



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

01672
13
201

**"PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD
HEMORRAGICA VIRAL
DE LOS CONEJOS (EHVC)"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Maestro en Ciencias Veterinarias
PATOLOGIA A.

PRESENTA
MV JORGE HUMBERTO OSSA
ARISTIZABAL

Asesores: Dr. Armando Mateos Pournian
Dr. Moisés Fraire Cachón
Dr. Ricardo Navarro Fierro
Dra. Rosa Ma. García Escamilla
Dra. Silvia Gómez Estrella

México, D.F.

1990

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

LISTA DE CONTENIDO

| | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| I- INTRODUCCION | 1 |
| II- REVISION BIBLIOGRAFICA | 3 |
| 1. DESCRIPCION | 3 |
| 2. HISTORIA | 3 |
| 3. ETIOLOGIA | 7 |
| 4. EPIDEMIOLOGIA | 10 |
| 5. SIGNIFICADO EN SALUD PUBLICA | 16 |
| 6. SIGNOS CLINICOS | 16 |
| 7. PATOLOGIA | 17 |
| 7.1 Macroscópico | 17 |
| 7.2 Microscópico | 18 |
| 8. DIAGNOSTICO | 20 |
| 8.1 DE CAMPO | 20 |
| 8.2 LABORATORIO | 20 |
| 8.2.1. Envío de muestras | 20 |
| 8.2.2. Bacteriología | 21 |
| 8.2.3. Inmunofluorescencia directa | 21 |
| 8.2.4. Hemoaglutinación | 21 |
| 8.2.5. Inhibición de la hemoaglutinación. | 22 |
| 8.2.6. Hematología | 23 |
| 8.2.7. Método de ELISA | 23 |
| 8.3. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL | 24 |

LISTA DE CONTENIDO

| | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| 9. CONTROL Y PREVENCIÓN | 24 |
| 9.1. CONTROL. Y ERRADICACIÓN | 24 |
| 9.2. PREVENCIÓN | 26 |
| 9.2.1. Medidas de higiene y desinfección | 26 |
| 9.2.1. Vacunación | 28 |
| 9.3. TRATAMIENTO | 29 |
| III- HIPOTESIS | 30 |
| IV- OBJETIVOS | 31 |
| 1. OBJETIVO PRINCIPAL | 31 |
| 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 31 |
| V- MATERIAL Y MÉTODOS | 33 |
| 1. OBTENCIÓN DEL INÓCULO | 34 |
| 2. DISEÑO EXPERIMENTAL | 34 |
| 3. PRUEBAS HEMATOLOGICAS Y DE QUÍMICA SANGUÍNEA | 35 |
| 4. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO | 36 |
| 5. ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA | 36 |
| 6. TÉCNICA DE INMUNOFLORESCENCIA | 37 |
| 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 37 |
| VI RESULTADOS | 38 |
| 1. HEMATOLOGÍA | 38 |

LISTA DE CONTENIDO

| | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| 1.1. Glóbulos blancos | 38 |
| 1.2. Glóbulos rojos | 41 |
| 2. QUIMICA SANGUINEA | 44 |
| 3. UROANALISIS | 47 |
| 4. SIGNOS CLINICOS | 47 |
| 5. CONSTANTES FISIOLÓGICAS | 50 |
| 6. LESIONES ANATOMOPATOLÓGICAS | 53 |
| 6.1. LESIONES MACROSCÓPICAS | 53 |
| 6.1.1. Aparato respiratorio | 53 |
| 6.1.2. Aparato digestivo | 53 |
| 6.2. LESIONES MICROSCÓPICAS | 59 |
| 6.2.1. Organos linfoides | 59 |
| 6.2.2. Aparato digestivo | 59 |
| 6.2.3. Aparato respiratorio | 60 |
| 6.2.4. Aparato urinario | 61 |
| 7. INMUNOFLORESCENCIA | 68 |
| 8. MICROSCOPIA ELECTRONICA | 70 |
| 8.1. TESTIGOS | 70 |
| 8.2. 3 HORAS POST-INOCULACION | 72 |
| 8.3. 9 HORAS POST-INOCULACION | 72 |
| 8.4. 18 HORAS POST-INOCULACION | 73 |
| 8.5. 35 HORAS POST-INOCULACION. CONEJO MUERTO ESPONTANEAMENTE DURANTE EL EXPERIMENTO | 74 |
| VII- DISCUSION | 88 |
| LITERATURA CITADA | 108 |

LISTA DE FIGURAS

| | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| FIGURA 1: RECUEENTO DE LEUCOCITOS Y LINFOCITOS EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C | 39 |
| FIGURA 2: RECUEENTO DE HETEROFILOS Y BANDAS EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C. | 40 |
| FIGURA 3: RECUEENTO DE TROMBOCITOS, CONCENTRACION DE PROTEINAS PLASMATICAS Y FIBRINOGENO EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C. | 42 |
| FIGURA 4: RECUEENTO DE GLOBULOS ROJOS, HEMATOCRITO, NORMOBLASTOS Y CONCENTRACION DE HEMOGLOBINA EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C. | 43 |
| FIGURA 5: CONCENTRACION DE BILIRRUBINA DIRECTA E INDIRECTA, UREA Y CREATININA EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C | 45 |
| FIGURA 6: CONCENTRACION DE A.L.S. Y A.L.T. EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C. | 46 |
| FIGURA 7: RESULTADO DE UROANALISIS EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C. | 48 |
| FIGURA 8: SIGNOS CLINICOS EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C. | 49 |
| FIGURA 9: SIGNOS CLINICOS (CONTINUACION). | 51 |
| FIGURA 10: CURVA DE TEMPERATURA EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C. | 52 |
| FIGURA 11: ALTERACIONES MACROSCOPICAS DEL APARATO RESPIRATORIO EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA EHV.C | 54 |

LISTA DE FIGURAS

| | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| FIGURA 12: ALTERACIONES MACROSCOPICAS DEL APARATO DIGESTIVO | 56 |
| FIGURA 13: ALTERACIONES MACROSCOPICAS DEL APARATO DIGESTIVO (CONTINUACION) | 57 |
| FIGURA 14: ALTERACIONES MACROSCOPICAS EN OTROS ORGANOS | 58 |
| FIGURA 15: LESIONES HISTOPATOLOGICAS EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA F.H.V.C. | 62 |
| FIGURA 16: LESIONES HISTOPATOLOGICAS (CONTINUACION) | 63 |
| FIGURA 17: A: HEPATOCITO DE CONEJO 15 HORAS POST-INOCULACION R: HIGADO DE CONEJO 46 HORAS POST-INOCULACION C: DETALLE DE FOTO ANTERIOR | 64 |
| FIGURA 18: PULMON DE CONEJO 56 HORAS POST-INOCULACION | 65 |
| FIGURA 19: PULMON DE CONEJO MUERTO ESPONTANEAMENTE DURANTE EL EXPERIMENTO 35 HORAS DESPUES DE LA INOCULACION CON EL AGENTE DE LA EHVC | 65 |
| FIGURA 20: RINON DE CONEJO 87 HORAS POST-INOCULACION | 66 |
| FIGURA 21: RINON DE CONEJO 56 HORAS POST-INOCULACION | 66 |
| FIGURA 22: NECROSIS LINFOIDE EN BRAZO DE CONEJO INOCULADO 15 HORAS ANTES CON EL AGENTE DE LA EHVC. | 67 |
| FIGURA 23: ASPECTO NORMAL DE HEPATOCITO DE UN CONEJO TESTIGO | 76 |
| FIGURA 24: CARACTERIZACION DEL NUCLEO DE HEPATOCITO DE CONEJO TESTIGO | 77 |
| FIGURA 25: PARTE DEL CITOPLASMA DE UN HEPATOCITO QUE MUESTRA UN NUCLEO NORMAL EN CONEJO DE 3 HORAS DE INFECCION | 77 |

LISTA DE FIGURAS

| | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| FIGURA 26: PLACAS DE HEPATOCITOS DE CONEJO CON 3 HORAS POST-INFECCION CON CARACTERISTICAS NORMALES | 78 |
| FIGURA 27: DETALLE DE CRESTAS MITOCONDRIALES CON ARREGLOS LAMINARES. CONEJO CON 9 HORAS DE INFECCION. | 79 |
| FIGURA 28: CELULA ITO, CON DILATACION DEL RETICULO ENDOPLASMICO RUGOSO. CONEJO CON 18 HORAS DE INFECCION. | 80 |
| FIGURA 29: DETALLE DEL NUCLEO DE UN HEPATOCITO DE CONEJO CON 18 HORAS POST-INFECCION | 80 |
| FIGURA 30: PANORAMICA DE TEJIDO HEPATICO DE UN CONEJO MUERTO A LAS 35 HORAS POST-INOCULACION CON EL AGENTE DE LA EHVC. | 81 |
| FIGURA 31: HEPATOCITO DE CONEJO MUERTO ESPONTANEAMENTE A LAS 35 HORAS POST-INOCULACION CON EL AGENTE DE LA EHVC. DETALLE NUCLEAR | 82 |
| FIGURA 32: PRINCIPALES SIGNOS CLINICOS EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA EHVC. | 84 |
| FIGURA 33: RESUMEN DE LOS PRINCIPALES RESULTADOS DE HEMATOLOGIA Y QUIMICA SANGUINEA. | 85 |
| FIGURA 34: PRINCIPALES LESIONES MACRO Y MICROSCOPICAS EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA EHVC. | 86 |
| FIGURA 35: PRINCIPALES RESULTADOS DE INMUNOFLOURESCENCIA Y MICROSCOPIA ELECTRONICA. | 87 |
| FIGURA 36: POSIBLE PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD HEMORRAGICA VIRAL DE LOS CONEJOS (EHVC). | 107 |

LISTA DE CUADROS

Página

**CUADRO 1: RESULTADOS DE INMUNOFLUORESCENCIA EN
ORGANOS DE CONEJOS INOCULADOS EXPERI-
MENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA EHVC**

69

I- INTRODUCCION

La cunicultura es una actividad que ha logrado gran desarrollo en los países europeos, mientras que en México se inicia como actividad de importancia.

En países como Francia, España, Italia y Suiza, la carne de conejo ocupa un lugar importante en la alimentación del hombre, independientemente de la utilización de su piel y el pelo como materias primas. El consumo anual per cápita de carne de conejo en Francia es de 6.1 Kg., en España 1.8 Kg., Italia y Suiza 1.2 Kg., Estados Unidos 0.9 Kg, Gran Bretaña 0.1 Kg., mientras que en México es apenas de 0.06 Kg.⁹⁸.

En México, donde la alimentación es un factor cada vez más importante debido al incremento de la población, la cunicultura tiene un buen porvenir; además ofrece perspectivas como fuente de trabajo y nuevos ingresos al campesino ya que es una especie de fácil explotación a muy bajo costo⁹⁸.

La cunicultura es una ganadería eminentemente artesanal, encontrándose dispersa en pequeñas explotaciones con espacios reducidos, manejo sencillo y alimentación con esquilmos agrícolas y poco concentrado, cuando se le compara con otras

especies productivas³⁸.

Durante la década de los setentas con el programa de fomento a la cunicultura, se observó un crecimiento substancial tanto en el número de animales para pie de cría, como en la producción de carne. En 1972 existían en el país 113.452 conejos y se produjeron 353.658 Ton. de carne; para 1983 el número de conejos ascendió a 1'158.625 y la producción de carne fué de 3'221.000 Tons⁴⁵.

La cunicultura ha afrontado muchos problemas, como lo son un pobre mejoramiento genético, bajo nivel nutricional o problemas en la comercialización, este último en parte resultantes de la falta de asociaciones de cunicultores. La introducción en 1988 de la "Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC)", enfermedad exótica que ocasiona grandes pérdidas económicas por el alto índice de morbilidad y mortalidad puso en peligro la endeble infraestructura de la ganadería cunícola del país.

Por la trascendencia de esta enfermedad, se decidió reproducirla experimentalmente inoculando por vía aerógena filtrado de órganos de conejos muertos durante el brote surgido en México y describir la patogenia del síndrome. Se espera que los resultados obtenidos permitirán entender mejor el comportamiento de la enfermedad, para apoyar la subsecuente toma de decisiones a nivel nacional.

II- REVISION BIBLIOGRAFICA

1- DESCRIPCION

La Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC), es una enfermedad de origen viral^{22,72}, aguda, altamente infecciosa y contagiosa de período de incubación corto y de rápida transmisión, caracterizada por su alta morbilidad y mortalidad.

Afecta a los conejos domésticos y en algunos países a los silvestres, mayores de dos meses, caracterizándose en la mayoría de los casos por muerte súbita y cuando se observan signos estos son: fiebre, secreción nasal sanguinolenta, chillidos, opistótonos y disnea^{4,15,16,17,19,20,21,23,24,54,64,72,88}.

2- HISTORIA

La enfermedad fue descrita por primera vez en China por Lui y col., como un proceso agudo. Se presentó durante la primavera y verano de 1984^{10,20}, en las provincias chinas de Jiangsu^{14,72,80} y Beijing¹⁴, de curso agudo y febril, con alta morbilidad y mortalidad. Se extendió a otras regiones del mismo país, provocando la muerte de 470000 conejos⁵². Se describió con varios nombres: La Plaga del Conejo (Cheng y Zeng 1986), Septicemia Viral del Conejo (Sheng y col. 1985), Neumonía Hemorrágica de los Conejos (RNHD) (Liu y col. 1984, Xu F.N. y col. 1985, Xu, Z.J. y Chen 1988⁸⁸). El brote se

asoció a la importación de un grupo de conejos de Angora, procedentes de Alemania Federal^{62, 68, 87}

Seguido se extendió a Corea por la importación de pelo de conejo y se le denominó: "Muerte Virica Súbita del Conejo", por los investigadores de la Universidad de Kiung-Pook^{3,4}

Durante el IV Congreso Mundial de Ciencias Cunicolas en Budapest (1988)^{10, 20}, se informó inicialmente de la aparición de la enfermedad en los países del Este de Europa (Rusia, Checoslovaquia, Rumania, Polonia, Hungría y Alemania Oriental), posteriormente en otros países como Francia, Italia, Portugal, España, Suiza, Austria y Alemania Occidental^{10, 52, 58, 64}, y en la reunión del Office International des Epizooties (O.I.E.), realizado en París en noviembre de 1989, se le denominó "Enfermedad Hemorrágica Viral de los Lagomorfos"⁶⁶, debido a la semejanza entre la EHVC y el Síndrome de la Liebre Parda (SLP).

En Francia se observaron los primeros focos en la parte Este del país desde julio y agosto de 1988; después de exámenes en la Estación Experimental de Plufragen, se eliminó la hipótesis de un origen tóxico por pesticidas^{62, 69} llamándosele "Septicemia Hemorrágica de los Conejos"^{21, 62, 68}

A principios de 1988 se informó del padecimiento en Italia encontrándose alta mortalidad en conejos de explotaciones rurales en las provincias de Lombardie, Piemont, Liguria,

Emilia, Rongne, Abruzzi, Molise, Basilient y Sicilia²⁷, y los investigadores del Instituto Zooprofiláctico de Lombardia, trabajaron en la causa del mal, pensando inicialmente en intoxicación alimenticia, hablándose después de una enfermedad viral la cual se denominó: "Enfermedad X"^{3,4,15,21,27,48,68} Algunos autores¹⁹ refieren que la enfermedad en Italia se presentó desde 1986 como un problema de alta mortalidad en especies silvestres, que coincidía con otros brotes en Europa Central afectando liebres (Síndrome de la Liebre Parda), de donde se cree se transmitió al conejo, y se pensó en la posibilidad de un vector activo o pasivo entre los leporidos salvajes y los rurales^{52,53} Esta enfermedad ha ocasionado la muerte de 32'000.000 de animales en Italia⁶.

Los investigadores Pages y col.⁶⁸, indican que la enfermedad entró a la Península Ibérica a principios de 1988; la enfermedad entró a España proveniente de canales importadas de Alemania Federal⁴, denominándose "Enfermedad Virica Hemorrágica del Conejo"^{3,6}, afectando pequeñas explotaciones en las provincias de León, Asturias, Lérica, Valencia y Murcia. La prensa catalogó estos brotes a pesar de ser pequeños como catástrofe nacional, además de señalar que la enfermedad era transmisible al hombre lo que provocó la caída de la demanda de carne^{6,92,94}. Las explotaciones minifundistas fueron las más afectadas sobre todo en la zona oriental de Asturias, luego se extendió a 14 provincias más, sin afectarse los grandes centros de producción⁴, también se

informó de infección en conejos de monte.

En 1988, Suíza informó del brote denominándosele "Hepatitis Necrótica de los Conejos" y se asoció a la importación de conejos de China¹⁹. Simultáneamente en Checoslovaquia se informó de un brote de la Peste de los Conejos¹⁹.

Durante los meses de diciembre de 1988 y enero de 1989 se presentó una enfermedad similar en diferentes estados de la República Mexicana, caracterizándose por alta morbilidad y mortalidad. Inicialmente se informó de la muerte de 2.600 conejos en Ecatepec, Estado de México⁷⁹. En febrero de 1989 se habían detectado focos en los estados de México, Morelos, Hidalgo, Michoacán, Puebla, San Luis Potosí, Tlaxcala, Jalisco, Guanajuato y el Distrito Federal^{17,15}. Su introducción se debió a la importación de canales de conejo provenientes de China¹⁹. Los nombres que inicialmente recibió fue: "Síndrome Neumo-hepático de los Conejos", "Enfermedad X" ó "Hepatitis Necrótica de los Conejos"²⁴, posteriormente se encontró que coincidía con los signos descritos por los investigadores Chinos^{87,88}, por lo que se decidió llamarla "Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos" (EHVC)¹⁶. Hasta el mes de mayo de 1990 habían muerto 65,420 conejos y 111,728 habían sido sacrificados⁵⁰. Hasta el momento ningún otro país americano ha informado de esta enfermedad²⁰.

3- ETIOLOGIA

Inicialmente en México, la enfermedad se asoció a una infección causada por *Pasteurella multocida* tipo A y *Pasteurella haemolytica* de alta patogenicidad aisladas de pulmón e hígado. Sin embargo al vacunar contra *Pasteurella multocida*, los animales continuaban muriendo aún cuando las lesiones pulmonares no se presentaron, lo que indicaba que en el problema había interacción entre el agente causal y las bacterias. Otros autores también aislaron las mismas bacterias^{16, 18}. En los estudios de microscopía electrónica se observaron diferentes partículas esféricas de diferente tamaño compatibles con picornavirus^{9B}. Al realizarse cultivos primarios en riñón de conejo se observó vacuolización y aglomeraciones anormales en el citoplasma, aunque no se pudo tipificar el agente. Otros autores¹⁶, asocian la enfermedad con un lepopoxvirus, serológicamente diferente al virus de la mixomatosis. En estudios realizados por la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (C.P.A.), se han mostrado partículas de 35 nm, de forma icosaédrica, compatibles con parvovirus, pero como en los casos anteriores no se ha podido caracterizar el virus por medio de cultivos¹⁹. Los investigadores chinos son los que más han trabajado con este agente desde 1984, estudiándose el virus en sangre y varios tejidos, en los cuales han observado que no tiene cápsula, que es de forma esférica, con diámetro

medio de 30 nm. (28-42 nm); contiene RNA de cadena simple, la capsida es icosaédrica conteniendo 32 capsómeros cilíndricos, con peso molecular de 26×10^6 u., clasificándolo como miembro de la familia picornaviridae, aunque su morfología, sus componentes químicos y su replicación en el citoplasma no concuerdan totalmente con otros picornavirus⁸⁸. Xu^{21,22} en Verona, mencionó que se trataba de un parvovirus de DNA monocadenado más sensible a altas temperaturas y que actúa sobre el núcleo de las células. Xu, W.⁸⁷, informó que el virus era sensible a la DNA-asa y resistente a la RNA-asa; positivo a la difenilalanina, y concluye que se trata de un virus DNA de cadenas simples parecido al parvovirus. Gregg y col.^{39,40,41}, mencionan que el estudio de microscopía electrónica de homogenizado de hígado, reveló numerosas partículas virales poligonales de 28 nm. encontradas en el núcleo asociadas con cuerpos de inclusión, sugiriéndose la etiología a un parvovirus y las características antigénicas del virus están relacionadas al parvovirus porcino y de ratón.

Inicialmente en Europa el brote se diagnosticó como un problema de origen tóxico^{27,54}, por pesticidas y herbicidas debido a las lesiones observadas en tejido hepático y renal, pero los resultados fueron negativos para la prueba de inhibición de la colinesterasa en tejido nervioso^{21,69}. Otros diagnósticos presuntivos fueron las de enterotoxemias, aunque el macerado de órganos de animales infectados, al ser

Inculados por diferentes vías reproducían los síntomas y al ser observados los tejidos al microscopio electrónico se encontraron partículas parecidas a parvovirus, sin poder descartar completamente a los picornavirus y calicivirus^{21, 60}.

Argüello y col.^{3,4}, informaron de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en células hepáticas y de pulmón que por su morfología ultraestructural podrían pertenecer a la familia picornaviridae o parvoviridae, sin embargo otros autores, los señalan como "parvovirus-like"^{6, 54}. Se piensa que por sus características ultraestructurales como es el polimorfismo de los virones, la ausencia de envoltura y sus depresiones en la superficie en forma de cúpula podría clasificarse como calicivirus, o virus herpes asociado^{68, 69}.

Ohlinger y col.⁶⁷, indican que el virus está formado por una proteína simple, de peso molecular entre 57 KDa a 60 KDa, similar al calicivirus felino. Marcató y col.⁵⁸ han encontrado cambios ultraestructurales e histopatológicos similares al del virus no A/ no B, de la hepatitis viral en humanos, por lo que llamaron a la enfermedad "Hepatitis Necrótica Infecciosa del Conejo", observándose agregados de partículas granulares en los núcleos de hígado semejantes al reforzamiento de cromatina y proteínas inducido por este virus (hepadnavirus) en los hepatocitos de humanos. Osterhaus y col., informaron que el agente es un "coronavirus-like"⁶⁸;

Pringet y col.⁷¹, lo catalogaron como un Astrovirus.

El agente causal de la EHVC, aglutina eritrocitos de ovinos, pollo y todos los tipos de sangre de humano principalmente el de tipo "O", por lo que la prueba de inhibición de la hemoaglutinación ha sido utilizada para la determinación de anticuerpos. El agente no aglutina eritrocitos de caballo, mula, burros, bovinos, patos, codornices, perros, cerdos, conejos, gansos, cobayo, ratones, ratas y otros roedores^{9,21,64,72}

No han sido exitosos hasta el momento los métodos de cultivo celular, aunque algunos autores^{72,86,88}, indican la replicación en cultivos de células de riñón de conejo lactante y en líneas celulares diploides como Rk-13 y HEP-2. La infectividad viral no se reduce con tratamiento con eter a pH. 3.0, pero si se inactiva con hidróxido de sodio al 1%, formaldehído al 0.4% a temperatura de 4°C a 37°C y β -propiolactona a 4°C; se ha demostrado que algunos desinfectantes como el formol eliminan la infectividad pero no la inmunogenicidad⁸⁸

4- EPIDEMIOLOGIA

El período de incubación de esta enfermedad es corto, de 20 a 48 horas^{6,19,20,88}. En los animales la morbilidad es del 70 a 90%, y mortalidad hasta el 100 % en forma natural^{6,19,21}. En algunos brotes se han observado picos de

mortalidad 2 a 3 días posteriores a la introducción de la enfermedad, iniciándose con un curso agudo y muerte a las 72 horas y un segundo pico de los 7 a 13 días posteriores a la infección, por lo que se habla de una mortalidad difásica^{16,17,24,88}. En conejares con ventilación dinámica horizontal se informa de mayor mortalidad⁴⁸.

