



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

“EVALUACIÓN CLÍNICO PATOLÓGICA DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL
CON *Gallibacterium anatis* (biovariedades *anatis*
y *haemolytica*) EN AVES ALPES”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PRESENTA:
Andrea Paloma Zepeda Velázquez

TUTOR:
Dra. Norma Leticia Calderón Apodaca

COMITÉ TUTORIAL:
Dr. Leopoldo Henri Paasch Martínez
Dr. Edgardo Soriano Vargas

MÉXICO D.F.

2010



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.

ÍNDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
REVISIÓN DE LITERATURA	9
JUSTIFICACIÓN	11
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y MÉTODOS	14
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	30
REFERENCIAS	31
ANEXOS	36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cepas de referencia de <i>Gallibacterium</i> spp., empleadas en el estudio	36
Cuadro 2. Cronología de la infección experimental, observación y necropsia de las aves.	36
Cuadro 3. Hallazgos histológicos de lesiones observadas en aves infectadas con la cepa de referencia ATCC 43329 (F149) de <i>Gallibacterium</i> spp.	37
Cuadro 4. Hallazgos histológicos de lesiones observadas en aves infectadas con la cepa de referencia 10672/9 Salp. (F114) de <i>Gallibacterium</i> spp.	38
Cuadro 5. Hallazgos histológicos de lesiones observadas en aves infectadas con la cepa de referencia CCM 5976 de <i>Gallibacterium</i> spp.	40
Cuadro 6. Porcentaje de los órganos afectados en aves ALPES inoculadas por las cepas de referencia.	41
Cuadro 7. Reaislamiento de la cepa de referencia ATCC 43329 (F 149) ^T de <i>Gallibacterium anatis</i> biovariedad <i>anatis</i> .	42
Cuadro 8. Reaislamiento de la cepa de referencia 10672/9 Salp. (F 114) de <i>Gallibacterium anatis</i> biovariedad <i>haemolytica</i> .	42
Cuadro 9. Reaislamiento de la cepa de referencia CCM 5976.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Saco aéreo de ave de 11.2 semanas de edad normal. Tinción de hematoxilina y eosina.	19
Figura 2. Tráquea de ave a las 96 horas postinfección, en donde se observa pérdida del epitelio (➡) en grado leve. Tinción de hematoxilina y eosina.	19
Figura 3. Pulmón de ave al día 15 postinfección, en donde se observa hipertrofia del tejido linfoide asociado con mucosas de los bronquios primarios (➡), en grado severo. Tinción de hematoxilina y eosina.	19
Figura 4. Hígado de ave a las 48 horas postinfección, en donde se observa infiltrado de heterófilos (➡), en grado leve, localizado principalmente en zonas perivasculares. Tinción de hematoxilina y eosina.	19
Figura 5. Saco aéreo de ave al día 15 postinfección, con infiltración multifocal de linfocitos y heterófilos (➡), en grado moderado. Tinción de hematoxilina y eosina.	21
Figura 6. Tráquea de ave a los 10 días postinfección, en donde se observan focos de infiltrado linfocitario (➡), en grado moderado. Tinción de hematoxilina y eosina.	21
Figura 7. Pulmón de ave a las 48 horas postinfección, en donde se observan focos de infiltrado de células mononucleares y heterófilos (➡), en grado severo. Tinción de hematoxilina y eosina.	21
Figura 8. Hígado de ave a las 96 horas postinfección, en donde se observan granulomas formados por células mononucleares, heterófilos y células gigantes multinucleadas (➡), en grado moderado. Tinción de hematoxilina y eosina.	21
Figura 9. Saco aéreo de ave a los 15 días post-infección, en donde se observa infiltración de linfocitos y heterófilos, además de la formación de folículos linfoides (➡), en grado severo. Tinción de hematoxilina y eosina.	23
Figura 10. Tráquea de ave a los 10 días postinfección, en donde se observan la presencia de focos de infiltrado linfocitario (➡), en grado moderado. Tinción de hematoxilina y eosina.	23

- Figura 11.** Pulmón de ave a las 96 horas postinfección, en donde se observan focos de infiltrado de células mononucleares y heterófilos (➡), en grado moderado, así como hiperplasia de células goblet (➡). Tinción de hematoxilina y eosina. 23
- Figura 12.** Pulmón de ave a las 48 horas postinfección, en donde se observa la presencia de neumonía intersticial linfocitaria (⇔), en grado moderado. Tinción de hematoxilina y eosina. 23
- Figura 13.** Hígado de ave a los 10 días postinfección, en donde se observa infiltrado focal de linfocitos y heterófilos, localizado principalmente en zonas perivasculares (➡), en grado moderado. Tinción de hematoxilina y eosina. 24
- Figura 14.** Hígado de ave a los 10 días postinfección, en donde se observan focos diseminados de degeneración y necrosis hepatocelular (➡), en grado moderado. Tinción de hematoxilina y eosina. 24
- Figura 15.** Hígado de ave a las 96 horas postinfección, en donde se observa hiperplasia y vacuolización de las células epiteliales de los conductos biliares (➡), en grado moderado. Tinción de hematoxilina y eosina. 24
- Figura 16.** Hígado de aves a los 10 días postinfección, en donde se observan granulomas conformados por infiltración de células mononucleares (➡), en grado moderado. Tinción de hematoxilina y eosina. 24

RESUMEN

Gallibacterium spp, es un género de bacterias de la familia *Pasteurellaceae*, aisladas de aves sanas y enfermas. Se tiene conocimiento de algunos de sus factores de virulencia, como la hemolisina, cápsula, toxinas RTX y hemoaglutininas, entre otros, que pueden provocar diversos niveles de daño en las aves. Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo investigar la patogenicidad y virulencia de 3 cepas de referencia de *Gallibacterium* spp. Se inocularon 60 aves libres de patógenos específicos (ALPES) por vía nasal y a partir de las 48 horas postinoculación las aves se sacrificaron para realizar los estudios bacteriológico y anatomopatológico. Las aves inoculadas no mostraron signos clínicos significativos. Las 3 cepas de referencia inoculadas fueron reaisladas a partir de senos infraorbitarios, tráquea, timo, hígado, riñón, testículo y médula ósea. Los estudios histológicos revelaron lesiones inflamatorias principalmente en tráquea, pulmón, sacos aéreos e hígado. En investigaciones previamente publicadas se sugiere la participación de otros agentes infecciosos e inmunodepresores para el desarrollo de las lesiones que incluso pueden provocar la muerte. De forma similar, se piensa que el cuadro clínico es más severo en aves coinfectadas con otros agentes infecciosos. Nuestro estudio muestra que las cepas de referencia de *Gallibacterium* empleadas tienen la capacidad de producir una infección y que son patogénicas para las aves.

Palabras clave: *Gallibacterium*, bacteria, infección experimental, aislamiento, aves.

INTRODUCCIÓN

El género *Gallibacterium* pertenece a la familia *Pasteurellaceae* y agrupa bacterias antes conocidas como *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus salpingitidis* y *Pasteurella anatis*. El género *Gallibacterium* spp, son bacterias Gram negativas, no móviles y pleomórficas, actualmente se conocen 2 biovariedades: *G. anatis* biovariedad *haemolytica* y *G. anatis* biovariedad *anatis*.¹ Asimismo, se ha informado que el género contiene 5 especies nuevas.² Se han realizado aislamientos de *G. anatis* del tracto respiratorio y otros órganos de aves sanas y enfermas, estos aislamientos son más frecuentes en los pollos y gallinas y son esporádicos en otras aves como pavos y patos.³

Se conoce poco de los mecanismos de patogenicidad y de los factores de virulencia de *Gallibacterium* spp, no obstante, se sabe que *Gallibacterium anatis* biovariedad *haemolytica* tiene la capacidad de producir metaloproteasas que están relacionadas con la patogenicidad de esta bacteria.⁴ Asimismo, se ha identificado el gen que codifica para toxinas RTX⁵ y también se ha encontrado el gen que codifica para la formación de la cápsula. La cápsula de *Gallibacterium anatis* biovariedad *haemolytica* es semejante a la del grupo 2 de *Escherichia coli*.⁶ Recientemente, se ha demostrado que algunas cepas de *Gallibacterium* tienen actividad hemoaglutinante de eritrocitos de diferentes especies animales⁷ y también tiene la capacidad de adherirse a células epiteliales traqueales del pollo y del oviducto de la gallina,⁸ por lo que se sugiere que las cepas de *Gallibacterium* spp, presentan diversos grados de virulencia.

Hasta antes del presente estudio, la inoculación experimental de cepas de referencia de *Gallibacterium* spp, en aves libres de patógenos no se había realizado. Las inoculaciones experimentales que cita la literatura corresponden a aves convencionales y entre esos estudios se encuentran la inoculación subcutánea con un aislamiento de *P. haemolytica* proveniente de un ave enferma⁹ y la inoculación de *Gallibacterium* spp, con la administración simultánea del agente inmunosupresor 5-fluorouracil (5-FU).¹⁰ También se informa la inoculación intraperitoneal e intravenosa con la cepa de referencia 12656-12, aislada del hígado de un pollo con septicemia,¹¹ entre otros estudios.^{3,12}

El propósito del presente trabajo fue investigar la patogenicidad y virulencia de 3 cepas de referencia de *Gallibacterium* spp, inoculadas experimentalmente por vía nasal, mediante la inspección clínica e histopatología. El presente trabajo de investigación fue realizado en las instalaciones del Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

REVISIÓN DE LITERATURA

La familia *Pasteurellaceae* incluye un grupo amplio de bacterias Gram negativas integradas por cocobacilos que comparten características fenotípicas, tales como: anaerobiosis facultativa, oxidasa positivas, reducción de nitratos, fermentación de carbohidratos, además de ser inmóviles.¹ Algunas especies como *Avibacterium paragallinarum* y *Pasteurella multocida* son patógenos primarios en las aves y se relacionan principalmente con enfermedades respiratorias en los animales.¹³

Dentro de las características que confieren patogenicidad a las bacterias se encuentran la cápsula, los lipopolisacáridos (LPS) de la pared celular, las toxinas y adhesinas, entre otras. Recientemente, se ha encontrado que *Gallibacterium anatis* biovar *haemolytica* posee un gen que codifica para la toxina RTX.⁵ También se ha identificado el locus que codifica la biosíntesis de la cápsula.⁶ Ésta última es especialmente importante para la virulencia, ya que actúa como una barrera aislante contra las defensas del organismo.¹⁴

