

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Detección de *Chlamydophila psittaci* y el virus de la Enfermedad del Pico y Pluma (vEPP) por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en psitácidos mantenidos en cautiverio en la zona de influencia de la FES- Cuautitlán”

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:
KARINA LÓPEZ YELMI**

Asesor: Dr. Guillermo Valdivia Anda

Coasesor: M.V.Z. Rodolfo Córdoba Ponce

Cuautitlán Izcalli, México. Noviembre, 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue financiado por los proyectos:

**-Programa de Apoyo a Proyectos para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME)
PE200707.**

Procedimiento Educativo de Integración de la Medicina en Pequeñas Especies y Fauna Silvestre.

**-Programa de Apoyo a Proyectos de la Investigación e Innovación Tecnológica
(PAPIIT) UNAM No. IN216005**

Efectos sobre el sistema inmune de cepas de *E. coli* Enterohemorrágica.

Cátedra de Investigación FESC No. IN.2.14

Mecanismos de Patogenicidad Microbianos

El trabajo fue realizado en las instalaciones y equipo de:

Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal, de la FESC Campo 4.

Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET®).

ÍNDICE

	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	1
III. Antecedentes	5
IV. Hipótesis	7
V. Objetivos:	
V.1. General.....	8
V.2. Particulares.....	8
VI. Justificación	8
VII. Material y método	
VII.1. Ubicación de los ejemplares.....	8
VII.2. Identificación de especie.....	8
VII.3. Historia clínica.....	8
VII.4. Toma de muestra.....	16
VII.5. <u>Pruebas de laboratorio</u>	
VII.5.1. Hematocrito.....	16
VII.5.2. Determinación de Proteínas totales.....	16
VII.6. <u>Técnica de la PCR</u>	
VII.6.1. Extracción del ADN.....	17
VII.6.2. Análisis por medio de la PCR.....	18
VII.6.3. Análisis por la electroforesis.....	20
VIII. Resultados	

VIII.1.	Distribución geográfica.....	21
VIII.2.	Especies de psitácidos.....	22
VIII.3.	Historia clínica dirigida.....	23
VIII.4.	Pruebas de laboratorio.....	31
VIII.5.	Técnica de la PCR.....	35
VIII.6.	PCR para la detección de <i>Chlamydophila psittaci</i>	36
VIII.7.	PCR para la detección del virus de la Enfermedad del Pico y Pluma.....	37
IX.	Discusión.....	36
IX.1	Distribución geográfica y especies encontradas.....	39
IX.2	Datos de la Historia clínica.....	40
IX.3	Hematocrito/ Proteínas totales.....	47
IX.4	PCR.....	48
X.	Conclusiones	54
XI.	Recomendaciones.....	55
XII.	Bibliografía.....	53

I. Resumen

Se examinaron 51 psitácidos pertenecientes a 6 diferentes géneros encontrados como mascotas con particulares, en diferentes localidades de la zona norte del área metropolitana del D.F. por la presencia de *Chlamydophila psittaci* y Circovirus de la Enfermedad del pico y pluma de los psitácidos. Por su relevancia dentro de la salud pública, en el caso de *Chlamydophila psittaci* y por la severidad de la enfermedad en el caso de Circovirus, ya que ésta no tiene tratamiento y por lo tanto no es curable. Se evaluó su estado de salud general con la ayuda de un examen físico y ciertas pruebas de laboratorio procesadas en la FES-Cuautitlán y en el laboratorio DIVET®. Usando la técnica de la PCR se buscaron los dos agentes etiológicos en las muestras de sangre tomadas a dichas aves. No se obtuvieron animales positivos a ninguno de los dos agentes. La principal anomalía encontrada fue la desnutrición y el deterioro físico posiblemente provocado por las formulaciones desbalanceadas de las dietas y los malos diseños de las instalaciones, reflejando un grado alarmante de ignorancia en el cuidado y nutrición de estas especies de aves por parte de los propietarios.

Palabras clave: *Chlamydophila psittaci*, Circovirus, psitácidos, PCR.