La enfermedad se transmite con mayor frecuencia entre explotaciones de tipo rústico donde las condiciones sanitarias son deficientes y donde los animales sufren de otros padecimientos virales, bacterianos y parasitarios en forma subclínica o estos agentes se encuentran latentes, por lo que es común que la EHVC se asocie con bacterias como son *Pasteurella*^{17,18,68}. En las granjas de tipo comercial con buen manejo sanitario la morbilidad y mortalidad son generalmente menores^{3,4,6,19,20,48,68}.

La transmisión experimental se ha realizado por inoculación intramuscular, subcutánea, respiratoria y alimenticia de homogeneizado de órganos de animales infectados^{3,4,12,14}. La transmisión natural mas importante es por contacto directo^{4,19,68}. En estudios realizados en México se observó una infección más alta entre conejos asinados en piso, mientras que en conejos en jaula era rara su transmisión; también la dirección del aire puede ser un factor importante en la transmisión (comunicación personal del Dr. Juan Gay). Igualmente se infectan por medio de

heridas en piel^{9,4,14,21}. Se ha logrado la transmisión por fómites como son agua de bebida, heces, utensilios infectados con secreciones y excreciones (orina y saliva)^{14,16,21,87,88}. Los insectos no parecen ser vectores importantes²¹; en Corea se presentó la enfermedad por la compra de lana de conejos enfermos⁸⁷. En Europa se considera que la liebre es reservorio natural y vector responsable de la difusión del virus de la EHVC debido a la infección cruzada entre liebres y conejos⁵⁹. En México el hombre fue un medio de transmisión mecánico de la enfermedad, por medio de la manipulación y contacto de objetos personales con canales contaminadas, ayudando así a la diseminación de la enfermedad.

La EHVC afecta principalmente a conejos mayores de dos meses, hembras gestantes y lactantes; es rara la infección en gazapos menores de dos meses y no se han informado casos de afección natural en los menores de un mes^{6,14,21,29,24,27,69,68,72,87}. Algunos trabajos indican que los lactantes de 3 semanas son susceptibles a la infección, pero la mortalidad se manifiesta hasta la cuarta semana⁶⁹, o que pueden tener una evolución crónica y ser capaces de eliminar el virus sin mostrar signos clínicos de la EHVC⁶⁰. Algunos autores indican que los machos castrados no se afectan⁸⁷, pero los estudios realizados por Saldivar y col.⁷⁷, muestran que son igualmente susceptibles. Tampoco existe predisposición de raza o sexo y las únicas especies afectadas son las liebres y los conejos^{10,69,87}; hasta el

momento no se ha informado de efectos teratológicos, embriológicos ni malformaciones en recién nacidos⁴⁸.

Los conejos domésticos (*Oryctolagus cuniculi*) son los más susceptibles^{60, 74}, aunque en los países europeos se afectaron tanto conejos silvestres como domésticos^{21, 60}; en Italia se presentó primero en liebres (Síndrome de la Liebre Parda), con alta morbilidad y mortalidad semejante a la EHVC⁵⁸. En España se afectaron primero los conejos de monte y posteriormente los conejos domésticos de explotaciones rústicas. Al afectarse la fauna silvestre en Europa se alteró el ciclo alimenticio de otros animales como fueron el linco y el aguilá, especies que se alimentan de conejos³⁴.

Los conejos silvestres en Méxicó como son los teporingos (*Romerolagus diazi*), y los del género *sylvilagus*, son resistentes al ponerse en contacto con animales infectados con la EHVC^{19, 20, 31}.

Estudios realizados por Gay y col.³⁶ y Maldonado y col.⁵⁷, mostraron que conejos susceptibles en contacto con animales que sobrevivieron dos meses antes a la enfermedad, los susceptibles no enferman. En los sobrevivientes fueron disminuyendo los títulos de anticuerpos y cinco meses después, al colocarlos con animales enfermos, no presentaron sintomatología, mientras que animales susceptibles morían. Otros autores indican la existencia de portadores de la enfermedad^{22, 30}.

Existe predisposición de carácter estacional, presentándose con mayor virulencia en primavera y otoño²⁴, los investigadores chinos indican que la presentación es más severa de enero a marzo y de agosto a octubre, siendo menor en abril y mayo, concluyendo que el virus sobrevive asociado a la temperatura del ambiente^{14, 88}, aunque en algunos países como Italia es endémica²⁷.

En México se recibió un reporte en el mes de enero de 1988, de alta mortalidad de conejos en el municipio de Ecatepec, Estado de México, procediéndose a realizar una investigación de campo por parte del SINESA (Sistema Nacional de Emergencia en Salud Animal), a la vez se contactó a otras instituciones educativas, gubernamentales, laboratorios oficiales y privados, encontrándose que había un grave problema en conejos del Valle de México y que data desde diciembre de 1988. La signología, lesiones y mortalidad indicaban un problema en común y no casos aislados como se consideró en un principio. Después de realizar el estudio retrospectivo se propuso el siguiente esquema epidemiológico⁷⁰:

-10. Noviembre: introducción a México de canales de conejo provenientes de China, a través de un embarque IN BOND de los Estados- Unidos.

-26 Noviembre: llegada de las canales a una bodega de acopio

de una tienda de autoservicio en Cuautitlán, Estado de México.

-6 de diciembre: entrada de un empleado de la granja " El Marfil", de Actopan Hidalgo a la bodega de acopio y la manipulación de las canales provenientes de China, retornando a la granja.

-10 de diciembre: visita a la Granja "El Marfil", de un comprador de conejos de desecho.

-12 de diciembre: muerte masiva de conejos en la granja " El Marfil".

-13 - 14 de diciembre: visita del comprador de conejos de desecho a la Unidad de cunicultura de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán (FES-C), Estado de México.

-18 - 19 de diciembre: elevada mortalidad de conejos en la granja cunícola de FES-CUAUTITLAN, Estado de México.

Posteriormente de FES CUAUTITLAN se diseminó por venta de canales a otras regiones como fueron: Ecatepec (foco índice), Chapingo, Chalco y el Distrito Federal.

La mayor difusión del problema se presentó en febrero de 1989, abarcando los Estados de Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala y el Distrito Federal⁸⁶.

5- SIGNIFICADO EN SALUD PUBLICA

Por tratarse de un problema con características virémicas, no deben aprovecharse las canales de animales muertos para el consumo humano, aunque el agente no es transmisible al hombre ^{6,19,20,21,24,62,68,86}.

6- SIGNOS CLINICOS

Xu y col. ⁸⁶ y Chao y col. ²⁹, describen tres formas clínicas:

1- SOBREGUDA. Cuando la enfermedad ha sido introducida por primera vez, presentándose muertes sin signología dentro de las primeras doce horas, el único signo aparente es la hipotermia de 41°C entre las 6 y 8 horas.

2- AGUDA. Postración y apatía, pelo sin brillo y áspero, fiebre de 41°C , polidipsia, disnea y muerte entre 12 a 36 horas; los animales se postran en decúbito lateral y presentan movimientos de pedaleo, durante la agonía se observa cianosis y material sanguinolento y espumoso por los hollares y boca.

En los dos cuadros clínicos anteriores se puede observar relajamiento de esfínteres con salida de heces que permanecen pegadas al ano, con mucosidad blanquecina y las conejas gestantes pueden abortar.

3- SUBAGUDO. Se presenta con mayor frecuencia en casos experimentales de las 30 a 38 horas posteriores a la

inoculación del homogenizado de órganos, observándose abatimiento, anorexia y posteriormente muerte a los dos o tres días, aunque algunos animales pueden sobrevivir.

En México los signos clínicos fueron clasificados como cuadros sobreagudo y agudo, ya que el cuadro clínico duraba generalmente menos de los tres días. La forma sobreaguda con periodo de incubación de 12 horas; observándose postración con excitación y chillidos, insuficiencia respiratoria con hemorragias nasales, congestión en las orejas, labios y conjuntiva^{6, 10, 20, 24, 27, 48, 70}. Esta signología se presentó con mayor frecuencia en animales de explotaciones de traspatio^{63, 64}.

Experimentalmente se observó la forma aguda con fiebre de 41°C entre las 18 a 24 y las 36 y 48 horas post-inoculación. Los animales se encontraban postrados y sumamente deprimidos, se observó congestión de la conjuntiva ocular, edema palpebral y algunos presentaron convulsiones, ataxia y parálisis. En su fase agonal los animales muestran taquicardia y taquipnea, con respiración abdominal y muerte con epistaxis^{3, 4, 12, 71, 74}.

7 - PATOLOGIA

7.1- Macroscópica

Los hallazgos más característicos son debidos a disfunciones circulatorias con hemorragias petequiales

generalizadas y coagulación intravascular diseminada (CID),^{3,6,88}

Las condiciones del cadáver son buenas⁶⁹, el pelaje se encuentra sin brillo y es común observar secreción sanguinolenta y espumosa por la nariz y boca. Al abrir cavidades se encuentra escaso líquido hemorrágico tanto en cavidad pleural como en peritoneo^{64,70}. Generalmente hay congestión y hemorragias en tráquea, timo, pulmones, pericardio, hígado, riñones y mucosa nasal e intestino; al abrir la tráquea se observa espuma de color rojizo^{29,24,48,69,64,70,87}, los pulmones presentan edema y en algunos hay lesiones neumónicas¹⁶. El hígado se encuentra aumentado de tamaño, friable, pálido, con áreas de necrosis gris-blanquecinas, y en otros hay ligera ictericia; la vesícula está distendida y con gran contenido de bilis^{64,70}. Otros cambios son: esplenomegalia y adenomegalia^{29,24}; estómago plétórico de alimento^{24,27}; el timo hiperplásico^{4,64,70}; congestión meníngea^{9,14} y vejiga plétórica^{19,20}.

7.2- Microscópica

Las lesiones más dramáticas se observan en hígado y consisten en: hepatitis generalizada, con disociación de hepatocitos, necrosis multifocal difusa y gran cantidad de pigmento hemático²⁴, en región periportal puede observarse infiltrado mononuclear², algunos autores han informado de

hepatitis necrótica^{3, 16, 24, 27, 69}. En pulmones se han encontrado lesiones desde hiperemia y hemorragias hasta focos neumónicos o neumonías sero-hemorrágicas, hiperplasia linfoide peribronquial y necrosis; y en algunos casos se ha informado de trombosis de vasos pulmonares^{24, 88}. En riñón se ha observado nefrosis y glomerulonefritis membranosa, así como trombos fibrinosos en los capilares glomerulares²⁴.

El tejido linfoide de timo, bazo y ganglio muestran depleción con cariorrhexis y cariolisis de linfocitos²⁴. A nivel nervioso se ha mencionado encefalitis no supurativa con infiltrado mononuclear perivascular, desmielinización y proliferación de la glia²⁴. Otros autores han informado de gastritis catarral, necrosis de las adrenales, congestión endometrial, degeneración del epitelio acinar del páncreas y de los islotes⁸⁸. La presencia de microtrombos en la mayoría de los órganos ha sido un hallazgo frecuente⁷⁹.

En microscopía electrónica se ha observado vacuolización del citoplasma, degeneración de las mitocondrias y ruptura de la membrana celular de los órganos parenquimatosos⁸⁸. Se ha mencionado la presencia de organizaciones virales, al igual que de organelos paracrystalinos de virus hexagonal coincidiendo en que se trata de un virus pequeño y desnudo^{16, 17, 47}.

8- DIAGNOSTICO

8.1- De campo.

La presencia de una enfermedad altamente contagiosa, con alta mortalidad, curso rápido, casi sin signos clínicos, serían los primeros indicios para sospechar de la EHVC.¹⁹

8.2- De laboratorio.

8.2.1- Envío de Muestras. Se debe enviar el animal vivo o muerto al laboratorio tomando las debidas precauciones para evitar su diseminación. Los animales vivos deben estar en la fase aguda y no deben haber recibido tratamiento; los muertos se envían enteros, ya que no se recomienda la necropsia por parte del dueño; estos animales deben ir acompañados de un informe de las observaciones más importantes como son: ubicación de la granja, cliente, número de jaulas, razas empleadas, registros de reproducción, número de nacimientos, mortalidad en lactancia, mortalidad post-destete, condiciones ambientales, clase de alimento, producción, condiciones de manejo, tasa de reproducción, informe sobre el problema, número de afectados, porcentaje de morbilidad y mortalidad, síntomas, evolución, tratamiento, causas posibles o sospechosas de la infección. Las muestras se colocan en un medio fresco o refrigerado a 4°C, en bolsas herméticas, las cuales deben ser desinfectadas a la salida de la granja con formol. Las muestras para virología y/o bacteriología deberán

enviarse lo más rápido posible^{82,88}

8.2.2-Bacteriología. Se deben realizar cultivos de sangre y órganos como: hígado, bazo, pulmones y riñones en medio de Agar sangre, Mackconkey, incubados a 37°C. de 20 a 48 horas. Estas muestras deben ser tomadas del sitio anatómico más representativo, dentro de las tres primeras horas de ocurrida la muerte; bajo estrictas condiciones de asepsia y recolectadas en recipientes estériles. Las muestras deben ser enviadas al laboratorio en condiciones de refrigeración. En algunos casos se han aislado *Pasterella multocida* y *haemolytica*, y en otros casos no se ha logrado aislar ningún agente²⁹.

8.2.3- Inmunofluorescencia directa Utilizada para descubrir antígenos virales en células infectadas, cortes de tejidos o frotis por impresión, y para identificar anticuerpos contra virus⁶¹. Se realiza en corte por congelación o por impronta de secciones de tejido. Se ha observado fluorescencia brillante hasta la dilución 1:80 en animales enfermos, siendo los órganos más importantes el hígado, bazo y riñón¹⁰. Estos órganos deben ser recolectadas en bolsas de plástico estériles y mantenerse bajo congelación (0° C).

8.2.4-Hemaaglutinación (H.A.). Se obtiene de la suspensión de tejido hepático en solución fisiológica estéril de conejos muertos, y su posterior centrifugación para obtenerse un

sobrenadante al cual se le realizara la prueba de hemoaglutinación con glóbulos rojos de humano del tipo "O"^{23,24,29,68,70}. Los órganos en que se han observado mayor cantidad de títulos son en orden decreciente el hígado, pulmón, bazo, riñón, corazón, músculo y cerebro^{10,88}.

El criterio de evaluación de la hemoaglutinación es el siguiente según lo recomienda Pu y col.⁷²:

- ++++ Los hematíes permanecen de manera homogénea en la casilla.
- +++ Igual que el anterior pero de forma irregular.
- ++ Los hematíes están en forma de anillo en el fondo, pequeños paquetes aglutinados se dispersan a la periferia.
- + Los hematíes están en forma de pequeñas masas, el borde es irregular, los pequeños paquetes aglutinados permanecen en la periferia.
- (-) Una masa de hematíes al fondo, el borde es irregular y liso.

Los animales convalescientes se mantienen con títulos estables de 1:160 aún después de dos semanas^{9,4}.

8.2.5-Inhibición de la hemoaglutinación (I.H). La actividad hemoaglutinante puede ser inhibida por suero de conejos convalescientes de la EHVC, siendo un método ampliamente utilizado en la serología. Aunque la I.H. es capaz de detectar anticuerpos contra la EHVC, su

estandarización ha sido difícil^{9,4,6,68}, el título de inhibición de la hemaglutinación se expresa como el título de dilución más alta de antisuero que inhibe completamente la hemaglutinación⁶¹, observándose títulos positivos entre 1:32 y 1:8000¹⁰. Otra prueba utilizada es la inhibición de la hemoaglutinación en microtécnica con muestras de sangre obtenidas en papel filtro, considerándose positivos títulos desde 1:40⁹⁵.

8.2.6-Hematología. Se deben enviar al laboratorio muestras de sangre recolectadas en capilares por punción en la oreja, o intracardiaca si se necesita mayor cantidad para la realización de varios estudios. En casos avanzados de la enfermedad hay disminución del número total de leucocitos desde un 73% hasta un 34%, también se ha observado hipergammaglobulinemia⁶⁶.

8.2.7-Método de ELISA. Capucci y col.⁵², han montado la técnica de ELISA en "sandwich simple", utilizando como captador suero hiperinmune anti RHVC de conejo y una mezcla de anticuerpos monoclonales como marcadores, siendo una prueba más sensible que la hemoaglutinación.

Aparte de los métodos diagnósticos anteriores, son de gran ayuda los signos clínicos, los hallazgos histopatológicos, la epidemiología y la microscopía electrónica^{6,41,42,68}.

8.3- Diagnóstico diferencial.

Se debe hacer diagnóstico diferencial entre:

- Intoxicaciones: Como son organofosforados, Paraquat, Parathion⁶.

- Pastereiosis, ya que inicialmente se le atribuyó a este agente la causa de la enfermedad, debido al aislamiento frecuente de *Pasteurella multocida* y *haemolytica*, en órganos de animales muertos en el brote^{6,16,17,55}.

- Mixomatosis. En los países europeos, donde esta enfermedad es enzoótica, la mixomatosis se prolonga por más días y la muerte es en goteo, mientras la EHVC las muertes son masivas y en poco tiempo⁶.

Otras enfermedades a diferenciar son: Salmonelosis, Coccidiosis y Enterotoxemias por *Clostridium spp.*^{55,64,88}.

9- CONTROL Y PREVENCIÓN

9.1- Control y erradicación en México.

México ha organizado un plan de erradicación contra esta enfermedad a través del Sistema Nacional de Emergencia en Salud Animal (SINESA), el cual contempló medidas contraepizootológicas como fueron: comunicación, cuarentena, inspección, sacrificio y desinfección, centinelización y repoblación^{20,24,79}.

a) La comunicación social, se realizó por medio de volantes, spots por radio y televisión, boletines de prensa, sensibilizando al productor o propietario para cooperar con la campaña, entregando sus animales enfermos o sospechosos al SINESA, y a cambio se le entregaba un vale para la reposición posterior de los conejos, una vez que las condiciones sanitarias lo permitieran.

b) La cuarentena de granjas cunícolas, prohibiéndose el acceso a personas y vehículos, al igual que la venta de conejos y sus productos.

c) La vigilancia activa de focos nuevos y su notificación inmediata a los organismos de salud animal.

d) Disposición sanitaria de cadáveres, limpieza y desinfección de las instalaciones con hipoclorito de sodio al 5%, lechada de cal (1/2 Kg. de cal viva por 10 litros de agua) o formol al 0.4%.

e) La centinelización que consiste en introducir algunos animales a una granja por un período de 3 semanas, después de haber sido desinfectada y permanecido vacía por un espacio de 8 semanas y así poder detectar la presencia del agente o no, para poder iniciar la repoblación.

f) Sobrevigilancia epidemiológica, con el fin de detectar nuevos focos en fases tempranas y tomar las medidas pertinentes.

pertinentes.

En el programa de erradicación en México, se dividió el país en las siguientes zonas⁷⁰:

a- Zona focal. La zona de mayor difusión de la enfermedad que fue el Valle de México, donde se dispuso de cuarentena con retenes sanitarios, se prohibió la movilización de animales y se realizó el sacrificio en puntos de acopio de animales con la entrega de su vale de reposición.

b- Zona perifocal. Focos aislados, perfectamente ubicados en los estados circunvecinos al foco principal, allí se realizó depoblación, incineración, limpieza y desinfección, al igual que vigilancia epidemiológica.

c- Foco en riesgo. El resto del país donde no se ha detectado, ni existe reporte alguno de foco positivo. En estas áreas solo se realizó vigilancia epidemiológica.

9.2- Prevención

9.2.1- Medidas de higiene y desinfección.

Se deben seguir estrictas medidas de bioseguridad, para evitar la introducción de la infección en animales susceptibles^{16, 20, 24, 68}. Las principales medidas a tomar son:

- Evitar la introducción de conejos a la granja; y si se hace, deben tener un certificado de sanidad (seronegativos),

estos no se deben colocar directamente en contacto con el resto de la explotación, sino mantenerlos en un lugar aislado en una jaula por lo menos 15 días, con uno o dos animales sanos de la explotación y si ninguno enferma durante ese lapso entonces se puede incorporar a la granja. En brote activo, no comercializar los animales, ni sus canales, ya que son riesgo de transmisión. No introducir al país animales vivos, canales o pieles no tratados de países que han sufrido la enfermedad.

- Evitar el intercambio de sementales.
- Evitar la visita a granjas o instalaciones donde se hayan presentado casos sospechosos de la enfermedad.
- No utilizar jaulas, alimento o material que haya estado en contacto con los animales enfermos. No utilizar alfalfa, ya que esta podría vehiculizar el virus por lo que se sugiere cambiar a tortilla, desperdicios de panadería o galletas y tener precaución en recibir los costales de alimento y el equipo nuevo fuera de las instalaciones desinfectándolos antes de introducirlos a los galpones con lechada de cal (1/2 Kg de Cal viva por 10 lts de agua) o formol al 0.4%. También se debe eliminar el material orgánico, lavar con agua y jabón y aplicar los desinfectantes a los galpones.
- Separar animales enfermos de sanos; y si se presentan muertes repentinas de conejos, se deben tomar muestras para

diagnóstico, y los otros ser enterrarlos o incinerarlos.

- No permitir la entrada a vehículos o personas extrañas; usar ropa y calzado exclusiva para atender a los animales, procurándose bañar antes de cambiar de ropa, igualmente tener cuidado con los trabajadores de la granja que tienen conejos en sus respectivas casas.

- Usar tapete sanitario a la entrada de la granja, utilizando solución de formol al 1% o los derivados del Iodo (Vanodine 2%).

- Mantener los conejos aislados de otras especies animales, las cuales podrían ser transmisoras de la enfermedad (roedores, pájaros, etc.).

9.2.2- Vacunación.

En algunos países europeos como España, Hungría, Rusia y Checoslovaquia se han utilizado vacunas obtenidas de tejidos inactivados; en España su uso se ha restringido únicamente a las áreas geográficas afectadas, ya que el producto puede enmascarar la presencia de animales portadores^{6,21,88}.

En China^{16,29,49,44}, se han preparado vacunas usando cepas virales como es la Bq-1 purificadas de hígado de conejos muertos por la enfermedad en forma natural y conservadas en nitrógeno líquido después de pasar por varias generaciones de inoculaciones experimentales. La preparación

de la vacuna se realiza utilizando las suspensiones de órganos filtrados e inactivados con formaldehído al 0.4% e incubados a 37°C, colocándose en excipiente oleoso e hidróxido de aluminio como inmunoadyuvantes en la preparación de la misma. Posteriormente se le realiza el control por medio de las pruebas de esterilidad, inocuidad y potencia.

