



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Determinación de Herpesvirus mediante la Prueba de Reacción en Cadena
de la Polimerasa (PCR) en Psitácidos en el área de influencia de la
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

TURRAL RAMÍREZ MARÍA MONTSERRAT

Asesor: MVZ Rodolfo Córdova Ponce

Coasesor: Dr. Hugo Ramírez Álvarez

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO DE MÉXICO

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

Determinación de Herpesvirus mediante la Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Psitácidos en el área de influencia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Que presenta la pasante: **MARIA MONTSERRAT TURRAL RAMÍREZ**

Con número de cuenta: **30522329-4** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de octubre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez	
VOCAL	M. en C. Juan Carlos Valladares de la Cruz	
SECRETARIO	M.V.Z. Rodolfo Córdova Ponce	
1er SUPLENTE	Dra. Cynthia González Ruiz	
2do SUPLENTE	M.V.Z. Alma Noemí Montes de Oca Chávez	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.

(Art 127 REP)

IHM/ntm*

AGRADECIMIENTOS

A dios por darme la vida, escogerme una familia hermosa, unos padres maravillosos, te luciste en elegirlos, te equivocaste en algún momento pero rectificaste el camino y fue la mejor decisión que tomaste, por todas las oportunidades que me das. También gracias a ti mi querido Santiago Teyahualco por todos los milagros que me has concedido. Me han dado muchas bendiciones.

A la UNAM por acogerme en su casa, por todas las facilidades que me dio para cumplir el gran sueño que tuve desde niña el ser “DRA DE PERROS”, a la mejor escuela FESC por formarme, madurarme durante 5 años y conocer a mucha gente maravillosa en tus instalaciones.

A mis padres por formarme y hacer de mi una buena persona, por sus valores, ejemplos y por nunca rendirse. Esté logro también es suyo.

Mami María de Jesús te amooo y te agradezco por ser mi mejor amiga, enfermera y por todo ese apoyo incondicional que siempre me has dado, por nunca dejarme caer, por levantarme y darme consejos, eres mi ejemplo. Eres la mejor mamá del mundo, dios se lucio conmigo por mandarte a mi lado, sabes que jamás daré un paso sin ti, eres lo mejor de mi vida, no tengo cómo agradecerte tanto, sobre todo por luchar por mi existencia, eres una mujer muy fuerte y aguerrida. Sabes que esto lo hago por ti.

Papi Fernando, por ayudarme a realizar mi gran sueño, por ser un buen padre, el mejor que dios y mi madre me pudieron escoger, por hacer tanto por mí, a pesar de nuestras diferencias te amooo, siempre serás mi príncipe azul ese que tenía un nombre pero yo siempre lo llamaré PAPÁ, gracias por todas tus palabras y acciones que me hicieron una mujer fuerte, de carácter, por enseñarme a ser independiente, gracias por hacer de mi UNA BUENA MUJER.

A mis hermanas Alexia y Jaqueline por apoyarme, por ser parte de mi familia, las amo, saben que siempre contarán conmigo. A mis princesas más bellas del mundo Shopia y Janethe saben que mucho de lo que hago es por ustedes, las amo.

A mi asesor el Dr Rodolfo Córdova, no tengo palabras para agradecer todo lo que ha hecho por mí, sabe que lo quiero cómo un segundo padre, no pude encontrar mejor sensei que usted, gracias por toda la paciencia que me ha tenido, por abrirme las puertas de su consultorio y de su vida, por formarme cómo médico y por todo lo que me ha enseñado, sin duda no sería lo que ahora soy, sé que me hace falta mucho camino por recorrer, pero sería más sin sus enseñanzas, también gracias por cada palabra, consejo y apoyo que me ha dado siempre, pareciera que me quiere como a una hija y todo esto no tengo como pagárselo. Lo quiero mucho. Gracias también a su esposa Alicia por sus palabras de consuelo que siempre me ha dado. Gracias infinitas a la familia Córdova González.

Mi coasesor el Dr Hugo Ramírez por ser mi tercer padre, gracias infinitas por todo el apoyo para realizar esta tesis, tiempo brindado, conocimientos aprendidos, consejos, regaños, sin duda alguna esta tesis no se hubiera logrado sin todo el esfuerzo que puso en ella. Gracias por cada consejo, abrazo y palabra de aliento cada vez que sentía que ya no podía, literal siempre sacaba mi cabeza del pozo para alientarme, agarrar oxigeno y volverme a meter. Por aguantar

mis locuras en el laboratorio y muchas veces ser parte de ellas, sabe que es una persona muy especial para mí, que lo admiro y quiero mucho.

A toda mi familia gracias infinitas, mis abuelitos: Fernando, Chela por su comprensión y todo el apoyo durante este largo proceso, por el mejor regalo que me dieron en la vida mi Tabata, por confiar siempre en mí. A mi abuelita meche por ser parte importante en mi vida, por cuidarme de pequeña y ser una segunda madre, a mi gran ángel que me cuida desde el cielo mi abuelito Joel, han sido los mejores abuelos del mundo, los amooo y también son parte de esto. Mis tías Gaby, Mari, Paty, Illy y Martha por confiar en mí, por su apoyo y creer que acabaría esto, las amoo.

Gracias a todos mis amigos, Verónica, Javier, Erika, Itzel, Eridani, Cecy, Hiram, Eduardo, Diego, Adrian, Kenji, Areli, Lizeth, Edna, Carlos, Marcela, Chucho, Paco (zorra), Betty, Yair, Pablo, Elizabeth, David, por compartir muchos momentos muy importantes en mi vida, porque a pesar de conocerme se quedaron a mi lado y me han demostrado su amistad incondicional, por aceptar mi locura, mis risas, mi histeria, intensidad y mi pésimo carácter, espero esta amistad dure muchos años más. Cada uno ocupa un lugar muy importante en mi corazón e individualmente hemos vivido experiencias únicas y que me unirán siempre a ustedes.... Los amooooooooo mucho.

A todos mis profesores que me formaron... muy especialmente a la Dra Graciela por su apoyo en este trabajo, por su tiempo y dedicación para mí, al Dr Marín por esas maravillosas fotos, tiempo, risas, pizzas y su gran amistad, me llevo un gran recuerdo, y al Dr Germán por el tiempo brindado para este proyecto.

A la Dra Cynthia González por brindarme su amistad, conocimientos, tiempo, paciencia y dedicación, pero sobre todo por ser una gran mujer, un gran ejemplo para mí, cuando sea grande quiero ser como usted, gracias por escucharme, aconsejarme cuando lo necesitaba, por secar mis lagrimas con grandes palabras de aliento, no tengo como agradecerle lo mucho que hace por mí, sabe que la quiero muchísimoooooo.

Gracias a todos mis clientes por confiar en mí, gracias a ello he mejorado mucho, a mis pacientes por que sin ellos no mejoraría cada día, ni seguiría luchando para ser mejor en esto que amo que es la Medicina Veterinaria y Zootecnia. Prometo no defraudarlos.

A ti mi amado Manzaneco (RAV) el AMOR DE MI VIDA, gracias por confiar en mí, por las enseñanzas que me diste y las mejores experiencias de mi vida que jamás olvidare, por cada palabra de aliento que me diste, risas, enojos e intensidades que me provocaste y por todo el éxito que me brindaste durante este proceso, siempre te llevaré en mi corazón, me enseñaste hacer una mejor persona y mujer, llegaste a cambiarme para bien. TE AMO

Al laboratorio de Virología por todo su apoyo, por acogerme en sus instalaciones, a los integrantes, la dra Alma, Dr Gerardo, Dra Lulú, Dr Alejandro, Yesi, Carmen, Areli, Híram, Cecy, Lizeth, Carlos, Edna, Alejandra, David me llevo excelentes amistades.

A la Dra Luz María Maldonado por el apoyo brindado para el muestreo de aves en Hidalgo, esto fue fundamental para mi tesis... gracias infinitas

A mis ex jefes Dr Rodolfo Córdova, Dra Karla, Dra Valeria y Dra Alma, sin su confianza y enseñanzas no hubiera adquirido la experiencia que ahora tengo.

A mis sinodales por el tiempo dedicado a mi tesis y mejorarla.

Y finalmente a los más importantes, porque sin ellos nunca hubiera aprendido lo que se.... A todos esos perros que dieron su vida y me prestaron su cuerpo para aprender, gracias a ustedes ahora puedo a salvar algunos de su especie, sin saberlo hicieron mucho por mí, siempre derrame una lagrima por ustedes.

Por fin logré lo que más he deseado en la vida, me siento tan feliz de ello, siempre pensé que nunca lo lograría, se me hacia eterno, está tesis me valió mucho sacrificio, dedicación y paciencia, pocos sabemos el verdadero valor de este tema, pero por fin lo logré, al fin el título que desde niña deseé Médica Veterinaria Zootecnista.

GRACIAS A DIOS Y A LA VIDA POR TANTA BENDICIÓN.....!!!!!!

DEDICATORIA

Principalmente está dedicada a mis motores de vida, lo que más amo en la vida, los que me han enseñado responsabilidad, amor y ganas de ser mejor cada día, mis hijos perrunos:

Tara: Por ser mi niñera, me dejaste el mejor regalo, mi pequeña Tabata, siempre fuiste linda y me diste mucho que aprender, te llevo en mi corazón y gracias por haber compartido tus 11 años a mi lado. T extraño mucho.

Tabata: por ser la más bella de mis hijas, la más noble, por ser mi mejor amiga, confidente y siempre tener un lengüetazo para consolar mis lagrimas, por enseñarme tantas cosas, te amoooo infinitamente mi chicken Little.

Ohanna: mi negra hermosa, por ser noble, por enseñarme que siempre es mejor no encontrar tamales porque encuentras algo mucho mejor y fiel, por ser mi modelo biológico durante la carrera, por ser parte de mis locuras, te amo mi perrucha.

Iron: mi pequeño chiquito panzonón, aprendí a ser mas agerrida y de carácter, porque tu discapacidad me enseñó mil cosas, lo mejor que me pudieron dejar ese 29 de julio, al principio no sabía qué hacer contigo y ahora no se qué hacer sin ti, te amoooo.

Manchas: mi pilón, eres todo lo que nadie querría, pero por algo estás conmigo, te amo mi desastrosa y sigues siendo lo que judas empeño y nunca saco, pero el ingrato me lo empeño a mí y no me arrepiento, me has enseñado a tener paciencia.

A mis otros hijos que también amo: pepinillo, zoruya, perita, limoncito, vainilla, guayabita, platanito y piñita.... Gracias.

Y al que le debo toda mi tesis, sin ti hubiera tardado más en realizarla, gracias por dejarte hacer mil cosas, no sabes cuánto te agradezco, nunca pensé querer tanto a un *Myopsitta monachus* te mereces una dedicatoria de mil hojas, siempre te viviré agradecida por esta satisfacción que me diste mi querido MANZANEZCO, el perico más peleonero, inteligente y muestreado del mundo.



ÍNDICE

Abstrac	1
Resumen	2
1. Introducción	3
1.1 Generalidades de psitácidos	3
1.2 Antecedentes	4
1.3 Agente etiológico	5
1.4 Replicación viral	7
1.4.1 Entrada	7
1.4.2 Expresión génica	7
1.4.3 Replicación, maduración y salida	8
1.5 Latencia y Reactivación	8
1.6 Patogenia	10
1.7 Signología y lesiones por herpesvirus	10
1.8 Transmisión	12
1.9 Tratamiento	12
1.10 Diagnóstico diferencial	12
1.11 Control y prevención	13
1.12 Diagnóstico	13
1.13 Prueba de PCR	14
2. Justificación	16
3. Hipótesis	17
4. Objetivo general	18
4.1 Objetivos particulares	18
5. Material y métodos	19

5.1 Población de estudio	19
5.2 Colección de muestras	19
5.3 Diseño de iniciadores y PCR	20
5.4 Muestras de necropsias e histopatología	21
6. Resultados	22
6.1 Obtención de células cloacales	22
6.2 PCR.....	23
6.3 Histopatología	27
7. Discusión.....	38
8. Conclusión.....	42
9. Perspectivas a futuro.....	43
10. Bibliografía	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los iniciadores diseñados y utilizados en la PCR para la detección de herpesvirus en psitácidos.....	23
Tabla 2. Resultados obtenidos en las PCRs realizadas en el grupo de estudio indicando en nombre común y científico, procedencia, identificación y situación en México.....	25
Tabla 3. Psitácidos en los cuales se realizó colección de órganos para necropsia y estudios histopatológicos	28
Tabla 4. Diagnóstico macroscópico de los casos estudiados	37
Tabla 5. Distribución de lesiones observadas en histopatología	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del herpesvirus.....	6
Figura 2. Célula de hisopo	22
Figura 3. Célula de raspado con cepillo	22
Figura 4. Célula de enema	23
Figura 5. Mapa genómico del herpesvirus	24
Figura 6. Resultado de producto de amplificación con 301 pb PRO	24
Figura 7. Resultado de producto de amplificación con 336 pb RAV.....	25
Figura 8. Hígado con hepatomegalia	29
Figura 9. Congestión cerebral	29
Figura 10. Nefromegalia	30
Figura 11. Hígado aumento de 4x.....	30
Figura 12. Hígado con necrosis e Infiltrado mononuclear (IMN) aumento de 4x.....	31
Figura 13. Hígado con necrosis e IMN aumento de 40x	31
Figura 14. Hígado con IMN aumento de 100x.....	32
Figura 15. Hígado con cuerpos de inclusion intranucleares y posible Hemosiderosis.....	32
Figura 16. Hígado con tinción de Perls	33
Figura 17. Riñón con necrosis e IMN aumento de 10x.....	33
Figura 18. Riñón con IMN y cuerpos de inclusión intranucleares aumento de 100x.....	34

Figura 19. Congestión cerebral en 20x	34
Figura 20. Cerebro con neuronofagia y satélitosis con aumento de 40x	35
Figura 21. Pulmón congestionado con aumento de 4x	35
Figura 22. Pulmón hemorrágico con aumento de 100x.....	36
Figura 23. Intestino necrosado en 10x.....	36

ABSTRACT

The Herpesvirus are the cause of several diseases in birds with high mortality in parrots, in addition the herpesvirus establishes viral latency in some birds making them healthy carriers.

Due to increased international trade of exotic birds, as well as the illegal traffic, is expected that infected birds increase and also those who can carry avian herpesvirus.

In this study, herpesvirus presence was identified by polymerase chain reaction (PCR). To carry out this test, there were used two pairs primers and 45 samples obtained by enema of different parrot species. Five birds with suggestive clinical infection of herpesvirus were necropsied and different organs were collected: liver, kidney, brain, colon and lung, which were fixed in 10% buffered formalin for histopathology study.

The results obtained by PCR identified 9 samples of parrots with an amplification product to the expected size (301 bp and 336 bp). Seven of them were exotic species and 2 of them endemic species of our country. In 4 of the 5 necropsied birds were observed highly suggestive lesions of the presence of herpesvirus, which included intranuclear inclusion bodies. The lesions were identified on 2 endemic species and 2 exotic parrot species.

These results indicate the presence and high probability of spread of herpesvirus in Mexican parrots, putting on risk because our endemic species can significantly impact their populations negatively.

RESUMEN

Los Herpesvirus son causantes de enfermedades graves en las aves y con alta mortalidad para los psitácidos, además de establecerse de forma latente en algunas aves convirtiéndolas en portadores sanos.