II. Introducción

Se sabe que hay una fuerte demanda, tanto nacional como internacional, de aves silvestres como mascotas, dentro de las más populares están las aves pertenecientes a la familia Psittacidae debido a su colorido plumaje y a su capacidad para imitar el lenguaje humano (Cantú *et al.*, 2007).

La familia Psittacidae proviene del orden Psittaciformes, orden al cual también pertenecen las cacatúas y las ninfas, formando otra familia, Cacatuidae. Existen alrededor de 356 especies de Psittaciformes, de las cuales el 34.6% se encuentran en las categorías de amenazados y en peligro de extinción (Forshaw, 2006). Las psitácidas comparten características morfológicas como poseer un pico largo, curvo y fuerte; un cuello relativamente corto; también cuentan con una lengua prensil que les permite manipular sus alimentos; se clasifican como zigodáctilos, lo cual significa que tienen dos dedos de la pata

dirigidos hacia el frente y dos hacia atrás; además de un plumaje intenso y colorido; la mayor parte de las especies no presentan dimorfismo sexual (Forshaw, 2006). Existen de muy diversos tamaños que van desde los 8cm hasta los 100cm de longitud según la especie. Su alimentación está basada principalmente de frutos, semillas, nueces, néctares; ocasionalmente pueden consumir gusanos y larvas de insectos. Viven en parvadas de hasta miles de especímenes; son monógamos y el cuidado de los polluelos está a cargo de ambos padres (Ritchie *et al.*, 1999; Forshaw, 2006).

Ya que es frecuente que se mantenga una estrecha relación entre el ave y el propietario, es de gran importancia el conocimiento del estado de salud en el que se encuentran dichas aves. Entre las enfermedades de mayor importancia, en el caso de los psitácidos se encuentran la psitacosis (*C. psittaci*) y la enfermedad del pico y pluma de los psitácidos, (Pbfd; por sus siglas en inglés) (Ritchie *et al.*, 1999; Harcourt-Brown *et al.*, 2005; Levine, 2003).

La psitacosis es una enfermedad de distribución mundial, causada por *Chlamydophila psittaci*, la cual es una bacteria Gram negativa intracelular obligada, que mide aprox. 0.2-1.5µm, dependiendo de la fase en la que se encuentre; pertenece a la familia Chlamydiaceae. No presenta pared celular y se tiñe mal con colorantes convencionales, no se puede cultivar en medios artificiales, sino que requiere de líneas celulares. Posee un ciclo de replicación único el cuál pasa por dos fases: la de cuerpo elemental (extracelular, infectante, metabólicamente inactivo) y la de cuerpo reticulado (fase no infectante y metabólicamente activa). Los cuerpos reticulados forman microcolonias llamadas “inclusiones” o cuerpos de inclusión (Songer *et al.*, 2005; Hirsh *et al.*, 2004; Fudge, 2000; Ritchie *et al.*, 1999). Existen 8 serovariedades de *C. psittaci* (A-F, M56, WC), siendo las aisladas de aves de la A a la F y en cuanto a la M56 y WC de brotes de mamíferos. *C. psittaci*, al igual que otras chlamydias, posee fagos, los cuales son microvirus icosaédricos que se replican en los cuerpos reticulados, en el caso de *C. psittaci* es el fago Chp1 (Everett, 2000; Fauquet *et al.*, 2005; Bavoil *et al.*, 2006). *Chlamydophila psittaci* puede afectar a un gran número de especies de aves (principalmente los psitácidos), inclusive se ha aislado de pingüinos en Perú (Smith *et al.*, 2007), mamíferos (ovinos, caprinos, suinos, gato doméstico, ganado vacuno, koalas, liebres) y el humano (grupos de alto riesgo como veterinarios, laboratoristas, propietarios de aves, manejadores de aves en tiendas de