Método de empleo. Subcutánea o intramuscular a los 30 días de nacimiento (0.5 a 1 ml.) y 1 ml. a los adultos, la inmunidad es desde los 7 días hasta 6 meses; la conservación de la vacuna debe ser entre 2 a 8°C.; en refrigeración puede durar 8 meses (2 - 4°C), y 6 meses entre 10-20°C. Si se vacuna entre los 15, 24, 29 días de preñez no se deben observar cambios en la cría, ni en la madre^{5,16,23}.

México desarrolló una vacuna experimental, cuyas pruebas de inocuidad, potencial y control de calidad fueron del 100%, sin embargo no se comercializó, ya que se decidió utilizar un programa de erradicación⁴⁶.

9.3- Tratamiento

Debido al curso rápido y al agente de la enfermedad no se ha encontrado un tratamiento directo para este padecimiento⁴⁰.

III- HIPOTESIS

1- El estudio de cambios anatomopatológicos, histopatológicos y ultramicroscópicos en los tejidos de conejos inoculados experimentalmente con el agente de la "Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos", permitirán establecer la secuencia cronológica acorde con la evaluación clínica de la enfermedad desde la infección hasta su resolución.

2- En la EHVC, se presentan cambios funcionales secuenciales en hígado y riñón detectables por medio del estudios hemáticos, de enzimas séricas y del uroanálisis.

3- El virus se replica inicialmente en el sistema linfático, y de ahí se difunde hacia hígado provocando necrosis y las consecuentes hemorragias y congestión generalizada en el resto del organismo.

IV- O B J E T I V O S

1- OBJETIVO PRINCIPAL

Conocer la patogenia y las alteraciones patológicas que se presentan en órganos, tejidos y células de conejos inoculados experimentalmente por vía aerógena con macerado de órganos de animales muertos naturalmente por la "Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos", surgida en México.

2- OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Describir e identificar la evolución de la enfermedad a través del estudio de cambios secuenciales anatomopatológicos e histopatológicos en los animales expuestos experimentalmente al agente de la EHVC.

- Evaluar los cambios secuenciales de los valores hematológicos en los animales expuestos experimentalmente a la EHVC.

- Establecer los valores séricos de enzimas hepáticas y renales a diferentes horas pos-inoculación con el virus de la EHVC.

- Identificar secuencialmente las lesiones ultraestructurales.

- Detectar por medio de la técnica de inmunofluorescencia antígeno viral a diferentes horas en los tejidos más afectados de conejos inoculados experimentalmente con el agente de la EHVC.

V- MATERIAL Y METODOS

La fase experimental del trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Alta Seguridad de la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (C.P.A.), localizado en Palo Alto, D.F., donde se realizó la técnica de inmunofluorescencia. Los estudios de hematología, química sanguínea, histopatología y microscopía electrónica se desarrollaron en los Departamentos de Patología y de Inmunología y Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se utilizaron 48 conejos adultos (mayores de 2 kilos) de la raza Nueva Zelanda, provenientes de la Granja Experimental y Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., donde hasta el momento no se han detectado serológicamente casos de la enfermedad. Los animales estuvieron en observación por una semana previa a la inoculación. Durante el periodo de adaptación y a lo largo del experimento recibieron la misma alimentación e igual manejo que el acostumbrado en la Granja.

1.- OBTENCION DEL INOCULO

El material a inocular se tomó de órganos de conejos naturalmente infectados por la EHVC, procedentes de una granja ubicada en la delegación de Xochimilco. Las vísceras se maceraron utilizando suero fisiológico y después se centrifugaron a 4000 G durante 30 minutos recuperando el sobrenadante. La suspensión se diluyó hasta obtener un título de 1:100.000 en 5 μ l. de acuerdo a la prueba de hemoaglutinación. A 1 ml de esta dilución se le añadieron 9 ml de una solución amortiguada con pH 7.0 y se inoculó por aerosol a los conejos (Técnica de la C.P.A.).

2.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Se sacrificaron 2 conejos cada 3 horas: los dos primeros a las cero horas fueron los testigos; los animales que sobrevivieron más tiempo, quedaron en observación y fueron sacrificados a las 90 horas realizándoseles las mismas pruebas que a los primeros.

Antes del sacrificio se observaron los signos clínicos, se tomaron las constantes fisiológicas (temperatura, frecuencia respiratoria y cardíaca), posteriormente se sangraron puncionando el corazón¹, se tomaron 5 ml de sangre en un tubo de ensayo sin anticoagulante para el estudio de química

sanguínea y 5 ml en un tubo de ensayo con heparina para biometría hemática según las técnicas de rutina^{8,28}. Después se procedió al sacrificio usando el método de desnucamiento^{4,54}, y se realizó la necropsia registrando las lesiones macroscópicas. Se tomaron las muestras para histopatología y microscopía electrónica de acuerdo a la técnica descrita por Weakley⁸⁴. De la vejiga se extrajo orina por punción directa para medir la gravedad específica, pH, proteína, glucosa, cetonas, bilirrubina, sangre, nitratos y urobilinógeno por el método de tiras reactivas Multistix (Laboratorios Ames).

3.- PRUEBAS HEMATOLOGICAS Y DE QUIMICA SANGUINEA

Se realizaron estudios de biometría hemática incluyendo la determinación de hemoglobina, hematocrito, cuenta absoluta y diferencial de leucocitos, conteo de eritrocitos y determinación de proteínas plasmáticas por los métodos de rutina^{8,28}. Dentro de las pruebas de química sanguínea se estudiaron por el método fotométrico la alanino-aspartosa-transferasa (A.L.T), antes G.O.T., la alanin-sorbitol-transferasa (A.S.T.), antes G.P.T., los niveles de urea y de bilirrubina^{*}; al igual que la concentración de creatinina en el suero^{*}

* MERCOTEST. Laboratorios Merck.

4.- ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

Para el estudio histopatológico de rutina, en cada uno de los conejos sacrificados se tomaron secciones de encéfalo, tonsilas, ganglios, pulmón, tráquea, intestino, bazo, vejiga, riñón, glándula adrenal e hígado de 1 cm³, los cuales fueron fijados en formalina bufferada al 10% e incluidos en parafina para realizar cortes histológicos de 6 µm. de grosor y teñidos con hematoxilina-eosina (H & E), para su observación con microscopio de luz^{1, 51, 56}.

5.- ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

Para el estudio por microscopía electrónica, se tomaron secciones de 2 mm³ de los siguientes tejidos: pulmón, bazo, ganglio, tonsila, hígado y timo, los cuales se fijaron en una solución de glutaraldehído al 3% en buffer de fosfato 0.1 M. y pH 7.2 por 24 horas, posteriormente las muestras fueron lavadas en una solución de 10% de sacarosa y 10 gotas de cloruro de calcio al 1% en 100 ml por 24 horas. Se realizó una fijación en tetróxido de osmio al 1% a 4°C. por 2 horas y luego se colocaron en solución lavadora por otras 24 horas; seguido se deshidrataron con cambios sucesivos en acetona de grados crecientes: 60, 70, 80, 90, 96 y 100%, cada una de 10 minutos para posteriormente ser infiltrados en resina-acetona 1:1 por una hora; luego resina-acetona 3:1 por 24 horas. Los cortes semifinos (un µm.) se evaluaron en

microscopio de luz y las secciones ultrafinas (60 - 80 nm) fueron cortadas en ultramicrotomo Barker-Blum MT-2 y teñidas con acetato de uranio y citrato de plomo, para ser evaluadas en el microscopio electrónico de transmisión ZEISS 9-2⁸⁴.

6.- TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA

Para el estudio de inmunofluorescencia se tomaron fragmentos de hígado, pulmón, bazo y riñón, los cuales fueron congelados y enviados al laboratorio de la C.P.A. para su evaluación; en el desarrollo de las pruebas se utilizó conjugado de órganos de animales naturalmente muertos por la E.H.V.C., siguiendo el procedimiento de rutina empleado en el Laboratorio de la C.P.A.²⁹.

7.- ANALISIS ESTADISTICO

La información se presenta mediante cuadros y gráficas. Para evaluar los cambios a través del tiempo se utilizó el análisis de regresión para las variables cuantitativas²⁵ y los métodos descritos por Navarro⁶⁵ para las variables binarias.

VI- RESULTADOS

1. - HEMATOLOGIA

1.1- GLOBULOS BLANCOS

En el recuento leucocitario se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en relación al tiempo post-inoculación, encontrándose una leucopenia moderada a horas avanzadas posteriores a la inoculación; los conejos que sobrevivieron más de 70 horas presentaron una leucocitosis moderada (Figura 1).

El número de linfocitos mostró una estrecha relación con el número de leucocitos. La linfopenia moderada, fue altamente significativa ($P < 0.01$), al compararse con el tiempo de inoculación. La leucopenia con linfopenia fue constante a partir de las 42 horas de la infección (Figura 1 y 33).

El número total de heterófilos en banda se elevó a partir de las 33 horas, este cambio fue altamente significativo ($P < 0.01$) (Figura 2 y 33).

La cantidad de heterófilos no mostró cambio significativo ($P > 0.05$) durante el experimento, aunque en los conejos después de 72 horas de inoculados se observó una leucocitosis con heterofilia moderada (Figura 2 y 33).

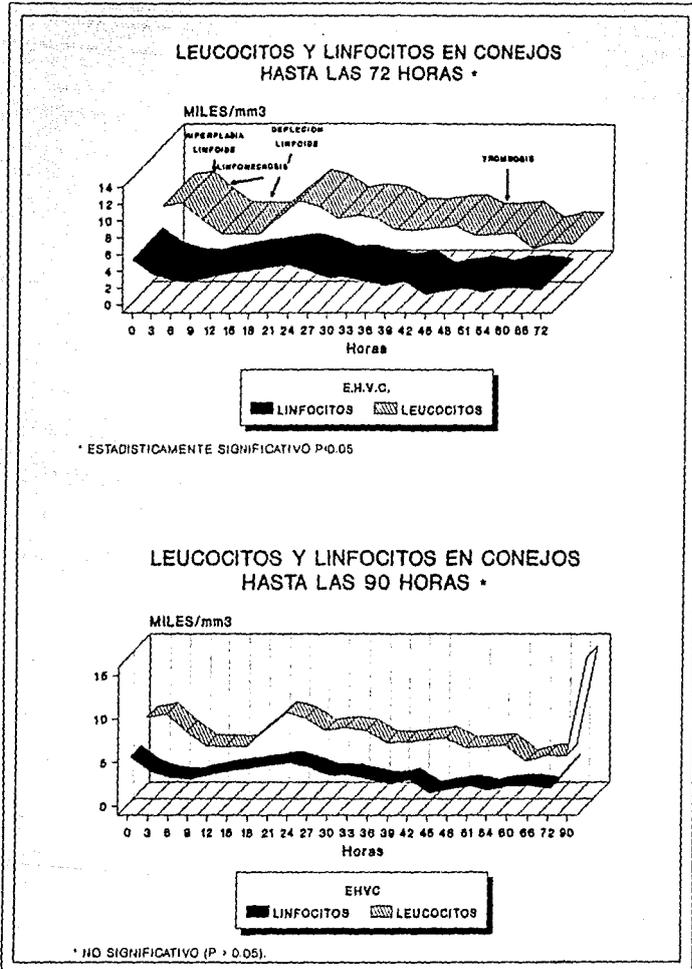


FIGURA 1. RECUENTO DE LINFOCITOS Y LEUCOCITOS EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C.

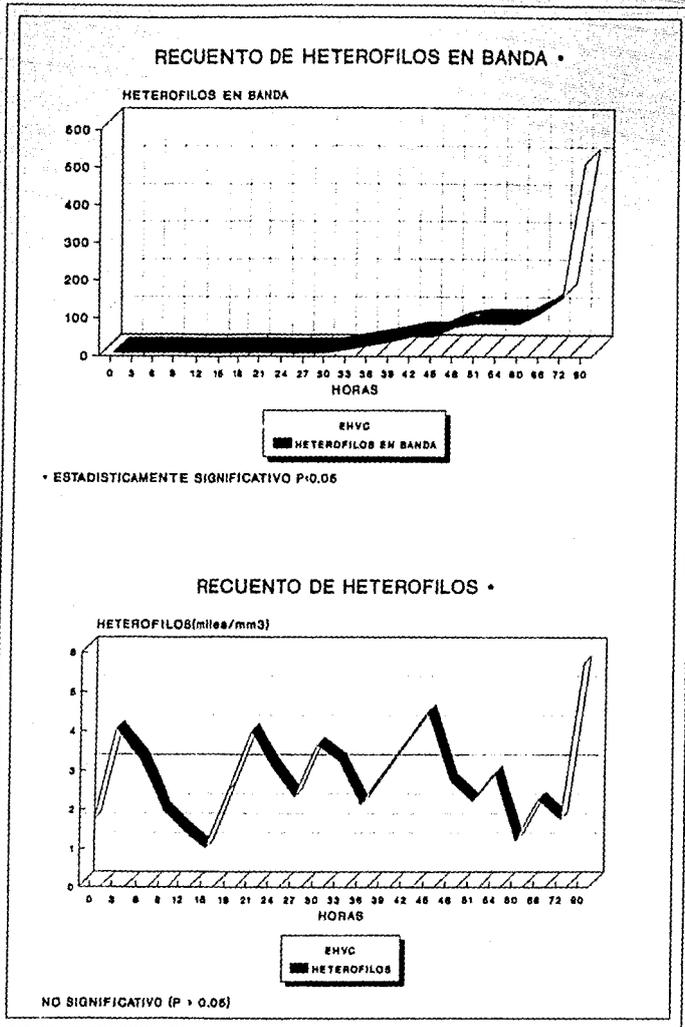


FIGURA 2. RECUENTO DE HETEROFILOS Y HETEROFILOS EN BANDA EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C.

No se encontró relación estadísticamente significativa ($P > 0.05$) del tiempo con el recuento plaquetario en los conejos, aunque solo 9 animales mostraron valores dentro de los rangos normales (250.000 a $850.000 / \text{mm}^3$)⁷⁶, los otros estuvieron por debajo de estos (Figura 3).

Los monocitos, basófilos y eosinófilos, no mostraron cambios significativos ($P > 0.05$), lo mismo ocurrió con el porcentaje de necrobiosis, el cual solo se observó en animales después de las 42 horas y en baja proporción.

1.2- GLOBULOS ROJOS

El recuento de eritrocitos, hematocrito, el volumen corpuscular medio (VCM), la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y la hemoglobina, no mostraron ninguna relación significativa con el tiempo (Figura 4). En casos aislados se observó basofilia difusa, crenocitos, rouleaux, anisocitosis y cuerpos de Howell Jolly.

Los normoblastos presentaron un aumento significativo ($P < 0.05$), a partir de las 42 horas de infección (Figura 4 y 33). La concentración de proteínas plasmáticas y fibrinógeno no mostraron cambios significativos (Figura 3).

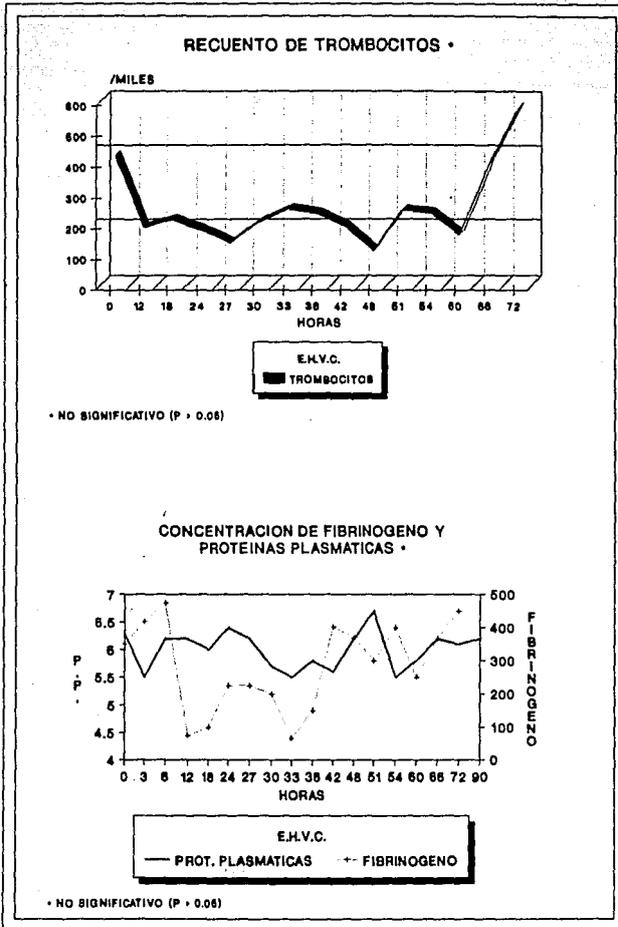


FIGURA 3. RECuento DE TROMBOCITOS Y CONCENTRACION DE PROTEINAS PLASMATICAS Y FIBRINOGENO EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C.

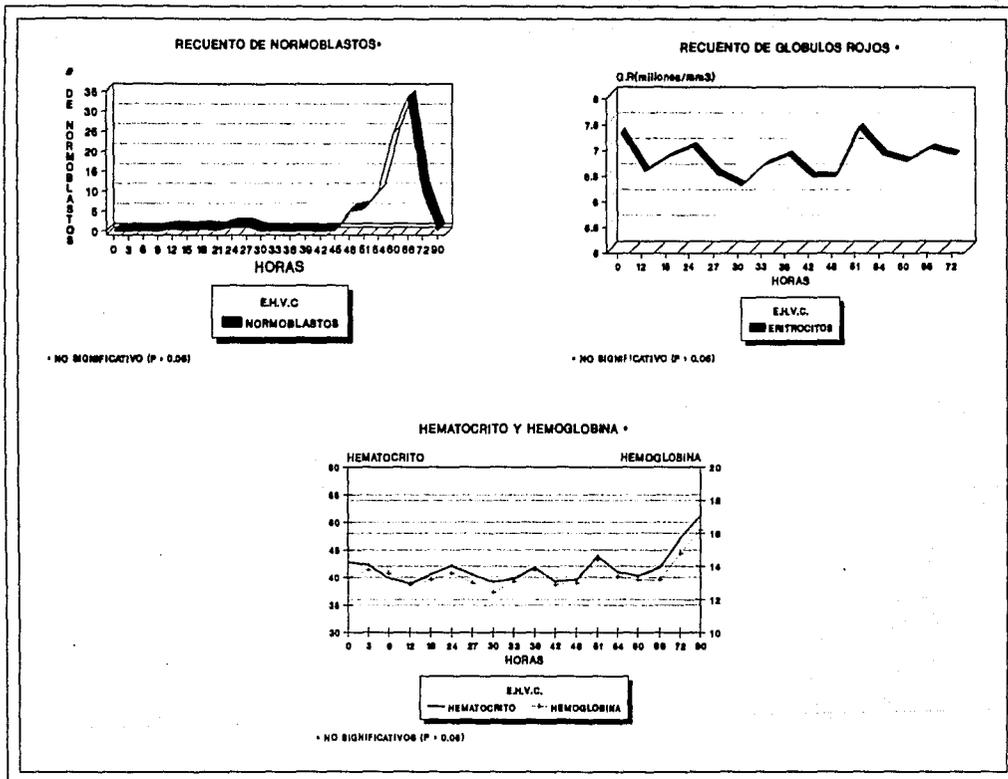


FIGURA 4. RECUESTO DE GLOBULOS ROJOS, HEMATOCRITO, NORMOBLASTOS Y CONCENTRACION DE HEMOGLOBINA EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C.

2. - QUÍMICA SANGUÍNEA

Los valores de química sanguínea mostraron elevaciones altamente significativas ($P < 0.01$), tanto en la concentración plasmática de urea como de creatinina, a partir de las 30 horas de inoculación, estos incrementos fueron superiores a 25 U/l y 2.0 mg/dl respectivamente (Figura 5 y 33).

Con relación a las bilirrubinas, solamente la directa presentó un incremento significativo ($P < 0.05$), a partir de las 36 horas post-inoculación con niveles superiores de 0.15 mg/dl; la bilirrubina indirecta no mostró cambio significativo ($P > 0.05$), aunque se observó una tendencia a elevarse a más de 0.50 mg/dl después de las 48 horas (Figura 5 y 33).

Las transaminasas alanino-aspartosa transferasa (ALT), alanino -sorbitol-transferasa (AST), y la fosfatasa alcalina mostraron un aumento altamente significativo ($P < 0.01$) a partir de las 45 horas (figura 6).

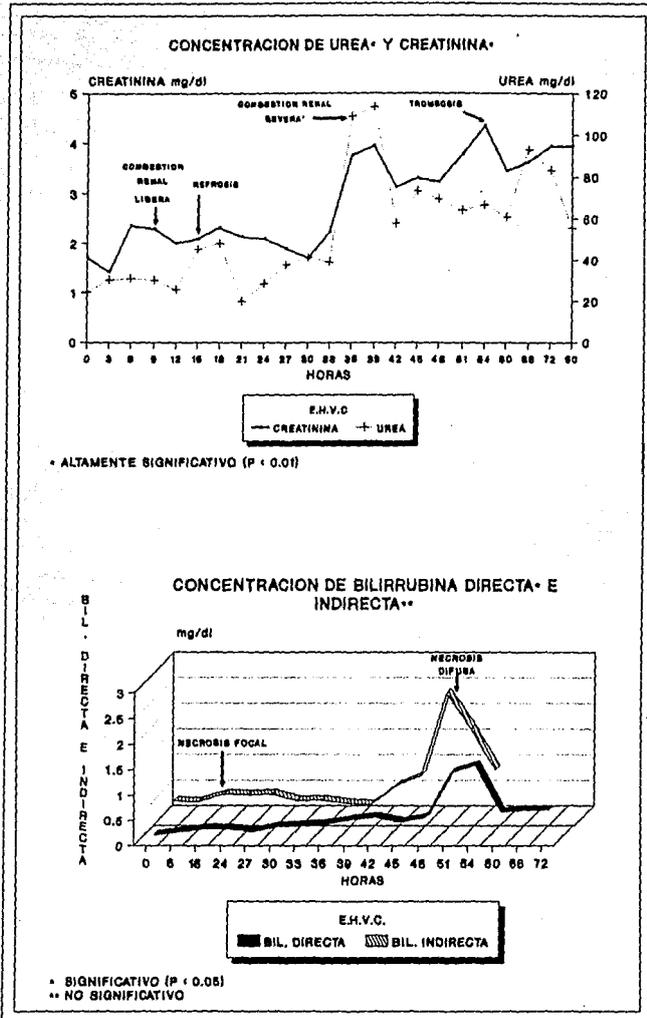


FIGURA 5. CONCENTRACION DE BILIRRUBINA DIRECTA E INDIRECTA, UREA Y CREATININA EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C.

