

105  
201



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**HEPATITIS CON CUERPOS DE INCLUSION  
EN POLLOS.  
CORRELACION CITO - HISTOLOGICA Y  
VALOR DIAGNOSTICO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A :**

**GONZALEZ COSTES MAURICIO FERNANDO**

**ASESORES: NURIA DE BUEN DE ARGUERO  
JOSE DE J. GOMEZ SANCHEZ  
GRACIELA TAPIA PEREZ**

**MEXICO, D. F.**

**FALLA DE ORIGEN**

**1991**



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.

## INDICE .

	Página
RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	3
MATERIAL Y METODO .....	8
RESULTADOS .....	10
DISCUSION .....	14
FOTOS .....	16
BIBLIOGRAFIA .....	18

## RESUMEN .

GONZALEZ COSTES , MAURICIO FERNANDO. Hepatitis con cuerpos de inclusión en pollos. Correlación cito - histológica y valor diagnóstico. (Bajo la dirección de: Nuria de Buen de Argüero, José de Jesús Gómez Sánchez y Graciela Tapia Pérez).

El presente trabajo se realizó con el objeto de ampliar los recursos diagnósticos en las especies domésticas, teniendo como finalidad determinar el valor diagnóstico de la citología en hígados de pollos afectados de Hepatitis con cuerpos de inclusión, correlacionando los hallazgos con el estudio histológico.

Se tomaron frotis ( cinco por cada ave) de hígados de 100 aves muertas y con lesiones macroscópicas compatibles a Hepatitis con cuerpos de inclusión, tres de ellos se tizaron por la técnica de Papanicolaou y los restantes con la tinción de Giemsa. También se tomaron fragmentos que fueron procesados por el método de inclusión en parafina y teñidos con H y E.

Mediante la fórmula de Bayes se obtuvo una especificidad del 96% y una sensibilidad del 100% con lo que se corrobora que la tinción con Papanicolaou es un método altamente sensible y muy específico para detectar cuerpos de inclusión intranucleares en los hepatocitos, en comparación con la correlación entre la tinción de Giemsa y la histología, en la que se encontró poca sensibilidad (78%), pero gran especificidad (100%).

De este trabajo se puede concluir que la citología presenta un gran valor diagnóstico para detectar cuerpos de inclusión en hepatocitos de hígados de pollos, que complementado con el

diagnóstico histológico ofrece un óptimo apoyo al clínico dedicado a las aves.

Por otro lado es importante que se practique una correcta técnica de toma de muestras tanto del frotis citológico como corte histológico.

## INTRODUCCION .

La Hepatitis con cuerpos de inclusión (HCI) fué descrita por primera vez en 1963 en los E.U.A por Helmboldt y Frazier (1,2,4,17).

En México fué diagnosticada por primera ocasión en 1974 por A.Antillón y B.Lucio, los cuales informan la presencia de la enfermedad en pollos de engorda de seis semanas de edad con una morbilidad del 2% y mortalidad del 0.5% (1,2,3).

Los informes recientes indican que la enfermedad es común y ocurre frecuentemente en Perú, Nueva Zelanda, E.U.A, Canadá y Australia (1,7).

En nuestro país la enfermedad se ha localizado en los estados de Querétaro, Jalisco, Coahuila, Nuevo León, Morelos, Puebla, Aguascalientes y Valle de México, y es sólo a mediados de 1989 que la HCI cobra importancia en México por su severidad y frecuencia (1,18).

La presentación de la HCI está asociada a agentes inmunodepresores infecciosos como el virus de la enfermedad de Gumboro, enfermedad de Marek, y micotoxinas consideradas agentes inmunodepresores (7,18,20).

Desde 1989, México importa de E.U.A. huevo fértil para la obtención de pollo de engorda, este evento coincide con la frecuencia y severidad de la HCI, apareciendo brotes en nuestro país con mortalidades acumuladas hasta más del 50%, hecho que explica el incremento actual de la severidad de la HCI en la República Mexicana (18,22).

La HCI es una enfermedad causada por un grupo de adenovirus aviáres, que afecta a pollos de engorda y aves de reemplazo entre 2 y

9 semanas de edad, caracterizada por un aumento drástico y repentino de la mortalidad, acompañada de una postración y aneemia de las aves, observándose a la necropsia un cuadro anémico hemorrágico, edema pulmonar, hidropericardio, atrofia de la bolsa de Fabricio, hepatomegalia, necrosis y hemorragias subcapsulares (1,2,11,14, 17,19,20 ).