mascota, zoológicos y granjas de producción) (Ritchie *et al.*, 1999; Everett, 2000; Songer *et al.*, 2005); por lo que es una enfermedad zoonótica. La transmisión puede ocurrir por contacto directo a través de la inhalación o ingestión de material contaminado, ya que se encuentra en el tracto respiratorio, digestivo, genital y conjuntiva ocular, debido a que sus células diana son principalmente las epiteliales columnares y los macrófagos mononucleares (Hirsh *et al.*, 2004; Ritchie *et al.*, 1999). El periodo de incubación (PI) de la enfermedad es muy variable debido a la variabilidad de la virulencia de la cepa, se ha mencionado que el PI mínimo en psitácidas es de 42 días (Ritchie *et al.*, 1999). Presenta una morbilidad de 5-20% en cepas de baja virulencia, pudiéndose incrementar hasta en un 80% en cepas de alta virulencia y parvadas confinadas a espacios cerrados y mal ventilados. Su mortalidad también varía de acuerdo a la virulencia de las cepas, siendo de un 10-30% en cepas de alta virulencia y un 1-4% en las de baja virulencia (Songer *et al.*, 2005). La signología que presenta el humano es similar al de un cuadro de gripe, progresando a una neumonía atípica y de no administrarse una antibioterapia se puede ver afectado el sistema cardiovascular e incluso llegar a la muerte (Gaede *et al.*, 2008; NASPVH, 2008). En cuanto a las aves, existen tres presentaciones de la enfermedad: la aguda, subaguda y crónica. La primera se presenta en aves jóvenes las cuales desarrollan una infección sistémica, su muerte ocurre entre los 8 a 14 días postinfección. La subaguda es la más común en las aves, los signos principales que presentan son disnea, descarga nasal, conjuntivitis húmeda, sinusitis y rinitis, estornudos, letargia, anorexia y pueden presentarse uratos verdes en heces o heces acuosas verde amarillentas. La presentación crónica se da porque la bacteria se encuentra alojada en los tejidos sin presentación de signos clínicos y en algún momento de estrés se puede presentar la enfermedad clínicamente, además de que el ave se encuentra eliminando la bacteria intermitentemente (Ritchie *et al.*, 1999; NASPVH, 2008).

Por su parte, existen diferentes etiologías para la presencia de anomalías en las plumas, por lo que se deben de descartar tres posibilidades generales al arrancar una pluma anormal; que ésta no vuelva a crecer (anormalidad sistémica, folicular), que crezca pero anormal (problema folicular) y que se desarrolle normalmente (daño físico después del crecimiento) (Ritchie *et al.*, 1999). Una de las etiologías para la afección de las plumas es el virus de la Enfermedad del Pico y Pluma (vEPP), es un virus perteneciente a la familia

Circoviridae; es muy similar al parvovirus, es pequeño (12-20.7nm), no envuelto e icosaédrico, de cadena sencilla de ADN. Presenta 2 *ORFs* mayores del gen *rep* y el gen *cap*. (Fauquet *et al.*, 2005; Hirsh *et al.*, 2004; Ritchie *et al.*, 1999). Provoca cuerpos de inclusión intranucleares e intracitoplasmáticos principalmente en células del folículo y la pulpa de la pluma (Fudge, 2000). Causa una enfermedad crónica o aguda en los psittaciformes, dependiendo de la edad del ave, su especie, los anticuerpos maternos, la ruta de infección y el título del virus (Hirsh *et al.*, 2004). El vEPP provoca la deformación del pico, degenera la epidermis y el estrato corneo, provocando su elongación con fisuras longitudinales y finalmente fracturarse; también, pero más raro, produce la deformación de las uñas; genera una distrofia simétrica de las plumas, decoloración, pérdida y retención de éstas. La enfermedad del pico y plumas de los psitácidos, es de gran importancia para éstos, debido a que no existe tratamiento para aquellas aves afectadas, resultando en su muerte o eutanasia 6-12 meses postinfección (PI), aunque cabe señalar que algunas cuantas viven bien por años (Rupley, 2005). En los pericos australianos (*Melopsittacus undulatus*) puede generar lesiones similares al Polyomavirus (APV) (Ritchie *et al.*, 1999). Además de que se pueden presentar infecciones secundarias debido a la inmunodepresión. A pesar de que es una enfermedad endémica de Australia (principalmente de las cacatúas en vida libre), el virus se ha podido diseminar por el movimiento de psitácidos australianos infectados al resto del mundo, ya que se han reportado casos en E.U.A., Europa (Inglaterra, Alemania, Portugal, Austria), Sudáfrica y Oceanía (Australia y Nueva Zelanda) (Khalesi, 2007); dentro de las especies más afectadas se encuentran los periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), periquito arco iris (*Trichoglossus haematodus*), las roselas (*Platycercus sp.*) y las cacatúas (*Cacatua sp.*) (Hirsh *et al.*, 2004; Ritchie *et al.*, 1999).

