endotelio vascular y a trombosis vascular.(ROTT,1992; Capua,1999; Suarez,1998)

Ultraestructuralmente las células endoteliales dañadas muestran hinchazón de núcleos y mitocondrias, así como dilatación del retículo endoplasmático y fragmentación de membrana basal, y en ocasiones se observa en la superficie luminal partículas de forma redonda envueltas que miden 80x100-620nm con 10nm de ancho.(Silvano,1997) Al informarse un daño severo en endotelios, y la presencia de trombos en aves infectadas con Influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP), es probable que esto desencadene una alteración en la hemostasia secundaria, al presentarse una coagulación intravascular diseminada, lo que ocasionaría un consumo excesivo de trombocitos, así como de factores de coagulación, que daría origen a las hemorragias en estas aves.(Darien,2000; Jain, 1993)

Dado que el virus causa una infección sistémica y que ha sido aislado de la médula ósea,(Barnes, 1999; Slemons,1992) cabe la posibilidad de que exista una infección directa en tromboblastos y trombocitos medulares, lo que originaría una trombocitopenia y por lo tanto el origen de las hemorragias en aves infectadas con IAAP. Esta posibilidad cabe ya que se ha informado que existen virus que invaden médula ósea, causando daño directo a precursores plaquetarios, como en el caso del *togavirus*, virus de la fiebre porcina clásica, en donde se ha informado que causa daño directo a los megacariocitos por efecto viral.(Calderón,1998)

REVISIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DE INFLUENZA AVIAR

Definición

La influenza aviar es una enfermedad viral, ocasionada por un *Orthomyxovirus*, es de distribución mundial, de transmisión horizontal y se caracteriza por tener dos tipos de presentación, la de alta patogenicidad, cuya presentación es generalizada, y la de baja patogenicidad, donde se afecta principalmente el tracto respiratorio y digestivo. La morbilidad, mortalidad y signología dependen de la cepa involucrada.

Etiología

La enfermedad es producida por el virus tipo A de influenza aviar, que es capaz de infectar a una gran variedad de aves, así como a cerdos, caballos, al hombre y a otros mamíferos; los otros tipos del virus de influenza el B y C, únicamente afectan al humano.

El virus pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, que inicialmente es pleomorfo y más tarde esférico. Se caracteriza por ser un virus envuelto y pequeño, mide aproximadamente 80 – 120 nm de diámetro; es un virus ARN de cadena sencilla, que presenta dos antígenos de superficie o glucoproteínas, denominados como hemoaglutininas (HA) y neuraminidasas (NA), que se utilizan para su clasificación. Actualmente existen 15 HA y 9 NA.(Suarez,2000; Esterday,1997; Swayne,1996; Webster,1992)

La cadena de ARN viral se encuentra conformada por 8 segmentos, es de polaridad negativa y dentro de cada segmentos se insertan las polimerasas PB1, PB2 y PA, así como las proteínas HA, NP, NA, M1, M2, NS1 y NS2.(Webster,1992; Rott,1992)

Las polimerasas intervienen en la replicación viral, por ejemplo la polimerasa PB1 es responsable de la elongación del ARN mensajero, mientras que la PB2 se encarga de la síntesis completa del molde del ARN viral y la PA actúa como proteína desenvolvedora.(Webster,1992)

La HA es una proteína integral de la membrana y el mayor antígeno de superficie del virión, que se encarga de la unión del virión al receptor de la célula huésped.(Webster,1992; Rott,1992)

La HA a nivel molecular determina la deferencia de patogenicidad de las cepas de influenza aviar, se ha informado que la presencia de múltiples aminoácidos básicos en el sitio de unión de la HA le confiere la patogenicidad a las cepas.(Senne,1996)

La HA requiere una serie de factores para que se de la unión adecuada entre el virus y la célula, como: (Rott,1992)

- Una inserción adecuada de los aminoácidos
- Una activación de las proteasas celulares (furina y PC6), que permita la infección sistémica. (Senne,1996)
- Un sitio único para la activación de la arginina, que resulte en una infección local.

- Puntos de mutación, que se pueden presentar por la pérdida de un carbohidrato cerca del sitio de unión. La mutación puede aumentar la patogenicidad de la cepa. (Senne,1996)

La nucleoproteína (NP), es transportada al núcleo celular, donde se une y encierra al ARN viral.(Webster,1992)

La NA se encuentra dentro de la membrana del virión y es el segundo antígeno de superficie más importante, cuya función es liberar las partículas virales de los receptores celulares, permitiendo que la progenie escape de la célula.(Webster,1992)

La proteína M1, se localiza dentro del citoplasma y el núcleo de la célula infectada; es posible que juegue un papel importante en el inicio del ensamble de la progenie.(Webster,1992)

La proteína M2, es una proteína integral de la membrana, se cree que controla el pH durante la síntesis de la NA.(Webster,1992)

Las proteínas NS1 y NS2 no estructurales, se encuentran en abundancia dentro de la célula infectada, la NS1 en el núcleo y la NS2 en el citoplasma y son importantes en la replicación viral.(Webster,1992)

Distribución

La enfermedad se encuentra distribuida en todo el mundo, afecta a aves de todas las edades y principalmente a aquellas que no han tenido exposición al virus. La presencia de la influenza aviar se confirmó en México el 13 de enero de 1995 por el Laboratorio de la Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales, quienes diagnosticaron un virus H5N2 de alta patogenicidad en granjas de Puebla y Querétaro. El 23 de enero del mismo año, en el Diario Oficial de la Federación

aparecieron los lineamientos para la activación del Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal (DINESA). (DINESA,1996; Esterday,1997)

Importancia económica

Las cepas altamente patógenas de la influenza aviar producen grandes pérdidas económica dentro de la industria avícola, estas incluyen disminución en la producción, costos en las medidas de cuarentena, limpieza y desinfección, así como disminución de las exportaciones.(Mcferran,1993; Davison,1999)

Patogenia y signos clínicos

El virus de influenza aviar se transmite por equipo y ropa contaminados, por contacto directo con aves infectadas o contacto con aves de vida libre que actúan como reservorios, así como por movimiento de aves infectadas a granjas libres, etc.(Suarez,2000; Esterday,1997; Swayne,1996; Capua,2000)

El virus se ha clasificado en dos categorías dependiendo de la patogenicidad de la cepa en campo, de la severidad de los signos y las lesiones; así como de la morbilidad y mortalidad de los animales infectados(Murphy,1999)

- Influenza aviar de moderada patogenicidad (IAMP), que se caracteriza por presentar una signología leve, que va desde una disminución en la actividad, signos respiratorios (tos, estornudos, estertores y lagrimeo), plumas erizadas, acurrucamiento, etc ; la replicación viral es limitada y se enfoca principalmente a tracto respiratorio y digestivo; la mortalidad y morbilidad son bajas. Cuando se llega a presentar alta mortalidad generalmente se asocia a patógenos secundarios.(Suarez,2000; Esterday,1997; Mcferran,1993)

- La influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP) es causada por los subtipos virales H5 y H7, se ha informado que cepas de baja patogenicidad pueden mutar a cepas de alta patogenicidad, por cambios en el gen de la HA.(Mcferran,1993) Las cepas de alta patogenicidad provocan viremia, así como una replicación pantrófica y sistémica, por lo que el virus puede encontrarse en la

mayoría de células del cuerpo(Suarez,2000; Silvano,1997). La IAAP, es un problema devastador, que se caracteriza por presentar alta morbilidad y mortalidad, en algunos casos la presentación es fulminante; la signología es severa entre la que se incluye: perdida de la actividad, disminución en el consumo de alimento, depresión marcada, plumas erizadas, eritema periocular, hemorragias en cavidad abdominal; cianosis, edema y necrosis de la cresta; ocasionalmente se presenta equimosis en la piel de las piernas. (Esterday,1997; Mcferran,1993; Kobayashi,1996).

