

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Tesis para obtener el grado de Maestría en Medicina Veterinaria y
Zootecnia

Título

Evaluación clínico y patológica de tres aislamientos serovariedad C - 1 de
Avibacterium paragallinarum inoculados experimentalmente en aves libres
de patógenos específicos.

Presenta: MVZ Andrés Paredes Dunzz

Tutor: Dra. Norma Leticia Calderón Apodaca
Comité Tutorial: Dr. Leopoldo Henri Paasch Martínez
Dr. Edgardo Soriano Vargas

México D. F.

Junio, 2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

A mis padres

Este logro es de todos ya que gracias a ustedes he encontrado el ánimo y la fuerza para seguir adelante, han sido mi inspiración y me han enseñado a creer en mi mismo y pelear por las cosas que quiero, gracias por su apoyo incondicional, por sus palabras de aliento, por su esfuerzo y por todo su cariño.

A mi hermano Oscar y a mi cuñada Evelyn

Gracias por todo su apoyo, porque yo se que siempre están al pendiente de todo lo que pasa a mi alrededor, porque se a quien acudir en cualquier situación y que siempre van a estar ahí para mi, les agradezco su compañía y sus enseñanzas.

A mi hermano Edgar y mi cuñada Gloria

Les agradezco por su preocupación y por su apoyo, porque yo se que cualquier cosa que necesite ustedes son un apoyo, en quien puedo confiar y estar seguro que van a estar ahí cuando los necesite.

A mis sobrinos, Oscar, Eder y Edwin

Porque a su corta edad me enseñan que la felicidad de la vida radica en los pequeños detalles y que por ustedes vale la pena seguir luchando.

A todos muchas gracias los amo desde lo más profundo de mi corazón

Agradecimientos

Dra. Norma L. Calderón Apodaca: Gracias por su guía y por su tiempo, porque siempre estuvo a mi lado y porque siempre pude contar con usted Dra. Para solucionar cualquier duda o pregunta, gracias por darme la oportunidad de conocerla como profesionalista y persona.

A mi Comité Tutorial: Les agradezco Dr. Leopoldo Paasch y Dr. Edgardo Soriano por todas sus enseñanzas y consejos que contribuyeron a mi formación profesional y a la finalización de este trabajo, gracias.

A mi jurado: Dr. Gary García, Dr. Erasmo Negrete, Dra. Elizabeth y Dr. Moedano, gracias por todos sus consejos y comentarios que me ayudan a ser mas critico con mi propio trabajo, por sus palabras y consejos.

Al Departamento de Aves y personas que lo integran: Les agradezco por abrirme las puertas de su casa y recibirme como un miembro más de su familia, ya que cada uno de ustedes contribuyeron a mi crecimiento profesional y personal, ya que en este lugar no solo encontré doctores, alumnos y trabajadores sino también encontré a personas muy cálidas y muy buenos amigos.

A Gabriel y Andrea: A ustedes les agradezco infinitamente por todo el tiempo que compartimos, ya que no solo significo trabajo, pasamos por tantas cosas juntos que se ha formado un lazo muy fuerte de amistad.

A aquellos miembros de mi familia, tíos, primos y sobrinos que siempre han estado a mi lado que se han preocupado por mi, que hemos compartido tantas cosas y de los cuales he recibido palabras de aliento y ánimos para seguir adelante y luchar por lo que quiero.

A mis amigos que siempre han estado ahí en el relajo y en los momentos que los necesito, porque la vida no vale la pena sin amigos, sin esas personas que están a tu lado incondicionalmente y por voluntad propia gracias a Elisa, Sandra, Pablo, Toño, Moni, Ceci, Rodrigo, Ana, Mitzi, Miguel, Saeth, y a todos aquellos que me faltaron por todo su tiempo.

Gracias a todos por que todos han contribuido en mi formación y en mi
lucha diaria

Resumen

La coriza infecciosa es una enfermedad de las vías respiratorias altas de las aves causada por la bacteria *Avibacterium paragallinarum*, que tiene un fuerte tropismo por las células ciliadas de las vías respiratorias altas, derivado de sus hemaglutininas, y que ocasiona retraso en el crecimiento del pollo de engorda y significativa reducción de la producción de huevo, hasta del 40%, en las ponedoras.

La coriza infecciosa, se caracteriza clínicamente por edema facial, conjuntivitis y lagrimeo. El edema facial se debe a la inflamación de los conductos nasales y senos infraorbitarios que se acompaña de descarga nasal de exudado mucopurulento muy denso y adherente.

Las lesiones histopatológicas que se han descrito consisten en degeneración, necrosis y descamación de las células epiteliales, de la mucosa nasal, de los senos infraorbitarios y del tercio superior de la tráquea, con infiltrado heterofilico y linfocitario de la lámina propia.

El serovar C-1 de *Avibacterium paragallinarum*, es el más virulento y hasta antes de los recientes aislamientos en México, se pensaba que solo existía en Japón. Previamente a los aislamientos del serovar C-1, en México ya se habían identificado los serovares A-1, A-2, B-1 y C-2.

Al igual que en las infecciones de campo, en las infecciones experimentales, también la cepa de referencia del serovar C - 1, ha provocado los signos clínicos más severos, y en general, los serovares C son más virulentos que los A y B.

Con objeto de caracterizar infecciones experimentales con aislamientos mexicanos de *Avibacterium paragallinarum*, se inocularon por vía nasal aves libres de patógenos específicos con la cepa de referencia H - 18, C - 129 y C - 135 provenientes de aislamientos de campo y todas pertenecientes al serovar C-1, se evaluaron las manifestaciones clínicas y las lesiones.

Del 100% de las aves inoculadas con las cepas H -18 y C - 135, se logró el aislamiento posterior de los agentes etiológicos empleados en la inoculación experimental. Los signos clínicos de las aves inoculadas fueron

los característicos de la coriza infecciosa, es decir, la hinchazón de la cara y la descarga nasal.

Las lesiones histopatológicas fueron las descritas previamente en la mucosa respiratoria de la tráquea y senos infraorbitarios, sin embargo, cabe resaltar que en nuestras inoculaciones experimentales, se detectaron además necrosis linfocitaria en el timo y en la Bolsa de Fabricio, así como infiltración linfocitaria perivascular en los espacios periportales hepáticos.

Los aislamientos mexicanos de *Avibacterium paragallinarum*, empleados en el presente estudio, son capaces de causar infección sin la asociación con otros agentes patógenos y asimismo tienden a mostrar más virulencia que las cepas de referencia descritas en la literatura ya que se pudieron aislar de órganos no respiratorios, sugiriendo una bacteremia.

Abstract

Infectious coryza is an acute avian respiratory disease caused by the bacteria *Avibacterium paragallinarum*, that has a strong adherence to epithelial cells of mucous membranes of nasal passages and sinuses derived from its haemagglutinines.

Infectious coryza is a disease of economic significance that causes growth reduction in chickens and significant drop in egg production in laying hens as high as 40%.

The most prominent features of infectious coryza are facial edema and conjunctivitis. Facial edema is caused by inflammation of nasal passages and sinuses with a mucous- purulent nasal discharge that is dense and sticky.

Reported histopathological findings are sloughing and disintegration of mucosal epithelial cells of nasal cavity, infraorbital sinuses and trachea with heterophil and lymphocytic infiltration in the tunica propria.

Serovar C-1 of *Avibacterium paragallinarum* is considered the most virulent of all, and previously to the recent isolations in Mexico, it was assumed to be restricted to Japan. Previous to the isolations of serovar C-1, the serovars A1, A2, B-1 and C-2 had been already isolated in Mexico.

Similarly as in natural field infections, in experimental infections, serovar C-1 has been the most virulent, and as group, serovars C are more virulent than serovars A and B.

Aiming to characterize experimental infections with Mexican isolates of *Avibacterium paragallinarum*, specific pathogen free birds were nasally inoculated with cultures of reference strains, H-18, C-129 and C-135 derived from field isolations and all belonging to serovar C-1. Clinical signs and lesions were monitored.

Isolation of previously, experimentally inoculated organisms was achieved in 100% of cases inoculated with H - 18 and C - 135 strains. Clinical signs were facial edema conjunctivitis, and mucous purulent nasal discharge typical of infectious coryza.

The histopathologic response was consistent with the essential changes described for infectious coryza, namely epithelial degeneration and necrosis of mucosal linings of nasal passages, infraorbital sinuses and trachea with heterophil and lymphocytic infiltration in the tunica propria, however, histopathological findings in our study were detected beyond the respiratory organs, since lymphocytic necrosis and depletion were observed in thymus and Bursa of Fabricius and perivascular lymphocytic infiltrations in hepatic portal spaces.

The Mexican isolates of *Avibacterium paragallinarum* employed in the present study were virulent and caused infection without association with other pathogenic agents and also could be isolated from organs different from the respiratory system, suggesting bacteremia.

Contenido

1	Introducción	8
1.1	Antecedentes	8
1.2	Etiología	9
1.3	Morfología y tinción	10
1.4	Hospederos	11
1.5	Patogenicidad	11
1.6	Patogenia	12
1.7	Signos	12
1.8	Lesiones	12
1.9	Lesiones macroscópicas	12
1.10	Lesiones microscópicas	13
1.11	Transmisión	13
2	Justificación	14
3	Objetivo general	14
3.1	Objetivos específicos	14
4	Hipótesis	14
5	Material y Métodos	15
5.1	Bacterias	15
5.2	Preparación del inóculo	15
5.3	Diseño experimental	15
5.4	Estudios histológicos	16
5.5	Aislamiento bacteriológico	16
6	Resultados	16
6.1	Signología	16
6.2	Aislamiento bacteriológico	21
6.3	Resultados histológicos	23
7	Discusión	40
8	Conclusiones	42
9	Referencias	43

1. Introducción

La avicultura es la rama de la producción pecuaria de más rápido crecimiento y la creciente demanda mundial de productos avícolas deriva de que no existen restricciones culturales o religiosas al consumo de los mismos. Para mantenerse acorde con la demanda se requiere un permanente incremento de la eficiencia y productividad de la avicultura. Este alto grado de tecnificación, exige una vigilancia permanente respecto a los agentes infecciosos que pueden abatir los parámetros de producción de las aves como es el caso de *Avibacterium paragallinarum* que ocasiona bajas tasas de crecimiento y reducción significativa en la producción de huevo que puede alcanzar hasta un 40%. (Blackall, 2007; Kaur, 2005; Blackall y Soriano, 2008.)

El hospedero natural de *A. paragallinarum* es la gallina doméstica, todas las edades son susceptibles, pero por lo general la enfermedad es menos grave en pollo de engorda. En aves de mayor edad, principalmente en gallinas de postura, el periodo de incubación es menor y el curso de la enfermedad más prolongado. No existen informes de infecciones en humanos por lo que *A. paragallinarum* no constituye un problema de salud pública. (Kaur, 2005).

Existen serovares con limitación geográfica como A-4 y C-4 que se han aislado en Australia, A-3 en Ecuador y Brasil (Blackall y Soriano, 2008). Por el contrario, el serovar B-1 tiene una distribución más amplia alrededor del mundo (Blackall y Soriano, 2008). El serovar B-1 se había denominado como el Serovar de más baja virulencia entre todos los serovares sin embargo se han tenido reportes de que éste puede tener diferente virulencia siendo tan agresivo como los demás en diversas áreas geográficas, aunque no se han determinado las causas de esta variación en patogenicidad. El serovar C-1 es el más virulento de todos y hasta antes de los reportes recientes en México (Soriano, 2004a), solo se había identificado en Japón. En México se han identificado los serovares A-1, A-2, B-1 y C-2, pero no se ha determinado su patogenicidad en forma comparativa con las cepas de referencia. (Soriano *et al.*, 2001).

1.1 Antecedentes

En 1932 De Blicke aisló por primera vez el agente de la coriza infecciosa aviar y lo denominó *Bacillus hemoglobinophilus coryzae paragallinarum*, poco después y debido a sus requerimientos de crecimiento en cuanto a los factores X (hemina) y V (dinucleotido de nicotinamida adenina), se reclasificó como *Haemophilus paragallinarum*.

A partir de 1962 se demostró que todos los aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* obtenidos de casos clínicos de coriza infecciosa, en realidad

solo requerían del factor V para crecer a diferencia de otras especies del género *Haemophilus* que requieren también del factor X. (Blackall y Soriano, 2008; Ibrahim, 2004).

1.1.1 Etiología

Haemophilus paragallinarum a partir de 2005 se reclasificó como *Avibacterium paragallinarum* con base en las secuencia del gen 16S RNA ribosomal. (Blackall *et al.*, 2005; Soriano, 2004a, b).

El primer esquema de agrupación serológica a través de la aglutinación en placa para *Avibacterium paragallinarum* fue propuesto por Page en 1962, quien los dividió en serovariedades A, B y C. (Page, 1962).

Matsumoto y Yamamoto en 1973 aislaron la cepa Modesto, que corresponde a la serovariedad C.

A través del esquema de Page es factible establecer una correlación entre las serovariedades y la especificidad inmunológica.

Kume *et al.*, en 1983 propusieron una clasificación serológica alterna, con base en la prueba de inhibición de la hemaglutinación modificada, utilizando células tratadas con tiocinato sódico y sonicadas, anti-suero de conejo y eritrocitos aviares fijados en gluteraldehído. En este esquema las serovariedades, A, B, y C de Page se clasificaron como serogrupos I, II, III y para cada serogrupo se determinaron serovariedades, tres de ellas para el serogrupo I (A1, A2, A3), una para el serogrupo II (A4) y tres para el serogrupo III (A5, A6 y A7)

Las serovariedades son HA-1, HA-2, HA-3, HA-4, HA-5, HA-6 y HA-7. (Hsu, 2007; Soriano, 2004b; Blackall y Soriano, 2008).

