



# Universidad Nacional Autónoma de México

8  
25

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
C U A U T I T L A N

Estudio de la Patogenia de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (E.H.V.C.), mediante la observación de Lesiones Macroscópicas, Microscópicas e Inmunofluorescencia en Conejos Domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) Inoculados Experimentalmente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

ALEJANDRO BANDA CASTRO

A S E S O R E S

M. C. MARTHA CHAVEZ NIÑO  
MVZ. MOISES FRAIRE CACHON  
MVZ. EMETERIO SALDIVAR ZUÑIGA  
MVZ. ARTURO A. CAMPOMANES CORTES

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 1992



## **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.

## CONTENIDO

	<u>PAGINA</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
OBJETIVOS.....	17
MATERIAL Y METODO.....	18
RESULTADOS.....	22
DISCUSION.....	33
CONCLUSIONES.....	41
ANEXOS.....	42
LITERATURA CITADA.....	44

## RESUMEN

BANDA CASTRO ALEJANDRO. Estudio de la Patogenia de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (E.H.V.C.), mediante la Observación de Lesiones Macroscópicas, Microscópicas e Inmunofluorescencia en Conejos Domésticos (Oryctolagus cuniculus) Inoculados Experimentalmente. (bajo la dirección de: MC. Martha Chávez N., MVZ. Moisés Fraire C., MVZ. Emeterio Saldívar Z. y MVZ. Arturo Campomanes C.)

Se expusieron 57 conejos domésticos a aerosoles obtenidos a partir de hígados macerados de conejos que murieron por EHVC de un brote de campo en México. Los animales se sacrificaron a intervalos determinados postinoculación, recolectándose muestras de diversos órganos para realizar histopatología y la técnica directa de inmunofluorescencia. A la necropsia se observaron lesiones necróticas, congestivas y hemorrágicas, resultando los órganos más afectados hígado pulmón y bazo. Mediante las observaciones por histopatología, se corroboraron las lesiones macroscópicas y además a partir de las 46 hr. se observó la presencia de múltiples microtrombos en pulmón, corazón, intestino delgado, riñón, tímo, ganglios mesentéricos y encéfalo. Mediante inmunofluorescencia se detectó desde las dos horas, presencia del virus en hígado, pulmón, intestino delgado, bazo, tonsilas faríngeas y ganglios mesentéricos. Se sugiere que el cuadro clínico se reprodujo por vía aerógena, sin embargo la infección por aparato digestivo no pudo descartarse; el virus tiene afinidad por hepatocitos, células epiteliales alveolares, y linfoides y provoca un trastorno de coagulación intravascular diseminada, que puede contribuir de manera importante en la presentación de la muerte.

## INTRODUCCION

La Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC) es una infección de curso agudo, altamente contagiosa, que afecta principalmente a conejos domésticos adultos y algunas variedades silvestres. Se caracteriza por producir muerte súbita, necrosis, congestión y hemorragias severas en diferentes órganos (14,18,50).

### a) Antecedentes de la Enfermedad.

La EHVC fue descrita por primera vez en China en 1984, en la región de Nanking. En julio del mismo año se presentó en la región de San Tung, donde murieron 470,000 conejos de raza Angora. El origen del padecimiento en este país, se atribuyó a un grupo de conejos Angora procedentes de Alemania Federal. En 1985 la enfermedad se detectó en Corea, donde se sospecha que el agente se introdujo mediante pieles importadas de China (14,15,16).

En Europa se reportó en 1987, localizándose en varios países como Alemania, Holanda, Dinamarca Checoslovaquia, Polonia, Austria, Italia, Francia Bélgica y España. En junio del mismo año apareció en Yugoslavia. En Portugal se diagnosticó EHVC pero sólo en pocos casos se afectaron explotaciones comerciales (4,6,14,51,52,69).

También, se ha presentado la enfermedad en Bulgaria y la U.R.S.S.: así como en el norte del continente africano, especialmente en Egipto y Túnez (28,46,48).

En México, su aparición coincidió con la introducción de canales de conejos provenientes de China (noviembre de 1988). La enfermedad se reportó por primera vez en enero de 1989 en el municipio de Ecatepec, Edo. de México, en donde el problema se presentó a partir de diciembre de 1988. El período de mayor difusión ocurrió a mediados de 1989, afectando los estados de Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala, Distrito Federal, Veracruz, Guerrero, Coahuila y Nuevo León (13,14,15,16,17,69).

#### b) Etiología

En un principio se especuló que la etiología de la EHVC era atribuible a intoxicaciones o envenenamientos; resultaba factible que en las zonas afectadas influyera algún pesticida o herbicida recogido en agua de bebida o en forrajes henificados. Otra posibilidad era la enterotoxemia, asociada a la muerte rápida y generalizada en animales adultos (12,54,61). Finalmente, también se señaló como una forma atípica de mixomatosis, sin embargo la presencia de anticuerpos frente a esta enfermedad y las vacunaciones con virus homólogo, hizo pensar en otro tipo de trastorno (54).

Los datos obtenidos de las observaciones epidemiológicas, los hallazgos anatomopatológicos, los aislamientos bacterianos poco concluyentes y los resultados de diferentes estudios virológicos, demostraron claramente el origen viral de la

enfermedad; por lo que la Organización Internacional de Epizootias denominó a esta afección como "Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo" ("Viral Haemorrhagic Disease V.H.D."), inscribiéndola en la Lista B del Código Zoonosario Internacional. (4,12,39,46,50,58,74).

A la fecha existe controversia en cuanto a la clasificación correcta del virus, que de acuerdo con algunos autores podría corresponder a un Picornavirus (1,8,38,39), un Parvovirus (14,18,31,32,79) o un Calicivirus (9,30,47,48,54,56,67,72,74).

Mediante microscopía electrónica se han observado partículas virales en extractos de hígado procedentes de casos clínicos, que tienen forma icosaédrica, carecen de envoltura y su tamaño oscila entre 25 a 40 nm.(1,9,19,74,79).

Según lo observado por Lee y col. (1990) en tejido hepático, estas partículas virales adoptan un arreglo cristalino que podría corresponder a un Picornavirus.

Gregg y House en 1989, mediante estudios inmunohistoquímicos y pruebas de inhibición de la hemoaglutinación, demostraron que el agente causal manifiesta fuertes reacciones cruzadas con anticuerpos monoclonales contra los parvovirus porcino y murino (31,32,33).

Los estudios de Xu y col. (1988) sugieren que el ácido nucleico del virus de EHVC es DNA de banda sencilla no

segmentado. y que es cercano al de parvovirus (78,79).

Sin embargo Tesouro Vallejo (1990) y Ohlinger y cols. (1990) describen partículas víricas vacías, con depresiones en su superficie, de fondo redondeado, en forma de cúpula y con 10 puntas en su borde externo, características de las imágenes de los calicivirus (48,54,60,74).

Mediante estudios con anticuerpos monoclonales, electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot se ha demostrado que la cápside del virus de la EHVC es muy similar a la de los calicivirus (47,48,49,56,67)

Ohlinger y col. (1989) purificaron por electroforesis en gel de agarosa un RNA viral de un tamaño similar al descrito para el calicivirus felino, que al inocularlo intrahepáticamente en conejos sanos reprodujo el cuadro clínico y las lesiones características de la EHVC; esto constituye la mayor evidencia en la caracterización del virus dentro del género de los calicivirus (47,48,49).

La adaptación del virus en cultivos celulares fue por mucho tiempo un fracaso. Se utilizaron múltiples cultivos primarios y diversas líneas celulares sin obtener resultados alentadores. No fue sino hasta los trabajos realizados por los investigadores chinos Ji y col (1991), quienes mediante una línea de células mutantes de riñón de conejo (DJRK), consiguieron la propagación



in vitro del virus de la EHVC (3,4,7,12,18,35,50,74,78,79).

### c) Epizootiología

En condiciones naturales, la difusión de la EHVC es muy rápida y errática; ya que puede presentarse en una explotación y en otra muy próxima no presentarse bajas. Se ha detectado en localidades distantes y aisladas de otras con la enfermedad, sin que exista algún nexo aparente de unión. En general son más susceptibles las explotaciones con pocas medidas sanitarias e instalaciones rústicas (4,12).

La susceptibilidad a la enfermedad varía de acuerdo a la edad y estado fisiológico de los animales; las hembras lactantes y gestantes son las más susceptibles, seguidas de los machos adultos, aunque los castrados parecen ser menos susceptibles en comparación con los enteros. Los gazapos y animales menores de 60 días son los más resistentes en la mayoría de los brotes. En algunos conejos adultos existe cierta resistencia natural no ligada a anticuerpos específicos (4,12,14,18,50,54,69).