Investigaciones recientes sugieren que *Gallibacterium* spp, posee adhesinas de tipo no fimbrial con actividad hemoaglutinante.⁷ También la adherencia observada a células epiteliales traqueales y de oviducto de gallina, que sugiere que puede existir diferencias en la capacidad de adherencia de diversas cepas de este microorganismo que pueden estar relacionadas con diferencias en la virulencia.⁸

Un estudio de la microbiota simbiótica del tracto respiratorio de las aves confirma que *G. anatis* puede infectar la tráquea de pollos, pavos y patos clínicamente sanos; además existe una correlación entre la infección y la edad de las aves, ya que la mayoría de los aislamientos se han obtenido en pollos de más de 4 semanas de edad^{3,15} y en aves adultas incluso se ha asociado con el incremento en la mortalidad y anormalidades en la producción de huevo en gallinas de postura.¹⁶

Diversos factores ambientales o el estrés pueden predisponer a la infección,^{3,15,17} sin embargo aún no se ha determinado si *Gallibacterium* spp, es un agente patógeno primario o secundario.¹⁸ *Gallibacterium* spp, se ha aislado de diferentes tipos de aves, entre las que se incluyen: pollos, gansos, patos, pavos, palomas, faisanes, gallinas de guinea, perdices, pavo reales y psitácidos, entre otras,

tanto clínicamente sanos como enfermas.^{1,19,17,20} Incluso se han obtenido aislamientos de este microorganismo provenientes de esputo humano.²¹ En las aves, la manifestación clínica relacionada con la infección de este microorganismo es de tipo respiratorio superior, no obstante, también se han reportado procesos septicémicos con petequias en vísceras y necrosis multifocal en el hígado. También se ha relacionado con salpingitis y peritonitis.²² La diversidad de lesiones que se han asociado con aislamientos de *Gallibacterium* incluyen septicemia, degeneración folicular, salpingitis, peritonitis, enteritis y lesiones en el tracto respiratorio tales como: la presencia de descarga mucoide sanguinolenta en fosas nasales y faringe .¹⁹

Para la infección experimental con *Gallibacterium* spp, se han empleado diferentes vías de inoculación, tales como: intratraqueal,^{3,12} intravenosa,¹⁰ subcutánea,⁹ intraperitoneal^{10,12} e intramuscular,³ pero no una de las puertas de entrada, la vía nasal.

JUSTIFICACIÓN

La interacción de los diferentes factores de virulencia confiere a los microorganismos la capacidad para establecerse en los tejidos de determinado hospedero. Las bacterias patógenas se caracterizan por su capacidad de adherencia e invasión, causando daño a las células. Otros mecanismos de patogenicidad incluyen la evasión de los mecanismos de defensa e inmunidad que caracterizan a ciertos microorganismos patógenos.²³

El aislamiento de *Gallibacterium* spp, a partir de aves enfermas o clínicamente sanas y los diferentes cuadros clínicos observados en aves infectadas de manera natural o experimental, sugieren que existen diferencias en la patogenicidad y virulencia de esta bacteria.

Debido a que se desconoce la patogenicidad de algunas cepas de referencia de *Gallibacterium* spp, tales como la cepa ATCC 43329 (F 149), la cepa 10672/9 Salp (F 114) y la cepa CCM 5976, se llevó a cabo el presente estudio en el cual se inocularon aves libres de patógenos por vía intranasal, sin someterlas a factores de estrés, con el objeto de evaluar el resultado clínico y patológico de la infección experimental.

HIPÓTESIS

Las diferentes cepas de *G. anatis* biovariedades *anatis* y *haemolytica*, inoculadas experimentalmente por vía nasal, tienen la capacidad de producir daño tisular, ocasionando diferentes lesiones en el tracto respiratorio.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la patogénesis de 3 cepas de referencia de *G. anatis* biovariedad *anatis* y *haemolytica*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Comprobar que los animales experimentales se encontraban libres de anticuerpos contra *G. anatis* biovariedad *anatis* y *haemolytica*.

Realizar la inoculación experimental por vía nasal de *G. anatis* biovariedad *anatis* y *haemolytica*.

Evaluar las manifestaciones clínicas que presenten los animales después de realizada la inoculación.

Determinar las lesiones en los órganos y tejidos de los animales experimentales.

Realizar la histopatológica de los tejidos para detectar las lesiones microscópicas.

Realizar el aislamiento de *G. anatis* biovariedad *anatis* y *haemolytica* de los diversos órganos de las aves experimentales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación y alojamiento: Se emplearon 60 aves machos libres de patógenos específicos^a de 11.2 semanas de edad.¹⁰ Estas fueron aclimatadas durante una semana en las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves de la FMVZ de la UNAM. Durante toda su estancia se alojaron en el piso (8 aves / m²) empleando viruta de madera como material de cama. Los animales recibieron 12 horas de fotoperiodo total y se les proporcionó alimento libre de antibióticos y agua a libre acceso. Después de su adaptación los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos.²⁴

Bacterias: Se emplearon 3 cepas de referencia denominadas ATCC 43329 (F 149)^T biovariedad *anatis*, 10672/9 Salp (F 114) biovariedad *haemolityca* y CCM 5976 genomoespecies 2, que fueron donadas por el Dr. Henrik Christensen (Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Dinamarca) y facilitadas por el Dr. Edgardo Soriano Vargas (Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Universidad Autónoma del Estado de México) (Cuadro 1).

Medios de cultivo. Para el mantenimiento, propagación, preparación del inóculo bacteriano y el aislamiento de los microorganismos se empleó caldo infusión cerebro corazón^b y base de agar sangre^c adicionado con 10% de sangre de ovino.²⁵

Preparación del inóculo. Las 3 cepas de referencia de cultivo puro fueron sembradas en base de agar adicionado con 10% de sangre de ovino e incubadas a 37° C en estufa bacteriológica^d durante toda la noche. Se inocularon de 3 a 5 colonias en 10 ml de caldo infusión cerebro corazón (por sus siglas en inglés, BHI) y se incubaron a 37°

^a ALPES, S.A de C.V., México.

^b BD Bioxon[®], cat.211200. México.

^c BD Bioxon[®], cat.252701. México.

^d Terlab[®], 0867. México.

C. Finalmente 10 µl de la suspensión bacteriana fueron transferidos en 10 ml de infusión BHI e incubados a 37 °C. Después de la incubación los paquetes se recolectados mediante centrifugación^e y se lavaron 3 veces con PBS a un pH 7.2 (amortiguador de pH, por sus siglas en inglés, *phosphate buffered saline*), y se ajustaron a una densidad óptica (DO) de 0.1 a 620 nm en espectrofotómetro^f, que corresponde a una concentración aproximada de 10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC)/0.5 ml. Este procedimiento se empleó para todas las cepas de referencia. Para calcular el valor de las UFC's se empleó la siguiente fórmula: $\log [CFU/ml] = 1.08 \cdot \log (OD) + 9.16$.²⁶

Prueba de Aglutinación en Placa. Se utilizaron 15 muestras de suero de cada grupo de trabajo, tomando aproximadamente 0.5 ml de suero por ave. Sobre una laminilla se colocó aproximadamente 0.02 ml de suero para resuspender una colonia bacteriana, con ayuda de un asa bacteriológica se extendió la mezcla sobre un área circular de aproximadamente 1.5 cm de diámetro, posteriormente se balanceo la laminilla durante 2 minutos. El resultado es positivo cuando la mezcla presenta aglutinación de bacterias en un lapso de 2 minutos y negativo cuando el contenido no presenta esta formación.²⁷

Diseño experimental. Las aves se asignaron aleatoriamente en 4 grupos después del periodo de adaptación. El día 0 se inocularon por vía nasal con 0.5 ml del inóculo de cada cepa de referencia para su respectivo grupo de trabajo, repitiéndose la misma operación para cada unidades de aislamiento y para el grupo control se utilizaron 0.5 ml de PBS a un pH 7.2. Se sacrificaron 3 aves de cada grupo a las 48, 72 y 96 horas postinoculación. Las aves restantes de cada grupo se observaron durante los días 5-15 postinfección para anotar la signología, 3 aves de cada grupo fueron sacrificadas al día 10 y día 15 postinfección.²⁶ (Cuadro 2).

^e Centrifuga refrigerada Hermle® Z300, 55020071.

^f Affordable Digital® UV/VIS Spectronic 21 D, México

Sacrificio de las aves. Todas las aves fueron sacrificadas mediante una sobredosis de Pentobarbital sódico^g inyectada vía intravenosa en la vena braquial.²⁸

Examen postmortem. Inmediatamente después del sacrificio se realizó la necropsia completa de las aves y se registraron todas las lesiones macroscópicas encontradas.²⁸

Histopatología. Se tomaron muestras de los siguientes órganos: bazo, hígado, tráquea, riñón, corazón, timo, pulmón, sacos aéreos, seno infraorbitario, tonsilas cecales, bolsa de Fabricio, médula ósea, articulación tibio-tarsiana y testículo. Las muestras fueron fijadas en formaldehído al 10% amortiguado a un pH de 7.4, durante 24 hrs. Después de la fijación, los tejidos se cortaron, se deshidrataron utilizando diferentes concentraciones de alcohol hasta llegar al alcohol absoluto y posteriormente se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 3 a 5 µm con ayuda de un micrótomoh, los cuales se montaron sobre un portaobjetos, para teñirse con la tinción de hematoxilina y eosina (HE). Cada sección se examinó por medio de un microscopio óptico de luzⁱ, se describieron, clasificaron en base a una escala de 0-3 (Cuadros 4, 5 y 6) y se fotografiaron las lesiones microscópicas con una cámara^j.²⁶

Aislamiento bacteriológico. Se tomaron muestras de senos infraorbitarios, tráquea, timo, sacos aéreos, pulmón, corazón, hígado, bazo, testículo, riñón, medula ósea y articulación. Las muestras se tomaron asépticamente con ayuda de un mechero Bunsen y un asa bacteriológica. Se sembraron en base agar sangre^k con 10% de sangre de ovino²⁵ y se incubaron durante toda la noche a 37° C. Se comprobó la identidad de algunos aislamientos mediante pruebas bioquímicas y tinción de Gram, según los métodos de Christensen *et al.*¹

^g Cheminova®, México.

^h Micrótomos Spencer®, 820.

ⁱ Carl Zeiss, no. 3108002787, México.