Debido al aumento del comercio internacional de aves exóticas, así como al tráfico ilegal, es de esperarse el incremento de aves infectadas y portadoras de herpesvirus aviarios.

En el presente trabajo se identificó la presencia del herpesvirus mediante la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para la realización de esta prueba se utilizaron 2 parejas de iniciadores y se usaron 45 muestras de células obtenidas mediante enema de diferentes especies de psitácidos. En 5 aves con cuadro clínico sugestivo a la infección por herpesvirus se realizó la necropsia de la cual se colectaron órganos como: hígado, riñón, cerebro, intestino grueso y pulmón, los cuales se fijaron en formalina amortiguada al 10% para posteriormente realizar el estudio histopatológico.

Los resultados obtenidos por PCR identificaron 9 muestras de psitácidos con un producto de amplificación al tamaño esperado (301 pb y 336 pb). De los cuales 7 fueron en especies exóticas y 2 en especies endémicas de nuestro país. En 4 de las 5 aves sometidas a necropsia se observaron lesiones altamente sugestivas a la presencia de herpesvirus, incluyendo la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares. Las lesiones se observaron en 2 especies endémicas y 2 especies exóticas de psitácidos.

Estos resultados nos indican la presencia y alta probabilidad de diseminación de herpesvirus en psitácidos mexicanos,

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de Psitácidos

Dentro de la clase aves existen aproximadamente 8,700 especies a nivel mundial. El orden Psitáciformes comprende un grupo grande y complejo, el cual se distribuye geográficamente en América, Asia, África y Australia (Murray & Miller 1986; Aguilar et al. 2005) .

Clasificación taxonómica

Dominio: Eukaryota

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Clase: Aves

Orden: Psittaciformes

Superfamilia: *Psittacoidea*

Familia: Psittacidae

El orden Psitaciforme está comprendido por loros, guacamayas, cacatúas y pericos (Aguilar et al. 2005; Tull & Dorrestein 2009).

Los psitácidos tienen características físicas que los distinguen de otros grupos de aves. Las aves de este orden presentan pico fuerte y curvo, cuya mandíbula superior arqueada termina en una larga punta que sobre pasan la mandíbula inferior, además no está fija (es decir, que se encuentra articulada) lo que le confiere una extraordinaria movilidad que le permite movimientos horizontales y mordeduras poderosas. Esta adaptación evolutiva permitió que los psitácidos se especialicen en la ingestión de semillas, quebrando las cascarras duras sin mucha dificultad, además de ayudarles a trepar (Murray & Miller 1986; Aguilar et al. 2005).

Las patas de los psitácidos son también muy características, están adaptadas para trepar en las ramas, coger el alimento y llevarlo hasta el pico, los dedos se ensanchan en forma de cojinetes; presentan cuatro dedos, de los cuales el primer y cuarto dedo están dirigidos hacia atrás, el segundo y tercer dedo hacia adelante (Zigodactilos). El tamaño de estas aves oscila entre 10 cm a 100 cm. (Murray & Miller 1986; Aguilar et al. 2005).

La mayoría de las especies son monomórficas (que no presentan diferencias entre los dos sexos), siendo necesario realizar exámenes para determinar el sexo del ave (por ejemplo de ADN o endoscopia) (Aguilar et al. 2005).

1.2 Antecedentes

Los herpesvirus tienen una distribución mundial, y ha sido aislado de aves silvestres, en cautiverio, domésticas enfermas y sanas aparentemente infectadas en etapa de latencia (Thomas et al. 2007).

El herpesvirus de la enfermedad de Pacheco fue descrito por primera vez en 1929 en Brasil por Pacheco y Bier (Gaskin 1989; Aguilar et al. 2005; Bistyak et al. 2007; Katoh et al. 2010). En 1931 el Dr Rivers informó que el agente aislado en un brote de psitácidos no estaba relacionado con el agente de la psitacosis, si no que se trataba de un virus específico de psitácidos que ocasionaba necrosis difusa en el hígado y cuerpos de inclusión en el mismo (Godwin et al. 1982; Steiner & Richard 1985; Gaskin 1989).

El virus es altamente específico de especie, existiendo cepas virulentas y no virulentas, además de 4 genotipos identificados hasta el momento y cualquiera de estos tiene el potencial de causar enfermedad. Son susceptibles los psitácidos de cualquier edad, principalmente los jóvenes, la susceptibilidad varía entre los géneros y especies, al parecer las aves del viejo mundo son más resistentes a la enfermedad que las del nuevo mundo (Gaskin 1989; Tomaszewski et al. 2006).

Los herpesvirus que afectan a los psitácidos están divididos en 4 genotipos (genotipo 1, 2, 3 y 4), los 4 genotipos se han identificado en los loros grises africanos como causantes de la enfermedad de Pacheco y sólo el genotipo 4 causa mortalidad en guacamayas y conuros, mientras que el genotipo 1 causa la enfermedad de Pacheco en el género Amazona (Tomaszewski et al. 2006).

El aspecto más preocupante de la enfermedad es que las aves infectadas actúan como portadores asintomáticos. Especies como las patagonias (*Cyanoliseus patagonus*), nandays (*Nandayus nenday*), y el perico dorado (*Aratinga solstitialis*) se han visto involucrados en brotes sin que ellos desarrollen signos de la enfermedad (Gaskin 1989; Fitzgerald & Reed 1995; Gilardi et al. 1995; Bistyak et al. 2007).

La infección es aguda y fatal de rápida propagación, y alto índice de mortalidad, cercana al 100%.

Es una enfermedad que no se encuentra descrita en el acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos.

1.3 Agente etiológico

La familia *Herpesviridae* incluye un amplio número de virus, los cuales son de estructura compleja, contienen un genoma de doble cadena de ADN. La familia contiene miembros de importancia médica y económica que afectan especies domésticas y silvestres de aves (MacLachlan & Duvobi 2011).

Los herpesvirus tienen un interesante y particular ciclo de replicación, en el que se establece una infección latente, debido a ello el individuo infectado puede ser reservorio del virus durante toda su vida y reactivarse espontáneamente durante etapas de la vida de un individuo infectado (Norkin 2010; MacLachlan & Duvobi 2011).

La infección inicial de los herpesvirus, se conoce cómo infección primaria, que es aguda y generalmente ocurre en células o tejidos epiteliales donde la replicación del virus es eficiente.

Los hospederos son capaces de montar una respuesta inmune después de la infección, de hecho la respuesta inmune del huésped le proporciona protección contra la re-infecciones.

Sin embargo, la respuesta inmune no es capaz de eliminar el virus del hospedero. Esto debido a que los herpesvirus establecen infecciones latentes en un tejido o célula diferente de donde inicio la infección primaria. El virus persiste indefinidamente en los tejidos y así la infección podría reactivarse periódicamente mediante estímulos que producen estrés, tales como la época de reproducción, de pelecha, desnutrición, etc., para permitir la transmisión a nuevos individuos susceptibles (Carrasco & Almendral del R 2006; Norkin 2010).

ESTRUCTURA

Los Herpesvirus miden de 120 a 220 nm de diámetro, están envueltos por una membrana lipídica, con una cápside icosaédrica rígida de aproximadamente 125 nm de diámetro y 15 nm de espesor, contienen un genoma lineal de ADN de doble cadena. Su replicación es llevada a cabo en el núcleo (Branson et al. 1994; Carrasco & Almendral del R 2006; Katoh et al. 2010; Norkin 2010; MacLachlan & Duvobi 2011).

Las proteínas y glicoproteínas virales insertadas en la superficie de la envoltura forman proyecciones las cuales pueden participar en la fijación del virus a la célula. La integridad de la envoltura es necesaria para la infectividad del virus.

El tegumento es el material que se encuentra entre la envoltura y la superficie de la cápside y es un complejo de proteínas virales de estructura fibrilar que aseguran la unión entre la envoltura y la cápside.

Dentro de la cápside del virus se localiza el genoma viral que se encuentra en forma condensada (figura 1).

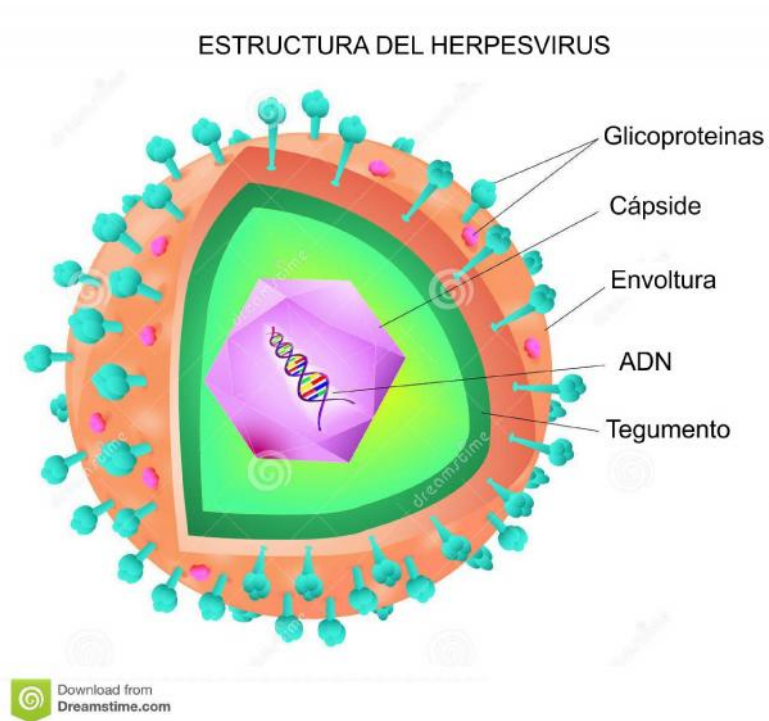


Figura 1. Estructura del herpesvirus. Se muestran los diferentes componentes que forman al virus.

La familia *Herpesviridae* se divide en 3 subfamilias de acuerdo a la homología y organización de su genoma, rango de huésped y otras propiedades biológicas.

Las tres subfamilias son: *alfaherpesvirinae*, *betaherpesvirinae* y *gammaherpesvirinae* (Kaleta 1990; Branson et al. 1994; Carrasco & Almendral del R 2006; Katoh et al. 2010; Norkin 2010).

Los herpesvirus que infectan predominantemente a psitácidos pertenecen a la subfamilia *alfaherpesviridae* y tiene las siguientes características:

- 1.- Variabilidad de huéspedes.
- 2.- Ciclo de replicación relativamente corto.
- 3.- Destrucción efectiva de la célula infectada.
- 4.- Capacidad de establecer una latencia primaria, aunque no exclusiva, a nivel de los ganglios sensitivos (Mattera, A. 2008)

1.4 Replicación viral

1.4.1 Entrada

La infección de los herpesvirus comienza con la interacción de las glicoproteínas de la envoltura viral con receptores de la membrana celular. Inicialmente se produce una interacción electrostática inespecífica del virión con el principal proteoglicano de la superficie celular (heparán sulfato) seguida por la unión de glicoproteínas virales de la envoltura a uno o varios otros receptores celulares específicos (nectina 1 y 1, manosa-6 fosfato).

Tras la unión a los receptores específicos, se produce la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática celular, lo que permite la liberación de la nucleocápside al citoplasma. La cápside, junto con la parte del tegumento, es transportada por el citoesqueleto hasta ser atraída por receptores de importinas hasta el complejo del poro nuclear, donde la cápside se abre e inyecta el genoma viral al interior del núcleo, sin que aparentemente se desensamble por completo (Carrasco & Almendral del R 2006).

1.4.2 Expresión génica

Una vez en el núcleo, donde ocurre la mayor parte del ciclo vital de los herpesvirus, el genoma viral se circulariza en un proceso probablemente promovido y mediado por proteínas celulares o virales contenidas en el virión.

En el caso de la infección lítica, comienza inmediatamente la transcripción de determinados genes del genoma viral. Los herpes codifican enzimas relacionadas con el metabolismo de los ácidos nucleicos y con la síntesis de ADN. La transcripción de los genes virales se lleva a cabo por la ARN polimerasa II celular, pero con la intervención de factores transcripcionales codificados por el virus en todos los estadios del ciclo de infección, los cuales modulan la actividad de la polimerasa celular y determinan el reconocimiento ordenado de los promotores virales por los complejos de transcripción (Carrasco & Almendral del R 2006).

Durante la infección lítica de un herpesvirus se pueden distinguir tres fases en la expresión genética: la inmediatamente temprana (o proteínas) son los primeros en expresarse tras la infección, su transcripción no depende de la síntesis de *nov*o de proteínas y en gran parte son reguladores de la expresión génica. Los productos inducen la transcripción de los genes tempranos (denominados) quienes codifican preferentemente proteínas que intervienen en la replicación viral, tales como la ADN polimerasa, la helicasa o la timidina quinasa. Tras la replicación del ADN viral, los genes tardíos (llamados) son transcritos, codificando en su mayoría proteínas estructurales (Carrasco & Almendral del R 2006).

Toda esta cascada de regulación se produce a nivel transcripcional y postranscripcional, fundamentalmente por tres tipos de factores:

Proteínas *trans-acting* (que actúan en *trans*) especificadas por el virus.
Secuencias reguladoras y promotoras *cis-acting* (que actúan en *cis*)
Factores y enzimas necesarias para la transcripción.

1.4.3 Replicación, maduración y salida

Para la replicación del genoma, se producen intermedios replicativos circulares y recombinaciones entre regiones de secuencias repetidas que producen los isómeros característicos. Los concatémeros finales de gran longitud genómica se resuelven en unidades más pequeñas por la acción de endonucleasas específicas, procediéndose al empaquetamiento de estas unidades en cápsides vacías preensambladas en el núcleo, que en ocasiones se han podido aislar con distinto grado de maduración en función del tamaño y composición de proteínas estructurales. El empaquetamiento se produce a través de un punto de la precápside en un proceso activo y dependiente de energía gracias a la contribución de una proteína portal y una terminasa asociada al extremo del ADN entrante, en el que la secuencia repetida “a” juega un papel de reconocimiento específico. Cuando las cápsides virales han madurado por que contienen el genoma empaquetado en su interior, salen del núcleo rodeándose de la membrana interna nuclear donde previamente se han insertado proteínas codificadas por el virus. A partir de aquí las etapas de salida de las partículas pueden seguir dos caminos alternativos:

- 1.- Los viriones pueden atravesar el lumen entre las membranas nucleares y fusionarse con la membrana nuclear externa, donde abandonan la envoltura y salen al citosol como cápsides desnudas para adquirir el tegumento.
- 2.- El tegumento se adquiere en el núcleo y las partículas no pierden la envoltura adquirida de la membrana nuclear interna.

En cualquiera de los caminos, los viriones se rodean sucesivamente por envolturas del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, que se unen por fusión con la membrana plasmática donde generalmente van adquirir otras glicoproteínas virales, hasta que son finalmente liberados de la célula infectada (Carrasco & Almendral del R 2006; MacLachlan & Duvobi 2011).

1.5 Latencia y reactivación

Todos los herpesvirus permanecen en sus huéspedes naturales y son responsables de infecciones latentes y de reactivaciones asintomáticas. La latencia está caracterizada por una expresión limitada de una pequeña cantidad de genes virales.

