



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

---

**DETERMINACIÓN DE LOS VIRUS ENTÉRICOS  
INVOLUCRADOS EN CUADROS DE SÍNDROME  
DE MALA ABSORCIÓN EN POLLO DE  
ENGORDA**

**TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA  
RAQUEL MIJARES GONZÁLEZ**

**TUTOR:  
NÉSTOR LEDESMA MARTÍNEZ**

**COMITÉ TUTORAL:  
JOSÉ ANTONIO QUINTANA LÓPEZ  
JUAN CARLOS DEL RÍO GARCÍA**

**MÉXICO, D.F.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **DEDICATORIA**

A toda mi familia y amigos por todo su cariño y por siempre estar ahí a lo largo de mi vida.

A Les, que siempre ha creído en mi.

**Con mucho cariño.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Dr. Néstor Ledesma por darme la oportunidad de realizar esta investigación.

A todos los que forman parte del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves por todos sus consejos y apoyo.

Al Dr. José Antonio Quintana y al Dr. Juan Carlos del Río por sus comentarios para enriquecer este trabajo.

Al Dr. Ernesto Soto por facilitarme el material necesario para la realización de este trabajo y por todo su apoyo.

A mis jurados: Dr. Félix Sánchez Godoy, Dra. Laura Cobos Marín, Dr. Álvaro Aguilar Setién y Dr. Abel Ciprian Carrasco.

A José G. González, Alfredo Díaz y Elisa Vázquez por su ayuda en la realización de diversas pruebas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico.

A mi familia y amigos, no tengo palabras para agradecerles.

A todos aquellos que involuntariamente dieron su vida para la realización de este trabajo.

## CONTENIDO

DEDICATORIA .....	I
AGRADECIMIENTOS .....	II
CONTENIDO .....	III
LISTA DE CUADROS .....	VI
LISTA DE FIGURAS .....	VI
LISTA DE ANEXOS .....	VII
ABREVIATURAS .....	VIII
RESUMEN .....	IX
ABSTRACT .....	X
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Situación de la avicultura en México .....	1
1.2. Antecedentes .....	2
1.3. Importancia económica .....	3
1.4. Etiología .....	3
1.5. Agentes virales involucrados .....	4
I. Coronavirus .....	4
II. Picornavirus .....	5
III. Reovirus .....	6
1.6. Síndrome de mala absorción (SMA) .....	7
I. Descripción .....	7
II. Patogenia .....	7
III. Hallazgos .....	8
IV. Prevención y control .....	8
2. JUSTIFICACIÓN .....	10
3. OBJETIVO GENERAL .....	11
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
5. HIPÓTESIS .....	11
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	12
6.1. Inhibición de la Hemoaglutinación para ENC .....	13
6.2. Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp .....	13
6.3. Conteo de coccidias .....	14
6.4. ELISA .....	14
6.5. Aislamiento viral para Reovirus, Picornavirus y Coronavirus .....	15
I. Inoculación en cavidad alantoidea .....	15
II. Inoculación en saco vitelino .....	16
III. Inoculación vía membrana corioalantoidea .....	16
6.6. Extracción de ARN .....	17
6.7. RT-PCR .....	17
6.8. Histopatología .....	18
7. RESULTADOS .....	19
A. Necropsia .....	19
B. Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp .....	20
C. Inhibición de la hemoaglutinación para ENC .....	20

D.	Estudio coproparasitológico .....	20
E.	Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus .....	20
F.	Aislamiento viral en embrión de pollo .....	20
G.	Biología molecular .....	20
H.	Histología .....	20
<b>II.</b>	<b>ENFERMOS CASO 2</b> .....	<b>21</b>
A.	Necropsia .....	21
B.	Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp .....	22
C.	Inhibición de la hemoaglutinación para ENC .....	22
D.	Estudio coproparasitológico .....	22
E.	Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus .....	22
F.	Aislamiento viral en embrión de pollo .....	22
G.	Biología molecular .....	22
H.	Histología .....	22
<b>III.</b>	<b>ENFERMOS CASO 3</b> .....	<b>23</b>
A.	Necropsia .....	24
B.	Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp .....	24
C.	Inhibición de la hemoaglutinación para ENC .....	24
D.	Estudio coproparasitológico .....	25
E.	Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus .....	25
F.	Aislamiento viral en embrión de pollo .....	25
G.	Biología molecular .....	25
H.	Histología .....	25
<b>IV.</b>	<b>ENFERMOS CASO 4</b> .....	<b>26</b>
A.	Necropsia .....	26
B.	Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp .....	27
C.	Inhibición de la hemoaglutinación para ENC .....	27
D.	Estudio coproparasitológico .....	27
E.	Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus .....	27
F.	Aislamiento viral en embrión de pollo .....	28
G.	Biología molecular .....	28
H.	Histología .....	28
<b>V.</b>	<b>ENFERMOS CASO 5</b> .....	<b>29</b>
A.	Necropsia .....	29
B.	Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp .....	30
C.	Inhibición de la hemoaglutinación para ENC .....	30
D.	Estudio coproparasitológico .....	30
E.	Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus .....	30
F.	Aislamiento viral en embrión de pollo .....	30
G.	Biología molecular .....	31
H.	Histología .....	31
<b>VI.</b>	<b>SANOS 1</b> .....	<b>32</b>
A.	Necropsia .....	32
B.	Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp .....	32
C.	Inhibición de la hemoaglutinación para ENC .....	32

D.	Estudio coproparasitológico .....	32
E.	Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus .....	32
F.	Aislamiento viral en embrión de pollo .....	32
G.	Biología molecular .....	33
H.	Histología .....	33
<b>VII.</b>	<b>SANOS 2</b> .....	34
A.	Necropsia .....	34
B.	Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp .....	35
C.	Inhibición de la hemoaglutinación para ENC .....	35
D.	Estudio coproparasitológico .....	35
E.	Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus .....	35
F.	Aislamiento viral en embrión de pollo .....	35
G.	Biología molecular .....	35
H.	Histología .....	35
<b>VIII.</b>	<b>SANOS 3</b> .....	36
A.	Necropsia .....	36
B.	Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp .....	36
C.	Inhibición de la hemoaglutinación para ENC .....	36
D.	Estudio coproparasitológico .....	36
E.	Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus .....	36
F.	Aislamiento viral en embrión de pollo .....	37
G.	Biología molecular .....	37
H.	Histología .....	37
<b>IX.</b>	<b>SANOS 4</b> .....	38
A.	Necropsia .....	38
B.	Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp .....	38
C.	Inhibición de la hemoaglutinación para ENC .....	39
D.	Estudio coproparasitológico .....	39
E.	Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus .....	39
F.	Aislamiento viral en embrión de pollo .....	39
G.	Biología molecular .....	39
H.	Histología .....	39
	<b>SANOS 5</b> .....	40
A.	Necropsia .....	40
B.	Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp .....	41
C.	Inhibición de la hemoaglutinación para ENC .....	41
D.	Estudio coproparasitológico .....	41
E.	Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus .....	41
F.	Aislamiento viral en embrión de pollo .....	41
G.	Biología molecular .....	41
H.	Histología .....	41
8.	DISCUSIÓN .....	42
9.	CONCLUSIÓN .....	46
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	47

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Resultados de la prueba de aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp para los casos de aves que presentaron signos clínicos de SMA .....	51
Cuadro 2. Resultados de la prueba de hemoaglutinación para la enfermedad de Newcastle para los casos de aves que presentaron signos clínicos de SMA .....	51
Cuadro 3. Resultados del estudio coproparásitológico para los casos de aves que presentaron signos clínicos de SMA .....	51
Cuadro 4. Resultados de la prueba de ELISA para Coronavirus en casos de aves que presentaron casos clínicos de SMA .....	52
Cuadro 5. Resultados de la prueba de ELISA para Reovirus en casos de aves que presentaron casos clínicos de SMA .....	52
Cuadro 6. Resultados de aislamiento viral y prueba de RT-PCR de los casos con signos clínicos .....	53
Cuadro 7. Resultados de la prueba de aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp para los casos de aves clínicamente sanas .....	53
Cuadro 8. Resultados de la prueba de hemoaglutinación para la enfermedad de Newcastle para los casos de aves clínicamente sanas .....	54
Cuadro 9. Resultados del estudio coproparásitológico para los casos de aves clínicamente sanas. ....	54
Cuadro 10. Resultados de la prueba de ELISA para Coronavirus en casos de aves clínicamente sanas .....	54
Cuadro 11. Resultados de la prueba de ELISA para Reovirus en casos de aves clínicamente sanas .....	55
Cuadro 12. Resultados de aislamiento viral y prueba de RT-PCR de los casos clínicamente sanos .....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lesiones en embrión de pollo por reovirus. Hígado con necrosis y cardiomegalia .....	56
Figura 2. Lesiones en embrión de pollo por reovirus. Hígado: necrosis en bordes y hemorragias moderadas. ....	56
Figura 3. Lesiones en embrión de pollo por reovirus. Cardiomegalia. ....	56
Figura 4. Lesiones en embrión de pollo por coronavirus. Enanismo, embrión en ovillo .....	56
Figura 5. Lesiones en embrión de pollo por coronavirus. Enanismo, embrión en ovillo, mal emplume .....	56
Figura 6. Lesiones en embrión de pollo por coronavirus: Presencia de uratos en riñón .....	56
Figura 7. Resultados de RT-PCR interno para coronavirus en casos de aves sanas .....	57



Figura 8. Resultados de RT-PCR interno para coronavirus a partir de muestras de casos con signos clínicos. ....	57
Figura 9. Resultados de RT-PCR para picornavirus a partir de muestras de aves sanas. ....	58
Figura 10. Resultados de RT-PCR para reovirus a partir de muestras de aves con signos clínicos. ....	58
Figura 11. Proventriculitis severa. ....	59
Figura 12. Enteritis linfocitaria leve. ....	59
Figura 13. Intestino sin cambios patológicos aparentes. ....	59
Figura 14. Hígado de embrión normal. ....	59
Figura 15. Enteritis linfocitaria severa y presencia de quiste. ....	59
Figura 16. Necrosis hepática en embrión de pollo inoculado por saco vitelino. ....	59

### **LISTA DE ANEXOS**

Anexo 1. ....	60
Anexo 2. ....	61
Anexo 3. ....	62

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
DEPC	Dietil-pirocarbonato
ENC	Enfermedad de Newcastle
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (Enzyme-linked immunoabsorbent assay)
GDP	Ganancia diaria de peso
HE	Hematoxilina y eosina
IBF	Infección de la bolsa de Fabricio
IA	Influenza Aviar
HI	Inhibición de la hemoaglutinación
LT	Laringotraqueitis
µl	Microlitros
ml	Mililitros
mM	Milimolar
Mg	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
Ms	<i>Mycoplasma sinoviae</i>
nm	Nanómetro
pH	Potencial de Hidrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
REO	Reovirus
RT-PCR	Retrotranscriptasa-Reacción en cadena de la polimerasa (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
Sp	<i>Salmonella sp.</i>
SCPA	Sin cambios patológicos aparentes
SMA	Síndrome de mala absorción
PBS	Solución amortiguada de fosfatos (Phosphate buffer solution)
UHA	Unidades Hemoaglutinantes

## RESUMEN

México se encuentra en el 5° lugar a nivel mundial en producción de pollo de engorda, por lo que la avicultura juega un papel muy importante en la economía mexicana. El Síndrome de Mala Absorción fue descrito por primera vez en los años 50's, volviéndose más común en los años 70's, actualmente es un padecimiento de distribución mundial que afecta al pollo de engorda, principalmente a partir de los 21 días de edad ocasionando trastornos a nivel intestinal, como son diarrea acuosa, pérdida de peso, mal emplume, que afectan los parámetros productivos ocasionando un aumento en la mortalidad, parvadas no uniformes que no logran el peso requerido al mercado repercutiendo en graves pérdidas económicas.

Se han realizado diferentes estudios pero no se ha logrado establecer cuál es la etiología exacta de este padecimiento. Se han asociado diferentes virus, entre ellos reovirus, coronavirus, astrovirus, picornavirus and parvovirus, así como deficiencias nutricionales, procesos tóxicos, factores ambientales y estrés.

Dado que estos virus han sido los agentes más señalados dentro del síndrome de mala absorción, en este estudio se realizaron diferentes pruebas encaminadas a demostrar reovirus, coronavirus y picornavirus, así como evaluar la salud general de la parvada.

Las pruebas realizadas son serologías, coproparasitoscópicos e histología de proventrículo e intestino de 5 casos de pollos con signos clínicos de SMA y 5 casos de pollos clínicamente sanos, así como aislamiento viral en embrión de pollo y RT-PCR para reovirus, picornavirus y coronavirus. Fueron encontrados 5 de 5 positivos a reovirus tanto en enfermos como en clínicamente sanos y coronavirus en 3 de 5 casos con signos clínicos, lo cual indica que puede existir una relación entre estos para que se presenten signos de SMA. En este estudio no hubo evidencia de infección por picornavirus.

Palabras clave: Síndrome de Mala Absorción, aves, reovirus, coronavirus, picornavirus

## **ABSTRACT**

Mexico is 5th place in the world for broiler production, making aviculture a very important factor of the Mexican economy. Malabsorption Syndrome was described for the first time in the 50's and became more common in the 70's. Nowadays, there is worldwide distribution of the disease that affects broilers from 21 days of age; causing intestinal problems such as diarrhea, weight loss, and bad feathering. These problems affect productive parameters causing an increase in mortality, non-uniformity in flocks that do not reach the weight required in the market, and is reflected in high economic losses.

It has been performed in different studies, but has not been established the exact etiology of the disease. Viruses such as reovirus, coronavirus, astrovirus, picornavirus and parvovirus have been associated with malabsorption; as well as nutritional deficiencies, toxic processes, environmental factors and stress.

Given that these viruses have been the most mentioned causes of Malabsorption Syndrome, this study performed different tests in order to evaluate reovirus, coronavirus and parvovirus, and the general health of the flocks as well.