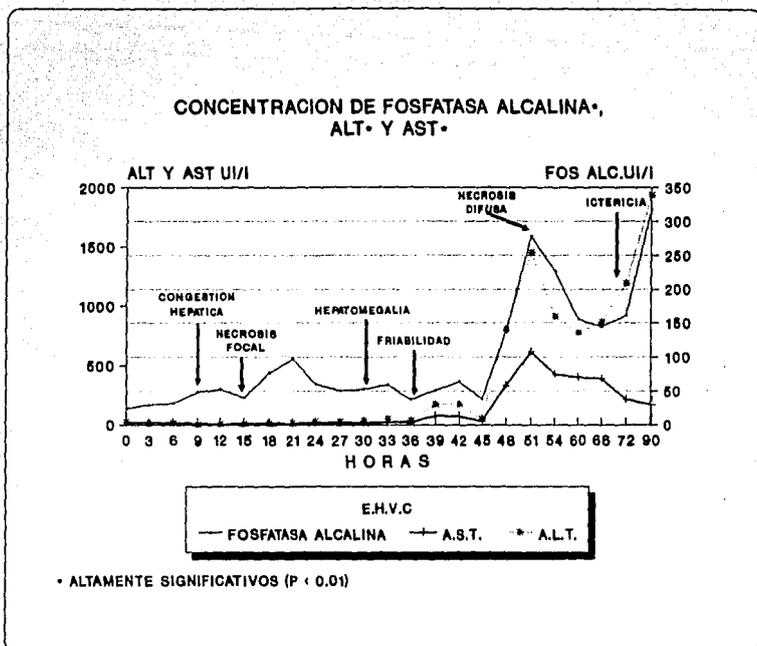


FIGURA 6. CONCENTRACION DE T.G.O., T.G.P. Y FOSFATASA ALCALINA EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C.

3. UROANALISIS

Los resultados mostraron cambios significativos ($P < 0.05$), en la gravedad específica, el pH, la presencia de sangre, proteínas y urobilinógeno con relación al tiempo posinoculación; la presencia de sangre fue permanente desde las 30 horas (Figura 7).

La presencia de bilirrubina en orina no mostró cambios importantes ($P > 0.05$) en el uroanálisis.

4- SIGNOS CLINICOS

Los signos clínicos más importantes fueron depresión y postración ($P < 0.01$), presentándose en forma constante y moderada desde la 6 horas y severo a partir de las 36 horas de infección (Figura 8 y 32). La Disnea ($P < 0.01$), tuvo variaciones de ligera a severa en las primeras horas, a las 33 horas fue severa en forma constante (Figura 8 y 32). Hubo diarrea ($P < 0.01$) desde las 36 horas como heces semi-líquidas y a las 51 horas se observó diarrea severa con evacuación líquida (Figura 8 y 32). La distensión abdominal ($P < 0.05$) se manifestó en forma variable desde las 30 horas, predominando la forma moderada (Figura 8 y 32). La secreción nasal sanguinolenta ($P < 0.01$) se observó en forma severa a partir de las 51 horas y en los animales que murieron espontáneamente durante el experimento a las 35, 47 y 87

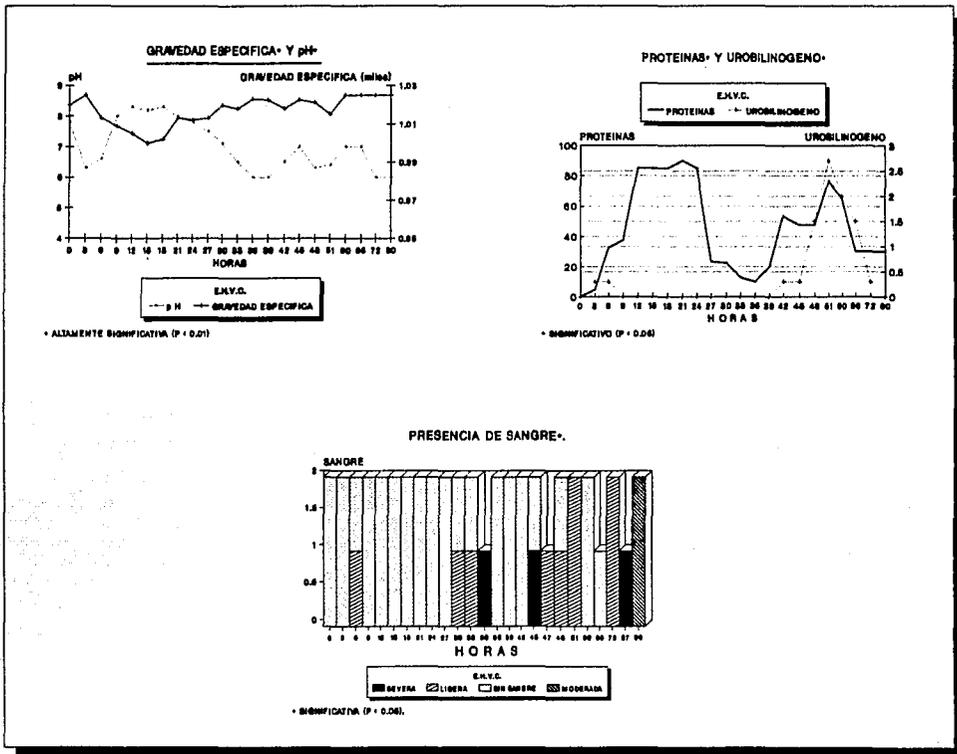
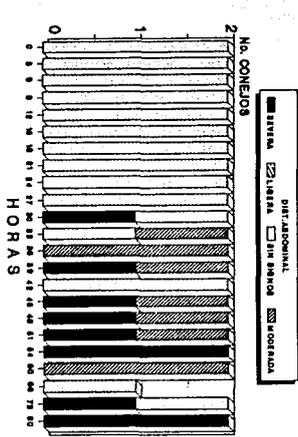


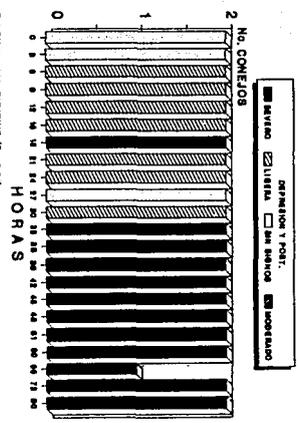
FIGURA 7. RESULTADO DE UROANALISIS EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C.

DISTENSION ABDOMINAL •



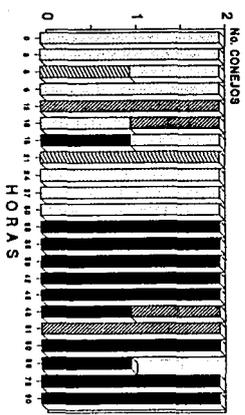
• AUMENTO SIGNIFICATIVO (P < 0.01)

DEPRESION Y POSTRACION •



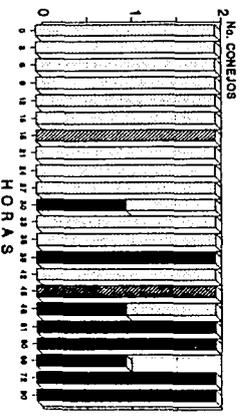
• AUMENTO SIGNIFICATIVO (P < 0.01)

DISNEA •



• AUMENTO SIGNIFICATIVO (P < 0.01)

DIARREA •



• AUMENTO SIGNIFICATIVO (P < 0.01)

FIGURA 8. SIGNOS CLINICOS DE CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C.

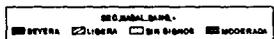
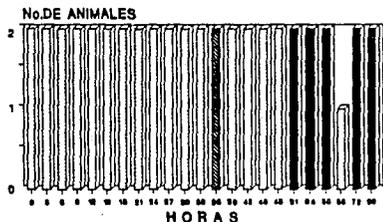
horas postinfección (Figura 9 y 32); algunos conejos presentaron estornudos ($P < 0.01$) a partir de las 33 horas, siendo un signo constante y severo desde las 51 horas (Figura 9 y 32). El opistótono ($P < 0.05$), se observó después de las 47 horas, siendo siempre de forma severa (Figura 9 y 32).

No se observó signología nerviosa, ni se registraron chillidos. Se presentó muerte súbita en dos conejos a las 35, 47 y 87 horas post-inoculación y los 2 animales a las 90 horas se encontraban en fase agónica.

5.- CONSTANTES FISIOLÓGICAS

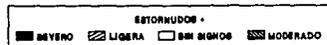
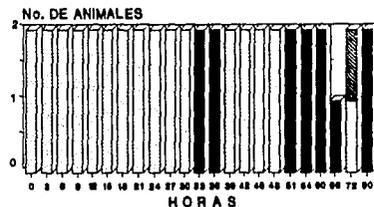
No se encontró relación significativa ($P > 0.05$) entre la frecuencia cardíaca, respiratoria y la temperatura rectal con el tiempo de inoculación; la tendencia de los dos primeros fue de disminución; a su vez la curva de temperatura mostró dos picos de hipertermia a las 18 y 42 horas post-infección (Figura 10).

SECRESION NASAL SANGUIOLENTA •



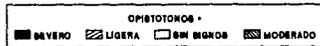
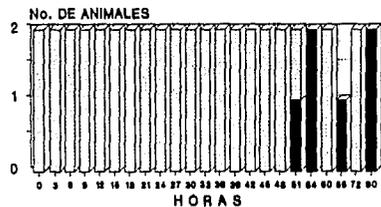
• ALTAMENTE SIGNIFICATIVA (P < 0.01)

ESTORNUDOS •



• ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS (P < 0.01)

OPISTOTONOS •



• SIGNIFICATIVO (P < 0.05)

FIGURA 9. SIGNOS CLINICOS (CONTINUACION)

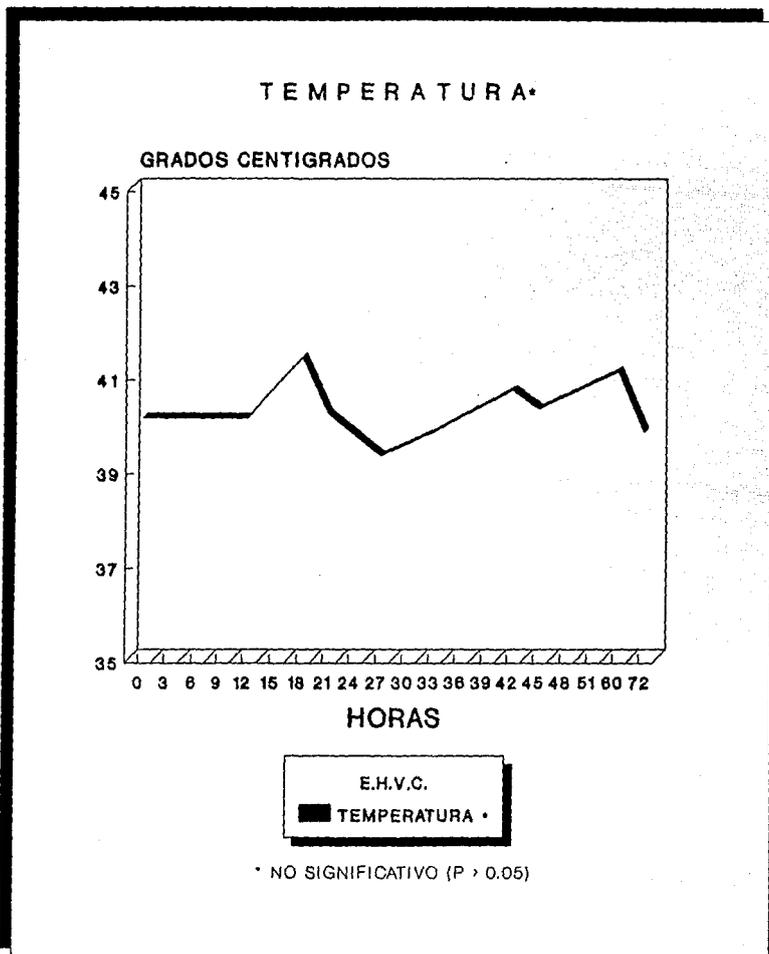


FIGURA 10. CURVA DE TEMPERATURA EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C.

6. - LESIONES ANATOMOPATOLOGICAS

6.1.- LESIONES MACROSCOPICAS

6.1.1. Aparato respiratorio. Se observó ligera cantidad de sangre y espuma en tráquea ($P < 0.05$), desde las 12 horas, a las 48 horas la cantidad fue moderada, y severa desde las 51 horas post-inoculación (Figura 11 y 34). La congestión y hemorragias en tráquea ($P < 0.05$) se presentó en forma ligera y moderada desde las 12 horas (Figura 11 y 34). La congestión y hemorragias pulmonares ($P < 0.01$) se encontraron en forma ligera y constante desde las 48 horas, siendo un hallazgo severo e importante en los animales que murieron repentinamente durante el experimento a las 35, 47 y 87 horas (Figura 11 y 34), el tipo de hemorragia que se presentó fue petequiral. Se observaron lesiones supurativas en los pulmones de 3 animales que llevaban más de tres días de inoculados como fue en los conejos de 87 y 90 horas.

6.1.2.- Digestivo. Las lesiones más importantes de acuerdo a las horas posinoculación fueron: palidez hepática ($P < 0.01$), se presentó en forma variable desde las 9 horas, con severidad desde las 51 horas (Figura 12); la friabilidad ($P < 0.01$), en este órgano fue ligera a las 36 y de moderada a severa a partir de las 42 horas (Figura 12 y 34); la hepatomegalia ($P < 0.01$), fue un hallazgo frecuente desde las 30 horas, con presentación severa desde las 48 horas y en los

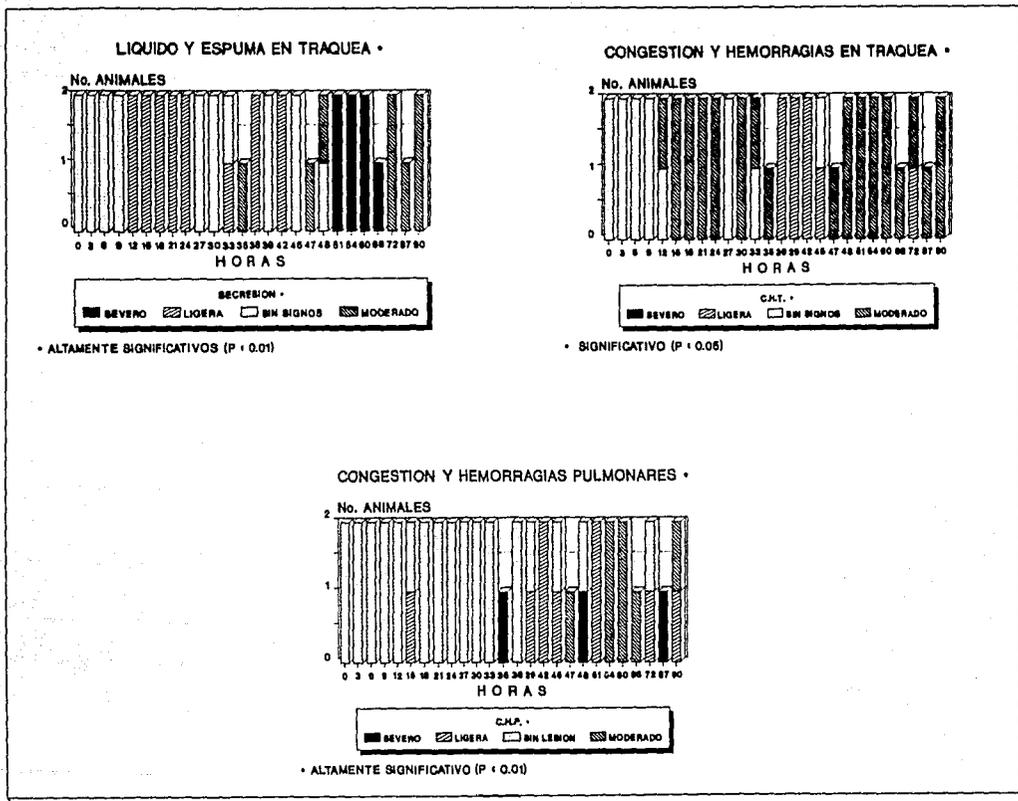


FIGURA 11. ALTERACIONES MACROSCOPICAS DEL APARATO RESPIRATORIO EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C

animales que murieron espontáneamente durante el experimento (Figura 12 y 34).

Los problemas vasculares hepáticos como la congestión ($P < 0.01$), se observaron a las primeras horas de infección, siendo ligero a las 6 horas, moderada a las 9 y severa a partir de las 33 (Figura 12 y 34). Únicamente los conejos que llevaban más de 72 horas inoculados, mostraron ictericia ($P < 0.05$) en forma severa (Figura 13 y 34).

La distensión cecal por gas ($P < 0.01$) se apreció en forma severa desde las 30 horas (Figura 13); la congestión y hemorragias en serosa intestinal ($P < 0.05$) se manifestaron de forma constante a partir de las 47 horas, siendo severa en los animales que murieron repentinamente durante el experimento (Figura 13). La distensión estomacal ($P < 0.01$) fue una observación frecuente desde las 27 horas con variación entre moderada y severa (Figura 13).

Otros hallazgos que variaron con el tiempo en forma altamente significativos ($P < 0.01$) fueron la congestión renal que empezó desde las 9 horas en forma ligera, observándose entre moderada y severa a partir de las 36 horas (Figura 14 y 34); y la esplenomegalia, siendo severa desde las 36 horas en adelante (Figura 14 y 34). Se observó adenomegalia en ganglios linfáticos ($P < 0.05$), presentándose en forma moderada desde las 45 horas post-inoculación. La

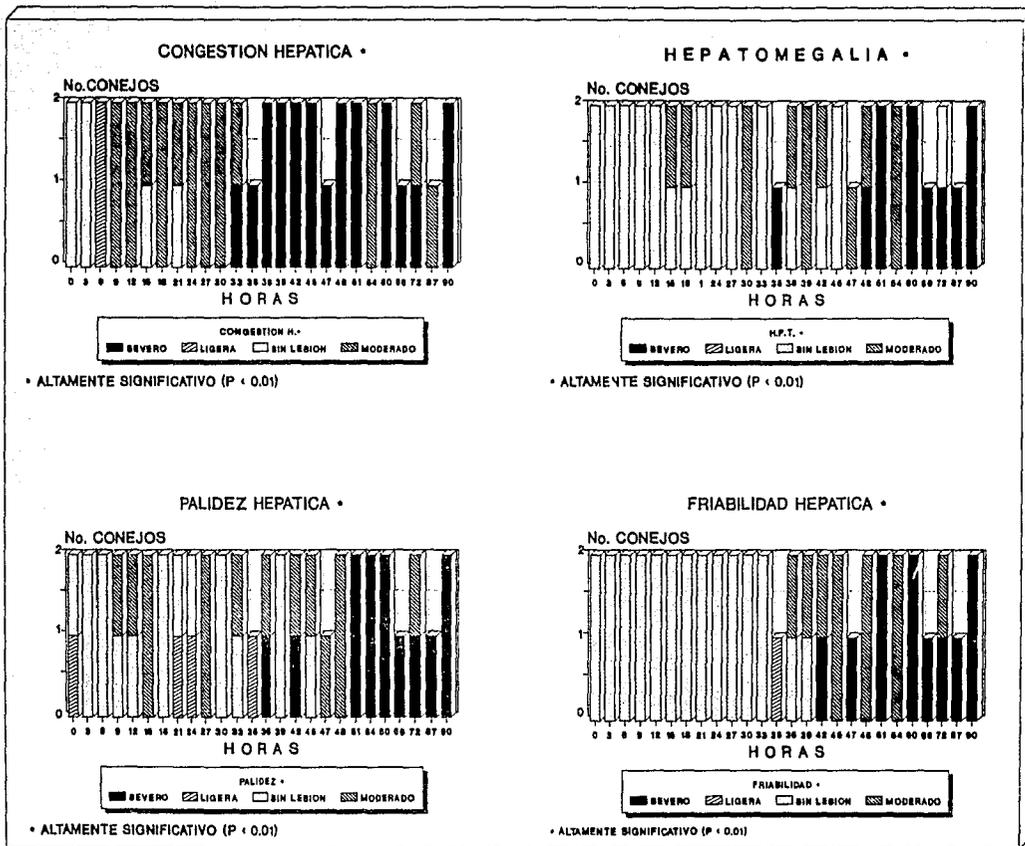


FIGURA 12. ALTERACIONES MACROSCOPICAS EN APARATO DIGESTIVO

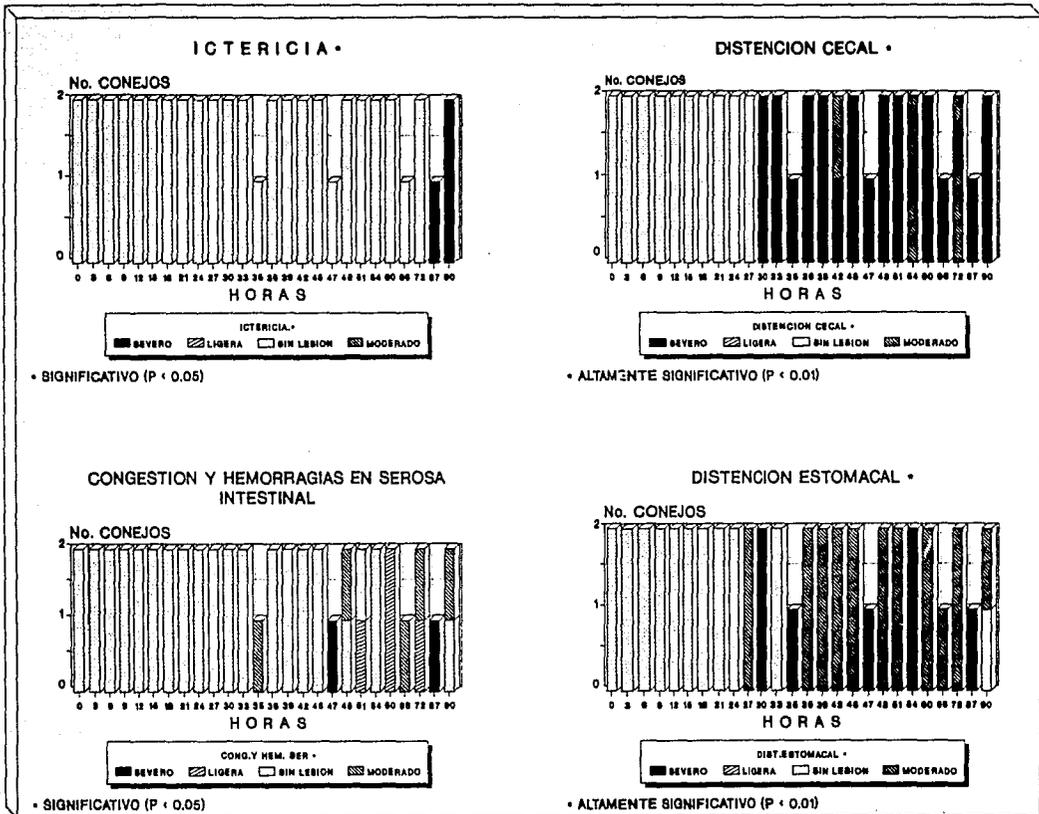


FIGURA 13. ALTERACIONES MACROSCOPICAS EN APARATO DIGESTIVO (CONT..)