Se define a la latencia cómo la persistencia silenciosa del virus en el organismo y para esta no se necesita necesariamente la replicación del herpesvirus (Mattera, A. 2008)

Se describen 3 sitios de latencia: nerviosa, epitelial y linfoide.

Existen 2 estados de latencia:

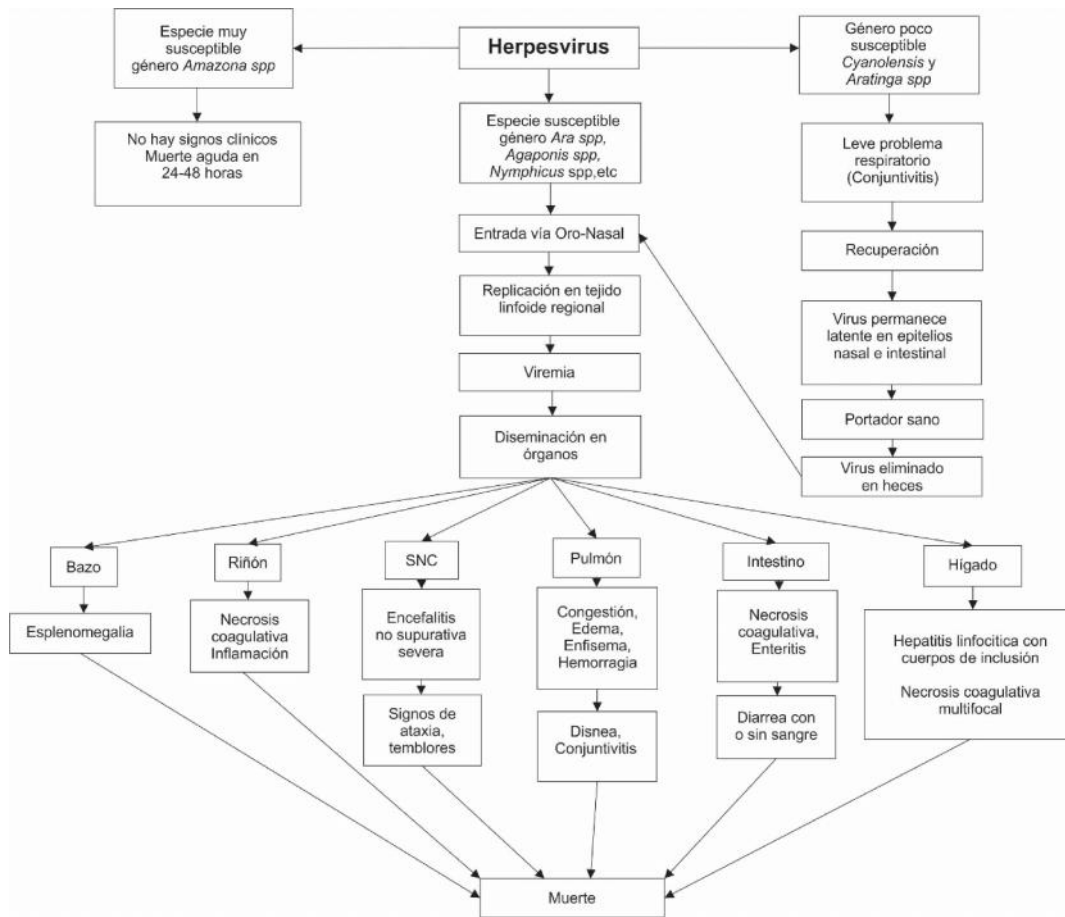
1.- Un estado dinámico: la multiplicación del virus se produce siempre en las células infectadas en forma latente, de tal modo que, en todo momento, las células contienen una cantidad reducida de virus infeccioso.

2.- Un estado estático: no existe una infección activa y productiva pero se conserva la información genética del virus.

Reactivación: se define como la aparición del virus infeccioso en las células donde se estableció de forma latente. A la re excreción se le define como la presencia del virus infeccioso o no infeccioso en los tejidos y órganos periféricos, seguida por su excreción fuera del cuerpo (Mattera, A. 2008).

La reactivación de un herpesvirus latente puede ser inducida, ya sea por una inmunodepresión o por un efecto directo del estímulo en las células latentemente infectadas o por una combinación de estos mecanismos (Mattera, A.2008).

1.6 Patogenia



1.7 Signología y lesiones por herpesvirus.

Los signos no son específicos, pero puede incluir problemas respiratorios, diarrea y signos neurológicos.

La muerte sobreviene rápidamente, por lo general dentro de las 24-48 hrs después de los primeros signos o incluso sin previos signos y esto se debe al colapso de la circulación (Godwin et al. 1982; Bistyak et al. 2007). En el cual se observa una reducción aguda del flujo sanguíneo efectivo, con un fallo para mantener el transporte y entrega de sustancias esenciales para sostener la función de órganos vitales. El efecto final es un estado de hipoperfusión periférica debido a disminución absoluta del gasto cardíaco o a la mala distribución de este (Kumar et al. 2014).

La presentación clínica puede ser aguda, con ausencia de signos clínicos, pero cuando éstos se encuentran presentes hay: depresión, anorexia, diarrea, regurgitación, plumaje erizado, eliminación de uratos de coloración amarillo-verdoso, temblores y en menores casos conjuntivitis, sinusitis (Fitzgerald & Reed 1995). Las cepas más virulentas se relacionan con ataxia, diarrea hemorrágica y regurgitación mucosanguinolenta. Antes de la muerte, las aves pueden demostrar signos nerviosos como temblores, opistótonos y síncope. Los psitácidos que presentan signología clínica tienen grandes concentraciones del virus en las heces y en secreciones faríngeas y muy rara vez sobreviven (Steiner & Richard 1985).

Las aves que sobreviven a la infección se transforman en portadoras latentes y factores estresantes, tales como infecciones concomitantes, desnutrición, periodo reproductivo, variaciones térmicas y cambio de ambiente pueden hacer que los portadores liberen el virus en las heces sin que presenten signología.

Las aves afectadas suelen tener una buena condición corporal y pueden presentar lesiones macroscópicas distribuidas en el hígado, bazo, riñón e intestino. El hígado se presenta aumentado de volumen, asociado a múltiples focos de coloración amarillenta y centros hemorrágicos; los riñones pueden estar agrandados y la mucosa intestinal puede estar hiperémica o hemorrágica (Aguilar et al. 2005).

Las lesiones histológicas son en general necróticas, hemorrágicas y se vinculan con una respuesta inflamatoria principalmente en el hígado, causada por la lisis de los hepatocitos por los agentes virales. Además, se puede observar necrosis de las células bronquiales, neumonía, aerosaculitis y enteritis hemorrágica.

La respuesta inflamatoria es de escasa a moderada, dependiendo del curso de la enfermedad y muchas veces es posible detectar células gigantes en múltiples órganos (Sanchez-Cordon et al. 2002; Aguilar et al. 2005; Katoh et al. 2011).

Las lesiones principalmente causadas por herpesvirus incluyen hemorragias en el epitelio respiratorio o intestinal, necrosis multifocal en hígado, bazo y médula ósea (Kaleta & Brinkmann 1993; Tomaszewski et al. 2006).

Los herpesvirus inducen la formación de cuerpos de inclusión intranucleares que frecuentemente se encuentran en hígado, pero que también se han identificado en otros órganos como el riñón, bazo, páncreas e intestino grueso (Gaskin 1989; Katoh et al. 2010).

1.8 Transmisión

Los herpesvirus se eliminan al exterior en materia fecal y su transmisión es horizontal por vía respiratoria mediante aerosoles y por vía oral principalmente al consumir agua y alimento contaminados. La transmisión está relacionada con aves portadoras asintomáticas (Cambri, 2015; (Steiner & Richard 1985).

1.9 Tratamiento

No existe tratamiento específico para el herpesvirus (Steiner & Richard 1985).

El tratamiento puede incluir cuidados paliativos, estrategias que limiten la propagación de la enfermedad a otras aves y aciclovir. El aciclovir es usado para aumentar la supervivencia de las aves y disminuir la diseminación del virus, puede ser administrado en el alimento durante 7 días, junto con terapia de fluidos y antibióticos no hepatotóxicos como enrofloxacin para evitar una infección bacteriana secundaria.

El aciclovir es eficaz en algunas cepas y en presentaciones tempranas de la enfermedad, aunque no es muy recomendable su uso ya que causa daño renal y hepático (Cambrico, 2015).

El aciclovir es un antiviral que se usa en el tratamiento de las infecciones por el virus del herpes y actúa impidiendo la replicación viral disminuyendo la extensión y duración de la enfermedad (Donald & D. 2010).

1.10 Diagnóstico diferencial

Polyomavirus aviar: es una enfermedad que causa muerte aguda, distensión abdominal y anomalías en las plumas conocida como la “muda francesa”. En exámenes anatomopatológicos han encontrado hidropericardio, hígado edematizado, riñones congestionados y hemorragia en cavidades.

Histopatológicamente se revelan cuerpos de inclusiones intranucleares grandes y ligeramente basófilos en hígado, riñón y bazo principalmente.

Su diagnóstico es mediante inmunofluorescencia, hibridación *in situ*, PCR, microscopía electrónica. (Kato et al. 2010)

Adenovirus aviar: las infecciones por este virus se asocian con depresión, anorexia, diarrea y hemorragia cloacal, tiene una progresión muy parecida al herpesvirus tipo 1 de psitácidos.

Las lesiones principalmente encontradas en las aves son: hepatomegalia, esplenomegalia, dilatación de duodeno y proventrículo, riñones inflamados, así como edema, congestión y hemorragia de pulmones.

Histopatológicamente se encuentran cuerpos de inclusión asociados a necrosis en hígado y bazo.

Su diagnóstico se basa en PCR y hallazgos patológicos. (Katoh et al. 2010)

Psitacosis: la clamidiosis aviar (CA) está causada por la bacteria *Chlamydophila psittaci*.

Los signos clínicos pueden incluir anorexia, letargo, plumaje erizado, descargas oculonasales serosas o mucopurulentas y pérdida de peso. Algunas aves desarrollan signos respiratorios que abarcan desde estornudos hasta un cuadro respiratorio; también se pueden observar conjuntivitis y diarrea con excremento verde a amarillento. Se pueden observar signos neurológicos, especialmente en casos subagudos a crónicos; se han informado casos de tortícolis, opistótonos, temblores, movimientos convulsivos y parálisis flácida o paresia de las patas. Las aves con infección grave pueden estar emaciadas y deshidratarse antes de morir.

Las lesiones post mortem en las aves pueden incluir congestión de los pulmones, neumonía fibrinosa, aerosaculitis, esplenomegalia y hepatomegalia con necrosis hepática multifocal. (Chamidiosis aviar, 2015).

1.11 Control y prevención

El control para la enfermedad se realiza a través del aislamiento de aves clínicamente enfermas y aves con infección latente. Desinfección de jaulas y accesorios que estén en contacto con heces y aerosoles de aves infectadas.

Las aves que son portadoras asintomáticas de la enfermedad (Patagonias, Nandays y Pericos dorados) deben de ser separadas de las especies susceptibles.

Toda ave nueva debe permanecer en cuarentena de 30-60 días.

La vacuna para el herpesvirus está disponible pero se ha reportado que después de su aplicación causa parálisis y granulomas. Las Cacatúas, la Guacamaya azul-dorado y el Perico verde africano aparecen ser especialmente sensibles a la vacuna (Cambri, 2015).

1.12 Diagnóstico

Los virus de la familia *herpesviridae* se pueden identificar mediante las siguientes técnicas: microscopía electrónica, cultivo celular, PCR o PCR en tiempo real, además de hallazgos clínicos y patológicos sugestivos de infección, (lesiones y cuerpos de inclusión) (Aguilar et al. 2005; Katoh et al. 2010).

1.13 Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En la actualidad, la PCR es una técnica de rutina indispensable en los laboratorios de investigación y diagnóstico médico con una gran variedad de aplicaciones.

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1983 por Kary Mullis que permite la síntesis “*in vitro*” de secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN).

La técnica se basa en la replicación del ADN realizada por la Taq polimerasa. Esta enzima realiza la síntesis de cadenas complementarias de ADN en sentido 5´- 3´ usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena, se utilizan los denominados iniciadores (*primers*). Estos son una pareja de oligonucleótidos diseñados de tal manera que sean complementarios a cada uno de los extremos del fragmento del ADN que se quiere amplificar.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es utilizada para amplificar un segmento de ADN que se localiza entre dos regiones de secuencias conocidas.

La amplificación por PCR ha servido para múltiples usos, entre ellos la detección de secuencias de ácidos nucleicos de organismos patógenos en muestras clínicas, además de que permite llevar a cabo una gran variedad de actividades de clonación molecular y análisis de ADN (Ramírez M. M. E et al. 2014)

Componentes de la PCR

1.- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs): son una mezcla de desoxi nucleótidos que sirven de sustrato para la síntesis de nuevo ADN.

2.- Iniciadores (primers): son dos oligonucleótidos cada uno complementarios a una de las dos hebras del ADN. Son secuencias cortas, de entre 18-30 nucleótidos, que son reconocidos por la polimerasa permitiendo iniciar la reacción, deben estar enfrentados (uno en cada hebra de ADN) para así determinar el fragmento a amplificar (Rodríguez & Barrios 2011).

3.- ADN polimerasa: es una enzima termoestable aislada de una bacteria *Thermus acuaticus*, encargada de la incorporación de los dNTPs.

4.- MgCl₂: es un factor esencial para el óptimo desempeño de la ADN polimerasa, por lo que su concentración debe ser optimizada, ya que regula la actividad y fidelidad de la enzima (Ramírez M. M. E et al. 2014).

5.- DNA molde: molécula que contiene la región de ADN que se va amplificar (Ramírez M. M. E et al. 2014).

En el proceso de amplificación por PCR, el ADN molde es separado en cadenas simples por temperaturas superiores a 90°C; posteriormente la enzima ADN polimerasa a temperaturas superiores de 70°C cataliza una serie de reacciones de síntesis de ADN utilizando dos oligonucleótidos como indicadores y creciendo las cadenas por la adición de dNTPs. Los oligonucleótidos tienen típicamente secuencias diferentes y son complementarios a las regiones en las que se hibridan sobre las cadenas opuestas del ADN molde, flanqueando el segmento del ADN que será amplificado y orientándose de tal forma que sus extremos 3' quedan frente a frente.

Los pasos de desnaturalización, alineamiento y síntesis de ADN son repetidos muchas veces. Debido a que el producto de ADN de una ronda de amplificación sirve como molde para la siguiente, cada ciclo sucesivo duplica la cantidad del producto de ADN deseado acumulándose exponencialmente (Ramírez M. M. E et al. 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

La infección por herpesvirus puede inducir una gran variedad de manifestaciones clínicas o asintomáticas en muchas especies de aves en el mundo. Las aves infectadas quedan como portadores y adicionalmente, en muchos casos se asocian con infecciones secundarias (*Adenovirus*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, hongos y protozoarios) los cuales enmascaran los efectos primarios de la infección por herpesvirus. La migración natural, el tráfico ilegal, el comercio internacional y las exposiciones contribuyen a la propagación de estos virus en las aves psitácidas. Es por ello que es pertinente estudiar la posible presencia del virus en psitácidos del país, tanto en aves nacionales como exóticas y establecer posibles herramientas de identificación dado el riesgo latente del ingreso de aves infectadas.