La enfermedad se transmite por contacto directo entre animales infectados y susceptibles o por vehiculización del virus mediante equipo, animales y personas. La transmisión mecánica por fomites, roedores, otros animales, subproductos de conejo y el hombre también pueden ser importantes en la diseminación de la EHVC (5,14,18).

Las vías de contagio no se han esclarecido completamente, es factible que la vía aerógena sea la principal; Smid y col encontraron que con la inoculación intranasal de material infectante murió el 93.3% de los animales en comparación con la vía intramuscular en la que enfermaron el 62.9% (70). No obstante otras vías como la digestiva o a través de heridas en la piel y mucosa no se pueden descartar. Todas las secreciones y excreciones pueden ser fuente de infección. (4,12,14).

Al parecer la EHVC afecta solo a miembros del orden Lagomorfa y ocurre con mayor frecuencia en conejos domésticos, a pesar de que en Europa se han afectado de manera importante variedades de conejos silvestres. En estudios realizados en México, se desafiaron a conejos volcanso mexicano y Romerolagus diazi (Teporingo ó Zacamuche) con material infectante, resultando resistentes a la EHVC; no se ha podido demostrar la eliminación del virus en las heces, por lo que hasta la fecha, solo los conejos domésticos han resultado afectados (14,18,24,50,69).

Desde hace varios años, se ha notificado en diferentes países europeos, una enfermedad de curso agudo y elevada mortalidad en poblaciones de liebres, caracterizada por extrema rapidez, y la presencia de lesiones idénticas a las producidas por la EHVC. A este proceso se le denomina Síndrome de la Liebre Marrón Europea (S.L.M.E.), cuya etiología viral se presume sea idéntica, o muy emparentada con el virus de la EHVC. (3,42,45,46).

#### d) Signología

La morbilidad debido a la EHVC oscila entre un 30 y 80%, mientras que la letalidad se presenta del 80 al 100%. (12,18,50,69).

El período de incubación es de 48 a 72 horas, después de la exposición de animales a aerosoles obtenidos de órganos macerados de conejos afectados. Mediante inoculación subcutánea ocurrió la muerte a las 96 hrs. La administración intramuscular de una suspensión filtrada de órganos mató a conejos dentro del intervalo de 1 a 5 días (4,14,25,38,70).

En la mayoría de los brotes, los animales se encontraron muertos, sin indicios de enfermedad en los demás. En otros casos se observó inquietud, congestión de los párpados, disnea con respiración abdominal, signos de asfixia, postración y al momento de la muerte, movimientos violentos con vueltas rápidas y sacudidas, así como presencia de líquido espumoso sanguinolento en las fosas nasales, que llegaba a manchar jaulas y piso (4,12,13,14,15,18,69).

Otros autores describen la presencia de pirexia (40°C), sangre en heces, opistótonos, emisión de chillidos, además de ataxia y ocasionalmente parálisis de los miembros (4,11,34,38,61).

Hasta la fecha no se ha determinado completamente si los conejos recuperados y los silvestres permanecen como portadores de la EHVC, pero se sospecha que esto puede ocurrir (23). En una investigación realizada por Fraire y col.(1989) se reprodujo la enfermedad en cuatro conejos después de ponerlos en contacto con otros diez, los cuales eran sobrevivientes de un brote que se había presentado dos meses antes, lo que sugiere el estado de portador en esos animales (18,23).

#### e) Lesiones Macroscópicas

Debido al curso rápido de la enfermedad, no ocurren trastornos de emaciación o deshidratación, por lo tanto, los animales muertos se encuentran frecuentemente en buen estado de carnes (18).

A la necropsia, las lesiones son características de procesos septicémico-hemorrágicos, en donde el hígado y aparato respiratorio son los más afectados (12).

El el tejido subcutáneo presenta congestión generalizada y dilatación de vasos sanguíneos (12).

En aparato respiratorio se observa congestión pulmonar intensa, edema y hemorragias petequiales o equimóticas; al corte hay salida de líquido sero-sanguinolento que en ocasiones tiene aspecto espumoso. En casos agudos, puede existir hepatización roja y traqueitis hemorrágica con espuma sanguinolenta (4,13,14,18,31,32,41,50,74).

El hígado presenta hepatomegalia, congestión leve, decoloración y apariencia degenerativa. El dibujo lobulillar se encuentra remarcado (4,18,31,32,50,74).

Los riñones frecuentemente están aumentados de tamaño, con consistencia blanda, congestión y hemorragias petequiales (4,12,13,18,50).

En bazo se puede presentar esplenomegalia, en timo aumento de tamaño con hemorragias petequiales y en ganglios linfáticos hay congestión (4,12,13,18,41).

En el intestino delgado se observa congestión, enteritis mucosa de leve a moderada y en el intestino grueso, dilatación de ciego (12).

El corazón aparece frecuentemente en diástole, con las aurículas repletas de sangre, además de hemorragias en miocardio. (4,13,14,18,31,38,50,61,74).

A nivel de encéfalo es frecuente encontrar congestión de los vasos meningeos (4,12,18).

#### f) Lesiones Microscópicas

Los hallazgos microscópicos en hígado corresponden a degeneración grasa y necrosis coagulativa multifocal ó masiva con leve infiltración de células mononucleares. Algunos autores describen la presencia de corpúsculos de inclusión así como acúmulos de pigmentos biliares y hemosiderina (4,18,31,41,73).

En pulmón se observa congestión, hemorragias en espacios aéreos y necrosis de tejido linfoide peribronquial (32,41).

Los riñones pueden estar congestionados con zonas de hemorragias, necrosis multifocal y trombosis hialina glomerular (18,31,32,33,41).

El bazo presenta necrosis en pulpa blanca y en pulpa roja congestión, hemorragias y depósitos de fibrina (4,41).

En timo y gánglios linfáticos se ha observado necrosis de linfocitos (31,50).

El intestino delgado presenta necrosis en las criptas, que puede variar en severidad y frecuentemente es segmental, afectando solo un área del intestino delgado (18,31).

En el corazón se aprecian lesiones degenerativas de fibras musculares, zonas hemorrágicas y necrosis (32,41,50).

Otros autores describen meningitis con infiltración linfocitaria perivascular en cerebro e hiperemia y hemorragias en corteza adrenal (18,38).

Por último, es importante señalar la formación de trombos de fibrina en la vasculatura de diversos órganos (18,31,32,33,42,46,75,77).

#### g) Patología Clínica

Los análisis de hematología indican leucocitosis con linfopenia, heterofilia y trombocitopenia. (53,62,75). La química sanguínea muestra elevaciones significativas en las concentraciones plasmáticas de urea, creatinina, bilirrubina directa, y de las transaminasas alanino-aspartosa transferasa (ALT), alanino-sorbitol transferasa (AST), fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida. En cuanto a los factores de coagulación, se observa un aumento en el tiempo de protrombina, trombina y un descenso en los valores de fibrinógeno. (10,53,62,75).

#### h) Patogenia

Algunos estudios sobre la patogenia de la EHVC, en donde se utilizaron coloraciones de H.E. e inmunohistoquímicas de avidina-biotina fosfatasa alcalina, indican que los sitios primarios de replicación del virus son el epitelio de las criptas y vellosidades de intestino delgado, hepatocitos y linfocitos esplénicos. Algunos macrófagos alveolares y células endoteliales también presentan coloración indicativa de replicación viral

(18,31,32,33).

Xu y col. (1988) describieron la patogénesis de la enfermedad, detectando un cierto tropismo del virus por los endotelios vasculares y estructuras reticulares, habiendo descrito coagulación intravascular diseminada en varios órganos parenquimatosos. Otros investigadores han corroborado ese tropismo mediante inmunofluorescencia, tinciones inmunohistoquímicas y microscopía electrónica (42,72,76,77,79).

La necrosis y microinfartos encontrados en varios órganos como corazón, glándulas adrenales, riñones, pulmones cerebro y testículos pueden asociarse a la coagulopatía intravascular diseminada, que se traduce en la formación de microtrombosis; que a su vez es exacerbada por la necrosis masiva de hígado (18,31,33,42).

#### i) Diagnóstico

El diagnóstico clínico presuntivo de EHVC se basa en la elevada mortalidad de conejos sin signología previa, diseminación rápida y la presencia de algunos animales con signos de asfixia, convulsiones y secreción nasal sanguinolenta. Sin embargo debe diferenciarse de otras enfermedades agudas de los conejos como pasteurelisis, mixomatosis atípica (exótica en México), enterotoxemia y envenenamientos (12,14,18).



Debido a que el sobrenadante de suspensiones de hígado, bazo y pulmón de animales afectados con EHVC tienen la propiedad de hemoaglutinar glóbulos rojos tipo "O" de humanos, de oveja y de aves, se ha implementado la prueba de hemoaglutinación (HA) para el diagnóstico de esta enfermedad (1,12,15,18,54,62,74).