Las aves afectadas mueren a los pocos días de la infección exhibiendo hemorragias petequiales y exudado en tracto respiratorio, digestivo y en tejido cardiaco. Las hemorragias presentes en las aves infectadas con cepas de alta patogenicidad se asocian a infección del endotelio vascular. (Kobayashi,1996)

Lesiones macroscópicas

Las lesiones macroscópicas son más evidentes en las aves infectadas con cepas altamente patógenas, entre las que se incluyen hemorragia subcutánea, congestión y edema de cabeza y cuello, hemorragias focales en varios órganos y tejidos como pulmón, mucosa de proventrículo y músculos esqueléticos, congestión sistémica, así como atrofia de timo y bolsa de Fabricio.(Esterday,1997; Mcferran,1993; Kobayashi,1996)

Lesiones microscópicas

La severidad de las lesiones esta determinada por la patogenicidad de la cepa y van desde una inflamación catarral, fibrinosa, serofibrinosa, mucopurulenta o caseosa, así como edema de la mucosa traqueal, también se llega a presentar engrosamiento de los sacos aéreos, peritonitis catarral, enteritis fibrinosa, exudado en los oviductos, infiltración mononuclear en el pericardio, dilatación de vasos linfáticos, necrosis multifocal del hígado, miositis, en encéfalo puede haber

infiltrado linfocitario perivascular, microgliosis y neurosis.(Suarez,2000; Esterday,1997; Mcferran,1993; Kobayashi,1996)

Otras enfermedades aviares que cursan con hemorragias

A pesar de que la influenza aviar es una enfermedad que presenta hemorragias, no es la única en aves en la que se presentan, por lo que es importante conocer otras enfermedades que favorecen el desarrollo de las hemorragias:

En la enfermedad de Newcastle ya se ha informado que la presentación de las hemorragias se debe al daño directo del virus en islotes hematopoyéticos, que incluyen a los precursores de los trombocitos en médula ósea.(Galindo,2001)

Infección de la bolsa de Fabricio, es una enfermedad viral en donde se ha informado la presencia de hemorragias en los músculos de los muslos y pectorales.(Lukert,1997)

Hepatitis con cuerpos de inclusión, es una enfermedad en donde se presenta hígado pálido, friable e hinchado; además de hemorragias petequiales o equimóticas en hígado y en músculo esquelético.(Mcferran,1997)

En la anemia infecciosa aviar, se presentan hemorragias las cuales se encuentran asociadas a la pancitopenia que ocasiona el virus.(Barnes,1999; Bulow,1997)

Colera aviar, en la presentación aguda se han informado hemorragias subepicárdicas, en pulmones, grasa abdominal y mucosa intestinal.(Rimler,1997)

Los rodenticidas como la warfarina, que inhibe a los factores K dependientes, ocasionan hemorragias en ojos, boca y otros tejidos.(Julian,1997)

La coccidiosis, dependiendo de la especie ocasiona petequias en intestino. (McDougald,1997)

Hemostasia en los mamíferos y en las aves

La hemostasia se define como los mecanismo que evitan la pérdida de sangre por extravasación.

La presencia de las hemorragias en algunas de las enfermedades en aves pueden ser por alteración en la hemostasia primaria y/o secundaria. La hemostasia primaria involucra principalmente la fase vascular y la fase plaquetaria: **Fase vascular**, esta dada por daño endotelial, lo que ocasiona vasoconstricción temporal con reducción del flujo sanguíneo, favoreciendo la adhesión plaquetaria. **Fase plaquetaria**, en aves a estas células se les denomina trombocitos, estas células tienen una actividad semejante a las plaquetas de los mamíferos, ya que participan de manera importante en la formación del coágulo primario; una diferencia importante entre los trombocitos y las plaquetas, es que los primeros también cuentan con actividad fagocítica.

La hemostasia secundaria involucra a los factores de coagulación, que son glucoproteínas presentes de manera inactiva o en su forma precursora en sangre, el objetivo de la hemostasia secundaria es la formación de un coágulo de fibrina estable en los endotelios dañados. En los mamíferos se encuentran muy bien definido el sistema intrínseco, extrínseco y común de la coagulación. El sistema extrínseco es iniciado por el factor tisular o factor III no plasmático, que es una glucoproteína de transmembrana y no se detecta en endotelios normales. El factor tisular activa al factor VII (proconvertina) más Calcio forman un complejo, denominado complejo extrínseco, que activa al factor X (Stuart Prower) de la vía común. El sistema intrínseco inicia con activación del factor XII (Hageman), activación mediada por las plaquetas activas, exposición de las fibras de colágeno de los vasos sanguíneos y por interacción con la prekalicreina, el factor XII activa al factor XI (tromboplastina plasmática), se ha informado que el factor XII no es necesario para la hemostasia normal en otras especies. El factor XI más Calcio activa al factor IX (Christmas) y este cataliza la activación del factor X (Stuart Prower), esta última reacción se lleva a cabo en presencia del factor VIII activo (Antihemofílico), Calcio y Fosfolípido 3 (proviene de las plaquetas), formando el

complejo activador del sistema intrínseco. El factor X inicia la vía común y es el sitio donde convergen el sistema intrínseco y extrínseco.

En la vía común con activación del factor X y la activación del factor V (proacelerina) por efecto del factor II activo (trombina), se forma el complejo protrombinasa, este se une al factor plaquetario 3 y al Calcio, formando el complejo protrombinasa, que activa al factor II (protrombina) formando trombina, este último transforma el fibrinógeno (factor I) a monómeros de fibrina, formando la fibrina insoluble y gracias al factor XIII (factor estabilizador de la fibrina) que es activado por la trombina y es dependiente de Calcio se favorece la formación de la fibrina insoluble, que es la que ofrece estabilidad al coágulo. (Darien,2000; Jain,1993; Restrepo,1994)

En aves existen diferencias muy marcadas en la hemostasia secundaria al compararse con la de los mamíferos y estas radican principalmente en que la vía extrínseca es la más importante, debido a que el factor XII no ha sido detectado en el plasma aviar y el factor XI se ha encontrado en pequeñas cantidades y en algunas ocasiones ausente. Además se ha encontrado actividad reducida de los factores II y IX.(Darien,2000; Espada, 2000)

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el origen de las hemorragias en la enfermedad de influenza aviar, mediante la evaluación del hemograma, estudios de histopatología y microscopía electrónica de transmisión, mediante la evaluación de lesiones en los endotelios vasculares, los trombocitos y sus precursores en médula ósea.

Objetivos particulares del estudio

- Comprobar la presencia del virus de influenza aviar por medio del reaislamiento viral en los siguientes órganos: médula ósea, pulmón, riñón, encéfalo y proventrículo.
- Cuantificar el grado de trombocitopenia, mediante la estimación de trombocitos en frotis sanguíneos.
- Evaluar la vía extrínseca de la coagulación, para detectar si hay consumo excesivo de algunos factores de la coagulación que indiquen coagulación intravascular diseminada.
- Evaluar los cambios histológicos presentes en médula ósea, pulmón, riñón, encéfalo y proventrículo.
- Evaluar las lesiones endoteliales presentes en los órganos antes mencionados por medio de la utilización de la microscopía electrónica de transmisión.

HIPÓTESIS

- El virus de la influenza aviar ocasiona alteración en los trombocitos medulares y/o de sus precursores, lo que genera una trombocitopenia aguda y esto ocasiona la presencia de hemorragias.
- El virus de la influenza aviar afecta células endoteliales, lo que provoca lesión endotelial, por lo cual se incrementa el grado de las hemorragias.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ALOJAMIENTO

Se utilizó 51 aves Leghorn, libres de patógenos específico de 4 semanas de edad, de ambos sexos. Se constató la ausencia de anticuerpos séricos contra la enfermedad de Influenza aviar mediante la prueba serológicas de inhibición de la hemoaglutinación. Las aves infectadas y testigo se alojaron en diferentes unidades de aislamiento de alta seguridad, que contaban con filtros especializados, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Pecuarias (INIFAP) bajo condiciones controladas y recibieron alimento comercial y agua de bebida a libre acceso.

OBTENCIÓN DEL INOCULO VIRAL

Se utilizó la cepa A/CK/Querétaro/14588-19/95 H5N2 de influenza aviar de alta patogenicidad propiedad del INIFAP, posteriormente se realizaron 2 pases en embriones de pollo de 9 días de edad, de los cuales se recolectó líquido alantoideo que se utilizó para realizar una titulación del virus a 10^6 DLEP₅₀, según el método de Sperman Kärber.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Las 51 aves se dividieron en dos grupos, uno de ellos, denominado grupo A, constituido de 42 animales que fueron inoculados por vía oral con 0.2 ml de la cepa de influenza aviar A/CK/Querétaro/14588-19/95 H5N2 (título 10^6 DLEP₅₀/ml) de alta patogenicidad y el grupo B, que fue constituido por 9 aves testigo a las que se les administro 0.2 ml de solución salina fisiológica por la misma vía.

Durante el período experimental, las aves fueron evaluadas diariamente para detectar signos clínicos característicos de la enfermedad.

Las aves del grupo "A", se subdividieron en 7 grupos, dependiendo de la hora de observación a las 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 horas post inoculación (hpi),

de cada subgrupo se tomaron muestras sanguíneas de 6 aves. Tres aves del grupo testigo o "B" fueron muestreadas a las 24, 60 y 96 hpi. Se extrajo a cada ave 2 ml de sangre, vía yugular y se dividieron las muestras en 2 tubos. Para el hemograma se utilizó tubos con sales de etilendiaminotetracético (EDTA) en una proporción 1:10 (0.1 ml por cada ml de sangre) y para coagulación se emplearon tubos al vacío con citrato de sodio al 3.8% en proporción de 1:9. Las aves que se utilizaron para el muestreo, tanto del grupo "A" como las del grupo "B", se sacrificaron con una dosis letal de anestesia vía endovenosa con pentobarbital sódico y se obtuvieron muestras para el estudio histológico, para la microscopía electrónica y para el estudio virológico (reaislamiento viral).