^j Moticam 2500, 5.0 Mpixel, USB 2.0

^k BD Bioxon®, cat.252701. México.

RESULTADOS

Aglutinación en placa. Las 60 muestras de suero de las aves de los grupos experimentales y grupo control analizadas mostraron reacción negativa contra las cepas de *Gallibacterium* spp, previo a la inoculación.

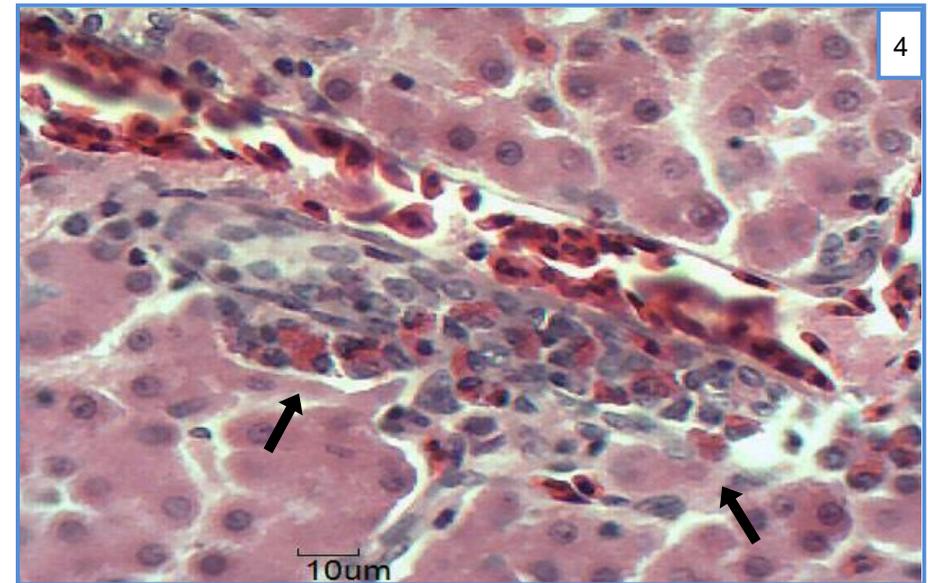
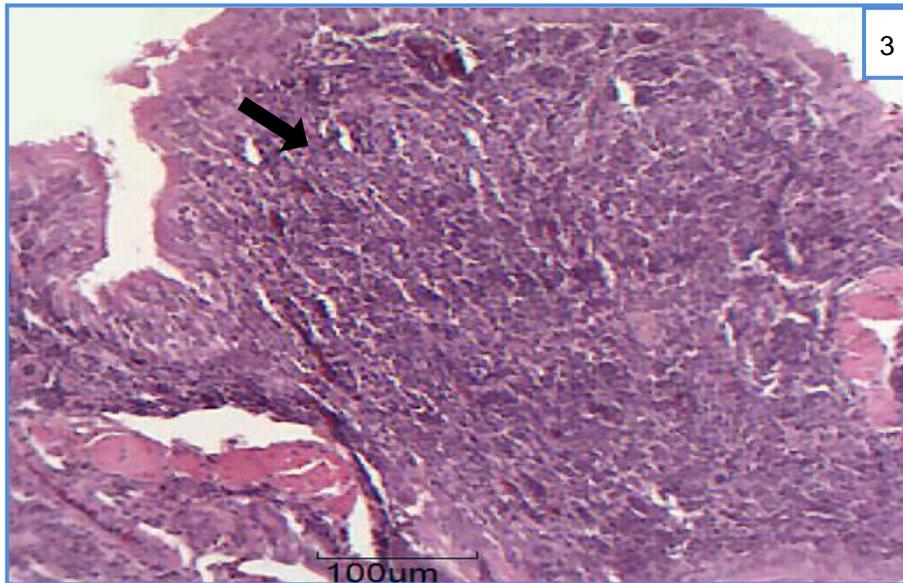
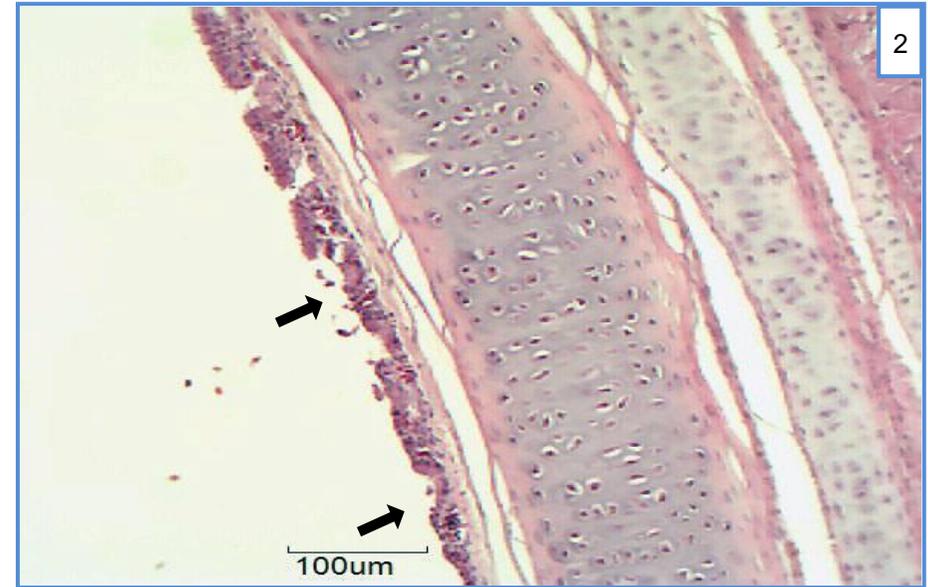
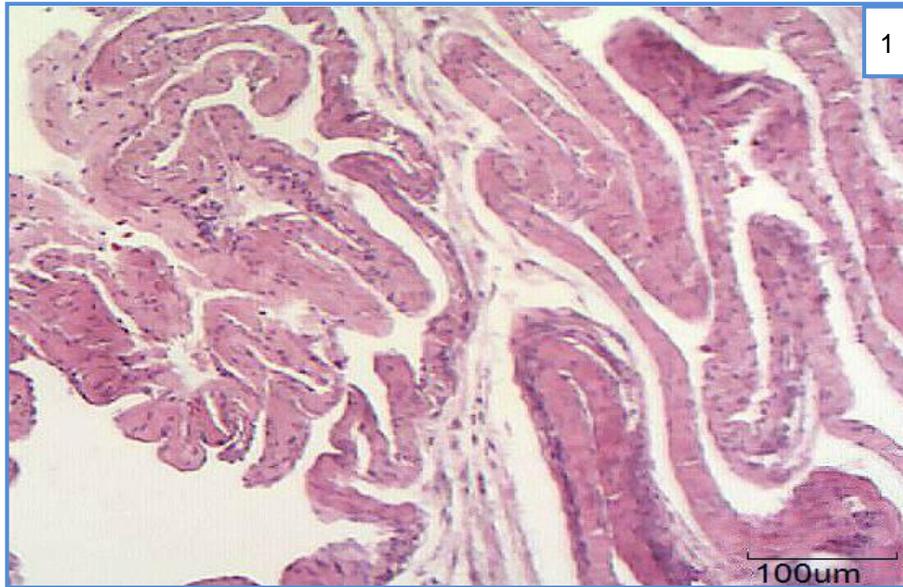
Signos y lesiones macroscópicas. Durante todo el período de observación las aves permanecieron clínicamente sanas y no hubo mortalidad. A la necropsia no se detectaron lesiones macroscópicas en las aves del grupo control y las infectadas.

Histopatología: Las lesiones histológicas se observaron en: tráquea, pulmón, sacos aéreos e hígado (Cuadro 3, Cuadro 4 y Cuadro 5). El porcentaje de las aves afectadas se presenta en el cuadro 6. No se observaron lesiones en los otros órganos examinados. A continuación se refieren las lesiones microscópicas asociadas a cada una de las cepas estudiadas.

Cepa ATCC 43329 (F149)^T

- **Sacos aéreos:** no se observaron cambios patológicos aparentes (Figura 1).
- **Tráquea:** Se detectaron focos de infiltración linfocitaria en la lámina propia de la mucosa a partir de los 2 hasta los 10 días postinfección. A partir de las 48 y hasta las 96 horas postinfección, se detectaron focos de erosión del epitelio mucociliar de la mucosa (Figura 2). Además, se observó exudado inflamatorio en la luz de la tráquea, en grado moderado, desde las 48 hasta las 96 horas postinfección.
- **Pulmón:** Se observó hiperplasia de los folículos linfoides de los bronquios primarios desde los 2 hasta los 15 días postinfección en grado severo (Figura 3).
- **Hígado:** Se detectaron focos de infiltración heterofílica y linfocitaria en el parénquima hepático, principalmente con localización perivascular, desde los 2 hasta los 15 días postinfección (Figura 4). Además se observó la presencia focal de un granuloma conformado por la infiltración de células mononucleares en el parénquima, en grado leve desde el día 3 hasta el día 15 post-infección. Se