Como en Australia se aislaron e identificaron una octava y una novena serovariedades, fue necesario modificar el esquema de Kume para permitir la adición de nuevas serovariedades, por ello, los serogrupos I, II y III, fueron nombrados como A, B, y C y de esta manera los serogrupos A, B, y C de Kume concuerdan con las serovariedades de A, B y C de Page (Blackall y Soriano. 2008).

De acuerdo con esta clasificación, las serovariedades de Kume actualmente reconocidas son A - 1, A - 2, A - 3, A - 4, B - 1, C - 1, C - 2, C - 3 y C - 4. (García, 2002; Hsu, 2007).

1.1.2 Morfología y características de tinción.

Avibacterium paragallinarum es una bacteria Gram negativa, no móvil, que en cultivos de 24 horas tiene forma cocobacilar y de bastones cortos de 3 µm de largo por 0.4 a 0.8 de ancho que pueden formar filamentos. Las cepas virulentas poseen cápsula. (García, 2002; Hsu, 2007).

Estas bacterias requieren de 5 a 10% de CO₂ para su crecimiento *in vitro*, son catalasa negativa y oxidasa positiva, fermentadoras de glucosa con producción de gas.

No causan hemólisis de eritrocitos de bovino y son negativas a la prueba de citrato.

No producen las siguientes enzimas: ureasa, hidrolasa, lisina decarboxilasa, deaminasa y gelatinasa.

Todas las serovariedades son productoras de D-mannitol, D-sorbitol, D-fructosa, D-mannosa y sucrosa.

Ninguno de los serotipos es positivo a β-galactosa, β-glucosa, α-fructosa, α-galactosa y, dependiendo de la serovariedad, son fermentadores de manitol, sorbitol, glicerol, arabinol, arabinosa, galactosa, trealosa, ribosa y xilosa entre otros glúcidos. (Blackall, 2005; Ibrahim, 2004; Blackall y Soriano, 2008)

Son requerimientos indispensables para el crecimiento de *Avibacterium paragallinarum* el NAD o el NADH y el cloruro de sodio. El pH de los diferentes medios de cultivo puede variar entre 6.9 a 7.6, creciendo a una temperatura óptima que va de 37° a 38° C.

Las bacterias que producen NAD - NADH favorecen el crecimiento simbiótico de *A. paragallinarum* (Blackall y Soriano, 2008).

Las colonias de *Avibacterium paragallinarum* tienen forma de gota de rocío de 0.3 mm de diámetro.

Para la observación de las colonias, la luz debe dirigirse de manera oblicua en cuyo caso se aprecian las características mucoides e irisdiscetes, rugosas y no irisdiscetes o formas intermedias (Blackall y Soriano, 2008).

A. paragallinarum es un microorganismo delicado que se inactiva con rapidez fuera del hospedero.

El exudado suspendido en agua de la llave se inactiva en 4 horas a temperatura ambiente; cuando se suspende el mismo en solución salina pierde su efectividad a las 24 horas a una temperatura constante de 22° C, el periodo de viabilidad infecciosa aumenta ligeramente si la temperatura es de 37° C. El exudado conservado a 4° C es infeccioso por 72 a 96 horas.

Para conservar un cultivo se requiere realizar pasajes semanales en cajas de agar-sangre. (Blackall y Soriano, 2008; Soriano, 2004c).

1.1.3 Hospederos

El hospedero natural de *A. paragallinarum* es la gallina doméstica de todas las edades pero también se ha aislado de gallinas de guinea y pavos. (Kaur, 2005; Blackall y Soriano, 2008).

1.1.4 Patogenicidad

La patogenicidad de la bacteria se asocia a la cápsula que protege al microorganismo en contra de los mecanismos de defensa del hospedero.

Se ha sugerido que las formas capsuladas de *A. paragallinarum* liberan una toxina que favorece su multiplicación *in vivo* y que sería la responsable de las manifestaciones clínicas (Blackall y Soriano, 2008).

Además de la cápsula, la virulencia de *Avibacterium paragallinarum* también está relacionada con factores como aglutininas, hemocina y secreción de proteínas (Soriano, 2004d).

La coriza infecciosa se caracteriza por su alta morbilidad. La mala nutrición, las infestaciones parasitarias y las condiciones ambientales adversas prolongan el curso de la coriza y exacerban sus manifestaciones clínicas. Puede llegar a presentarse mortalidad cuando coriza infecciosa coexiste con agentes virales causantes de enfermedades como; viruela aviar, bronquitis infecciosa y laringotraqueitis.

La infección mixta con otras bacterias como *Mycoplasma gallisepticum* y *Pasteurella multocida* pueden llegar a presentar mortalidad (Byarugaba, 2007; Kaur, 2005).

Los pollos que se recuperan de la infección activa presentan diferentes grados de inmunidad. Cuando las gallinas de postura adquieren la coriza infecciosa durante su crecimiento, por lo general ya no enferman durante la postura. (Blackall y Soriano, 2008)

La cepa de referencia del serovar C - 1 ha mostrado los signos clínicos más severos en aves infectadas de manera experimental y en general los serovares C son los más virulentos dentro de los tres grupos. Se creía que el serovar C-1, estaba restringido a Japón, sin embargo en México se han aislado organismos que corresponden a este serovar (Bragg; 2005, Soriano *et al.*, 2004).

En Argentina se ha aislado un serovar B1 que es genéticamente distinto de los demás y se ha encontrado que las vacunas preparadas con base en los serovares de referencia no protegen contra esta infección (Sandoval, 1994). En China también se ha aislado un serovar B1 y las vacunas convencionales tampoco confieren protección (Blackall, 1999; Zhang, 2003).

1.1.5 Patogenia

Avibacterium paragallinarum es una bacteria no invasiva con un fuerte tropismo por las células ciliadas de las vías respiratorias altas por lo que para establecerse en otros sitios requiere de la sinergia con otros agentes infecciosos o de la baja inmunidad del hospedero (Ibrahim, 2004).

Se ha demostrado *in vitro* que *A. paragallinarum* produce adhesinas que lo fijan a las células epiteliales de la tráquea. (Soriano, 2004d). Encontrando que las adhesinas son las hemaglutininas mediadoras de esta adhesión. Fuera de los mecanismos de adhesión, la patogenia de *A. paragallinarum* no ha sido estudiada a profundidad.

1.1.6 Signos

La coriza infecciosa es una enfermedad de las vías respiratorias altas con dos presentaciones que se han denominado simple y complicada.

La forma simple se caracteriza por inflamación de los conductos nasales y los senos infraorbitarios con una descarga nasal muy adherente, edema facial, lagrimeo y conjuntivitis.

La forma complicada se refiere a la sinergia con otras infecciones virales o bacterianas tales como bronquitis infecciosa, laringotraqueitis infecciosa, viruela y enfermedad crónica respiratoria en cuyos casos se manifiesta disnea, diarrea así como baja notable en el consumo de agua y alimento.,

En las casetas en las que se encuentran muchos animales afectados, y donde la presentación de la enfermedad es crónica se detecta un olor a putrefacción debido a las deyecciones de las aves.

En la forma complicada la mortalidad puede ser significativa y la baja de la postura oscila entre 10 y 40% (Blackall y Soriano, 2008).

1.1.6.1 Lesiones Macroscópicas

Se produce un exudado que va de catarral a caseoso en las membranas mucosas de los conductos nasales y senos infraorbitarios.

La piel y plumas alrededor del ojo se cubren de exudado mucoso y es muy marcada la hinchazón de la cara y barbillas por el edema subcutáneo. En ocasiones la infección se extiende ocasionando traqueitis serosa o caseosa. Los pulmones pueden presentar zonas de consolidación y en los sacos aéreos llega a presentarse opacidad y la presencia de exudado seroso o caseoso.

1.1.6.2 Lesiones Microscópicas

Los reportes de estudios histológicos describen lesiones en la mucosa de la cavidad nasal, los senos infraorbitarios y la tráquea, consistentes en degeneración, necrosis y descamación de las células epiteliales. Posteriormente se presenta hiperplasia compensatoria.

En la lámina propia se reporta edema e infiltración heterofílica.

Algunos autores han descrito abundancia de células cebadas en lámina propia de la membrana mucosa de la cavidad nasal. (Blackall y Soriano, 2008; Kaur, 2005).

Los cambios patológicos son detectables a partir de las 20 horas post infección y alcanzan su mayor severidad entre los 7 y 10 días.

La regeneración ocurre entre los 14 y 21 días. (Ibrahim, 2004; Blackall y Soriano, 2008).

En infecciones severas se presenta bronconeumonía con exudado de heterófilos en los espacios aéreos. Las células epiteliales de los capilares respiratorios presentan degeneración e hiperplasia.

La inflamación de los sacos aéreos se caracteriza por infiltración heterofílica del tejido subepitelial. (Blackall y Soriano, 2008; Kaur, 2005).

1.1.7 Transmisión

La transmisión del agente de *Avibacterium paragallinarum* es horizontal por el contacto entre las aves, de forma directa a través de gotas de exudado nasal, o de forma indirecta a través de agua y alimento contaminados.

Existen aves clínicamente sanas que son reservorios de la infección lo que juega un papel importante cuando se manejan aves de diferentes edades ya que los animales jóvenes se pueden enfermar al entrar en contacto con animales de mayor edad que sean portadores (Blackall, 2003; Blackall y Soriano, 2008).

2. Justificación

Hasta 2009, los serovares prevalentes de *Avibacterium paragallinarum* en México eran A-1, A-2, B-1 y C-2. Recientemente, se identificaron aislamientos emergentes del serovar C-1.

El presente trabajo se diseñó para estudiar la patogenia de los aislamientos de campo de serovar C-1 en México, comparándolos con la cepa de referencia de éste a través de infecciones experimentales.

El serovar C - 1 ha sido identificado únicamente en Japón, y la cepa de referencia de este serovar ha mostrado ser de la de mayor virulencia con relación a los otros serovares.

El aislamiento de serovar C1 de *Avibacterium paragallinarum* en México, requiere de un estudio detallado para conocer su patogenia con el fin de aportar nuevo conocimiento a favor de la avicultura mexicana que permita diseñar los mejores métodos de diagnóstico, prevención y control de la infección.

3. Objetivo general

Determinar la patogenia de los aislamientos del serovar C -1 de *Avibacterium paragallinarum* en México y compararla con la del serovar de referencia.

3.1 Objetivos particulares

Inocular aves libres de patógenos específicos con el Serovar H18 y los aislamientos C - 135 y C - 129 de *Avibacterium paragallinarum* para realizar estudios comparativos de patogenicidad.

Evaluar los signos clínicos y las lesiones macro y microscópicas de las aves inoculadas experimentalmente.

Realizar el aislamiento de la bacteria de los diversos órganos y tejidos estudiados.

4. Hipótesis

Por tratarse del serovar C-1 de *Avibacterium paragallinarum*, los aislamientos de casos de campo realizados en México, deben producir el cuadro clínico de una enfermedad respiratoria y las correspondientes lesiones en aves libres de patógenos inoculadas experimentalmente.

5. Material y Métodos

El presente trabajo se realizó en las unidades de aislamiento y laboratorios del Departamento de Producción Animal Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se utilizaron 84 aves libres de patógenos específicos (ALPES) de sexo mixto, de 7 semanas de edad con las que se integraron cuatro grupos de 21 aves cada uno. El primer grupo de aves testigo, el segundo grupo de aves inoculadas con el aislamiento de campo C-135, correspondiente al serovar C-1, el tercer grupo de aves inoculadas con el aislamiento de campo C-129, correspondiente al serovar C-1 y el cuarto grupo de aves inoculadas con la cepa de referencia H - 18, serovar C1.

5.1 Bacterias

Para el presente estudio se utilizaron 2 aislamientos C - 1 mexicanos aislados en campo, la C- 135 y la C - 129, y la cepa de referencia H - 18 de la bacteria *Avibacterium paragallinarum*. Las cepas fueron facilitadas por el Dr. Edgardo Soriano Vargas del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (C.I.E.A.S.A.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

5.2 Preparación del inóculo

Las 3 cepas utilizadas, la de referencia y los dos aislamientos (C - 135 y C - 129) en cultivo puro fueron sembradas en base de agar con 10% de sangre de ovino con una estría de la colonia nodriza de *Staphylococcus epidermidis*, se agregó NAD y fueron incubadas a 37° C durante toda la noche. Se procedió a inocular de 3 a 5 colonias en 10ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI) que se incubó a 37° C.

Los paquetes bacterianos se obtuvieron mediante centrifugación y se lavaron en 3 ocasiones con PBS, a un pH 7.2 y ajustados a una densidad óptica (DO) de 0.1 a 620 nm que corresponde a una concentración de 10⁸ UFC/0.5 ml.

La cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC), se estableció por medio de conteo de placas. El valor se calculó con la fórmula:
 $\log [\text{CFU/ml}] = \log (\text{DO}) - 9.16$ (Chadfield *et al.*, 2005).

5.3 Diseño experimental

Las aves se alojaron en las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves, en corrales en piso, con cama de viruta de madera a razón de 8 aves/m²

Se les proporcionó 12 horas de luz al día y se alimentaron con alimento comercial sin antibióticos, se les dotó de agua a libre acceso y se mantuvieron a temperatura ambiente.