Al examen microscópico, se observan en los hepatocitos cuerpos de inclusión intranucleares basófilos, eosinófilos o ambos, que pueden considerarse como lesión patognomónica ( 1,3,4,10,21 ).

En casos de campo y experimentales, a través del microscopio electrónico, se ha encontrado que los cuerpos de inclusión basófilos presentan en su interior partículas virales, en contraste con las inclusiones eosinofílicas que solo contienen material fibrogranular ( 21 ). En algunos casos la historia clínica y las lesiones sugieren un problema de Hepatitis con cuerpos de inclusión; sin embargo, resultan negativos a la presencia de corpúsculos de inclusión; posiblemente debido a una selección errónea de las aves para su diagnóstico, o porque la lesión degenerativa es tan severa que no hay corpúsculos de inclusión (1,4,7,10,11).

Esta enfermedad se transmite principalmente por vía transovárica, aunque también se excreta a través de las heces y en menor grado por secreciones oronasales. La difusión de la enfermedad es relativamente rápida, en una misma caseta varía de dos a tres días, mientras que entre casetas es lenta y puede variar de siete a quince días (2,18).

El virus de la HCI pertenece al grupo FI (CELD), es un virus ADN que puede hemaglutinar eritrocitos de rata, cuye y hamster (1,13,16,20).

El virus es resistente al calor (56 °C por mas de una hora), a cambios de pH dentro de un rango entre 3 y 9 y a la luz ultravioleta. Debido a que es un virus desnudo (sin envoltura lipídica) es resistente a los solventes de lípidos como el éter y el cloroformo, no así a los compuestos halogenados como el iodo y el cloro. Es también sensible al formal en una dilución de 1/10,000 (2,11,12,16,20).

La HCI puede ser diagnosticada mediante varias técnicas, la más común es el estudio histopatológico, en el cual la única lesión patognomónica de la enfermedad es la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares en los hepatocitos (4,6,10,17). También puede observarse una disociación de los sinusoides y de los cordones hepáticos acompañado de vacuolización de los hepatocitos, así como necrosis multifocal que tiende a ser difusa dependiendo de la severidad del caso (17). Sin embargo este método requiere de 24 a 48 horas para llegar al diagnóstico.

Otra forma de diagnóstico de la enfermedad es mediante el aislamiento del adenovirus en embrión de polio, inoculado vía saco vitelino y produciendo lesiones entre el cuarto y octavo día post-inoculación, como congestión, hemorragias subcutáneas y necrosis focal hepática. La desventaja de este método es que se requieren varias pases "ciegos" antes de que las lesiones se manifiesten y por lo tanto la prueba se vuelve lenta (2,4,9,11).



Otra opción es la prueba de Virus suero neutralización en cultivo celular, esta prueba es muy sensible para titular anticuerpos en el suero, pero esto no siempre indica que la enfermedad está en curso (2,6,16).

Otra alternativa es la detección de anticuerpos por medio de la prueba de inmunoensayo con enzimas asociadas (ELISA), la cual es altamente sensible pero poco específica (23).

Tanto la histopatología, aislamiento en esbrión de pollo, cultivo celular y prueba de ELISA, necesitan de una infraestructura costosa, por lo que el precio para el diagnóstico es elevado.

El método citológico mediante la tinción de Papanicolaou ha sido utilizado con eficacia en el diagnóstico de enfermedades en humanos y animales, presentando una de las alternativas más rápidas para el diagnóstico de la HCI en pollos. Esta prueba tiene las ventajas de dar rapidez al diagnóstico (25 minutos) y de tener un bajo costo (5,8).

## **OBJETIVO .**

Determinar el valor diagnóstico de la citología, en hígados de pollos afectados de hepatitis con cuerpos de inclusión, correlacionando los hallazgos con el estudio histológico.

## MATERIAL Y METODO.

Se recolectaron 100 hígados provenientes de pollo de engorda de siete semanas de edad, pertenecientes a una granja que presentó casos de HCI. De cada muestra recolectada, se hicieron cinco frotis. Tres de ellos se fijaron con alcohol al 96% para su tinción con Papanicolaou y los restantes se secaron al aire. De éstos últimos, sólo se tñeron los que se requerían para corroborar el diagnóstico con la tinción de Giemsa.

Además, del lugar de donde se obtuvieron los frotis, se tomó una muestra de tejido hepático, la cual se fijó con formalina al 10% y posteriormente se procesaron por el método habitual de inclusión en parafina y se tñeron con Heastoxilina - Eosina.

Después de teñidas las laminillas se realizó la lectura al microscopio para detectar la presencia de cuerpos de inclusión en las muestras citológicas e histológicas.