3. HIPÓTESIS

Debido a la migración natural, al tráfico ilegal y comercio de aves psitácidas que existe en nuestro país, es altamente probable que se puedan identificar aves infectadas por herpesvirus en poblaciones nacionales, siendo las especies de psitácidos exóticos el posible foco de infección (entendiéndose por exótica toda aquella especie no endémica o nativa de México).

4. OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia de herpesvirus mediante la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de células epiteliales del recto y de ejemplares presentados a necropsia, de los cuales se tomaran muestras de tejidos para cortes histológicos incluidos en parafina de psitácidos provenientes de dueños particulares y de un centro aviario.

4.1 Objetivos particulares

- 1.- Detectar la presencia de herpesvirus en psitácidos mediante la técnica de PCR.
- 2.- Estandarizar la técnica de PCR a partir de ADN proveniente de células epiteliales de recto y tejidos incluidos en parafina.
- 3.- Identificar por histopatología lesiones tisulares sugestivas de infección por herpesvirus en órganos de aves con signos clínicos presentados a necropsia.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular (L-504) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, ubicada en la carretera Cuautitlán-Teoloyucán Km. 2.5, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

5.1 Población de estudio

La población de estudio consistió en 50 psitácidos provenientes de dueños particulares y de un centro aviario realizando un muestreo por conveniencia, sin distinción de sexo y edad.

5.2 Colección de muestras

De todos los psitácidos se obtuvieron muestras de células intestinales mediante enema. Para establecer el método de muestreo, se evaluaron 3 técnicas, ya que se debe asegurar obtener una buena cantidad de células nucleadas y el menor daño posible en el ave, las cuales se describen a continuación:

1.- Hisopado: el procedimiento consistió en sujetar el ave, introducir un hisopo estéril humedecido previamente con solución de Hanks en la cloaca, se realizaron movimientos de rotación de derecha a izquierda, para posteriormente retirarlo de la cloaca y depositarlo en un tubo de ensaye con solución de Hanks, agitándolo para desprender las células en el líquido.

2.- Raspado cloacal: se sujeto el ave, se utilizó un cepillo dental con cerdas flexibles (G.U.M), el cual se introdujo en la cloaca, se roto de derecha a izquierda, se retiró y se colocó en un tubo de ensaye con solución de Hanks, agitándolo para desprender las células en el líquido.

3.- Enema: el procedimiento consistió en sujetar el ave, introducir en la cloaca una jeringa insulínica sin aguja 0.6 ml de solución de Hanks, posteriormente se aplicó un masaje para enseguida recuperar el líquido realizando este procedimiento de 2-3 veces dentro de la cloaca. Una vez retirada la jeringa, la solución se colocó en un microtubo. En general se recuperó en la mayoría de los casos arriba de un 80% de la solución.

Para la toma de muestras en todas las metodologías las aves fueron sujetadas de cabeza y patas con una toalla para así inmovilizarlas. Las muestras se colocaron en microtubos y fueron centrifugadas a 6000rpm X 5 min.

A partir del botón obtenido se tomó una gota para realizar un frotis de cada muestra y posteriormente teñirlas con Wrigth con la finalidad de visualizar la cantidad y morfología celular.

Procedimiento de realización de tinción de Wright.

- 1.- Se coloca una gota en el centro del portaobjetos distribuyéndola en forma de estrella y se esperó a que se seque.
- 2.- Colocar sobre el portaobjetos el colorante de Wright.
- 3.- Dejar reposar durante 3 min.
- 4.- Agregar buffer hasta formar una capa metacromática.
- 5.- Dejar reposar durante 7 min.
- 6.- Enjuagar con agua destilada.
- 7.- Enjuagar con agua corriente.
- 8.- Dejar secar (Jörundsson et al. 1993)

El botón de células obtenido del fondo del tubo se procesó para la extracción de ADN, así como algunas muestras de órganos embebidos en parafina de aves remitidas al laboratorio con signología sugestiva de la infección por herpesvirus. Se utilizó un Kit comercial de extracción (FavorGen ©) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado y almacenado a -20°C hasta su uso.

Para observar la calidad del ADN obtenido de dicha extracción, este fue separado por electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador.

5.3 Diseño de iniciadores y PCR

Las dos parejas de iniciadores se diseñaron con base a las secuencias disponibles en el GeneBank de herpesvirus de psitácidos del genotipo 1 al 4, para lo cual se utilizaron programas bioinformáticos (BioEdit y Primer3 Input V4.0).

Se accedieron a todas las secuencias disponibles en el GeneBank de herpesvirus del genotipo 1 al 4, posteriormente se alinearon y editaron con el programa BioEdit para seleccionar el fragmento con más similitud para los 4 genotipos y de esta forma se seleccionó la región de interés, de la cual se generaron opciones de iniciadores cumpliendo diversos criterios analizados con el programa Primer3. Los iniciadores diseñados se mandaron a la industria Bioselec S.A de C.V. para su sintetización.

Se diseñaron propuestas para realizar la PCR en un solo ciclo de amplificación o como PCRs anidadas.

La mezcla de reacción de las PCRs realizadas fue: buffer 1X (Biotools), 2.5mM de MgCl_2 (Biotools), 280 μM de cada dNTPs (Biotools), 600 nM de cada primers, 5 U/ μl de Taq ADN polimerasa (Biotools) y de 0.5 a 1 μg de ADN por reacción en un volumen final de 30 μl . Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización inicial por 5 min a 94°C seguido por 40 ciclos a 94°C por 30 seg., alineamiento a 54°C por 40 seg., extensión a 72°C por 40 seg. y un paso

final de extensión a 72° C por 7 min. Los productos amplificados por PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa, fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador.

5.4 Muestras de necropsias e histopatología.

Los psitácidos que murieron por cuadro sugestivo de infección por hepesvirus, fueron remitidos al laboratorio, para la realización de las respectivas necropsias y toma de muestra de órganos, que la bibliografía reporta con lesiones sugestivas: hígado, intestino, cerebro, riñones y pulmones, los cuales fueron fijados en formol amortiguado al 10% para su posterior estudio histopatológico.

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de células cloacales.

1.- Raspado con hisopo

Cuando se realizó el frotis con este método se observó una alta cantidad de células anucleadas que correspondían a la descamación del epitelio, en poca cantidad se observan células con gran citoplasma y un núcleo central correspondientes a células epiteliales de la cloaca, al igual que restos de alimento y abundantes bacterias.

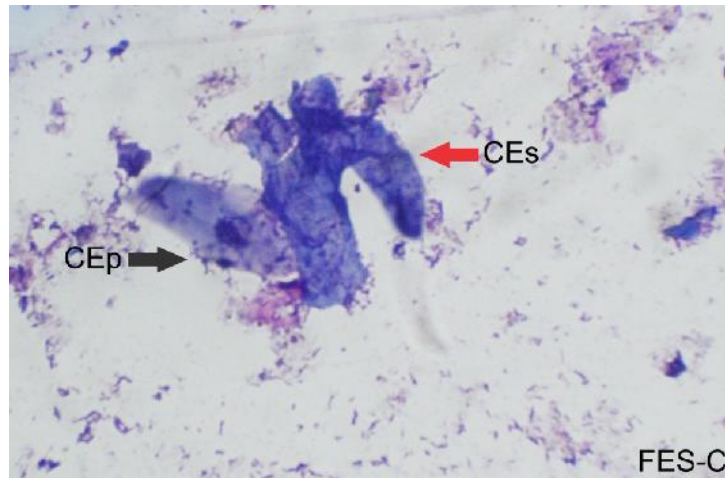


Figura 2, Célula de hisopo. Se observan dos células escamosas anucleadas (CEs) y una célula nucleada (CEp) con acumulo de bacterias. (Tinción de Wrigth, 100x)

2.- Raspado con cepillo dental

Con esta técnica se observó en laminilla la presencia de un acúmulo de células escamosas anucleadas, rodeados de bacterias y en algunos campos presencia de eritrocitos.

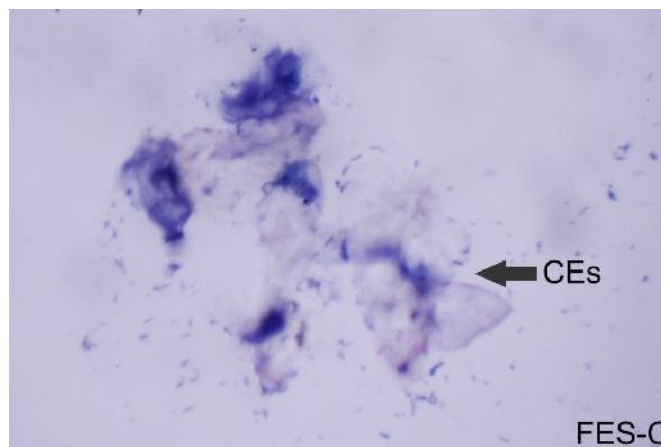


Figura 3. Célula de raspado con cepillo. Acumulo de células escamosas anucleadas (CEs) (Tinción de wright, 100x)

3.- Enema.

Con este método de obtención de células en el frotis se observó conglomerados de células epiteliales nucleadas, pocas o en algunos casos nulas células escamosas anucleadas. Se presentó gran cantidad de bacterias, así como eritrocitos y residuos de fibras de alimento.

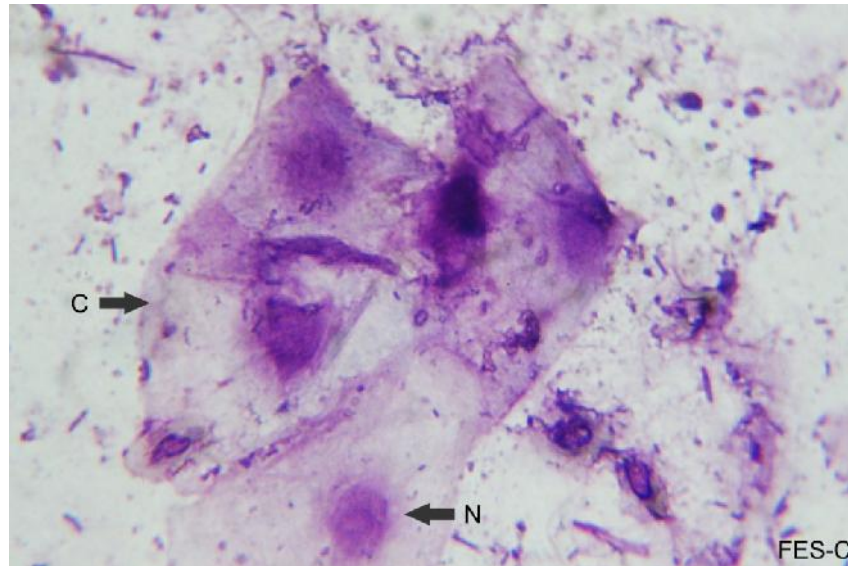


Figura 4. Célula de enema. Acúmulo de células epiteliales, las cuales corresponden a la última porción del colon y recto. Se observa el citoplasma (C) y núcleo (N), alrededor se ubican bacterias y eritrocitos. (Tinción de Wrigth, 100x)

6.2 PCR

Los iniciadores utilizados para las pruebas de PCR se ubicaron en el gen UL16 de los herpesvirus (Tabla 1), los cuales se relacionan con la expresión de la proteína del tegumento.

Tabla 1.- Características de los iniciadores diseñados y utilizados en la PCR para la detección de herpesvirus de psitácidos.

NOMBRE ASIGNADO	SECUENCIA SENTIDO (FW) 5'-3'	SECUENCIA ANTISENTIDO (RV) 3'-5'	TAMAÑO DEL PRODUCTO ESPERADO EN PARES DE BASES (pb)
PRO	ACAAAAGACAAAACGCATGG	ATGCGCGTATCCGTATCTAA	301
RAV	CACAGCTGGGACTTAGATACG	CGAGCGACTTCTCAACGA	336



Figura 5. Mapa genómico del herpesvirus. Donde se muestra la ubicación de los iniciadores diseñados en la región del gen UL16.

En el diseño de iniciadores se considero el empleo de ellos en PCRs simples así cómo anidada.

De la pareja de iniciadores PRO donde el producto esperado era de 301 pb se obtuvieron 2 psitácidos con producto positivo: MNZ y 33, ambos de la especie *Myopsitta monachus*. (Figura 6)

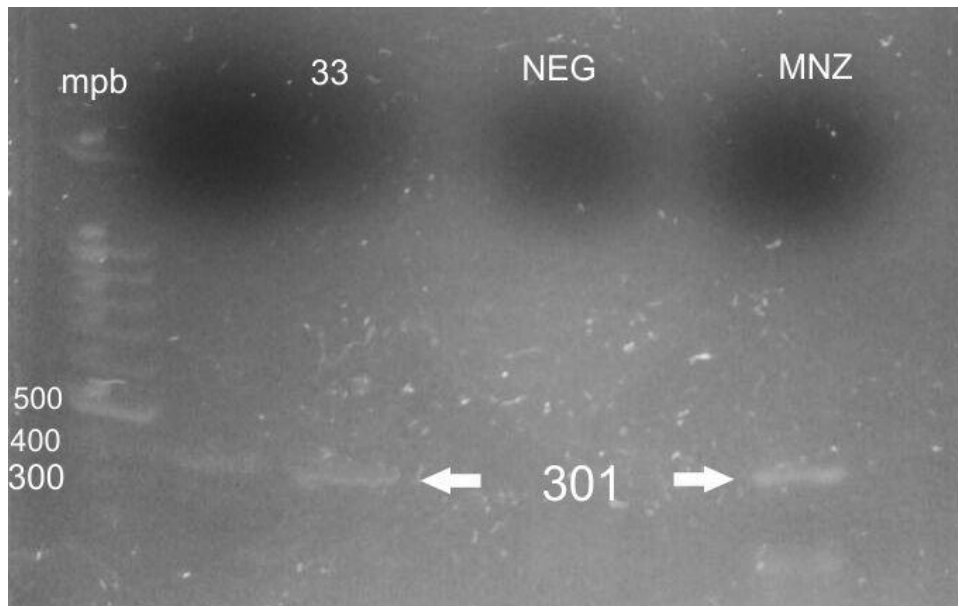


Figura 6. Resultado de producto de amplificación con 301 pb PRO.