A las aves se les inocularon 0.2 ml de los serovares C -1 de referencia, C - 129 y C - 135 mediante instilación nasal que contenía 5×10^8 unidades formadoras de colonia por mililitro.

Las aves testigo fueron inoculadas con 0.2 ml de solución salina fisiológica.

Cada 24 horas durante los 7 días post inoculación se observaron los signos clínicos.

Cada 24 horas, se sacrificaron 3 aves con inyección de pentobarbital sódico, para proceder a realizar la necropsia completa.

Se tomaron muestras para bacteriología e histopatología de tráquea, pulmones, sacos aéreos, timos, bolsa de Fabricio, bazo, tonsilas cecales, medula ósea, hígado, riñón y corazón.

5.4 Estudios histológicos

Los órganos se fijaron con formalina al 10%, amortiguada a un pH de 7.4 durante 24 horas, se deshidrataron con Xilol en concentración creciente (70 a 100%), se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 3 a 5 micras de espesor con un micrótomo. Se montaron en laminillas para teñirse con hematoxilina y eosina.

5.5 Aislamiento bacteriológico

De cada órgano muestreado se realizó la siembra en agar sangre, por medio de una estria cerrada con una línea cruzada de *Staphylococcus epidermidis* como cepa nodriza, se incubaron a 37° C por 24 a 48 horas en anaerobiosis, 10% de CO₂.

Las pruebas de identificación bacteriana incluyeron la morfología de las colonias (Ibrahim, 2004).

6. Resultados

6.1 Signología

Los signos clínicos se tabularon en una escala del 0 al 4.

Grado 0: Ave sin signos clínicos.

Grado 1: Ligero escurrimiento nasal, ligera hinchazón facial, lagrimeo escaso, ligera conjuntivitis, estornudos ocasionales, disnea moderada, heces pastosas (Figura 1).

Grado 2: Exudado nasal seroso abundante, ligera hinchazón de los senos infraorbitarios, lagrimeo abundante pero acuoso, párpados parcialmente cerrados, estornudos, frecuencia respiratoria aumentada, heces acuosas (Figura 2).

Grado 3: Exudado nasal abundante y muy adherente, cara hinchada y ojos cerrados, lagrimeo constante y denso, estornudos frecuentes, disnea, heces acuosas con olor fétido (Figura 3).

Grado 4: Exudado nasal muy abundante que adhiere el alimento y forma costras, cara muy hinchada y párpados adheridos, estornudos muy frecuentes, manifiesta disnea caracterizada por boqueo, diarrea con estrías de moco y olor muy fétido (Figura 4).

Ejemplos de signos clínicos en la cara:



Fig 1. Grado 1



Fig 2. Grado 2



Fig 3. Grado 3



Fig 4. Grado 4

El signo clínico más frecuente fue la hinchazón facial que se presentó en 86% de las aves inoculadas con el aislamiento C - 135 (Figuras 5, 6, 7, 8 y 9). En las aves inoculadas con la cepa H-18 y el aislamiento C - 129 este signo se observó respectivamente en 67% y 42% de los casos (Figuras 10, 11, 12, 13 y 14).

Las aves inoculadas con el aislamiento C - 135 presentaron descarga nasal en un 66% de los casos (Figura 15), mientras que con la cepa H-18 y el aislamiento C-129 esta presentación fue respectivamente de 38% y 23% de los casos (Figura 16).

En cuanto a signos clínicos, el aislamiento C-135 fue el que afectó al mayor número de animales, mientras que C-129, resultó menos agresiva que la cepa de referencia H-18.

Tabla 1. Tabla de signos clínicos característicos, mostrando la frecuencia en las aves, en número de observaciones y grado (Números Romanos):

Aislamientos	DESCARGA NASAL	HINCHAZON FACIAL	ESTORNUDO	CONJUNTIVITIS
H -18	8/21, II	14/21 III	5/21 II	5/21 II
C-129	5/21, II	9/21 III	2/21, I	1/21 I
C-135	14/21, II	18/21 III	5/21; II	3/21 III



Figura 5. Ave ALPES de 7 semanas inoculada con el aislamiento C - 135. Presenta lesión de grado 3 a las 72 horas post – infección (hpi). Se observa edema e hinchazón notable en la cara y párpados hinchados.



Figuras 6, 7, 8 y 9. Aves ALPES de 7 semanas de edad inoculadas con el aislamiento C - 135. Presentan lesión de grado 4 a los 4 y 5 días post – infección (dpi). Se observa exudado abundante con conjuntivitis, deformación de la cara con los ojos cerrados.



Figuras 10 y 11. Aves Alpes de 7 semanas de edad inoculadas con el aislamiento C - 129. Presentan lesión de grado 4 a las 96 hpi. Se observa conjuntivitis, deformación de la cara con los ojos cerrados.



Figuras 12, 13 y 14. Aves ALPES de 7 semanas de edad inoculadas con la cepa H - 18. Presentan lesión de grado 4 a las 96 hpi. Se observa conjuntivitis, deformación de la cara con los párpados cerrados.



Figura 15. Aislamiento C - 135. Lesión de grado 3, presente desde el día 2 hasta el día 5 pos infección. Se observa exudado nasal abundante y muy adherente con edema e hinchazón en la cara con párpados hinchados.



Figura 16. Aislamiento C – 129. Lesión de grado 3, presente desde el día 2 hasta el día 5 post - infección. Se observa exudado nasal abundante y muy adherente, así como párpados hinchados.

6.2 Aislamientos bacteriológicos

En las aves inoculadas con el aislamiento C-135 y la cepa H – 18 se pudo aislar el agente causal en un 100% de las aves inoculadas, mientras que en las inoculadas con el aislamiento de campo C-129 se lograron en 52.3% de los casos (Tabla 2).

Tabla 2. Los aislamientos obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Aislamientos	% de Aislamiento	Día de Aislamiento	Órganos Positivos
H-18	(21/21) 100%	2,3,4,5,6,7	Seno infraorbitario(9) Tráquea (9) Saco aéreo (1) Riñón (1) Bazo (1)
C-129	(11/21) 52.3%	2,3,4,5,6	Seno infraorbitario (6) Tráquea (4) Bazo (1)
C-135	(21/21) 100%	1,2,3,4,5,6,7	Seno infraorbitario (11) Tráquea (6) Saco aéreo (1) Pulmón (1) Timo (1) Bazo (1) Médula ósea (1) Articulación (1)

Tejido	Número de aves con aislamientos de C - 135 / C - 1 / C - 129, después del día de inoculación:						
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Seno Infraorbitario	1/0/0	3/2/1	2/2/2	3/2/ 2	1/1/1	1/1/0	0/1/0
Tráquea	0/0/0	1/1/0	2/3/1	2/3/2	1/1/1	0/1/0	0/0/0
Saco aéreo	0/0/0	0/0/0	1/0/0	0/1/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Pulmón	0/0/0	1/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Timo	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	1/0/0	0/0/0
Corazón	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Hígado	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Bazo	1/0/0	0/0/0	0/0/0	0/1/1	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Tonsilas Cecales	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Bolsa de Fabricio	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Riñón	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/1/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Médula Ósea	1/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Articulación	0/0/0	0/0/0	1/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0

Tabla 3. Aislamientos bacteriológicos del 1° al séptimo día post -infección.

6.3 Estudios histológicos

Las aves inoculadas con el aislamiento C - 135 mostraron lesiones histológicas en los siguientes órganos:

Seno infraorbitario: Se observó congestión y hemorragias desde el primer día post - infección (dpi) hasta el séptimo dpi en 11/21 aves, el grado de severidad fue de leve a moderado (Figura 17). También se encontró edema desde el segundo dpi hasta el séptimo dpi en grado leve en 7/21 aves, además de pérdida de epitelio desde el primer hasta el séptimo dpi variando de grado de leve a moderado en 11/21 aves (Figura 18).

Se encontró la presencia de infiltrado heterofílico y linfocitario, además de exudado inflamatorio mixto así como de eritrocitos en la luz desde el primer día hasta el séptimo dpi, el grado de severidad fue de leve a severo en 21/21 aves (Figuras 19 y 20).

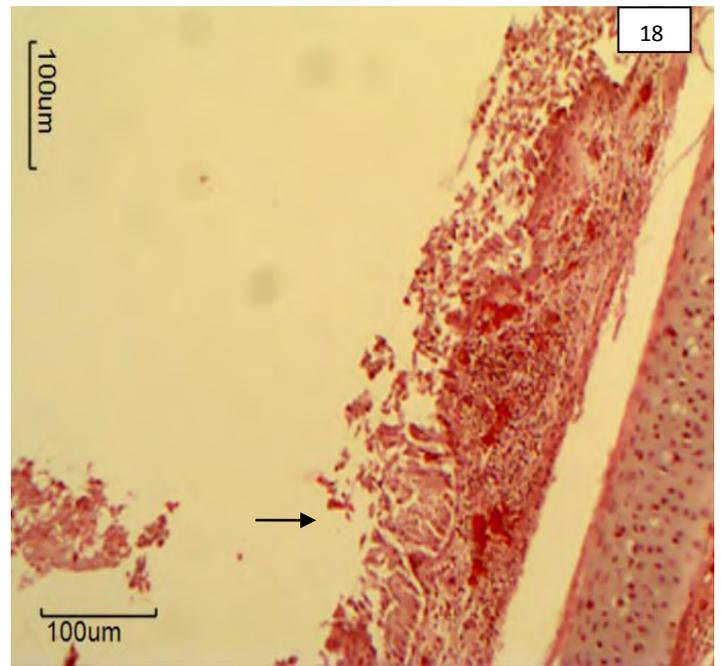
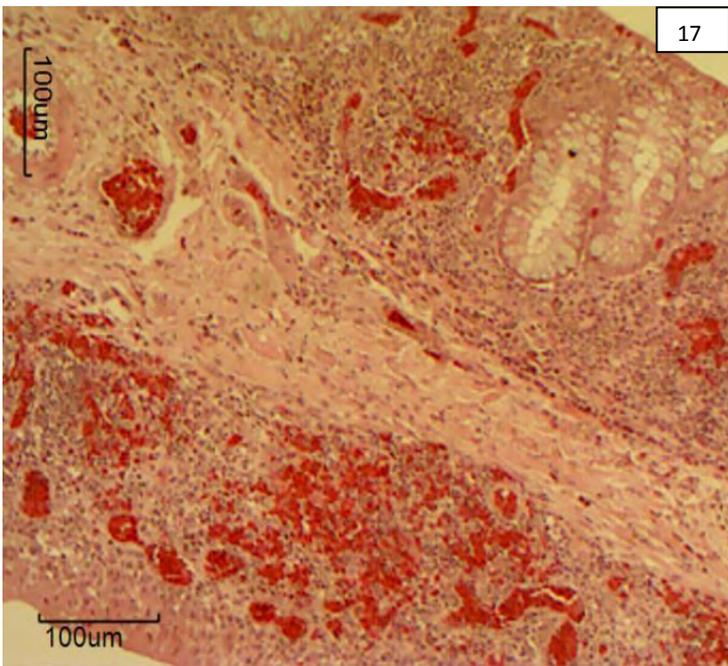


Fig 17. Aislamiento C - 135 aves ALPES. Seno infraorbitario con presencia de hemorragias e infiltrado linfocitario y heterofílico al día 4 post - infección (pi). Tinción Hematoxilina y Eosina (HE). Fig 18. Aislamiento C - 135 aves ALPES. Seno Infraorbitario con hemorragia y descamación del epitelio (), así como infiltrado inflamatorio mononuclear al día 3 pi. Tinción HE.

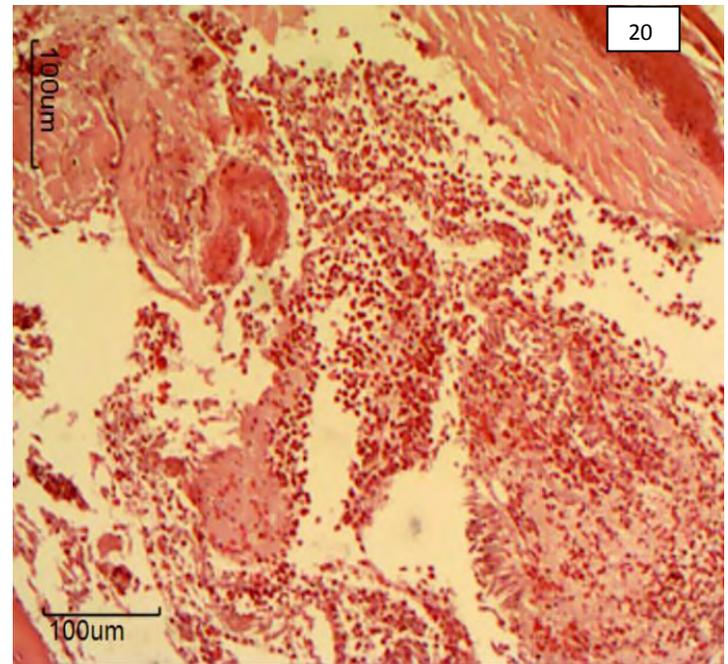
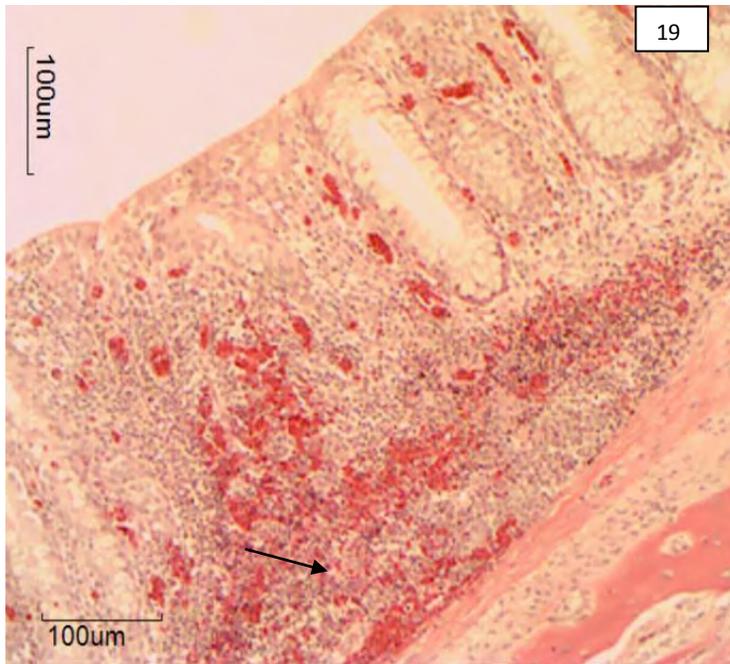


Fig 19. Aislamiento C – 135 aves ALPES. Seno infraorbitario con infiltrado linfocitario así como hemorragias al día 7 pi. Tinción HE. Fig 20. Aislamiento C – 135 aves ALPES. Seno infraorbitario con exudado inflamatorio y hemorragia en la luz del órgano al día 2 pi. Tinción HE.