The tests were: serology, coproparasitologic and histology of the proventriculus and intestine of 5 chicken cases with clinical signs of malabsorption syndrome and 5 chicken cases with no signs, using viral isolation in chicken embryos and RT-PCR for reovirus, picornavirus and coronavirus. Reovirus was found in 5 of 5 cases with and without clinical signs and coronavirus was found in 3 of 5 cases with clinical signs, which indicate that a relation can exist between those that present signs of malabsorption syndrome. In this study there was no evidence of picornavirus infection.

Key words: Malabsorption Syndrome, poultry, reovirus, coronavirus, picornavirus

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Situación de la avicultura en México

La producción de pollo en México durante el periodo de 1994 a 2010 ha aumentado a un ritmo de crecimiento anual del 4.6%. La avicultura representa el 63.4% de la producción pecuaria del país, del cual 2,822,413 toneladas corresponden a pollo de engorda, colocando a México en el 5º lugar a nivel mundial en esta área, además de generar alrededor de 1,153,000 empleos directos e indirectos. El consumo per-cápita de carne de pollo en el 2010 fue de 26.0 kg, ya que es la proteína de origen animal más económica y preferida por su calidad, frescura y accesibilidad.<sup>1</sup>

Los estados productores más importantes son: Coahuila y Durango que conforman la Comarca Lagunera (12%), Veracruz (11%), Querétaro (11%), Aguascalientes (9%), Jalisco (7%), Puebla (7%), Chiapas, Yucatán y Nuevo León (5%), Sinaloa, Guanajuato, Estado de México y San Luis Potosí (4%) y Morelos (3%).<sup>1</sup>

Por todo lo antes mencionado la avicultura juega un papel muy importante en la economía mexicana, por lo que es necesario seguir tomando las medidas necesarias para que la industria avícola siga creciendo, siendo uno de los puntos importantes la revisión constante de la salud de las parvadas, ya que, si no se tienen medidas de bioseguridad adecuadas se pueden provocar grandes pérdidas que repercutirán en la economía del sector avícola y de México.

Existen trastornos que afectan a las aves que han sido clasificados como síndromes, ya que se desconoce el agente causal o se encuentran asociados a una etiología multifactorial.<sup>2</sup> Un ejemplo de esto es el Síndrome de mala absorción (SMA), que ha sido reportado con diferentes nombres, entre ellos; Síndrome de Tránsito Rápido, Enteritis viral, Síndrome del Ave Pálida, Síndrome de Crecimiento Deficiente y Enanismo, Síndrome de Pollos Helicópteros, Proventriculitis Transmisible, entre otros.<sup>2,3,4,5</sup> Este padecimiento altera la salud intestinal de los

pollos, ocasionando que no se alcancen los parámetros productivos óptimos que se verá reflejado en pérdidas económicas graves.

Es muy importante el cuidado apropiado del pollito desde edad muy temprana, para obtener un buen desarrollo . Se deben de considerar 3 factores importantes para la salud del tracto intestinal<sup>6,7</sup>:

1. Inmunidad; protección contra agentes patógenos
2. Integridad; evitar la entrada y proliferación de agentes patógenos
3. Funcionalidad; optimizar el aprovechamiento de los nutrientes

La presentación de alteraciones intestinales en la parvada se determina por una variedad de factores, como son la edad y el estado inmunológico del ave, así como la virulencia, dosis infectante y la vía de entrada de los agentes patógenos.<sup>6,7,8</sup> También, según la etapa de crecimiento del ave, se debe de proporcionar una nutrición y manejo zootécnico adecuado; conservar condiciones de temperatura y humedad recomendados, hacer la desinfección de la caseta antes de la introducción del pollito y mantenerla limpia durante el ciclo de producción.<sup>5,9</sup>

## **1.2. Antecedentes**

El SMA fue descrito por primera vez en los 50's, siendo más común en los años 70's en Estados Unidos de América y Europa. Actualmente es un trastorno de distribución mundial que afecta diferentes especies aviares, como pavos, faisanes y gansos.<sup>4,9,10</sup>

A pesar de que se han realizado estudios en diferentes países, no se ha logrado establecer cuál es la etiología exacta de esta enfermedad, se han mencionado que pueden estar involucrados diferentes agentes virales; así como también agentes bacterianos, procesos tóxicos, deficiencias nutricionales, mal manejo zootécnico y estrés.<sup>11, 12</sup>

### 1.3. Importancia económica

Es un síndrome que afecta el óptimo funcionamiento del sistema digestivo, que afectará en los parámetros de producción; provocando un aumento del índice de conversión alimenticia, disminución en la ganancia de peso, parvadas no uniformes, mal emplume, aumento en la mortalidad y gastos imprevistos debido a tratamientos; todo esto se verá reflejado en graves pérdidas económicas para el avicultor.<sup>3,4,9,14,15,16,17</sup>

### 1.4. Etiología

Este síndrome, como se mencionó anteriormente se ha reportado que es de origen multifactorial, y no se conoce con certeza cuál es la causa primaria, se mencionan aspectos tanto infecciosos como no infecciosos.

Con respecto a los agentes infecciosos se mencionan principalmente los virales que dañan la mucosa intestinal afectando la capacidad de absorción favoreciendo la colonización por otros patógenos, como son *Escherichia coli* y *Salmonella spp*, que pudieran desencadenar deficiencias nutricionales.<sup>9</sup> Los virus que se han reportado en aves enfermas son: enterovirus-like, togavirus-like, astrovirus, adenovirus, calicivirus, coronavirus, parvovirus, reovirus, picornavirus y rotavirus.<sup>4,9,14,15</sup>

El daño intestinal dependerá del agente viral, por ejemplo, se ha reportado que los rotavirus y coronavirus se replican en las células epiteliales de la punta de las vellosidades; los reovirus y parvovirus lo hacen en las criptas y en el caso de los calicivirus, aún no se ha determinado el lugar con precisión.<sup>2,15</sup> Además del daño causado por factores virales, se ha documentado la acción de sustancias liberadas durante la respuesta inmune a la invasión viral, como las citocinas, que pueden afectar el funcionamiento intestinal.<sup>4,7</sup>

## 1.5. Agentes virales involucrados

Los agentes virales que se han reportado en casos con SMA son varios, pero para fines de este estudio solo se analizarán los siguientes:

### I. Coronavirus

Han sido relacionados con mayor frecuencia con enteritis en pavos aunque se ha encontrado en Estados Unidos de América en casos de alta mortalidad en pollos y disminución severa del crecimiento.<sup>9</sup>

Pertenece a la familia *Coronaviridae*, es un virus envuelto de forma esférica con cadena positiva simple de ARN con un diámetro de 60 a 220 nm. El virus se excreta en heces y la transmisión es por vía oral.<sup>9</sup> Presenta glicoproteínas en forma de pétalo, que se proyectan a partir de la envoltura de los viriones. Se compone de al menos 3 proteínas estructurales de importancia que son: glicoproteína (S), glicoproteína de membrana (M) y nucleocápside (N).<sup>8,9,18,19,20</sup>

- Glicoproteína S que forma las espículas en la superficie del virión, ésta se divide en 3 que son: S1, S2 y S3 de las cuales S1 es la que reconoce los receptores específicos localizados en la membrana celular, induce la formación de anticuerpos neutralizantes y la mutación de esta proteína provoca una alteración de la patogenicidad y la antigenicidad viral.
- Glicoproteína de membrana (M): forma parte de la envoltura viral y desencadena el ensamblaje viral,
- Fosfoproteína de la nucleocápside (N): se encuentra unida al ARN viral y forma la nucleocápside.

#### *Replicación viral*

La replicación viral ocurre principalmente en el citoplasma de células epiteliales del tracto respiratorio e intestinal, así como en macrófagos. Los receptores de la membrana celular se unen a las proyecciones virales, y, posteriormente se lleva a cabo la penetración a la célula receptora y pérdida de la envoltura, lo que provoca la liberación del ARN en el citoplasma y subsecuentemente la traducción viral



dando como resultado ARNm y a la replicación. Finalmente se forma la nucleocápside y la envoltura que protegerá al ARN.<sup>8,18,19,20,21</sup>

Se forman vesículas con acúmulos virales que son liberados por lisis celular destruyendo a los enterocitos de las vellosidades del intestino delgado.

El periodo de incubación es de 1 a 3 días y los signos que se reportan son diarrea acuosa, pérdida de peso, deshidratación, así como alta morbilidad y mortalidad variable. Los hallazgos a la necropsia en intestino son: contenido acuoso y gas; microscópicamente se observa atrofia de vellosidades, con aumento de células inflamatorias mononucleares en la lamina propia, y pérdida de microvellosidades,<sup>3,21</sup> también se puede presentar proventriculitis ocasionada por algunas cepas de coronavirus.<sup>8</sup>

## II. *Picornavirus*

Es un virus icosaédrico no envuelto, con cadena simple positiva de ARN, el virus tiene un tamaño de aproximadamente 22-30 nm de diámetro. Son estables en un pH ácido, lo que le confiere la capacidad de sobrevivir en el tracto intestinal.<sup>18,19</sup> La excreción viral es por heces y la vía de entrada es oral.<sup>9</sup> Se divide en 12 géneros de los cuales solo tres involucran virus aviares: Sapelovirus aviar, Tremovirus aviar y Avihepatovirus.

### *Replicación viral.*

La replicación viral ocurre en el citoplasma, principalmente en los enterocitos de la parte media de las vellosidades intestinales,<sup>3,9</sup> ésta inicia con la unión del virión a los receptores específicos localizados en la membrana celular; se inhibe la síntesis de proteínas de la célula hospedera y ocurre la liberación del ARN. Mediante el uso de los ribosomas y la síntesis de proteínas en el hospedero, se forman diversas proteínas; P1, P2, P3 y P4, que dan lugar a los protómeros maduros que confieren la diferencia entre los géneros de picornavirus, así como VPg que inicia la síntesis de ARN y ARN polimerasa y de esta forma dar origen a los viriones. Para la formación de la cápside, la proteína P1 da origen a un protómero inmaduro compuesto por agregados de proteínas, que posteriormente forman los

pentámeros; el virión adquiere su infectividad cuando se forman las subunidades VP4, 2, 3 y 1.<sup>18,19</sup>

Los signos reportados son diarrea y retraso en el crecimiento, también se ha observado destrucción de las vellosidades intestinales.<sup>3</sup>

### III. *Reovirus*

Se ha relacionado también con artritis-tenosinovitis, padecimientos respiratorios y síndrome de malabsorción, además de que se menciona que puede aumentar la patogenicidad de otros agentes como *E.coli* y coccidias.<sup>3,9</sup> La vía de entrada es oral y la excreción mediante heces,<sup>3,17,21</sup> aunque hay reportes de transmisión vertical<sup>3,9,21,22</sup> y que puede mantenerse en plumas, alimento y cascarón hasta por 10 días.<sup>17</sup>

Pertenece al género *Orthoreovirus* que se caracteriza por tener una forma esférica y la cápside es icosaédrica; es un virus no envuelto que posee una doble cadena lineal de ARN de un tamaño de 60 a 80 nm y su genoma tiene 10 segmentos. Es resistente a pH ácido. La replicación y ensamblaje ocurre principalmente en el citoplasma de los enterocitos.<sup>18,19</sup> Algunos autores mencionan que otros órganos blanco para la replicación de este virus son el hígado y la bolsa de Fabricio, donde se han observado focos de necrosis.<sup>3,21</sup>

#### *Replicación viral.*

Se da la unión mediante proyecciones virales que se unen a los receptores específicos de la célula hospedera y entra a ésta por endocitosis. En el citoplasma ocurre la liberación del ARN iniciándose la traducción primaria dando como resultado al ARNm, a partir del cual se da lugar a la replicación viral, mediante la traducción de proteínas virales para el ensamblaje de los viriones. Al poco tiempo de la infección viral, empieza la formación de diferentes estructuras virales en el citoplasma, haciéndose evidente la formación de numerosos cuerpos de inclusión de gran tamaño donde se lleva a cabo la liberación viral mediante lisis celular.<sup>21,22</sup>

Los signos varían según la edad e inmunidad del ave, patogenicidad viral y entre los más mencionados están: heces alrededor de la cloaca, aumento de la mortalidad, baja de peso, claudicación, anormalidades en pluma; como son crecimiento deficiente, plumas erizadas. Algunas de las lesiones son enteritis ulcerativa, proventriculitis, tenosinovitis del tendón digital flexor y tendón extensor metatarsiano, ruptura del tendón gastrocnemio, inflamación en el parénquima de diversos órganos, necrosis focal en corazón de aves jóvenes, hepatitis y focos de necrosis en hígado. Los signos se presentan con mayor frecuencia entre las 4-16 semanas de edad, pero el pico de incidencia es a las 7 semanas.<sup>3,19,21</sup>

## **1.6. Síndrome de mala absorción (SMA)**

### **I. Descripción**

Reovirus ha sido relacionado con más frecuencia en SMA. El cuadro clínico se ha descrito en diferentes países desde 1956, pero la presentación de los signos varían; se caracteriza por la presencia de heces acuosas que pueden presentar alimento sin digerir, diuresis, baja ganancia de peso, distensión de molleja y abdomen, mal emplume que se presenta principalmente en cabeza, alas y dorso, retraso en el crecimiento, así como el desarrollo de padecimientos secundarios como deficiencia nutricional, deficiencia en la pigmentación de la piel, osteodistrofia, tenosinovitis y ruptura del tendón gastrocnemio.<sup>3,17,20,23,24,25</sup>

También se menciona que puede lesionar páncreas, lo que sugiere que hay una deficiencia en la producción de enzimas, sin embargo esto no es una lesión persistente en todos los casos de SMA.<sup>15,21,26</sup>