A los resultados obtenidos se les aplicó el análisis estadístico desarrollado por Bayes (15) para determinar la sensibilidad y la especificidad del método citológico en comparación con el histológico, según las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad} = P(T/E) = \frac{TP}{TP + FN}$$

$$\text{Especificidad} = P(T/E) = \frac{TN}{FP + TN}$$

Donde:

$P ( T / E )$  Es la probabilidad de que ocurra un evento en una prueba positiva (Sensibilidad).

$P ( \bar{T} / \bar{E} )$  Es la probabilidad de que no ocurra un evento en una prueba negativa (Especificidad).

TP = Verdaderos positivos.

FN = Falsos negativos.

FP = Falsos positivos.

TN = Verdaderos negativos.

## RESULTADOS .

### APLICACION DEL ANALISIS ESTADISTICO DE BAYES.

La sensibilidad y la especificidad son dos características útiles para validar la exactitud de una prueba, comparándola con una de referencia.

La sensibilidad (S) , es la probabilidad de que la prueba resulte positiva cuando el individuo realmente tiene la enfermedad, y se representa como  $P(+|E)$ . (probabilidad, P, de que la prueba sea positiva, +, dado, I, que el individuo está enfermo, E).

La especificidad (E) , es la probabilidad de que la prueba sea negativa cuando el individuo realmente no tiene la enfermedad, y se representa como  $P(-|\bar{E})$ . (probabilidad, P, de que la prueba sea negativa, -, dado, I, que el individuo no está enfermo,  $\bar{E}$ ). (15).

### RESULTADOS EN LAS LECTURAS CITOLÓGICAS (Papanicolaou y Biessa) Y LECTURAS HISTOLÓGICAS.

Pba. de diagnóstico (Papanicolaou)	Pba. de referencia (histología)	
	+	-
+	96	0
-	3	1

$$P(+|E) \quad S = TP / (TP + FN) = 96 / 99 = 0.96$$

$$P(-|\bar{E}) \quad E = TN / (FP + TN) = 1 / 1 = 1$$

		Pba. de referencia (histología)	
		+	-
Pba. de diagnóstico (Tinción de Giemsa)	+	78	0
	-	21	1

$$P(+IE) S = TP / (TP + FN) = 78 / 99 = 0.78$$

$$P(-IE) E = TN / (FP + TN) = 1 / 1 = 1$$

#### CORRELACION TINCION DE PAPANICOLAOU E HISTOLOGIA.

En el presente trabajo, los verdaderos positivos (TP) correspondieron a los 96 casos en los que se detectó y corroboró la presencia de cuerpos de inclusión, tanto en la citología como en la histología. Los verdaderos negativos (TN) fueron aquellos en los que se descartó la presencia de cuerpos de inclusión en ambos procesos (solo 1), los falsos positivos (FP) fueron aquellos en los que en la citología se detectaron cuerpos de inclusión, pero en la histología no (0 casos). Los falsos negativos (FN) fueron aquellos en los que en la citología no se detectaron cuerpos de inclusión pero en la histología sí (3 casos).

Sustituyendo:

$$S = TP / (TP + FN) = 96 / (96 + 3) = 0.96$$

$$E = TN / (FP + TN) = 1 / (1+0) = 1$$

La probabilidad de que un evento ocurra es un número entre el cero y el uno, por lo tanto el resultado de la prueba indica que los hallazgos de cuerpos de inclusión mediante la tinción de

Papanicolaou, es una prueba con un 96% de sensibilidad y un 100% de especificidad.

#### CORRELACION TINCION DE GIEMSA E HISTOLOGIA.

La tinción de Giemsa se considera poco sensible pero muy específica.

#### VALORES DE PREDICCIÓN.

- Si la prueba es positiva en un individuo, ¿Qué probabilidad hay de que el individuo realmente tenga el padecimiento?, es decir  $P(E|+)$ , a esta probabilidad se le llama el valor de predicción de una prueba positiva o sensibilidad diagnóstica.

- Si la prueba es negativa en un individuo, ¿Qué probabilidad hay de que el individuo no tenga el padecimiento?, es decir  $P(\bar{E}|-)$ , a esto se le llama valor de predicción de una prueba negativa o especificidad diagnóstica (15).