Tráquea: Se observó congestión y hemorragias desde el día 2 hasta el día 5 pi en 4/21 aves, el grado de severidad fue de leve a moderado (Figura 23), El edema se encontró desde el segundo hasta el séptimo dpi en 16/21 aves, el grado de severidad vario de leve a moderado (Figura 21).

Además de infiltrado heterofilico desde el primer hasta el séptimo dpi en 19/21 aves, e infiltrado linfocitario desde el segundo hasta el séptimo dpi en 17/21 aves, el grado de severidad de ambos infiltrados estuvo entre leve a moderado.

El epitelio traqueal presentó pérdida de cilios a partir del segundo hasta el séptimo día post – infección, en 16/21 aves, así como descamación del epitelio en 14/21 aves que fue de grado leve a moderado (Figura 22 y 23).

En las zonas donde se podían observar células epiteliales con cilios se encontró la presencia de bacterias adheridas a los mismos en 5/21 aves sugerentes de *Avibacterium paragallinarum* (Figuras 24 y 25).

Además de las lesiones anteriores se identificó hiperplasia del epitelio y de las células mucosas y en algunas zonas el epitelio traqueal presentó metaplasia en 4/21 aves.

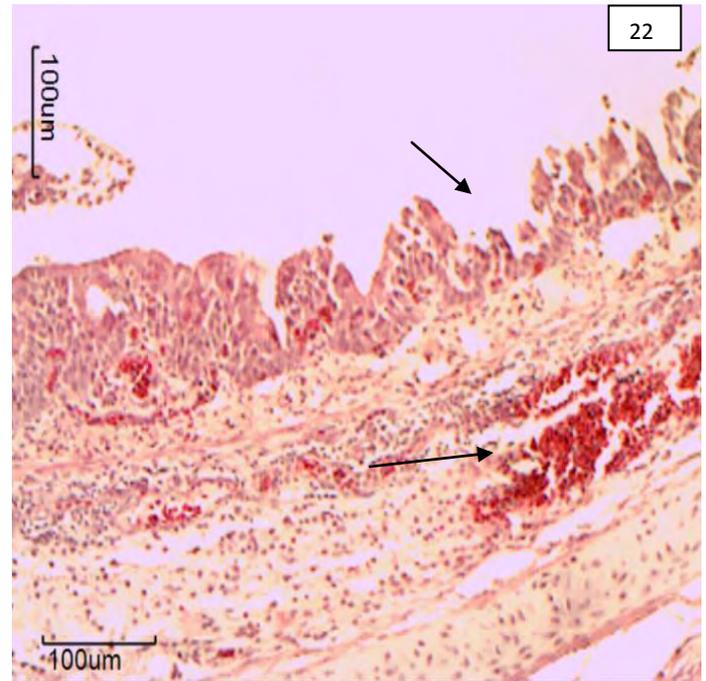
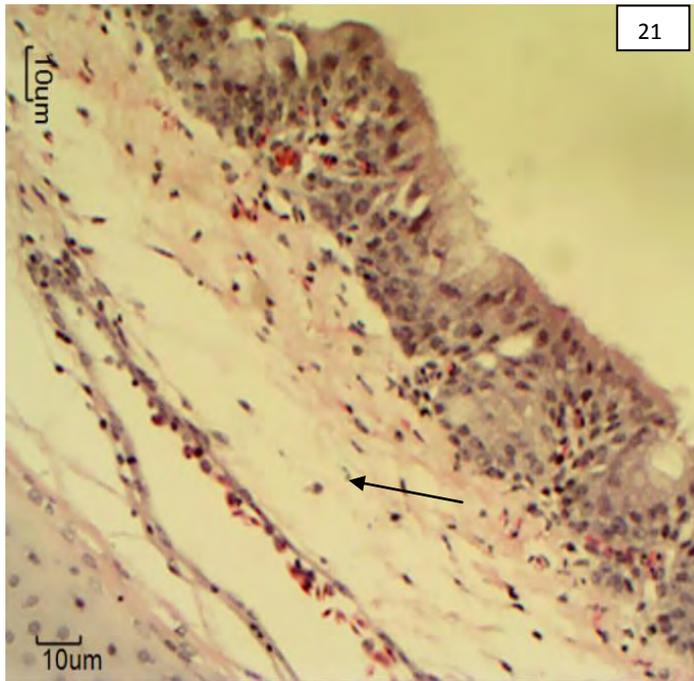


Fig 21. Aislamiento C - 135 aves ALPES. Tráquea con edema (→) e infiltrado linfocitario y heterofilico al día 4 pi. Tinción HE Fig 22. Aislamiento C - 135 aves ALPES. Tráquea con hemorragias (→) e infiltrado heterofilico y linfocitario y pérdida del epitelio (→) al día 5 pi. Tinción HE.

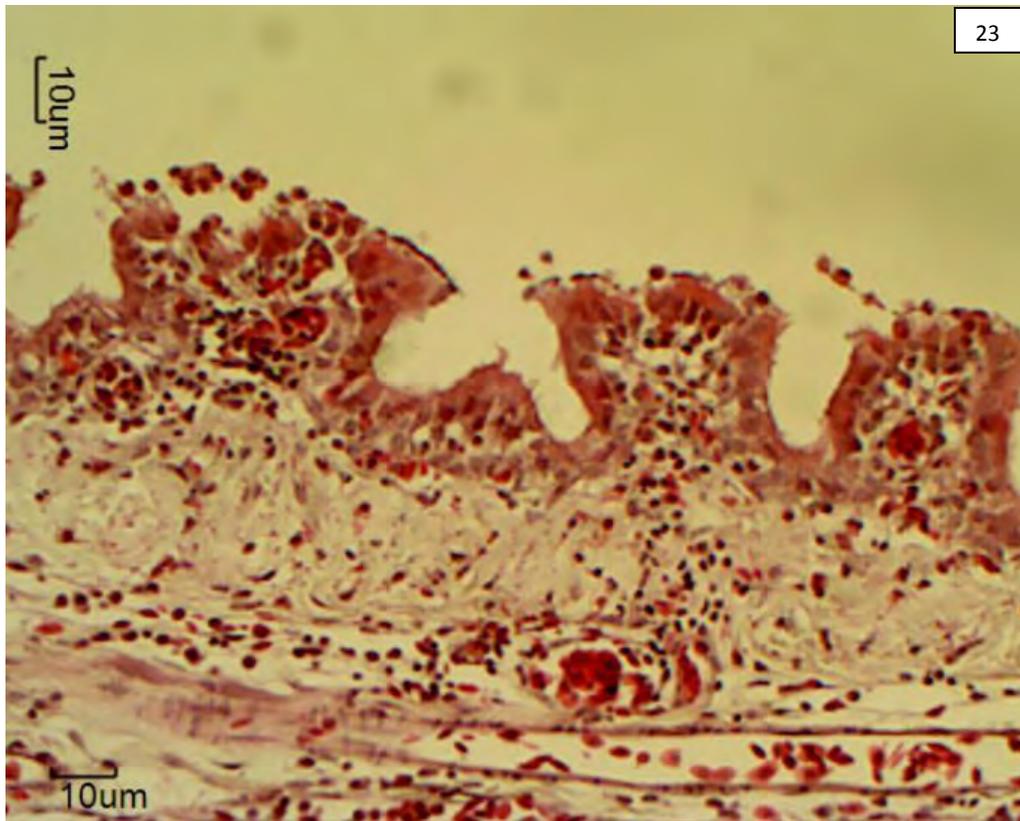


Fig 23. Aislamiento C – 135 aves ALPES. Tráquea con pérdida de cilios e infiltrado heterofilico y linfocitario al día 7 pi. Tinción HE.

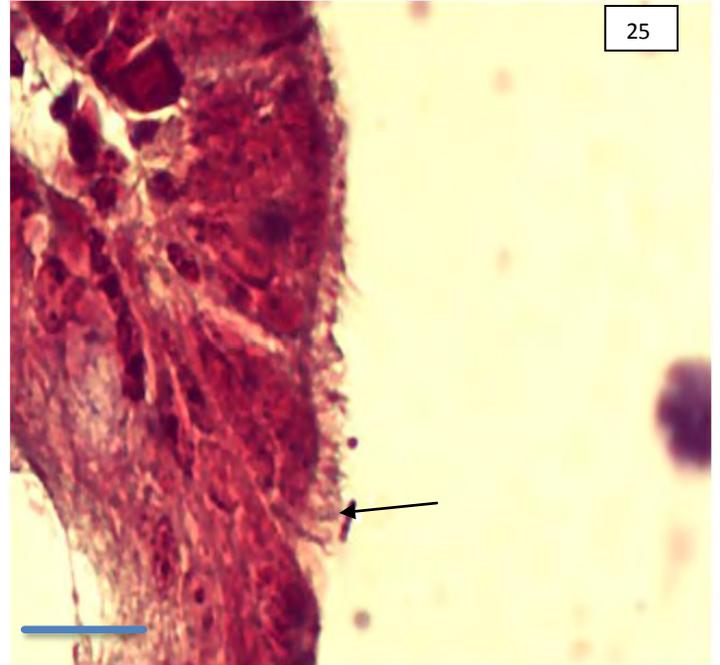
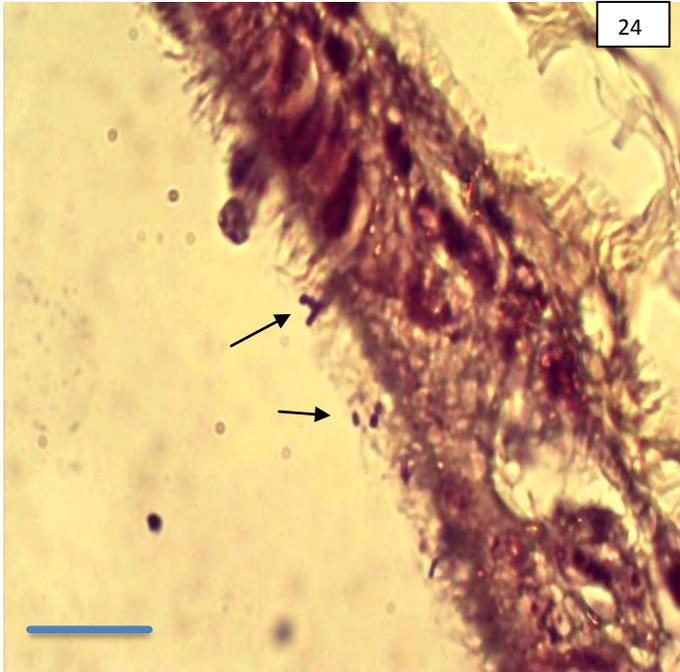


Fig 24 Aislamiento C - 135. Tráquea con bacterias en células ciliadas sugerentes a *A. paragallinarum* (→) al día 3 pi. Tinción de Gram. Barra de 0.05 mm. Fig 25 Aislamiento C - 135. Tráquea con bacterias en células ciliadas sugerentes a *A. paragallinarum* (→) al día 5 pi. Tinción de Gram. Barra de 0.05 mm.

Las lesiones encontradas en aparato respiratorio inferior no fueron significativas en el desarrollo de la infección experimental:

Pulmones: Se observó un ligero infiltrado linfocitario intersticial con distribución multifocal y en 10/21 aves (Figura 26).

Saco aéreo: Se encontró un foco de infiltrado linfocitario ligero en 1/21 aves (Figura 27).