### **II. Patogenia**

Se ha reportado que la posible causa de este síndrome es la replicación viral en el intestino, ocasionando la necrosis de criptas intestinales y la atrofia de microvellosidades intestinales que provocan una disminución en la absorción de

nutrientes y electrolitos, debido a una reducción en la superficie de absorción del tejido intestinal.<sup>2,15,16,27</sup>

Se ha reportado que existe un pico de mortalidad entre los 6 a 12 días de edad.<sup>12</sup>

### III. Hallazgos

Han sido descritos: hepatomegalia, esplenomegalia, cardiomegalia, así como atrofia de vellosidades intestinales, hipertrofia de criptas intestinales, focos de necrosis en hígado, pancreatitis, proventriculitis, enteritis catarral y atrofia de la Bolsa de Fabricio.<sup>2,11,15,16,17,21,23</sup>

Se ha encontrado degeneración vacuolar de las células epiteliales de las vellosidades intestinales, así como infiltración de linfocitos, macrófagos y granulocitos en la lámina propia, quistes en las criptas de intestino delgado, principalmente en yeyuno.<sup>4,12</sup>

Existen reportes donde se menciona que las lesiones se han inducido experimentalmente mediante solución homogénea de tejido y contenido intestinal de pollos con SMA en pollitos de 1 día de edad.<sup>4,11</sup> Sin embargo, en algunos casos en los que no se ha podido reproducir el cuadro clínico y las lesiones, se cree que la existencia inmunidad materna pudiera conferir protección e impedir la presentación de esta enfermedad en pollos comerciales.<sup>21,28</sup>

### IV. Prevención y control

Para evitar la diseminación se deben de mantener las condiciones adecuadas en la caseta, como son: cama seca, ventilación y temperatura, la desinfección del equipo e instalaciones.<sup>3,9,19,21</sup> Se ha reportado que el virus puede mantenerse viable en plumas, alimento y cascarón hasta por 10 días.<sup>16</sup> Por otra parte, se ha recomendado que al termino del ciclo se deseche el material de cama y si no se desechara, se menciona que debe calentarse a 37.7°C por 100 horas.<sup>12</sup>

A pesar de que se han aplicado vacunas con virus vivo en agua de bebida en pollo de engorda, no se obtuvo una buena protección; esto puede deberse a los diferentes serotipos que pueden afectar a las aves.<sup>25</sup> Sin embargo, se menciona que es recomendable aplicar la vacuna a las reproductoras para que la progenie

esté protegida, por lo que se sugiere que la presentación de los signos dependen de los títulos de anticuerpos maternos, así como de la patogenicidad, serotipo y vía de entrada del agente.<sup>21,25</sup>

Otro método que se ha recomendado para el control de este síndrome es la inmunización contra coronavirus y coccidiosis aviar, que se ha reportado que pueden ser factores predisponentes para la presentación de SMA.<sup>4</sup>

## 2. JUSTIFICACIÓN

Se han realizado varias investigaciones alrededor del mundo acerca del síndrome de mala absorción; en investigaciones realizadas por Fehérvári *et al.* (1998) y Casaubon *et al.* (1998) no se logró reproducir el cuadro clínico en pollos de engorda en México y aún no se han realizado investigaciones de campo.

Todavía no se ha logrado determinar cuál es el agente etiológico que afecta a las parvadas de pollo de engorda en México que presentan el cuadro clínico característico del SMA y aún se tienen muchas interrogantes en lo que respecta a este trastorno por lo que se deben de realizar investigaciones para determinar al agente etiológico y los factores involucrados, para poder establecer medidas de prevención eficaces, así como pruebas de diagnóstico rápidas y confiables para evitar que se afecte la industria.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

- Determinar en pollos de engorda en México, que presenten signos de SMA, si los siguientes agentes virales están presentes: reovirus, coronavirus y picornavirus.

### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar 5 parvadas comerciales de pollo de engorda con cuadro sugestivo de SMA y 5 parvadas clínicamente sanas.
2. Identificar los virus presentes en las parvadas estudiadas mediante:
  - Aislamiento viral en embrión de pollo.
  - RT-PCR (Retrotranscriptasa-Reacción en Cadena de la Polimerasa).
  - ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima)
3. Determinar las lesiones macro y microscópicas, así como su relación con los hallazgos de virología, serología y biología molecular

### **5. HIPÓTESIS**

En los pollos de engorda con cuadros clínicos sugestivos de SMA se encontrará al menos uno de los siguientes virus: coronavirus, reovirus y picornavirus.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 10 parvadas de pollos de engorda, de las cuales se seleccionaron 5 que presentaron el cuadro clínico de SMA y 5 clínicamente sanas, y se realizó el siguiente procedimiento:

- Se registró la historia clínica (ver anexo 1)
- Se tomaron muestras de sangre para obtener el suero y realizar pruebas serológicas:
  - Como indicador de la salud general de la parvada, se realizó:
    - Aglutinación en placa para micoplasmosis: *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) y *Mycoplasma synoviae* (Ms) y *Salmonella* sp (Sp).
    - Inhibición de la hemoaglutinación para Enfermedad de Newcastle (ENC)
  - ELISA de reovirus y coronavirus
- Se tomaron muestras de heces para el diagnóstico de coccidias mediante la técnica de McMaster.
- Se realizó la necropsia, para hacer la evaluación macroscópica.
- Se tomaron muestras del tracto intestinal de:
  - Proventrículo
  - Duodeno
  - Yeyuno
  - Íleon
- En el caso de animales con signos clínicos, se tomaron muestras de tendón, así como de exudado cuando estuvo presente.
- Las muestras de órganos, previamente conservadas en formol al 10%, fueron procesadas para histopatología
- Las muestras de órganos para aislamiento viral y biología molecular fueron congeladas a -20°C hasta su procesamiento.



Los resultados de todas las pruebas por parvada fueron analizados para establecer un diagnóstico integral de infección viral entérica que pudiera estar o no relacionada con los signos clínicos observados.

### **6.1. Inhibición de la Hemoaglutinación para ENC**

Se diluyó el antígeno de ENC<sup>A</sup> en PBS para obtener una concentración de 10 UHA. Se depositaron, mediante el uso de micropipetas Labsystems, 50 µl del antígeno diluido en una placa de 96 pozos y se agregaron 50 µl de los sueros a analizar en la primera fila, se mezclaron con una micropipeta y se llevaron a cabo diluciones dobles seriadas hasta la última fila y se desecharon los últimos 50 µl. Se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos y se agregaron 50 µl de eritrocitos de pollo al 0.5% a todos los pozos, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se tomó la lectura registrando la dilución en la que se produjo inhibición de la hemoaglutinación. Se utilizaron sueros testigos positivos y negativos para dar validez a la prueba.<sup>29</sup>

### **6.2. Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp**

Esta es una prueba cualitativa y se realizó de la siguiente manera: en una placa de acrílico se mezclaron, mediante el uso de micropipetas Labsystems, 30 µl del suero problema con 30 µl del antígeno a probar; Mg<sup>B</sup>, Ms<sup>C</sup> y Sp<sup>D</sup>. Se mezclaron las gotas con un palillo y se realizó la lectura en menos de 2 minutos. Se consideró positiva cuando la aglutinación ocurrió en menos de 60 segundos, sospechosa entre 60-90 segundos y negativa después de 90-120 segundos o si no ocurrió.<sup>29</sup>

---

<sup>A</sup> Antígeno de ENC. CPA. Lote. 02-09

<sup>B</sup> SPAFAS CHARLES RIVER. 6X100323

<sup>C</sup> SPAFAS CHARLES RIVER. 6F100216

<sup>D</sup> Antígeno K polivalente coloreado. 50 ml 1000 pruebas. Lohmann 9600h

### **6.3. Conteo de coccidias**

En un tubo de McMaster se vertió solución saturada de cloruro de sodio hasta la primera marca, posteriormente se agregó la muestra de excretas hasta la segunda marca (2 gramos de heces) y se mezcló por agitación. Se agregó solución saturada de cloruro de sodio hasta llenar el tubo y se mezcló por agitación. Inmediatamente después, con un gotero se tomó la parte superior de la mezcla y se llenó la cámara de McMaster dejándolo reposar por 5 minutos antes de hacer el conteo en el microscopio con objetivo 10X. El número total de coccidias por gramo de heces se ajustó tomando en cuenta el factor de dilución y el factor de la cámara ( $X100/2$ ).<sup>29</sup>

### **6.4. ELISA**

Se utilizaron juegos de reactivos comerciales para técnica de ELISA para detección cuantitativa de anticuerpos contra Reovirus (ProFLOK® REO Symbiotics cat. No. 96-6512) y Coronavirus (ProFLOK® IBV Symbiotics cat No. 96-6506) En microplacas de 96 pozos de fondo plano se colocaron, mediante el uso de micropipetas Labsystems, 300  $\mu$ l de solución amortiguadora por pozo y se agregaron los sueros a probar. Estas diluciones fueron transferidas a las placas de prueba. Se agregaron 6  $\mu$ l del control positivo en el primer, tercer y penúltimo pozo de la placa (A1, A3 y H11) y 6  $\mu$ l del control negativo en el segundo pozo de la placa (A2) así como en H10 y H12. Se colocaron los sueros diluidos a analizar en cada uno de los pozos de la placa de prueba de A4 hasta H9. Se incubaron por 30 minutos y se realizaron 5 lavados con 200  $\mu$ l de la solución de lavado. Se colocaron 100  $\mu$ l del conjugado (10 ml de buffer+100 $\mu$ l del concentrado de conjugado incluido en el kit) y se incubó por 30 minutos. Se hicieron 5 lavados. Se colocaron 100  $\mu$ l del sustrato incluido en el kit por pozo y se dejaron incubar a temperatura ambiente por 15 minutos. Se colocaron 100  $\mu$ l de la solución

detenedora por cada pozo y se hizo la lectura en el espectrofotómetro con el filtro de 405 nm.

## **6.5. Aislamiento viral para Reovirus, Picornavirus y Coronavirus**

### **PREPARACIÓN DE INÓCULO**

Se colectaron muestras a partir de proventrículo, duodeno, yeyuno e íleon, que se conservaron en congelación hasta la preparación de los inóculos.

Los órganos se cortaron en pequeñas porciones y posteriormente se maceraron en un mortero y se hizo una dilución al 20% de las muestras en PBS 1x estéril. Se centrifugaron las muestras a 500 g por 15 minutos y se obtuvo el sobrenadante.

El sobrenadante se filtró en membranas de 0.45 µm (Durapore® Membrane, PVDF, 0.45 µm, WH cat. HVLP02500) y se agregaron 0.2 ml de antibiótico. Se conservaron a -20° C hasta su utilización.

El aislamiento viral se llevó a cabo mediante inoculación en embrión de pollo.<sup>29</sup>

#### *I. Inoculación en cavidad alantoidea*

Se emplearon 5 embriones de 9 a 11 días de edad, estos fueron ovoscopiados para ubicar la cámara de aire. Se localizó un área con poca irrigación y se marcó un punto aproximadamente 2 mm arriba de la cámara de aire, se desinfectó el punto con yodo y se realizó una perforación con un vibrograbador. De cada inóculo descrito con anterioridad, fueron inoculados 0.2 ml en cavidad alantoidea y posteriormente se selló el sitio de inoculación con pegamento blanco. Los embriones fueron incubados a 37°C, con humedad del 85% y volteo cada 2 horas. A las 24 horas se desechó la mortalidad, ya que esta se debe a traumatismo y los sobrevivientes se incubaron por 7 días. Se cosechó líquido alantoideo a las 72 horas post inoculación que fue usado para dar pases ciegos. Mediante esta vía se hizo el aislamiento de coronavirus, éste se consideró como positivo si los embriones presentaron enanismo, enroscamiento, membranas adheridas y

acumulo de uratos en riñón. Se llevaron a cabo 6 pases ciegos antes de ser considerados negativos.<sup>29</sup>

## II. *Inoculación en saco vitelino*

Se emplearon embriones de 5 a 7 días de edad. Se ubicó la cámara de aire, se marcó, desinfectó y perforó el centro de esta y se inocularon 0.2 ml en el saco vitelino mediante el uso de una jeringa. Se descartaron los embriones muertos en las primeras 24 horas. Los embriones fueron incubados a 37°C con humedad del 85% y volteo cada 2 horas durante 10 días. A partir del hígado e intestino de los embriones, se llevaron a cabo pases. Se consideraron como positivos los embriones que presentaron focos de necrosis hepática, hemorragias subcutáneas, enanismo, hepatomegalia, esplenomegalia y cardiomegalia. Esta vía se utilizó para el aislamiento de reovirus. Se llevaron a cabo al menos 6 pases antes de descartar como negativos.<sup>29</sup>

## III. *Inoculación vía membrana corioalantoidea*

Se identificó, con ayuda del ovoscopio, la cámara de aire y un punto con poca irrigación en la parte media del huevo. En medio estéril, se marcaron, desinfectaron y perforaron estos puntos, sin atravesar las membranas. Mediante el uso de una manguera, se succionó hasta formar la cámara falsa en la cual se inoculó 0.2 ml. Posteriormente se sellaron los agujeros con pegamento blanco y se incubaron a 37°C con humedad del 85% y volteo cada 2 horas. A las 24 horas se desechó la mortalidad, ya que esta se debe a traumatismos y los sobrevivientes se incubaron por 7 días. Se llevaron a cabo al menos 6 pases preparando inóculos a partir de la recuperación de membrana corioalantoidea, antes de descartar como negativos. Esta vía se usó para el aislamiento de picornavirus, siendo positivos los embriones que en su membrana presentaron pústulas.<sup>29</sup>

## 6.6. Extracción de ARN

A partir de un macerado al 20% de las muestras de intestino delgado y proventrículo en PBS, así como líquido alantoideo o tejidos de embrión con lesiones sugestivas de infección viral, se obtuvo el ARN total mediante extracción por Trizol® Reagent (Invitrogen Life Technologies Cat No. 15596-026). El ARN fue suspendido en 30 µl de agua DEPC y congelado a -85° C hasta su utilización. A partir de aislamientos previos de coronavirus llevados a cabo en el Departamento de Medicina y Zootecnia Avícola y de vacuna comercial contra reovirus, se llevaron a cabo extracciones como testigos positivos.