III. Antecedentes

La literatura consultada reporta que la PCR es una de las mejores técnicas para el diagnóstico oportuno, de *C. psittaci*, del vEPP y de otras enfermedades. En el caso del vEPP, se puede detectar a los portadores o confirmar la presencia del virus junto con la aparición de la signología clínica (Fudge, 2000; Tully *et al.*, 2000). Además se han realizado estudios en los que se ha comparado la sensibilidad y la especificidad de

diferentes pruebas utilizadas en la detección del vEPP, y se ha encontrado que la PCR es más útil en los casos crónicos (Khalesi *et al.*, 2005). También se han hecho estudios de PCR para la detección de *C. psittaci*, tanto en aves en cautiverio como en aves en vida libre (De Freitas *et al.*, 2006). Y otros estudios han utilizado la PCR para la detección de *C. psittaci* en otras especies como las palomas que se encuentran en vida libre y llegan a ser plaga en distintas ciudades como Ámsterdam (Heddema *et al.*, 2006). Además la PCR ha sido una técnica de elección en algunos casos de brotes de *Chlamydophila psittaci* como en E.U.A., Australia y Alemania (Gaede *et al.*, 2007; Messmer *et al.*, 1997; Messmer *et al.*, 2000).

En el caso de la detección de *C. psittaci* por PCR se han utilizado sistemas de iniciadores de los genes *ompA* (Heddema *et al.*, 2006; De Freitas *et al.*, 2006;) o de los genes del ARN ribosomal (16S-23S) (Everett, 1999). Sin embargo un nuevo grupo de iniciadores se han estudiado y demostrado que son una herramienta efectiva para la detección de la clamidiosis aviar a través de la PCR; estos iniciadores están dirigidos a la familia de genes *pmp* de *C. abortus* (Laroucau *et al.*, 2001, 2007). Se menciona en la literatura que esta familia de genes probablemente forme la base en el mecanismo de variación antigénica diseñada para la evasión inmune o para la adaptación a distintos ambientes, esto, lo respalda evidencia genotípica pero está poco documentada la evidencia fenotípica (Bavoil *et al.*, 2006).

Por lo que se refiere al vEPP, Ypelaar *et al.* (1999), probaron siete iniciadores diferentes para la detección de este virus encontrando que sólo la combinación de aquellos dos que se encontraban dentro del ORF1 dieron amplificadas consistentes, los cuales fueron el número 2 y el 4 (Figura 2.1).

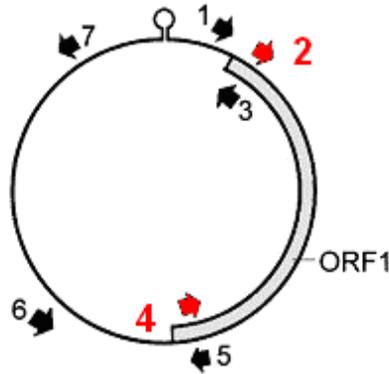


Figura 2.1 Posición y dirección de los iniciadores usados por Ypelaar *et al.* (1999).

Acerca de las muestras; hay trabajos en los que se comprueba que para el PCR, de aquellos individuos que resultaron positivos de una muestra de sangre sólo el 4.7% resultó positivo también para su muestra de pluma y ninguno de los que resultó positivo con la muestra de pluma dio negativo con su muestra de sangre (Khalesi *et al.*, 2005).