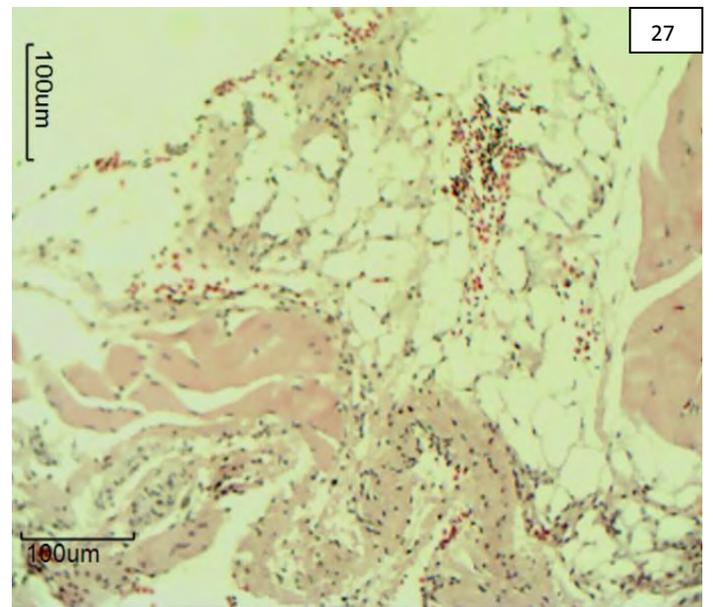
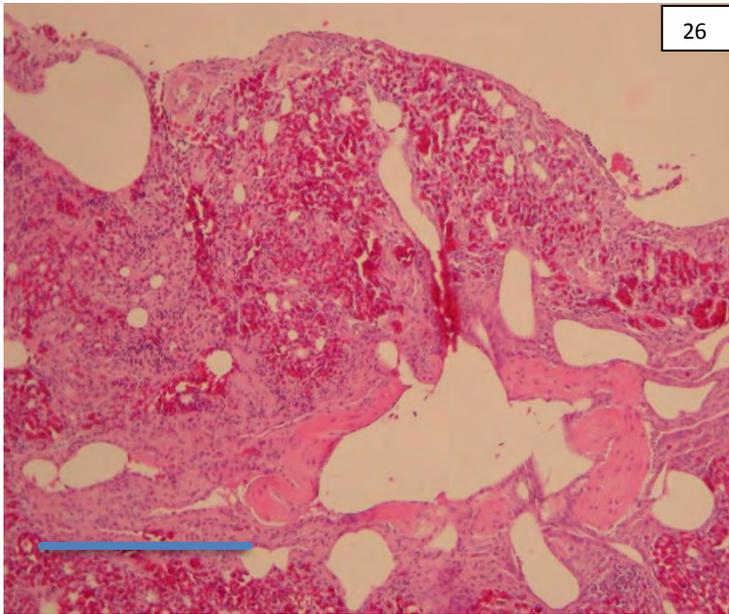


Fig 26. Aislamiento C – 135 aves ALPES. Pulmón con infiltrado intersticial y hemorragias al día 4 pi. Tinción HE. Barra de 1 mm. Fig 27. Aislamiento C – 135 aves ALPES. Saco aéreo con infiltrado linfocitario y heterofílico al día 4 pi. Tinción HE.

Timo: Las lesiones en timo incluyen infiltrado heterofílico del segundo al quinto dpi, en grado leve en 3/21 aves, con necrosis y apoptosis de linfocitos del primer al séptimo dpi en grado moderado en 21/21 aves, correspondiente a la depleción linfoide medular del primer al séptimo dpi en 21/21 aves, el grado de severidad varió de leve a moderado (Figura 28, 29 y 30).

La depleción linfoide en la corteza va del segundo al séptimo dpi en 11/21 aves, con un grado de severidad de leve a moderado.

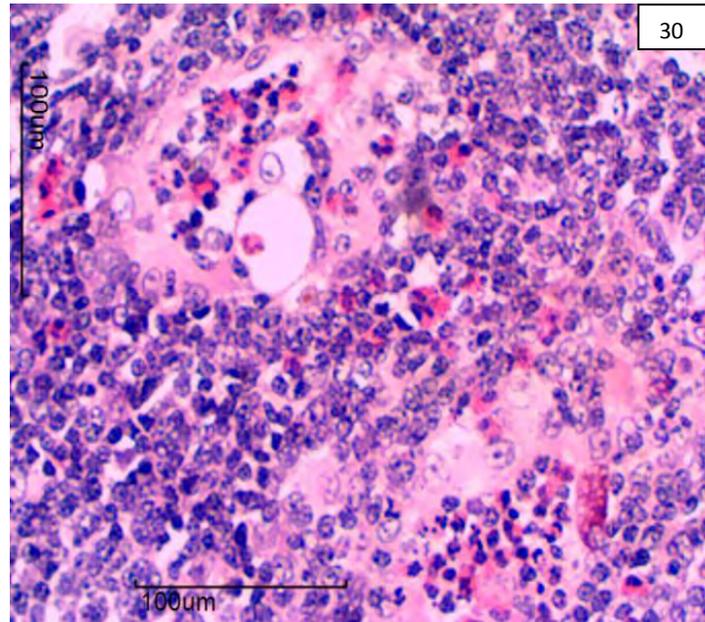
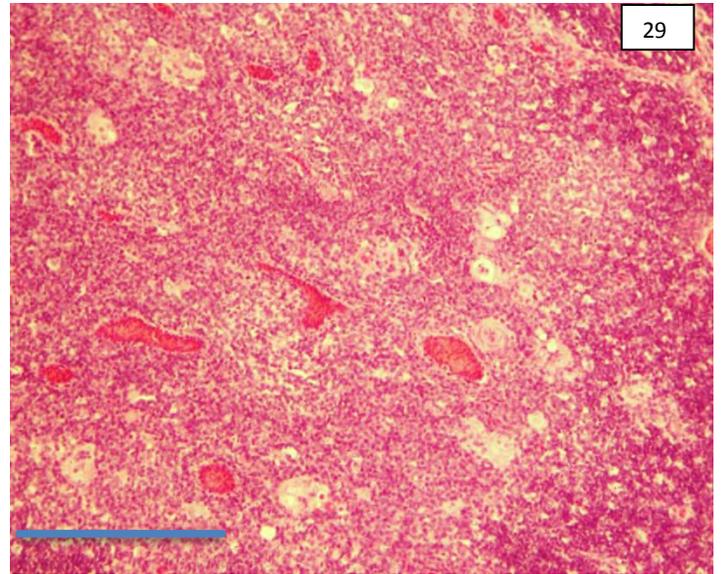
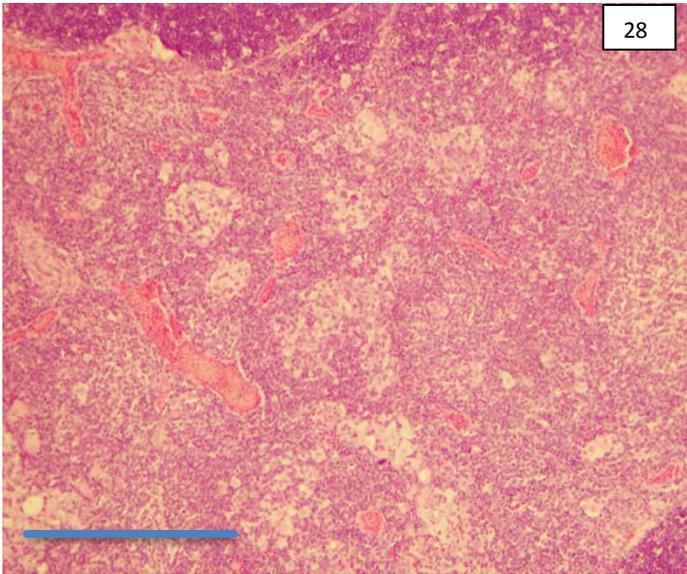


Fig 28. Aislamiento C – 135 aves ALPES. Timo con depleción linfocitaria medular, necrosis y apoptosis al día 2 pi. Tinción HE. Barra de 1 mm. Fig 29. Aislamiento C – 135 aves ALPES. Timo con depleción linfocitaria medular al día 7 pi. Tinción HE. Barra de 1 mm. Fig 30. Aislamiento C – 135 aves ALPES. Timo con necrosis y apoptosis de linfocitos al día 5 pi. Tinción HE.

Bolsa de Fabricio: Se observó edema desde el primer hasta el séptimo dpi en 21/21 aves, el grado de severidad fue de leve a moderado. Se identifico

necrosis y apoptosis de los linfocitos tanto en la zona medular como en la zona cortical, del primer hasta el séptimo dpi en 21/21 aves con un grado de severidad de leve a moderado (Figura 31). Además de infiltrado intersticial de linfocitos del tercero al séptimo dpi en 12/21 aves en grado leve a moderado (Figura 32).

Se observó de forma menos constante la presencia de quistes intraepiteliales entre el segundo y tercer dpi en 3/21 aves en grado moderado (Figura 33). Se observó atrofia folicular en el séptimo dpi en 2/21 aves en grado leve.



Fig 31. Aislamiento C – 135 aves ALPES. Bolsa de Fabricio con edema, depleción linfocitaria leve medular e infiltrado intersticial () al día 3 pi. Tinción HE. Barra de 1 mm.

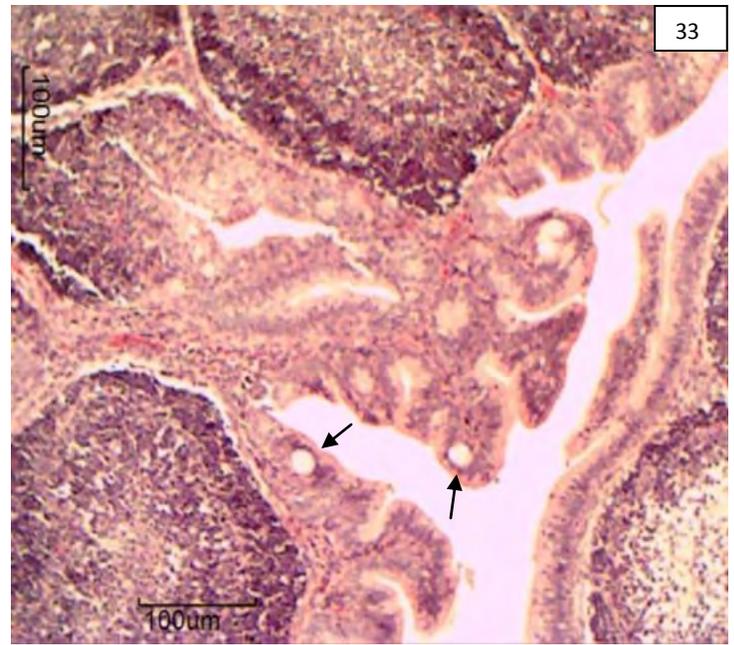


Fig 32. Aislamiento C – 135 aves ALPES. Bolsa de Fabricio con edema e infiltrado intersticial (→) al día 7 pi. Tinción HE. Fig 33 Aislamiento C – 135 aves ALPES. Bolsa de Fabricio con presencia de quistes intraepiteliales y formación de epitelio adenoide (→) al día 2 pi. Tinción HE.

Hígado: Se encontró infiltrado linfocitario perivascular del segundo al séptimo dpi en 17/21 aves, el grado de severidad fue de leve a moderado (Figuras 34 y35).

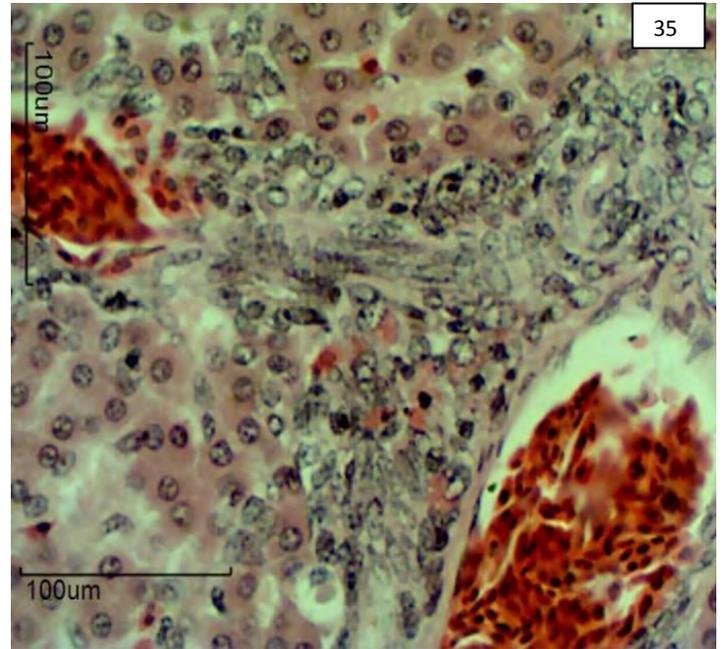
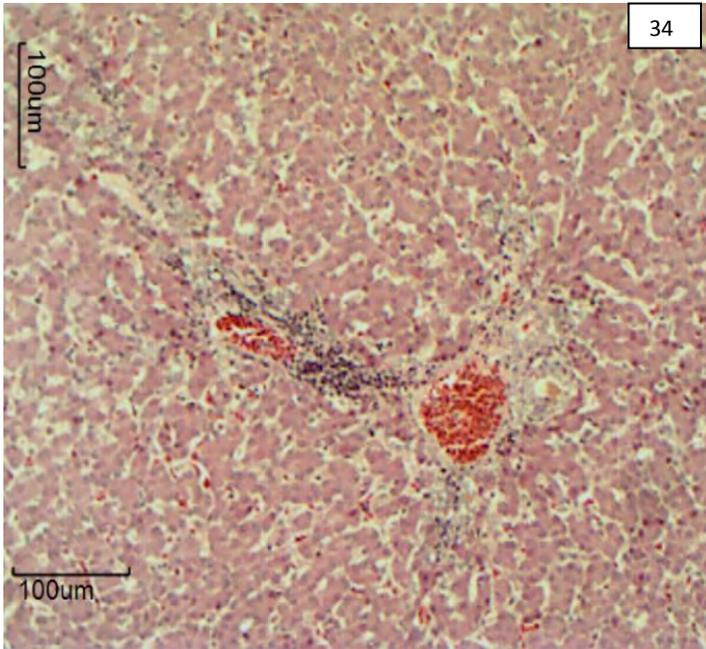


Fig 34. Aislamiento C – 135 aves ALPES. Hígado con infiltrado linfocitario perivascular al día 3 pi. Tinción HE. Fig 35. Aislamiento C – 135 aves ALPES. Hígado con infiltrado linfocitario perivascular al día 7 pi. Tnción HE.