HEMOGRAMA

Del hemograma se obtuvo lo siguiente:

- Hematócrito, para lo cual se llenó un tubo de microhematócrito 2/3 partes y se centrifugó a 15,000 g por 5 minutos.(Pierson,2000)
- Hemoglobina, se colocó 0.02ml de sangre en un tubo con 5ml de solución de Drabkin, dejando reposar 10 minutos, para promover la lisis de las células, posteriormente se centrifugó a 250 g por 10 minutos, para remover los núcleos y otros detritos celulares.(Pierson,2000)
- Estimación de trombocitos se evaluaron 5 campos del frotis sanguíneos, se obtuvo el promedio y se multiplicó por 3500.(Pierson,2000)
- Conteo de glóbulos rojos, se realizó una dilución 1:200 con la sangre y violeta de metilo 2B, se utilizó unas gotas de esta dilución para llenar la cámara de Neubauer y se evaluaron 5 de los cuadrantes centrales de la cámara utilizando el objetivo seco fuerte (400x), el total de células se multiplicó por 1×10^{12} , para obtener el resultado en cifras internacionales.(Pierson,2000)
- Conteo de leucocitos, se utilizó el mismo diluyente y la misma dilución que para los glóbulos rojos, el conteo se realizó en los 9 cuadrantes externos de la cámara de Neubauer, usando el objetivo seco fuerte (400x), el total de esta cuenta se multiplicó por 220 y se realizó una división entre 1000 para obtener el resultado por $10^9/L$.(Pierson,2000)

- Se realizó el diferencial de los glóbulos blancos evaluando los frotis sanguíneos y posteriormente se determinaron las cifras absolutas.(Pierson,2000)

TIEMPO DE PROTROMBINA (TP) COMO PARÁMETRO PARA EVALUAR COAGULACIÓN

Las muestras para coagulación se centrifugaron a 250 g por 10 minutos y el plasma obtenido se congeló a -70°C. Para la realización del TP, se obtuvo el reactivo de tromboplastina, a partir de los encéfalos de 6 pollos de 3 a 4 semanas de edad, los cuales se colocaron en un mortero estéril y frío, se agregó acetona helada y se maceraron, se dejó deshidratar el tejido cerebral toda la noche en el mortero y se almacenó en tubos de vidrio a -22 °C. Se reconstituyó la tromboplastina con solución salina al 0.85% y se colocó a baño María a 37°C, posteriormente se centrifugó esta solución, se separó el sobrenadante al que se le colocó un volumen igual de cloruro de calcio al 0.025M. Para determinar el tiempo de protrombina, se incubaron 200 µl de plasma citratado y 200 µl de reactivo de tromboplastina a 37°C por un minuto; posteriormente se tomó 100 µl del plasma ya incubado, que se agregó al reactivo, finalmente se esperó la formación del coagulo. La lectura se realizó en un coagulómetro (Trombotimer Organon Teknika). (Bigland,2000; Stopforth,1970; Bigland,1965)

ESTUDIO HISTOLÓGICO

De los animales sacrificados se realizó la necropsia y de cada animal se extrajo proventrículo, pulmón, riñón, encéfalo y médula ósea de la porción proximal del fémur, se fijaron con formalina al 10% amortiguada a pH de 7.2. Las muestras fueron incluidas en parafina y seccionadas a 4 micrómetros de espesor, se tiñeron con hematoxilina y eosina y se observaron en un microscopio óptico para su evaluación. La observación de los órganos de las aves desafiadas, se compararon con la de las aves del grupo testigo. (Swayne,1996)

ULTRAESTRUCTURA, MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Para el estudio ultraestructural se tomaran muestras de los órganos descritos en el apartado anterior. Estas se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato, pH 7.4 y se dividieron en secciones de 3 a 5mm, posfijadas en tetróxido de osmio al 1% durante 2 hrs, se deshidrataron en series de alcoholes y se incluyeron 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.(Luft,1961)

REISLAMIENTO VIRAL

El reislamiento viral se realizó a partir del pulmón, riñón, encéfalo, proventrículo y médula ósea de las aves del grupo testigo e infectadas en las diferentes horas de muestreo, para lo cual se utilizaron embriones de pollo de 9 días de edad, que fueron inoculados por cavidad alantoidea y se evaluó la viabilidad cada 12 horas a partir de la fecha de inoculación, por medio de la observación de los huevos al trasluz, posteriormente a los embriones muertos se les realizó la técnica de hemoaglutinación en placa.(Fenner,1992)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores obtenidos del hemograma (hematócrito, hemoglobina, eritrocitos, leucocitos, heterófilos, linfocitos, monocitos, basófilos) y del tiempo de protrombina, fueron evaluados mediante la prueba t de Student pareada y se determinó su nivel de significancia de $p < 0.01$. Los resultados obtenidos en el reislamiento viral se les aplicó χ^2 (Statgraphics 1998).

RESULTADOS

Durante el período experimental las aves del grupo desafiado "A" y del grupo testigo "B" se observaron diariamente, con el fin de detectar la aparición de algún signo clínico. Las aves del grupo testigo no mostraron signología de ningún tipo y no así el grupo de aves desafiadas, quienes presentaron signología a partir de las 36 hpi, en donde se observó que 15 animales de los 42 que se inocularon mostraron hipersensibilidad al ruido y a la luz, así como las plumas erizadas, también se presentó lagrimeo y edema de la cabeza. A las 48 hpi, 18 aves de las 42 desafiadas, además de los signos antes descritos, presentaron diarrea, crestas cianóticas, boqueo y disminución del apetito. A partir de las 60 hpi, se presentó cresta y barbilla necróticas, edema en cabeza y deshidratación, en las 42 aves desafiadas.

Mortalidad

Se murieron 2 aves a las 60 hpi y a las 72 hpi se murió 1 ave, lo que constituyó el 7.1% del total de las aves desafiadas.

HEMOGRAMA

En el estudio hematológico, el hematócrito presentó un incremento a las 48 hpi con respecto a las aves testigo ($p < 0.01$), las demás horas no presentaron diferencia significativa. Cuadro I

La determinación de hemoglobina y el conteo de eritrocitos no mostraron diferencia significativa con respecto al grupo testigo. Cuadro I

En el leucograma, se presentó leucocitosis en los diferentes muestreos a partir de las 36 hpi por heterofilia ($p < 0.01$). Cuadro II

El conteo absoluto de linfocitos no mostró diferencia significativa en los diferentes muestreos, sin embargo se observó un incremento del 20 y 40% de los linfocitos, con respecto al grupo testigo, a las 36 y a las 60 hpi respectivamente. Además se presentó linfopenia a partir de las 72 hpi del 34%.

Se observó monocitosis a partir de las 60 hpi en adelante ($P < 0.01$).

Los basófilos no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo de aves testigo. Cuadro II

COAGULACIÓN

Se observó la presencia de trombocitopenia a partir de las 24 hpi ($P < 0.01$) en las aves desafiadas al compararse con las aves testigo. Cuadro III

Los resultados del tiempo de protrombina (TP) no presentaron diferencia significativa en las diferentes horas de muestreo con respecto al grupo testigo ($P < 0.01$). Cuadro IV

REISLAMIENTO VIRAL

El reislamiento viral de los grupos testigo a las 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 hpi no presentaron mortalidad de los embriones, la observación se realizó hasta el quinto día. Cuadro V

Los embriones inoculados con los tejidos de proventrículo, pulmón, encéfalo y riñón, de las aves desafiadas, obtenidos del subgrupo de las 24 hpi, iniciaron la mortalidad a partir de las 48 hpi con una diferencia significativa ($p < 0.01$), en tanto que los embriones inoculados con la médula ósea no presentaron mortalidad. En tanto que los embriones inoculados con tejidos de las aves desafiadas de las 36 hpi en adelante presentaron mortalidad a partir de las 24 hpi, con una $p < 0.01$. Cuadro V

Los embriones muertos fueron positivos a la técnica de hemoaglutinación en placa.

HALLAZGOS A LA NECROPSIA

Los cambios macroscópicos más importantes de las aves desafiadas se presentaron a partir de las 36 hpi, en donde se observó congestión en riñones y pulmones, así como presencia de hemorragias petequiales en proventrículo y encéfalo, y a partir de las 60 hpi se detectó friabilidad renal.