Se ha demostrado que el sobrenadante que produce HA a mayor dilución es el procedente de hígado, pues éste puede producir HA a diluciones superiores de 1/32 y en algunos casos hasta 1/2048 (54,74).

Debido a que no se ha encontrado la existencia de sobrenadantes de órganos procedentes de conejos sanos que tengan poder hemoaglutinante, la prueba de hemoaglutinación es la técnica de elección para realizar un diagnóstico confirmativo ya que tiene una gran sensibilidad, especificidad y bajo costo. Dicha prueba se ha modificado y estandarizado en técnica de microplaca, obteniendo títulos mayores de 1:100,000 (22,74).

En el suero de animales recuperados se encuentran anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación, por lo que se han implementado pruebas de Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA) (12,15,18,62), obteniéndose títulos 1:32 a 1:8000 (22).

Por otra parte, en México y en La República Popular China se elaboró un conjugado para la prueba de Inmunofluorescencia (IF) a partir de sueros con títulos elevados de conejos recuperados. En México, fué evaluado en improntas y cortes por

congelación de órganos de animales sanos y enfermos, observándose fluorescencia clara y brillante hasta la dilución 1:80, en los animales afectados (21,22,27).

Se han implementado otras alternativas para el diagnóstico como: fijación de complemento y ELISA, así como el uso de anticuerpos monoclonales en las técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa (59,67).

#### j) Medidas de Prevención y Control

Para prevenir la diseminación de la enfermedad a áreas libres, se han aplicado medidas cuarentenarias en países donde está presente la EHVC, restringiendo la movilización de conejos y sus subproductos (18).

La inoculación de macerados de órganos inactivados por formol, induce una alta inmunidad ante el desafío con virus sin inactivar, lo que ha propiciado el uso de la vacunación como medida de control (54).

Varios países han desarrollado vacunas inactivadas con formalina al 0.4% a partir de suspensiones de tejido. Estas vacunas se han usado en Hungría (43), China, Checoslovaquia (71) la U.R.S.S. (29), Corea (19) y España (55), demostrando ser altamente seguras, efectivas y producir inmunidad de 3 a 6 días después de la vacunación con una duración de aproximadamente seis a doce meses (18,55).

Sin embargo, la opción de utilizar la vacuna debe reservarse únicamente a países donde la enfermedad está ampliamente difundida y la erradicación sería sumamente difícil de realizar. De cualquier modo la vacunación puede enmascarar la infección o puede inducir un estado de portador en los animales vacunados (18,38,54).

#### k) Problemas de Salud Pública

No se han presentado problemas de salud en humanos debidos a la EHVC, el virus responsable de esta enfermedad no es peligroso para el consumidor de carne de conejo (12,18,71).

Debido a que la EHVC es una enfermedad de reciente aparición, se desconoce mucho en relación a su patogenia, el presente estudio tiene como finalidad obtener una mayor información acerca de la transmisión, diseminación y alteraciones macro y microscópicas que provoca el virus de la E.H.V.C.

### OBJETIVO GENERAL

1. Determinar la patogenia de la EHVC en conejos inoculados experimentalmente.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la presencia del virus de la EHVC en los tejidos, por medio de la Técnica Directa de Inmunofluorescencia.
2. Determinar las principales lesiones macroscópicas y microscópicas presentes en la EHVC.
3. Establecer la relación entre los hallazgos macroscópicos, microscópicos y de inmunofluorescencia.

## MATERIAL Y METODO

### a) Virus

Para el presente estudio se utilizó virus vivo de la EHVC obtenido de macerados de hígados de conejos afectados en un brote de campo en México; donado por la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y Otras Enfermedades Exóticas de los Animales (C.P.A.).

### b) Animales de Experimentación

Se utilizaron 57 conejos blancos de la raza Nueva Zelanda, de 2 Kg. en promedio, alojados en una unidad de aislamiento del Laboratorio de Alta Seguridad de la C.P.A., ubicado en Palo Alto, México D.F. Los animales se dividieron en lotes de dos animales por jaula, y se les permitió un periodo de adaptación de dos semanas.

### c) Exposición de los Animales al Virus

Los conejos se expusieron mediante rociadores manuales a un aerosol obtenido de hígados macerados de conejos que sufrieron la EHVC. El tiempo de exposición fué de cinco minutos aproximadamente. Para el grupo testigo se emplearon dos animales, que no recibieron inóculo y fueron sacrificados antes de la inoculación del grupo experimental, no se utilizaron testigos en en otras etapas del experimento, ya que habrían sufrido también la infección con el virus.

#### D) Obtención de las Muestras.

Los conejos se sacrificaron a intervalos determinados después de la inoculación (Cuadro 1), se utilizó como método de eutanasia dislocamiento de la nuca.

En cinco animales se permitió que el curso de la EHVC llegara al final, con la presentación de la muerte.

La necropsia se realizó con la finalidad de detectar lesiones y obtener muestras de tonsilas faríngeas, timo, pulmón, hígado, riñón, intestino, bazo, encéfalo, ganglios linfáticos mediastínicos y mesentéricos para los estudios de histopatología e inmunofluorescencia.

Las medidas de bioseguridad que se realizaron para evitar la difusión del virus incluyeron el uso de overoles desechables, baño del personal al momento de abandonar la unidad de aislamiento, desinfección previa en solución de formol durante diez minutos de todo material que se exteriorizó de las instalaciones, esterilización de utensilios contaminados e incineración del material desechable y biológico.

### E) Procesado de las muestras.

Para el estudio histopatológico, las muestras se fijaron en formalina bufferada al 10%, se deshidrataron e incluyeron en parafina para realizar cortes de 4µm de espesor. Se colorearon con la técnica de Hematoxilina/Eosina de Harris según el Manual de Coloraciones para Histología del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas U.S.A. (5) (Ver anexo 1). El procesado y observación se realizó en la Sección de Análisis Clínicos y Patología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM).

Para el estudio de Inmunofluorescencia las muestras fueron congeladas y cortadas a 6µm de espesor mediante un microtomo de congelación. Las pruebas de inmunofluorescencia se realizaron de acuerdo a la técnica directa que describen Garvey (26) y Rovozzo (68) con un conjugado específico para la EHVC, adsorbido con polvo de hígado de conejo sano, para eliminar la fluorescencia inespecífica (\*) (Ver anexo 2). El procesado y la observación se llevaron a cabo en el Laboratorio de Alta Seguridad de la C.P.A. El criterio utilizado para cuantificar la inmunofluorescencia en los tejidos fue el siguiente:

- (+) Células Inmunofluorescentes aisladas.
- (++) Grupos de células inmunofluorescentes.
- (+++) Tejido Inmunofluorescente.

(\*) Elaborado en el Depto. de Virología e Inmunología FMVZ

CUADRO 1

TIEMPO DE SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

GRUPO	TIEMPO DE SACRIFICIO	No. DE ANIMALES
TESTIGO:	Antes de inocular al grupo experimental	2
EXPERIMENTAL:	Despues de la inoculación:	
1	30 minutos	2
2	1 hora	2
3	2 horas	2
4	3 "	2
5	4 "	2
6	5 "	2
7	6 "	2
8	7 "	2
9	8 "	2
10	9 "	2
11	10 "	2
12	11 "	2
13	12 "	2
14	13 "	2
15	14 "	2
16	15 "	2
17	17 "	2
18	20 "	2
19	25 "	2
20	30 "	2
21	35 "	2
22	40 "	1
23	45 "	2
24	51 "	1
25	55 "	1
26	60 "	1
27	65 "	1
28	70 "	1



## RESULTADOS

En los conejos sacrificados antes de las 50 hr. no se observaron signos, a partir de esta hora, los animales presentaron apatía y ligera dificultad respiratoria, que se fue acentuando conforme transcurrió el tiempo, hasta presentarse en forma drástica y con marcada respiración abdominal.

Los cinco animales utilizados para observar el curso de la enfermedad, murieron a las 46, 55, 61, 62 y 71 horas. Estos conejos presentaron un cuadro súbito de tres a cinco minutos, con contracciones y movimientos de carrera violentos. En dos animales se observó la salida de un fluido sanguinolento espumoso a través de las fosas nasales.

### LESIONES ANATOMOPATOLOGICAS

#### a) LESIONES MACROSCOPICAS.

##### APARATO RESPIRATORIO.

Tráquea.- Se observaron hemorragias leves en mucosa a partir de las 25 hr. en diez conejos.

Pulmon.- Se observó congestión y edema, desde las 45 hrs en forma leve. En los animales muertos de manera natural, se observaron ambos trastornos de forma severa y además la presencia de múltiples hemorragias petequiales y equimóticas; al corte se observó la salida abundante de un fluido de color rojizo.