## 6.7. RT-PCR

Esta prueba fue usada para los siguientes virus: reovirus, picornavirus y coronavirus. Una vez realizada la extracción de ARN, se realizó la RT-PCR, usando los iniciadores indicados para cada virus (Ver anexo 2). Los ADN complementarios fueron congelados a -80°C hasta su utilización.

Para la PCR, las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador de tapa caliente (Thermo Hybaid PCR Express Limited 24913). En un volumen de reacción con 20 µl se incluyeron: 5 µl de muestra de ADNc (200 ng/µl) , 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> , 0.2 mM de dNTP mix (Biogénica 200 µM) 2.5 U de Taq ADN polimerasa (5U/ µl) (Amplificasa Biogénica EA 500), 0.5 µM del iniciador sentido (10 µM), 0.5 µM del iniciador reversa (10 µM), 1X Amortiguador de PCR 10X (Biogénica EA 500), H<sub>2</sub>O cbp 20 µl. Se usaron concentraciones diferentes de MgCl<sub>2</sub> (Biogénica EA 500) para cada virus; para reovirus se usó 1.5 mM, para coronavirus y picornavirus 2.0 mM. Las condiciones de amplificación son especificadas en el anexo 3.<sup>30</sup>

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y se observaron con el transiluminador UVPNX281991B.<sup>30</sup>

## **6.8. Histopatología**

Las muestras de proventrículo, duodeno, yeyuno e íleon, así como de tejidos de embriones con lesiones fueron fijados en formalina amortiguada al 10%, para ser procesadas mediante la técnica de inclusión en parafina y tinción de hematoxilina y eosina para evaluación de lesiones microscópicas.<sup>31</sup>

## 7. RESULTADOS

### I. ENFERMOS CASO 1

#### *Historia Clínica.*

Número de aves y estirpe: 5 aves Ross

Edad: 28 días

Procedencia: Xalapa, Ver

Tipo de alimento: comercial

Número de aves: 2, 000, 000

Alojamiento: Piso

Ciclo de producción: Todo dentro-todo fuera

#### *Calendario de vacunación:*

ENFERMEDAD	EDAD (días)	CEPA	VIA DE INOCULACION
Marek	1	----	----
ENC/BI	1	----	----
IBF	8	----	Oral (agua)
ENC	8	----	Ocular
BI	9	Mass	----
ENC	12	----	----
IBF	18	----	Oral (agua)
ENC	30	----	Oral (agua)

Se presentaron trastornos respiratorios entre el 5<sup>o</sup> y 6<sup>o</sup> día de edad, disminución de peso y aumento de conversión alimenticia. Salen al mercado a los 49 días de edad pero presentaron patas verdes un 3-15% de las aves. Se reportó que se administraron coccidiostatos y que la cama se encontraba ligeramente húmeda.

#### **A. Necropsia**

Hallazgos a la necropsia:

- Estrías blancas en pectoral superficial, abundantes 1/5, moderadas 4/5
- Articulación tibio tarso metatarsiana con escasas petequias de 1 mm aproximadamente 2/5

Diagnóstico morfológico principal

- Miopatía degenerativa de moderada a severa

**B. Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp**

Ver resultados en cuadro 1

**C. Inhibición de la hemoaglutinación para ENC**

Ver resultados en cuadro 2

**D. Estudio coproparasitológico**

Ver resultados en cuadro 3

**E. Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus**

Coronavirus: Ver resultados cuadro 4

Reovirus: Ver resultado cuadro 5

**F. Aislamiento viral en embrión de pollo**

Ver resultados en cuadro 6

Positivo a coronavirus al sexto pase a partir de muestras de intestino

Positivo a reovirus al sexto pase a partir de muestras de proventrículo

Sospechoso a reovirus al sexto pase a partir de muestras de intestino y tendón

Negativo a picornavirus

**G. Biología molecular**

Ver resultados en cuadro 6

Positivo a Coronavirus a partir de inóculos originales, de proventrículo e intestino y de líquido alantoideo al sexto pase de muestras de intestino.

Positivo a reovirus a partir de inóculos originales de intestino y tendón.

Negativo a picornavirus al sexto pase en todos los órganos

**H. Histología**

Proventrículo: SCPA

Intestino: enteritis linfocitaria de leve a moderada



## II. ENFERMOS CASO 2

### *Historia clínica*

Número de aves y estirpe: 5 aves Ross

Edad: 35 días

Procedencia: Xalapa, Ver

Número de aves: 2, 000, 000

Tipo de alimento: comercial

Alojamiento: piso

Ciclo de producción: todo dentro-todo fuera

*Calendario de vacunación:*

ENFERMEDAD	EDAD (días)	CEPA	VIA DE INOCULACION
Marek	1	----	----
ENC/BI	1	----	----
IBF	8	----	Oral (agua)
ENC	8	----	Ocular
BI	9	Mass	----
ENC	12	----	----
IBF	18	----	Oral (agua)
ENC	30	----	Oral (agua)

Se presentaron trastornos respiratorios entre el 5<sup>o</sup> y 6<sup>o</sup> día de edad, hubo una disminución de peso y aumento de conversión alimenticia. Salen al mercado a los 49 días de edad pero presentaron patas verdes un 3-15% de las aves.

Se administraron coccidiostatos y presencia de cama ligeramente húmeda.

### **A. Necropsia**

Hallazgos a la necropsia:

- Estrías blancas en pectoral superficial moderada 5/5
- Tendón gastrocnemio: exudado seroso moderado bilateral 3/5
- Articulación tibio metatarsiana: exudado seroso mezclado con líquido sinovial 2/5

Diagnóstico morfológico principal

- Miopatía degenerativa de moderada
- Artritis leve en articulación tibio tarso metatarsiana.

**B. Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp**

Ver resultados en cuadro 1

**C. Inhibición de la hemoaglutinación para ENC**

Ver resultados en cuadro 2

**D. Estudio coproparasitológico**

Ver resultados en cuadro 3

**E. Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus**

Coronavirus: Ver resultados en cuadro 4

Reovirus: Ver resultado en cuadro 5

**F. Aislamiento viral en embrión de pollo**

Ver resultados en cuadro 6

Positivo a coronavirus al sexto pase a partir de muestras de proventrículo

Sospechoso a coronavirus al sexto pase a partir de muestras de intestino.

Positivo a reovirus al sexto pase a partir de muestras de proventrículo y tendón

Sospechoso a reovirus al sexto pase a partir de muestras de intestino

Negativo a picornavirus al sexto pase en todos los órganos

**G. Biología molecular**

Ver resultados en cuadro 7

Positivo a coronavirus a partir de líquido alantoideo al sexto pase en muestras de proventrículo.

Positivo a reovirus a partir de inóculos originales de proventrículo, intestino y tendón.

Negativo a picornavirus al sexto pase en todos los órganos.

**H. Histología**

Proventrículo: SCPA

Intestino: enteritis linfocitaria moderada

### III. ENFERMOS CASO 3

#### *Historia clínica*

Número de aves y estirpe: 6 aves Ross      Edad: 59 días  
Procedencia: Chalco, Estado de México      Tipo de alimento: comercial  
Alojamiento: piso      Parvada: mixta  
Ciclo de producción: todo dentro-todo fuera      Mortalidad: 6.3 a 8%  
Inician con 17,400 aves por caseta      Densidad: 14.5 a 15 aves/m<sup>2</sup>  
Las dimensiones de las casetas: 100m X 12m= 1200 m<sup>2</sup>

Sacan el pollo al mercado a los 59 días con un peso promedio de

- Machos: 3.316 kg      Hembras: 2.800 kg

#### *Calendario de vacunación*

ENFERMEDAD	EDAD (días)	CEPA	VIA DE INOCULACIÓN
ENC-IA	1	----	Oral (agua)
REO	4	1133	Oral (agua)
IBF	7	Lukert	Oral (agua)
ENC-IA	8	----	Subcutánea (0.5 ml)
ENC-IA	8	----	Ocular
IBF	16	----	Oral (agua)
ENC	16	----	Oral (agua)
ENC-IA	21	----	Subcutánea

Los pollos presentaban buena pigmentación, calidad de la canal y conversión alimenticia de 2:1, pero a los 58 días de edad comenzaron con problemas locomotores, a los 59 días de edad se presentó pollo tirado y a los 60 días en adelante se presentó patas verdes por hemorragias en tendón (13%), provocando un aumento de decomiso en el rastro y pérdidas económicas. Se reportó la presencia de diuresis entre los 21 y 25 días, apelmazamiento de cama, erosiones en cojinete plantar, pollos seleccionados en un extremo de las casetas que presentaban patas abiertas y plumas erizadas y se adicionó acidificante a la dieta a los 21 días aproximadamente.

### **A. Necropsia**

Hallazgos a la necropsia:

- Externa: región cloacal con plumas sucias por heces y uratos 4/6
- Subcutáneo: hemorragias en la región articular tarso metatarsiana 4/6
- Digestivo: Hígado: aumento de tamaño del 40% de en relación con el resto de las aves 1/6 y con palidez 2/6. Duodeno: hiperemia leve en toda la mucosa 2/6 y con hemorragias de 0.2 a 0.5 mm de diámetro 1/6
- Respiratorio: laringe y tráquea: mucosa con hiperemia leve y exudado mucoso escaso en la luz 2/6
- Músculo esquelético: músculo pectoral externo con cantidad escasa de fibras blancas dispersas entremezcladas con fibras musculares normales 3/6 y en cantidad moderada 1/6, músculo abductor de color blanco en aproximadamente el 50% unilateral 2/6 y bilateral 1/6. Músculo del tendón gastrocnemio con áreas hemorrágicas y palidez en el 80% del músculo 4/4 y menores en el otro miembro 2/6. Tendón del músculo gastrocnemio: ruptura completa y hemorragia extensa unilaterales 4/6. Articulación tarso metatarsiana izquierda con exudado seroso color amarillo en cantidad escasa 1/6

Diagnóstico morfológico principal:

- Degeneración hepática
- Enteritis hemorrágica leve
- Laringitis y traqueítis catarral leve
- Degeneración moderada del músculo abductor y ruptura del tendón del músculo gastrocnemio
- Artritis serofibrinosa leve

### **B. Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp**

Ver resultados en cuadro 1

### **C. Inhibición de la hemoaglutinación para ENC**

Ver resultados en cuadro 2

#### ***D. Estudio coproparasitológico***

Ver resultados en cuadro 3

#### ***E. Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus***

Coronavirus: Ver resultados en cuadro 4

Reovirus: Ver resultado en cuadro 5

#### ***F. Aislamiento viral en embrión de pollo***

Ver resultados en cuadro 6

Negativo a coronavirus a partir de todos los órganos

Positivo a reovirus al sexto pase a partir de muestras de proventrículo, tendón y exudado

Sospechoso a reovirus al sexto pase a partir de muestras de intestino.

Negativo a picornavirus al sexto pase en todos los órganos.

#### ***G. Biología molecular***

Ver resultado en cuadro 6

Negativo a coronavirus a partir de todos los órganos

Positivo a reovirus a partir de inóculos originales de proventrículo e intestino

Negativo a picornavirus a partir de todos los órganos

#### ***H. Histología***

Proventrículo: SCPA

Intestino: enteritis linfocitaria severa, dilatación de criptas moderada con detritus e infiltración heterofílica

#### IV. ENFERMOS CASO 4

##### *Historia Clínica.*

Número de aves y estirpe: 4 aves Ross

Edad: 57 días

Procedencia: Chalco, Estado de México

Tipo de alimento: comercial

Alojamiento: piso

Parvada mixta

Ciclo de producción: todo dentro-todo fuera

Mortalidad: 6.3 a 8%

Inician con 17,400 aves por caseta

Densidad: 14.5 – 15 aves/m<sup>2</sup>

Las dimensiones de las casetas son de 100m X 12m= 1200 m<sup>2</sup>

Sacan el pollo al mercado a los 59 días con un peso promedio de:

- Machos: 3.316 kg

Hembras: 2.800 kg

Calendario de vacunación

ENFERMEDAD	EDAD (días)	CEPA	VÍA DE INOCULACIÓN
ENC-IA	1	----	Oral (agua)
REO	4	1133	Oral (agua)
IBF	7	Lukert	Oral (agua)
ENC-IA	8	----	Sub cutánea (0.5 ml)
ENC-IA	8	----	Ocular
IBF	16	----	Oral (agua)
ENC	16	----	Oral (agua)
ENC-IA	21	----	Sub cutánea

Los pollos presentaban buena pigmentación, calidad de la canal y conversión alimenticia, pero a los 58 días de edad comenzaron problemas locomotores y a los 59 días de edad hubo pollo tirado, a los 60 días de edad en adelante patas verdes por hemorragias en tendón (13%), aumento decomiso en el rastro y pérdidas económicas. Diuresis entre los 21 y 25 días de edad, apelmazamiento de cama, hay erosiones en cojinete plantar, había pollos seleccionados en un extremo de las casetas que presentaban patas abiertas y plumas erizadas. Se ha adicionado acidificante a la dieta a los 21 días aproximadamente

##### **A. Necropsia**

Hallazgos a la necropsia:

- Externa: región cloacal con plumas sucias por heces y uratos 2/4
- Subcutáneo: hemorragias extensas en región articular tarso metatarsiana 2/4 y leves 2/4
- Digestivo.Hígado: palidez moderada 1/4. Duodeno: hiperemia leve en toda la mucosa 1/4
- Músculo esquelético: músculo pectoral externo con cantidad moderada de líneas blancas entremezcladas con fibras musculares normales y dispersas ¼ y en cantidad leve 1/4, músculo abductor de color blanco en el 80% unilateral ¼ y 20% bilateral 2/4. Músculo del tendón gastrocnemio con áreas hemorrágicas pálidas extensas en el 80% 4/4 y leves en el otro miembro 4/4. Tendón del músculo gastrocnemio: ruptura completa y hemorragia extensa unilaterales 4/4.