En México, ha habido reportes de un brote de clamidiosis en aves en 1930; se ha confirmado su presencia en éstas y en pequeños rumiantes (ovinos y caprinos), pero el estudio en aves silvestres en cautiverio como los psitácidos es muy escaso; en cuanto a estudios recientes, solamente se encuentra Rojas (1996) que trabajó en el aislamiento de *C. psittaci* de aves de ornato a través de cultivo celular y la técnica de inmunofluorescencia directa y Morales en el 2006 realizó un estudio a fondo para determinar la presencia de *C. psittaci* en aves silvestres en cautiverio y su relación con la zoonosis que causa.

IV. Hipótesis

Con el uso de la técnica de PCR se podrán detectar a aquellos ejemplares que presenten a los agentes *Chlamydophila psittaci* y/o vEPP, esperando encontrar ejemplares positivos principalmente a *C. psittaci*.

V. Objetivos

V.1. Objetivo general

Detectar la presencia de *Chlamydophila psittaci* y el virus de la Enfermedad del Pico y Pluma (vEPP) en muestras de sangre de psitácidos mantenidos en cautiverio en la zona de influencia de la FES- Cuautitlán.

V.2. Objetivos particulares

- Evaluar el estado de salud aparente de los individuos de estudio a través de la exploración general.
- Evaluar el microambiente de los sujetos de estudio a través de una Historia Clínica dirigida.
- Completar la valoración del estado de salud de los individuos a través de la obtención en el laboratorio del hematocrito y la determinación de proteínas totales (PT).
- Detectar la presencia, en psitácidos, del ADN de *Chlamydophila psittaci* y el virus de la Enfermedad del Pico y Pluma (vEPP) a través de la prueba de PCR.

VI. Justificación

Debido a que en México prevalece el hecho de tener diferentes especies de aves como mascotas es de gran importancia determinar el estado de salud de estas aves, incluyendo las especies exóticas que llegan al país. Sobre todo de enfermedades zoonóticas, ya que la mayoría de éstas aves guardan una estrecha relación con sus propietarios.

VII. Material y Método

VII.1. Ubicación de los ejemplares.

Los sujetos que se eligieron para el estudio fueron de la familia Psittacidae, en estado cautivo y procedentes de particulares radicados en la zona de influencia de la FES Cuautitlán (Tepetzotlán, Cuautitlán Izcalli, Cuautitlán de Romero Rubio, Tultitlán y Coacalco). Se tuvo conocimiento de la localización de los psitácidos gracias a la información proporcionada por médicos veterinarios, así como de los mismos residentes de la zona.

VII.2. Identificación de especie.

La especie de los psitácidos fue determinada mediante un análisis morfométrico, esto es un análisis de las características exteriores de cada especie como tamaño, distribución de la coloración en el plumaje, coloración del iris, coloración del anillo perioftálmico, presencia o no de plumas en el anillo perioftálmico, coloración de las patas y el pico entre otras (Forshaw, 2006).

VII.3. Historia Clínica

Se encontraron y utilizaron un total de 51 psitácidos de los siguientes géneros y especies:



14 *Amazona autumnalis*



7 *Amazona albifrons*



4 *Amazona oratrix*



2 *Amazona auropalliata*



2 *Amazona finschi*



1 *Amazona farinosa*



7 *Aratinga mitrata*



6 *Aratinga canicularis*



1 Aratinga nana



1 Ara chloroptera



2 Myopsitta monachus



1 Pionus maximiliani



3 Psittacus erithacus

Se obtuvo la historia clínica (Figura 6.2) de cada uno incluyendo una reseña: género, especie, edad, peso, señas particulares, identificación, fecha y lugar. Así como una anamnesis: procedencia, manejo nutricional, instalaciones y accesorios, comportamiento y manejo veterinario.

Figura 6.2 Ejemplo de hoja para levantamiento de H.C. que fue utilizado.