Se observaron lesiones sugestivas de neumonía intersticial en un 23% de los conejos, incluyendo a los animales testigo.

#### APARATO CIRCULATORIO.

Se observó dilatación del ventrículo derecho, con hemorragias petequiales subepicárdicas leves unicamente en los cinco animales muertos por la EHVC.

#### APARATO DIGESTIVO.

Intestino Delgado.- En once animales sacrificados a partir de las 30 hrs. postinoculación se observó enteritis mucosa de leve a moderada, abarcando principalmente duodeno y yeyuno. En los animales muertos por la EHVC, se observó congestión de moderada a severa en los vasos subserosos.

En los animales que murieron de manera espontánea, el ciego se observó con marcada dilatación y abundante contenido pastoso.

Hígado.- En 13 conejos se presentó hepatomegalia y hepatitis leve a partir de las 12 hrs., tornándose severa de la hora 60 en adelante. En los animales que murieron por la EHVC, se encontró ligera friabilidad y la presencia de zonas congestionadas, hemorrágicas y sugestivas a necrosis coagulativa severa. En dos conejos de las 20 y 45 hr. se observaron hemorragias petequiales leves.

#### SISTEMA URINARIO.

En ocho conejos se apreció congestión leve renal desde la hora 20, y severa a partir de las 55 hr. En un animal se observaron lesiones sugestivas de nefritis intersticial severa crónica a las 61 horas.

En los cinco animales que murieron por la enfermedad, se observó la vejiga urinaria pletórica de orina espesa.

#### ORGANOS LINFOIDES.

Bazo.- En doce conejos se observaron trastornos congestivos y esplenomegalia a partir de las 30 hrs.

Timo.- Se encontró con hemorragias petequiales leves sólomente en los animales muertos expontaneamente.

En dos conejos a las 40 y 45 hr., se apreciaron hemorragias petequiales en tonsilas faríngeas y en ganglios linfáticos mesentéricos en dos animales sacrificados a las 20 y 45 hrs.

#### ENCEFALO.

Los vasos sanguíneos meníngeos se apreciaron dilatados y congestionados en los animales muertos por la enfermedad y en los sacrificados a las 13, 30 y 35 horas.

#### GLANDULA ADRENAL

Presentó hemorráguas en médula en un 80% de animales, incluyendo controles negativos.

## b) LESIONES MICROSCOPICAS.

### APARATO RESPIRATORIO.

Pulmones.- En doce conejos se observó congestión moderada y edema leve focal a partir de las ocho hr. y en forma severa a las 45 hr. postinoculación. Dos conejos sacrificados a las dos y ocho horas, presentaron hemorragias moderadas. Escasos microtrombos de fibrina en capilares, se apreciaron desde las 46 hrs. y en abundancia de las 61 a las 71 horas en nueve conejos.

La neumonía intersticial se presentó en el 62% de los animales incluyendo controles. La severidad de esta lesión fue de leve a moderada, encontrándose una mayor afección en los conejos muertos en forma natural por la EHVC.

Sólamente un conejo sacrificado a los 30 minutos presentó hiperplasia linfoide peribronquial leve. El infiltrado de heterófilos en espacios intersticiales fue leve-moderado y se presentó en un 20% de los animales.

### CORAZON.

En 20 conejos se presentó degeneración hialina moderada a partir de las once hr.; se observó congestión leve en tres conejos de las horas ocho, 62 y 65. Un infiltrado linfocitario leve se observó exclusivamente en dos animales a las 61 y 65 horas; y formación de algunos microtrombos en los sacrificados a las 65 y 70 horas. Finalmente en un conejo muerto de manera natural a las 71 horas se apreciaron hemorragias moderadas.

## APARATO DIGESTIVO.

Intestino delgado.- En 33 conejos se encontró a partir de las ocho horas, evidencia de destrucción y desprendimiento de las células epiteliales en vellosidades intestinales, el grado de afección aumentó gradualmente en las observaciones siguientes, hasta llegar a ser severo en los conejos que murieron en forma espontánea. Se observó trombosis múltiple de capilares de la submucosa en los cinco conejos que murieron por la EHVC.

Ciego.- Se encontró en dos animales, infiltración linfocitaria en el epitelio a las siete horas, necrosis epitelial a la hora 61, depresión linfoide leve a las 45 horas, y congestión leve-moderada a las 62 y 71 horas. Se observó además la presencia de Eimeria spp en algunas muestras.

Apendice.- En 27 animales sacrificados a diferentes horas, se presentó necrosis e infiltración linfocitaria leve a moderada en el epitelio, a partir de las cuatro horas. La necrosis leve del tejido linfoide se hizo evidente en dos conejos a los 30 minutos y cuatro horas. La infestación por Eimeria spp también se observó en casos aislados.

Colon.- Se observó con infiltración de linfocitos y heterófilos en epitelio solamente a las siete horas. Necrosis epitelial leve a las 45 y congestión leve a las 71 horas. La presencia de infiltrado de heterófilos fue frecuente.

Hígado.- Se observó en un 99% de los conejos incluyendo a los testigos, degeneración vacuolar difusa de moderada severa y de forma difusa. Los trastornos congestivos se presentaron con frecuencia a partir de la hora diez. En 17 conejos se apreció un infiltrado linfocitario periportal leve. Necrosis coagulativa leve difusa se encontró de forma constante a partir de la hora 46, tornándose severa a partir de la hora 61 en diez conejos.

#### SISTEMA URINARIO.

Riñón.- Se presentó con nefrosis albuminosa de leve a moderada en todos los casos. Los cambios congestivos se apreciaron a partir de las siete horas en forma leve y en forma severa a partir de las 46 horas, resultaron afectados principalmente los glomérulos. La trombosis se observó desde la hora 55.

En los conejos sacrificados a los 30 mín., tres, 15, 35, 61, y 65 horas se encontró nefritis intersticial leve a moderada. Los animales de las horas 14 y 61, presentaron focos necróticos con calcificación distrófica leve.

#### ORGANOS LINFOIDES.

Tonsilas Faríngeas.- Con infiltración de linfocitos a nivel epitelial en uno de los conejos sacrificados a los 30 minutos. La necrosis del epitelio fue frecuente desde las nueve horas. En acúmulos linfoides se pudo apreciar en algunos casos, necrosis linfoide leve multifocal en un conejo sacrificado a las dos horas

y en los conejos afectados por la EHVC a las 55, 62 y 71 horas.

Tímo.- Se encontró un discreto infiltrado de heterófilos a las uno, 20, 25 y 30 horas postinoculación. La congestión moderada pudo ser observada a partir de las 20 horas. La formación de microtrombos se apreció de las 55 horas en adelante.

Bazo.- La congestión se presentó en forma aislada desde la primera hora en grado leve y severa a partir de la hora 51. Se observó vasculitis leve en dos animales a las 11 y 30 horas. Necrosis linfóide leve multifocal y trombosis se apreciaron en un conejo de la hora 71. Otros cambios incluyeron la presencia de un leve infiltrado de heterófilos a las 4 y 20 horas, y acúmulo de hemosiderina a las 20 y 46 horas.

Ganglios Mesentéricos.- En tres conejos se observó un infiltrado leve de heterófilos. En las muestras obtenidas a la hora 20 se apreció congestión leve que se presentó en forma constante a partir de la hora 61. A la hora 61 se encontró necrosis multifocal leve y microtrombosis a las 65 horas.

#### ENCEFALO.

Los trastornos congestivos se hicieron aparentes de manera discontinua a partir de la hora 11, también se observaron trombos en un conejo muerto a las 71 horas. En seis conejos sacrificados a los 30 min., 3, 5, 15, 35, 61, y 65 horas se apreciaron focos de gliosis y vasculitis, leve a moderada.

**GLANDULA ADRENAL.**

**Se observó congestión leve a las horas 15 y 55, y la presencia de hemorrágias leves a las 71 horas.**



## RESULTADOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

### APARATO RESPIRATORIO.

La inmunofluorescencia (IF) se detectó en uno de los conejos sacrificados a los 30 minutos postinoculación y en forma frecuente a partir de las dos horas, en los núcleos de macrófagos alveolares; la cantidad de dichas células fluctuó entre (+) a (++) y aumentó a (+++) a partir de la hora 51 y en los animales muertos.

### CORAZON.

El Corazón mostró escasas células con núcleo IF unicamente en los animales sacrificados a las horas dos y nueve.

### APARATO DIGESTIVO.

En intestino delgado se observaron a partir de las dos horas, células mononucleares con núcleo inmunofluorescente infiltradas entre el epitelio de la mucosa y en tejido conjuntivo de la submucosa. La inmunofluorescencia se observó desde negativa hasta (++) . También se observaron en algunos animales, grupos de células epiteliales con un citoplasma teñido de un color verde más intenso en comparación con las demás células del tejido, localizadas principalmente en la parte superior e intermedia de las vellosidades intestinales.