Diagnóstico morfológico principal:

- Hepatosis moderada
- Enteritis leve
- Miopatía degenerativa del músculo abductor
- Ruptura del tendón del músculo gastrocnemio

***B. Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp***

Ver resultados en cuadro 1

***C. Inhibición de la hemoaglutinación para ENC***

Ver resultados en cuadro 2

***D. Estudio coproparasitológico***

Ver resultados en cuadro 3

***E. Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus***

Coronavirus: Ver resultados en cuadro 4

Reovirus: Ver resultado en cuadro 5

#### ***F. Aislamiento viral en embrión de pollo***

Ver resultados en cuadro 6

Negativo a coronavirus a partir de todos los órganos

Positivo a reovirus al sexto pase a partir de muestras de proventrículo y tendón

Sospechoso a reovirus a partir de muestras de intestino

Negativo a picornavirus a partir de todos los órganos

#### ***G. Biología molecular***

Ver resultados en cuadro 6

Positivo a coronavirus a partir del inóculo original de proventrículo

Negativo a reovirus a partir de todos los órganos

Negativo a picornavirus a partir de todos los órganos

#### ***H. Histología***

Proventrículo: SCPA

Intestino: enteritis linfocitaria leve



## V. ENFERMOS CASO 5

### *Historia clínica*

Número de aves y estirpe: 6 aves Ross

Edad: 57 días

Procedencia: Chalco, Estado de México

Peso promedio: 3.5 kg

Ciclo de producción: todo dentro-todo fuera

Cama: cascarilla de arroz

Número de aves: 60,000 producción

Alojamiento: piso

### *Calendario de vacunación:*

ENFERMEDAD	EDAD (días)	CEPA	VÍA DE INOCULACIÓN
Marek	1	HVT	Subcutánea
IBF	6	Bursine 2	Oral (agua)
ENC	12	La Sota	Ocular
BI	12	Mass	Ocular
ENC	12	La sota	Subcutánea
IA	12	H5N2	Subcutánea
IBF	18	Bursine 2	Oral (agua)
ENC	18	La sota	Oral (agua)
LTI	25	CC	Ocular

Los signos empezaron desde la tercera semana de edad, la difusión de la enfermedad fue lenta, con una mortalidad acumulada de 9%. El consumo de alimento aumentó y el estado de la cama fue húmeda.

La parvada presentó una mortalidad elevada desde la tercera semana y presentaron claudicación leve a partir de las 6 semanas y el problema se agudizó en las últimas 2 semanas, cuando se presentó claudicación, postración, patas abiertas y las aves de mayor peso presentaron pododermatitis y hemorragias en piernas. Hubo presencia de heces acuosas que presentaron alimento sin digerir y moco naranja, no se mencionaron tratamientos anteriores.

### **A. Necropsia**

Hallazgos a la necropsia:

- Externo: pluma alrededor de la cloaca sucia. Cojinete plantar con úlceras

- Digestivo: molleja: adelgazamiento de la capa de Kaolin 1/6 y erosión en la capa de Kaolin 1/6
- Duodeno: petequias dispersas 2/6, Yeyuno: moco anaranjado 1/6.
- Músculo esquelético: articulación tarso metatarso: exudado seroso leve 2/6, exudado fibrinoso moderado 1/6. Tendón gastrocnemio: ruptura y zonas hemorrágicas unilaterales 2/6. Músculo gastrocnemio: hemorragia severa con áreas irregulares en aproximadamente el 60% del músculo 1/6

Diagnóstico morfológico principal.

- Enteritis hemorrágica severa difusa
- Enteritis catarral leve
- Queratolisis leve del Kaolin
- Tenosinovitis severa
- Ruptura del tendón gastrocnemio

***B. Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp***

Ver resultados en cuadro 1

***C. Inhibición de la hemoaglutinación para ENC***

Ver resultados en cuadro 2

***D. Estudio coproparasitológico***

Ver resultados en cuadro 3

***E. Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus***

Coronavirus: Ver resultados en cuadro 4

Reovirus: Ver resultado en cuadro 5

***F. Aislamiento viral en embrión de pollo***

Ver resultados en cuadro 6

Negativo a coronavirus

Positivo a reovirus al sexto pase a partir de muestras de proventrículo, intestino, tendón y exudado.

Sospechoso a picornavirus al sexto pase a partir de proventrículo e intestino

**G. *Biología molecular***

Ver resultados en cuadro 6

Negativo a coronavirus a partir de todos los órganos

Negativo a reovirus a partir de todos los órganos

Negativo a picornavirus a partir de todos los órganos

**H. *Histología***

Proventrículo: proventriculitis linfocitaria severa difusa

Intestino: enteritis linfocitaria leve

## VI. SANOS 1

### *Historia clínica*

Número de aves y estirpe: 5 aves Ross

Edad: 63 días

### **A. Necropsia**

Número de pollo	1	2	3	4	5
Peso (g)	2,550	3,500	3,610	3,320	3,240

Hallazgos a la necropsia:

- Externo: cloaca sucia
- Digestivo: proventrículo: papilas dilatadas 3/5

Diagnóstico morfológico:

- Proventriculitis

### **B. Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp**

Ver resultados en cuadro 7

### **C. Inhibición de la hemoaglutinación para ENC**

Ver resultados en cuadro 8

### **D. Estudio coproparasitológico**

Ver resultados en cuadro 9

### **E. Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus**

Coronavirus: Ver resultados en cuadro 10

Reovirus: Ver resultado en cuadro 11

### **F. Aislamiento viral en embrión de pollo**

Ver resultados en cuadro 12

Negativo a coronavirus a partir de todos los órganos

Sospechoso a reovirus a partir de todos los órganos

Negativo a picornavirus a partir de todos los órganos

### ***G. Biología molecular***

Ver resultados en cuadro 12

Positivo a coronavirus a partir de inóculo original de intestino

Negativo a reovirus a partir de inóculos de todos los órganos

Positivo a picornavirus a partir de todos los órganos

### ***H. Histología***

Proventrículo: SCPA

Intestino: SCPA

## VII. SANOS 2

### *Historia clínica*

Número de aves y estirpe: 6 aves Ross

Edad: 56 días

Procedencia: Chalco, Estado de México

Tipo de alimento: comercial

Cama de cascarilla de arroz

Número de aves: 316, 000

Número de casetas: 17

Densidad de población: 15 aves/m<sup>2</sup>

Dimensiones de casetas: 85x12 m y 130x 12 m<sup>2</sup>

Parámetros productivos

Conversión alimenticia: 2.08

GDP: 52 g

Índice de producción: 235

Mortalidad acumulada: 5%

Tipo de alimento:

0-7 días preinicio

8-21 días inicio

22-35 días engorda

36-49 días finalización

### *Calendario de vacunación*

ENFERMEDAD	EDAD (días)	VÍA DE INOCULACIÓN
ENC+IA	1 d	Oral
Artritis viral	4d	Oral
Gumboro	6 d	Oral
ENC+IA	8 d	Ocular
ENC+IA emulsionada	8d	Subcutánea
Gumboro	16d	Oral
ENC	16 d	Oral
LT	21d	Ocular
ENC+IA	21d	Subcutánea

Problemas de sangre en heces por coccidias a las 4 Semanas y se dio tratamiento con furaltadona, trimetoprim y amprolium por 5 días.

### **A. Necropsia**

Número de pollo	1	2	3	4	5
Peso (g)	3,700	3,000	3,400	2,850	3,400

Hallazgos a la necropsia:

- Digestivo: hígado: hemorragias de aproximadamente 5 mm difusas 3/5 y suave al corte 1/5

Diagnóstico Morfológico:

- Degeneración hepática

***B. Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp***

Ver resultados en cuadro 7

***C. Inhibición de la hemoaglutinación para ENC***

Ver resultados en cuadro 8

***D. Estudio coproparasitológico***

Ver resultados en cuadro 9

***E. Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus***

Coronavirus: Ver resultados en cuadro 10

Reovirus: Ver resultado en cuadro 11

***F. Aislamiento viral en embrión de pollo***

Ver resultados cuadro 12

Negativo a coronavirus a partir de todos los órganos.

Positivo a reovirus a partir de inóculo de intestino.

Negativo a picornavirus a partir de todos los órganos.

***G. Biología molecular***

Ver resultados cuadro 12

Negativo a coronavirus a partir de inóculos de todos los órganos.

Negativo a picornavirus a partir de inóculos de todos los órganos.

Negativo a reovirus a partir de inóculos de todos los órganos.

***H. Histología***

Proventrículo: Proventriculitis linfocitaria leve

Intestino: SCPA

### VIII. SANOS 3

#### *Historia clínica*

Número de aves y estirpe: 5 aves Ross      Edad: 49 días  
Procedencia: Tláhuac, Distrito Federal      Tipo de alimento: comercial  
Material de cama: viruta      Número de aves: 1000  
Dimensiones de caseta: 100m x 10m m<sup>2</sup>      Densidad: 12 aves/m<sup>2</sup>  
Conversión alimenticia: 1.80      GDP: 62.4 g  
Consumo de alimento al ciclo: 5580 g

#### Vacunación:

ENC ocular y ENC e IA emulsionada subcutánea

#### **A. Necropsia**

Número de pollo	1	2	3	4	5
Peso (g)	2,750	2,600	2,710	2,700	2,750

Hallazgos a la necropsia: SCPA

#### **B. Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp**

Ver resultados en cuadro 7

#### **C. Inhibición de la hemoaglutinación para ENC**

Ver resultados en cuadro 8

#### **D. Estudio coproparasitológico**

Ver resultados en cuadro 9

#### **E. Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus**

Coronavirus: Ver resultados en cuadro 10

Reovirus: Ver resultado en cuadro 11



#### ***F. Aislamiento viral en embrión de pollo***

Ver resultados cuadro 12

Negativo a coronavirus a partir de todos los órganos

Positivo a reovirus a partir de proventrículo e intestino

Negativo picornavirus a partir de todos los órganos.

#### ***G. Biología molecular***

Ver resultados en cuadro 12

Negativo a coronavirus a partir de inóculos de todos los órganos

Negativo a reovirus a partir de inóculos de todos los órganos

Negativo a picornavirus a partir de inóculos de todos los órganos

#### ***H. Histología***

Proventrículo: SCPA

Intestino: SCPA

## IX. SANOS 4

Historia clínica

Número de aves y estirpe: 5 aves Ross

Edad: 56 días

Procedencia: Chalco, Estado de México

Tipo de alimento: comercial

Alojamiento: piso

Material de cama: Cascarilla de arroz

Dimensiones de caseta: 1200 m<sup>2</sup>

Densidad de población: 15 aves/m<sup>2</sup>

Conversión alimenticia: 1.82

Consumo diario; 175 g/día

GDP: 50 g

Peso del pollo al mercado:

Machos: 3100 kg

Hembras: 2.700 kg

Promedio: 2.700 kg

*Calendario de vacunación:*

ENFERMEDAD	EDAD	VÍA DE INOCULACIÓN
ENC+IA	1 d	Oral
Artritis viral	4d	Oral
Gumboro	6 d	Oral
ENC+IA	8 d	Ocular
ENC+IA emulsionada	8d	Subcutánea
Gumboro	16d	Oral
ENC	16 d	Oral
LT	21d	Ocular
ENC+IA	21d	SC

Se reportó que presentaron ligeros estornudos y se adicionaron coccidiostatos en el alimento

### **A. Necropsia**

Número de pollo	1	2	3	4	5
Peso (g)	2,830	2,320	2,265	2,490	2,450

Hallazgos: Proventrículo: papilas dilatadas 4/5

Diagnóstico morfológico: proventriculitis

### **B. Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp**

Ver resultados en cuadro 7

**C. Inhibición de la hemoaglutinación para ENC**

Ver resultados en cuadro 8

**D. Estudio coproparasitológico**

Ver resultados en cuadro 9

**E. Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus**

Coronavirus: Ver resultados en cuadro 10

Reovirus: Ver resultado en cuadro 11

**F. Aislamiento viral en embrión de pollo**

Ver resultados cuadro 12

Negativo a coronavirus a partir de todos los órganos.

Positivo a reovirus a partir de intestino

Negativo a picornavirus a partir de todos los órganos

**G. Biología molecular**

Ver resultados cuadro 12

Negativo a coronavirus a partir de inóculos de todos los órganos

Negativo a reovirus a partir de inóculos de todos los órganos

Negativo a picornavirus a partir de inóculos de todos los órganos

**H. Histología**

Proventrículo: SCPA

Intestino: enteritis linfocitaria leve

## **SANOS 5**

### *Historia clínica*

Número de aves y estirpe: 5 aves Ross

Edad: 54 días

Procedencia: Querétaro, Querétaro

Tipo de alimento: comercial

Alojamiento: piso

Material de cama: paja de cebada

Dimensiones de caseta: 10 X 165m<sup>2</sup>

Densidad de población 18 aves/m<sup>2</sup>

Peso del pollo al mercado:

Machos: 3.300 kg

Hembras: 1.750 kg

### Calendario de Vacunación:

ENFERMEDAD	EDAD (días)	VÍA DE INOCULACIÓN
Marek, ENC e IA	1d	----
Gumboro	8d	----
ENC+IA	8 d	Oral
IA	8 d	Subcutánea
ENC	18d	----
Gumboro	24 d	----
ENC+IA	24	Subcutánea
LT	24d	Ocular
ENC+IA	28 d	----

Problemas respiratorios a los 28 días, se dio tratamiento con enrofloxacin a los 28-33 días, forfenicol a los 40-44 días, oxitetraciclina de los 45-49 días.