HALLAZGOS HISTOLÓGICOS

Pulmón: Las aves del grupo testigo no presentaron cambios histológicos. Las aves del grupo "A" o desafiadas presentaron cambios desde las 36 hpi en donde se observó focos de proliferación celular de células epiteliales y linfocitos en los endotelios de los capilares aéreos en grado ligero, lo que corresponde a una neumonía intersticial (NI). A las 48 hpi se observan los mismos cambios, mientras que a las 60 hpi se presentaron múltiples focos hemorrágicos y algunos de distribución difusa, la NI es más difusa y en grado moderado. A partir de las 72 hpi la proliferación celular en los capilares aéreos es más evidente y difuso, lo que ocasiona que en algunas zonas se pierde la arquitectura del capilar . Figura 1

Proventrículo: Las aves del grupo testigo no presentan cambios histológicos. Las aves del grupo desafiado presentan cambios a partir de las 36 hpi, en donde se observaron múltiples focos pequeños hemorrágicos en la mucosa del órgano, así mismo se presentó un infiltrado compuesto por heterófilos, linfocitos y macrófagos distribuidos de manera difusa y en grado moderado, a diferencia de las 48 hpi, donde se observó un infiltrado en la mucosa del proventrículo compuesto principalmente de células mononucleares (linfocitos y macrófagos) con distribución difusa y de grado moderado. A las 60 hpi, no se observan otros cambios de los antes descritos, mientras que a partir de las 72 hpi, se presentó una disminución del infiltrado mononuclear y se observó una proliferación ligera de tejido conectivo fibroso en la lamina propia.

Riñón: Las aves del grupo testigo no presentaron cambios histológicos. En las aves del grupo desafiado las lesiones se observaron a partir de las 60 hpi, éstas lesiones consistieron en múltiples focos pequeños de hemorrágicos de grado que variaba entre ligeros a moderados en vasos sanguíneos intersticiales perilobulares, así mismo se observan imágenes de necrosis epitelial en túbulo renales (túbulo proximal, túbulo distal y túbulo colector).

Médula ósea: Las aves del grupo testigo o grupo "B" no presentaron alteraciones histológicas. Las aves del grupo "A" o desafiado, al compararse con las del grupo B, presentan alteraciones desde las 36 hpi, en donde se observó una hiperplasia celular que involucró principalmente la línea linfocítica, granulocítica (heterófilos), eritrocítica y trombocítica, las células de estas líneas se encontraban en diferentes fases de maduración. A partir de las 48 hpi, además del aumento generalizado en el número de células, se observó que los linfocitos se agrupaban en nódulos hiperplásicos distribuidos en el tejido medular. Figura 3 y 4

Encéfalo: En las aves del grupo testigo no se observaron cambios histológicos. Las aves del grupo desafiado presentaron cambios a partir de las 48 hpi, en donde se observó infiltrado de linfocitos en el espacio de Virchow-Robin de los vasos sanguíneos de la zona cortical extendiéndose de manera discreta hacia el parénquima, así mismo la pared de algunos vasos sanguíneos presentaron degeneración hialina. En zonas paraventriculares se observaron algunos focos discretos de gliosis. A las 60 hpi no se observaron cambios diferentes a los ya mencionados, mientras que a las 72 hpi se presentó hemorragias en grado moderado en vasos corticales y sin la presencia de infiltrado linfocitario perivascular. A las 84 hpi se presentaron hemorragias de vasos de la zona cortical, además de focos de gliosis en la misma zona. A las 96 hpi, se presentó focos discretos de infiltrado perivascular en zona cortical y algunos focos de gliosis.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Pulmón: En las aves testigo no se observan alteraciones en microscopia electrónica. En las aves del grupo "A" o desafiado a partir de las 24 hpi en células endoteliales no se observan alteraciones en microscopía electrónica.

A las 24 y 36 hpi se observó una vacuolización de las células epiteliales de los capilares aéreos. A las 48 hpi no se observan otros cambios a lo descrito anteriormente. A las 60 y 72 hpi se presentó un incremento en la presencia de

heterófilos y a partir de las 84 hpi se observó necrosis y proliferación de tejido fibroso.

Riñón: Las aves del grupo "B", no presentaron alteraciones a nivel de microscopia electrónica.

Las aves del grupo "A" o desafiadas presentaron edema de células endoteliales a las 24 hpi, mientras que a las 36, 48 y 60 hpi no se observan cambios diferentes a los ya mencionados; a partir de las 72 hpi se observó una disminución del daño endotelial.

A las 24 hpi se observó una vacuolización en las células del epitelio tubular, a las 36 hpi se presentó tumefacción en mitocondrias e hiperplasia del retículo endoplásmico formando remolinos, a las 48 hpi se observó aparato de Golgi dilatado, así como una degeneración hidrópica.

En las observaciones de microscopia electrónica de médula ósea, encéfalo y proventrículo no se observan cambios con respecto al grupo testigo.

DISCUSIÓN

Los signos clínicos que se observaron en las aves en este estudio, como el edema, la cianosis y necrosis de cresta, etc., concuerdan con lo informado en la literatura para cepas altamente patógenas. (Esterday,1997; Swayne,1997; Mcferran,1993; Brown,1992; Mo,1997)

Swayne, 1997, informa que las aves inoculadas con la cepa A/CK/Querétaro/14588-19/95, presentaron edema de la cabeza, cresta y barbilla, al igual que en este experimento.

En lo referente a la mortalidad, esta varía en tiempo según lo informado en la literatura, algunos autores mencionan que puede asociarse al tipo de cepa empleada, al número de pases que sufrió la misma, así como a la edad de las aves utilizadas en los diferentes experimentos. En el presente estudio las aves murieron a partir de las 60 hpi, mientras que en el experimento de Capua,1999, al inocular vía endovenosa, la mortalidad se inició a las 24 y a las 48 horas después de las primeras manifestaciones de los signos clínicos; en tanto Brown,1992, al inocular en sacos aéreos, informa una mortalidad a partir de las 24 hpi y en el estudio de Mo,1997, quien inoculó intratraquealmente, observó que la mortalidad se presentó dentro de los 6 días post inoculación. Swayne, 1997 utilizando la cepa A/CK/Querétaro/14588-19/95, mediante inoculación endovenosa, no informa el momento en el que se inicia la mortalidad de las aves desafiadas. Es importante resaltar que la variación en el tiempo en que se presentó la mortalidad en este estudio, dependió de la vía de inoculación, ya que en esta investigación se prefirió una vía más natural, la oral y esto pudo influir en los diferentes tiempos en los que se presentó la mortalidad en los estudios antes mencionados.

En el hemograma, hubo un incremento del hematócrito a las 48 hpi, con respecto al grupo testigo, lo cual se puede relacionar a una eritrocitosis relativa, ya que en este periodo posinfección, se presentó una disminución en el consumo de agua y de alimento en las aves desafiadas. Posteriormente, la eritrocitosis se enmascaró para las 60,72,84 y 96 hpi, debido a la aparición de hemorragias en las

aves desafiadas durante todo el desarrollo de la enfermedad. La anemia enmascarada por eritrocitosis es un fenómeno muy común que ocurre en perros. Jain, 1993

En el leucograma, se presentó monocitosis a partir de las 60 hpi, Allen,1982 y Kastner,1999 informan incremento de monocitos en estudios hematológicos en caballos infectados con el virus de influenza, donde sugieren que los monocitos juegan un papel importante en la defensa de las infecciones virales. Campbell,1995 informa que la monocitosis en aves también se puede presentar en situaciones donde se presenta necrosis masiva de tejido y en este estudio al observarse focos de necrosis epitelial en túbulos renales del riñón en el estudio histológico, es factible que la monocitosis se este presentando por los dos factores antes mencionados.

El incremento de heterófilos se relaciona al proceso inflamatorio que desarrollaron los animales en el transcurso de la enfermedad, lo cual se pudo observar en el estudio histológico al encontrarse focos de hemorragia e infiltraciones inflamatorias en los diferentes tejidos de las aves infectadas. Campbell ,1995 y Harmon,1998 informan que la respuesta de los heterófilos en procesos inflamatorios en las aves es similar a la respuesta de los neutrófilos de los mamíferos, a diferencia que los heterófilos no producen procesos purulentos.

Se observó incremento de linfocitos a las 36 hpi y 60 hpi, que en este estudio se encuentra relacionado a la hiperplasia linfocitaria que se encontró en médula ósea. Zitzow,2002 informa que en su estudio con hurones infectados con el virus de influenza, se presentó linfopenia a partir de 72 hpi, con un posterior incremento del número de linfocitos a partir de las 120 hpi.

La linfopenia ya se ha informado en estudios en caballos infectados con el virus de influenza, la cual se presenta a partir de las 96 hpi, mientras que en este estudio la linfopenia se manifestó a partir de las 72 hpi.(Krumrych,1999)

El origen de la linfopenia se ha sugerido como un daño indirecto a los linfocitos, (Campen,1989) así mismo se menciona que puede relacionarse con la liberación de glucocorticoides endógenos.(Mo,1997; Swayne) Estudios recientes realizados en cultivos celulares indican que la presencia de linfopenia se relaciona con la inducción de apoptosis por activación de las caspasas como consecuencia de la presencia del virus, (Nichols,2001) en este trabajo no se observó este fenómeno en la evaluación ultraestructural, por lo que cabe la posibilidad de que la linfopenia presente se pueda relacionar a la liberación de esteroides endógenos, más que a un daño de los linfocitos por apoptosis.