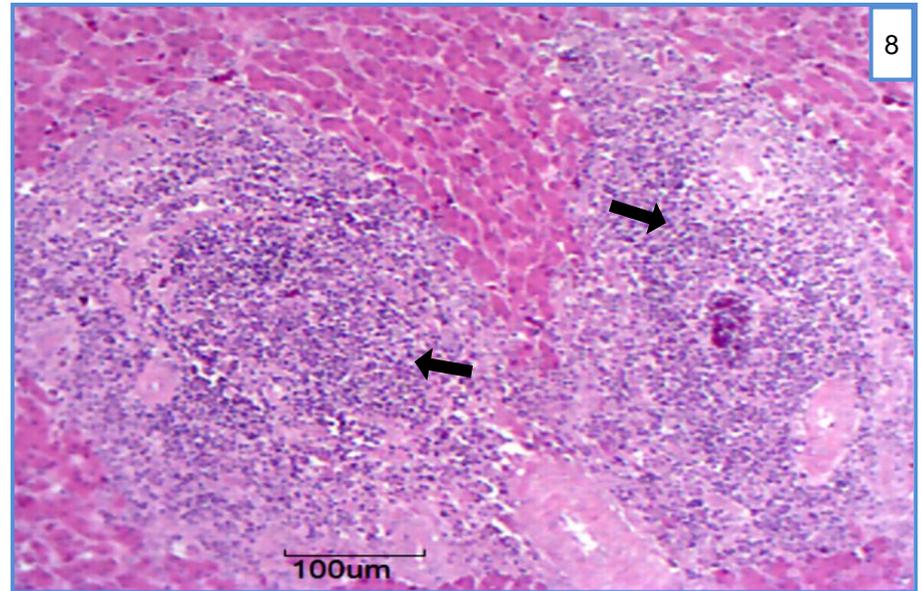
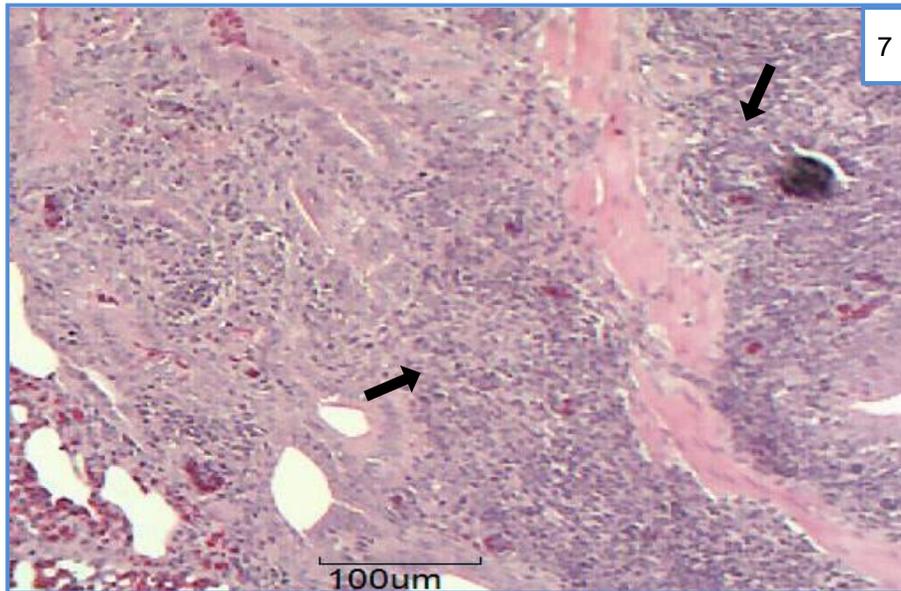
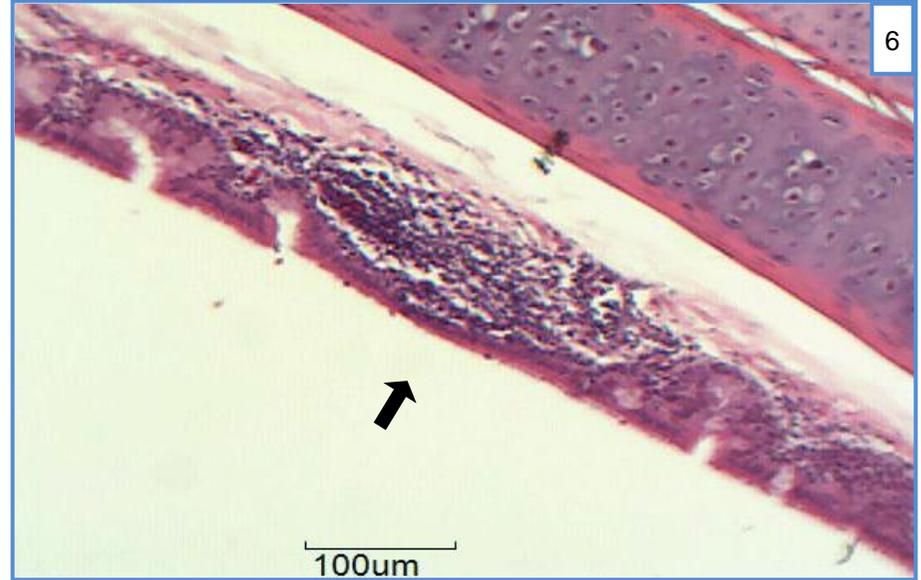
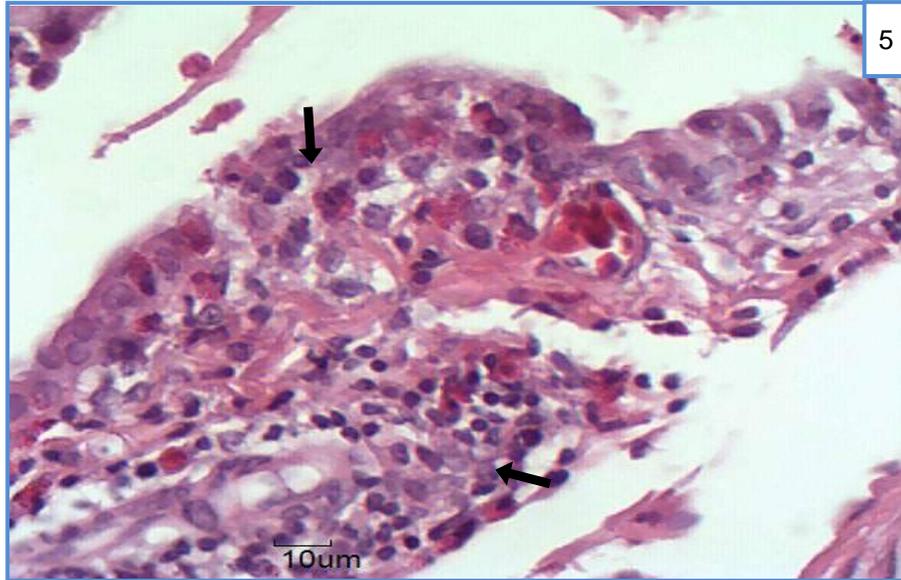
observo de manera multifocal la presencia de necrosis y degeneración vacuolar de los hepatocitos, en grado de leve a moderado, en el día 10 post-infección y en el día 15 post-infección.



Cepa ATCC 43329 (F149)

Figura 1) Saco aéreo de ave a las 48 horas postinfección, sin cambios a las 11.2 semanas de edad. Tinción de HE. **Figura 2)** Tráquea de ave a las 96 horas postinfección, en donde se observa pérdida del epitelio (↓) en grado leve. Tinción de HE. **Figura 3)** Pulmón de ave al día 15 postinfección, en donde se observa hiperplasia del tejido linfóide asociado con las mucosas de los bronquios primarios (↓), en grado severo. Tinción de HE. **Figura 4)** Hígado de ave a las 48 horas postinfección, en donde se observa infiltrado de heterófilos (↓), en grado leve, localizados principalmente en zonas perivasculares. Tinción de HE.

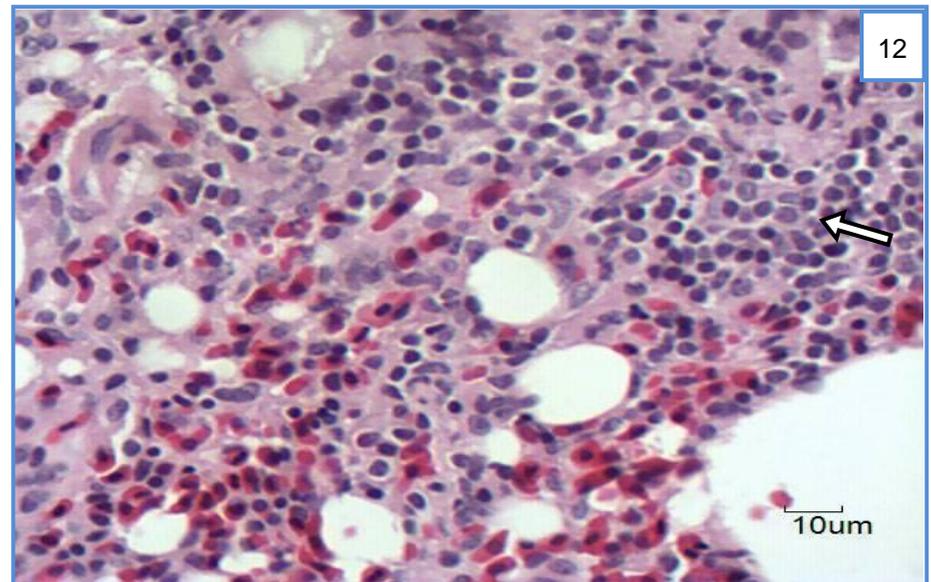
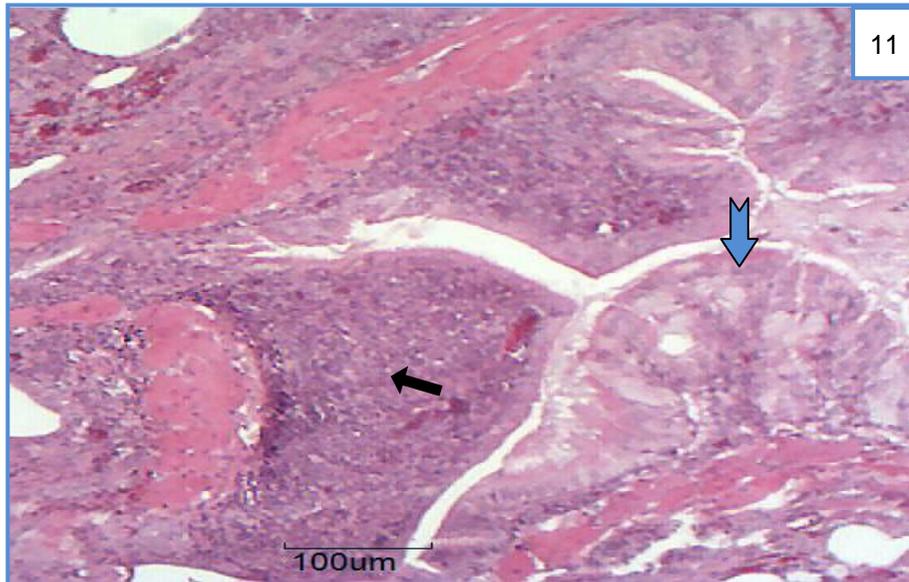
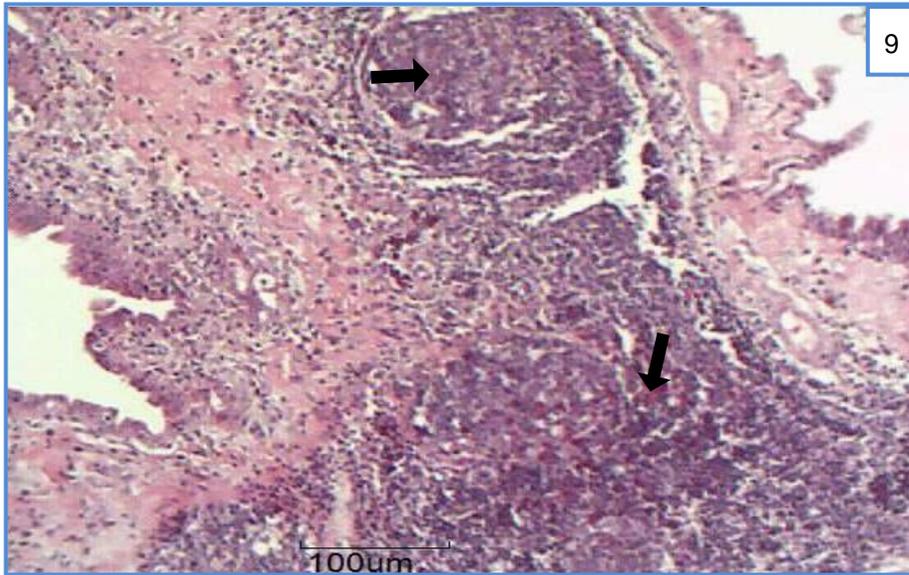
- **Sacos aéreos:** se observó proliferación segmental del tejido conjuntivo sub-epitelial y congestión de los capilares e infiltración inflamatoria con linfocitos y heterófilos, desde el día 3 hasta el día 15 postinfección. En las zonas de engrosamiento, el epitelio superficial presentó focos de hiperplasia principalmente a las 48 horas postinfección (Figura 5).
- **Tráquea:** se observaron focos de infiltración linfocitaria de la lámina propia desde los 2 hasta los 15 días postinfección (Figura 6). De manera similar se observaron focos de pérdida del epitelio mucociliar, de grado leve a moderado, desde el día 3 hasta el día 15 postinfección.
- **Pulmón:** se observaron infiltrados peri-bronquiales de linfocitos y heterófilos desde las 48 hasta las 96 horas postinfección. Existió una significativa hiperplasia de folículos linfoides peribronquiales desde los 2 hasta los 15 días postinfección (Figura 7). Además se observó la presencia de infiltrado inflamatorio (neumonía intersticial) conformado en su mayoría por células mononucleares, en grado de moderado a severo, desde el día 2 hasta el día 4 postinfección.
- **Hígado:** se observó infiltrado inflamatorio, compuesto en su mayoría por linfocitos y en menor grado por heterófilos, localizado principalmente en zonas periportales desde los 2 días postinfección hasta los 15 días postinfección, los infiltrados inflamatorios se asociaron con degeneración y necrosis hepatocelular. Se observó un granuloma conformado por la infiltración de células mononucleares en el parénquima, en grado severo durante el día 3 postinfección (Figura 8). Además, se observó de manera multifocal hiperplasia y vacuolización de las células epiteliales de los conductos biliares, en grado leve desde el día 3 hasta el día 15 postinfección. Se observó de manera multifocal necrosis y degeneración vacuolar de los hepatocitos, en grado de leve a moderado, desde el día 3 hasta el día 15 postinfección.