Problemas de *E. tenella* a los 42 días, se adicionó coccidiostatos al alimento

### **A. Necropsia**

Número de pollo	1	2	3	4	5
Peso (g)	2,950	3,450	3,270	3450	3,440

Hallazgos a la necropsia:

- Externo: cloaca sucia, heces acuosas.
- Digestivo: proventrículo: papilas dilatadas 5/5. Duodeno: descamación de mucosa 2/5, hiperemia con petequias de aproximadamente 5 mm de diámetro

a lo largo de duodeno y la primera porción del yeyuno, congestión leve en duodeno-yeyuno 1/5.

- Diagnóstico morfológico:
  - Proventriculitis y Enteritis leve

***B. Aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp***

Ver resultados en cuadro 7

***C. Inhibición de la hemoaglutinación para ENC***

Ver resultados en cuadro 8

***D. Estudio coproparasitológico***

Ver resultados en cuadro 9

***E. Prueba de ELISA para coronavirus y reovirus***

Coronavirus: Ver resultados en cuadro 10

Reovirus: Ver resultado en cuadro 11

***F. Aislamiento viral en embrión de pollo***

Ver resultados cuadro 12

Negativo a coronavirus a partir de todos los órganos

Positivo a reovirus a partir de proventrículo e intestino

Negativo a picornavirus a partir de todos los órganos

***G. Biología molecular***

Ver resultados cuadro 12

Negativo a coronavirus a partir de inóculos de todos los órganos

Negativo a reovirus a partir de inóculos de todos los órganos

Negativo a picornavirus a partir de inóculos de todos los órganos

***H. Histología***

Proventrículo: SCPA

Intestino: enteritis linfocitaria leve

## 8. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio, muestran que en los casos estudiados, los reovirus y coronavirus pudieron ser demostrados a través de aislamiento viral o técnicas moleculares en aves con y sin cuadro clínico de SMA, esto concuerda con los hallazgos de Rosenberger *et al.* (2010), Otto *et al.* (2004), Day *et al.* (2007) y Jindal *et al.* (2010)

El aislamiento viral en conjunto con la prueba de ELISA fueron las técnicas que mostraron más resultados positivos en comparación con RT-PCR (ver cuadro 1), esto sugiere que la técnica de RT-PCR pudiera verse afectada por las características de la muestra, ya que algunos autores reportan que en el contenido intestinal pudieran existir sustancias inhibitorias como ha mencionado Wilde *et al.* (1990) y Monroy *et al.* (2010). Sin embargo, Caterina *et al.* (2004) y Xie *et al.* (1997) mencionan que no detectaron un efecto negativo para esta prueba, habiéndose detectado hasta 23 serotipos de reovirus aviares con las mismas condiciones de amplificación.

Por otra parte, el aislamiento viral en embrión de pollo, puede detectar cualquier reovirus independientemente del serotipo, esto pudo observarse en los resultados del presente estudio, donde se obtuvieron aislamientos virales en embrión de pollo positivos a partir de muestras de tracto intestinal, tendón y exudado en tendón, que no fueron detectados por RT-PCR. Lo anterior puede deberse a que los iniciadores se diseñaron a partir del serotipo S1133; es posible que la región en la que se asientan los iniciadores pudiera tener cambios en la secuencia y no detectar los serotipos presentes en estas aves. Clark *et al.* (1990) al estudiar 6 serotipos diferentes de reovirus con variaciones genotípicas, menciona que éstos varían también según la ubicación geográfica de la parvada. Por otra parte, también es posible que esta prueba no diera los resultados los positivos esperados por degradación del material genético, ya que no se realizaron pruebas (controles) con un gen constitutivo de pollo para evidenciar la integridad de éste.

En dos casos de las aves con signos clínicos, tuvieron antecedentes de vacunación a los 4 días de edad, en ellas se pudo aislar reovirus después de 6 semanas y los títulos de anticuerpos son más altos a lo que se reporta en vacunación contra reovirus. Lo anterior sugiere que la vacunación no fue efectiva, ya que, como lo fue mencionado por Hyeronimus *et al.* (1983) y Magsombol (2004) las vacunas a partir de S1133 no protegerán contra serotipos diferentes a éste, por lo que un estudio enfocado a la identificación de reovirus existente según el área geográfica, proveería información que podría emplearse para la elaboración de vacunas específicas para los serotipos prevalentes

Además, Otto *et al.* (2004), Roessler *et al.* (1989), Tang *et al.* (1987) Friedman *et al.* (1998) reportan que los diferentes serotipos presentan patogenicidad, virulencia y tropismo diferentes. Así mismo, Sterner *et al.* (1989) menciona que aún en animales infectados con el mismo serotipo, los signos pueden variar en severidad y que puede deberse a la interacción de virus-hospedero, serotipo, edad del ave y vía de infección.

En un caso, con aislamiento positivo sin vacunación, los títulos de anticuerpos detectados por ELISA son más altos que en los animales vacunados, que sugiere un virus de campo. Por otra parte, en dos casos con aislamiento viral positivo, los títulos de anticuerpos son más bajos y podrían indicar una infección en etapas iniciales.

El hecho de aislar reovirus de parvadas clínicamente sanas, sugiere que éstos no son el factor determinante del SMA. Los títulos de anticuerpos, así como la ausencia de vacunación en 4 casos de aves clínicamente sanas indican exposición a virus de campo. En el único caso, de aves sanas con vacunación contra reovirus, en el que se aisló reovirus y los títulos de anticuerpos son altos en comparación con lo reportado ante vacunación indica un virus de campo que no es capaz de generar signos ni lesiones o que como ya se ha mencionado, necesita de algún factor desencadenante para la presentación del cuadro.

En general, en todas las parvadas los títulos de anticuerpos contra enfermedad de Newcastle se encuentran de acuerdo a lo reportado ante vacunación, esto indica

que los animales no estuvieron sometidos a agentes inmunodepresores. Así mismo los niveles de coccidias tanto en animales con signos clínicos como los clínicamente sanos se encuentran dentro de rangos comunes en los que no se desarrolla un cuadro clínico de coccidias, por lo que se sugiere que este agente no tiene un efecto en la presentación del SMA en los casos estudiados.

Por otra parte solo 2 casos tuvieron anticuerpos contra micoplasma, que produce lesiones en articulaciones y tendones que pudieran ser la vía de entrada para reovirus.

Dormitorio *et al.* (2007), Sterner *et al.* (1989) y Jindal *et al.* (2010) describen como lesión presente en cuadros clínicos de SMA: proventriculitis y enteritis, pero estas lesiones fueron encontradas en este estudio en las aves tanto sanas como enfermas, y por lo tanto no se considerarían como lesiones patognomónicas de este padecimiento.

Con respecto a coronavirus solo pudo ser demostrado por aislamiento en 3 casos de animales con signos clínicos, en estos casos no hay antecedentes de vacunación o problemas respiratorios y ya que también se aisló reovirus se sugiere que exista una asociación de estos dos virus para desencadenar SMA. Los aislamientos pudieron ser confirmados mediante RT-PCR a partir de líquido alantoideo de aislamientos virales previos. Se menciona que para coronavirus, la prueba de RT-PCR da mejores resultados en muestras que ya han sido procesadas en embrión de pollo, al menos 2 pases ciegos como lo menciona Jackwood *et al* (1992), en comparación con muestras de inóculo original. Sin embargo, en un caso en el que no hubo aislamiento pero si prueba de RT-PCR positivo a partir del inóculo original, sugiere que el virus pudo estar inactivado y por esta razón no se logró el aislamiento pero se conservó el material genético.

En las aves clínicamente sanas, aunque no se logró aislamiento de coronavirus ni prueba de PCR positiva en 4 de 5 casos, se detectó serología positiva que podría indicar exposición a virus de campo sin repercusión sobre la parvada. Esto pudiera deberse a las diferencias de tropismo de los coronavirus, ya que existen cepas respiratorias, renales y reproductivas o bien, que al momento de tomar la muestra



para el aislamiento viral, la infección activa por virus de campo ya había pasado, quedando únicamente la respuesta inmune demostrada por la serología. También se observó que 1 de los 5 casos de aves clínicamente sanas presentó anticuerpos a coronavirus y fue positivo al RT-PCR, sin embargo fue negativo al aislamiento viral, que indicaría que el virus estaba inactivo en el momento del procesamiento de la muestra. El hecho de solo haberse demostrado coronavirus tanto en aves con signos clínicos y un caso sin signos clínicos sugiere que otros factores están involucrados para que se desarrolle el cuadro de SMA.

Dado que no se encontró aislamiento positivo, ni RT-PCR positivo a picornavirus en ninguno de los casos se considera que no tiene un papel importante en el SMA en los casos estudiados. Los reportes de picornavirus son escasos, por lo que para efectos de este estudio queda descartado como agente de SMA.

Dado que los embriones fueron inoculados por las tres vías posibles y no hubo evidencia de lesiones o cambios ocasionados por otros virus, se sugiere que solamente reovirus y coronavirus en combinación con otro factor, son probablemente los responsables de SMA; como lo mencionan Yu *et al.* (2000) y Jindal *et al.* (2010) que la presencia de enfermedades preexistentes pudiera ocasionar un aumento en la virulencia de los virus entéricos, por lo que es necesario llevar a cabo ensayos con los virus obtenidos de este estudio en diversas condiciones en pollo de engorda.

## **9. CONCLUSIÓN**

1. En los casos estudiados, se encontró reovirus, tanto en sanos como en aves con signos clínicos, lo que sugiere que este virus por si solo, no es el agente principal del SMA.
2. En los casos estudiados, se demostró la presencia de coronavirus en aves con signos clínicos. Esto podría indicar que es un factor asociado a SMA, aunque no pueden ser descartados de otros factores desencadenantes.
3. En este estudio, se encontró que el picornavirus no es un factor determinante para desencadenar el SMA en los casos estudiados.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Unión Nacional de Avicultores, Compendio de indicadores económicos del Sector Avícola 2011, Dirección de Estudios Económicos, México, 2011
2. López C, Fehérvári T, Arce JM, Ávila E. Panorama de los problemas digestivos que afectan al pollo de engorda. Curso de enfermedades de las aves, 1998: 9-21
3. Rosenberger J. Reovirus Infections. En: Calnek BX, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM. Enfermedades de las aves. 11<sup>a</sup> ed. Iowa, USA. Blackwell Publishing, 2003:283-298
4. Rebel JMJ, Balk FRM, Boersma WJA. Cytokine responses in broiler lines that differ in susceptibility to Malabsorption Syndrome. British Poultry Science 2005; 46:679-686
5. Barnes DM, Kirby YK, Oliver KG. Effect of biogenic amines on growth and the incidence of proventricular lesions in broiler chickens. Poultry Science. 2001; 80:906-911
6. Noy Y, Geyra A, Sklan D. The effect of early feeding on growth and small intestinal development in the posthatch poult. Poultry Science 2001; 80:912-919
7. Jeurissen SHM, Lewis F, Van der Klis JD, Mroz Z, Rebel JMJ, ter Huurne AAHM. Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity and functionality. Curr Issues Intest. Microbiol. 2002 3; 1-14
8. Cavanagh D. Coronaviruses in poultry and other birds. Avian Pathology. 2005; 34(6), 439-448
9. Guy J. Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry. Poultry Science 1998; 77:1166-1175
10. Dormitorio TV, Giambone JJ, Hoerr FJ. Transmissible proventriculitis in broilers. Avian Pathology. 2007; 36(2): 87-91

11. Songserm, T, Engela B, van Roozelaar DJ, Kok, GL, Pijpers A, Pol JMA, ter Huurne AAHM. Cellular immune response in the small intestine of two broiler chicken lines orally inoculated with malabsorption syndrome homogenates. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2000; 85:51-62.
12. Zavala G, Barbosa T. Runting and stunting in broiler chickens. APINCO-FACTA, May 2006
13. Jordan FTW, Pattison M, Enfermedad de las aves. México, D.F. Manual Moderno, 1998
14. Hernández, VX, Petrone VM, Fehérvári T, Téllez IG. Anatomopatología proventricular en pollo de engorda con mala digestión. XXIV Convención Anual ANECA, 1999: 128-130
15. Casaubon MT, Ledesma N, del Río JC, Fehérvári T, Quintana JA, Ávila E. Disertación con respecto al posible papel de las lesiones gástricas en el Síndrome de “Indigestión, diuresis y ganancia de peso deficiente” (IDGP) que padecen los pollos de engorda en México, VII Jornadas Médico Avícolas, 1998: 99-104
16. Otto P, Liebler-Tenorio E, Elschner M, Reetz J, Löhren U, Diller R. Detection of Rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with Runting and Stunting Syndrome (RSS). *Avian Dis* 2006; 50:411-418
17. Magsombol ML. Comparative pathogenicity studies on avian reoviruses. (tesis de maestría). North Carolina, EUA: North Carolina State University, 2004
18. Knipe DM, Howley PM. *Fundamental Virology*. 4a ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, EUA 2001
19. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. *Veterinary virology*. 3a ed. Academic Press, EUA, 1999
20. Dimmock NJ, Easton AJ, Leppard KN. *Introduction to modern virology*. 6a ed. Blackwell Publishing, Australia, 2007
21. Virus infection of birds. En: *Virus infection of vertebrates*, Vol. 4. Elsevier Science Publishers, Países Bajos, 1993