Los basófilos no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo testigo, hecho referido por Krumrych,1999 en su estudio en caballos infectados con el virus de influenza, el cual tampoco observó cambios en los basófilos.

La disminución de los trombocitos presente en los animales infectados en las diferentes horas post infección demuestra que existe una alteración en la hemostasia primaria, esta trombocitopenia fue evidente a pesar de que en la observación histológica de médula ósea se observa un incremento de la línea trombocítica. La reducción de los trombocitos circulantes en este experimento se puede relacionar a la presencia de las hemorragias que presentaron las aves durante el curso de la enfermedad, lo que ocasiona una pérdida de estos elementos de la sangre. Jain,1993 y Darien,2000 han informado trombocitopenia en mamíferos a causa de hemorragias agudas, y Grindem,1994 en un estudio realizado en perros observó que dentro del 52% de las causas más comunes de trombocitopenia, el 5% se relaciona a disminución de plaquetas a consecuencia de las hemorragias.

Jain,1993 también informa que en enfermedades virales se puede llegar a presentar incremento en la destrucción de las plaquetas por la presencia de virus. En este estudio al no existir alteraciones ultraestructurales en los trombocitos y/o sus precursores en médula ósea no se confirmó un daño de estas células por efecto directo del virus de la influenza aviar sobre esta línea celular, semejante a

lo informado en otras enfermedades como es el caso de la fiebre porcina clásica, en donde la trombocitopenia presente en estos animales se relaciona a daño directo en megacariocitos y/o sus precursores.(Calderón,1998)

En otros estudios, sobre influenza en caballos Krumrych,1999 relaciona la trombocitopenia a la participación de estas células en la formación de coágulos, sugiriendo alteración de la hemostasia secundaria, de la misma manera Capua,1999; Silvano,1997; Kobayashi,1996 al informar daño endotelial y presencia de antígeno viral presente en endotelios vasculares de todos los tejidos en aves infectadas con cepas de influenza aviar de alta patogenicidad hacen sugerir que estos animales pueden desencadenar una coagulopatía por alteración de la hemostasia secundaria; sin embargo, en esta investigación, al no presentarse prolongaciones en el TP se descarta la idea de la alteración en la hemostasia secundaria, a pesar de que se observaron focos hemorrágicos en pulmón, riñón, proventrículo y sistema nervioso, hecho que hace presumir la existencia de daño endotelial, mismo que en la microscopía electrónica se confirmó por la presencia de edema en las células endoteliales del riñón y que en este estudio se asocia a la inyección viral de endotelios vasculares en las aves desafiadas, cabe indicar que no se demostró la presencia del virus a través de la microscopía electrónica en los órganos antes mencionados. Resulta importante precisar que la lesión endotelial presente en las aves desafiadas no derivó en una coagulación intravascular diseminada, al no presentarse alteración en el tiempo de protrombina, descartándose así una alteración en la hemostasia secundaria, desencadenada por el virus de influenza aviar, semejante a lo que Skeeles,1980⁴⁸ informó en aves con infección de la bolsa de Fabricio. Las hemorragias en las aves infectadas con el virus de influenza aviar de alta patogenicidad se relacionan a una alteración de la hemostasia primaria en las aves desafiadas, más que a una alteración de la hemostasia secundaria y la lesión endotelial presente favoreció la presencia de las mismas.

Las lesiones macroscópicas que se presentaron en este experimento, por ejemplo la hemorragia del proventrículo concuerdan con lo informado en la literatura.(Capua,2000; Swayne,1997)

En cuanto a los cambios histológicos encontrados en pulmón concuerdan con lo que Kobayashi,1996 informa en su estudio en donde observó neumonía en la mayoría de las aves, sin embargo, otros hallazgos como edema y focos necróticos no se observaron en nuestro estudio, esto se puede deber a que Kobayashi, utilizó una cepa H5N1 de alta patogenicidad en su investigación. En los estudios realizados por Swayne,1997 con la misma cepa viral que se utilizó en este experimento informó neumonía intersticial de leve a moderada, al igual que en este estudio. Con otras cepas virales de influenza aviar de alta patogenicidad Zitzow,2002 ha informado neumonía intersticial, al igual que en este estudio.

En proventrículo Kobayashi,1996 informa proventriculitis, al igual que hemorragia multifocal ligera y en este estudio se observan lesiones parecidas.

Las lesiones hemorrágicas presentes en riñón, concuerdan con los hallazgos de Suárez,1998 en su investigación y las asoció a un daño endotelial; mientras que Mo,1997 señala que aves inoculadas con cepas altamente patógenas desarrollan necrosis multifocal en túbulo proximal, distal y colector; para las observaciones de Swayne,1997 utilizando la misma cepa que en este estudio, no observó inflamación en los riñones de las aves afectadas, como las presentes en este estudio.

En médula ósea Barnes,1999 informa hiperplasia de células hematopoyéticas en pollos infectados experimentalmente, con una cepa virulenta H5N2, en este experimento se observó igualmente una hiperplasia hematopoyética, con presencia de nódulos linfocitarios, que a pesar de que en la cuenta absoluta de linfocitos no se presentó diferencia significativa, con respecto al grupo testigo, se observó una linfocitosis del 20% y 40% a las 36 y 60 hpi respectivamente, que puede estar relacionado al hallazgo histopatológico de médula ósea.

Los cambios en sistema nervioso central son compatibles con lo que describe Kobayashi,1996, en donde asocia la microgliosis y las lesiones en vasos, a la presencia del virus en vasos sanguíneos, mismo que determinó por estudios inmunohistoquímicos; mientras en el estudio de Mo,1997 al igual que en este estudio informa la encefalitis linfocitaria perivascular, así como la gliosis.

En el reaislamiento viral realizado en pulmón, proventrículo, riñón, médula ósea y encéfalo de las aves del grupo testigo al no observarse muerte de los embriones, se descarta la idea de que las aves sufrieron algún tipo de infección, no así para las aves desafiadas en las cuales se observó mortalidad de los embriones y en la realización de la técnica de hemoaglutinación en placa se constató la presencia del virus de influenza aviar en esto órganos. Fenner, 1992

CONCLUSIONES

- I. Se comprobó la presencia del virus de influenza aviar en pulmón, riñón, proventrículo, encéfalo y médula ósea, de las aves desafiadas, por medio del reaislamiento viral.
- II. En aves con influenza aviar, se presentó trombocitopenia desde las primeras horas post inoculación, lo que indica una alteración de la hemostasia primaria.
- III. Las lesiones endoteliales fueron evidentes en riñón a través del uso de la microscopía electrónica, mientras que en pulmón, proventrículo y encéfalo la lesión endotelial fue presumible por la presencia de hemorragias en estos órganos, lo que incrementa el grado de las hemorragias
- IV. A través de la microscopía electrónica no se observó daño directo a trombocitos y/o sus precursores, que indicara que fuera la causa directa de las hemorragias en las aves desafiadas.
- V. Al evaluar la vía extrínseca de la coagulación en las aves inoculadas con la cepa A/CK/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) de alta patogenicidad, no se observó alteración de la hemostasia secundaria en las aves desafiadas, ya que no se detectaron cambios en el TP.
- VI. Las hemorragias en las aves infectadas con el virus de influenza aviar de alta patogenicidad se relacionan más a una alteración de la hemostasia primaria en las aves desafiadas, más que a una alteración de la hemostasia secundaria y la lesión endotelial presente favoreció la presencia de las mismas.

REFERENCIAS

1. Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal. Bioseguridad, la mejor defensa contra la Influenza Aviar. México (D.F):DINESA, 1996
2. Rott R. The pathogenic determinant of Influenza virus 1992, 33: 303-310.
3. Capua I, Marangon s, Selli L, Alexander DJ, Swayne DE, Pozza MD, Parenti E, Cancellotti FM. Outbreaks of highly pathogenic avian influenza (H5N2) in Italy during October 1997 to January 1998. Avian Pathology 1999, 28: 455-460.
4. Suarez DL, Perdue ML, Cox N, Rowe T, Bender C, Huang J, Swayne DE. Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. Journal of Virology 1998, 72: 6678-6688.
5. Silvano FD, Yoshikawa M, Shimada A, Otsuki K, Umemura T. Enhanced neuropathogenicity of avian influenza A virus by passages through air sac and brain of chicks. J. Vet. Med. Sci 1997, 59: 143-148.
6. Darien B. Acquired coagulopathy. In: Feldman FB, Zinkl JG, Jain NC. Schalm's veterinary hematology. 5 ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2000: 574 - 579.
7. Jain NC. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993: 82-104.
8. Barnes JH. Hemic system. In: The American Association of Avian Pathologists. Avian histopathology. 2d ed. Canada. American Association of Avian Pathologists, 1999:1-17.
9. Slemons RD, Swayne DE. Nephrotropic properties demonstrated by A/chicken/Alabama/75 (H4N8) following intravenous challenge of chickens. Avian Diseases 1992, 36: 926-931.
10. Calderón NL. Patogénesis de la diátesis hemorrágica en la fiebre porcina clásica aguda. México 1998. (Tesis Doctorado, FMVZ-UNAM)
11. Suarez DL, Schultz-cherry S. Immunology of avian influenza virus: a review. Developmental and Comparative Immunology 2000, 24: 269-283.
12. Esterday BC, Hinshaw VS, Halvorson DA. Influenza. In: Calnek BW. Diseases of poultry. 10 ed. USA: Iowa State University Press, 1997: 583 - 605.