Los resultados más claros se obtuvieron con la pareja de iniciadores RAV donde el producto esperado era de 336 pb, con el cual se encontraron 7 muestras positivas. (Figura 7)

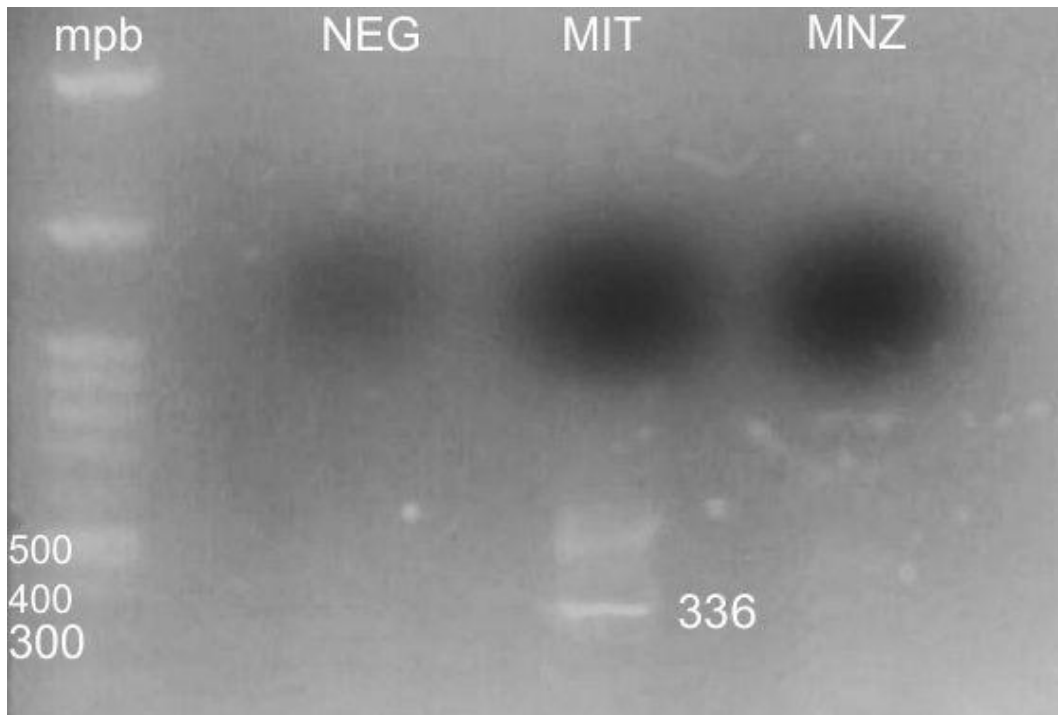


Figura 7. Resultado de producto de amplificación con 336 pb RAV.

Con las diferentes combinaciones de iniciadores en las PCRs se encontró que de 45 muestras evaluadas, en 9 muestras se pudo identificar el amplicon esperado.

Tabla 2. Resultados obtenidos en las PCRs realizadas en el grupo de estudio indicando el nombre común y científico, procedencia, identificación y situación en México.

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	PROCEDENCIA	IDENTIFICACIÓN	ESTATUS EN EL PAÍS	PRODUCTO AMPLIFICADO POR PCR (pb)
Agaporni	<i>Agapornis Spp.</i>	Hidalgo	A1	Exótico	S/A
Agaporni	<i>Agapornis Spp.</i>	Hidalgo	A2	Exótico	S/A
Agaporni	<i>Agapornis Spp.</i>	Hidalgo	A3	Exótico	S/A
Agaporni	<i>Agapornis Spp.</i>	Hidalgo	A4	Exótico	S/A
Agaporni	<i>Agapornis Spp.</i>	Hidalgo	A5	Exótico	S/A
Agaporni	<i>Agapornis Spp.</i>	Hidalgo	A6	Exótico	S/A
Agaporni	<i>Agapornis Spp.</i>	Hidalgo	A7	Exótico	S/A

Agaporni	<i>Agapornis Spp.</i>	Hidalgo	A8	Exótico	336 pb RAV
Agaporni	<i>Agapornis Spp.</i>	Hidalgo	A9	Exótico	S/A
Agaporni	<i>Agapornis Spp.</i>	Hidalgo	A10	Exótico	S/A
Ninfa	<i>Nymphicus hallandicus.</i>	Hidalgo	N1	Exótico	S/A
Ninfa	<i>Nymphicus hallandicus.</i>	Hidalgo	N2	Exótico	S/A
Ninfa	<i>Nymphicus hallandicus.</i>	Hidalgo	N3	Exótico	S/A
Ninfa	<i>Nymphicus hallandicus.</i>	Hidalgo	N4	Exótico	S/A
Ninfa	<i>Nymphicus hallandicus.</i>	Hidalgo	N5	Exótico	S/A
Perico monje	<i>Myopsitta monachus</i>	Hidalgo	M1	Exótico	S/A
Perico monje	<i>Myopsitta monachus</i>	Hidalgo	M2	Exótico	S/A
Perico monje	<i>Myopsitta monachus</i>	Hidalgo	M3	Exótico	S/A
Perico monje	<i>Myopsitta monachus</i>	Hidalgo	M4	Exótico	336 pb RAV
Patagonia	<i>Cyanoliseas patagonus</i>	Hidalgo	P1	Exótico	S/A
Guacamaya Azul dorado	<i>Ara ararauna</i>	Hidalgo	G1	Exótico	336 pb RAV
Loro eclectus	<i>Eclectus roratus</i>	Hidalgo	E1	Exótico	S/A
Perico mejillas amarillas	<i>Amazona autumnalis</i>	Hidalgo	AA1	Exótico	S/A
Perico australiano	<i>Melopsittacus undulatus</i>	Hidalgo	PAE1	Exótico	S/A
Cacatúa	<i>Cacatúa galerita</i>	Hidalgo	CE1	Nacional	S/A
Agaporni	<i>Agapornis spp.</i>	Hidalgo	AE11	Exótico	S/A
Guacamaya verde	<i>Ara militaris</i>	Hidalgo	GE1	Nacional	S/A
Guacamaya verde	<i>Ara militaris</i>	Hidalgo	GE2	Nacional	S/A
Loro corona azul	<i>Amazona farinosa</i>	Hidalgo	LE1	Nacional	S/A
Loro cabeza amarilla	<i>Amazona oratrix</i>	Hidalgo	LAE1	Nacional	S/A
Perico mejillas amarillas	<i>Amazona autumnalis</i>	Tabasco	31	Nacional	336 pb RAV

Perico monje	<i>Myopsitta monachus</i>	Uruguay	32	Exótico	S/A
Perico monje	<i>Myopsitta monachus</i>	Desconocido	33	Exótico	301 pb PRO
Perico monje	<i>Myopsitta monachus</i>	Tepozotlán	M34	Exótico	S/A
Perico cachetes amarillos	<i>Amazona autumnalis</i>	Desconocido	AU35	Nacional	336 pb RAV
Agaporni	<i>Agapornis roseicollis</i>	Desconocido	Pepi 36	Exótico	S/A
Perico monje	<i>Myopsitta monachus</i>	Zumpango	MNZ	Exótico	301 pb PRO
Perico monje	<i>Myopsitta monachus</i>	Desconocido	KIW	Exótico	336 pb RAV
Calacante cara roja	<i>Aratinga mitrata</i>	Desconocido	MIT	Exótico	336 pb RAV
Perico monje	<i>Myopsitta monachus</i>	Desconocido	MGO	Exótico	S/A
Perico monje	<i>Myopsitta monachus</i>	Desconocido	MGC	Exótico	S/A
Perico atolero	<i>Eupsittula canicularis</i>	Chiapas	CIR	Exótico	S/A
Perico monje	<i>Myopsitta monachus</i>	Zumpango	JEL	Exótico	S/A
Perico frente blanca	<i>Amazona albifrons</i>	Desconocido	Max	Nacional	S/A
Perico mejillas amarillas	<i>Amazona autumnalis</i>	Desconocido	MIra	Nacional	S/A
Perico cabeza amarilla	<i>Amazona oratrix</i>	Desconocido	CA	Nacional	S/A

S/A= Sin producto de amplificación (Negativo), PCR
336 pb= PCR realizada con iniciadores RAV
301 pb= PCR realizada con iniciadores PRO

Las PCRs anidadas no mejoraron la detección de productos positivos, teniendo mejores resultados en PCRs de una sola ronda. A partir de la extracción de muestras de ADN de órganos embebidos en parafina de psitácidos a los que se realizó necropsia no fue posible encontrar resultados de amplificación positivos.

6.3 Histopatología

Se presentaron 5 casos con cuadro clínico sugestivo a infección por herpesvirus para necropsia e histopatología. 4 de los 5 psitácidos estudiados fueron tratados como cuadro de chlamydia, pero no hubo mejoría y a las 24-48 hrs después de presentar el cuadro clínico murieron.

Tabla 3. Psitácidos en los cuales se realizó colección de órganos para necropsia y estudios histopatológicos.

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	PROCEDENCIA	IDENTIFICACIÓN	ESTATUS EN EL PAÍS	SÍGNOS CLÍNICOS	ÓRGANOS COLECTADOS
Perico cachetes amarillos	<i>Amazona autumnalis</i>	Desconocido	Caso 1	Nacional	Disnea, anorexia y diarrea.	Hígado, riñón, cerebro, pulmón
Perico monje	<i>Myopsitta monachus</i>	Villa del carbón	Caso 2	Exótico	Disnea, 3 días antes presento diarrea, incoordinación y parálisis de miembro posterior.	Hígado, riñón, cerebro, intestino, pulmón.
Perico monje	<i>Myopsitta monachus</i>	Toluca	Caso 3	Exótico	Disnea, erizamiento de plumas, diarrea.	Hígado, riñón, cerebro, pulmón.
Perico cachetes amarillos	<i>Amazona autumnalis</i>	Desconocido	AU 35	Nacional	Diarrea, disnea, y muerte súbita. Convivió con un <i>Myopsitta monachus</i> que nunca enfermó, pero si murieron varios psitácidos que estuvieron en contacto con él.	Hígado, cerebro, pulmón, riñón, testículo, adrenales.
Perico monje	<i>Myopsitta monachus</i>	Caso 5	Desconocido	Exótico	Muerte súbita.	Hígado, intestino, cerebro, pulmón, riñón.

6.3.1 Resultados a la necropsia.

Las lesiones más relevantes encontradas en los diferentes órganos fueron fotodocumentadas y se muestran a continuación:

➤ HÍGADO



Figura 8. Hígado con hepatomegalia. El órgano se encontró aumentado de tamaño (hepatomegalia), observando bordes redondeados así como coloración roja negruzca intercalada con áreas de color aparentemente normal. Además se evidenciaron áreas de color amarillo pálido distribuidas en el parénquima (Flechas).

➤ CEREBRO

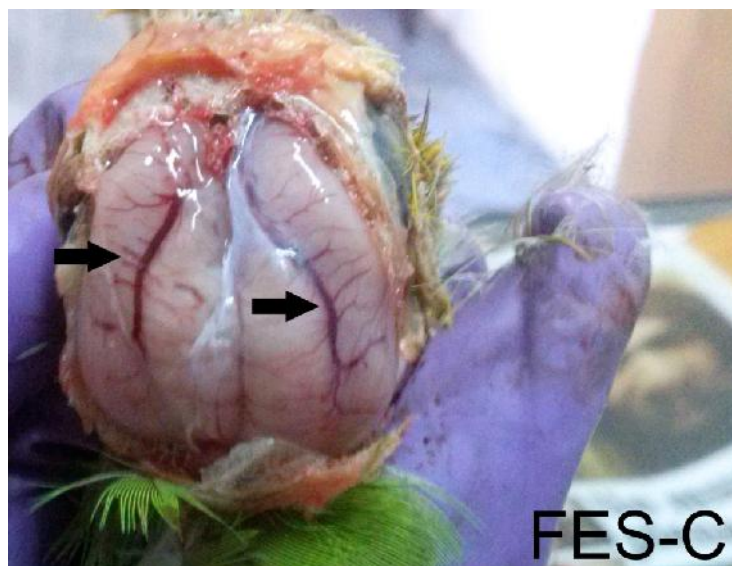


Figura 9. Congestión cerebral. Este órgano se encontró con los vasos sanguíneos muy congestionados y prominentes (Flechas).

➤ RIÑÓN

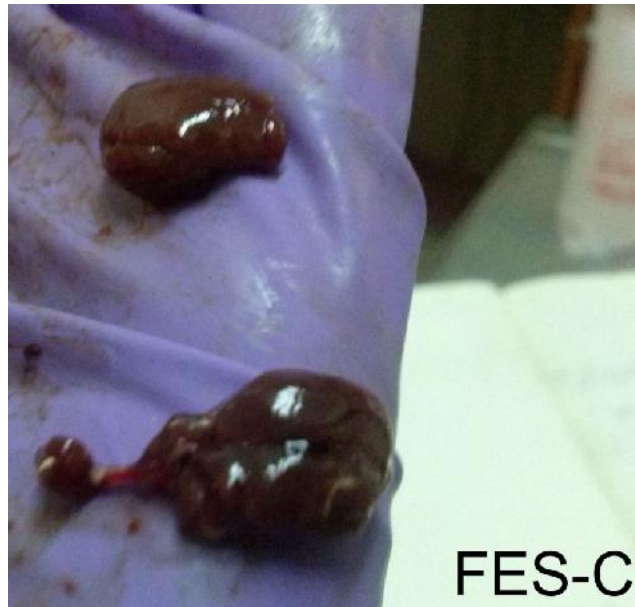


Figura 10. Nefromegalia. Los riñones se observaron con una coloración café obscura intensa, de consistencia blanda al corte y asimétricos entre ellos con bordes redondeados.

6.3.2 Resultados Histopatología

➤ HÍGADO

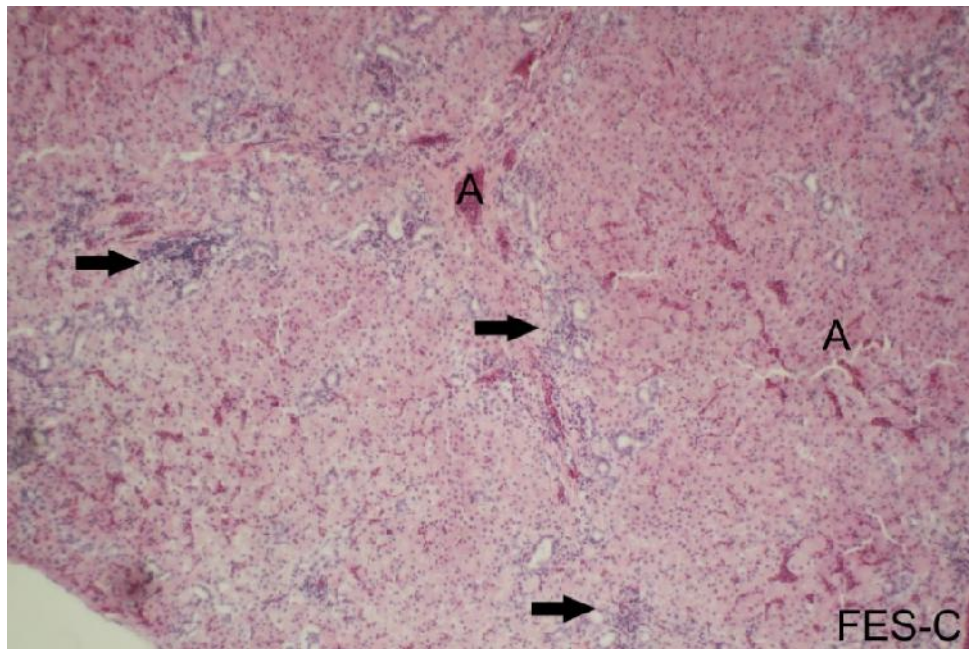


Figura 11. Hígado aumento de 4x. En el hígado fue evidente una congestión difusa (A= congestión), identificada en general en todos los vasos sanguíneos (venas centrales, espacios porta y sinusoides) con presencia de eritrocitos en su luz. Así mismo, se observaron espacios porta, con evidente infiltrado inflamatorio mononuclear difundido en el intersticio perilobulillar (Flechas).