La revisión de las aves inoculadas con la cepa H – 18 mostró lesiones histológicas en los siguientes órganos:

Seno infraorbitario: Se encontró edema desde el segundo hasta el séptimo dpi en grado ligero en 3/21 aves, además se observó desprendimiento de epitelio desde el primer hasta el séptimo dpi que fue variando de leve a moderado en 5/21 aves.

Se demostró la presencia de infiltrado heterofílico y linfocitario en el órgano además de exudado inflamatorio en la luz del órgano desde el primer día hasta el séptimo dpi, el grado de severidad estuvo entre ligero a moderado en 18/21 aves (Figuras 36 y 37).

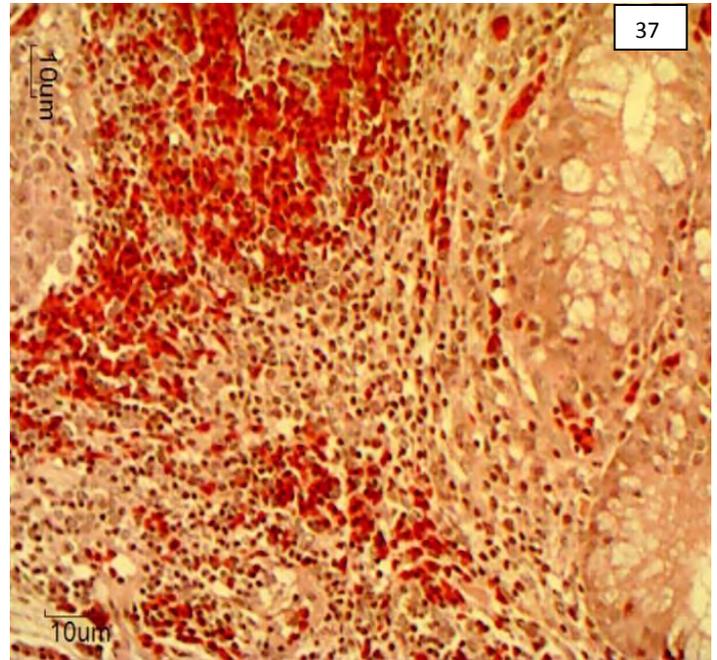
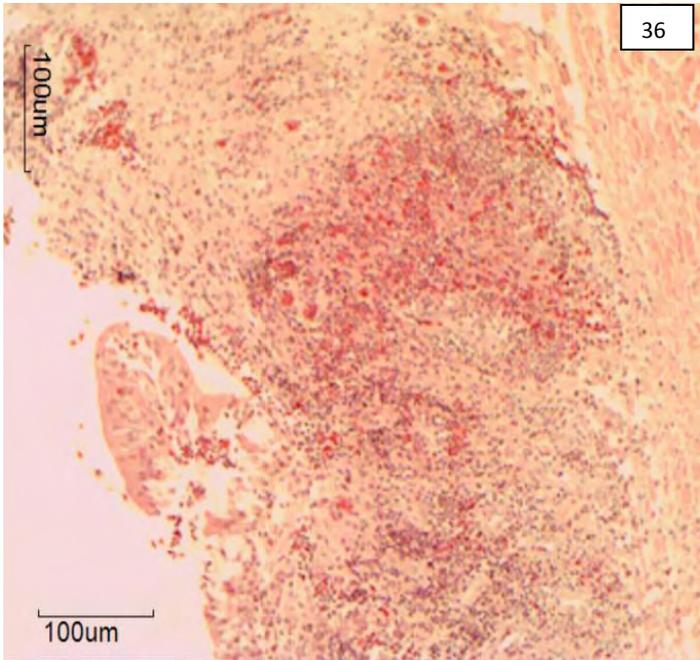


Fig 36. Cepa H - 18, aves ALPES. Seno infraorbitario infiltrado linfocitario y heterofilico severo, con desprendimiento del epitelio al día 4 pi. Tinción HE. Fig 37. Cepa H - 18 aves ALPES. Seno infraorbitario con infiltrado linfocitario y heterofilico, con hemorragias, al día 4 pi. Tinción HE

Tráquea: Se encontró edema desde el segundo hasta el séptimo dpi en 5/21 aves, en grado de severidad leve (Figura 43).

Además de infiltrado heterofilico y linfocitario desde el primer hasta el séptimo dpi en 15/21 aves, el grado de severidad de ambos infiltrados varió entre leve a moderado (Figuras 38 y 39).

El epitelio traqueal presentó pérdida de cilios a partir del segundo día post - infección hasta el séptimo día en 3/21 aves, así como descamación del epitelio en 8/21 aves en grado leve a moderado, así como hiperplasia de la mucosa y epitelio traqueal en 2/21 aves en grado leve; de la misma forma se observó la presencia de epitelio plano en 5/21 en grado leve.

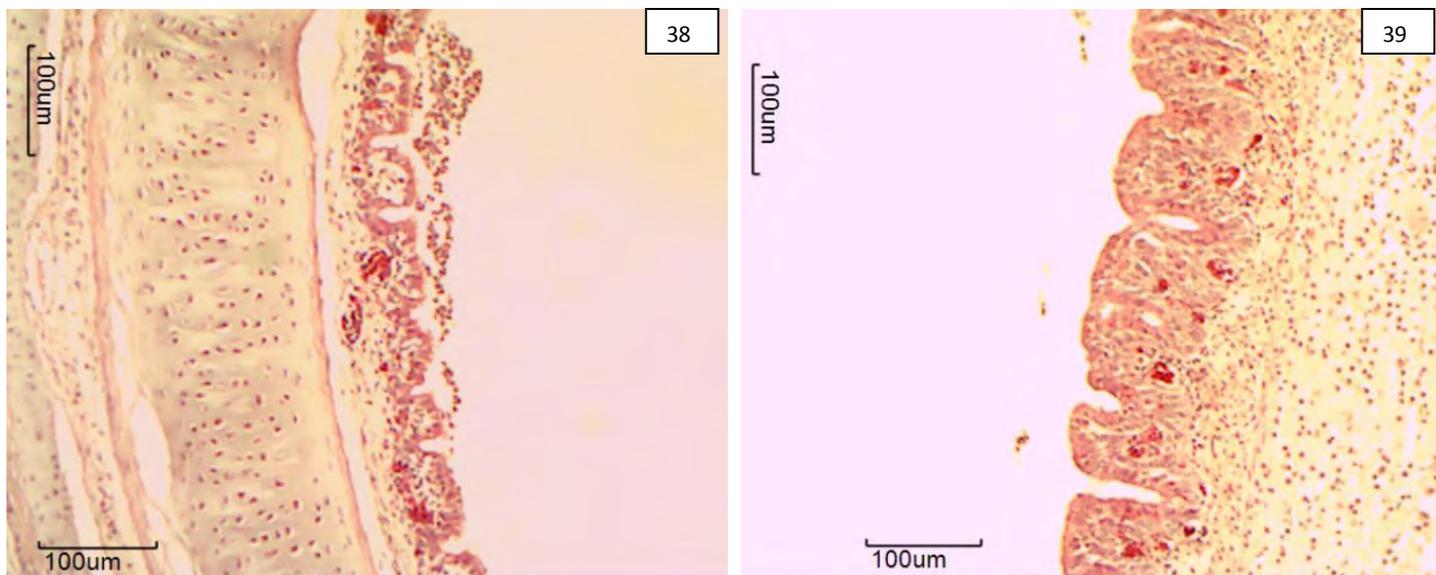


Fig 38. Cepa H – 18 aves ALPES. Tráquea con infiltrado linfocitario y heterofílico, con exudado inflamatorio en la luz del órgano al día 2 pi. Tinción HE Fig 39. Cepa H – 18 aves ALPES. Tráquea con infiltrado linfocitario y heterofílico al día 4 pi. Tinción HE

Las lesiones encontradas en aparato respiratorio inferior no son significativas en el desarrollo de la infección experimental, sin embargo en los pulmones se observó un ligero infiltrado linfocitario intersticial multifocal en 3/21 aves.

Órganos linfoides:

Timo: Las lesiones observadas son necrosis y apoptosis de linfocitos del primer al séptimo dpi en grado leve a moderado en 5/21 aves, la cual corresponde a la depleción linfoide medular y cortical del primer al séptimo dpi en 16/21 aves, el grado de severidad vario de ligero a moderado (Figura 40).

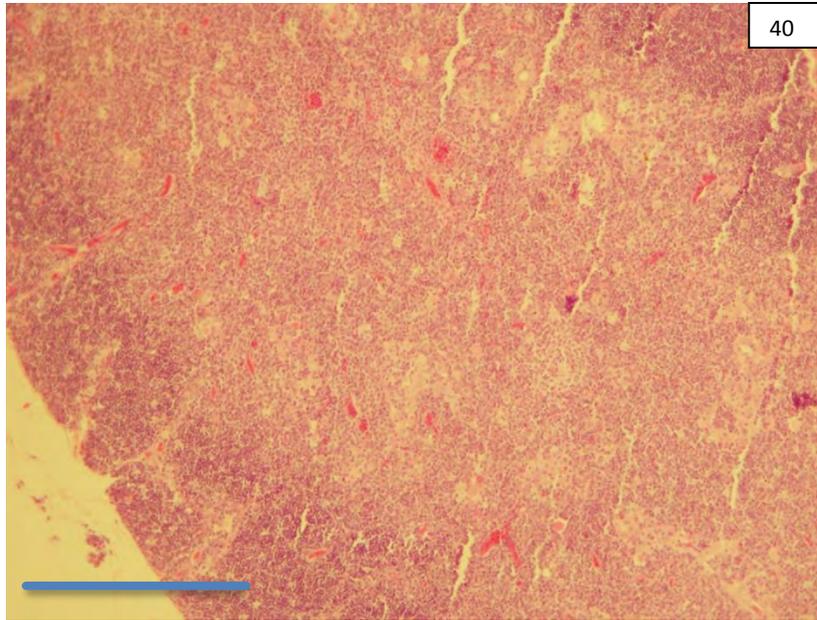


Fig 40. Cepa H - 18 aves ALPES. Timo con depleción linfocitaria moderada medular con necrosis y apoptosis al día 4 pi. Tinción HE. Barra de 1 mm.

Bolsa de Fabricio: Hay edema desde el primer hasta el séptimo dpi en 3/21 aves, en grado leve. Hubo necrosis y apoptosis de los linfocitos tanto en la zona medular en 15/21 aves, como en la zona cortical en 14/21 aves, del primer hasta el séptimo dpi con una grado de severidad de leve a moderado (Figura 41).

Se encontró de forma menos constante la presencia de quistes intraepiteliales en el tercer dpi en 1/21 aves en grado leve y focal.

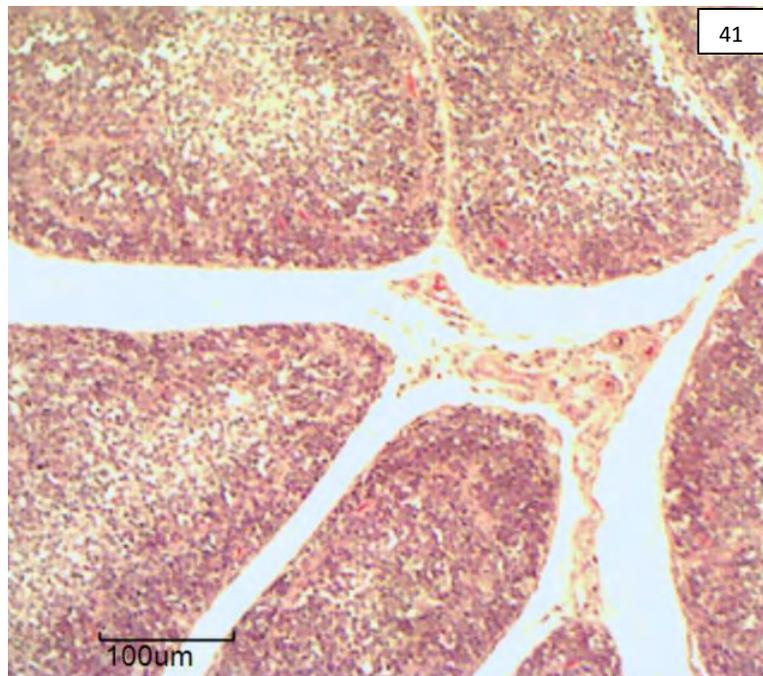


Fig 41. Cepa H - 18 aves ALPES. Bolsa de Fabricio con depleción linfocitaria moderada medular presencia de edema en el órgano al día 4 pi. Tinción HE.