13. Swayne DE. Pathobiology of H5N2 Mexican avian Influenza Virus infections of chickens. *Vet Pathol* 1997, 34: 557-567.
14. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM. Evaluation and Ecology of Influenza A viruses. *Microbiological Reviews* 1992, 56: 152-179.
15. Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, Pearson JE, Suss J, Lipkind M, Kida H, Webster RG. Survey the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a Marker of pathogenicity potential. *Avian Diseases* 1996, 40: 425 –437.
16. McFerran JB, McNulty MS. *Virus infections*. New York: Elsevier Science Publisher B.V., 1993: 287 - 316.
17. Davison S, Galligan D, Eckert TE, Ziegler AF, Eckroadde RJ. Economic analysis of an outbreak of avian influenza, 1997-1998. *JAVMA* 1999, 214: 1164-1167.
18. Capua I, Marangon S. The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a review. *Avian Pathology* 2000, 29: 289-294.
19. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. *Veterinary Virology*. 3rd ed. New York: Academic Press, 1999.
20. Silvano FD, Yoshikawa M, Shimada A, Otsuji K, Umemura T. Enhanced neuropathogenicity of avian Influenza A virus by passages through air sac and brain of chicks. *J. Vet. Med. Sci* 1997, 59: 143 –148.
21. Kobayashi Y, Horimoto T, Kawaoka Y, Alexander DJ, Itakura C. Pathological studies of chickens experimentally infected with two highly pathogenic avian influenza viruses. *Avian Pathology* 1996, 25: 285-304.
22. Galindo MF. *Patogenesis de las hemorragias en la enfermedad de Newcastle (tesis de maestría)*. México, D.F: UNAM, 2001.
23. Lukert PD, Saif YM. Infectious bursal disease. In: Calnek BW. *Diseases of poultry*. 10 ed. USA: Iowa State University Press, 1997: 721-738.
24. McFerran JB. Adenovirus infections. In: Calnek BW. *Diseases of poultry*. 10 ed. USA: Iowa State University Press, 1997: 607-618.
25. Bulow VV, Schat KA. Chicken Infectious anemia. In: Calnek BW. *Diseases of poultry*. 10 ed. USA: Iowa State University Press, 1997: 739-756.

26. Rimler RB, Glisson JR. Fowl cholera. In: Calnek BW. Diseases of poultry. 10 ed. USA: Iowa State University Press, 1997: 143 - 159.
27. Julian RJ, Brown TP. Other toxins and poisons. In: Calnek BW. Diseases of poultry. 10 ed. USA: Iowa State University Press, 1997: 979-1005.
28. McDougald LR, Reid WM. Coccidiosis. In: Calnek BW. Diseases of poultry. 10 ed. USA: Iowa State University Press, 1997: 865-883.
29. Restrepo A, Campuzano G, Falabella F, Layrisse M. Hematología. 4ta ed. Colombia: Corporación para investigaciones biológicas, 1994.
30. Espada Y. Avian Hemostasis. In: Feldman FB, Zinkl JG, Jain NC. Schalm's veterinary hematology. 5 ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2000: 552 - 555.
31. Pierson FW. Laboratory techniques for avian hematology. In: Feldman FB, Zinkl JG, Jain NC. Schalm's veterinary hematology. 5 ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2000: 1145 - 1146.
32. Bigland CH, Triantaphyllopoulos DC. Chicken prothrombin, thrombin and fibrinogen. Am J. Physiol 2000, 5: 1013 – 1017.
33. Stopforth A. A study of coagulation mechanisms in domestic chickens. J. Comp. Path. 1970, 80: 525 – 533.
34. Bigland CH, Starr RM. Comparison of simple blood coagulation test in birds. Can. Vet. Jour 1965, 6: 233-236.
35. Luft JH. Improvent in epoxy resin embedding method. J. biophys. Biochem. Cytol. 1961, 9: 409 –414.
36. Fenner F, Bachmann PA, Gibbs EPJ, Murphy FA, Studdert MJ, White DO. Virología Veterinaria. España: Acribia, 1992.
37. Brown CC, Olander HJ, Senne DA. A patogénesis study of highly pathogenic avian Influenza Virus H5N2 in Chickens, using immunohistochemistry. J. Comp. Path. 1992, 107: 341-348.
38. Mo IP, Brugh M, Fletcher OJ, Rowland GN, Swayne DE. Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian Influenza Viruses of low and high pathogenicity. Avian Diseases 1997, 41: 125 – 136.

39. Allen BV, Frank CJ. Haematological changes in 2 ponies before and during an infection with equine influenza. *Equine Veterinary J* 1982, 14: 171-172.
40. Kastner SBR, Haines DM, Archer J, Townsend HGG. Investigations on the ability of clenbuterol hydrochloride to reduce clinical signs and inflammation associated with equine influenza A infection. *Equine Veterinary Journal* 1999, 31: 160-168.
41. Campbell TW. *Avian hematology and cytology*. 2nd ed. Iowa: Iowa State University Press, 1995.
42. Harmon BG. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Science* 1998, 77: 972 – 977.
43. Zitzow LA, Rowe T, Morken T, Shieh WJ, Zaki S, Katz JM. Pathogenesis of avian Influenza A (H5N1) viruses in ferrets. *J. of Virol.* 2002, 76: 4420-4429.
44. Krumrych W, Wisniewski E, Dabrowska J, Danek J. Haematological parameters in the course of equine influenza. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 1999, 43: 147-154.
45. Campen HV, Easterday BC, Hinshaw VS. Destruction of lymphocytes by a virulent avian Influenza A Virus. *J. Gen. Virol.* 1989, 70: 467-472.
46. Swayne DE, Beck JR, Perdue ML, Brugh M, Slemons RD. Assessment of the ability of ratite-origin influenza viruses to infect and produce disease in rheas and chickens. *Avian diseases* 1996, 40: 438-447.
47. Nichols JE, Niles JA, Norbert J, Roberts JR. Human Lymphocyte apoptosis after exposure to Influenza A virus. *Journal of Virology* 2001, 73: 5921-5929.
48. Grindem CB, Breitschwerdt EB, Corbett WT, Jans HE. Epidemiologic survey of thrombocytopenia in dogs: a report on 987 cases. *Veterinary Clinical Pathology* 1994, 20: 38-43.
49. Skeeles JK, Slavik M, Beasley JN, Brown AH, Meinecke CF, Maruca S, Welch S. An age-related coagulation disorder associated with experimental infection with infectious Bursal disease virus. *Am. J. Vet. Res* 1980, 41: 1458-1461.

CUADRO I. Resultados del hematócrito (HT), hemoglobina (HB) y de eritrocitos (GR) en sangre de aves testigo e infectadas con el virus de Influenza Aviar H5N2 de alta patogenicidad (Media \pm Desviación estándar)

Grupo	n=51	HPI	HT	HB	GR
Testigo	3	24	0.26 \pm 0.04	96.56 \pm 4.86	2.24 \pm 0.46
Testigo	3	60	0.27 \pm 0.05	95.62 \pm 5.73	2.23 \pm 0.48
Testigo	3	96	0.26 \pm 0.03	98.30 \pm 11.60	2.21 \pm 0.46
1	6	24	0.33 \pm 0.05	97.5 \pm 15.4	2.35 \pm 0.2
2	6	36	0.28 \pm 0.05	94.5 \pm 4.76	2.40 \pm 0.08
3	6	48	0.35 \pm 0.05*	100.33 \pm 8.4	2.3 \pm 0.53
4	6	60	0.30 \pm 0.03	96 \pm 2.7	2.39 \pm 0.03
5	6	72	0.30 \pm 0.05	94.17 \pm 5.81	2.02 \pm 0.4
6	6	84	0.26 \pm 0.07	90.5 \pm 24.74	2.03 \pm 0.81
7	6	96	0.29 \pm 0.05	97.83 \pm 15.98	2.02 \pm 0.52

Grupo testigo: no infectado, sólo inoculado con 0.2 ml de SSF vía oral por ave

HPI: Horas posinfección en las que fueron sacrificadas las aves de cada grupo para la obtención de las muestras. Las aves fueron infectadas por vía oral con 0.2 ml por ave del virus de la enfermedad de Influenza Aviar H5N2 de alta patogenicidad, cepa A/CK/Querétaro/14588-19/95.