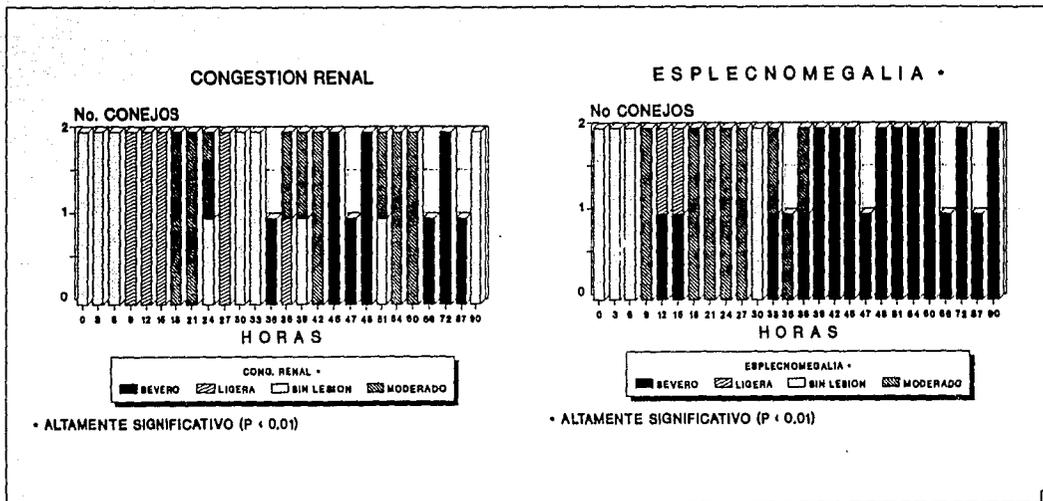


FIGURA 14. ALTERACIONES MACROSCOPICAS EN OTROS ORGANOS

congestión ligera de timo y meninges se presentó solo en animales que murieron repentinamente sin presentar una variación estadística significativa con el tiempo ($P > 0.05$).

6.2.- LESIONES MICROSCOPICAS

6.2.1. Organos linfoides. Inicialmente en ganglios y bazo se apreció hiperplasia linfoide ($P < 0.05$), siendo un hallazgo común entre las 6 y 9 horas de forma ligera a moderada, y solo en un conejo se presentó esta lesión a las 45 horas. La depleción linfoide ($P < 0.05$) se observó desde las 12 horas en forma variable, siendo severa y continua desde las 45 horas (Figura 16 y 34). Las hemorragias ($P > 0.05$), se observaron desde las 12 horas, con cambios variables de ligero a severo en el resto del tiempo sin tener una tendencia específica. La linfocrosis ($P > 0.05$), se observó en forma ligera y moderada entre las 9 y 30 horas post-inoculación (Figura 22 y 34).

6.2.2- Aparato digestivo. El hígado fue el órgano que manifestó cambios mas significativos ($P < 0.01$), siendo los más importantes la necrosis hepática, la cual fue inicialmente focal entre las 12 y 18 horas; desde las 51 horas se observó una franca necrosis difusa, misma que se encontró en los animales que murieron espontáneamente (Figura 15, 17 y 34). La congestión hepática ($P < 0.01$), se presentó en forma ligera a las 9 horas y moderada a las 66 (Figura

15). Se observaron otras lesiones menos significativas ($P > 0.05$), como fueron tumefacción, acúmulos de pigmento hemático.

Así mismo se observaron lesiones como infiltrado linfocitario periportal y presencia de parasitosis (*Eimeria stidae*) en diferentes estados, lesiones que tuvieron variación en su forma de presentación

A nivel intestinal no se encontraron cambios significativos ($P > 0.05$), aunque en la mayoría de los casos aislados se observaron parásitos del género *Eimeria spp.*

6.2.3.- Aparato respiratorio. Los órganos más afectados fueron tráquea y pulmón ($P < 0.01$). La congestión y hemorragias en tráquea, se presentaron en forma ligera a las 12 horas y moderada desde las 72 (Figura 15). La congestión a nivel pulmonar fue en forma ligera y moderada a partir de las 12 horas, la forma severa solo se presentó en los conejos de más de 72 horas y en los que murieron espontáneamente en el transcurso del experimento (Figura 16). La trombosis pulmonar resultó ser otra lesión muy significativa a partir de las 51 horas donde se encontró trombosis ligera, la forma severa se encontró en conejos que murieron espontáneamente durante el experimento (Figura 16, 18, 19 y 34).

En los animales agónicos de 90 horas de infección se

apreciaron discretas zonas de bronconeumonía, sin ser una lesión importante durante el experimento. El edema pulmonar, únicamente se presentó en forma ligera y moderada a diferentes horas y en casos aislados.

6.2.4 Aparato urinario. Las lesiones microscópicas más significativas en riñón fueron nefrosis ($P < 0.05$), que fue ligera desde las 15 horas y moderada a partir de las 42, sin observarse la forma severa (Figura 15 y 34). Otros hallazgos menos significativos ($P > 0.05$) fueron congestión glomerular, cuya forma severa se observó únicamente en un conejo a las 87 horas de infección, en algunos casos la congestión estaba acompañada de trombosis (Figura 20, 21 y 34). La nefritis intersticial se observó en forma variable en casos aislados.

En la glándula adrenal se observaron hemorragias, ligera en un animal a las 87 horas y moderada en otro a las 51 horas post-inoculación.

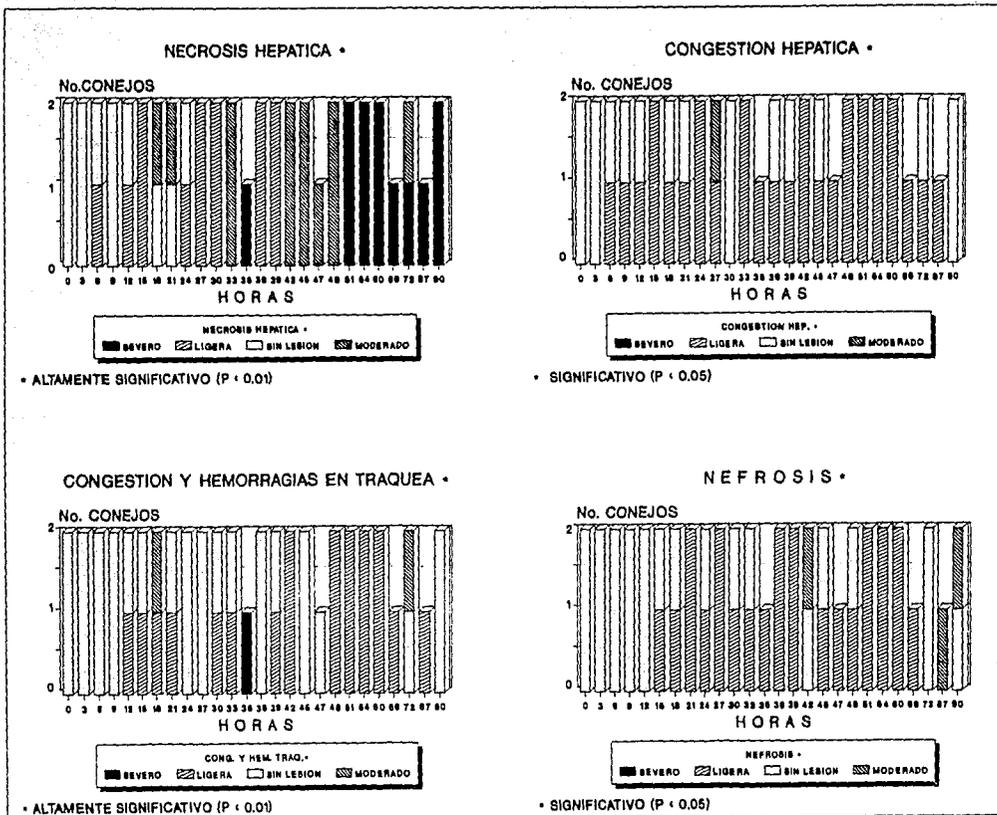


FIGURA 15. LESIONES HISTOPATOLÓGICAS EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA E.H.V.C.

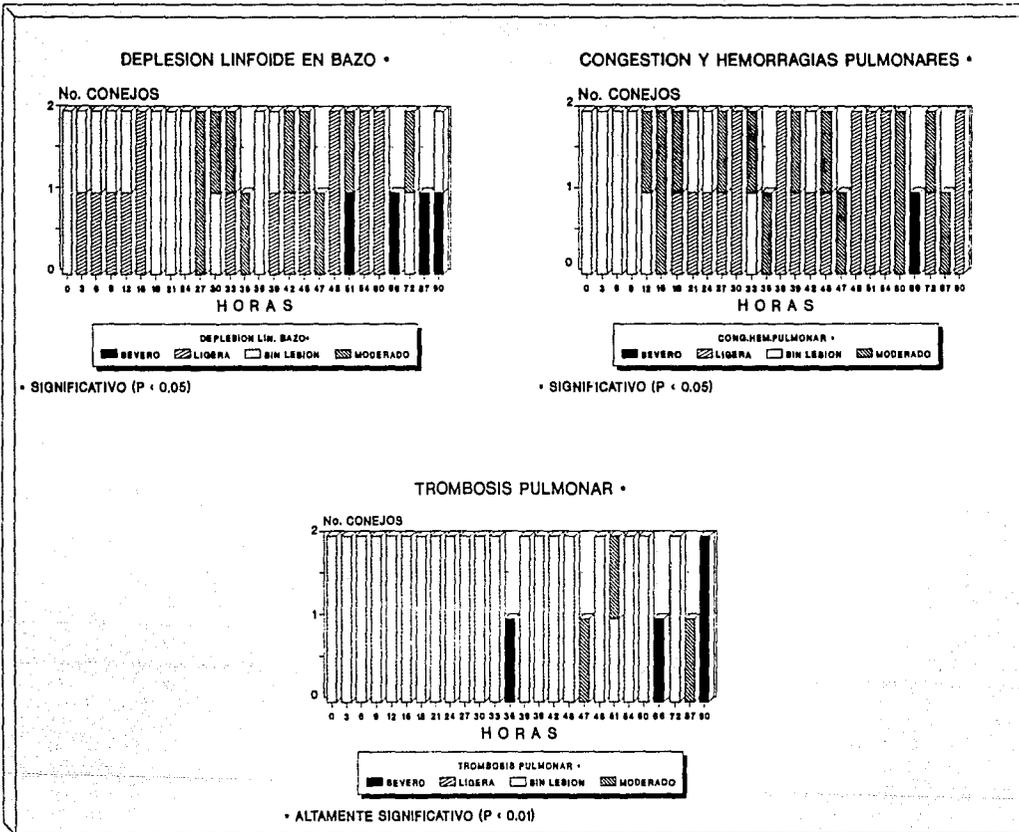
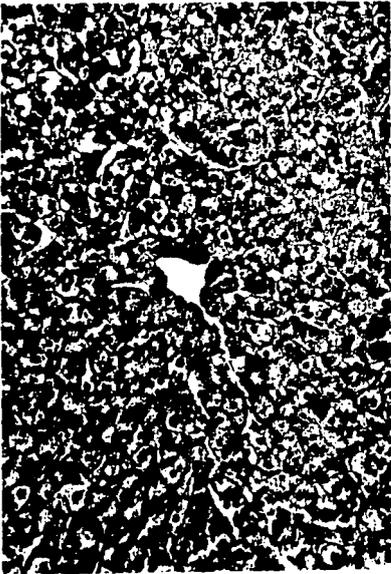


FIGURA 16. LESIONES HISTOPATOLÓGICAS (CONT.)



A

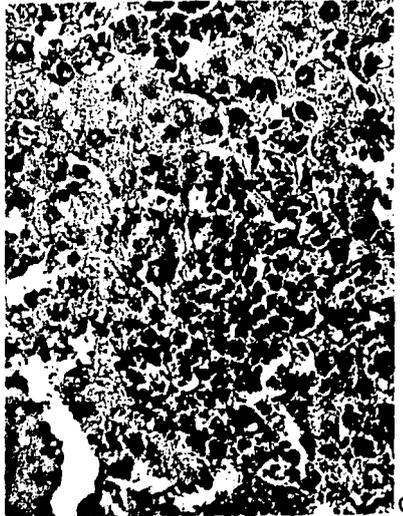


B

A B

C FIGURA 17

- A. Hepatocito de conejo 15 ha. post-inoculación. Marcada degeneración de las células. (Hepatoeste) 102 X
- B. Hígado de conejo 46 ha. post-inoculación. Necrosis severa difusa con infiltración moderada de heterófilos. 102 X
- C. Detalle de la foto anterior. Marcada necrosis e infiltración por polimorfonucleares. 480X.



C

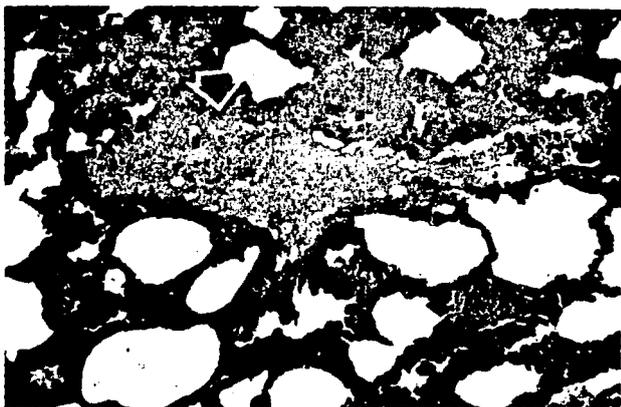


FIGURA 18. Pulmón de conejo 56 ha. post-inoculación. Obsérvese el inicio de la formación de un trombo, el acúmulo de fibrina y células blancas. (FLECHAS) 75.6 X

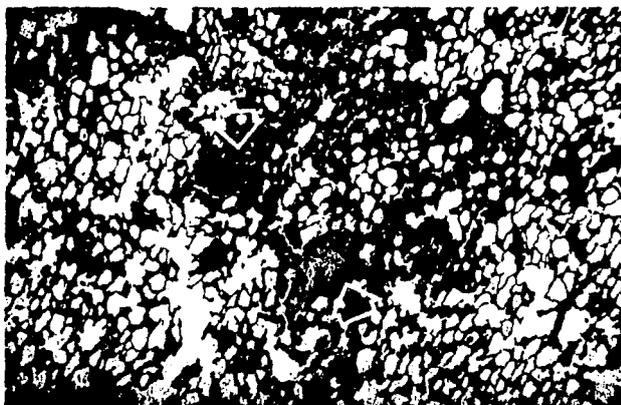


FIGURA 19. Pulmón de conejo que murió espontáneamente durante el experimento 95 ha. después de la inoculación con el agente de la EHVC. Presencia de múltiples trombos en vasos pulmonares. (FLECHAS) 98.4X.

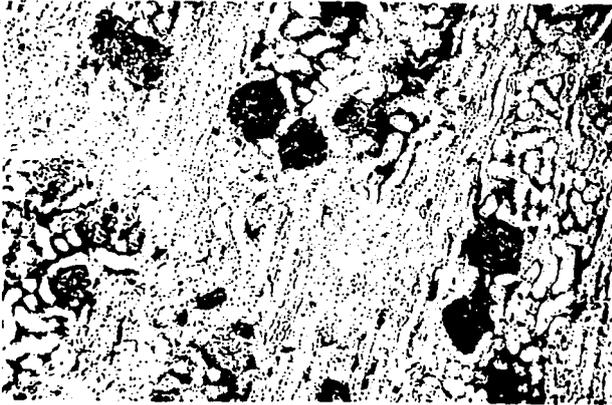


FIGURA 20 Riñón de conejo 87 hs. post-inoculación. Marcada congestión glomerular. 245.76X

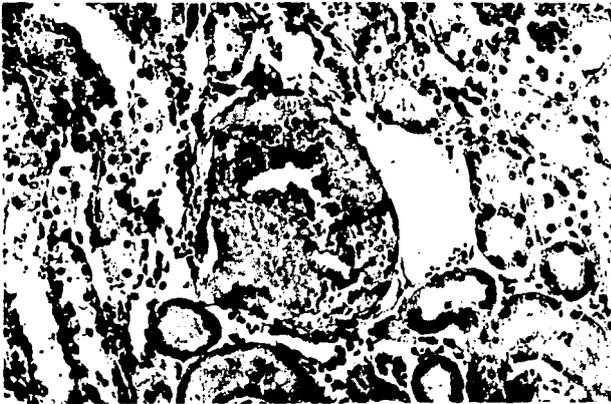


FIGURA 21. Riñón de conejo 56 hs. Post-inoculación. Trombosis en capilares glomerulares. 907.2X

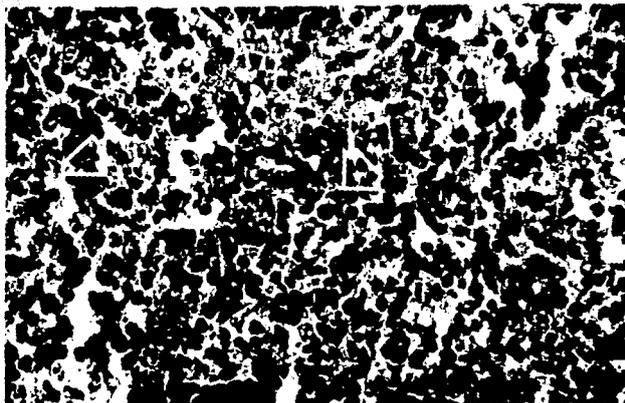


FIGURA 22. Necrosis linfoide en bazo de conejo inoculado 15
hs. antes con el agente de la EHVC. Obsérvase
cariorrexis (FLECHAS). 480X.

7. - INMUNOFLUORESCENCIA

Mediante la técnica de inmunofluorescencia se comenzó a observar fluorescencia en células aisladas distribuidas en el tejido (+) desde las 9 horas en hígado y riñón, mientras en bazo habían focos (++) y en pulmón el tejido era fluorescente en forma difusa (+++). El órgano con más cambios fue el hígado observándose un cambio secuencial constante a las 15 horas encontrándose grupos de células fluorescentes (++) y desde las 24 horas se observó tejido fluorescente (+++) (Cuadro 1 y 35). El bazo mostró igual variación, aunque el tejido fluorescente (+++) fue desde las 33 horas (Cuadro 1 y 35). El pulmón y el riñón tuvieron cambios variables sin mostrar una tendencia específica (Cuadros 1 y 35).

CUADRO I
RESULTADOS DE INMUNOFLUORESCENCIA EN ORGANOS
DE CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON
EL AGENTE DE LA E.H.V.C.

| ORGANOS | HORAS | | | | | | | | | | | |
|---------------|------------|------------|------------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 | 24 | 27 | 30 | 33 |
| HIGADO | 2/2 (-) | 2/2 (-) | 2/2 (-) | 1/1 (+) | 2/2 (+) | 1/2 (+) | 2/2 (++) | 1/2 (+) | 1/2 (++) | 1/2 (++) | 2/2 (+++) | 1/2 (++) |
| | | | | | | 1/2 (++) | | 1/2 (++) | 1/2 (+++) | 1/2 (+++) | | 1/2 (+++) |
| BAZO | 2/2 (-) | 2/2 (-) | 2/2 (-) | 1/1 (++) | 2/2 (++) | 1/2 (+) | 2/2 (++) | 2/2 (++) | 1/2 (+) | 2/2 (++) | 2/2 (++) | 2/2 (++) |
| | | | | | | 1/2 (++) | | | 1/2 (++) | | | |
| PULMON | 2/2 (-) | 2/2 (-) | 2/2 (-) | 1/2 (++) | 2/2 (++) | 2/2 (++) | 2/2 (++) | 1/2 (+) | 2/2 (++) | 2/2 (++) | 2/2 (++) | 1/2 (++) |
| | | | | 1/2 (+++) | | | | 1/2 (+++) | | | | 1/2 (+++) |
| RIÑON | 2/2 (-) | 2/2 (-) | 2/2 (-) | 2/2 (+) | 1/1 (++) | 2/2 (++) | 2/2 (++) | 2/2 (++) | 1/2 (+) | 1/2 (+) | 2/2 (++) | 1/2 (+) |
| | | | | | | | | | 1/2 (++) | 1/2 (++) | | 1/2 (++) |

- * NUMERO DE ANIMALES POR CADA RESULTADO
- + IF. EN CELULAS AISLADAS DISTRIBUIDAS EN EL TEJIDO
- ++ FOCOS O GRUPOS DE CELULAS INMUNOFLUORESCENTES
- +++ TEJIDO FLUORESCENTE
- ** EN 33 HORAS SIEMPRE FUE TEJIDO FLUORESCENTE (**)

8. - MICROSCOPIA ELECTRONICA

Los órganos tomados para el estudio de microscopía electrónica fueron bazo, riñón, pulmón, hígado, tonsila, timo y ganglio, de los cuales únicamente se le realizó estudio al hígado, dejando los otros órganos para estudios posteriores. De las muestras de hígado se trabajaron las de los testigos (0 horas) y las de conejos de 3, 9 y 18 horas de infección más uno de los conejos que murió espontáneamente durante el experimento después de 35 horas de haber sido inoculado.

8.1 Testigos

Se trabajó con animales de campo, no SPF, de tal forma que la evaluación de los cortes semifinos y finos permitió caracterizar con precisión la arquitectura del parénquima hepático así como la morfología de los componentes nucleares y citoplásmicos de los hepatocitos.

Inicialmente se observó a la cápsula de Glisson, tapizada externamente por células mesoteliales aplanadas con algunas microvellosidades en la superficie apical. Por debajo del mesotelio hubo presencia de haces de colágena con orientación diversa y en cantidad variable (Figura 23).

Subyacente a la colágena los sinusoides se observaron constantemente amplios, dispuestos en sentido paralelo al

mesotelio, los cuales a medida que se alejan de la cápsula de Glisson, reducen la luz y diversifican su dirección entre los cordones hepáticos hasta drenar directamente en la luz de la vena hepática. Dentro de los sinusoides se observaron eritrocitos, células de la serie blanca y algunas plaquetas. Los cordones hepáticos sin ningún cambio significativo, entre ellos la formación de canalículos biliares que en esta especie animal son discretamente dilatados y los cuales no mostraban material en su interior, ni modificación alguna de la superficie microvellosa de los mismos.

El espacio de Disse no mostró ningún cambio importante, se identificó un espacio estrecho y limpio con microvellosidades, formada a expensas de la superficie celular de los hepatocitos colindantes con dicho espacio (Figura 23). Interpuesto entre el espacio de Disse y la luz sinusoidal se observó un endotelio adelgazado con fenestras algunas de ellas muy abiertas y macrófagos caracterizados por típicos gránulos intracitoplasmáticos; la mayoría de macrófagos se encontraron libres en la luz sinusoidal, y otros formando parte de la pared sinusoidal (células de Kupffer).