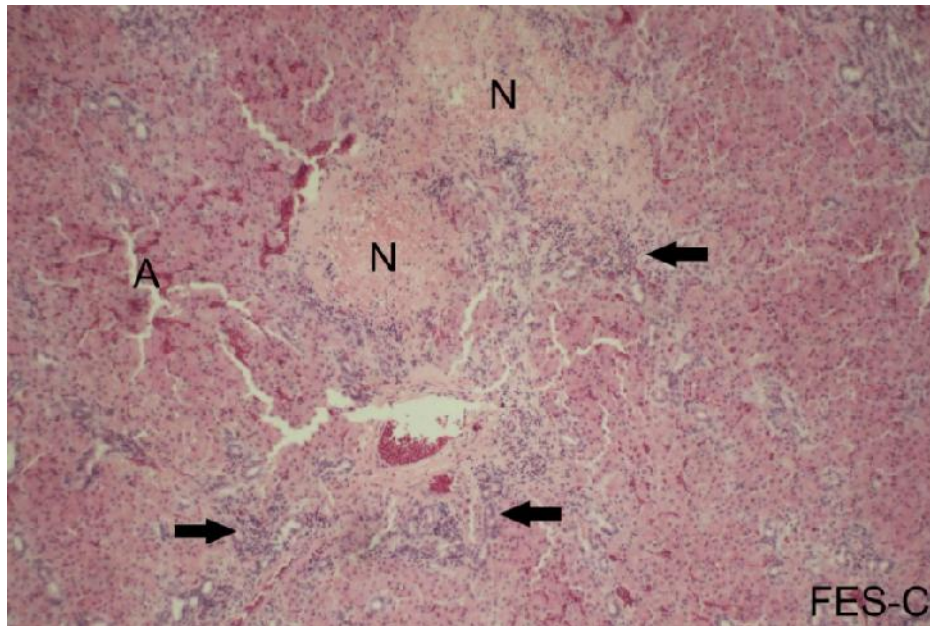


Figura 12. Hígado con necrosis e Infiltrado Mononuclear (IMN) aumento de 4x. En otros campos del corte hepático, se identificaron áreas multifocales de color pálido, que evidenciaron pérdida de la arquitectura y el detalle celular lo que corresponde a una necrosis coagulativa (N), delimitado por un infiltrado inflamatorio mononuclear (Flechas).

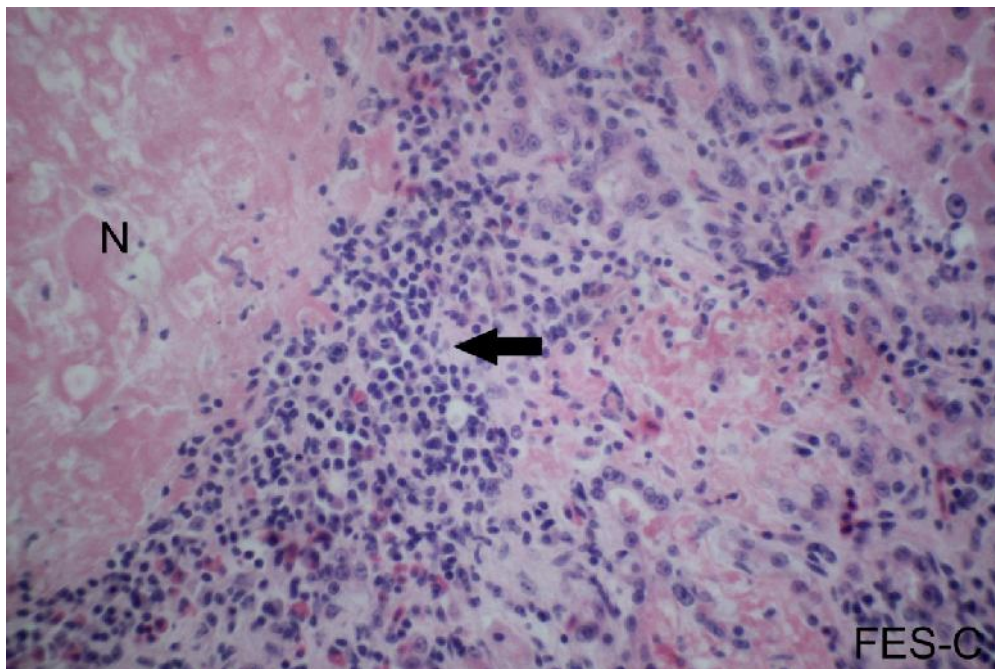


Figura 13. Hígado con necrosis e IMN aumento de 40x. En un acercamiento de las zonas de necrosis coagulativa (N), se observa el infiltrado inflamatorio mononuclear delimitando las áreas de necrosis (Flechas).

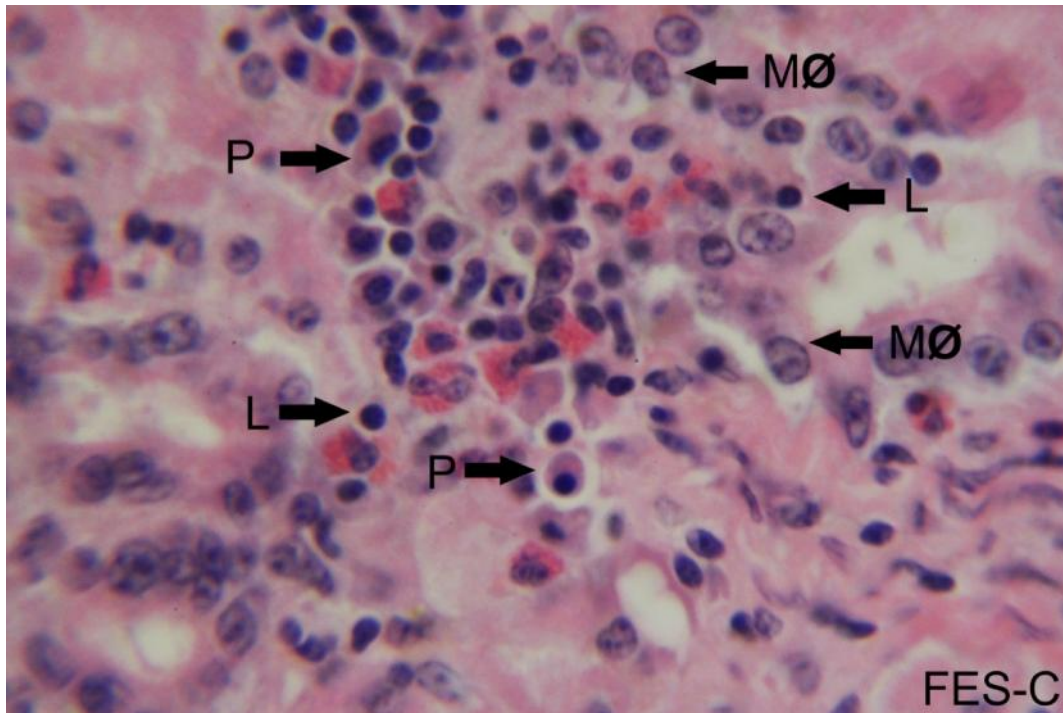


Figura 14. Hígado con IMN aumento de 100x. En la imagen se aprecia sobre el parénquima a nivel intersticial del espacio porta principalmente, infiltrado inflamatorio mononuclear caracterizado por la presencia de linfocitos (L) y células plasmáticas (P) y macrófagos (MØ).

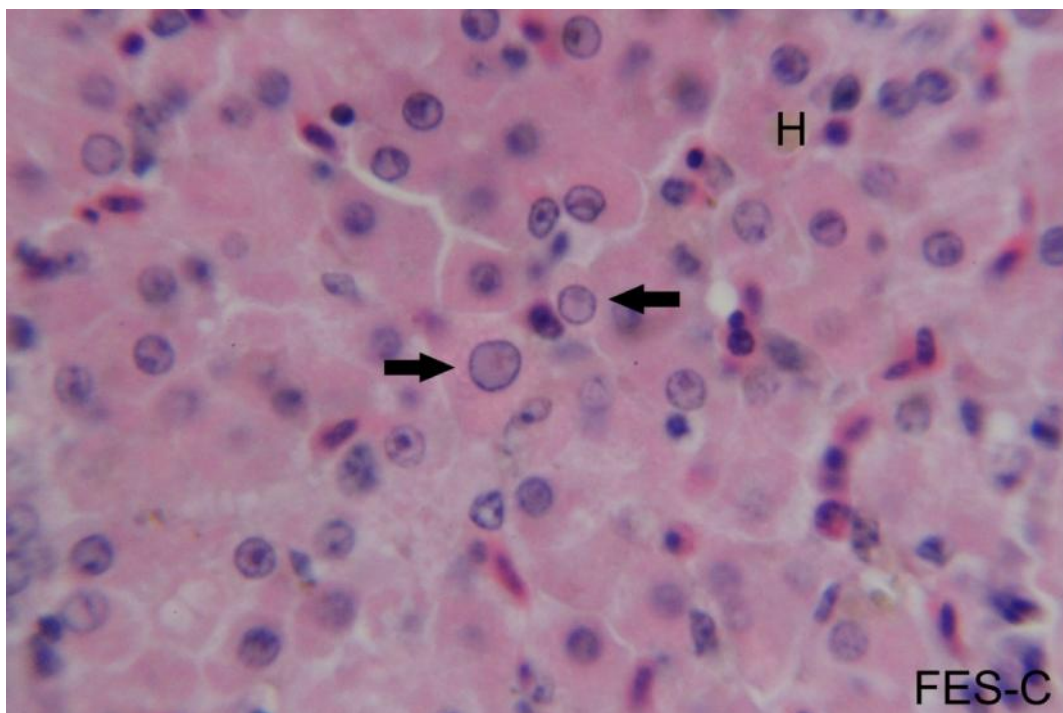


Figura 15. Hígado con cuerpos de inclusión intranucleares y posible hemosiderosis en 100x. En el parénquima hepático se observaron múltiples cuerpos de inclusión (Flechas), que paralelamente mostraron un material café-ocre que pareciera hemosiderina (H) al interior de las células hepáticas en un 80% del corte revisado.

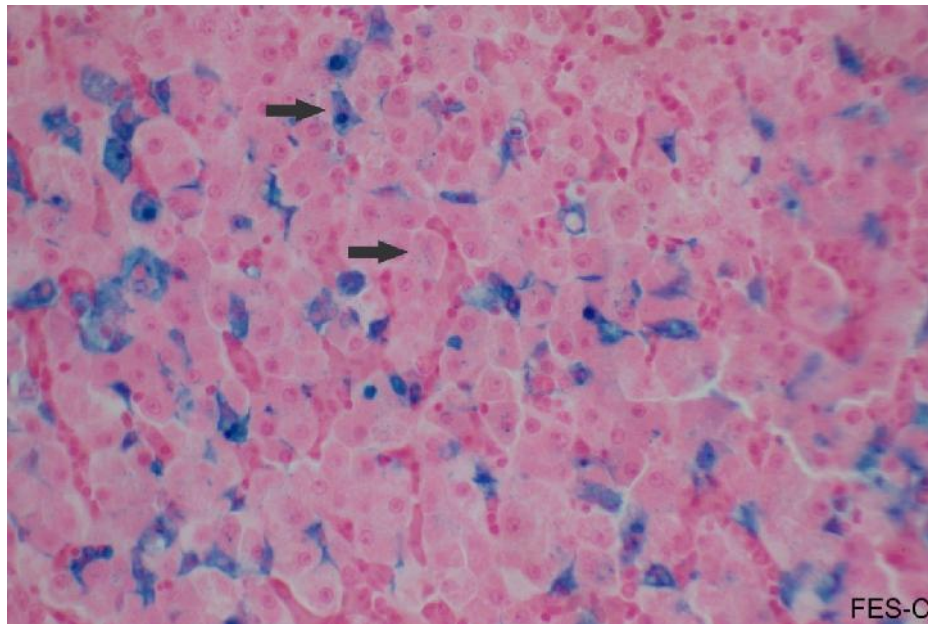


Figura 16. Tinción de Perls, A los órganos sospechosos de hemosiderosis, se les realizó la tinción de Perls en la cual salieron positivos, el material se observa de color azul.

➤ RIÑÓN

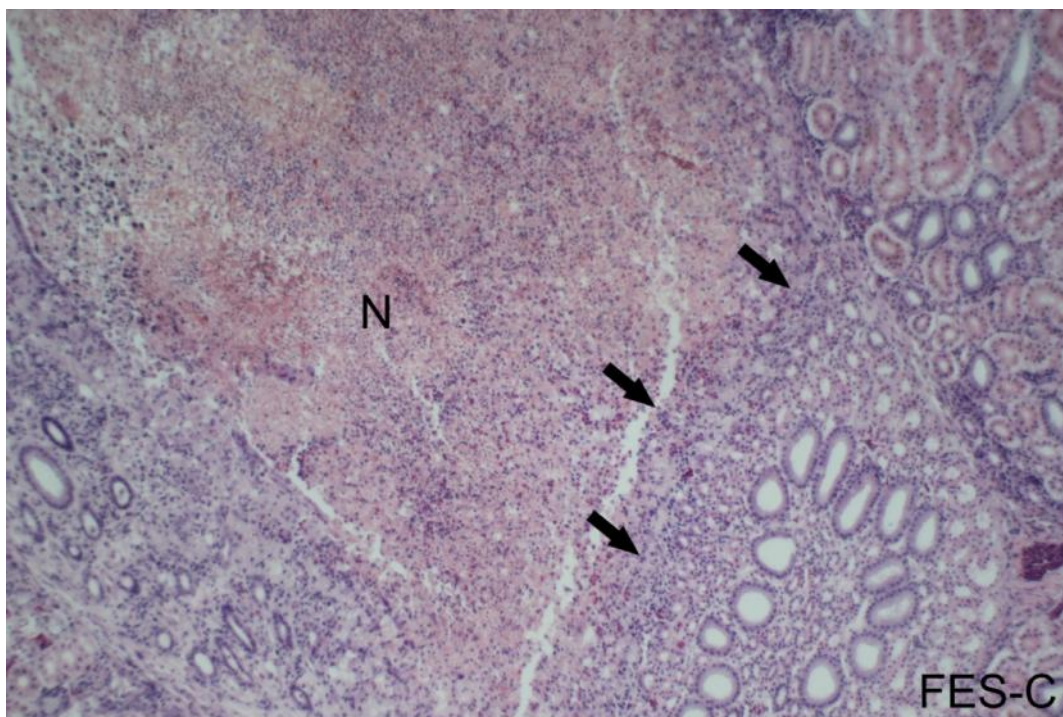


Figura 17. Riñón con necrosis e IMN, aumento de 10x. El parénquima renal evidenció extensas áreas de necrosis coagulativa (N), entre la corteza y la médula. Dichas áreas se caracterizaron por una marcada pérdida de arquitectura y detalle celular, delimitado por células inflamatorias mononucleares (Flechas).