Hígado: Se observó infiltrado linfocitario perivascular del segundo al sexto dpi en 16/21 aves, el grado de severidad fue de leve a moderado (Figuras 42 y 43).

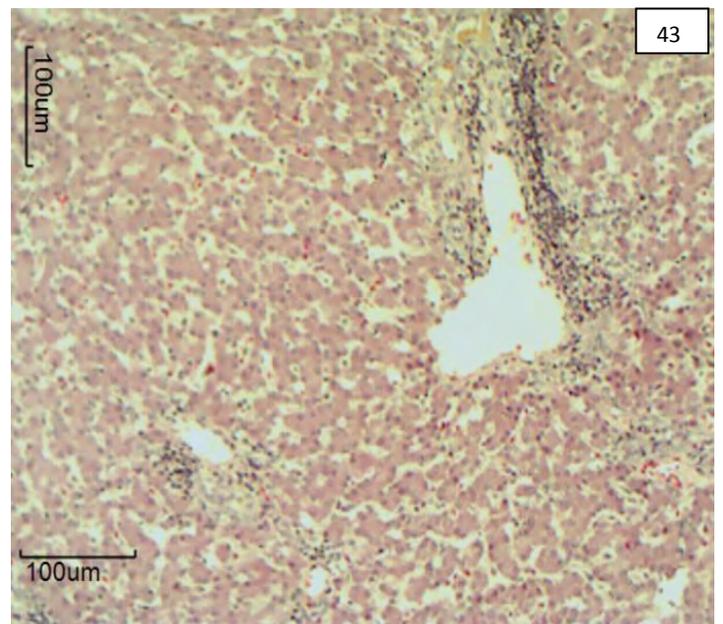
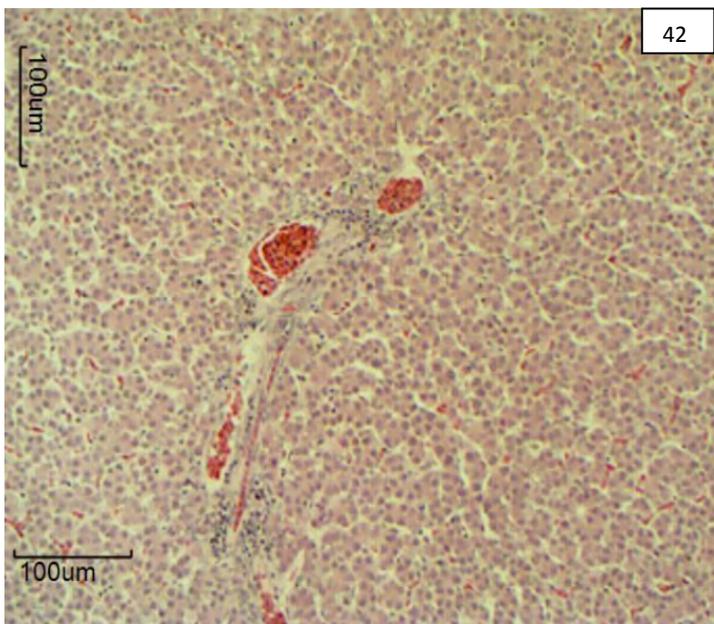


Fig 42. Cepa H – 18 aves ALPES. Hígado con Infiltrado linfocitario perivascular leve al día 3 pi. Tinción HE Fig 43. Cepa H – 18 aves ALPES. Hígado con infiltrado linfocitario perivascular moderado al 5 dpi. Tinción HE.

La revisión de las aves inoculadas con el aislamiento C – 129 mostró lesiones histológicas en los siguientes órganos:

Seno infraorbitario: Se observó edema en el cuarto dpi en grado leve en 11/21 aves, así como desprendimiento de epitelio al cuarto dpi en grado ligero en 10/21 aves.

Se demostró la presencia de infiltrado heterofílico y linfocitario en el órgano además de inflamatorio en la luz del órgano desde el primer día hasta el séptimo dpi, el grado de severidad vario de leve a moderado en 17/21 aves (Figuras 44 y 45).

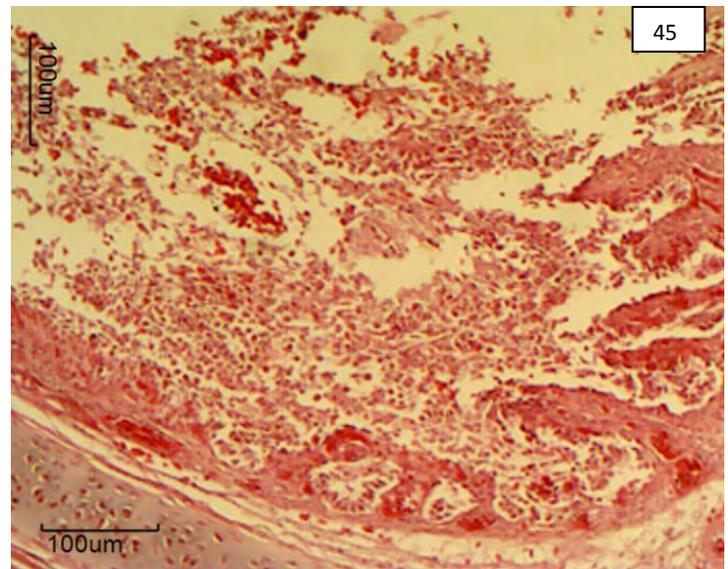
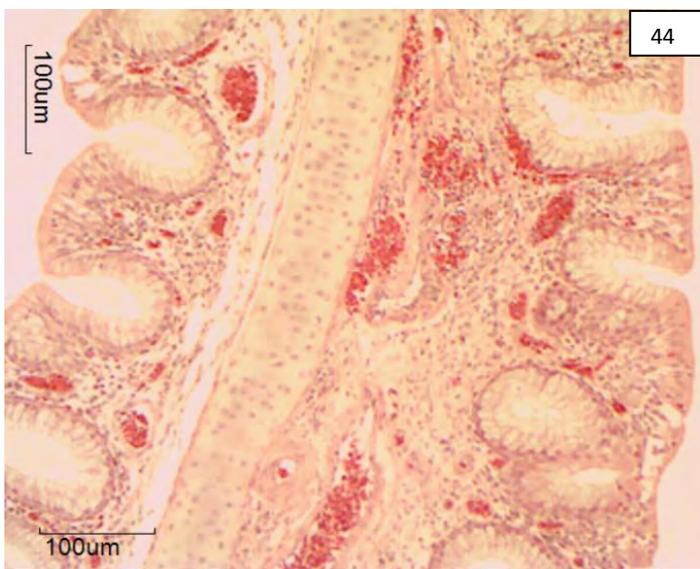


Fig 44. Aislamiento C – 129 aves ALPES. Seno infraorbitario con infiltrado linfocitario y heterofílico, con leve edema y hemorragias al 3 dpi. Tinción HE. Fig 45. Aislamiento C – 129 aves ALPES. Seno infraorbitario con congestión e infiltrado heterofílico y linfocitario, descamación del epitelio además de exudado inflamatorio mixto con hemorragias a la luz del órgano al 4dpi. Tinción HE

Tráquea: Se encontró edema desde el segundo hasta el cuarto dpi en 2/21 aves, el grado de severidad observado fue leve; además de infiltrado

heterofílico en el cuarto dpi en 7/21 aves, e infiltrado linfocitario desde el segundo hasta el séptimo dpi en 13/21 aves; el grado de severidad de ambos infiltrados fue entre leve a moderado (Figuras 46 y 47).

Se observó la pérdida de cilios en células epiteliales de la tráquea al cuarto día post - infección en 6/21 aves en grado leve, así como descamación del epitelio en 6/21 aves que fue de grado leve a moderado.

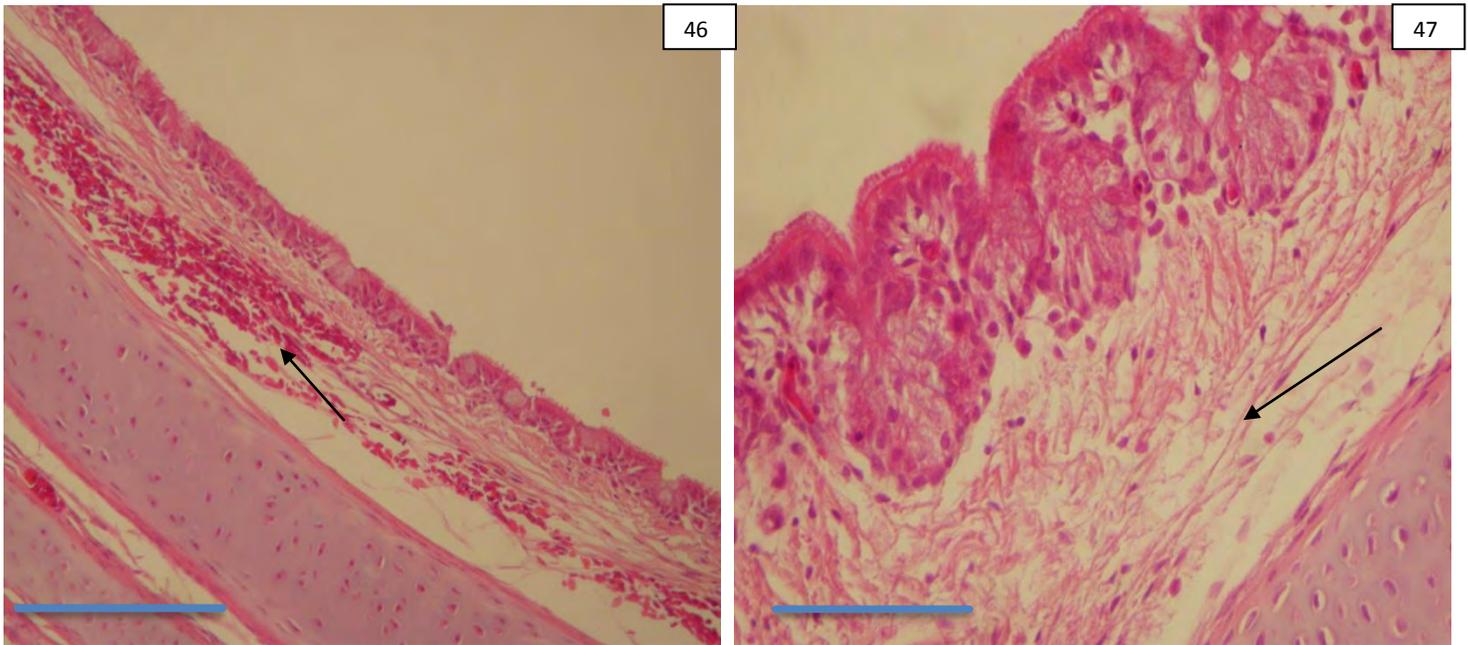


Fig 46. Aislamiento C - 129 aves ALPES. Tráquea con infiltrado linfocitario y heterofílico leve, y presencia de edema y hemorragia () al día 4 pi. Tinción HE. Barra de 1 mm. Fig 47. Aislamiento C - 129 aves ALPES. Tráquea con infiltrado linfocitario y heterofílico, y presencia de edema () al día 5 pi. Tinción HE. Barra de 0.2 mm

Las lesiones encontradas en aparato respiratorio inferior no son significativas en el desarrollo de la infección experimental; sin embargo en los pulmones se observó un ligero infiltrado linfocitario intersticial de forma focal y multifocal en 2/21 aves en grado leve.

Órganos linfoides

Timo: Las lesiones en timo fueron un ligero infiltrado heterofílico al cuarto dpi, en 14/21 aves, se observó necrosis y apoptosis de linfocitos del primer

al séptimo dpi en grado leve a moderado en 11/21 aves, la necrosis corresponde a la depleción linfoide medular del segundo al sexto dpi en 15/21 aves, el grado de severidad vario de leve a moderado (Figura 48 y 49).

La depleción linfoide en la corteza se observó del cuarto al sexto dpi en 13/21 aves, con un grado de severidad de leve a moderado.