Historia Clínica	
<i>Reseña</i>	
Fecha _____	No. Caso _____
Propietario _____	
Dirección _____	
Nombre ave _____	
Género _____	
Especie _____	
Peso _____	
Edad aproximada _____	
Señas particulares _____	
Instalaciones	
1.A. Descripción de la jaula (forma): _____	
2.A. Medidas: _____	
3.A. Accesorios _____	
4.A. Zona de la casa en la que se encuentra: _____	
Forma y lugar de adquisición: _____	
Costo _____	
Miembros de la familia _____	
Sale de la jaula (frecuencia) _____	
Recibe sol? Horas _____ Días a la semana _____	
Tapan la jaula para dormir (hora aprox.) _____	
Lo bañan? (frecuencia) _____	
Lo secan? _____ Manera? _____	
Se trepa a la mano con facilidad? _____	
Quién tiene mayor afinidad por el ave? _____	
<i>Exploración general</i>	
1. Actitud _____	
2. Comportamiento _____	
3. Aspecto clínico _____	
<i>Anamnesis general</i>	
A. Alimentación	
1.A Ingredientes: _____	
2.A Presentación de los alimentos: _____	

- 3.A Frecuencia: _____.
- 4.A Preferencias: _____.
- 5.A Cantidad de agua: _____.

B. Atención Veterinaria

- 1.B Ha visitado al veterinario (frecuencia) _____.
- 2.B Por enfermedad o de rutina? _____.

B. *Chlamydophila psittaci*

- 1.C Fumadores en la casa (cuántos) _____.
- 2.C Asmáticos en la casa (cuántos) _____.

D. vEPP

- 1.D .Presenta estereotipias? _____.
- 2.D .Cuál?: Automutilación _____ Masticar plumas _____
Arrancar plumas _____ Otra _____.
- 3.D .Partes del cuerpo afectadas _____.
- 4.D .Primera vez que apareció (tiempo) _____.
- 5.D .Situaciones donde ocurre:
- Cuando no hay nadie en la casa _____.
- Cuando no se le pone atención _____.
- Cuando se le pone atención _____.
- 6.D .Se puede interrumpir este comportamiento? _____.
- 7.D .Cómo?: Con atención _____ Con comida _____ Reprimiéndolos
_____.

E. Otros

- 6.E Habla? Poco _____ Moderado _____ Mucho _____

VII.3.1. Peso/ Condición corporal.

El peso fue obtenido por medio de la utilización de una báscula digital, colocando, ya sea al sujeto directamente en la báscula o con la utilización de una caja de cartón pesando al ave dentro de ésta y realizando la siguiente sustracción:

$$\text{Peso ave} + \text{caja} - \text{peso de la caja} = \text{peso del ave};$$

lo anterior dependió de la docilidad del ave (Samour, 2000).

La condición corporal se determinó en base a lo propuesto por Ritchie, Harrison & Harrison (1999) en donde se clasifica de manera subjetiva en una escala del uno al cinco, dándole el valor de uno a los ejemplares que presenten un menor tamaño de los músculos pectorales y por lo tanto resalte más el esternón y de cuatro a cinco a aquellos que presenten mayor cantidad de tejido adiposo desapareciendo la depresión que se encuentra a un lado del esternón (Figura 6.3).

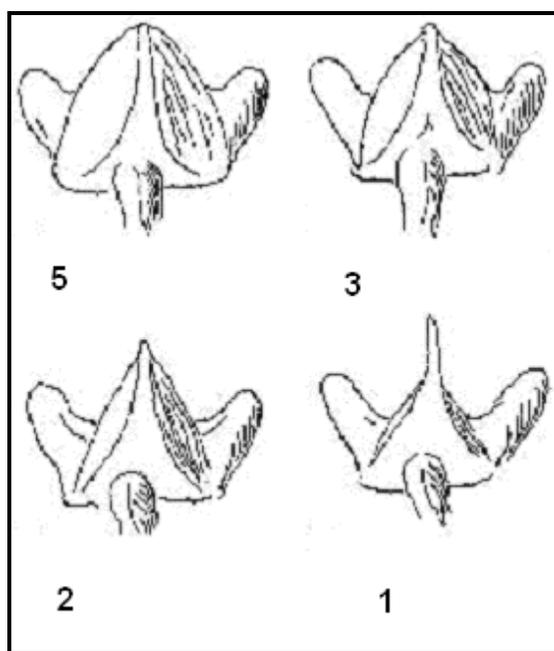


Figura 6.3 Evaluación de la condición corporal (escala del 1-5) (Ritchie, Harrison & Harrison, 1999).