Una manera de obtener  $P(E|+)$  y  $P(\bar{E}|-)$  es usar el método nosológico y el teorema de Bayes:

$$P(E|+) = \frac{P(+|E) P(E)}{P(+|E) P(E) + (P(+|\bar{E})) P(\bar{E})} = \frac{P(+|E) P(E)}{P(+)}$$

$$P(E|-) = \frac{P(-|\bar{E}) P(\bar{E})}{P(-|\bar{E}) P(\bar{E}) + (P(-|E) P(E))} = \frac{P(-|\bar{E}) P(\bar{E})}{P(-)}$$

Donde  $P(E)$  es la probabilidad a priori de la enfermedad, y se refiere a la incidencia de la enfermedad en una población particular.

En el caso de la HCI la probabilidad a priori es de 0.55 ó 55% (\*).

(\*) Comunicación personal. Dr. José de Jesús Gómez Sánchez.

De este modo los valores de  $P(E|+)$  y  $P(E|-)$  deben aplicarse a la misma población en donde se estimó  $P(E)$ .

En el presente trabajo se estima que  $P(E) = 0.55$ .

Sustituyendo en las fórmulas anteriores obtenemos que:

$P(E|+) = 1$ . De modo que si la prueba es positiva en un individuo, la probabilidad estimada de que realmente esté enfermo es de 1.

$P(E|-) = 0.95$ . Así, si un individuo tiene una prueba negativa, la probabilidad de que no esté enfermo es de 0.95.



## DISCUSION .

Debido a la alta incidencia de HCI que afecta al pollo de engorda actualmente en nuestro país, se requiere de un diagnóstico rápido, seguro y de bajo costo.

La citología es un método idóneo, que aunado a una técnica adecuada y complementado con un diagnóstico histológico ofrecen un óptimo apoyo al clínico de aves para el diagnóstico de la HCI.

Es importante tener presente que para obtener diagnósticos certeros por medio de la citología, es necesario que se practique una correcta técnica durante la toma de muestras, lo que implica que las aves enfermas de las que se disponga, deben haber muerto recientemente o en su defecto ser sacrificadas, debido a la rápida autólisis hepática. Los frotis deben ser lo más delgados posibles por la facilidad de encontrar los cuerpos de inclusión en los hepatocitos.

En el presente trabajo los cuerpos de inclusión observados tanto en la citología como en la histología, fueron en su mayoría de tipo basófilo y en menor cantidad los de tipo eosinófilo.

Dentro de las limitaciones técnicas, nos encontramos que la citología (y sobre todo la tinción de Giemsa) no sustituye a la histología en las alteraciones en las que se requiera de la observación de la arquitectura hepática para su diagnóstico.

La observación de cuerpos de inclusión tanto en la citología como en la histología, debe realizarse por personal capacitado para ello, ya que esto reducirá el error diagnóstico.

Cabe mencionar la dificultad de detectar cuerpos de inclusión en frotis teñidos con Papanicolaou cuando el número de éstos es escaso en cortes histológicos.

En el presente trabajo la citología como método de diagnóstico ha demostrado tener hasta el 96% de confiabilidad respecto al método actual de diagnóstico de la HCI que es la histología.

Este valor diagnóstico aunado a la rapidez y menor costo representa una enorme ventaja para el Clínico ya que en un corto tiempo podrá realizar el inicio de las medidas preventivas y de control para la enfermedad.

F O T O S .

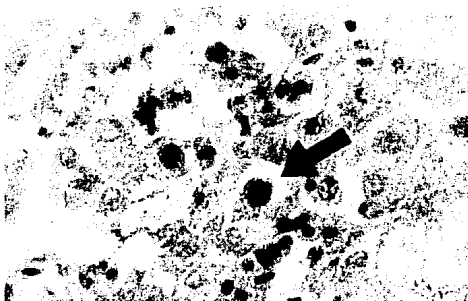


FOTO 1. HIGADO DE POLLO CON CUERPOS DE INCLUSION EN HEPATOCITOS. TINCION H Y E ( 1.25 x 40 ).



FOTO 2. CUERPOS DE INCLUSION, TINCION DE PAPANICOLAOU (1.25 x 40 ).

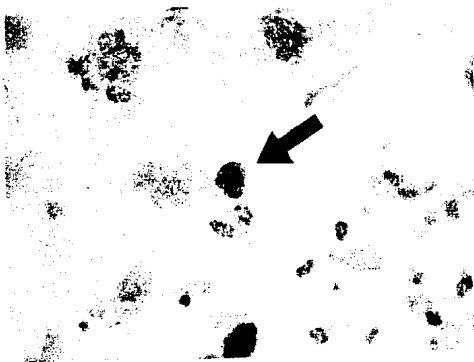


FOTO 3. CUERPOS DE INCLUSION INTRANUCLEARES. TINCION DE GIEMSA  
( 1.25 x 40 ).