Se reconocieron a las células de Ito, llamadas también células almacenadoras de vitamina A, localizadas a manera de cuña en el parénquima hepático y siempre adyacentes a un sinusoides. Citoplásmicamente contienen numerosas vacuolas de

grasa.

Los hepatocitos mostraron abundante glucógeno en forma de partículas a y dicreta cantidad de pigmento intracitoplasmático (Figura 23); abundante ergastoplasma localizado perinuclearmente (figura 24), un retículo liso poco desarrollado, numerosas mitocondrias y espacios intercelulares estrechos (Figura 23).

El núcleo presentó buena configuración de la cromatina, de los gránulos pericromatínicos y los intercromatínicos y del nucléolo (figura 24)

A.2. 3 horas post-inoculación

No se observaron cambios importantes comparados con los testigos. A excepción de las mitocondrias que presentaron una marcada densidad de la matriz mitocondrial que imprimen un aspecto de "tinción negativa" (Figuras 25 y 26).

A.3. 8 horas post-inoculación.

Enclavados en el parénquima hepático normal se observaron pequeñas zonas con desarreglo de los cordones hepáticos, no perceptibles bajo el microscopio de luz. Los hepatocitos de éstas zonas desorganizadas mostraron un citoplasma más granular que el observado en los controles, con mitocondrias hinchadas, diferentes tamaños, y en buen número de ellas las crestas mitocondriales mostraron figuras helicoidales (Figura 27 y 35).

R. 4. 18 horas post-inoculación.

En los corte semifinos se observó incremento de la colágena, subcapsular, formando en algunas zonas áreas de aspecto fibroso. El hepatocito muestra mayor lesión intracitoplásmica, el ergastoplasma perinuclear perdió la típica basofilia y se muestra de aspecto hialino. Los núcleos tienen nucléolos grandes intensamente teñidos, algunos con marginación de la cromatina, que sugirió a este nivel de corte semifino, cuerpos de inclusión que en los cortes finos observados al microscopio electrónico no se documentaron como tales. Se observó zonas de necrosis con aumento de células de la serie blanca.

En los corte finos se encontró pérdida de la organización de los cordones hepáticos; numerosos sinusoides estaban dilatados, congestionados, con material de aspecto proteináceo en su luz y en mucho de ellos se observaron amplias extensiones de pérdida de la pared endotelial del espacio de Disse y de las microvellosidades (Figura 28). En el citoplasma de los hepatocitos se presentaron áreas irregulares vacías; las mitocondrias con matriz anormalmente densa y pérdida del paralelismo de las cisternas del retículo endoplásmico, con fragmentación de las mismas. Los conductos biliares se observaron ligeramente dilatados sin alteración de sus complejos de unión.

En algunos núcleos que se conservaron dentro de límites normales con la cisterna perinuclear, poros nucleares, nucléolo, cromatina tanto periférica como en islotes se observaron suspendidos en el jugo nuclear estructuras anilladas diferentes a los gránulos pericromatínicos e intercromáticos, el diámetro de dichas estructuras midió entre 22 y 28 nm., observándose aisladas y en pequeños grupos formando cortas cadenas (Figura 29 y 35).

8.5 35 horas post-inoculación. Conejo muerto espontáneamente durante el experimento.

Los cortes semifinos revelaron sinusoides severamente dilatados con células de la serie blanca en su luz. El citoplasma de los hepatocitos mostró severa vacuolización e intranuclearmente presentaron densas condensaciones hipercromáticas compatibles con cuerpos de inclusión, mismos que fueron corroborados en los cortes finos (Figuras 30, 31 y 35).

Las observaciones en el microscopio electrónico documentaron: sinusoides dilatados, con numerosas células granulares tanto en la luz como localizadas alrededor de los vasos (Figura 30). Los hepatocitos perisinusoidales pierden sus límites celulares sin identificar las microvellosidades, espacios de Disse y solo en escasas zonas se conserva endotelio (Figura 30). El 80% de los hepatocitos presentaron vacuolización intracitoplásmica importante; la mayoría de

estas vacuolas presentaron membrana (grasa), otras vacuolas están originadas por dilatación de las cisternas del retículo rugoso y en una minoría de vacuolas no se pudo determinar su origen. Existen zonas de parénquima en donde es difícil de observar hepatocitos con citoplasma funcional debido a la pérdida de organelos y la hialinización del mismo (Figura 30).

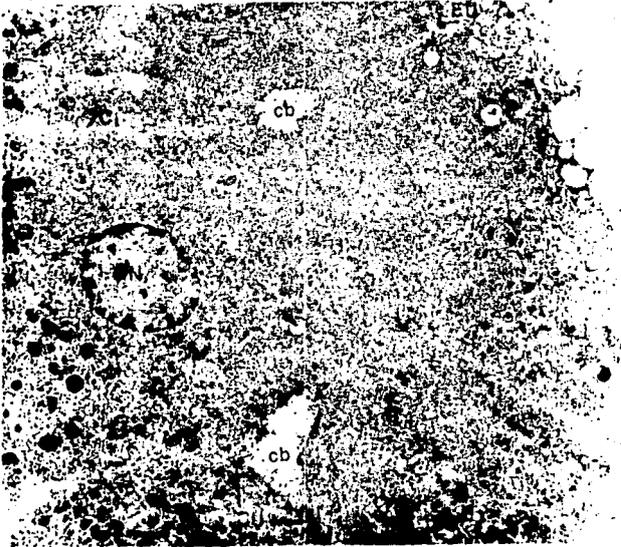


FIGURA 29. ASPECTO NORMAL DE HEPATOCITO DE UN CONEJO TESTIGO. SE CARACTERIZA POR PRESENTAR CONDUCTOS INTERCITOPLASMATICOS (ci) Y COMPLEJOS DE UNION NORMALES (cu), LOS CANALICULOS BILIARES DENTRO DE LIMITES NORMALES (cb), N= NUCLEO g= GLUCOGENO m= MITOCONDRIAS ED= ESPACIO DE DISSE. 4,286 X.

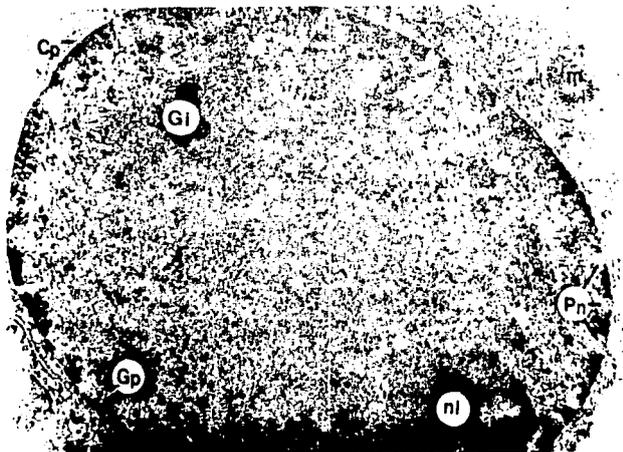


FIGURA 24. CARACTERIZACION DEL NUCLEO DE HEPATOCITO DE CONEJO TESTIGO. SE OBSERVA EL ARREGLO CROMATINICO DEL NUCLEOLO (nl). GRANULOS INTERCROMATINICOS (G). GRANULOS PERICROMATINICOS (Gp). POROS NUCLEARES (Pn). CISTERNA PERINUCLEAR (Cp). MITOCONDRIAS (m). 15,714 X.



FIGURA 25. PARTE DEL CITOPLASMA DE UN HEPATOCITO QUE MUESTRA UN NUCLEO NORMAL. HETEROCHROMATINA ASOCIADA A LA PERIFERIA INTERCITOPLASMATICA POR POROS NUCLEARES (Pn). GRANULOS INTERCROMATINICOS, CISTERNA PERINUCLEAR (Cp), RETICULO ENDOPLASMICO RUGOSO (RER), ZONAS DE RETICULO ENDOPLASMICO LISO (REL) Y ABUNDANTES ESTRIAS β DE GLUCOGENO EN ROSETA (G). CONEJO INFECTADO 9 HORAS ANTES. 8.750 X.



FIGURA 25. PLACAS DE HEPATOCITOS DE CONEJO CON 9 HORAS POST-INFECCION CON CARACTERISTICAS NORMALES. NOTESE LOS SINUSOIDES (S) EN SU LUZ UNA CELULA DE KUPFFER (K), EL ESPACIO DE DISSE (KD) CON SUS FENESTRACIONES Y SU PARED VASCULAR. UN SINUSOIDE DONDE SE OBSERVAN ALGUNOS GLOBULOS ROJOS (gr). CONDUCTOS BILIARES (cb) Y LOS NUCLEOS (N). 4,001X.

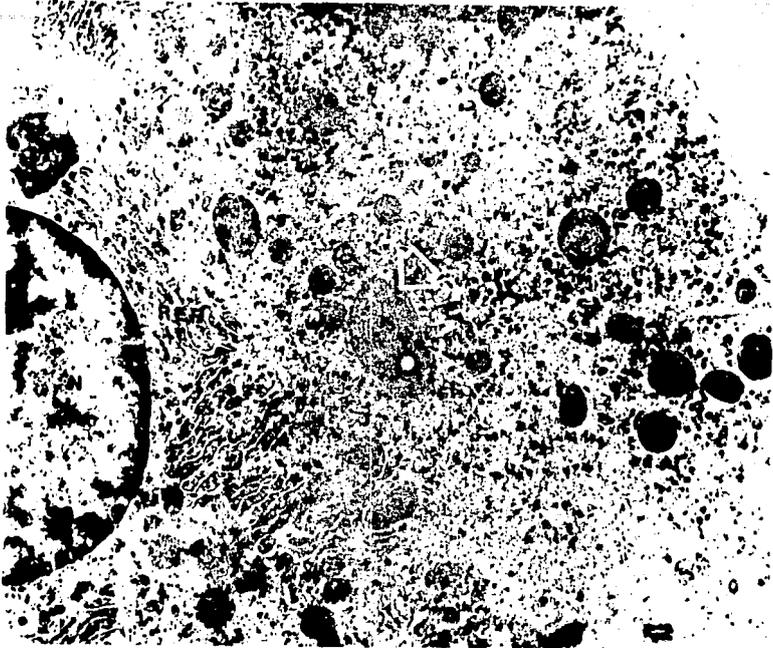


FIGURA 27. DETALLE DE CRESTAS MITOCONDRIALES CON ARREGLOS LAMINARES (FLECHAS). CONEJO DE 9 HORAS DE INFECCION. N= NUCLEO, RER= RETICULO ENDOPLASMICO RUGOSO. 27,420 X.

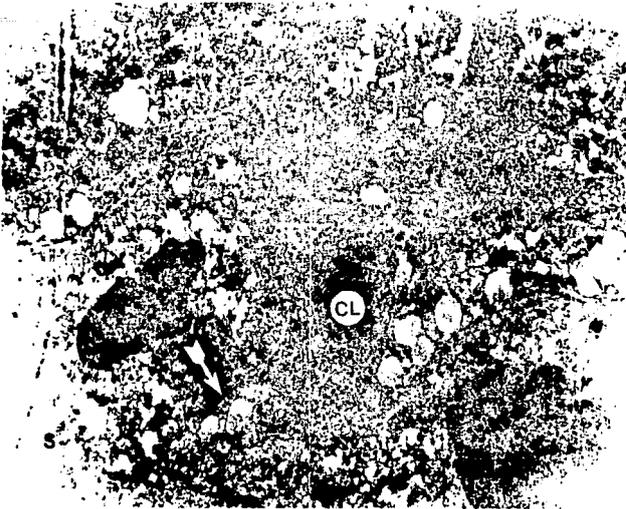


FIGURA 28. SE OBSERVA CELULA ITO (CL) CON DILATACION DEL RETICULO ENDOPLASMICO RUGOSO (FLECHA). LOS SINUSOIDES PRESENTAN ABUNDANTE MATERIAL PROTEINACEO EN SU LUZ (S) Y SE OBSERVA PERDIDA DE LA PARED VASCULAR. CONEJO DE 18 HORAS DE INFECCION. 5,140

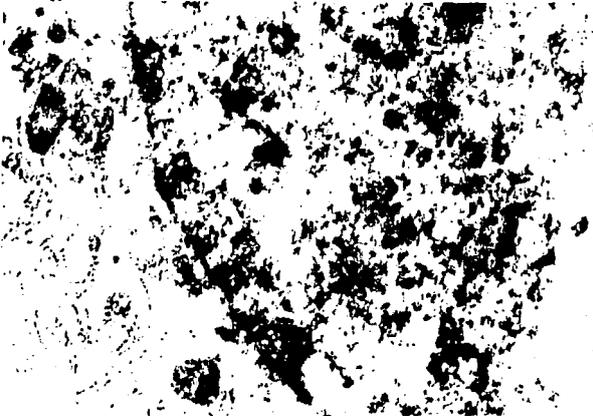


FIGURA 29. DETALIE DEL NUCLEO DE UN HEPATOCITO DE CONEJO CON 18 HORAS POST-INFECCION. NOTESE ALGUNAS ESFERAS INTRANUCLEARES VACIAS CORRESPONDIENTE A PARTICULAS VIRALES. 35,600 X

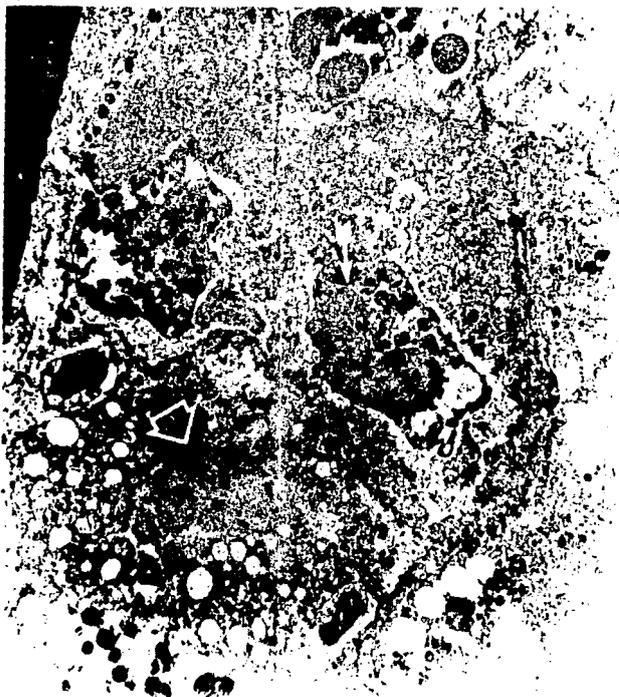


FIGURA 30. PANORAMICA DEL TEJIDO HEPATICO DE CONEJO MUERTO A LAS 95 HORAS, POST-INOCULO CON EL AGENTE DE LA ENFERMEDAD HEMORRAGICA VIRAL DE LOS CONEJOS. EL HEPATOCITO MUESTRA VACUOLIZACION INTRACITOPASMICA POR ESTEATOSIS Y LA PRESENCIA DE DOS CUERPOS DE INCLUSION INTRANUCLEARES (IB) (FLECHA GRUESA). SE OBSERVAN ZONAS DE DEPLECION DE GLUCOGENO. EN LA LUZ DEL SINUSOIDE SE OBSERVAN DOS CELULAS DE LA LINEA BLANCA (FLECHA DELGADA) Y ABUNDANTE MATERIAL PROTEINICO POR DAÑO DE LA PARED DEL SINUSOIDE. 4500 X.

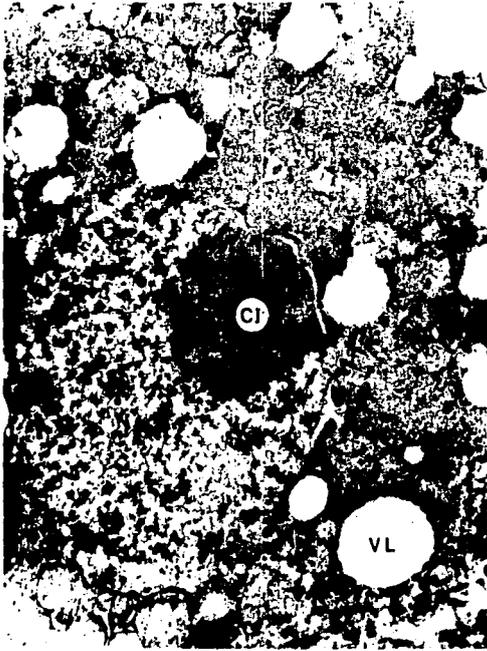


FIGURA 31. HEPATOCITO DE CONEJO MUERTO ESPONTANEAMENTE A LAS 95 HORAS POST-INOCULO CON EL AGENTE DE LA EHVC. SE DETALLA LA ALTERACION NUCLEAR (N) Y SE HA PERDIDO LA CISTERNA PERINUCLEAR, Y SE OBSERVA LA PRESENCIA DE UN CUERPO DE INCLUSION (CI). EN EL CITOPLASMA SE OBSERVAN MODERADAS GOTAS LIPIDICAS, DILATACION DEL RETICULO ENDOPLASMICO RUGOSO (RER). 14,857 x.

Las figuras de la 32 a la 35, nos muestran un resumen global de los signos clínicos, resultados hematológicos y de química sanguínea, las lesiones macro y microscópicas; y los resultados de inmunofluorescencia y microscopía electrónica más significativos durante el desarrollo del presente trabajo, asociadas a las horas post-inoculación y la gráfica de temperatura.

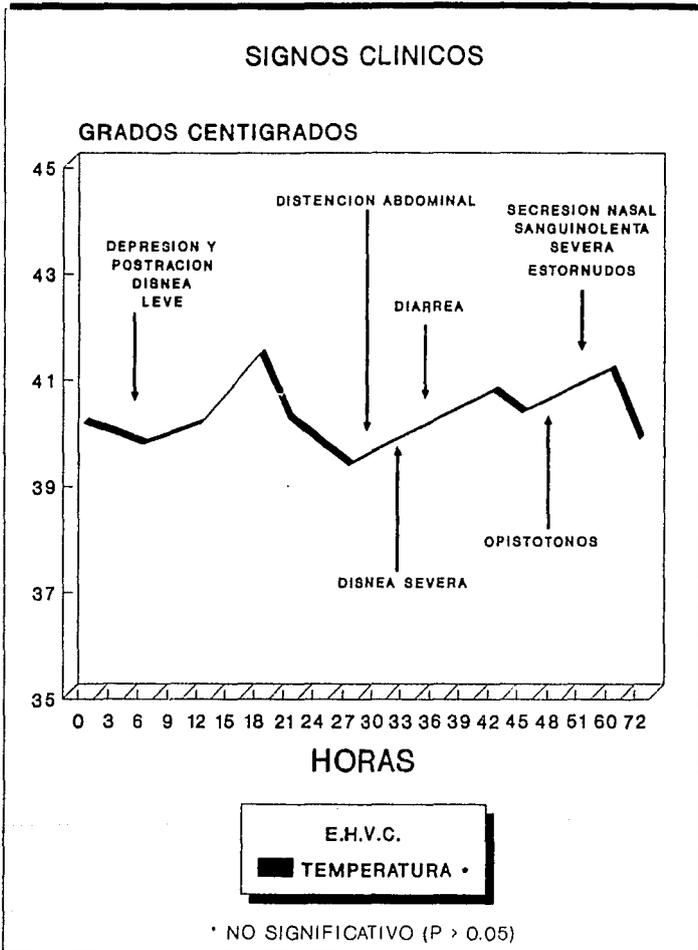
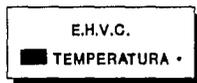
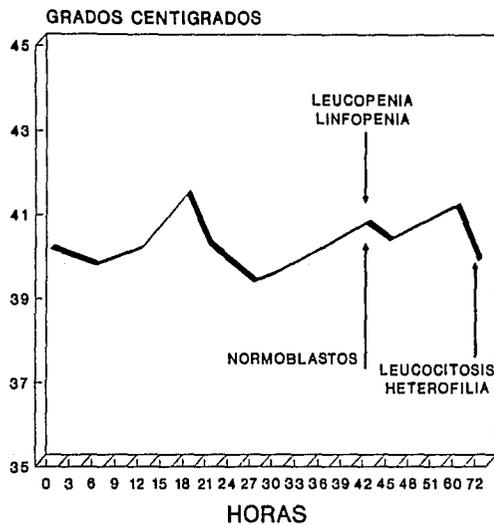


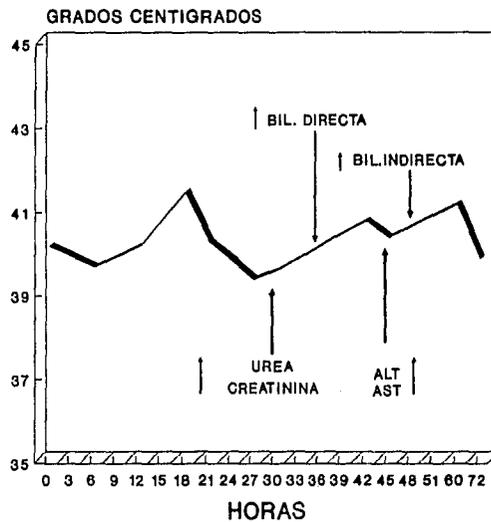
FIGURA 32. PRINCIPALES SIGNOS CLINICOS EN CONEJOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON EL AGENTE DE LA ENFERMEDAD HEMORRAGICA VIRAL DE LOS CONEJOS (E.H.V.C.)

HEMATOLOGIA



* NO SIGNIFICATIVO (P > 0.05)

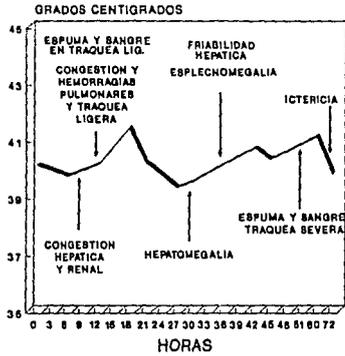
QUIMICA SANGUINEA



* NO SIGNIFICATIVO (P > 0.05)

FIGURA 33. RESUMEN DE LOS PRINCIPALES RESULTADOS DE HEMATOLOGIA Y QUIMICA SANGUINEA.