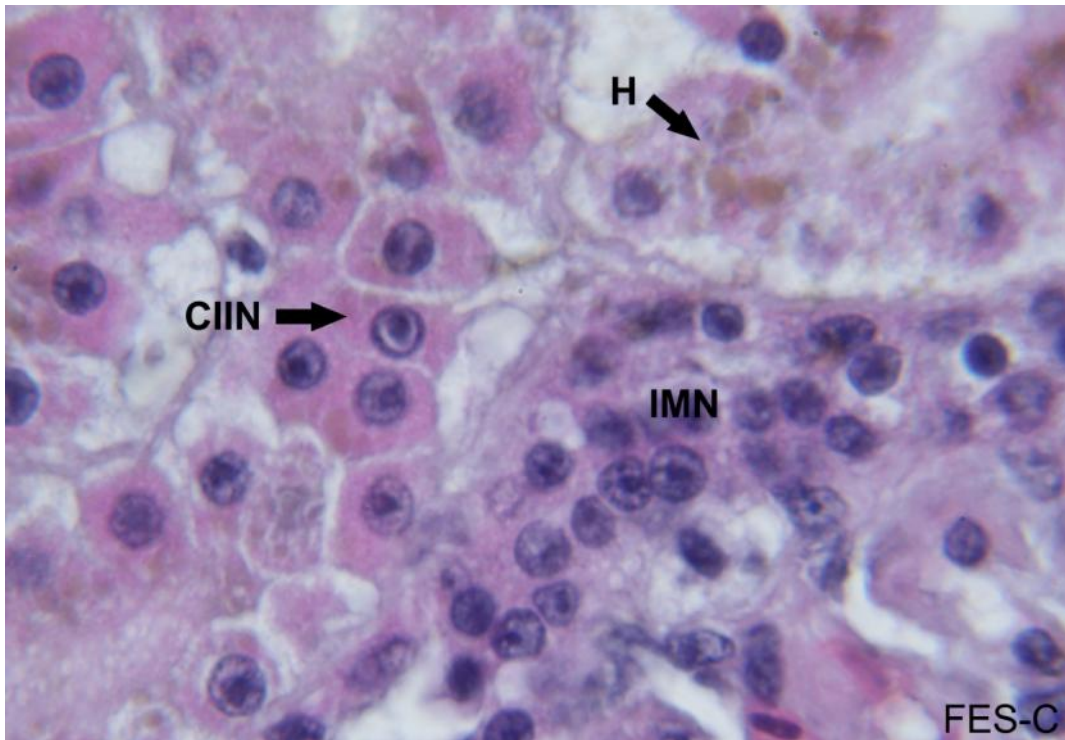


Figura 18. Riñón con IMN y cuerpos de inclusión Intranucleares, 100x. Al detalle en el parénquima renal de la corteza, a nivel del epitelio tubular, se identificó una severa hinchazón celular que da paso a la necrosis coagulativa, en donde se exagera la presencia de núcleos picnóticos y cariólisis, así como cuerpos de inclusión intranucleares (CIIN). Por otra parte, se observa un material café-ocre (H= hemosiderina) en el citoplasma de las células, principalmente de la corteza renal. Paralelamente se aprecia infiltración de células inflamatorias mononucleares (IMN).

➤ CEREBRO

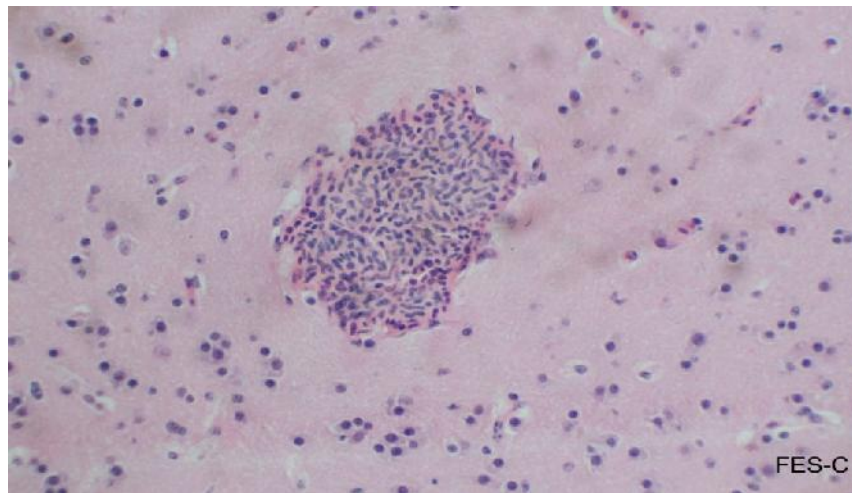


Figura 19. Congestión cerebral en 20x. El sistema nervioso central, se observó marcada congestión vascular y evidente gliosis.

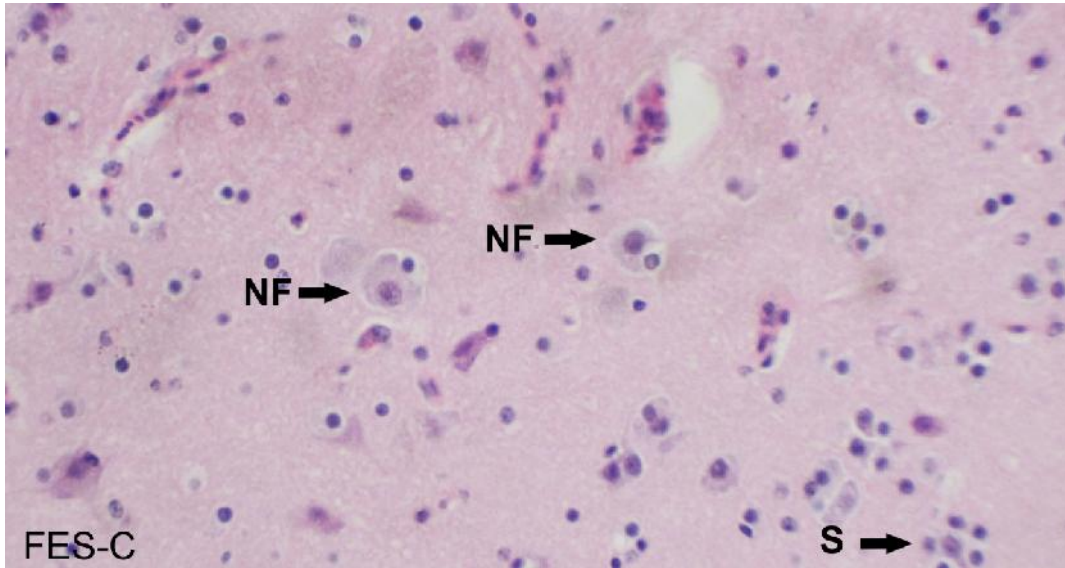


Figura 20. Cerebro con neuronofagia y satélitosis con aumento de 40x. A la revisión de la sustancia gris se observa una evidente neuronofagia (NF), caracterizada por células de la glia fagocitando neuronas e invadiendo el espacio perineural, rodeando a las mismas, satélitosis (S).

➤ PULMÓN

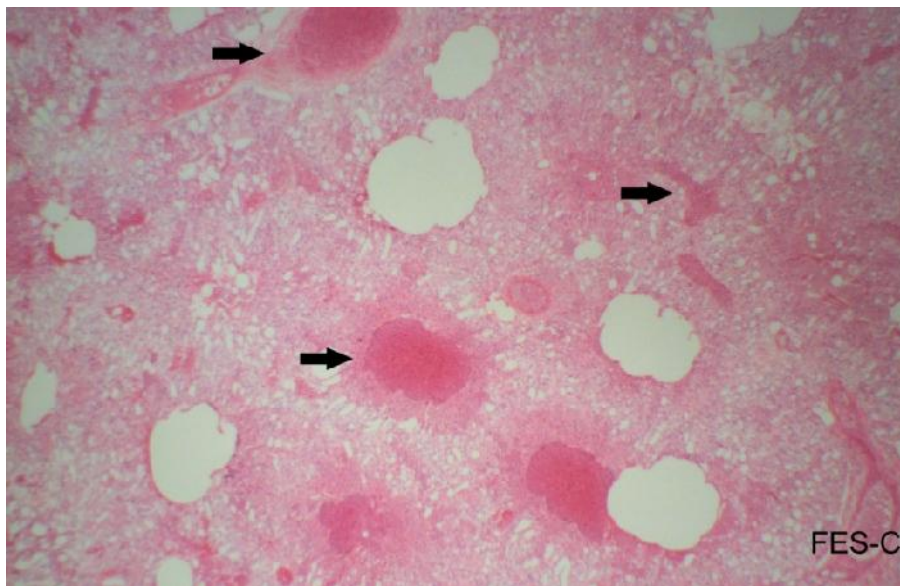


Figura 21. Pulmón congestionado con aumento de 4x. Se observó que la totalidad de los vasos sanguíneos del corte pulmonar presentaron una gran cantidad de eritrocitos en su luz (congestión). En algunos casos señalados con flechas se observan vasos sanguíneos distendidos y pletóricos.

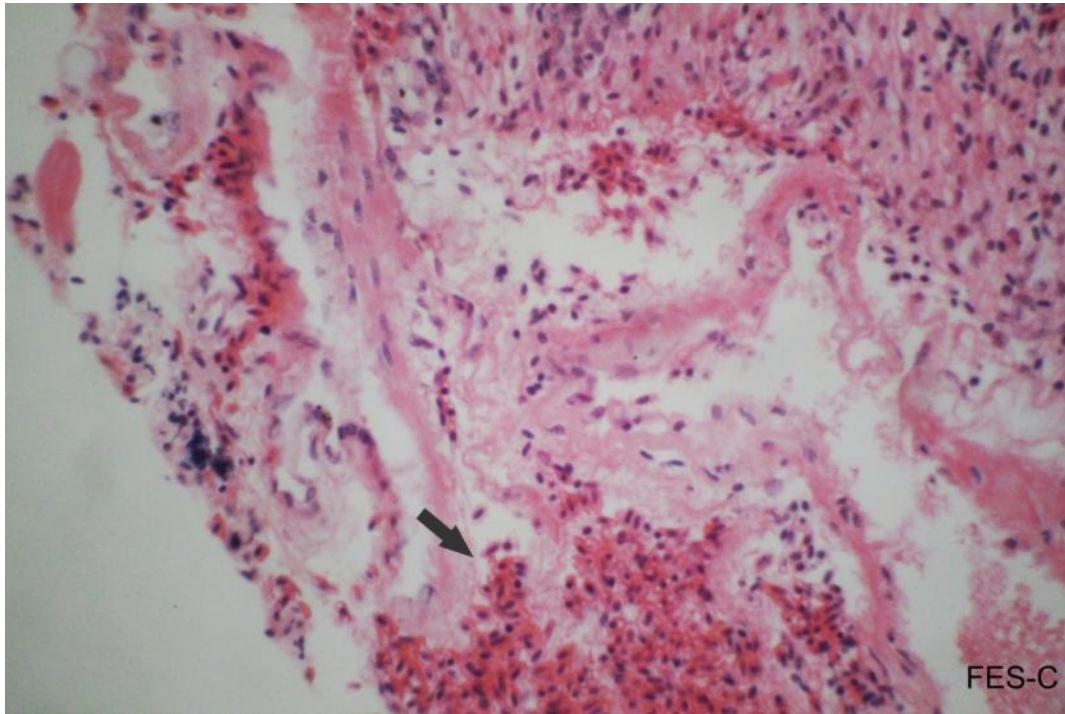


Figura 22. Pulmón hemorrágico con aumento de 10x. A mayor aumento se observaron áreas del parénquima pulmonar, con presencia de eritrocitos fuera de los vasos sanguíneos a nivel intersticial, hemorragia.

➤ INTESTINO

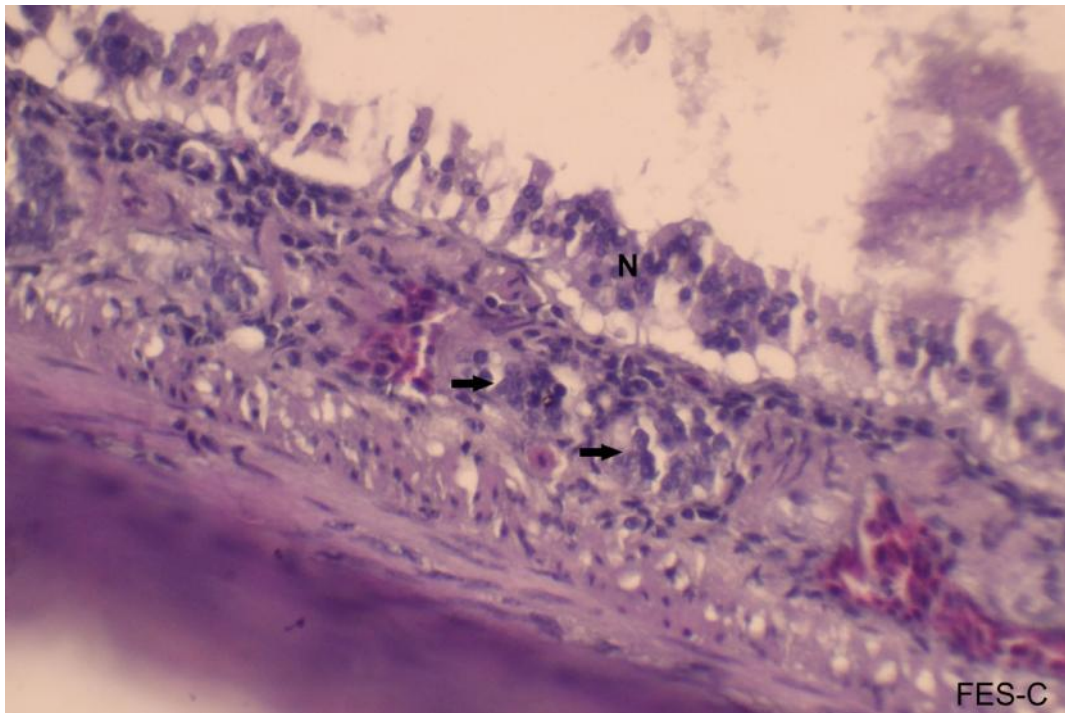


Figura 23. Intestino necrosado en 100x. El intestino desarrollo severa necrosis coagulativa (N) en la totalidad de la mucosa. Así mismo se evidenció la presencia de infiltrados inflamatorios de células mononucleares hacia la membrana basal de la mucosa (Flechas).

Tabla 4. Diagnóstico macroscópico de los casos estudiados.

Dx Morfopatológicos a la Necropsias	CASO 1	CASO 2	CASO 3	AU 35	CASO 5
Hepatomegalia	++	++	++	+++	----
Hepatitis necrótica MF Severa	++	++	++	+++	+
Nefromegalia	+	+	+	+++	----
Congestión Cerebral Difusa Severa	++	+++	+++	+++	+++
Hemorragias Pulmonares difusas de moderadas a severas	+++	++	++	++	+++

Tabla 5. Distribución de lesiones observadas en histopatología.