En intestino grueso, se observaron células mononucleares infiltradas en tejido conectivo a partir de las 5 hrs cuya cantidad fue de (+) a (++) .

En la mayoría de las muestras, (incluyendo a los animales testigos) había células con gránulos fluorescentes, que en algunos casos eran abundantes.

En hígado se observó a partir de las dos horas postinoculación, un infiltrado leve de células mononucleares inmunofluorescentes, en tejido conjuntivo y espacios porta. A las tres horas se observaron escasos hepatocitos con inmunofluorescencia únicamente en el núcleo, en la mayoría de los animales la IF fue escasa (+) y a partir de la hora 51 se incrementó a (++) y (+++) observándose desde este momento inmunofluorescencia en núcleo y citoplasma.

#### SISTEMA URINARIO.

En riñón se observaron escasas células con núcleo fluorescente en dos conejos correspondientes a las horas 40 y 61. En un animal muerto por la E.H.V.C. a las 62 horas, se observó fluorescencia en los glomélulos renales, afectando principalmente al ovillo capilar. En el 98% de las muestras, incluyendo a los animales testigo, se apreció la presencia de un material de aspecto granular fino y de color verde brillante en el citoplasma de las células tubulares.

#### ORGANOS LINFOIDES.

Bazo.- Se observaron macrófagos con inmunofluorescencia tanto en el núcleo como en el citoplasma, y linfocitos con fluorescencia en el núcleo unicamente; se apreciaron grupos (++) a partir de la hora cuatro y el número aumentó a (+++) a partir de la hora 51 y en adelante los animales muertos por la enfermedad.

Tonsilas Faríngeas.- Se observaron linfocitos con núcleo IF y células del epitelio a partir de las dos horas (+). La fluorescencia varió entre (+) a (++) a partir de este momento, hasta observarse abundantes células IF (+++) en un conejo muerto a las 55 hrs.

Timo.- Presentó escasas células IF (+) en los conejos de las dos horas y de la hora siete, la fluorescencia desde este momento se observó entre (+) a (++) .

Ganglios Mesentéricos.- Las células con fluorescencia se observaron a partir de la hora cinco y se mantuvieron entre (+) a (++) .

#### ENCEFALO.

Se observaron neuronas con IF ligera en varios animales incluyendo testigos negativos.

#### GLANDULA ADRENAL.

En glándula adrenal la IF se presentó en células aisladas de la corteza (+), en los conejos de las horas 61, 62, y 71.

**FIGURA No. 1 : Nistagmos, opistótonos y contracción de miembros. Inoculación experimental Hora 71 EHVC.**

**FIGURA No. 2 : Congestión y edema pulmonar, necrosis hepática difusa y congestión esplénica. Inoculación experimental Hora 71 EHVC.**

**FIGURA No. 3 : Vaso sanguíneo con un trombo oclusivo Hora 62. Pulmón H.E. (400X).**

**FIGURA No. 4 : Lobulillo hepático con necrosis coagulativa difusa. Hora 62 (400X)**

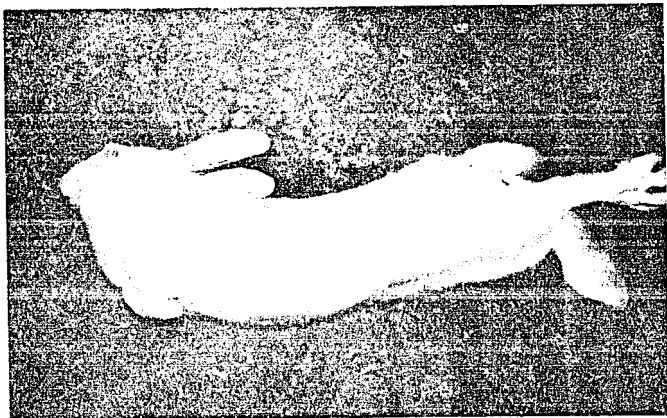


FIGURA No. 1



FIGURA No. 2

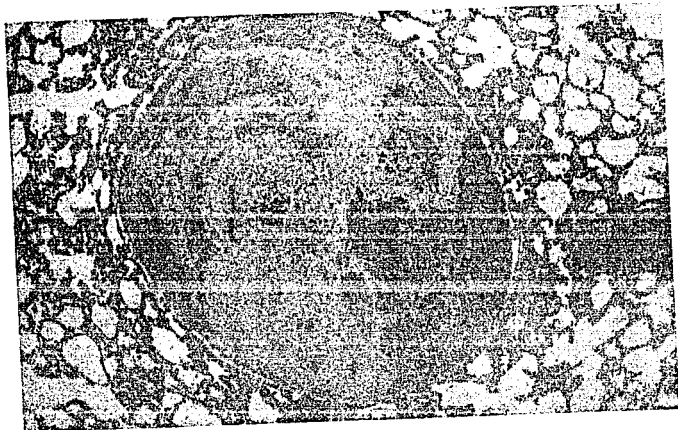


FIGURA No. 3

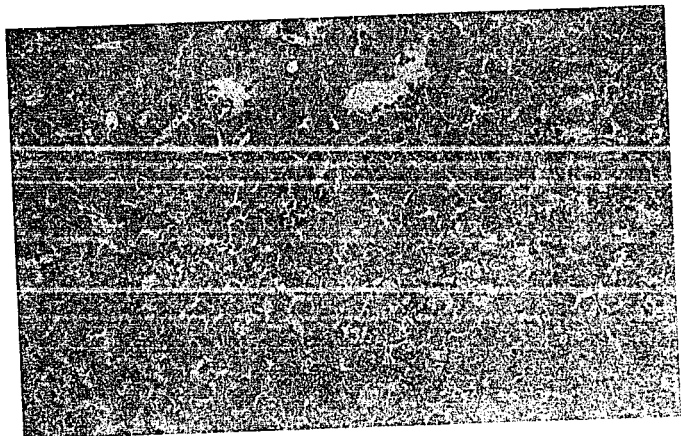


FIGURA No. 4

## DISCUSION

En la presente investigación se estudió la secuencia en la presentación de las principales alteraciones macroscópicas e microscópicas, así como su relación con la detección del virus por inmunofluorescencia, para integrar una posible patogenia de la EHVC en conejos inoculados experimentalmente por vía aerógena.

El cuadro clínico y los cambios macroscópicos observados son similares a los descritos por otros autores, (4,12,13,14,15,18,69) sin embargo en el presente estudio no se observaron emisión de chillidos, presencia de sangre en heces, opistótonos o ataxia (4,11,34,38,61).

Las lesiones macroscópicas e histopatológicas en los animales muertos espontáneamente por la EHVC, fueron de mayor severidad en comparación con los hallazgos en los conejos sacrificados en etapas avanzadas del experimento. Lo que se atribuye a que la enfermedad presenta un cuadro súbito e hiperagudo.

Las lesiones macroscópicas y microscópicas observadas, son similares a lo reportado por Ossa (1990) y Endong (1991) en estudios similares.

Ossa (1990) describe la presencia de congestión y hemorragias pulmonares severas en animales muertos espontáneamente, hepatomegalia moderada desde las 30 horas, congestión renal y esplenomegalia severas y en forma constante desde las 36 horas y finalmente la presencia de congestión en

timo y meninges en los animales muertos por la enfermedad.

Por su parte, Endong (1991) describió en hígado la presencia de congestión y degeneración leve a partir de las 20 horas postinoculación, enrojecimiento de la mucosa traqueal a las cinco horas; abundantes focos hemorrágicos a las 25 horas en pulmón y congestión y aumento de tamaño en riñones a las 10 horas.

Los hallazgos histopatológicos de Ossa (1990) incluyen trombosis en capilares pulmonares y necrosis hepática severa desde las 51 horas, en riñón nefrosis constante desde las 15 horas con congestión glomerular severa y nefritis intersticial en casos aislados.

Endong (1991), por su parte encontró necrosis masiva a las 35 horas; trombosis múltiple en capilares pulmonares a las 30 horas; necrosis de las fibras musculares cardíacas a las 25 horas; microtrombosis glomerular a las 30 horas y finalmente en intestino delgado, desprendimiento de las células epiteliales con infiltración de células plasmáticas a partir de las cinco horas.

Ossa (1990) observó de manera importante, hiperplasia linfoide en los acúmulos peribronquiales entre las seis y nueve horas, con linfo necrosis de moderada a severa entre las nueve y trece horas. En este estudio esos cambios histopatológicos fueron leves y se presentaron en casos aislados.



Los trastornos inflamatorios en los diversos órganos fueron leves, lo que se atribuye a la corta duración de la enfermedad. El infiltrado de heterófilos puede asociarse a la presencia de agentes bacterianos independientes de la EHVC.