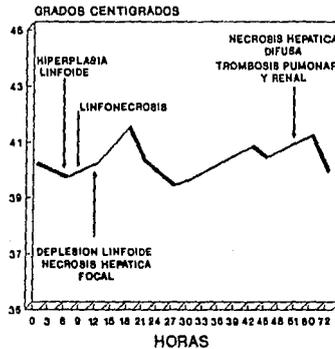
LESIONES MACROSCOPICAS



E.H.V.C.
 ■ TEMPERATURA

* NO SIGNIFICATIVO (P > 0.05)

LESIONES MICROSCOPICAS

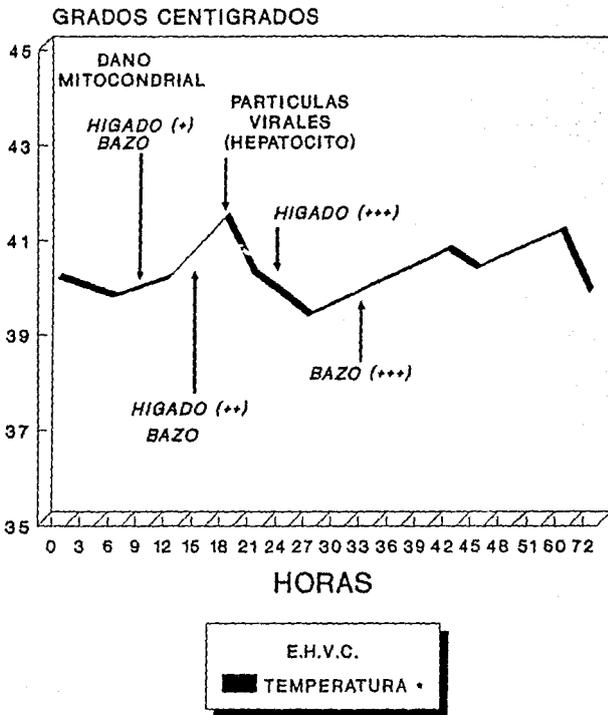


E.H.V.C.
 ■ TEMPERATURA

* NO SIGNIFICATIVO (P > 0.05)

FIGURA 34. PRINCIPALES LESIONES MACRO Y MICROSCOPICAS

INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA ELECTRONICA



• NO SIGNIFICATIVO (P > 0.05)

FIGURA 35. RESULTADOS DE INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA ELECTRONICA

VII- DISCUSION

Se ha estudiado poco la patogenia de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos, debido principalmente al curso de presentación agudo y a la muerte súbita que se observa en algunos casos, sin una signología específica. En el presente trabajo se intentaron establecer algunos puntos importantes sobre la secuencia de alteraciones patológicas por medio de estudios hematológicos, de química sanguínea, signología, estudios anatomopatológicos, inmunofluorescencia y microscopía electrónica en conejos inoculados por vía aerógena con macerado de órganos de animales infectados con la E.H.V.C.

Los cambios hematológicos mostraron una leucopenia y linfopenia, estos se observaron a partir de las 42 horas de infección en forma constante; debido a que el virus se replica en células linfoides, utilizando la velocidad de síntesis de DNA y RNA principalmente de blastos y células madres, produciendo linfocrosis semejante a la observada en órganos linfoides como bazo, ganglio y timo, lo que hace disminuir la producción de células linfoides⁶, llevando a los cambios antes anotados. Estos también han sido informados por otros autores^{10,20,28}.

En la biometría hemática se observó leucocitosis con heterofilia entre las 72 y 90 horas de inoculación, mostrando linfocitos dentro del rango normal bajo, esto es debido a una

infección secundaria asociada a agentes piógenos como *Pasteurella spp.*, este agente se encuentra normalmente y en forma latente en la cavidad nasal de los conejos⁶⁵, pero en circunstancias de estrés o inmunosupresión pueden convertirse en agentes patógenos, en este caso, asociándose a la leucopenia y linfopenia observada. Lo anterior explica la asociación de la *Pasteurella spp.* y otros agentes piógenos con la enfermedad como los describen Ciprian y col^{16,18}.

El aumento significativo de los heterófilos en banda demuestra una desviación hacia la izquierda por granulocitos inmaduros en sangre periférica, lo que indica una respuesta normal de la médula ósea a infecciones bacterianas⁸. Algunos conejos mostraron heterofilia con eosinofilia, debido posiblemente a estrés en el momento de tomar la muestra⁸.

Los trombocitos o plaquetas no mostraron cambios estadísticamente significativos, sin embargo la mayoría de los animales presentaron durante el experimento una trombocitopenia ligera, que asocian algunos autores^{2,8} a esplenomegalia, la cual se observó en los conejos desde las 9 horas y a la hiperagregación plaquetaria observada en la coagulación intravascular diseminada (CID), otros también la señalan por pérdida de trombocitos en sangrados⁸. Los conejos entre las 72 y 90 horas de infectados, mostraron trombocitosis, por estimulación plaquetaria asociada probablemente a la necrosis hepática que provoca la

liberación de gran cantidad de tromboplastina tisular⁶.

Los eosinófilos no mostraron cambio significativo a pesar de que la mayoría de los conejos incluyendo los testigos presentaron evidencia de infección leve por coccidias del género *Eimeria spp.* a nivel intestinal, con lo que se podría explicar la diarrea desde las 36 horas de infección en la mayoría de los animales.

No se observó ninguna relación entre los eritrocitos, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), concentración de hemoglobina corpuscular (CHCM) y la hemoglobina, con relación a las horas post-inoculación. Los normoblastos tuvieron un aumento significativo en horas avanzadas, indicándonos la respuesta medular. Algunos animales presentaron en forma individual ligera anisocitosis, formación de rouleaux y cuerpos de Howell Jolly, cambios que sugieren un problema de anemia^{6,7a}.

Las proteínas plasmáticas no tuvieron cambios importantes con relación al tiempo de inoculación, solo en casos aislados se observó un ligero aumento atribuible a deshidratación ligera en animales postrados y deprimidos.

Debe mencionarse que los conejos testigo, se mantuvieron dentro de los parámetros normales hemáticos descritos por Benirschke y col⁷ y Zenteno^{8a}.

La úrea y la creatinina los cuales son componentes

nitrogenados de la orina, son los indicadores más importantes de la intensidad de filtración glomerular. La úrea se forma en el hígado a partir del amoníaco liberado por la desaminación de aminoácidos, siendo en esta forma en la que se elimina la mayor parte del nitrógeno, la úrea es resorbida activa y pasivamente al cruzar por el túbulo, esta cantidad depende de la intensidad del flujo sanguíneo, que cuando es lento puede ser resorbido hasta el 90% y sus niveles en plasma aumentan; si el flujo es rápido entonces se resorbe el 30%, disminuyendo en el plasma⁴⁴. La creatinina es un metabolito formado de la creatina, esta pasa por el filtrado glomerular y es secretada por los túbulos⁴⁴. En el presente trabajo se observó un aumento significativo en estos dos metabolitos, incremento que se hizo manifiesto a partir de las 30 horas, lo que indica una alteración en el funcionamiento renal. En cuanto a úrea se esperaría una disminución debido al daño hepático, pero al no haber filtración a nivel glomerular se retiene lo poco que está siendo metabolizado por el hígado, y se refleja como un aumento sérico. Esta alteración renal fue corroborada con el estudio anatomopatológico donde se observa en riñón una alteración vascular aguda importante desde las 9 horas con trombosis en los animales que murieron espontáneamente durante el experimento.

En otros estudios de química sanguínea se determinaron los niveles de bilirrubinas tanto directa como indirecta,

siendo el aumento de la primera altamente significativa ($P < 0.01$) desde las 42 horas, mientras que la segunda aunque no fue significativo, tuvo tendencia a aumentar después de las 40 horas de inoculación. Un factor que pudo contribuir a la no significancia de los cambios de la bilirrubina indirecta fue la escasa cantidad de muestras analizada debido a la poca cantidad de suero que en algunos casos solo alcanzó para la determinación de la bilirrubina directa.

La bilirrubina es el producto natural de la destrucción de los eritrocitos, la cual se lleva a cabo en forma natural en el Sistema Mononuclear Fagocítico, donde se libera el hierro, la protoporfirina y la globina. La fracción protoporfirina forma un compuesto tetrapirrol de cadena abierta, la biliverdina, la que es reducida principalmente en los macrófagos del bazo para ser liberada en forma de bilirrubina libre o indirecta y llevada en forma insoluble en agua al hígado por la albumina para transformarse por medio de la conjugación con ácido glucorónico en bilirrubina soluble en agua (bilirrubina directa o conjugada) y ser excretada por el hígado^{75,82,83}; al aumentarse esta nos indica una deficiencia en la conjugación debida a un daño hepatocelular, demostrado con el estudio anatomopatológico donde se observó desde hepatitis hasta necrosis severa difusa tal como lo indican la mayoría de los autores^{4,12,15,27,39,87}. Un aumento importante de las bilirrubinas produce ictericia en los tejidos⁵⁰, tal como se

observó en animales a horas avanzadas de infección.

Algunas enzimas son producidas en el hígado, sin embargo muchas de estas enzimas se encuentran en otros órganos restandole especificidad pero no utilidad a la prueba, es por eso que la alanino aspartasa transferasa (ALT), antes TGO, además de encontrarse en hígado, se encuentra en corazón y músculo, aunque en procesos inflamatorios de hígado sufre elevaciones importantes⁷³; y la alanín-sorbitol transferasa (AST), antes TGP, es una enzima que se encuentra en gran cantidad en el hígado y en pequeñas cantidades en riñón, de forma que el aumento considerable en suero se ha considerado órgano-específica del hígado⁷⁵. Durante el trabajo estas enzimas mostraron un aumento altamente significativo ($P < 0.01$) a partir de las 42 horas, lo que nos indica una alteración funcional hepática importante en relación con el tiempo post-inoculación.

La fosfatasa alcalina hidroliza ésteres monofosfóricos con la liberación de fosfatos inorgánicos. Esta enzima, se encuentra en huesos, placenta, intestino, hepatocitos y células epiteliales biliares, y sin valoración isoenzimática, es imposible determinar el tejido donde se originó. Por ello su aumento en suero no es un hallazgo específico de daño hepático, pero cuando este está afectado se observa un aumento, posiblemente como resultado de una mayor producción de isoenzima I que facilita la excreción de colina en

bilis²⁶. Los valores de esta enzima durante el experimento se elevaron a partir de las 45 horas, y esto aunado al aumento de otras enzimas nos demuestra el daño hepático.

En el examen general de orina se observó un cambio estadísticamente significativo en la gravedad específica y el pH, con tendencia a aumentar el primero y a disminuir el segundo. La gravedad específica refleja la capacidad de concentración y dilución por parte del riñón, el aumento en este parámetro está asociado a deshidratación, fiebre y estados iniciales de nefritis aguda⁴, el pH se encuentra disminuido en infecciones y fiebre⁸.

Las proteínas en orina tuvieron inicialmente un incremento debido al aumento de la permeabilidad capilar por la congestión y posteriormente por la disminución de la reabsorción de estas en los túbulos debido al daño tubular⁴⁰, cambio que se detectó desde las 30 horas, al igual que el sangrado por la congestión y hemorragias que se presentaron en este órgano.

El aumento de urobilinógeno en orina, fue importante desde las 36 horas, demostrando la incapacidad de ser eliminado este metabolito por la circulación porta debido al daño hepatocelular.

Los signos clínicos más importantes fueron depresión y postración notorio desde las 6 horas, la disnea fue un signo

común desde las 12 horas, asociado a la infección y fiebre. La diarrea se apareció desde las 36 horas. La distensión abdominal se presentó con variación desde las 30 horas. La secreción nasal sanguinolenta fue severa desde las 51 horas y en los animales que murieron espontáneamente durante el experimento. Los estornudos se presentaron desde las 33 horas, al igual que los apistótonos, signos que han sido descritos por diferentes autores^{5,17,19,32,42,52,88}.

La signología nerviosa y chillidos no fueron observados durante el trabajo, la muerte súbita se presentó en tres conejos a las 35, 47 y 87 horas de infección, pero sin la presentación de cuadros convulsivos como lo indican Argüello y col^{9,4,5}.

Las constantes fisiológicas variaron continuamente, observándose en la temperatura un pico de hipotermia a las 18 horas y otro a las 42, concordando con los datos de varios autores^{5,52,88}. El primer pico se podría explicar como resultado de una viremia, donde el organismo aumenta su temperatura corporal por la presencia de un agente infeccioso⁵⁰; y el segundo por una infección generalizada en diferentes órganos como son el hígado y riñón. Las constantes de frecuencia respiratoria y cardíaca tuvieron diferente respuesta de acuerdo al estado del animal en el momento del sacrificio.

Las lesiones anatomopatológicas macro y microscópicas

revelan principalmente una disfunción vascular caracterizada por congestión, hemorragias y trombosis, como lo indica Xu y col.⁶⁶, siendo los órganos más importantes hígado, riñón, tráquea, pulmón e intestino, cambios que se empezaron a manifestar desde las 12 horas post-inoculación.

El órgano con los cambios más importantes durante el presente estudio fue el hígado, mostrando cambios macroscópicos congestivos que se comenzaron a notar en forma ligera desde las 6 horas, paralelamente con la palidez del órgano, con posterior aumento del tamaño del órgano (hepatomegalia), hallazgo constante desde las 30 horas, y friabilidad desde las 36 horas de infección; esto concuerda con los cambios histopatológicos donde se observó inicialmente degeneración desde las 9 horas, pasando a necrosis hepatocelular de focal a difusa con el aumento del tiempo, como se observa en la figura 15, todo correlacionado con los datos obtenidos en hematología y química sanguínea donde se observó el aumento de algunos metabolitos y enzimas producidos en el hígado.

Los problemas digestivos como la distensión cecal y estomacal se han observado en casos de campo en México^{19,20}; aunque en Europa no es un hallazgo común; problemas que estarían más asociados a la presencia de parásitos como las coccidias.

La esplenomegalia con depleción linfóide y necrosis de

Linfocitos fue otro cambio importante para demostrar la posible replicación del virus en éstas células; esto estaría corroborado con el estudio de inmunofluorescencia donde se observan grupos de células fluorescentes desde las 9 horas, con igual resultado en hígado, lo que muestra a estos dos órganos como sitio importante de replicación como lo propone Gregg^{41,42}, indicando que la replicación inicial del virus es a nivel intestinal en las vellosidades y criptas del intestino, en el núcleo de los hepatocitos y en los linfocitos esplénicos demostrados por el método de inmunohistoquímica con el complejo avidina-biotina. En el presente trabajo no fue posible demostrar la replicación intestinal, sin embargo se observó necrosis intestinal severa en un conejo. Este cambio puede estar asociado a infección con coccidias del género *Eimeria spp.*, lo cual fue un hallazgo común en la mayoría de los animales.

Otras lesiones encontradas como fibrosis e infiltrado periportal de mononucleares en hígado, asociadas a infecciones crónicas con *Eimeria stidae*, que parasita los conductos biliares en conejos⁷³ y la nefritis intersticial, no son lesiones atribuibles a la EHVC, debido al tiempo de desarrollo de las mismas, las cuales no se forman en un período de tiempo tan corto, con lo que también se demuestra que muchos animales a pesar de estar clínicamente sanos, pueden ser portadores de algunos agentes potencialmente patógenos. Para un mejor entendimiento de los cambios que

produce el virus en forma controlada, podrían utilizarse conejos S.P.F.

La presencia de trombos y microtrombos, fue una lesión importante, porque se puede atribuir a estos la causa directa de la muerte. La trombosis se observó principalmente en órganos como pulmón, riñón, en menor proporción en intestino y meninges, sugiriéndose un fenómeno de coagulación intravascular diseminada (CID), que como lo señalan algunos autores^{P. 81}, es debida principalmente a daño tisular extensivo, a neoplasias, reacciones inmunológicas sistémicas (Incluyendo anafilaxia) o a infecciones agudas especialmente septicémicas. Esta trombosis podría estar asociada a la severa necrosis hepática, debida a replicación viral masiva, lo que hace que se libere tromboplastina tisular activando el sistema extrínseco de la coagulación; aunque en el presente trabajo no se valoró esta proteína, y producir la coagulopatía por desgaste de los factores de coagulación aunado a la disminución de los factores V, VII, IX, X, XI, XII que normalmente se sintetizan en el hígado^B; la tendencia hemorrágica que ocasiona la disminución de los factores de coagulación se agrava con la activación secundaria del sistema trombolítico con formación de productos de degradación de la fibrina que tienen propiedades anticoagulantes^{P. 82}. Este esquema fue propuesto por Lavazza y col.⁵⁸, quien también propone un posible daño endotelial como consecuencia directa del virus sobre el endotelio, aunque los

estudios microscópicos de este trabajo no revelan un daño directo sobre los vasos.

Otros autores^{52,88}, han descrito como posible patogenia la liberación de mediadores inflamatorios como histamina de las células cebadas produciendo una reacción alérgica de tipo I, este modelo estaría por demostrar; o la asociación de depósitos de complejos inmunes e inmunoglobulinas, aunque por el curso tan corto de la enfermedad el último modelo puede ser descartado.

El edema pulmonar severo, que para algunos autores^{9,40,42}, ha sido un hallazgo importante, en el presente trabajo no tuvo una significancia revelante, se observó únicamente en animales que murieron espontáneamente durante el experimento. Algunos autores⁴¹, proponen que el edema pulmonar es causado por una falla cardíaca por necrosis del miocardio, lo cual no se observó durante el presente trabajo ya que los cambios vasculares se asocian a trombosis.

Ultraestructuralmente, únicamente se realizaron estudios en hígado, de testigos y conejos sacrificados a las 3, 9 y 18 horas post-infección, más un animal que murió espontáneamente a las 35 horas. Debido a fallas técnicas los otros órganos serán analizados posteriormente.

El microscopio electrónico por su amplia capacidad resolutive (de 1 a 2 Å), permite explorar organizaciones

intracelulares, niveles macromoleculares tisulares y visualizar directamente viriones⁷⁶.

La revisión de cortes semifinos y finos de los conejos testigo permitió caracterizar la estructura fina del hígado encontrándolo dentro de los parámetros señalados por Ghadially⁹⁷ y Rouller y col.⁷⁶

Dos atipias se observaron uno a nivel de la matriz mitocondrial observándose densas de tal forma que las crestas mitocondriales se mostraron como si hubieran sido teñidas negativamente. Cabe destacar que de todos los componentes del hígado la densidad de la matriz mitocondrial señalada es poco usual en condiciones normales, encontrándose únicamente en los hepatocitos.

Las mitocondrias centrales energéticas de las células, son organelos con una morfología ultraestructural básica, que permite identificarlas en cualquier célula eucariótica aeróbica de cualquier especie animal. Están muy bien documentadas las innumerables variaciones ultraestructurales, que pueden presentarse por diferencia de especie animal, de tejidos u órganos, variaciones morfológicas mitocondriales generadas en diferentes estadios de actividad fisiológica y funcional y por último por diversas patologías⁹⁷.

La inusual densidad de la matriz mitocondrial observada en los hepatocitos de los testigos, hasta este momento

sugerimos que se trata de una característica del conejo, ya que también se ha observado en las mitocondrias del epitelio renal de testigos de la misma especie animal, utilizada en otros estudios llevados a cabo. El segundo cambio observado, se refiere a la dilatación de la luz de los canaliculos biliares evidente en el microscopio de luz (cortes semifinos), en canaliculos incididos longitudinalmente.

El cambio ultraestructural más importante observado a las 9 horas fue en las mitocondrias, observándose incremento del volumen y el arreglo peculiar de las crestas mitocondriales y la presencia de formaciones membranosas de tipo concéntrico, espiral y anulares, los cuales pueden ser un hallazgo asociado a un hipermetabolismo por falta del acoplamiento de la fosforilación oxidativa por metabolismo activo en estados iniciales y más tarde sufrir algunos cambios degenerativos⁹⁷. El incremento de la densidad y tamaño de las mitocondrias puede estar dado por el aumento de calcio observado en algunos procesos en los cuales se produce necrosis focal y en un aumento de la función mitocondrial⁹⁷.

Los mismos cambios mitocondriales se observaron en las muestras de 18 y 35 horas, encontrándose además en el citoplasma ligera vacuolización, aunque no se pudo determinar el origen de la misma, Ghandially⁹⁷, lo asocia a la presencia de triglicéridos de ácidos grasos que forman inclusiones lipídicas las cuales se observan como gotas grandes o

pequeñas dependiendo de la situación fisiológica o patológica. Normalmente se encuentran pocas gotas lo que representa una fuente de energía, pero el depósito de lípidos en gran cantidad en el parénquima son sugestivos de una degeneración grasa; aunque estas inclusiones no están limitadas por una membrana trilaminar verdadera, si lo están con un anillo cromafílico o estructura parecida a membrana alrededor de la gota lipídica⁹⁷, estructura que en algunos hepatocitos no se presentó, por lo que no se puede catalogar como lipídica. Otras posibilidades que propone el mismo autor⁹⁷, son la dilatación y vacuolización del retículo endoplásmico rugoso, el cual corresponde a un sistema de ribosomas paralelos en el citoplasma, localizados como un sistema de elementos tubulares y vesiculares llamados cisternas que se continúan con el sistema perinuclear formando el ergastoplasma. Esta dilatación puede deberse al aumento de agua o almacenamiento de productos secretorios; el incremento de agua puede dilatar esta cisterna, al igual que las mitocondrias, retículo de Golgi; el término dilatación indica que el retículo endoplásmico rugoso se ha roto formando discretas vesículas o grandes vacuolas, las cuales se producen en lesiones avanzadas como puede ser daño hepático y obstrucción biliar⁹⁷.

La presencia de gránulos pericromáticos los cuales son electrodensos, esféricos y sueltos, descansando en los bordes del área cromatinica del núcleo y los gránulos

intercromatínicos altamente electrodensos fueron un hallazgo normal en el hepatocito⁸⁷, pero por su forma de presentación deben diferenciarse de partículas virales.

En el hepatocito del conejo de 18 horas de infección, se observaron estructuras intranucleares anilladas que oscilan entre 16 a 20 nm de diámetro, las cuales son sugestivas de corresponder a partículas virales, que por sus características morfológicas y su localización son semejantes al parvovirus descrito por Gregg y col^{39,40,41}. La única diferencia con el picornavirus es que este se localiza en el citoplasma y no en el núcleo como se observó en el presente trabajo.

En el conejo que murió a la 35 horas, se observaron cambios más avanzados, tales como severa vacualización intracitoplásmica que podría corresponder a los cambios antes mencionados, marginación de la cromatina, lo que podría sugerir muerte celular. Se observaron grandes cuerpos de inclusión intranucleares con aspecto filamentar, que están asociados a infecciones virales. Este material podría corresponder a proteína viral, precursores de partículas virales. En este trabajo no se encontraron partículas virales en el conejo de 36 horas, como las observadas en el conejo de 18 horas, lo que nos puede sugerir por la positividad de la inmunofluorescencia correspondan a proteína viral.

El análisis integral de los resultados obtenidos

determinan que el virus de la EHVC, tienen su replicación en órganos linfoides y hepatocitos desde las 9 horas, aunque sin determinar el sitio inicial de replicación; la asociación de la enfermedad con agentes secundarios debido a la inmunosupresión observada en los animales, la cual fue corroborada con los estudios hematológicos e histopatológicos encontrándose leucopenia con linfopenia y necrosis linfoide.