Dx Morfopatológicos a la Histopatología	hígado	Riñón	Cerebro	Pulmón	Intestino
Infiltrado mononuclear linfocitario de MF a difuso severo	+++	+++	+++	+++	+++
Necrosis Coagulativa multifocal severa	+++	+++	----	----	+++
Cuerpos de inclusión intranucleares	+++	+++	----	----	----
Gliosis, satelitosis y neuronofagia	----	-----	+++	----	-----
Hemorragia	+	+	+	+++	---
Congestión	+++	++	+++	+++	+++
Hemosiderosis	+++	+++	----	-----	-----

+++ Difuso severo

++ Moderado

+ Leve

---- Ausente

MF: Multifocal

7. DISCUSIÓN

La identificación de herpesvirus en psitácidos es complicada debido a que la patogénesis no es del todo clara, además que estos virus tienen la capacidad de persistir en forma latente en los animales que se recuperaron de la enfermedad. El virus en un ave infectada es eliminado principalmente mediante los epitelios respiratorio y digestivo. En México, la falta de información sobre la patogénesis de la infección por herpesvirus es el problema para identificarla. Además se suma que prácticamente los veterinarios no reconocen los cuadros clínicos asociados a la infección, no se realizan estudios sobre el tema, ni tampoco en los laboratorios se tienen disponibles pruebas estandarizadas para su identificación. Esto claramente justificado ya que es considerada una enfermedad exótica. Sin embargo, con la entrada de psitácidos exóticos de forma legal e ilegalmente al país, existe una plena justificación para realizar investigaciones, como el presente trabajo, en relación a los herpesvirus que afectan a los psitácidos.

La detección de los herpesvirus puede orientarse a la identificación de la partícula viral fuera de la célula en fases de infección activa y a la detección de los virus en etapas de latencia. Para establecer el método más idóneo de colección de células en el presente estudio se considero lo descrito en la literatura, como el uso de asas bacteriológicas (Tomaszewski et al. 2006) e hisopos (Gilardi et al. 1995). Sin embargo, para el tipo de aves que conformaron el grupo de estudio en el presente trabajo, las dimensiones de las asas no fueron adecuadas, dañando de forma importante al ave. El uso de hisopos para la colección de heces (infección activa) y raspado del epitelio de la cloaca (infección latente) es un método ampliamente descrito en la literatura (Steiner & Richard 1985; Gilardi et al. 1995), no obstante este método al ser evaluado en las aves del presente estudio en general, no fue adecuado para obtener suficientes células nucleadas y dado que estas aves en su mayoría fueron clínicamente sanas, poniendo en relevancia la importancia de una buena colección de células con núcleo para identificar la infección latente. El uso del cepillo dental con cerdas flexibles no fue tampoco un método adecuado para la obtención de células nucleadas, además, de que generó traumatismo y estrés en el ave, esto aunque en menor grado también sucedió con el uso del hisopo debido a que el diámetro fue grande para aves pequeñas. La obtención de células por enema se ha descrito como un método en el que se puede lograr una gran cantidad de células con un núcleo central (Campbell 2015).

La cloaca tiene un epitelio simple columnar, presencia de tejido linfoide, revestido por un epitelio escamoso estratificado. Las células presentes son células epiteliales con un núcleo posicionado central o excéntrico (Campbell 2015). Como se pudo confirmar en el presente estudio, la obtención de una buena cantidad de células nucleadas, disminución de traumatismos y estrés se logró con la aplicación del método por enema.

Por otro lado los iniciadores diseñados para ser utilizados en la técnica de PCR se unen a una porción del gen UL16, la cual es una región frecuentemente utilizada para la identificación de herpesvirus en psitácidos (Tomaszewski et al. 2003; Tomaszewski et al. 2006; Katoh et al. 2011), adicionalmente en el presente estudio se consideró el que estos iniciadores pudieran unirse al gen UL16 de cualquiera de los 4 genotipos descritos en la literatura. Las PCRs descritas en aves aparentemente enfermas han demostrado buenos resultados en los países donde la enfermedad es reconocida. En el presente estudio considerando que el 90% (45/50) de las aves fueron clínicamente sanas, los resultados fueron satisfactorios ya que se detectaron 9/45 psitácidos con un amplicon del tamaño esperado. El psitácido mayormente identificado como positivo por PCR fue el Perico monje (*Myopsitta monachus*) (5/9) y otras aves en menor proporción fueron *Agaponi spp*, *Aratinga mitrata*, *Ara ararauna* todas ellas aves exóticas, también se identificó 1 ave nacional: *Amazona autumnalis*. Estos resultados en conjunto con los hallazgos histopatológicos exponen la importancia de hacer estudios más amplios para que las autoridades sanitarias del país establezcan leyes que regulen el ingreso de aves importadas para preservar de mejor forma la salud de las aves nacionales.

En los diferentes órganos embebidos en parafina como hígado, cerebro, pulmón y riñón de aves con cuadro clínico asociado a la infección por herpesvirus no se pudo amplificar por PCR en ninguna de las muestras de las 5 aves. Esto podría estar asociado a la fragmentación, modificación de bases y daños oxidativos importantes que suceden en los tejidos fijados con formol, lo que hacen que el material sea de mala calidad, y por otro lado, la cantidad de DNA es afectada dado que el rendimiento es pobre según el método que se utilice para extraer el DNA como se ha descrito en otros estudios (Skage 2007; Paireder et al.).

Es importante mencionar que en otros estudios han mejorado sus protocolos de detección de herpesvirus, cuando aíslan el virus y lo amplifican en sistemas de cultivo celular (Tomaszewski et al. 2003; Tomaszewski et al. 2004; Tomaszewski et al. 2006; Katoh et al. 2011), sin embargo en nuestro caso esto no se pudo realizar ya que partimos que la mayoría de las muestras fueron de animales clínicamente sanos, por lo que obtener ADN y cultivarlo sería muy complicado.

La mayoría de los trabajos han descrito la identificación del genotipo 1 de herpesvirus en psitácidos (Tomaszewski et al. 2003; Tomaszewski et al. 2004; Tomaszewski et al. 2006; Katoh et al. 2010). Sin embargo, aunque en el presente estudio se identificaron 9 aves positivas por PCR, no fue posible determinar el genotipo, para lo cual era necesario secuenciar los productos amplificados y este no fue objetivo del trabajo, aunque si fue posible identificar células cloacales con virus latente.

Otro elemento que permitió reforzar la identificación de herpesvirus en psitácidos del presente estudio fueron los hallazgos macroscópicos encontrando lesiones características en hígado, bazo, riñón e intestino, así como lesiones sugestivas encontradas en cerebro y pulmón.

Las lesiones microscópicas más frecuentemente observadas en el presente trabajo fueron en el 80% de los casos en hígado caracterizadas por un aumento de volumen con bordes redondeados, múltiples focos de coloración amarillenta y el centro color rojo negruzco, lesiones similares han sido descritas en otros estudios (Steiner & Richard 1985; Aguilar et al. 2005). De igual forma las lesiones en riñones (agrandados y de coloración oscura) han sido descritas en otros trabajos (Steiner & Richard 1985; Aguilar et al. 2005).

Un elemento importante entre los hallazgos histopatológicos observados fue la identificación de la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares, entre un 20-30% de las muestras revisadas, principalmente se observaron en hígado y riñón, asociado a un infiltrado mononuclear severo. Dichos hallazgos denotan la fuerte reacción tisular, a la presencia del virus replicándose e infectando los tejidos. (Sanchez-Cordon et al. 2002; Aguilar et al. 2005; Katoh et al. 2010). Diversos estudios realizados en psitácidos afectados por herpesvirus, han descrito que los cuerpos de inclusión intranucleares se generan durante la fase aguda de la infección, son un hallazgo constante en hígado principalmente, aunque también podrían localizarse en riñón, intestino y bazo. En el presente trabajo, solo se encontraron cuerpos de inclusión intranucleares en hígado y riñón, y no así en intestino. No obstante fue evidente una respuesta inflamatoria aguda caracterizada por necrosis coagulativa multifocal severa, asociada a un infiltrado celular inflamatorio mononuclear, altamente sugestivo de infección viral (Godwin et al. 1982; Tsai et al. 1993). En el caso de las lesiones encontradas en riñón, éstas fueron compatibles con lo que han descrito en otros estudios, los cuales mencionan que es posible hallar la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares junto con necrosis coagulativa e infiltrado inflamatorio mononuclear (Gaskin 1989; Katoh et al. 2010).

En cuanto a los hallazgos de lesiones en cerebro, intestino y pulmón, así como múltiples hemorragias asociadas con áreas severas de congestión vascular, como la presencia de infiltrado celular inflamatorio de tipo mononuclear, distribuido de manera difusa con un grado de severidad de moderado a severo dependiendo el órgano, también han sido descritas en la literatura (Aguilar et al. 2005).

Kaleta y Brinkmann (1993) describieron en el intestino una necrosis coagulativa severa, similar a lo observado, en donde el intestino desarrolló una severa necrosis coagulativa difusa de la mucosa, infiltrada por células inflamatorias mononucleares, principalmente hacia la membrana basal ((Kaleta & Brinkmann 1993).

En general los resultados identificados en la histopatología, demuestran una serie de lesiones compatibles con la infección por herpesvirus en diferentes fases de infección en psitácidos.

Aunque la infiltración de células mononucleares encontradas en los tejidos analizados es indicativa de una infección viral, no es concluyente de que la causa sea por herpesvirus. Sin embargo, utilizando la prueba de PCR complemento la certeza de identificación de este virus en algunos psitácidos del estudio. Es importante mencionar que algunas aves fueron tratadas contra *Clamydophila* sin remisión del cuadro clínico. Lo que pone en manifiesto, la importancia de realizar diagnósticos diferenciales considerando otras enfermedades virales que afectan a las aves y algunas enfermedades causadas por bacterias y parásitos.

8. CONCLUSIONES

Se estandarizó el método de obtención de células cloacales a partir de enema.

Se identificó la presencia de herpesvirus en células epiteliales intestinales de psitácidos por PCR.

Con base algunos elementos epidemiológicos, historia clínica, histopatología y PCR, los resultados sugieren fuertemente la presencia de infección de herpesvirus en psitácidos del país.

9. PERSPECTIVAS A FUTURO

Para ampliar el conocimiento sobre la presencia de herpesvirus en psitácidos en el país es necesario ampliar el número de individuos de estudio y orientarlo en aves con cuadro clínico sugestivo de la infección, se debe buscar la estandarización de otras pruebas de PCR en otras regiones genéticas virales, para aumentar la sensibilidad de la prueba y los amplicones obtenidos secuenciarlos para determinar el genotipo viral y corroborar que los productos están relacionados con herpesvirus, esto permitirá entender mejor aspectos epidemiológicos y de patogenia de la enfermedad en cuestión.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar R, Hernández S, Hernández S (2005) Atlas de medicina, terapéutica y patología de animales exóticos, Buenos aires, Argentina.
- Bistyak A, Kecskemeti S, Glavits R et al. (2007) Pacheco's disease in a Hungarian zoo bird population: a case report. *Acta Vet Hung* 55, 213-218.
- Branson W, Narrison GJ, Harrison LR (1994) *Avian Medicine; Principles and application*, Florida.
- Campbell W (2015) *Exótico Animal Hematology and Cytology*. Hardcover.
- Carrasco L, Almendral del R J (2006) *Virus Patógenos*. Hélice, Madrid España.
- Donald PC, D. P (2010) *Manual de Farmacología Veterinaria*. Inter-Médica S.A.I.C.I, Buenos Aires, Argentina.
- Fitzgerald S, Reed M (1995) *Enfermedades virales sistémicas de las aves de mascota*.
- Gaskin JM (1989) Psittacine viral diseases: A Perspective. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 20, 249-250.
- Gilardi KV, Lowenstine LJ, Gilardi JD et al. (1995) A survey for selected viral, chlamydial, and parasitic diseases in wild dusky-headed parakeets (*Aratinga weddellii*) and tui parakeets (*Brotogeris sanctithomae*) in Peru. *J Wildl Dis* 31, 523-528.
- Godwin JS, Jacobson ER, Gaskin JM (1982) Effects of Pacheco's Parrot Disease Virus on Hematologic and Blood Chemistry Values of Quaker Parrots (*Myopsitta monachus*). *The Journal of Zoo Animal Medicine* 13, 127-132.
- Jörundsson E, Lunsden J, H., Jacobson RM (1993) Rapid staining techniques in cytopathology: A review and comparison of modified protocols for hematoxylin and eosin, papanicolaou and romanowsky stains. *Vet Clin Path* 23.
- Kaleta EF (1990) Herpesviruses of birds--a review. *Avian Pathol* 19, 193-211.
- Kaleta EF, Brinkmann BM (1993) An outbreak of Pacheco's parrot disease in a psittacine bird collection and an attempt to control it by vaccination. *Avian Pathology* 22, 785-789.
- Katoh H, Ogawa H, Ohya K et al. (2010) A review of DNA viral infections in psittacine birds. *J Vet Med Sci* 72, 1099-1106.
- Katoh H, Yamada S, Hagino T et al. (2011) Molecular genetic and pathogenic characterization of psittacid herpesvirus type 1 isolated from a captive galah (*Eolophus roseicapillus*) in Japan. *J Vet Med Sci* 73, 1341-1345.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N et al. (2014) *Robbins and cotran pathologic basis of disease*. Elsevier, Health Sciences.
- MacLachlan JN, Duvobi JE (2011) *Fenner's Veterinary Virology*. ELSEVIER.
- Murray EF, Miller RE (1986) *Zoo and Wild Animal Medicine*.
- Norkin C (2010) *Virology Molecular Biology and Pathogenesis*. ASM PRESS, Washington.
- Paireder S, Werner B, Bailer J et al. (2013) Comparison of protocols for DNA extraction from long-term preserved formalin fixed tissues. *Anal Biochem* 439, 152-160.
- Ramírez M. M. E, De Nova OAM, Monzalvo RA et al. (2014) *Manual de prácticas de biología molecular* Instituto Politecnico Nacional México.

- Rodríguez N, Barrios MA (2011) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras técnicas moleculares en el estudio de afecciones dermatológicas. Dermatología Ibero-Americana Online.
- Sanchez-Cordon PJ, Hervás J, Chacon de Lara F et al. (2002) Reovirus infection in psittacine birds (*Psittacus erithacus*): morphologic and immunohistochemical study. *Avian Dis* 46, 485-492.
- Skage M, Schander, C. (2007) DNA from formalin-fixed tissue: extraction or repair? That is the question. *Marine Biology Research* 3, 289-295.
- Steiner J, Richard D (1985) Patología de las aves enjauladas/ temas seleccionados, España.
- Thomas NJ, Hunterd B, Atkinson CT (2007) *Infectious Diseases of Wild Birds*, USA.
- Tomaszewski EK, Gravendyck M, Kaleta EF et al. (2004) Genetic characterization of a herpesvirus isolate from a superb starling (*Lamprolornis superbus*) as a psittacid herpesvirus genotype 1. *Avian Dis* 48, 212-214.
- Tomaszewski EK, Kaleta EF, Phalen DN (2003) Molecular phylogeny of the psittacid herpesviruses causing Pacheco's disease: correlation of genotype with phenotypic expression. *J Virol* 77, 11260-11267.
- Tomaszewski EK, Wigle W, Phalen DN (2006) Tissue distribution of psittacid herpesviruses in latently infected parrots, repeated sampling of latently infected parrots and prevalence of latency in parrots submitted for necropsy. *J Vet Diagn Invest* 18, 536-544.
- Tsai SS, Park JH, Hirai K et al. (1993) Herpesvirus infections in psittacine birds in Japan. *Avian Pathol* 22, 141-156.
- Tull JN, Dorrestein MG (2009) *Handbook of avian Medicine*. EL Sevier.
- http://www.cambri.co/doc/aves/fichatecnica_pacheco.pdf Abril 2015.
- <http://es.dreamstime.com/foto-de-archivo-libre-de-regal%C3%ADas-estructura-del-virus-de-herpes-image27182865>.