Cepa 10672/9 Salp. (F114)

Figura 5) Saco aéreo de ave al día 15 post-infección, con infiltración multifocal de linfocitos y heterofilos (↓), en grado moderado. Tinción de HE. **Figura 6)** Tráquea de ave a los 10 días postinfección, en donde se observan focos de infiltrado linfocitario (↓), en grado moderado. Tinción de HE. **Figura 7)** Pulmón de ave a las 48 horas postinfección, en donde se observan focos de infiltrado de células mononucleares y heterófilos (↓), en grado severo. Tinción de HE. **Figura 8)** Hígado de ave a las 96 horas postinfección, en donde se observan granulomas formados por células mononucleares, heterófilos y células gigantes multinucleadas (↓), en grado moderado. Tinción de HE.

- **Sacos aéreos:** se observó aerosaculitis de grado moderado a severo con infiltración linfocitaria y heterofílicas y presencia de fibrina en tejido conectivo, desde los 2 hasta los 15 días postinfección (Figura 9).
- **Tráquea:** se observaron focos de infiltrado linfocitario en la lámina propia e hiperplasia de células goblet en el epitelio mucociliar desde los 2 hasta los 15 días postinfección (Figura 10). Además, se observó exudado inflamatorio en la luz de la tráquea, de grado leve a moderado, desde las 48 hasta las 96 horas postinfección.
- **Pulmón:** se observó infiltración inflamatoria con linfocitos y heterófilos de la lámina propia de los bronquios primarios desde las 48 hasta las 96 horas postinfección. Se detectó hiperplasia significativa de células de goblet en el epitelio mucociliar de bronquios primarios y presencia de exudado catarral en las vías aéreas desde los 2 hasta los 15 días postinfección (Figura 11). Se observó infiltrado inflamatorio (neumonía intersticial) conformado en mayor grado por células mononucleares en el parénquima pulmonar a las 48 horas postinfección, en grado moderado (Figura 12).
- **Hígado:** se detectó una infiltración linfocitaria periportal desde los 2 hasta los 15 días postinfección en grado severo (Figura 13). Asimismo, se observaron focos diseminados de degeneración y necrosis hepatocelular independientes a las zonas de infiltración inflamatoria, en grado de leve a moderado, desde el día 2 hasta el día 15 postinfección (Figura 14). Además, se observó de manera multifocal hiperplasia y vacuolización de las células epiteliales de los conductos biliares, en grado de leve a moderado desde el día 3 postinfección hasta el día 15 postinfección (Figura 15). En algunas zonas se encontraron focos de granulomas conformados por infiltración de células mononucleares y células gigantes multinucleadas, en grado moderado desde el día 10 hasta el día 15 postinfección (Figura 16).



Cepa CCM 5976

Figura 9) Saco aéreo de ave a los 15 días postinfección, en donde se observa infiltración de linfocitos y heterófilos, además de la formación de folículos linfoides (↓), en grado severo. Tinción de HE. Figura 10) Tráquea de ave a los 10 días postinfección, en donde se observan focos de infiltrado linfocitario (↓), en grado moderado. Tinción de HE. Figura 11) Pulmón de ave a las 96 horas postinfección, en donde se observan focos de infiltrado de células mononucleares y heterófilos (↓), en grado moderado, así como hiperplasia de células goblet (↓). Tinción de HE. Figura 12) Pulmón de ave a las 48 horas postinfección, en donde se observa neumonía intersticial linfocitaria (↓), en grado moderado. Tinción de HE.

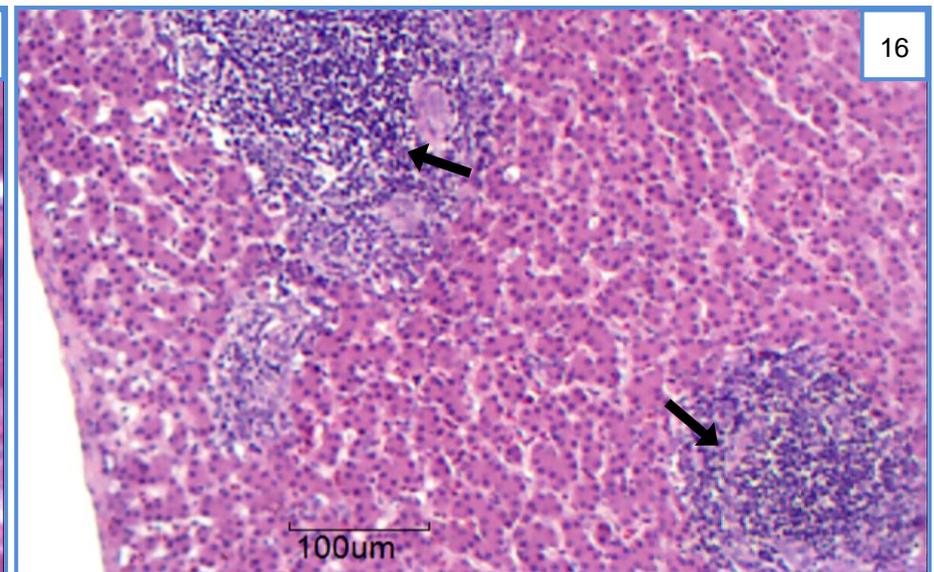
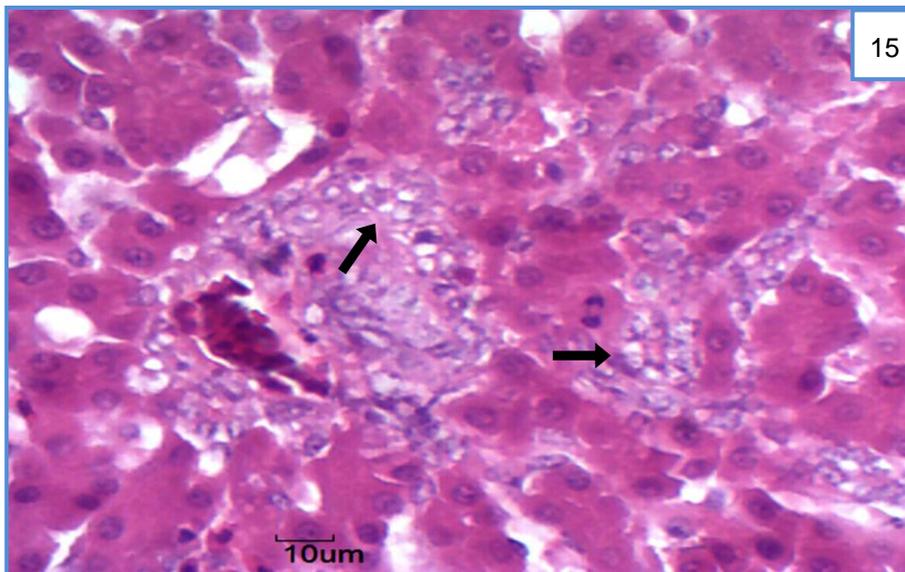
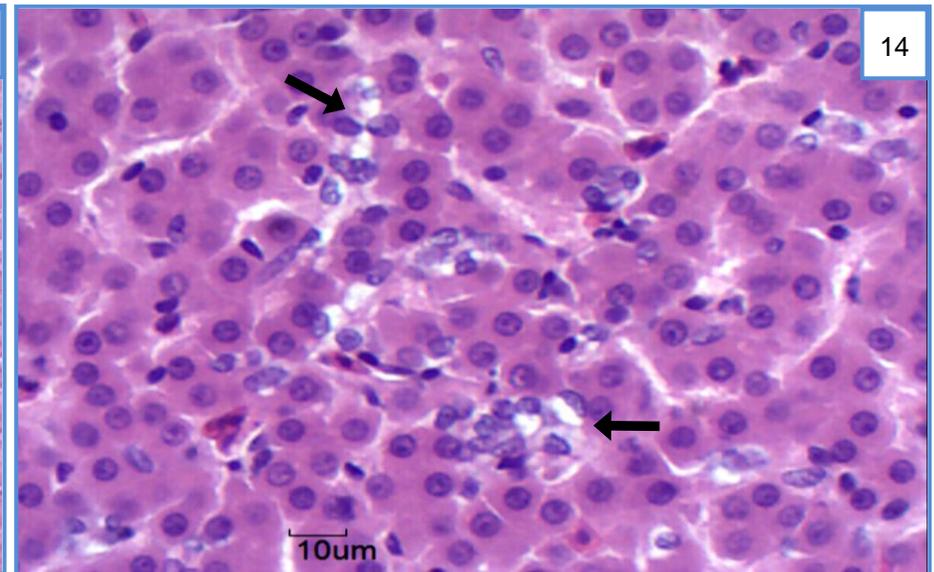
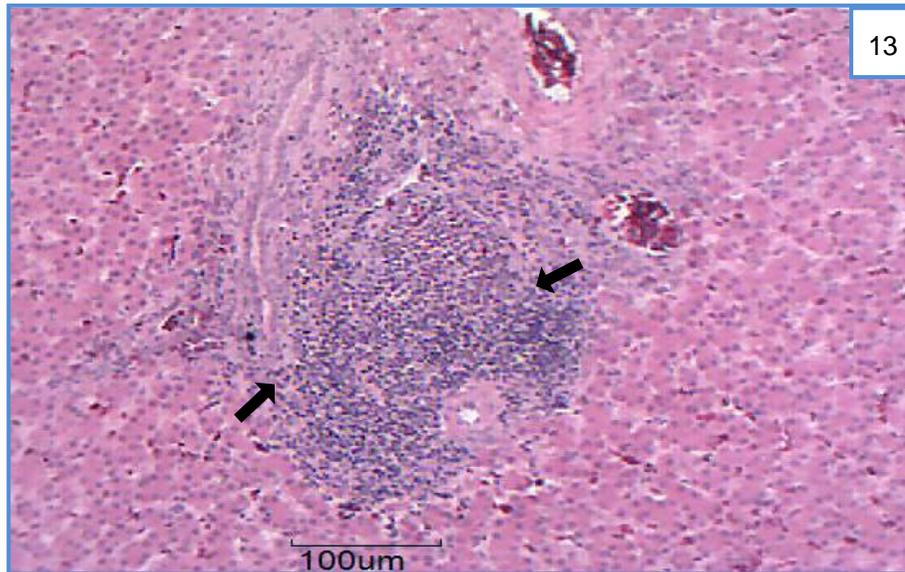