22. Roessler DE, Rosengerger JK. In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. III. Host factors affecting virulence and persistence. *Avian Diseases*. 1989; 33(3): 555-565.
23. Tang KN, Fletcher OJ, Villegas P. Comparative study of the Pathogenicity of avian Reoviruses. *Avian Diseases*. 1987; 31: 577-583
24. Hieronymus DRK, Villegas P, Kleven SH. Identification and serological differentiation of several reovirus strains isolated from chickens with suspected Malabsorption Syndrome. *Avian Diseases*. 1982; 27: 246-254
25. Clark DF, Yawei N, Collisson EW, Kemp MC. Characterization of avian reovirus strain-specific polymorphisms. *Avian Diseases*. 1990; 34: 304-314.
26. Sterner FJ, Rosenberger JK, Margolin A, Ruff D. In vitro and In vivo Characterization of avian Reoviruses. II. Clinical Evaluation of chickens infected with two avian Reovirus pathotypes. *Avian Diseases*. 1989; 33: 545-554
27. Perry RW, Rowland GN, Glisson JR. Poult Malabsorption Syndrome. I. Malabsorption in poult enteritis. *Avian Diseases*. 1991; 35: 685-693
28. Songserm T, Zekarias ABB, van Roozelaar DJ, Kok, GL, Pijpers A, Pol JMA, ter Huurne AAHM. Experimental reproduction of malabsorption syndrome with different combinations of reovirus, *Escherichia coli*, and treated homogenates obtained from broilers. *Avian Diseases* 2002; 46:87-94
29. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. American Association of Avian Pathology. 3a ed. 1989
30. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. Molecular cloning, A laboratory manual, 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
31. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Washington, DC. 1995
32. Day JM, Spackman E, Patin-Jackwood M. A multiplex RT-PCR test for the Differential identification of Turkey Astrovirus Type 1, Turkey Astrovirus type 2, Chicken Astrovirus, Avian Nephritis Virus, and Avian Rotavirus. *Avian Diseases*. 2007 51; 681-684

33. Jindal N, Patnayak DP, Yogesh C, Ziegler AF, Goyal SM. Detection and molecular characterization of enteric viruses in breeder turkeys. *Avian Pathology*. 2010;39(1):53-61
34. Rosenberger JK, Sterner FJ, Botts S, Lee KP, Margolin A. In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. I. Pathogenicity and antigenic relatedness of several avian reovirus isolates. *Avian Diseases*. 1989; 33(3): 535-544
35. Wilde J, Eiden J, Yolken R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of Group A rotaviruses by Reverse Transcriptase and Polymerase Chain Reactions. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990; 28 (6): 1300-1307
36. Monroy BI. Determinación por medio de PCR de *Salmonella Enteritidis* FT 13 A y *Salmonella Issatschenko* en muestras de pollitos infectados experimentalmente. (tesis de licenciatura). DF. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2010.
37. Caterina KM, Frasca S.Jr, Girshick T, Khan M. Development of a multiplex PCR for detection of avian adenovirus, avian reovirus, infectious bursal disease virus, and chicken anemia virus. *Molecular and Cellular Probes* 2004; 18; 293–298
38. Friedman A, Aryeh I, Melamed D, Nir I. Defective immune response and failure to induce oral tolerance following enteral exposure to antigen in broilers afflicted with Stunting Syndrome. *Avian Pathology*, 1998; 27:528-525.
39. Jackwood MW, Moo Kwon H, Hilt DA. Infectious Bronchitis Virus detection in allantoic fluid using the Polymerase Chain Reaction and DNA Probe. *Avian Diseases*. 1992; 36:403-409.
40. Yu M, Ismail MM, Qureshi MA, Dearth RN, Barnes HJ, Saif YM. Viral agents associated with Poultry Enteritis and Mortality Syndrome: The role of a small round virus and a Turkey Coronavirus. *Avian Diseases*. 2000; 44:297-304

**Cuadro 1.** Resultados de la prueba de aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp para los casos de aves que presentaron signos clínicos de SMA

	<b>Caso 1</b>	<b>Caso 2</b>	<b>Caso 3</b>	<b>Caso 4</b>	<b>Caso 5</b>
<b>Mg (+)</b>	0/5	0/5	0/6	0/7	0/5
<b>Ms (+)</b>	0/5	0/5	4/6	5/5	0/5
<b>Sp (+)</b>	0/5	0/5	0/6	0/7	0/5

**Cuadro 2.** Resultados de la prueba de hemoaglutinación para la enfermedad de Newcastle para los casos de aves que presentaron signos clínicos de SMA

<b>Caso 1</b>		<b>Caso 2</b>		<b>Caso 3</b>		<b>Caso 4</b>		<b>Caso 5</b>	
<b>Título</b>	<b>sueros</b>	<b>Título</b>	<b>sueros</b>	<b>Título</b>	<b>sueros</b>	<b>Título</b>	<b>sueros</b>	<b>Título</b>	<b>sueros</b>
16	1	256	2	256	3	128	2	256	2
128	3	512	3	1024	3	256	1	512	3
512	2	--	--	--	--	512	4	--	--

**Cuadro 3.** Resultados del estudio coproparásitológico para los casos de aves que presentaron signos clínicos de SMA

	<b>Caso 1</b>	<b>Caso 2</b>	<b>Caso 3</b>	<b>Caso 4</b>	<b>Caso 5</b>
<b># ooquistes/ gr de heces</b>	42,600	27,700	600	1,500	50

**Cuadro 4.** Resultados de la prueba de ELISA para Coronavirus en casos de aves que presentaron casos clínicos de SMA

	<b>Caso 1</b>	<b>Caso 2</b>	<b>Caso 3</b>	<b>Caso 4</b>	<b>Caso 5</b>
<b>MEDIA</b>	426	4979	7472	7584	10973
<b>MEDIA GEO.</b>	388	3161	5970	6354	2657
<b>C.V. (%)</b>	29.22	65.04	44.54	39.88	51.57
<b>MIN</b>	203	640	4349	3013	0
<b>MAX</b>	701	13618	16389	14922	18357
<b># SUEROS</b>	5	5	6	7	5

**Cuadro 5.** Resultados de la prueba de ELISA para Reovirus en casos de aves que presentaron casos clínicos de SMA

	<b>Caso 1</b>	<b>Caso 2</b>	<b>Caso 3</b>	<b>Caso 4</b>	<b>Caso 5</b>
<b>MEDIA</b>	620	1306	2656	2286	6602
<b>MEDIA GEO.</b>	184	372	2542	2133	5840
<b>C.V. (%)</b>	71.80	45.00	32.86	33.42	49.24
<b>MIN</b>	0	0	1984	922	2946
<b>MAX</b>	1512	1724	4486	3297	11858
<b># SUEROS</b>	5	5	6	7	5



**Cuadro 6.** Resultados de aislamiento viral y prueba de RT-PCR de los casos con signos clínicos

	Aislamiento viral			RT-PCR		
	Corona	REO	Picorna	Corona	REO	Picorna
<b>Caso 1</b>	+	+	-	+	+	-
<b>Caso 2</b>	+	+	-	+	+	-
<b>Caso 3</b>	-	+	-	-	+	-
<b>Caso 4</b>	-	+	-	+	-	-
<b>Caso 5</b>	-	+	S	-	-	-

+Positivo, -Negativo, S Sospechoso.

Corona= coronavirus, REO= reovirus, Picorna= picornavirus

**Cuadro 7.** Resultados de la prueba de aglutinación en placa para Mg, Ms y Sp para los casos de aves clínicamente sanas

	<b>S 1</b>	<b>S 2</b>	<b>S 3</b>	<b>S 4</b>	<b>S 5</b>
<b>Mg (+)</b>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
<b>Ms (+)</b>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
<b>Sp (+)</b>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

**Cuadro 8.** Resultados de la prueba de hemoaglutinación para la enfermedad de Newcastle para los casos de aves clínicamente sanas

<b>S 1</b>		<b>S 2</b>		<b>S 3</b>		<b>S 4</b>		<b>S 5</b>	
<b>Título</b>	<b>sueros</b>	<b>Título</b>	<b>sueros</b>	<b>Título</b>	<b>sueros</b>	<b>Título</b>	<b>sueros</b>	<b>Título</b>	<b>sueros</b>
512	3	1024	5	256	1	512	1	256	1
1024	2	---	---	512	2	2048	4	512	2
---	---	---	---	1024	2	---	---	1024	2

**Cuadro 9.** Resultados del estudio coproparásitológico para los casos de aves clínicamente sanas.

	<b>S1</b>	<b>S 2</b>	<b>S 3</b>	<b>S 4</b>	<b>S 5</b>
<b># ooquistes/ gr de heces</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>150</b>	<b>450</b>

**Cuadro 10.** Resultados de la prueba de ELISA para Coronavirus en casos de aves clínicamente sanas

	<b>S 1</b>	<b>S 2</b>	<b>S 3</b>	<b>S 4</b>	<b>S 5</b>
<b>MEDIA</b>	25618	19203	7251	15908	4873
<b>MEDIA GEO.</b>	20780	16228	5197	13308	3931
<b>C.V. (%)</b>	39.61	35.18	50.34	37.22	39.66
<b>MIN</b>	5570	4440	938	4317	934
<b>MAX</b>	35151	29788	12503	23715	7466
<b># DE SUEROS</b>	5	5	5	5	5

**Cuadro 11** Resultados de la prueba de ELISA para Reovirus en casos de aves clínicamente sanas

	<b>S 1</b>	<b>S 2</b>	<b>S 3</b>	<b>S 4</b>	<b>S 5</b>
<b>MEDIA</b>	4680	5694	2952	7893	1306
<b>MEDIA GEO.</b>	4602	4855	2662	7578	372
<b>C.V. (%)</b>	19.19	52.98	47.22	29.48	45.00
<b>MIN</b>	3532	1761	1533	7055	1067
<b>MAX</b>	5562	9634	4728	11710	3047
<b>#DE SUEROS</b>	5	5	5	5	5

**Cuadro 12.** Resultados de aislamiento viral y prueba de RT-PCR de los casos clínicamente sanos

	<b>Aislamiento viral</b>			<b>RT-PCR</b>		
	<b>Corona</b>	<b>REO</b>	<b>Picorna</b>	<b>Corona</b>	<b>REO</b>	<b>Picorna</b>
<b>S 1</b>	-	S	-	+	-	+
<b>S 2</b>	-	+	-	-	-	-
<b>S 3</b>	-	+	-	-	-	-
<b>S 4</b>	-	+	-	-	-	-
<b>S 5</b>	-	+	-	-	-	-

+Positivo, -negativo, S Sospechoso.

Corona= coronavirus, REO= reovirus, Picorna= picornavirus



**Figura 1.** Lesiones en embrión de pollo por reovirus. Hígado con necrosis y cardiomegalia.



**Figura 4.** Lesiones en embrión de pollo por coronavirus. Enanismo, embrión en ovillo.



**Figura 2.** Lesiones en embrión de pollo por reovirus. Hígado: necrosis en bordes y hemorragias moderadas.



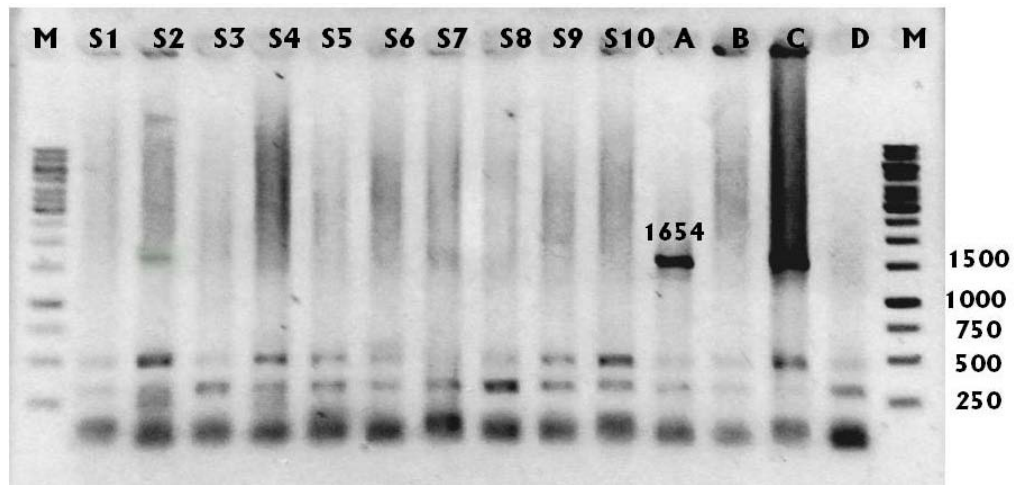
**Figura 5.** Lesiones en embrión de pollo por coronavirus. Enanismo, embrión en ovillo, mal emplume.



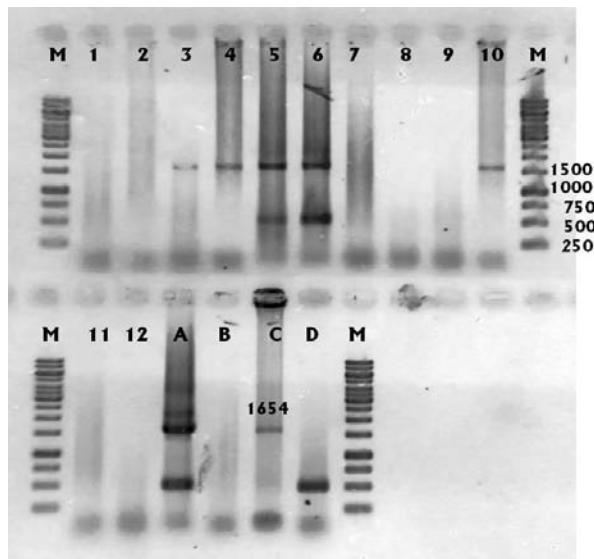
**Figura 3.** Lesiones en embrión de pollo por reovirus. Cardiomegalia.