HT: hematócrito en L/L

HB: hemoglobina g/L

GR: eritrocitos 10^{12} /L

* diferencia significativa comparado con el grupo testigo ($P < 0.01$).

CUADRO II. Resultados del conteo de leucocitos y cifras absolutas en sangre de aves testigo e infectadas con el virus de Influenza Aviar H5N2 de alta patogenicidad (Media \pm Desviación estándar)

Grupo	n=51	HPI	GB	Heterófilos	Linfocitos	Monocitos	Basófilos
Testigo	3	24	5.81 \pm 2.69	1.61 \pm 0.92	3.87 \pm 1.95	0.21 \pm 0.16	0.12 \pm 0.11
Testigo	3	60	5.75 \pm 2.59	1.55 \pm 0.80	3.87 \pm 1.95	0.2 \pm 0.15	0.12 \pm 0.12
Testigo	3	96	5.64 \pm 2.54	1.5 \pm 0.77	3.83 \pm 1.94	0.19 \pm 0.15	0.12 \pm 0.11
1	6	24	8.33 \pm 2.4	3.62 \pm 1.5	3.47 \pm 0.7	0.47 \pm 0.23	0.32 \pm 0.2
2	6	36	20.25 \pm 8.9*	14.77 \pm 9.2	4.65 \pm 1.1**	0.53 \pm 0.7	0.3 \pm 0.3
3	6	48	14.73 \pm 4.9*	10.73 \pm 4.2	3.6 \pm 1.2	0.3 \pm 0.3	0.1 \pm 0.1
4	6	60	21.45 \pm 5.7*	14.93 \pm 4.4	5.42 \pm 1.9**	0.82 \pm 0.4*	0.28 \pm 0.2
5	6	72	14.5 \pm 10.5*	10.68 \pm 9.4	2.57 \pm 1.2	1.22 \pm 0.9*	0.03 \pm 0.05
6	6	84	11.05 \pm 2.2*	7.25 \pm 2.3	2.8 \pm 0.8	0.92 \pm 0.6*	0.08 \pm 0.07
7	6	96	14.75 \pm 3.8*	10.48 \pm 2.7	2.62 \pm 0.9	1.62 \pm 0.6*	0.03 \pm 0.05

Grupo testigo: no infectado, sólo inoculado con 0.2 ml de SSF vía oral por ave

HPI: Horas posinfección en las que fueron sacrificadas las aves de cada grupo para la obtención de las muestras. Las aves fueron infectadas por vía oral con 0.2 ml por ave del virus de la enfermedad de Influenza Aviar H5N2 de alta patogenicidad, cepa A/CK/Querétaro/14588-19/95.

GB: Leucocitos x 10⁹/L

* representa diferencia significativa comparado con el grupo testigo (P < 0.01).

** Implica una diferencia no significativa del 20% y 40% a las 36 hpi y 60 hpi respectivamente, al compararse con el grupo testigo

Cuadro III. Resultados del los valores promedio \pm DE de trombocitos de aves testigo e infectadas con la cepa de influenza aviar H5N2 (título 10^6 DLEP₅₀/ml) de alta patogenicidad.

Grupo	n=51	HPI	Trombocitos
Testigo	3	24	18.77 \pm 3.9
Testigo	3	36	18.94 \pm 3.8
Testigo	3	96	18.71 \pm 3.9
1	6	24	14.22 \pm 2.26*
2	6	36	10.75 \pm 2.63*
3	6	48	11.87 \pm 4.86*
4	6	60	9.17 \pm 1.35*
5	6	72	8.4 \pm 3.88*
6	6	84	7.8 \pm 1.85*
7	6	96	7.82 \pm 2.01*

DE: Desviación estándar

Grupo testigo: no infectado, sólo inoculado con 0.2 ml de SSF vía oral por ave

HPI: Horas posinfección en las que fueron sacrificadas las aves de cada grupo para la obtención de las muestras. Las aves fueron infectadas por vía oral con 0.2 mL por ave del virus de la enfermedad de Influenza Aviar H5N2 de alta patogenicidad, cepa A/CK/Querétaro/14588-19/95.

Trombocitos x 10^9 /L

* representa diferencia significativa comparado con el grupo testigo (P < 0.01).

Cuadro IV. Resultado promedio \pm DE del tiempo de protrombina de aves testigo e infectadas con la cepa de influenza aviar H5N2 (título 10^6 DLEP₅₀/ml) de alta patogenicidad.

Grupo	n=51	HPI	TP
Testigo	3	24	21.42 \pm 4.53
Testigo	3	36	21.8 \pm 4.53
Testigo	3	96	21.79 \pm 4.67
1	6	24	17.84 \pm 3.56
2	6	36	20.58 \pm 1.24
3	6	48	20.45 \pm 4.30
4	6	60	21.18 \pm 1.99
5	6	72	18.96 \pm 5.07
6	6	84	20.15 \pm 1.79
7	6	96	21.68 \pm 2.13

DE: Desviación estándar

Grupo testigo: no infectado, sólo inoculado con 0.2 ml de SSF vía oral por ave

HPI: Horas posinfección en las que fueron sacrificadas las aves de cada grupo para la obtención de las muestras. Las aves fueron infectadas por vía oral con 0.2 ml por ave del virus de la enfermedad de Influenza Aviar H5N2 de alta patogenicidad, cepa A/CK/Querétaro/14588-19/95.

TP: Tiempo de protrombina en segundos

No se presentó diferencia significativa comparado con el grupo testigo ($P < 0.01$).

Cuadro V. Reaislamiento viral y porcentaje de positividad a la hemoaglutinación en aves testigo e infectadas con el virus H5N2 de influenza aviar de alta patogenicidad.

GRUPO	HPI	PULMÓN	RINÓN	MO	PV	ENCÉFALO
Testigo	-	5 ^a /0 (0%)	5/0 (0%)	5/0 (0%)	5/0 (0%)	5/0 (0%)
1	24	5/5 (100%)*	5/4 (80%)*	5/0 (0%)	5/4 (80%)*	5/2 (40%)*
2	36	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*
3	48	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*
4	60	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*
5	72	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*
6	84	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*
7	96	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)*

Grupo testigo: no infectado, sólo inoculado con 0.2 ml de SSF vía oral por ave

HPI: Horas posinfección en las que fueron sacrificadas las aves de cada grupo para la obtención de las muestras. Las aves fueron infectadas por vía oral con 0.2 ml por ave del virus de la enfermedad de Influenza Aviar H5N2 de alta patogenicidad, cepa A/CK/Querétaro/14588-19/95.

^a Número total de embriones inoculados/número de embriones positivos a la hemoaglutinación.

* indica diferencia significativa (p<0.01)

Figura 1. Pulmón 60 hpi de ave Leghorn desafiada con la cepa H5N2 de Influenza aviar de alta patogenicidad. Neumonía intersticial moderada, 400x (Flecha).

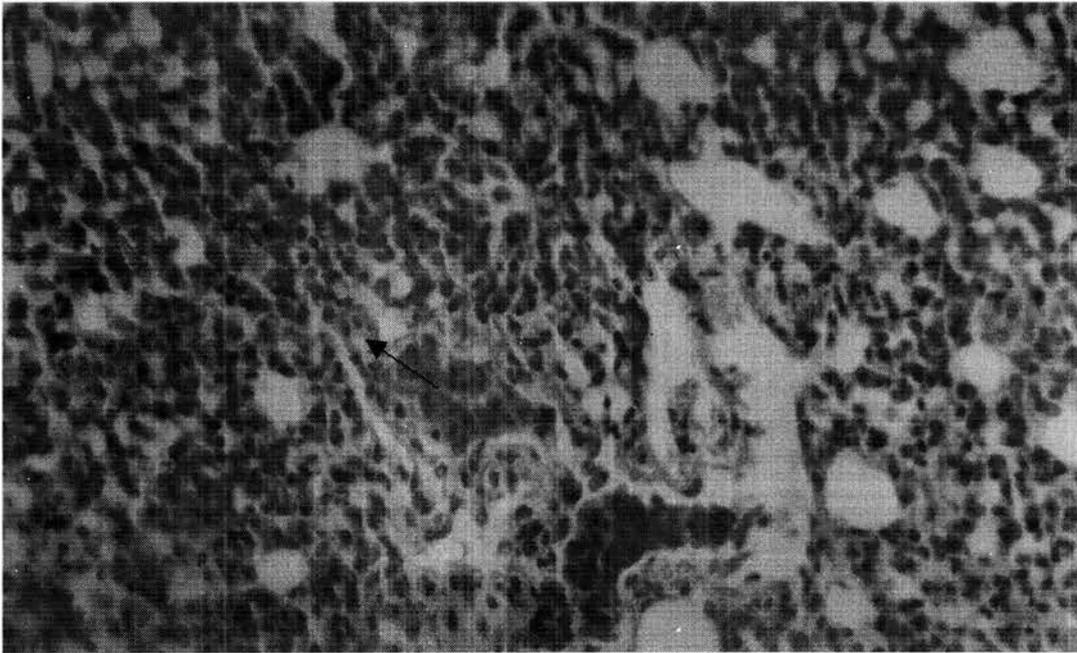


Figura 2. Médula ósea a las 48 hpi de ave Leghorn inoculada con la cepa H5N2 de alta patogenicidad. Nódulo de hiperplasia linfocitaria, 400x (flecha).