Figura 13) Hígado de ave a los 10 días postinfección, en donde se observa infiltrado focal de linfocitos y heterófilos, localizado principalmente en zonas perivasculares (↓), en grado moderado. Tinción de HE. Figura 14) Hígado de ave a los 10 días postinfección, en donde se observan focos diseminados de degeneración y necrosis hepatocelular (↓), en grado moderado. Tinción de HE. Figura 15) Hígado de ave a las 96 horas postinfección, en donde se observa hiperplasia y vacuolización de las células epiteliales de los conductos biliares (↓), en grado moderado. Tinción de HE. Figura 16) Hígado de aves a los 10 días postinfección, en donde se observan granulomas conformados por infiltración de células mononucleares (↓), en grado moderado. Tinción de HE.

Aislamiento bacteriológico. Los aislamientos realizados de las aves infectadas experimentalmente con la cepa de referencia ATCC 43329 (F149)^T, fueron en su mayoría obtenidos de senos infraorbitarios a los 3,4 y 10 días postinfección. A partir de tráquea se aisló esta cepa a los 2, 3,10 y 15 días postinfección. Además, se obtuvo un aislamiento de hígado al día 4 postinfección y de testículo a las 48 horas postinfección (Cuadro 7).

La cepa 10672/9 Salp. (F114) fue aislada de senos infraorbitarios durante los 5 días de sacrificio, mientras que de tráquea sólo se obtuvieron del día 3, 4 y 10 días postinfección; de timo se obtuvieron 2 aislamientos a los días 3 y 4 postinfección. Sin embargo, en pollos infectados con esta cepa a las 72 horas postinfección, se obtuvieron aislamientos adicionales de: hígado, riñón y medula ósea (Cuadro 8).

De manera similar, en la infección experimental con la cepa CCM 5976 se obtuvieron aislamientos durante 4 días de senos infraorbitarios, el día 2, 4, 10 y 15 postinfección; de tráquea fue aislado el día 2, 3, 10 y 15 postinfección. De timo y riñón se obtuvo el aislamiento a las 48 horas post-infección y de testículo al día 4 postinfección (Cuadro 9).

DISCUSIÓN

La infección experimental con *Gallibacterium* spp, no ha sido suficientemente estudiada desde el punto de vista clínico y de lesiones producidas. En estudios de infección experimental con aislamientos de órganos afectados se han empleado diversas vías de inoculación (intravenosa, intraperitoneal y subcutánea) y se han reportado una variedad de signos clínicos, como son: depresión, disminución en la ingesta, y letargo.¹⁰ Otros signos reportados, se asocian con la infección de las vías respiratorias altas: disnea, descarga mucopurulenta nasal y conjuntivitis,¹⁷ mientras que otro estudio reporta baja en la producción de huevo y mortalidad.¹⁸

La ausencia de signos clínicos en las aves del presente estudio sugiere baja virulencia del patógeno. Sin embargo, la concentración de UFC's inoculadas en las aves puede ser de suma importancia para la presentación de lesiones macroscópicas e incluso mortalidad, como en el caso de *Pasteurella multocida*. Además, se sabe que la asociación o sinergia con otras bacterias o virus puede ocasionar diversos cuadros clínicos. Asimismo, las aves estudiadas no sufrieron factores estresantes como vacunación o hacinamiento, ni se emplearon en ellas sustancias inmunodepresoras como el 5-fluorouracil^{31,10,18,16,17} que influyeron en el resultado clínico. Por otro lado, esta bacteria se considera parte del microbiota simbiótica de la tráquea del pollo.¹² En estos trabajos se aisló *Gallibacterium anatis* de tracto respiratorio, sin embargo, no se informaron lesiones, debido a la falta de histopatología detallada como la que se presenta en el presente estudio, llegando a la conclusión de que *Gallibacterium anatis* es un habitante no patogénico, simbiótico, de las aves.

La patogenicidad de *Gallibacterium* spp, indudablemente aumenta con factores estresantes simultáneos o predisponentes a la infección.¹⁷ Los factores estresantes y la sinergia con varios organismos infecciosos es frecuente en la patología aviar, por ejemplo, se ha reportado que patos infectados de manera natural con *Riemerella anatipestifer* sufren presentaciones más agudas de la infección si ésta se asocia con agentes infecciosos y en condiciones ambientales adversas.²⁹ Asimismo, se han encontrado serovariedades de diferente grado de virulencia en este microorganismo y

la influencia de condiciones propias de los animales infectados, principalmente la edad.³⁰ Las condiciones y asociaciones descritas tienen importancia en la prevalencia ya que se pueden presentar infecciones subclínicas de las vías respiratorias altas de aves que pueden considerarse portadoras y diseminadoras de la enfermedad, como ha sido reportado para el caso de *Pasteurella multocida*, en donde las infecciones latentes se activaron durante períodos de estrés.³¹

Si bien es sabido que *Gallibacterium* spp, es capaz de producir lesiones como peritonitis, granulomas en hígado, lesiones en tracto respiratorio, en aves estresadas,^{9,19} en el presente trabajo no se observaron lesiones macroscópicas. Algunos autores opinan que la ausencia de lesiones en casos de infección, se deben a la eliminación del agente por el sistema fagocítico mononuclear del hospedero.³²

En el presente estudio, las lesiones histológicas observadas en las vías respiratorias (tráquea, pulmón y sacos aéreos) y en hígado, sugieren que la bacteria evadió los sistemas locales de defensa, invadió y se diseminó produciendo una condición sistémica, con localización en diversos órganos. Los hallazgos del presente trabajo coinciden con el trabajo de Hunter y Wobeser,³¹ que describen un comportamiento similar en patos (*Anas platyrhynchos*) infectados experimentalmente con *Pasteurella multocida*.

En otras especies como en el caso de los caprinos, en un trabajo con cabras sanas infectadas experimentalmente con una cepa aislada de órganos de cabras infectadas por *Pasteurella haemolytica* (*Mannheimia haemolytica*), se detectaron lesiones microscópicas en pulmón e hígado, consistentes en infiltrados inflamatorios linfocitarios y neutrofilicos, localizados en el parénquima pulmonar y hepático.³³

Es relevante comentar el trabajo de Bojesen *et al.*,¹¹ quienes infectaron pollos de manera experimental con *Gallibacterium anatis*, por vía intravenosa, y observaron en hígado focos de necrosis rodeados por una inflamación mononuclear con la presencia de colonias bacterianas. En el presente estudio, las lesiones observadas en hígado,

tuvieron una localización preferentemente periportal y perivascular, además de la presencia de focos de degeneración y necrosis sin reacción inflamatoria.