La presencia de neumonía intersticial en el 62% de los animales (incluyendo testigos), se asocia a la inhalación continua de vapores de un producto elaborado a base de formol utilizado para desinfectar el lugar; ya que entre las causas de esta lesión se menciona la inhalación de agentes irritantes que se distribuyen ampliamente en el pulmón (36,63). Sin embargo en los conejos muertos por la EHVC se observó en forma severa, por lo que no se puede descartar la acción patógena del virus.

La presentación en seis conejos de nefritis intersticial crónica acompañada de encefalitis no supurativa, es sugestiva con Encefalitozoonosis, que es una infestación crónica y subclínica causada por el microsporidio Encefalitozoon cuniculi (2,64).

Las hemorragias observadas en médula adrenal son características de condiciones de tensión y estrés al momento de la muerte. (36).

Las observaciones por inmunofluorescencia en hígado, pulmón riñón y bazo realizadas anteriormente por Fraire (1990) muestran la presencia constante de células inmunofluorescentes a partir de las nueve horas. Por otra parte, Gong y Ji (1991) mediante inmunofluorescencia y tinciones inmunohistoquímicas, detectaron

antígeno viral a partir de las cuatro horas en células de hígado, bazo, pulmón, riñón, epitelio intestinal, y endotelios vasculares.

En este trabajo la inmunofluorescencia en pulmón se observo a partir de los 30 minutos, en hígado a las tres horas, en bazo a partir de las cuatro hr. y en riñón solo se presentó en dos casos; la tendencia fué constante en hígado y en los demás órganos mostró variaciones marcadas.

La afinidad del virus por tejido renal de acuerdo a los resultados de IF fué mínima, la presencia en varios conejos (incluyendo testigos negativos), de un material finamente granular de color verde brillante en el citoplasma de las células tubulares, posiblemente sea inespecífico. Sin embargo en otro estudio por IF, se describe la presencia de fluorescencia leve desde la primera hora postinoculación hasta la presencia de manchas muy fluorescentes a las 20 horas (21).

De igual forma, en glándula adrenal y encéfalo solo se observaron células ligeramente fluorescentes en los animales muertos espontáneamente por la enfermedad, lo que posiblemente indica que la cantidad de antígeno viral en estos tejidos fué escasa.

En corazón los hallazgos por inmunofluorescencia son poco importantes; a diferencia de lo observado por Endong, que

describe a las 15 horas después de la inoculación, fluorescencia en la mayoría de las fibras cardiacas (21).

Las células granulocíticas con fluorescencia no son específicas de la EHVC, ya que son autofluorescentes.

La reproducción del cuadro clínico y a los hallazgos patológicos encontrados, la presencia de inmunofluorescencia en pulmón a partir de los 30 minutos y dos horas, sugieren que la entrada del agente fue por vía aerógena sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de infección por vía digestiva debido a la presencia de células inmunofluorescentes en intestino delgado a partir de las dos horas. Existe la posibilidad que estas dos vías sean forma importante de contagio en condiciones naturales.

Dada la relación de las tonsilas con el tracto respiratorio y por la observación de inmunofluorescencia a partir de las dos horas es probable que en dicho órgano se pueda realizar una replicación viral inicial.

El infiltrado de células mononucleares inmunofluorescentes en espacios porta de hígado y en tejido conectivo de intestino delgado a las dos horas, y en bazo a las cuatro, sugiere que la vía de diseminación dentro del organismo es por vía sanguínea.

La inmunofluorescencia a partir de las dos horas y la destrucción con desprendimiento de las células epiteliales en la mucosa de intestino delgado desde las ocho horas, corrobora lo observado por Gregg y House (1989) mediante la técnica de

Avidina-biotina, quienes sugieren que en el intestino delgado también se realiza una réplica viral. Aunque se debe de tomar en cuenta la posible penetración del agente por vía digestiva.

La inmunofluorescencia constante a partir de las tres horas y la necrosis coagulativa severa en hígado, indican que este órgano tiene un papel importante en la replicación viral; lo anterior concuerda con lo propuesto por Xianpú y col. (1991), quienes mencionan que este órgano es el más severamente afectado por el virus de la EHVC. La inmunofluorescencia inicial en el núcleo y posteriormente en el citoplasma de los hepatocitos, sugiere que la replicación viral se inicia en el núcleo, lo que confirma lo observado por distintos autores mediante la técnica de inmunofluorescencia tinciones inmunohistoquímicas y microscopía electrónica. (21,27,35,76,77).

En órganos linfoides se observó inmunofluorescencia, lo que sugiere que sea también un sitio de replicación viral, sin embargo al examen histopatológico las lesiones en dichos órganos son leves e inconstantes; lo anterior no coincide con lo encontrado por Ossa (1990) (53).

En las condiciones de este experimento los tejidos linfoides no resultaron afectados de manera importante por la acción patógena del virus.

Los múltiples microtrombos de fibrina en pulmón, riñón, bazo, intestino delgado, encéfalo y timo, implican una alteración

en el sistema de coagulación, lo que se manifiesta como un cuadro de Coagulación Intravascular Diseminada (CID); lo anterior sugiere que puede ser un factor importante en la causa de la muerte por la enfermedad.

La CID es un trastorno trombohemorrágico que aparece como complicación secundaria de diversos estados patológicos, que tiene como consecuencias además de la formación de trombos, la presentación de diatesis hemorrágica, ocasionada por el consumo de plaquetas, factores de coagulación, así como por la activación del sistema fibrinolítico de plasminógeno-plasmina (57,65).

Las lesiones hemorrágicas en diversos órganos observadas en este estudio, son compatibles con diatesis hemorrágica, ocasionada por coagulopatía por consumo asociada a la aparición de la trombosis (42).

La CID se desencadena por dos mecanismos: daño directo a las células endoteliales y liberación de tromboplastina o sustancias tromboplásticas por lesión masiva de tejidos (65).

Entre las causas de lesión extensa de endotelios se encuentra la acción de algunos virus con afinidad por las células endoteliales, como el virus de fiebre porcina clásica, peste porcina africana y lengua azul, entre otros (44).

La presencia de antígeno viral en células endoteliales se ha detectado por otros investigadores, sin embargo en este

trabajo no fue demostrado. Tomando en consideración las lesiones trombóticas diseminadas en diferentes órganos; se sugiere que el virus de la EHVC tiene tropismo por endotelios vasculares y células epiteliales (27,76,77).

Por otra parte, no se puede descartar la acción de las sustancias tromboplastinicas tisulares que aumenten en la circulación debido a la destrucción masiva en hígado y desencadenen la CID mediante la vía extrínseca, según sugiere Ossa (1990).

## CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones en que se realizó este trabajo, y a los resultados obtenidos, se concluye lo siguiente:

La reproducción de la EHVC fué por vía aerógena sin embargo no se puede descartar la entrada por aparato digestivo.

Es factible que la diseminación viral en el organismo se lleve a cabo por vía sanguínea.

El virus invade: tonsilas faringéas, timo, intestino delgado, hígado, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos; siendo el hígado el órgano más afectado.

Las lesiones hemorrágicas sugieren la presencia de un trastorno de diátesis hemorrágica debido al consumo de factores de coagulación ocasionado por trombosis masiva.

## ANEXO 1

### TECNICA DE COLORACION DE HEMATOXILINA Y EOSINA PARA CORTE HISTOLOGICOS CON INCLUSION EN PARAFINA (5)

1. Desparafinar e hidratar.
2. Aplicar hematoxilina de Harris por 15 minutos.
3. Enjuagar con agua corriente.
4. Dar de tres a diez lavados rápidos en alcohol ácido, comprobando la diferenciación de los núcleos en el microscopio.
5. Enjuagar con agua corriente.
6. Dar de tres a cinco lavados en agua de amonio o de carbonato de litio hasta que los cortes se observen de un color azul brillante.
7. Lavar en agua corriente de 10 a 20 minutos.
8. Aplicar la eosina de 15 segundos a dos minutos, dependiendo del estado de la eosina y el contraste deseado.
9. Deshidratar en alcohol al 95% y absoluto dos cambios de dos minutos en cada uno, hasta que se haya removido el exceso de eosina.
10. Sumergir en alcohol absoluto, dos cambios de tres minutos cada uno.
11. Sumergir en xileno, dos cambios de dos minutos cada uno.
12. Colocar resina sintética y cubreobjetos.