## B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Altamirano R.R., Ramirez J.H., Retana A. y Zurita D.J.: Hepatitis con cuerpos de inclusión y su relación con altas mortalidades en el pollo de engorda en México. Memorias de la XV Convención Nal. ANECA, Cancún México: 279-287 (1990).
- 2.- Antillón R.A.: Hepatitis con cuerpos de inclusión (HCI): su presencia en la República Mexicana. Revista Vet. Méx. 11: 13-16 (1980).
- 3.- Antillón A., and Lucio B.: Inclusion body hepatitis in Mexico. Avian Dis. 19: 195-197 (1975).
- 4.- Bickford A.A., Krasovich M.A. and Fadly A.M.: Demonstration of virus particles in hepatic cells of chickens with inclusion body hepatitis. Avian Dis. 17: 629-638 (1973).
- 5.- Candanosa A.E., de Buen de A.N., y Trigo F.J.: Correlación citohistológica de lesiones cutáneas en perros. Vet. Méx. 18: 3-11 (1987).
- 6.- Cowen B.S.: Chicken embryo propagation of type I avian adenoviruses. Avian Dis. 32: 347-352 (1988).
- 7.- Christensen N.H. y Saifuddin Md.: A primary epidemic of inclusion body hepatitis in broilers. Avian Dis. 33: 622-630 (1989).

8.- de Buen de A.N.: Citología vaginal. Memorias del curso de actualización de temas Selectos de Laboratorio Clínico. Div. de Estudios de Posgrado de la Fac. de Med. Vet. y Zootec. México D.F. 118-124 (1986).

9.- Fadly, A.M., and Winterfield R.W.: Isolation and some characteristics of an agent associated with inclusion body hepatitis, hemorrhages, and aplastic anemia in chickens. Avian Dis. 17: 182-193 (1973).

10.- Gallina A.M., Winterfield R.W. and Fadly A.M.: Adenovirus infection and disease. Histopathology of natural and experimental disease. Avian Dis. 17: 343-353 (1973).

11.- Hofstad M.S.: Disease of Poultry 8th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa 1984.

12.- Klopp S., Rosenber J.K. and Krauss W.C.: Diagnosis of inclusion body hepatitis and hemorrhagic anemia syndrome in Delaware broiler chickens. Avian Dis. 19: 608-611 (1975).

13.- Mc.Ferran J.B.: Immunity to adenoviruses. Avian Immunity. British Poultry Science, Ltd. 187-203 (1981).

- 14.- Mc. Ferran J.B., Mc. Cracken R.M., Connor T.J. and Evans R.T.: Isolation of viruses from clinical outbreaks of inclusion body hepatitis. Avian Pathology, 5: 315-324 (1976).
- 15.- Méndez R.I., Namihira G.D., Moreno A.L. y Sosa de M.C.: El protocolo de investigación, lineamientos para su elaboración y análisis. Trillas. México D.F. 1990.
- 16.- Otsuki K., Tsubokura M., and Yamamoto H.: Some properties of avian adenoviruses isolated from chickens with inclusion body hepatitis in Japan. Avian Dis. 20 : 693-705 (1976).
- 17.- Pettit J.R. and Carlson H.C.: Inclusion body hepatitis in broiler chickens. Avian Dis. 16: 858-864 (1972).
- 18.- Ramirez J.H., Altamirano R.R.: Hepatitis con cuerpos de inclusión. Memorias de la primera jornada Médico Avícola. FMVZ-ANECA México: 236-241 (1990).
- 19.- Reece R.L., Grix D.C., and Barr D.A.: An unusual case of inclusion body hepatitis in a cockerel. Avian Dis. 30: 224-227 (1986).
- 20.- Retana R.A.: Generalidades del virus "asociado" a hepatitis con cuerpos de inclusión en las aves. Seminario sobre hepatitis con cuerpos de inclusión. Fac. Med. Vet. UNAM (1990).

21.- Ridell C.: Avian Histopathology. First Edition. The American Association of Avian Pathologists. Pennsylvania U.S.A 1987.

22.- Sarfatti D., Ramirez H., Altamirano R. y Lucio E.: Encuesta epizootiológica y notificación de brotes de "hepatitis con cuerpos de inclusión (HCI) en México". Seminario sobre hepatitis con cuerpos de inclusión. Fac. Med. Vet. UNAM. (1990).

23.- Winterfield R.W., Fadly A.M. and Hoerr F.J.: Inmunization of chickens against adenovirus infection. Poultry Science 56: 1481-1486 (1977).