Las lesiones histológicas encontradas en tráquea en el presente estudio confirman que la bacteria tiene un tropismo preferente por tráquea, aproximadamente del 80% a 93.33% (Cuadro 6), la cual se adhiere a las células epiteliales⁸ y a partir de esta infección primaria eventualmente puede ocurrir la invasión y diseminación sistémica.³⁴

Las aves experimentales de este estudio fueron machos, lo que ciertamente condujo a limitaciones en el estudio de la patogenia, principalmente al nivel de oviducto. Otros reportes de infección con *G. anatis* biovariedad *haemolytica* en gallinas, registran afecciones reproductivas con aislamiento bacteriológico a partir de coanas, tráquea, pulmón, corazón, hígado y bazo. Cabe mencionar, sin embargo, que en esas gallinas se aisló también *Escherichia coli*, pudiendo existir sinergia con *G. anatis*.³⁵ La información existente sobre *Gallibacterium anatis* reitera el aislamiento de este microorganismo a partir de gallinas, donde las lesiones predominantes se localizan en tracto reproductor.¹²

Los aislamientos a partir de hígado y medula ósea sugieren una bacteremia.¹⁸ La bacteremia asintomática puede ocurrir, como lo sugiere un estudio en humanos en el que se detectaron donadores de plaquetas infectadas con *Pasteurella multocida* que fueron transferidas a un paciente con displasia mieloide, resultando en una infección diseminada que le produjo la muerte.³⁶

En el presente estudio se obtuvo un aislamiento a partir de testículo, lo que probablemente signifique que esta bacteria pueda infectar el aparato reproductor del macho y eventualmente transmitir la bacteria a través el semen. Esta vía de transmisión vertical ocurre en el caso de *Campylobacter* spp., procedente del semen de pollos y pavos.³⁷

Cabe señalar que es posible la transmisión transovárica en gallinas infectadas experimentalmente con *Gallibacterium anatis*.³⁸ Debido a la afinidad de este

microorganismo por el tracto reproductor de las hembras adultas, sería recomendable repetir el presente estudio en gallinas, además de combinar otras situaciones experimentales como los factores estresantes, inmunosupresores y la sinergia con otros organismos.

CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que las cepas de referencia F149^T de *G. anatis* biovariedad *anatis*, F114 biovariedad *haemolytica* y CCM 5976 genomoespecies 2, tienen la capacidad de establecer una infección en aves libres de patógenos machos infectados por vía nasal. Asimismo, muestran que estas cepas de referencia son patogénicas y que ocasionan lesiones microscópicas en tráquea, bronquios, sacos aéreos y en hígado de los pollos infectados.

La magnitud del daño ocasionado por estas bacterias no fue suficiente para producir signos clínicos en las aves infectadas. Los aislamientos múltiples y las lesiones hepáticas sugieren que el organismo no sólo tiene afinidad por el epitelio respiratorio, sino también es capaz de producir una bacteremia y ser localizado en otros órganos.

REFERENCIAS

1. Christensen H, Bisgaard M, Bojesen AM, Mutters R, Olsen JE. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, '*Actinobacillus salpingitidis*' or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003; 53:275-287.
2. Christensen H, Korczak BM, Kuhner P, Busse H-J, Bojesen AM, Bisgaard M. Five new species of *Gallibacterium* – a diagnostic enigma. *Proceedings of the 15th World Veterinary Poultry Congress.* Beijing, China. September 10-15, 2007:240.
3. Mushin R, Weisman Y, Singer N. *Pasteurella haemolytica* found in the respiratory tract of fowl. *Avian Dis.* 1979; 24:162-168.
4. García-Gómez E, Vaca S, Pérez-Méndez A, Ibarra-Caballero J, Pérez-Márquez V, Tenorio RV, Negrete-Abascal E. *Gallibacterim anatis*-secreted metalloproteases degrade chicken IgG. *Avian Pathol.* 2005; 34:426-429.
5. Kristensen MB, Frees D, Bojesen AM. GtxA from *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX-toxin with a novel domain organization. *Vet. Res.* 2010; 41: 25. Epub 2009 Dec 4.
6. Bojesen AM, Soriano VE, Kristensen BM. Identification and characterization of the capsule biosynthetic locus of *Gallibacterium anatis* biovar *haemolytica*. *Proceedings of the 15th World Veterinary Poultry Congress.* Beijing, China. September 10-15, 2007:244.

7. Zepeda A, Ramírez S, Vega V, Morales V, Talavera M, Salgado-Miranda C, Simón-Martínez, Bojesen AM, Soriano-Vargas E. Hemagglutinating activity of *Gallibacterium* strains. Avian Dis. 2009; 53:115-118.
8. Ramírez AS. "Adherencia de *Gallibacterium* a células epiteliales de tráquea y oviducto de la gallina". Tesis. Universidad Autónoma de Estado de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, 2008.
9. Harbourne JF. A hemolytic cocco-bacillus recovered from poultry. Vet Rec. 1962; 74:566-567.
10. Bojesen AM, Nielsen OL, Christensen PJ, Bisgaard M. In vivo studies of *Gallibacterium anatis* infection in chickens. Avian Pathol. 2004; 33:147-154.
11. Bojesen AM, Christensen H, Nielsen OL, Olsen JE, Bisgaard M. Detection of *Gallibacterium* spp. in chickens by fluorescent 16S rRNA in situ hybridization. J Clin Microbiol. 2003; 41:5167-5172.
12. Bisgaard M. Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of apparently healthy chickens and chickens infectious bronchitis. Avian Pathol. 1977; 6:285-292.
13. Glisson JR. *Pasteurella* and other related bacterial infections. In Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE. Diseases of Poultry. Iowa State Press. 11th ed. Ames: Iowa State Press. 2003:657-676.
14. Inzana TJ. Capsules and virulence in the HAP group of bacteria. Can J Vet Res. 1990; 54:S22- S27.
15. Bojesen AM, Torpdahl M, Christensen H, Olsen JE, Bisgaard M. Genetic diversity of *Gallibacterium anatis* isolates from different chicken flocks. J Clin Microbiol. 2003; 41:2737-2740.

16. Shaw DP, Bouley DC, Maheswaran SK, Lindeman CJ, Halvorson DA. *Pasteurella haemolytica* as a co-pathogen in pullets and laying hens. *Avian Dis.* 1990; 34:1005-1008.
17. Rzewuska M, Karpinska E, Szeleszczuk P, Binek M. Isolation of *Gallibacterium* spp. from peacocks with respiratory tract infections. *Med Wet.* 2007; 63:1431-1433.
18. Hacking CW, Pettit RJ. *Pasteurella haemolytica* in pullets and laying hens. *Avian Dis.* 1974; 18: 483-486.
19. Bojesen AM, Shivaprasad HL. Genetic diversity of *Gallibacterium* isolates from California turkeys. *Avian Pathol.* 2007; 36; 227-230.
20. Gregersen RH, Neubauer C, Christensen H, Korczak B, Bojesen AM, Hess M, Bisgaard M. Characterization of *Pasteurellaceae*-like bacteria isolated from clinically affected psittacine birds. *J Appl Microbiol.* 2009. Epub ahead of print.
21. Gautier AL, Dubois D, Escande F, Avril JL, Trieu-Cuot P, Gaillot O. Rapid and accurate identification of human isolates of *Pasteurella* and related species by sequencing the *sodA* gene. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:2307-2314.
22. Rimler RB, Sandhu TS, Glisson RJ. Pasteurellosis, Infectious Serositis, and Pseudotuberculosis. In Saif YM, Swayne DE, Glisson RJ, Jackwood WM, Pearson EJ, Reed MW. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. American Association of Avian Pathologists. 4th ed. United States of America. 1998; 256-257.
23. Brumell JH, Finlay BB. Bacterial invasion, colonization, and survival. In: Brogden KA, Roth JA, Stanton TB, Bolin CA, Minion FC, Wannemuehler MJ, editors. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens.* United States of America: ASM Press, 2000:3-17.

24. Dahl C, Permin A, Christensen JP, Bisgaard M, Muhairwa AP, Petersen KMD, Poulsen JSD, Jensen AL. The effect of concurrent infections with *Pasteurella multocida* and *Ascaridia galli* on free range chickens. *Vet Microbiol.* 2002; 86:313-324.
25. Soriano VE, Longinos GM, Fernández RP. Aislamiento y caracterización de *Ornithobacterium rhinotracheale* obtenido de pavos con enfermedad respiratoria. *Vet Méx.* 2003; 34:283-288.
26. Chadfield MS, Bojesen AM, Christensen JP, Juul-Hansen J, Saxmose S, Nielsen and Bisgaard M. Reproduction of sepsis and endocarditis by experimental infection of chickens with *Streptococcus gallinaceus* and *Enterococcus hirae*. *Avian Pathol.* 2005; 34:238-247.
27. Biberstein EL, Gills M, Knight H. Serological types of *Pasteurella haemolytica*. *Cornell Vet.* 1960; 50:283-300.
28. Aluja AS, Constantino FC. Técnicas de necropsia en animales domésticos. 2da. México: Manual moderno, 2002:49- 58.
29. Leavitt S, Ayroud M. *Riemerella anatipestifer* infection of domestic ducklings. *Can Vet J.* 1997; 38:113.
30. Goto Y, Nakura R, Nasu T, Sawada T, Shinjo T. Isolation of *Pasteurella multocida* an outbreak of infectious septicemia in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J Vet Med Sci.* 2001; 63:1055-1056.
31. Hunter B, Wobeser G. Pathology of experimental avian cholera in mallard ducks. *Avian Pathol.* 1979; 24:403 -414.

32. Nakamura M, Nagamine N, Takahashi T, Norimatsu M, Suzuki S, Sato S. Intratracheal infection of chickens with *Salmonella enteritidis* and the effect of feed and water deprivation. *Avian Dis.* 1995; 39:853- 858.
33. Biberstein EL, Kennedy CP. Septicemic Pasteurellosis in lambs. *Am J Vet Res.* 1959; 20:94-101.
34. Virgin S. Pathogenesis of Viral Infections. En: *Fields of Virology*. Ed. Lippincott Williams & Wilkins V. Wolters Kluwer Health ed. 2007:327-388.
35. Neubauer C, De Souza-Pilz M, Bojesen A. M, Bisgaard M, Hess M. Tissue distribution of haemolytic *Gallibacterium anatis* isolates in laying birds with reproductive disorders. *Avian Pathol.* 2009; 38:1-7.
36. Bryant BJ, Conry-Cantilena C, Ahlgren A, Felice A, Stroncek FD, Gobble J, Leitman FS. *Pasteurella multocida* bacteremia in asymptomatic plateletpheresis donors: a tale of two cats. *Transfusion* 2007; 47:1984-1989.
37. Cole K, Donoghue AM, Blore PJ, Holliman JS, Cox NA, Musgrove MT, Donoghue DJ. Effects of Aeration and Storage Temperature on *Campylobacter* Concentrations in Poultry Semen. *Poult Sci.* 2004; 83; 1734–1738.
38. Bojesen AM, Nielsen SS, Bisgaard M. Prevalence and transmission of hemolytic *Gallibacterium* species in chickens production system with different biosecurity levels. *Avian Pathol.* 2003; 32:503-510.