VII.4. Toma de muestra.

Se obtuvieron muestras de sangre, las cuales fueron tomadas de la vena yugular derecha, en el caso de los animales obesos se eligió la vena ulnar cutánea debido a la dificultad para visualizar la yugular en estos casos. Se obtuvo la muestra con jeringas insulínicas; se tomó como máximo el 10% del volumen total de sangre. El volumen total de sangre es el 10% del peso corporal; significando que el 10% del volumen total de sangre es igual al 1% del peso corporal. Debido al peso de las aves, en la mayoría se extrajo 0.1 ml de sangre (Ritchie *et al.*, 1999; Fudge, 2000; Tully *et al.*, 2000; Harr, 2002). Como anticoagulante se utilizó heparina sódica a una concentración de 5UI/ ml. Las muestras de sangre fueron procesadas el mismo día en el laboratorio, pasando la sangre a capilares heparinizados y centrifugando a 11,000 r.p.m/ 5min.

VII.5. Pruebas de laboratorio.

VII.5.1. Hematocrito.

Una vez centrifugados los capilares se obtuvo la separación del paquete celular (GR y capa flogística) y plasma con los cuales se midió el microhematocrito utilizando una regla graduada en milímetros, de manera que se tomaron tres medidas, la primera (X) corresponde al total, incluidos el plasma y el paquete celular, la segunda medida (Y) lo que abarcaban los glóbulos rojos y la tercer medida (Z) la capa flogística.

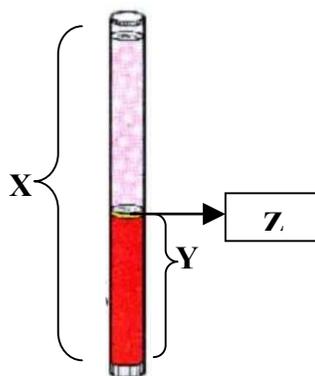


Figura 6.4. Esquema de las medidas tomadas de un capilar centrifugado.

El cálculo se realizó por una regla de tres:

Donde $X = 100\%$

entonces $Y \times 100\% \div X = \% \text{ de hematocrito (Hto)}$

y $Z \times 100\% \div X = \% \text{ capa flogística}$

VII.5.2. Determinación de proteínas totales (PT).

Las proteínas plasmáticas se determinaron por medio del método de refractometría utilizando un refractómetro tipo Goldberg (American Optical®):

- Con los capilares centrifugados, una vez que se midió el microhematocrito se procedió a romper el capilar por encima de la capa flogística, utilizando la porción en donde quedó el plasma.
- Se tomó el refractómetro en posición horizontal y se colocó una gota del plasma situando encima la placa protectora para que por capilaridad se llenara la cámara.
- Se realizó la lectura exponiendo el refractómetro a la luz, y se tomó la medida que marcaba la línea que divide el campo oscuro del luminoso en g/ dl.

VII.6. Técnica de la PCR.

VII.6.1. Extracción del ADN.

El resto del capilar con el paquete celular se sometió a la extracción de ADN, colocando 52 μl de paquete celular (se usaron dos capilares considerando que cada tercera parte de un capilar tiene 26 μl) en 3ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, SDS 1%) (Wu *et al.*, 2007) y 250 $\mu\text{g/ ml}$ de proteinasa K. Se incubó la solución anterior a 55° C durante 6 horas. Posteriormente se congeló a -70° C y se descongeló a 37°C realizando los dos pasos anteriores dos veces. Se tomaron 500 μl de la solución anterior y se agregaron 500 μl de fenol cloroformo, agitando en el Vortex por unos segundos para posteriormente centrifugar a 10,000 r.p.m. durante 5 minutos. Se tomó la fase acuosa aprox. 500 μl y se colocó en un tubo de Ependorff de 1.5ml, se agregaron 375

μl de isopropanol y 125 μl de acetato de amonio; se refrigeró por 15 minutos y se centrifugó a 10, 000 r.p.m. durante 5 minutos, se decantó la fase acuosa y se disolvió en agua desionizada estéril.