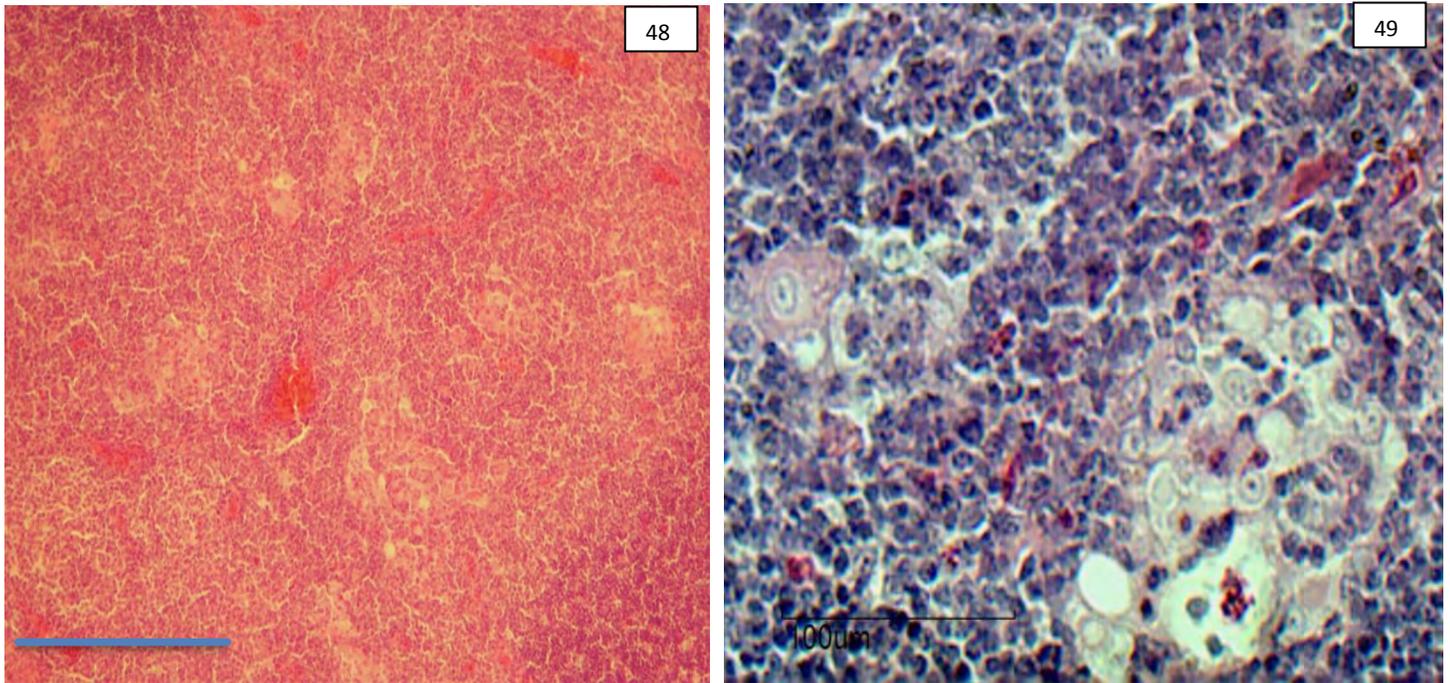


Fig 48. Aislamiento C – 129 aves ALPES. Timo con depleción linfocitaria medular moderada con necrosis y apoptosis al 4 dpi. Tinción HE. Barra de 1 mm. Fig 49. Aislamiento C – 129 aves ALPES. Timo con depleción linfocitaria medular moderada con necrosis y apoptosis al 4 dpi. Tinción HE.

Bolsa de Fabricio: Se encontró edema en la bolsa desde el cuarto hasta el quinto dpi en 6/21 aves, el grado de severidad fue leve. Se observó necrosis y apoptosis de los linfocitos tanto en la zona medular como en la zona cortical, del segundo hasta el sexto dpi en 15/21 aves con una grado de severidad de leve a moderado (Figura 50 y 51).

De forma menos constante se vio la presencia de quistes intraepiteliales entre el segundo y tercer dpi en 2/21 aves en grado ligero; y algunas presentaron atrofia folicular en el cuarto dpi en 2/21 aves en grado ligero.



Fig 50. Aislamiento C – 129 aves ALPES. Bolsa de Fabricio depleción linfocitaria medular, necrosis y apoptisis con ligero edema (→) al día 4 pi. Tinción HE. Barra de 1 mm. Fig 51. Aislamiento C – 129 aves ALPES. Bolsa de Fabricio depleción linfocitaria medular leve con ligero infiltrado intersticial y formación de epitelio adenoide (→) al 4 dpi. Tinción HE. Barra de 1 mm.

7. Discusión

Los signos observados tanto en los aislamientos de campo como la cepa de referencia varían en grado de severidad, en el presente trabajo la signología observada en los aislamientos y la cepa estudiadas concuerda con lo reportado por la literatura ya que también se reporta una variación en el grado de severidad. (Blackall y Soriano, 2008, García, 2004, Ibrahim, 2004, Kaur, 2005, Soriano, 2004 y Zhang, 2003).

Es importante destacar que los signos observados en la cepa H – 18 y en el aislamiento C – 135 tuvieron una presentación más severa, mientras que el aislamiento C – 129 mostró un grado de severidad leve.

En nuestro estudio los signos aparecen a las 24 horas con el aislamiento C - 135, mientras que la cepa C1 y el aislamiento C - 129 los signos se presentaron a partir de las 48 horas, es de destacarse que los signos

alcanzan su mayor severidad entre el día 4 y 5 post - infección, por otro lado fueron las aves del aislamiento C - 135 quienes mostraron los signos más severos, seguidos por la cepa H - 18 la cual corresponde a la cepa de referencia y en tanto que el aislamiento C - 129 los signos fueron leves; por otro lado, las aves experimentales de los tres grupos mostraron una recuperación a la infección al día 7; todo esto concuerda con el trabajo realizado por Ibrahim en el 2004, el cual menciona que los signos de coriza aparecen de las 24 a 72 horas post - infección con una recuperación entre el día 7 y 10, mientras que Blackall en el 2008 indica que las aves expuestas a coriza infecciosa muestran signos entre las 24 - 48 post - infección y en ausencia de infecciones combinadas, el curso de la enfermedad es de entre 2 y 3 semanas.

Con respecto a los aislamientos bacteriológicos, Ibrahim en el 2004 menciona que *Avibacterium paragallinarum* puede migrar a otros órganos solo con la interacción con otros agentes infecciosos o cuando hay inmunosupresión de las aves. Los aislamientos documentados en la literatura corresponden en su totalidad al tracto respiratorio siendo los más comunes, seno infraorbitario y tráquea.

Como lo menciona la literatura, en el presente estudio se obtuvieron los aislamientos bacteriológicos de seno infraorbitario y de tráquea en la mayoría de las aves experimentales, pero también se obtuvieron aislamientos de otros órganos tales como: pulmón, sacos aéreos, timos, bazo, médula ósea, articulaciones y riñones; sin la combinación de algún agente inmunosupresor.

Cabe mencionar que los aislamientos bacterianos obtenidos en las diferentes cepas no concuerdan en su totalidad en lo mencionado con Blackall en el 2008, Kaur en el 2005 los cuales han obtenido muestras de tracto respiratorio superior y pulmón, por otra parte Ibrahim en el 2004 realizó pruebas de aislamiento en órganos tales como, ovario, oviducto, bazo, intestino sin encontrar resultados positivos, mientras que nuestro estudio muestra que la bacteria es capaz de migra a otros órganos además de los respiratorios.

La descripción de los hallazgos clínicos, patológicos y los aislamientos de campo nos da un panorama más amplio con respecto a patogenia así como a la severidad con la que cursa la infección, destacando la infección en especial del aislamiento C - 135, la cual cursa con una bacteremia mucho más evidente migrando a diferentes órganos en las aves.

Las lesiones macroscópicas observadas concuerdan con los trabajos de: Ibrahim, 2004, Blackall y Soriano, 2008, en donde describen lesiones macroscópicas similares a los encontrados en este estudio, sin embargo

las lesiones más severas fueron en el aislamiento C – 135 y la cepa C – 1, mientras que el aislamiento C – 129 mostró lesiones de leves a moderadas.

Los cambios patológicos descritos en la literatura mencionan que se pueden observar desde las 20 hpi y alcanzan su máximo grado entre los 7 y 10 días post - infección, con subsiguiente involución de las lesiones entre los 14 y 21 días post - infección (Ibrahim, 2004; Blackall y Soriano, 2008). Sin embargo de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se encontró que las lesiones se detectaron desde las 24 hpi con el aislamiento C - 135, mientras que en la cepa C – 1 y el aislamiento C – 129 fueron a las 48 horas post - infección y las lesiones más severas de coriza infecciosa se observaron entre los días 3 y 5 días post - infección y la involución de las lesiones fue al día 7 post - infección.

El aislamiento C – 135 causó neumonía intersticial y una aerosaculitis linfocitaria en grado de leve a moderado, mientras que Blackall y Soriano, 2008 y Kaur, 2005, mencionan que la presencia de lesiones microscópicas en pulmones y sacos aéreos, se debe principalmente a la combinación de *Avibacterium paragallinarum* con otros agentes patógenos observando bronconeumonía catarral aguda, con heterófilos y restos celulares que llenaban el lumen de bronquios secundarios y terciarios; células epiteliales de capilares respiratorios hinchadas con hiperplasia y en los sacos aéreos con una inflamación heterofílica e hiperplasia de las células epiteliales.

En nuestro estudio además se observaron lesiones en hígado en el aislamiento C – 135 y en la cepa H – 18, los cuales consisten en infiltrado linfocitario de leve a moderado a partir de las 48 horas hasta los 7 días post - infección, destacando que estas lesiones no han sido documentadas anteriormente en la literatura.

Asimismo en órganos linfoides como el timo y la bolsa de Fabricio se observó una depleción linfoide de grado leve, además de bursitis subaguda a partir de las 24 horas hasta los 7 días PI, en las tres cepas utilizadas, lo que nos indica que las cepas estudiadas son capaces de infectar órganos linfoides ocasionando posiblemente inmunodepresión en las aves.

8. Conclusiones

El aislamiento C 135 es mucho más agresivo que la cepa H - 18, ya que es capaz de ocasionar signos y lesiones más graves.

Las cepas utilizadas en este trabajo causan lesiones en órganos linfoides y posiblemente sean inmunodepresoras.

La bacteria es capaz de infectar y producir lesiones en órganos diferentes a los respiratorios.

9. Referencias

- Blackall P. J. 1999. Infectious Coryza: Overview of the Disease and New Diagnostic Options. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 12 (4): 627 – 632.
- Blackall P. J. 2007. Bacterial respiratory diseases – the challenges of the future. Proceedings of the 15th World Veterinary Poultry Conference. Beijing, China.
- Blackall P. J. 2005. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55 (1): 353 – 362.
- Blackall J. P. y Soriano V. E. 2008. Infectious Coryza and Related Bacterial Infections. In: Saif Y. M. Barnes H. J. Diseases of poultry. 12th Edición. Iowa State Press, Capítulo 20, 789 – 799.
- Bragg R. R. 2005. Effects on differences in virulence of different serovars of *Haemophilus paragallinarum* on perceived vaccine efficacy. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 72: 1-6
- Byarugaba, D. K. U. M. Minga, P. S. Gwakisa, E. Katunguka-Rwakishaya, M. Bisgaard and J. E. Olsen. 2007. Virulence characterization of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Uganda. *Avian Pathology* 36(1): 35 – 42
- Chadfield M. S. Bojesen A. M. Christensen J. P. Juul-Hansen J. Saxmose S. Nielsen and Bisgaard M. 2005. Reproduction of sepsis and endocarditis by experimental infection of chickens with *Streptococcus gallinaceus* and *Enterococcus hirae*. *Avian Pathology* 34:238-247.
- García J. L. Márquez A. M. Fernández P. 2002. Prevalencia e identificación de serogrupos y serovariedades 1 de *Haemophilus paragallinarum* en gallinas comerciales de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México. Patología y Sanidad. Ponencias Cortas. Memorias del X Congreso Nacional de Patología Veterinaria.
- García A. J, Angulo E, Blackall P. J, Ortiz A. M. 2004 The presence of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Haemophilus paragallinarum* in México *Avian Diseases*. Apr-Jun, 48 (2):425-9.
- Hsu Y. 2007. Immunogenicity and haemagglutination of recombinant *Avibacterium paragallinarum* HagA. *Veterinary Microbiology* 122: 280 – 289.
- Ibrahim R. S. 2004. Complicated infectious coryza in broiler and layer chickens in upper Egypt. *Assiut Veterinary Medical Journal* 50 (113): 94 – 106.

- Kaur J. 2005. Pathological studies on naturally occurring infectious coryzae in chickens. *Indian Journal of Animal Sciences* 75 (2): 209 – 211.
- Kume K. *et al.* 1983. Serologic and immunologic studies on three types of hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* serotype 1 organism. *Nippon Juigaku Zasshi*, 45: 783 – 792.
- Matsumoto, M. and R. Yamamoto. 1975. Protective quality of an aluminum hydroxide-absorbed broth bacterin against infectious coryza. *American Journal of Veterinary Research* 36:579—582.
- Page, L. A. 1962. *Haemophilus* infectious in chickens. 1. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *American Journal of Veterinary Research* 23:85-95
- Sandoval V. E. Terzolo H. R. Blackall. P. J. 1994. Complicated infectious coryza outbreaks in Argentina. *Avian Diseases*. 38 (3): 672 – 678.
- Soriano V. E. 2000. Serotipificación de aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* bajo un esquema de Page. Tesis para obtener el grado en Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Soriano V. E, Longinos MG, Fernández RP, Velásquez QE, Ciprián CA, Salazar – García F y Blackall PJ. 2004a. Virulence of the nine serovar reference strain of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Diseases* 48:886 – 889.
- Soriano V. E, Longinos MG, Téllez G, Fernández RP, Suárez-Güemes F, Blackall PJ. 2004b. Cross-protection study of the nine serovars of *Haemophilus paragallinarum* in the Kume haemagglutinin scheme. *Avian Pathology* 33:506-511.
- Soriano VE, Blackall P. J, Dabo S. M, Téllez G. I, García-Delgado G. A, Fernández R. P. 2001. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. *Avian Diseases* 45:680-683.
- Soriano V. E, Terzolo H. R. 2004c. *Haemophilus paragallinarum*: etiología de la coriza infecciosa. *Veterinaria México* 35:245-259.
- Soriano V. E, Terzolo H. R. 2004d. Epizootiología, prevención y control de la coriza infecciosa. *Veterinaria México* 35:261-279.
- Zhang P. J. Blackall P. J. 2003. Infectious Coryza due to *Haemophilus paragallinarum* serovar B in China. *Australian Veterinary Journal*. 81:96 -97.