## ANEXO 2

### TECNICA DE INMUNOFLORESCENCIA PARA CORTES DE TEJIDOS POR CONGELACION ADAPTADA PARA LA ENFERMEDAD HEMORRAGICA VIRAL DE LOS CONEJOS ( Modif. 26,68)

1. Obtener aproximadamente 1 cm cúbico de tejido.
2. Montar en platinas para criotomo y dejar congelar.
3. Realizar cortes de seis micrómetros de espesor.
4. Fijar en acetona pura durante 15 a 20 minutos.
5. Dejar secar acetona.
6. Aplicar conjugado inmunofluorescente específico para E.H.V.C.
7. Incubar por una hora a 37 C en cámara húmeda.
8. Escurrir conjugado.
9. Lavar con solución P.B.S. (pH 7.2).
10. Sumergir en P.B.S. con movimiento constante durante diez minutos.
11. Lavar con agua bidestilada.
12. Sumergir en agua bidestilada con movimiento constante durante diez minutos.
13. Dejar secar en medio ambiente.
14. Aplicar una gota de glicerina buferada (pH 8.0) y colocar cubreobjetos.
15. Observar.

#### LITERATURA CITADA.

1. An, S.H.; Kim, B.H.; Lee, J.B.; Song, J.Y.; Park, B.K.; Kwon, Y.B.; Jung, J.S.; Lee, Y.S.: Studies on a picornavirus hemorrhagic fever (tentative name) in Rabbits 1. Physico-chemical properties of the causative virus Reseach Reports of the Rural Development Administration, Veterinary 30: 55-61 (1988)
2. Anónimo.: Las Afecciones Nerviosas en el Conejo. Cunicultura. 15: 238-243 (1990)
3. Andral, B.; Hurard, C.; Vivates, C.P.: Viral Culture *in vitro* from Rabbits with Haemorrhagic Disease (VHD) and from Hares with European Brown Hare Syndrome (EHBS). Preliminary Observations. Point Vétérinaire 22: 680-682. (1990).
4. Argüello, V.J.L.; Llanos, P.A.; Pérez-Ordoyo, G.L.I.: Enfermedad Virica Hemorrágica del Conejo en España. Med Vet. 5: 645-650 (1988).
5. Armed Forces Institute of Pathology: Manual of Histologic Staining Methods. 3rd ed. Mc Graw - Hill, New York, 1968.
6. Cancellotti, F.M.; Villeri, C.; Renzi, M.; Monfredini, R.: Le insidie della Malattia X del Coniglio. Rivista di Coniglicultura 25: 41-46 (1988)
7. Cancellotti, F.M.; Villeri, C.; Renzi, M.; Monfredini, R.: La Enfermedad X del Conejo Cunicultura (1989)
8. Cao, S.Z.; Liu, S.G.; Gan, M.H.; Liu, R.P.; Cai, S. and Liu, S.F.: A Preliminary Report on Viral Haemorrhagic Neumonia (tentative name) in Rabbits. Chin. J. Vet. Med., 12: 9-11 (1986).
9. Capucci, L.; Scicluna, M.T.; Lavazza, A.; Brocchi, E.: Purification and Characterization of the aetiological Agent of Viral Haemorrhagic Disease of Rabbits. Selezione Veterinaria 31: 301-312 Italia (1990).
10. Chen, K.; Zeng, D.; He, H.; Zang, X.; Chen, C.; Wei, H.: Observations on Pathology of Rabbit Haemorrhagic Disease, and Dynamics of the Hepatic Enzymes and the T-Lymphocytes in Tissues. International Symposium on Rabbit Haemorrhagic Disease Beijing 131-139 (1991).
11. Ciprian, C.A.; Colmenares, V.G.; Mendoza, E.S.; Hernández, B.E.: Descripción de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos. Memorias Reunión Nacional de Investigación Pecuaria México, D.F. SARH-UNAM (1989)

12. Contera, C.: Enfermedad Virica Hemorrágica del Conejo en España. Servicio Técnico Gallina Blanca Purina, España, 1989.
13. C.P.A.: Gran Brote de la Enfermedad Viral Hemorrágica de los Conejos, Fatal para ellos en México. Boletín Extra. 20 de Febrero de 1989.
14. C.P.A.: Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos: Identificación de la Enfermedad. Boletín Extra.
15. C.P.A.: Operación del Sistema Nacional de Emergencia en Salud Animal de México para la erradicación del brote de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los conejos. Boletín, 2: 4-12 (1989).
16. C.P.A.: Situación Actual de la Campaña contra la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC) en México. Boletín 2: 4-6, (1989).
17. C.P.A.: Impacto Económico del Brote de E.H.V.C. en México. Boletín 2: 6-8, (1989).
18. C.P.A. : Manual para el Reconocimiento de Ciertas Enfermedades de los Animales (En prensa).
19. Deng, R.; Xu, W.; Du, N: Characteristics of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus. Jour. of Nanjing Agric. University. 110-114 (1987).
20. Endong, B.: A Research in Pathomorphology and Pathogenesis of Rabbit Haemorrhagic Disease. International Symposium on Rabbit Haemorrhagic Disease. Beijing. 185-195 (1991)
21. Endong, B.: Tracing Observation of Rabbit Haemorrhagic Disease in Rabbits with Immunofluorescence Technique. International Symposium on Rabbit Haemorrhagic Disease. Beijing. 196-201 (1991).
22. Fraire, C.M.; Benitez, P.I.; Velázquez, E.A.: Pruebas de Hemoaglutinación (HA), Inhibición de la Aglutinación (IHA) e Inmunofluorescencia (IF), aplicadas al diagnóstico de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC) Memorias Reunión Nacional de Investigación Pecuaria México D.F. SARH UNAM. (1989).
23. 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) Memorias Reunión Nacional de Investigación Pecuaria México D.F. SARH-UNAM (1989).

24. 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). Memorias Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, México D.F. SARH-UNAM. (1989).
25. Frescura, T.; Gialletti, L.; Rutili, D.; Fioroni, A.; Marini, C.; Mario de la Mia, G.; Malattia Emorragica Virale del Coniglio. *Obiettivi e Documenti Veterinari* 10: 37-40 (1989).
26. Garvey, J.S.; Cremer, N.E.; Sussdorf, D.H.; *Methods in Immunology* 3a ed. Benjamin/Cummings Pub. Massachusetts, 1977.
27. Gong, X.M.; Ji, C.Y.; Systematic Morphogenesis of the Viral Haemorrhagic Disease Virus in Infected Rabbits and in Adapted Cell Culture. *Rev. sci. tech. Off Int Epiz.* 10: 499-511 (1991).
28. Gunenkov V.V., Kuznetsova, G.D.; Karpov, V.M.: Viral Haemorrhagic Disease of Rabbits. *Krolikodstvo i Zverovodstvo* 20-21 (1989).
29. Gunenkov, V.V.: Viral Haemorrhagic Disease of Rabbits. *Veterinariya* 13-15 (1990).
30. Granzow, H.; Schirrmeyer, H.; Tews, G.: Viral Haemorrhagic Septicaemia of Rabbits: Some Properties of the Causal Agent. *Monatshäfte für Veterinärmedizin* 44: 379-380 RDA (1989).
31. Gregg, D.A.; House, C.: Necrotic Hepatitis of Rabbits: A fatal new parvoviral disease of rabbits. *Proceedings of the 93th Annual Meeting of the U.S. Animal Health Assoc. Las Vegas, Nevada.* (1989).
32. Gregg, D.A.; House, C.: Necrotic hepatitis of rabbits in Mexico: A parvovirus. *Vet. Rec.* 124: 603-604 (1989).
33. Gregg, D.A.; House, C.; Meyer, R.; Berninger, M.: Viral Haemorrhagic Disease of Rabbits in Mexico: Epidemiology and Viral Characterization. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 10: 435-451 (1991).
34. Hernández, B.E.; Colmenares, V.G.; González, G.S.; Mendoza, E.S.; Robles, R.R.; Ciprian, C.A.: Estudio de Microscopia Electrónica de Transmisión de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC). Memorias Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. 1989 México D.F. SARH-UNAM.
35. Ji, C.Y.; Du, N.X.; Xu, W.Y.: Adaptation of the Viral Haemorrhagic Disease Virus of Rabbits to the DJRK Cell Strain. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 10: 337-345 (1991)
36. Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C.; Palmer, N.: *Pathology of Domestic Animals.* 3a ed. Academic Press N.Y. 1985.