ANEXOS

Cuadro 1. Cepas de referencia de *Gallibacterium* spp, empleadas en el estudio.

<i>Gallibacterium</i>	País	Origen	Ha*	Adherencia**	Aislamiento asociado a lesión	Órgano
ATCC 43329 (F 149) ^T	Dinamarca	Pato	-	-	-	Intestino
10672/9 Salp. (F 114)	Dinamarca	Pollo	+	+	+	Oviducto
CCM 5976	República Checa	Pollo	+	+	+	Oviducto

*Ha = Hemoaglutinación.⁷

** De acuerdo con Ramírez.⁸

Cuadro 2. Cronología de la infección experimental, observación y necropsia de las aves.

Tiempo / Acción	7 días	Día 0	Horas pi			Días postinfección										
			48	72	96	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Adaptación	X															
Inoculación		X														
Signología			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Necropsia			X	X	X						X					X

Cuadro 3. Hallazgos histológicos de lesiones observadas en aves infectadas con la cepa ATCC 43329 (F149)^T de *Gallibacterium* spp.

Cuadro de Lesiones																		
Lesiones observadas	Grupo Testigo			Día 2 pi			Día 3 pi			Día 4 pi			Día 10 pi			Día 15 pi		
Tráquea																		
Congestión y/o hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltración heterofílica	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltración linfocitaria	0	0	0	1	0	1	2	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
Fusión de cilios (aspecto de mechones)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pérdida de cilios	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis de células epiteliales	0	0	0	0	2	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	2	2	2
Sincitios	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Descamación del epitelio	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0
Hiperplasia del epitelio traqueal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Exudado en la luz traqueal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Agregados basófilos (bacterias)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pulmones																		
Congestión	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemorragias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltración heterofílica intersticial	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Infiltrado linfocitario intersticial	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1
Exudado en la luz de los bronquios	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eritrocitos en la luz de los bronquios	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltración heterofílica en bronquios	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Hiperplasia linfocitaria en bronquios	0	0	0	2	1	2	1	1	2	2	2	1	1	3	2	1	2	2
Agregados basófilos (bacterias)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sacos aéreos																		

Infiltración linfocitaria	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	2	1	2	2	1
Infiltración heterofílica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1	2	2
Fusión de cilios (aspecto de mechones)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pérdida de cilios	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Hiperplasia del epitelio	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agregados basófilos (bacterias)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hígado																		
Congestión y/o hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltración heterofílica intersticial	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltración heterofílica perivascular	0	0	0	2	2	2	1	2	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
Infiltrado linfocitario intersticial	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrado linfocitario Perivascular	0	0	0	2	2	2	1	1	2	1	1	2	2	2	1	2	2	1
Necrosis de hepatocitos	0	0	0	2	0	3	2	1	0	1	1	0	1	2	2	1	1	2
Agregados basófilos (bacterias)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Severidad de lesiones: 0= sin lesiones leve = 1 moderado = 2 severo = 3

Cuadro 4. Hallazgos histológicos de lesiones observadas en aves infectadas con la cepa 10672/9 Salp. (F114) de *Gallibacterium* spp.

Cuadro de Lesiones																		
Lesiones observadas	Grupo testigo			Día 2 pi			Día 3 pi			Día 4 pi			Día 10 pi			Día 15 pi		
Tráquea																		
Congestión y/o hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltración heterofílica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Infiltración linfocitaria	0	0	0	1	1	0	1	2	2	0	0	0	1	0	1	1	0	0
Fusión de cilios (aspecto de mechones)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pérdida de cilios	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis de células epiteliales	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Sincitios	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Descamación del epitelio	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0
Hiperplasia del epitelio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

traqueal																		
Exudado en la luz traqueal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Agregados basófilos (bacterias)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pulmones																		
Congestión	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemorragias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrado heterofílico intersticial	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Infiltrado linfocitario intersticial	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
Exudado en la luz de los bronquios	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eritrocitos en la luz de los bronquios	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltración heterofílica en bronquios	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
Hiperplasia linfocitaria en bronquios	0	0	0	0	3	0	1	1	2	1	2	3	1	3	3	2	2	2
Agregados basófilos (bacterias)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sacos aéreos																		
Infiltración linfocitaria	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1
Infiltración heterofílica	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Fusión de cilios (aspecto de mechones)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pérdida de cilios	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Hiperplasia del epitelio	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Agregados basófilos (bacterias)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hígado																		
Congestión y/o hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltración heterofílica intersticial	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltración heterofílica perivascular	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Infiltrado linfocitario intersticial	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Infiltrado linfocitario Perivascular	0	0	0	0	1	0	2	2	3	1	1	2	1	1	0	1	1	1
Necrosis de hepatocitos	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	2
Agregados basófilos (bacterias)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Severidad de lesiones: 0= sin lesiones leve = 1 moderado = 2 severo = 3

Cuadro 5. Hallazgos histológicos de lesiones observadas en aves infectadas con la cepa CCM 5976 de *Gallibacterium* spp.

Cuadro de Lesiones																		
Lesiones observadas	Grupo testigo			Día 2 pi			Día 3 pi			Día 4 pi			Día 10 pi			Día 15 pi		
Tráquea																		
Congestión y/o hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Infiltración heterofílica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	
Infiltración linfocitaria	0	0	0	2	2	0	2	2	2	3	3	3	0	2	2	1	2	0
Fusión de cilios (aspecto de mechones)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pérdida de cilios	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
Necrosis de células epiteliales	0	0	0	1	2	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
Sincitios	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Descamación del epitelio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	2	2	2	1
Hiperplasia del epitelio traqueal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Exudado en la luz traqueal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1
Agregados basófilos (bacterias)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pulmones																		
Congestión	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hemorragias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Infiltración heterofílica intersticial	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
Infiltrado linfocitario intersticial	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
Exudado en la luz de los bronquios	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Eritrocitos en la luz de los bronquios	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Infiltración heterofílica en bronquios	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
Hiperplasia linfocitaria en bronquios	0	0	0	1	1	2	2	2	2	2	2	3	2	3	3	1	1	3
Agregados basófilos (bacterias)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sacos aéreos																		
Infiltración linfocitaria	0	0	0	0	1	0	1	1	0	2	3	3	1	2	0	0	0	0
Infiltración heterofílica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	1	0	0	0	0

Fusión de cilios (aspecto de mechones)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pérdida de cilios	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiperplasia del epitelio	0	0	0	1	0	0	0	2	2	0	1	0	1	1	0	0	1	1
Agregados basófilos (bacterias)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hígado																		
Congestión y/o hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltración heterofílica intersticial	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
Infiltración heterofílica perivascular	0	0	0	1	2	1	2	2	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0
Infiltrado linfocitario intersticial	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0
Infiltrado linfocitario Perivascular	0	0	0	3	1	3	2	3	2	2	1	2	2	2	1	1	0	1
Necrosis de hepatocitos	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	1	3	1	1	2	2	1
Agregados basófilos (bacterias)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Severidad de lesiones: 0= sin lesiones leve = 1 moderado = 2 severo = 3

Modificado de Nakamura *et al.*³¹

Cuadro 6. Porcentaje de los órganos afectados en aves ALPES inoculadas por las cepas de referencia.

Cepa Órgano	ATCC 43329 (F149) ^T	10672/9 Salp. (F114)	CCM 5976
Tráquea	46 %	80 %	93.33 %
Pulmón	66.66 %	73.33 %	86.66 %
Saco aéreo	0 %	60 %	80 %
Hígado	80 %	86.66%	93.33%

Cuadro 7. Aislamiento de la cepa ATCC 43329 (F 149)^T a partir de las aves infectadas.

Órganos / Días pi	Cepa ATCC 43329 (F 149) ^T				
	Día 2 pi	Día 3 pi	Día 4 pi	Día 10 pi	Día 15 pi
S. Infraorbitarios	-	+	+	+	-
Timo	-	-	-	-	-
Tráquea	+	++	-	++	+
Sacos Aéreos	-	-	-	-	-
Pulmón	-	-	-	-	-
Corazón	-	-	-	-	-
Hígado	-	-	+	-	-
Bazo	-	-	-	-	-
Riñón	-	-	-	-	-
Bolsa de Fabricio	-	-	-	-	-
Tonsilas Cecales	-	-	-	-	-
Testículo	+	-	-	-	-
Medula Ósea	-	-	-	-	-
Articulación	-	-	-	-	-

- no aislamiento; + aislamiento de 1/3; ++ aislamiento de 2/3.

Cuadro 8. Aislamiento de la cepa 10672/9 Salp. (F 114) de *Gallibacterium anatis* a partir de las aves infectadas de manera experimental en el estudio.

Órganos / Días pi	Cepa 10672/9 Salp. (F 114)				
	Día 2 pi	Día 3 pi	Día 4 pi	Día 10 pi	Día 15 pi
S. Infraorbitarios	+	++	++	++	++
Timo	-	+	+	-	-
Tráquea	-	++	++	+	-
Sacos Aéreos	-	-	-	-	-
Pulmón	-	-	-	-	-
Corazón	-	-	-	-	-
Hígado	-	+	-	-	-
Bazo	-	-	-	-	-
Riñón	-	+	-	-	-
Bolsa de Fabricio	-	-	-	-	-
Tonsilas Cecales	-	-	-	-	-
Testículo	-	-	-	-	-
Medula Ósea	-	+	-	-	-
Articulación	-	-	-	-	-

- no aislamiento; + aislamiento de 1/3; ++ aislamiento de 2/3.

Cuadro 9. Aislamiento de la cepa CCM 5976 de *Gallibacterium anatis* a partir de las aves infectadas de manera experimental en el estudio.

Órganos / Días pi	Cepa CCM 5976				
	Día 2 pi	Día 3 pi	Día 4 pi	Día 10 pi	Día 15 pi
S. Infraorbitarios	++	-	+	++	++
Timo	+	-	-	-	-
Tráquea	+	+	-	+	+
Sacos Aéreos	-	-	-	-	-
Pulmón	-	-	-	-	-
Corazón	-	-	-	-	-
Hígado	-	-	-	-	-
Bazo	-	-	-	-	-
Riñón	+	-	-	-	-
Bolsa de Fabricio	-	-	-	-	-
Tonsilas Cecales	-	-	-	-	-
Testículo	-	-	+	-	-
Medula Ósea	-	-	-	-	-
Articulación	-	-	-	-	-

- no aislamiento;

+ aislamiento de 1/3;

++ aislamiento de 2/3.