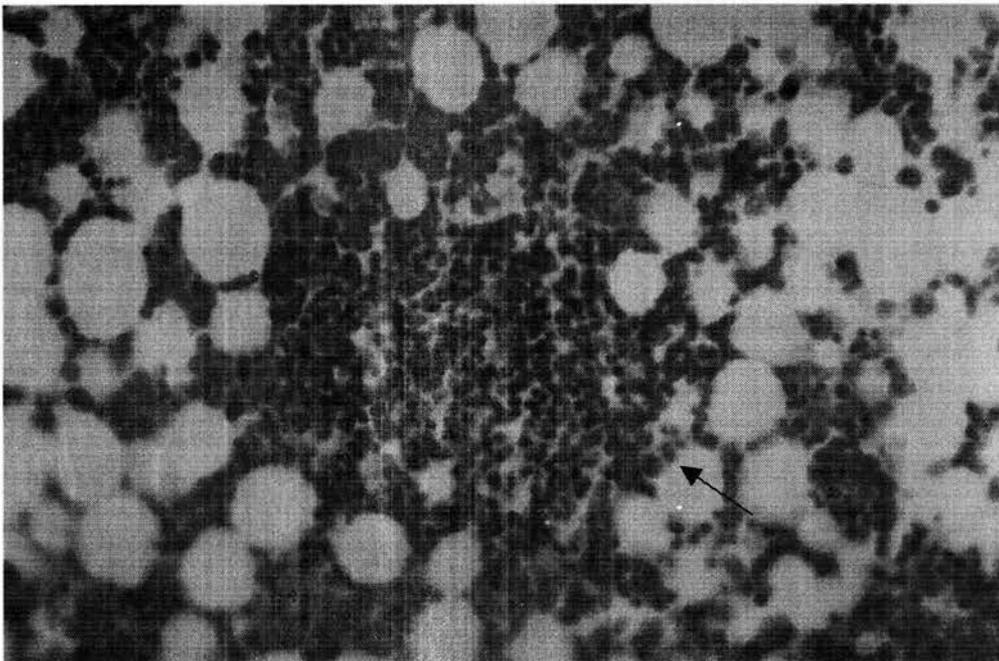


Figura 3. Médula ósea a las 72 hpi de ave Leghorn inoculada con la cepa H5N2 de alta patogenicidad. Hiperplasia hematopoyética, 400x (Flecha).

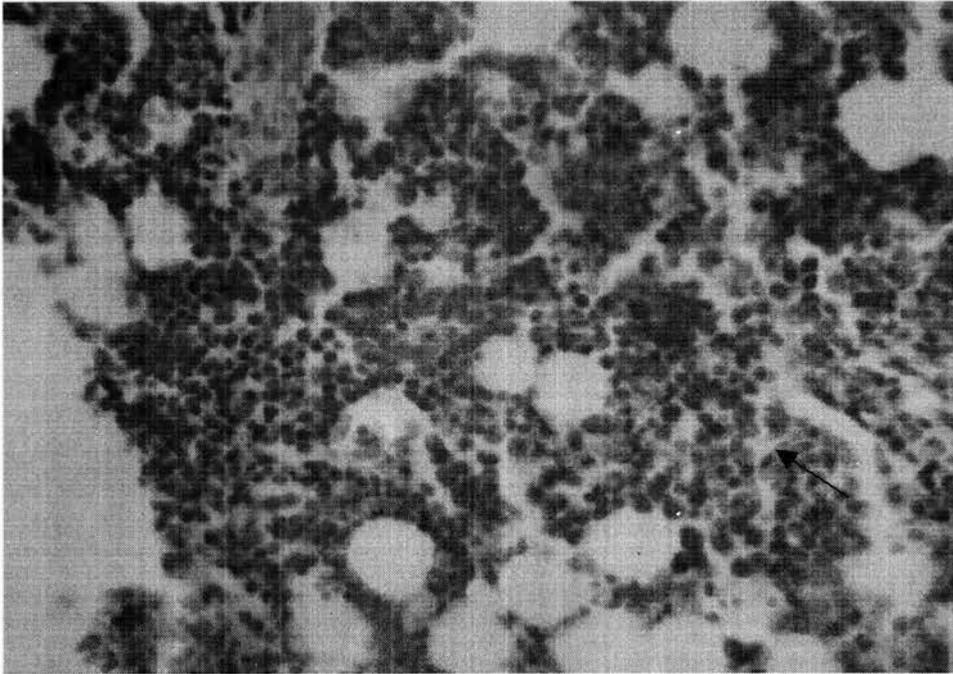


Figura 4. Riñón de ave Leghorn a las 24 hpi, células epiteliales del tubúlo contorneado distal, se observa vacuolización y ruptura de membrana celular en su porción apical (Flecha) 6300x.

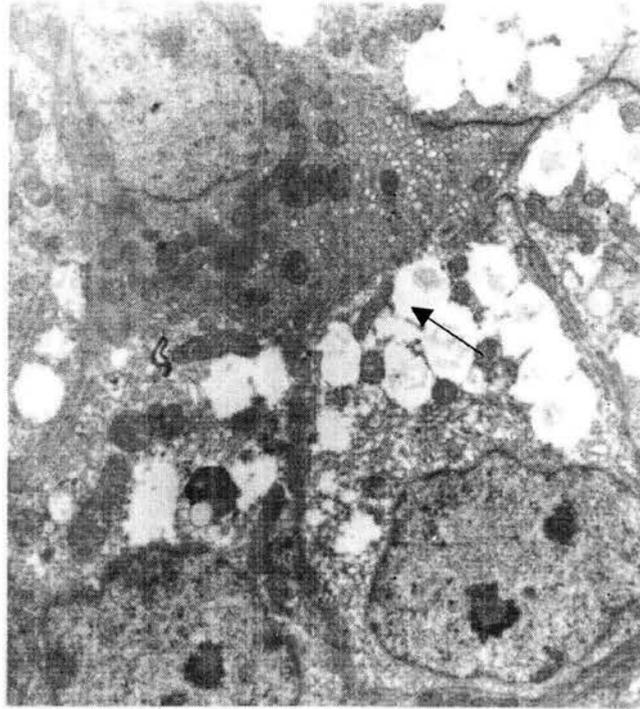


Figura 5. Pulmón de ave Leghorn a las 60 hpi, capilares aéreos, incremento de heterófilos (Flecha) 6300x.

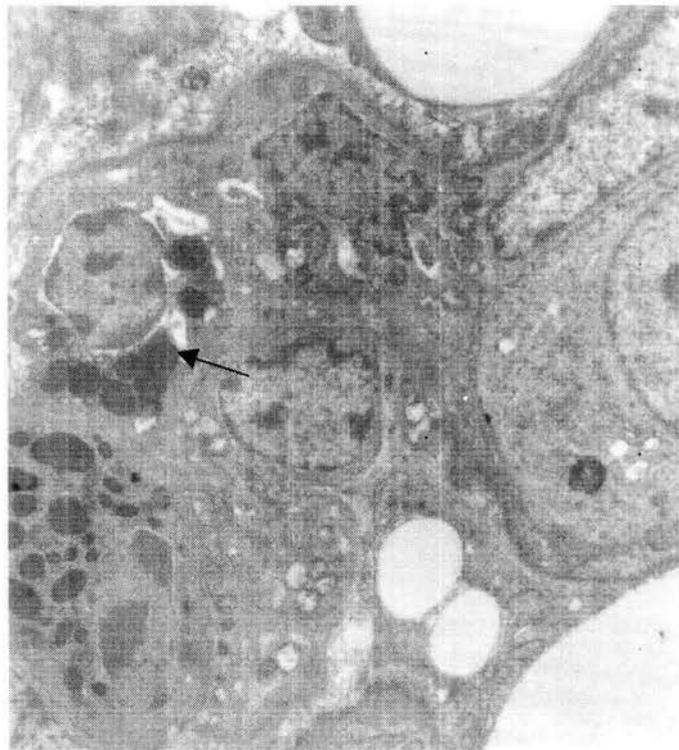


Figura 6. Pulmón de ave Leghorn a las 72 hpi, capilares aéreos, incremento de heterófilos (flecha) 6300x.