Se observaron los cambios anatomopatológicos progresivos de congestión y hemorragia en órganos importantes como hígado, bazo, riñón, tráquea y pulmón; siendo la lesión hepática la más importante corroborándose por la dramática elevación de las enzimas hepáticas. Esta alteración hepática pudiera así mismo producir la liberación de tromboplastina tisular y activar un fenómeno similar a la coagulación intravascular diseminada (CID), por la vía extrínseca y de esta manera explicar los cambios vasculares de trombosis principalmente en riñón y pulmón. A través del estudio de enzimas y productos del metabolismo se pudo demostrar la elevación de úrea, creatinina, fosfatasa alcalina, bilirrubina y transaminasas desde las 30 horas, lo que implica alteraciones funcionales en hígado y riñones (Figura 32).

La inoculación por vía aerógena del agente de la EHVC, permitió demostrar los cambios secuenciales anatomopatológicos e histopatológicos como fueron las

alteraciones hepáticas, los cambios vasculares y la esplenomegalia con necrosis linfóide las cuales se observan desde las 18 horas.

Las anteriores alteraciones fueron corroboradas con las variaciones secuenciales de los valores hematológicos siendo el principal la leucopenia con linfopenia siendo constante desde las 42 horas post-inoculación.

Se establecieron las variaciones sucesivas de los valores séricos de algunas enzimas y metabolitos, encontrándose aumentos significativos en bilirrubina, fosfatasa alcalina, A.L.T y A.S.T. a partir de las 45 horas de infección.

Se determino por medio de las pruebas de inmunofluorescencia y ultraestructura la presencia de partículas virales de forma anillada, con un diámetro entre 16 y 20 nm e intranucleares, los cuales por su morfología y localización podrían corresponder a parvovirus.

Se encontró una asociación entre las bacterias piógenas y el agente de EHVC, lo cual se hizo evidente después de las 72 horas.

Son pocos los trabajos realizados con relación a la patogenia de la enfermedad, se puede decir que es necesario seguir investigando más a fondo acerca del virus y su clasificación, al igual que desarrollar investigación

detallada con respecto a la dinámica de los factores de coagulación, la susceptibilidad de diversos tejidos dependiendo de la vía de entrada del agente y la relación con la eliminación del virus por los animales enfermos y convalecientes para demostrar el estado de portador de algunos animales.

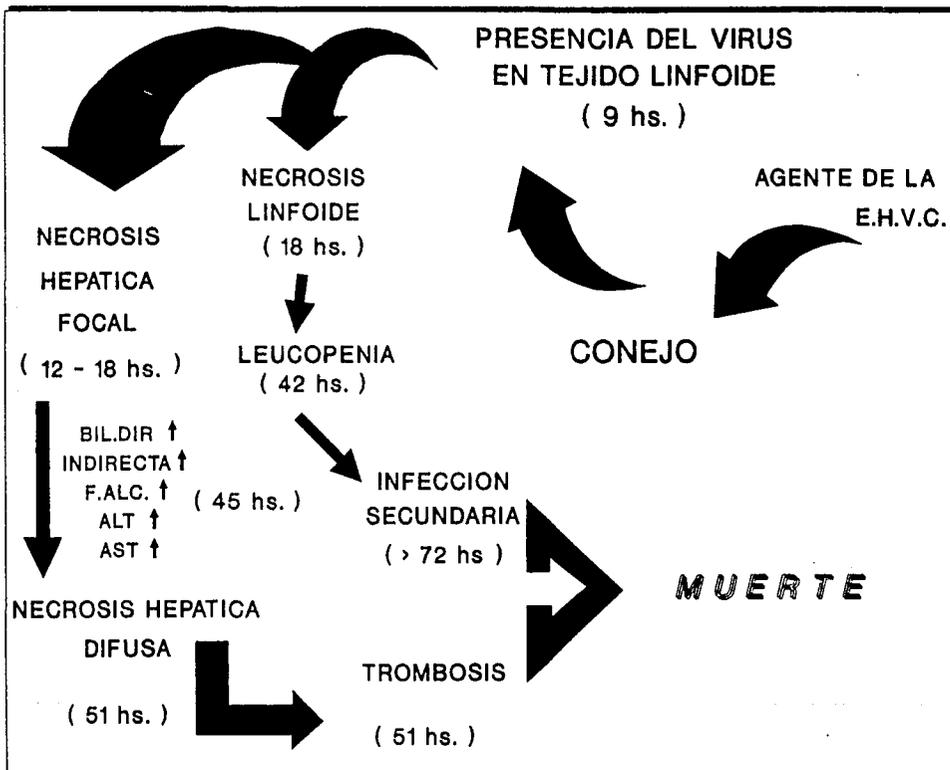


FIGURA 36. POSIBLE PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD HEMORRAGICA VIRAL DE LOS CONEJOS (E.H.V.C.)

LITERATURA CITADA

- 1- Aluja, A. S.; Rossi, A.: Manual de necropsias de los animales domésticos. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. México (1977).*
- 2- Ambriz Fernández, R.: Alteraciones benignas y malignas de los trombocitos. En temas selectos de laboratorio clínico. Memoria. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.* pp 33 -37. México. (1986).
- 3- Argüello, J.J.: Enfermedad Virica hemorrágica de los conejos en España. *Laboratorios Overo S.A. Leon.* p.p. 1 - 7 España (1989).
- 4- Argüello Villares, J.L.; Llanos Pellitero, A.; Pérez - Ordoño, J.I.: Contribución al estudio de la Enfermedad Virica Hemorrágica del Conejo. *Servicio Técnico de Laboratorios Overo S.A. Leon.* p.p. 58 - 60 España (1988).
- 5- Argüello Villares, J.L.; Llanos Pellitero, A.; Pérez-Ordoño, J.I.: Enfermedad Virica Hemorrágica del Conejo en España. *Med. Vet. Vol 5 (12):* 645-650. (1988).
- 6- Asociación Española de Cunicultura: Informe de la Asociación Española de Cunicultura sobre la llamada: "Enfermedad Virica Hemorrágica del Conejo". *Asociación Española de Cunicultura.* España (1989).
- 7- Benirschke, K.; Garner, F.M.; Jones, T.C.: Pathology of laboratory animals. Vol.I y II. *Springer-Verlang Inc.* 2a. Edition. New york. (1978).
- 8- Benjamín, M.M.: Manual de Patología Clínica en Veterinaria. *Edit. Limusa.* 1a. Edición.pp: 97 - 99. México. (1984).
- 9- Blood, D.C.; Rodostist, O.M.; Henderson, J.A.; Arandel, J.H.; Gay, C.C.: Medicina Veterinaria. *Ed. Interamericana.* 5a. Edición. pp: 331. México. (1986).
- 10- Bloom, W.; Fawcett, D.W.: A textbook of Histology. *W.B. Saunders Company.* 9a. Edición. Philadelphia (1970).
- 11- Bowman, W.C.; Rand, M.I.: Farmacología. Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas. *Ed. Interamericana.* 2a. Edición. pp: 27.1 - 27.33. México D.F. (1985).

- 12- Buonovoglia, C.; Di Trani, L.; Di Pasquale, R.; Tinari, A.; Ruggen, F.M.; Galassi, D.: Sui recenti episodi di mortalità nei conigli in Italia (Nota preliminar). *Sel. Vet. XXIX* (10): 1509-1510. (1988).
- 13- Cancelotti, F.M.; Villeri, C.; Renzi, M.; Monfredini, R.J.: Le insidie della malattia "X" del conigliaco. *Revista de Conglicoltura XXV(9)*: 41-46. (1988).
- 14- Cancelotti, F.M.; Renzi, M.; Vecchi, G.; Villereni, C.: Considerazioni derivati da esperienze maturate nel corso di focali di Malattia emorragica virale nell'Italia del Nord. *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Padova* (1988).
- 15- Cao, S.Z.; Liu, S.G.; Gan, M.H.; Liu, R.P.; Cai, S.; Liu, S.F.: A preliminary report on viral haemorrhagic pneumonia (tentative name) in rabbits. *Chinese Journal of Veterinary Medicine. 12(4)*: 9-11. (1986).
- 16- Ciprian, C.A.; Colmenares, G.; Mendoza, S.; Gonzalez G.S.; Tórtora, J.; Hernández, B.E.: Hepatitis Hemorrágica de los Conejos. Informe experimental realizado por el Departamento de Epizootiología del GENID, microbiología del INIFA y los departamentos de Virología y Patología el de Microscopio y Microscopía Electrónica de la Coordinación General de Investigación y Estudios de Posgrado de la FES-Cuautitlan. (1988).
- 17- Ciprian, C.A.; Colmenares, V.G.; Mendoza, E.S.; Hernández, B.E.: Descripción de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). Reunión Nacional de Investigación Pecuaria 1989. Memoria. *Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia. UNAM. México.* (1989).
- 18- Ciprian, C.A.; Colmenares, V.G.; Mendoza, E.S.; Hernández, B.E.: Posible interacción entre la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC) y *Pasteurella spp.* Reunión Nacional de Investigación Pecuaria 1989. Memoria. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México* (1989).
- 19- Comisión México-Estados Unidos, para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los animales (C.P.A.): Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos. *Bol. Extra de la C.P.A. México* (1989).

- 20- Comisión México-Estados Unidos, para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los animales: Operación del Sistema Nacional de Emergencia (SINFESA) de México para la erradicación del brote de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). *Boletín C.P.A. Vol.2 (2): 4 - 12 (1989).*
- 21- Contera, G.: La Nueva Enfermedad Hemorrágica del Conejo. En: *Enfermedad Virica Hemorrágica del Conejo en España. Gallina Blanca Purina. p.p.3 - 12. España (1989).*
- 22- Contera G.: Verona y Valencia: Cumbres técnicas internacionales acerca de la Enfermedad Virica Hemorrágica del Conejo. *Gallina Blanca Purina. España (1989).*
- 23- Chao L.,G.L.; Chal, L.: Contribution à l'étude de la Pneumonia Hemorrhagique Virale du Lapin. *Chin. Journ. Vet. Med. 12: 9 - 11 (1988).*
- 24- Dirección general de Fomento y Protección Pecuaria: Información Oficial sobre el Síndrome Neumo-hepático en Conejos. *Dirección General de Fomento y Protección Pecuaria. México.(1989).*
- 25- Draper, N.R.; Smith, H.: Applied regression analysis. *John Wiley & Sons. Second edition. New York. (1981).*
- 26- Doxey, D.I.: Patología clínica y procedimientos de diagnóstico en veterinaria. *Ed. El Manual Moderno. pp: 53 - 61. (1983).*
- 27- Facchin, F.: La Maladie " X" des Lapins. *Cuniculture No.84. 15(6): 275 - 276. (1988).*
- 28- Fernandez M., J.C.; Garcia E., R.M.: Biometría hemática. Temas Selectos de Laboratorio Clínico. *Memoria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. pp: 61 - 71 México (1986).*
- 29- Fraire C., M.; Benítez P.,J.; Velázquez E.,A.: Pruebas de hemaglutinación (HA), Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA) e Inmunofluorescencia (IF), aplicadas al diagnóstico de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). *Reunión Nacional de Investigación Pecuaria 1989. Memoria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México (1989).*

- 30- Fraire C., M.; Hamdy, F.; Saldivar Z.,E.; Gay G.,M.: Determinación de animales portadores del virus de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). Reunión Nacional de Investigación Pecuaria 1989. Memoria. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México (1989).*
- 31- Fraire C.,M.; Hamdy, F.; Saldivar Z.,E.; Gay, G.M.: estudio sobre la susceptibilidad de los Teporingos (*Romerolagus diazi*) al virus de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). Reunión Nacional de Investigación Pecuaria 1989. Memoria. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México. (1989).*
- 32- Gallina Blanca Purina. anexo I. Información bibliográfica de la Enfermedad hemorrágica Virica del Conejo en España. *Gallina Blanca Purina. España (1989).*
- 33- Gallina Blanca Purina. Anexo II: La recogida y envío de muestras. En Enfermedad Hemorrágica Virica del Conejo en España. *Gallina Blanca Purina. España. (1989).*
- 34- Gallina Blanca Purina. Anexo III: Revista de prensa de la Enfermedad Virica Hemorrágica del Conejo en España. *Gallina Blanca Purina. España (1989).*
- 35- Gay, G.M.; Hamdy, M.F.: Prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación en microtécnica con muestras de sangre obtenidas con papel filtro para el serodiagnóstico de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). Reunión Nacional de Investigación Pecuaria 1989. Memoria. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México (1989).*
- 36- Gay, G.M.; Zamora, R.H.; Hamdy, M.F.: Determinación del estado de portador en sobrevivientes dos meses después de un brote de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). Reunión Nacional de Investigación Pecuaria 1989. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. Memoria. México. (1989).*
- 37- Ghandially, F.N.: Ultrastructural pathology of the cell and matrix. *Butterworths & Co. Second edition. (1982).*
- 38- Godínez A.,A.: La Cunicultura como alternativa de solución en la alimentación Nacional. En Seminario de la situación y perspectivas de la Cunicultura en México. *Universidad Autónoma de Chapingo. p.p.1 - 7 (1987).*
- 39- Gregg, D.A.; House, C.: Necrotic Hepatitis of rabbits in Mexico: A parvovirus. *Veterinary Record 125(24): 603 - 604. (1989).*

- 40- Gregg, D.; House, C.: Necrotic Hepatitis of rabbits: a fatal new parvoviral disease of rabbits. *In press*. (1990).
- 41- Gregg, D.; Wilson, T.; House, C.: Necrotic Hepatitis of rabbits: A Parvovirus. *Foreign Animal Disease Report*. 17(2): 7 - 10. (1989).
- 42- Gregg, D.A.; House, C.: Necrotic hepatitis of rabbits: A fatal new parvoviral disease of rabbits. *Foreign Animal Disease Diagnostic Laboratory*. Greenport, N.Y. (1989).
- 43- Gu, Z.D.; Wang, X.X.; Li, Q.Z.; Sun, F.F.: An inactivated vaccine against Haemorrhagic Pneumonia in Rabbits. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*. 12(2): 60 - 61. (1986).
- 44- Gu, Z.D.; Wang, X.X.; Liu, Q.Z.; Sun F.F.: Pneumonie Hemorragique du lapin, technique de preparation du vaccin. *Veterinary medicine* 12(2): 50 - 51 (1986).
- 45- Haro A., E.H.: Centro Nacional de Cunicultura (S.A.R.H), Irapuato Gto. En Seminario de la situación y perspectivas de la Cunicultura en México. *Universidad Autónoma de Chapingo*. p.p. 7 - 13 (1987).
- 46- Hernández, B.E.; Colmenares, V.G.; Mendoza, E.S.; Ciprian C.A.: Desarrollo y evaluación de una vacuna experimental contra la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). Reunión Nacional de Investigación pecuaria 1989. Memoria. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México* (1989).
- 47- Hernández, B.E.; Colmenares, V.G.; González, G.S.; Mendoza E.S.; Robles, R.R.; Ciprian, C.A.: Estudio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). Reunión Nacional de Investigación Pecuaria 1989. Memoria. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México* (1989).
- 48- Higiene y patología: La enfermedad "X" del conejo en Italia *Conagliocultura* 25: 8 - 11 (1988).
- 49- Jardon Herrera, S.G.: Examen general de orina. En temas Selectos de Laboratorio Clínico. Memoria. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. pp: 141 -149. México D.F. (1986).
- 50- Jubb k., V.V.; Kennedy, P.C.: Pathology of Domestic Animals. Vol I. *Academic Press*. 3a. Edition. London (1985).

- 51- Kellbach B., N.M.: Guía para la realización de necropsias y el diagnóstico de algunas enfermedades de los animales domésticos. Tesis. *Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlan. UNAM. México* (1983).
- 52- Lavazza, A.; Capucci, L.; Sciclung, M.T.: The viral haemorrhagic disease of rabbits (a review completed by personal observation). *Instituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia. Italia* (1989).
- 53- Lavazza, A.; Morisse, J.P.; Gregg, D.: Viral Haemorrhagic disease of lagomorphos. *O.I.E. Disease information* 2: 5 - 7. (1989).
- 54- Lee, G.S.; Park, G.K.: Aetiological studies on an acute fatal disease of Angora rabbits; so-called Rabbit Viral Sudden Death. *Korean Journal of Veterinary Research*. 27(2): 277 - 290 (1987).
- 55- Lomell, C.; Aurellin, G.: Protocolo para el tratamiento de los Conejos. *Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. México* (1987).
- 56- Luna, L.: Manual of Histologic Staining Methods. Armed Forces Institute of pathology. *McGraw Hill. New York* (1968).
- 57- Maldonado H.,A.; Coha A.,M.A.; Anaya E., A.M.; Correa G., P.; Fraire C.,M.; González S.,D.; Monroy B.,J.; Batalla G.,D.: Investigación de la transmisión del virus de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC), al poner en contacto conejos criollos negros sobrevivientes de un brote con conejos susceptibles. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria 1989. Memoria. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México* (1989).
- 58- Marcato P.S.; Berazzi, C.; Vecchi, G.; Della Salda, I.; Simoni, P.; Anello, P.; Tomino, G.: L'epatite necrotica infetta del coniglio. *Rev. Cunigliocultura* 9: 59 - 64 (1988).
- 59- Mason, J.: Rabbit disease in Mexico. *Foreign Animal Disease Report* 17 (1): 8 - 9 (1989).
- 60- Mocsari, E.; Palya, V.; Sinkovics, G.: An effective inactivated vaccine against Viral Haemorrhagic Disease (RHD). *Central Veterinary Institute. Budapest* (1988).

- 61- Mohanty, S.B.; Dutta, S.K.: *Virología Veterinaria. Nueva Editorial Interamericana. 1a. Edición. México. (1983).*
- 62- Morisse, J.P.: Aparition d'un syndrome de type "Septicémie-hémorragique" dans l'Est de la France. *L'Éleveur de Lapins* 22: 17 (1988).
- 63- Morisse, J.P.: Le syndrome "septicémie-hémorragique" chez le lapin, premières observations en France. *Le point Veterinaire* 20: 79 - 83 (1988)
- 64- Morisse, J.P.; Lavezza, A.: A Viral Haemorrhagic Disease (VHD) of rabbits. *Commission for the Control of FMD and other diseases. Vol 2(3): 5 - 7 (1989).*
- 65- Navarro, R.: Introducción a la Bioestadística. Análisis de variables binomiales. *Mcgraw Hill. México (1987).*
- 66- Office International des Epizooties: A new disease of the rabbit in Europe. *O.I.E. Disease Information* 1(16): 46 - 47. (1989).
- 67- Ohlinger, V.F.; Haas, B.; Ahl, R.; Weiland, F.: Die infektiöse hämorrhagische krankheit der Kanin chen eine durch ein Calicivirus verursachte tierseuche. *Tierärztl Umschau* 44: 284 - 294 (1989).
- 68- Pages Mante, A.: Aspectos epidemiológicos y laboratoriales de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo (RHD) en España. *Laboratorios HIPRA S.A.*, p.p. 1 - 16 España (1989).
- 69- Plana D., J.; Voyreda, M.; Bostons, M.; Vilá, X.: Calicivirus. Firme candidato como agente inductor de la Enfermedad Virica Hemorrágica del Conejo. *Laboratorios Sobrino, S.A.* p.p. 1 - 5 España (1989).
- 70- Pol, Q.G.: Le test des titres de anticorps de pneumonia hemorragique de lapin dans les sérums de lapin porles méthodes d'hémogglutination el d'inhibition de l'hémagglutination. En *Enfermedad Hemorrágica Virica del Conejo en España. Gallina Blanca Purina. España (1989).*
- 71- Pringent, A.Y.: La Maladie "X" ou Pneumonie Hemorragique du lapin en Italie. *Cuniculture* 16: 48 - 51. (1989).
- 72- Pu, B.Q.; Qian, N.H.; Guí, S.J.: Micro H.A. and H.I. test for the detection of antibody titles to so-called "Haemorrhagic pneumonia in rabbits. *Chinese Journal of Veterinary Medicine* 11 (10): 16 - 17 (1985).

- 73- Quiroz R.H.: Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Ed. Limusa. 1a. Edición. México (1984).
- 74- Renzi, M.; Vecchi, G.: Come riconoscere la malattia "X". *Revista de Conigiocultura* 2: 22 - 23. (1989).
- 75- Resano Pérez, F.J.: Pruebas de laboratorio en el estudio de funcionamiento hepático. En Seminario de Temas Selectos de Hematología. Memoria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. pp: 80 - 89. México. (1986).
- 76- Rouller, C.; Forssmann, W.G.; Siegrist, G.: El microscopio electrónico y sus aplicaciones. *Documenta Geigy. Acta Clinica. No.8.* (1968).
- 77- Saldivar, Z.E.; Fraire C.M.: Estudio comparativo de la resistencia en conejos castrados y enteros a la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). Reunión Nacional de Investigación Pecuaria 1989. Memoria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México (1989).
- 78- Schalm, O.W.; Jan, N.C.; Carroll, F.J.: Hematología Veterinaria Ed. Hemisferio Sur S.A.. pp: 224 - 227, 522 - 528, 638. E.U.A. (1981).
- 79- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH); Sistema Nacional de Emergencia en Salud Animal (SINESA): Operación del Sistema Nacional de Emergencia en salud Animal en México para la erradicación del brote de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). SINESA y SARH. México. (1989).
- 80- She, R.P.; Chen, D.W.; Gao, Q.Y.: Observation on the ultra-structures of host cells in rabbit viral haemorrhagic disease. *Chinese Journal of Veterinary Medicine* 2(8): 2 - 4. (1986).
- 81- Slauson, D.O.; Cooper, B.J.: Mechanisms of disease a textbook of comparative general pathology. Williams & Williams. pp: 103, 403. Baltimore. (1983).
- 82- Sodeman, W.A.; Sodeman, W.A. Jr.: Pathologic physiology. Mechanisms of disease. W. A. Saunders Co. pp: 481 - 651. Philadelphia. (1974).
- 83- Trigo T.F.; Mateos P.,A.: Patología general veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 2a. Edición. pp: 78 - 81. (1987).

- 84- Weakley, B.S.: A beginner's handbook in Biological Electron Microscopy. *Churchill Livingstone*. First Edition. p.p. 18 - 43. Edinburgh and London. (1972).
- 85- Weisbroth, H.; Flatt, R.F.; Kraus, A.L.: The biology of the laboratory rabbit. *Academic Press, Inc.* pp:264 - 270. New York. (1974).
- 86- Xu, F.N.; Shen, W.P.; Liu, S.J.: Study of the etiology of Viral Haemorrhagic Disease in Rabbits. *Animal Husbandary and Veterinary Medicine* 7(4): 153 - 155. (1985).
- 87- Xu, W.; Du, N.; Liu, S.: A new virus isolated from haemorrhagic disease in rabbits. *4th. World Rabbit Congress*. p.p. 456 - 462. Budapest (1988).
- 88- Xu, Z.J.; Chen, W.X.: Viral Haemorrhagic Disease in Rabbits: A review. *veterinary Research Communications* (13): 205 - 212. (1989).
- 89- Zenteno C.,J.O.: Biometrias hemáticas en conejos criollos del Distrito Federal. Tesis. *Universidad Nacional Autónoma de México*. México. (1969).