37. Kim, B.H.; Lee, J.B.; Song, J.Y.; An, S.H.; Chung, J.S.; Cho, Y.J.: Studies on Picornavirus Haemorrhagic Fever (tentative name) in Rabbits 2. Development of inactivated Vaccines. Research Reports of Rural Development Administration, Veterinary 31: 7-11 Corea (1989)
38. Lee, C.S.; Park, C.K.: Aetiological Studies on an Acute Fatal Disease of Angora Rabbits, so called Rabbit Viral Sudden Death. Korean J. Vet. Res.. 27: 277-290. (1987).
39. Lee, C.S.; Park, C.K.; Shin, T.K.; Cho, Y.J.; Jyeong, J.S. An Outbreak of Rabbit Sudden Death in Korea Suspected of a New Viral Hepatitis. Japanese Jour. of Vet. Sci. 53: 1135-1137. (1990).
40. Li, C.; Jiang, S.D. Zhang, T.: An Electron Microscopy ion-exchange Technique for the Identification of Rabbit Plague Virus. Chinese Jour. of Vet. Med. 14: 2-3 (1988)
41. Marcato, P.E.: Hepatitis Necrótica Infecciosa del Conejo (Perfil Patogénico de una Nueva Enfermedad Hemorrágica) Cunicultura (1989).
42. Marcato, P.S.; Benazzi, C. Vecchi, G.; Galeotti, M.; Della Salda, L.; Sarli, G.; Lucidi, P.: Clinical and Pathological Features of Viral Haemorrhagic Disease of Rabbits an the European Brown Hare Syndrome. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 10: 371-392 (1991).
43. Mocsari, E; Palya, V.; Sinkovics, G.: An effective inactivated vaccine Against Viral Haemorrhagic Disease (RHD) Central Veterinary Institute Budapest (1988).
44. Mohanty, S.B.; Dutta, S.K.: Virología Veterinaria Nva. Ed. Interamericana Mexico D.F. 1983.
45. Morisse, J.P. et al.: Relaciones Etiológicas entre el Síndrome de la Liebre Marrón Europea (S.L.M.E.) y la Enfermedad Virica Hemorrágica del Conejo (E.V.H.) Cunicultura (1990).
46. Morisse, J.P.; Gall, L.E.; Boiletot, E.: Hepatitis de Origen Viral de los Lepóridos: Introducción e Hipótesis Etiológicas. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 10: 297-310 (1991).
47. Ohlinger, V.F.; Haas, B.; Ahl, R.; Weiland, F.: Infectious Haemorrhagic Disease of Rabbits. Contagious Disease Caused by Calicivirus. Tierärztliche Umschau 44: 284-294. (1989).
48. Ohlinger, V.F.; Haas, B.; Meyers, G.; Weiland, F.; Thiel, H.J.: Identification and Characterization of the Virus Causing Rabbit Hemorrhagic Disease. Jour of Virol. 64: 3331-3336 (1990).

49. Ohlinger, V.F.; Thiel, H.J.: Identification of the Viral Haemorrhagic Disease Virus of Rabbits as a Calicivirus. *Rev. sci. tech. Off Int. Epiz.* 10: 311-323 (1991).
50. O.I.E.: Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos. *Informaciones Sanitarias*. 2: 20 de Febrero (1989).
51. O.I.E.: Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo en Yugoslavia. *Informaciones Sanitarias*. 28 Junio (1989).
52. O.I.E.: Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo en Austria. *Informaciones Sanitarias*. 3 de Julio (1989).
53. Ossa, A.J.H.: Patogenia de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (E.H.V.C.) Tesis Maestría F.M.V.Z. (1990).
54. Pages, M.A.: Aspectos Epidemiológicos y Laboratoriales de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo (R.H.D.) en España. Servicio Técnico Laboratorios Hipra
55. Pages, M.A.: Control de la Enfermedad Hemorrágica Virica del Conejo (RHDV) Mediante Vacunación. *Med. Vet.* 7: 93-96 (1990).
56. Parra, F.; Prieto, M.: Purification and Characterization of a Calicivirus as the Causative Agent of a Lethal Hemorrhagic Disease in Rabbits. *Jour of Virol* 64: 4013-4015 (1990).
57. Pérez, T.R.: Introducción a la Patología. 2a ed. Ed. Médica Panamericana México D.F. 1987.
58. Peshev, R.; Petkov, A.; Belemezov, P.; Mitov, B. Bostandzhieva, R.; Lyutskanov, M.: An Acute, Contagious Disease of Domestic Rabbits Accompanied by a Haemorrhagic Syndrome. *Veterinarna Sbirka* 87: 34-36 (1989).
59. Peshev, R.; Ivanov, Y.A.: Micro-Complement Fixation Test for Viral Haemorrhagic Disease of Rabbits. *Veterinarna Sbirka* 87: 31-34 Bulgaria (1989).
60. Plana, D.J.; Vayreda, C.M. Bastoris, P.M.; Vilá, M.X.: Calicivirus: Firme Candidato como Agente Inductor de la Enfermedad Virica Hemorrágica del Conejo. Servicio Técnico Laboratorio Sobrino S.A. (1989).
61. Prigent, A.Y: La Maladie "X" ou Pneumonie Hemorragique du Lapin en Italie. *Cuniculture* 16: (1989)
62. Pu, B.Q.: Quian, N.H. and Cui, S.J.: Micro HA and HI Test for the Detection of Antibody Titres to So-Called "Haemorrhagic Pneumonia" in Rabbits. *Chin. J. Vet. Med.* 11: 16-17 (1985).
63. Quintero, R.V.: Patología del Aparato Respiratorio. (Estudio Recapitulativo.) Tesis Licenciatura F.E.S.C. (1986).

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

64. Quiroz, R.H.: Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos Límusa 1984.
65. Robbins, S.L.; Cotran, R.S.; Kumar, V.: Patología Estructural y Funcional Nueva Editorial Interamericana. México D.F. 3a ed 1987.
66. Rodák, L.; Smid, B.; Valicek, L.; Vesely, T.; Stepanek, J.; Hampl, J.; Jurák, E.: Enzyme-linked Immunosorbent Assay of Antibodies to Rabbit Haemorrhagic Disease Virus and Determination of its Major Structural Proteins. Jour. of Gen. Virol. 71: 1075-1080 (1990)
67. Rodák, L.; Granátová, M.; Valicek, L.; Smid, B.; Vesely, T.; Nevoránková, Z.: Monoclonal Antibodies to Rabbit Haemorrhagic Disease Virus and their use in the Diagnosis of Infection Jour. of Gen. Virol. 71: 2593-2598 (1990).
68. Rovozzo, C.N.B.: A Manual of Basic Virological Techniques. Pretense Hall, N.J. U.S.A. 1975.
69. SARH, SINESA, CPA.: Operación del Sistema Nacional de Emergencia en Salud Animal para la Erradicación del Brote de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos. 17 de Mayo de 1989.
70. Smid, B.; Valicek, L.; Stepanek, J.; Jurák, E.; Rodák, L.: Experimental Transmission and Electron Microscopic Demonstration of the Virus of Haemorrhagic Disease of Rabbits in Czechoslovakia. Jour. of Vet. Med. B. 36: 237-240 (1989).
71. Smid, B.; Valicek, L.; Rodak, L.; Stepánek, J.; Jurák, E.: Rabbit Haemorrhagic Disease: an Investigation of Some Properties of the Virus and Evaluation of an inactivated Vaccine. Veterinary Microbiology 26: 77-85 (1991).
72. Soike, D.; Wilke, I.; Tutte, B.; Stropp, M.; Rösler, D.; Rummler, H.J.; Richter, W.; Werdier, H.; Schlutár, H.; Böhme, R.: Initial Results of Diagnosis and Control of Haemorrhagic Septicaemia of Rabbits in the Potsdam Region of the German Democratic Republic. Monatshefte für Veteinärmedizin 44: 376-378. (1989).
73. Soltystar, Z.; Michalska, Z.: Gross Lesions and Histopathological Picture of Viral Haemorrhagic Disease of Rabbits During the Outbreak in Lower Silesia. Medycyna Weterynaryjna 45: 521-524. (1989).
74. Tesouro-Vallejo, M.: Diagnóstico de la Enfermedad Hemorrágica Virica de los Conejos (E.H.V.C.). Med. Vet. 7: 173-182 (1988).

75. Wang, B.; Xu, Y.; Wang, Y.: Rabbit Haemorrhagic Disease Virus-Induced Acute Disseminated Intravascular Coagulation in Rabbits International Symposium on Rabbit Haemorrhagic Disease Beijing 145-160 (1991).
76. Xianpù, H.; Xi, L.; Fenglong, W. Zhenhua, Z.; Yufang, G.; Chenghao, T.: Studies on Localization of Viral Antigen and Pathomorphology of Experimental Rabbit Haemorrhagic Disease. International Symposium on Rabbit Haemorrhagic Disease Beijing 168-179 (1991).
77. Xu, F.; Chen, W.; Zhang, S.; Zhao, L.; Shen, W.: Pathological Studies of Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) International Symposium on Rabbit Haemorrhagic Disease Beijing 161-167 (1991).
78. Xu, W.Y.: Viral Haemorrhagic Disease of Rabbits in the People's Republic of China: Epidemiology and Virus Characterization Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 10: 393-408 (1991).
79. Xu, W.; Du, N.; Liu, S.: A new Virus Isolated from Hemorrhagic Disease in Rabbits. Procc. of 4th World Rabbit Congress. Budapest 456-461 (1988)