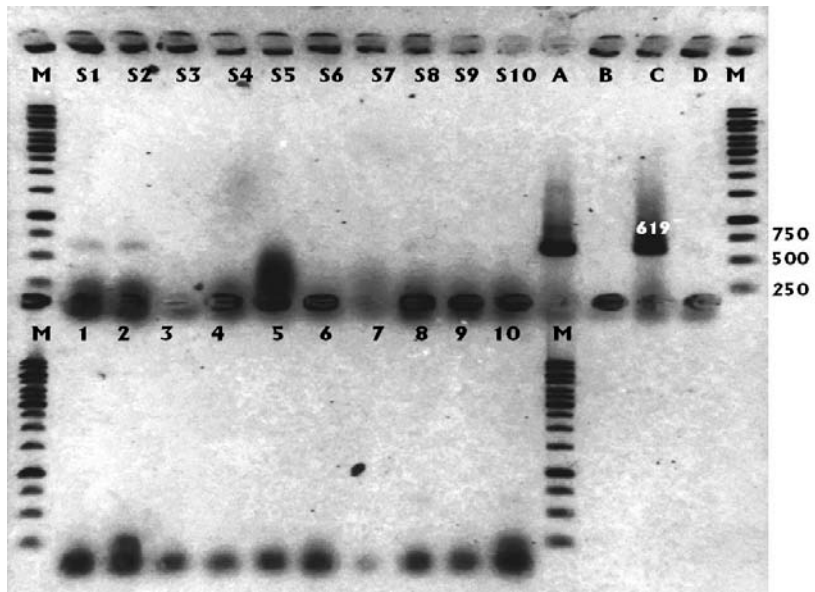
**Figura 6.** Lesiones en embrión de pollo por coronavirus: Presencia de uratos en riñón.



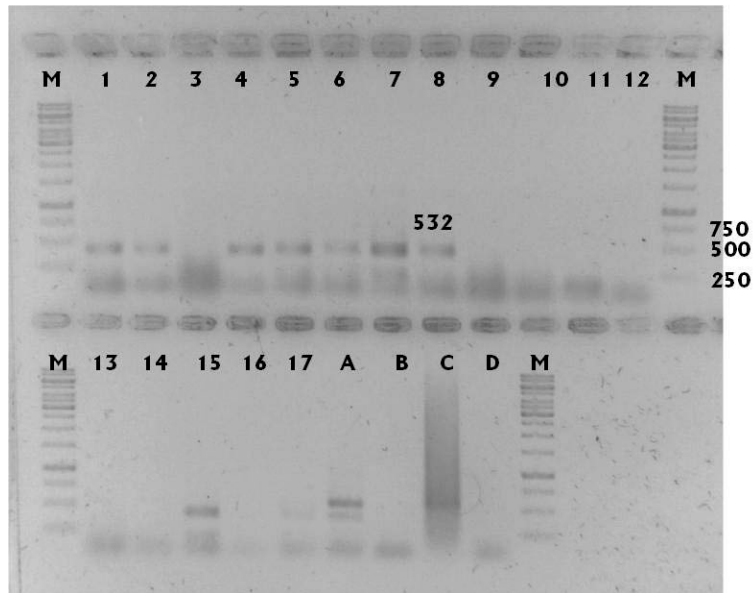
**Figura 7.** Resultados de RT-PCR interno para coronavirus en casos de aves sanas. Se observa banda positiva a coronavirus de 1654 pb en S2 (intestino sanos 1). El resto de las muestras resultaron negativas. M: marcador de 1 Kb A: control positivo de RT, B: control negativo de RT, C: control positivo de PCR, D: control negativo de PCR.



**Figura 8.** Resultados de RT-PCR interno para coronavirus a partir de muestras de casos con signos clínicos. Se observan bandas positivas a coronavirus de 1654 pb en 3 (intestino caso 1), 4 (proventrículo caso 1) 5 (Líquido alantoideo a partir de proventrículo caso 2) ,6 (Líquido alantoideo a partir de proventrículo caso 1) y 10 (proventrículo caso 4). M: marcador de 1 Kb A: control positivo de RT, B: control negativo de RT, C: control positivo de PCR, D: control negativo de PCR.

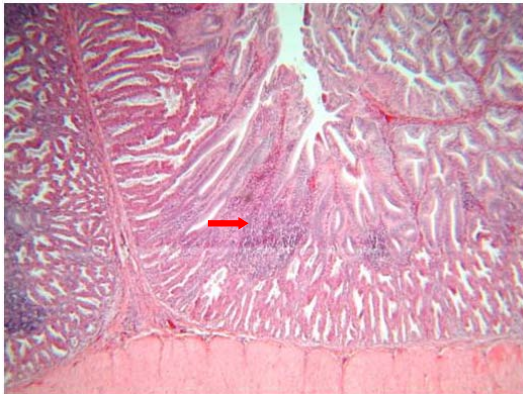


**Figura 9.** Resultados de RT-PCR para picornavirus a partir de muestras de aves sanas. Se observan bandas positivas a picornavirus de 619 pb en S1 (proventrículo sanos 1), S2 (intestino Sanos 1). M: marcador de 1 Kb A: control positivo de RT, B: control negativo de RT, C: control positivo de PCR, D: control negativo de PCR.

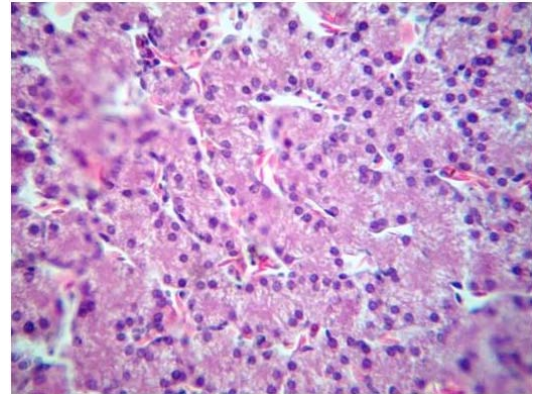


**Figura 10.** Resultados de RT-PCR para reovirus a partir de muestras de aves con signos clínicos. Se observan bandas positivas a reovirus de 532 pb en 1 (tendón caso 1), 2 (intestino caso 1), 4 (tendón caso 2), 5 n(intestino caso 2), 6 (proventrículo caso 2), 7 (intestino caso 3) y 8 (proventrículo caso 3), M: marcador de 1 Kb A: control positivo de RT, B: control negativo de RT, C: control positivo de PCR, D: control negativo de PCR.

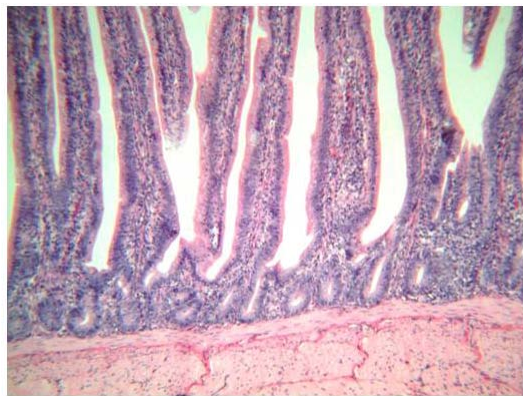




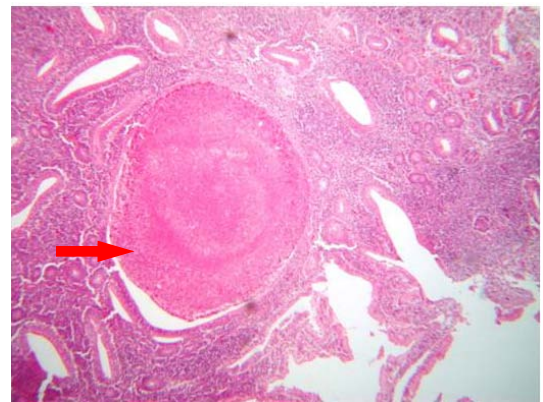
**Figura 11.** Proventriculitis severa.  
Aumento 400x. Tinción HE



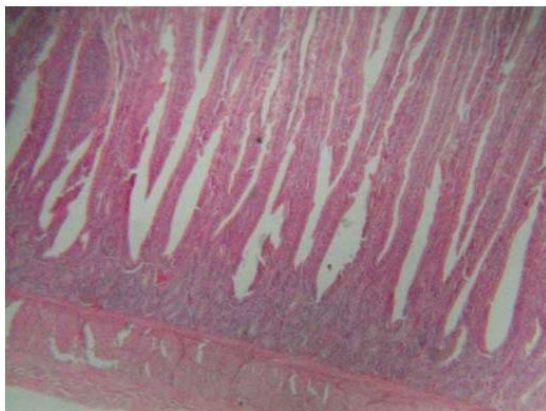
**Figura 14.** Hígado de embrión normal.  
Aumento 400x. Tinción HE



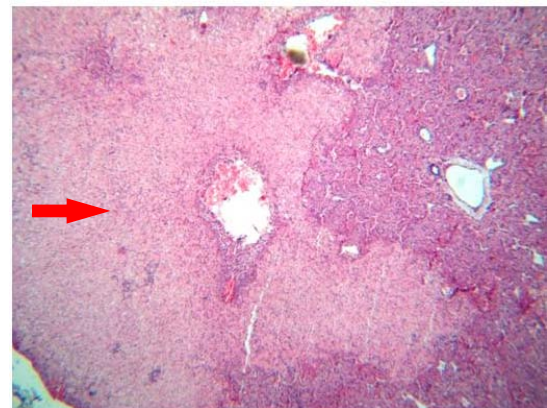
**Figura 12.** Enteritis linfocitaria leve.  
Aumento 400X. Tinción HE



**Figura 15.** Enteritis linfocitaria severa y presencia de quiste.  
Aumento 400x. Tinción HE



**Figura 13.** Intestino sin cambios patológicos aparentes.  
Aumento 400x. Tinción HE



**Figura 16.** Necrosis hepática en embrión de pollo inoculado por saco vitelino.  
Aumento 400x. Tinción HE

**Anexo 1. . Formato de historia clínica**

No. de caso \_\_\_\_\_  
 Fecha de recepción \_\_\_\_\_

Propietario: \_\_\_\_\_ Dirección: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_  
 Estirpe: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Número de aves \_\_\_\_\_  
 No. aves en la explotación: \_\_\_\_\_ Tipo de alimento: \_\_\_\_\_  
 Tipo de alojamiento: \_\_\_\_\_ Estado de lacama \_\_\_\_\_  
 Ciclo de producción: \_\_\_\_\_

**Vacunación:**

Enfermedad	Edad	Cepa	Vía de administración

Fecha de inicio de signos: \_\_\_\_\_ Tratamientos previos: \_\_\_\_\_  
 Mortalidad diaria: \_\_\_\_\_ Mortalidad acumulada \_\_\_\_\_  
 Consumo de alimento: Normal                      Disminuido                      Aumentado  
 Consumo de agua: Normal                            Disminuido                            Aumentado

**Signos:**

**Externo:**

Mal emplume	Pollos pequeños

Tiempo de presentación \_\_\_\_\_ Tratamientos: \_\_\_\_\_ % Aves afectadas \_\_\_\_\_

**Respiratorios:**

Estornudo	Secreción nasal	Boqueo	Secreción ocular	Estertor

Tiempo de presentación \_\_\_\_\_ Tratamientos: \_\_\_\_\_ % Aves afectadas \_\_\_\_\_

**Digestivo:**

Diarrea	Color					Consistencia	
	naranja	blanca	amarilla	verde	sanguinolenta	pastosa	acuosa

Tiempo de presentación \_\_\_\_\_ Tratamientos: \_\_\_\_\_ % Aves afectadas \_\_\_\_\_

**Urinario:**

Tiempo de presentación \_\_\_\_\_ Tratamientos: \_\_\_\_\_ % Aves afectadas \_\_\_\_\_

**Locomotor:**

Artritis	Parálisis	Postración	Claudicación	Patas abiertas	Alas caídas

Tiempo de presentación \_\_\_\_\_ Tratamientos: \_\_\_\_\_ % Aves afectadas \_\_\_\_\_



## Anexo 2

VIRUS	SECUENCIA DE INICIADORES	bp	Gen
Reovirus <sup>1</sup>	MK87 5'GGTGCGACTGCTGTATTTGGTAAC3' MK88 5' AATGGAACGATAGCGTGTGGG3'	532	S1
Coronavirus <sup>2</sup>	EXTERNO JK1 5'GACMGACTTAGTMKTTAATTTA3' JK2 5'ATTTTCAGTAAYAGAACGTCTA3' INTERNO CLONA1 5' CGGGATCCAGATGTTGGTRAMRYCWCT3' CLONA2 5'ACGCGTCGACACGTCTARAACGAYGTGTTC3'	1720   1654	S1
Picornavirus <sup>3</sup>	MK AE 1 5'CTTATGCTGGCCCTGATCGT3' MK AE 2 5'TCCCAAATCCACAAACCTAGCC3'	619	VP2

1. Xie Z, Fadl A, Gischick T, Khan M. Amplification of Avian Reovirus RNA Using the Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Avian Diseases* 1997; 41: 654-660.
2. Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de producción animal: Aves
3. Xie Z, Mazhar I. Khan M, Girshick T. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction to Detect Avian Encephalomyelitis Virus. *Avian Diseases* 2005; 49:227–230

### Anexo 3

VIRUS	CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN				
	Desnaturalización inicial	Desnaturalización de PCR	Alineamiento	Extensión de PCR	Extensión final
Reovirus <sup>1</sup>	94°C por 5 minutos	30 ciclos de 94°C por 30 segundos	60.7°C por 30 segundos 30 ciclos	72°C por 30 segundos	72°C por 15 minutos
Corona <sup>2</sup>	94°C por 30 segundos	30 ciclos de 94°C por 30 ciclos	60°C por 30 segundos	72°C por 1 minuto	72°C por 3 minutos
Picorna <sup>3</sup>	95°C por 5 minutos	30 ciclos a 94°C por 30 segundos	64.0°C por 30 segundos 30 ciclos	72°C por 30 segundos	72°C por 15 minutos

1. Xie Z, Fadl A, Gischick T, Khan M. Amplification of Avian Reovirus RNA Using the Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Avian Diseases* 1997; 41: 654-660
2. Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de producción animal: Aves
3. Xie Z, Mazhar I. Khan M, Girshick T, Xie Z. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction to Detect Avian Encephalomyelitis Virus. *Avian Diseases* 2005; 49:227–230