VII.6.2. Análisis por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la PCR se preparó cada muestra de ADN usando:

Tabla 6.1. Reactivos para PCR.

Reactivo	Concentración	Cantidad	Laboratorio
Buffer para PCR	1x	2.5 μl	Invitrogen®
MgCl ₂	1.5 mM	1.5 μl	Invitrogen®
dNTPs	200 μM	0.6 μl	Invitrogen®
primer <i>Circ1</i>*	56.53nM	3.2 μl	Invitrogen®
primer <i>Circ2</i>*	50.82nM	3.3 μl	Invitrogen®
primer <i>CpsiA</i>**	52.5nM	3 μl	Invitrogen®
primer <i>CpsiB</i>**	45.58nM	3.4 μl	Invitrogen®
H ₂ O desionizada estéril		11.2 μl	Invitrogen®
Taq DNAPolimerasa	5UI/ μl	0.2 μl (1UI)	Invitrogen®

Primer *Circ1 5'-AAC CCT ACA GAC GGC GAG-3' (posición 182-199pb), **primer *Circ2*** 5'-GTC ACA GTC CTC CTT GTA CC-3' (posición 879-898 pb) ambos de la región ORF1 del genoma del BFDV.

****Primer *CpsiA*** (5'-ATG AAA CAT CCA GTC TAC TGG-3') y **primer *CpsiB*** (5'- TTG TGT AGT AAT ATT ATC AAA-3') de los genes *pmp*.

*** Se realizó una mezcla para *C. psittaci* y otra para circovirus para cada una de las muestras.

Y por último se agregaron 2.5 μl de la muestra de ADN para dejar así un volumen final de 25 μl los cuales se remitieron al termociclador PCT-100™ (MJ Research, Inc.) utilizando un programa el cual consiste en el caso de la PCR para detectar a *Chlamydophila psittaci* en:

Tabla 6.2. Condiciones del ciclado de la PCR para *Chlamydophila psittaci*.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	2min
2	94	30s
3	50	1min
4	72	2min
5	Se repite 30 veces Paso 2 al 4	
6	72	10min

*Sareyyupoglu *et al.*, 2007 (con modificaciones)

Y para la detección del vEPP las condiciones de ciclado fueron:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	5min.
2	50	2min.
3	72	45s.
4	94	45s.
5	50	45s.
6	Se repite 35 veces Paso 3 al 5	
7	72	10min.
8	4	∞
9	FIN	

*Condiciones de ciclado utilizadas en trabajos previos en el UIMSA FESC.

Como controles positivos se utilizaron dos casos del laboratorio DIVeT® provenientes del estado de Morelos, ambos individuos de la especie *Rhynchopsitta pachyrhyncha* y mantenidos en parvada. Y como control interno para ambos agentes se utilizó un tubo Ependorff con todos los reactivos usados para la técnica pero sin agregarles los 2.5 µl de ADN.

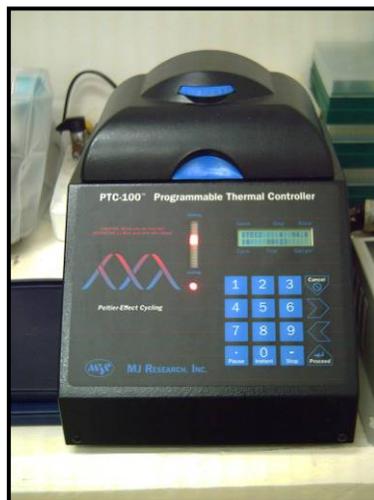


Figura 6.5. Termociclador PCT-100™ (MJ Research, Inc.)

VII.6.3. Análisis por electroforesis.

Al final se separaron los amplificadores por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con 5 μ l bromuro de etidio (10mg/ml). Se usó una cámara de electroforesis Horizon 58 (Life Technologies®). Se colocaron 2 μ l de buffer Blue Juice (Invitrogen®) más 6 μ l de los productos del PCR. Se colocaron 4.5 μ l de marcador 123bp DNA Ladder (Invitrogen®) y se corrió a 81 volts por espacio de 45min.

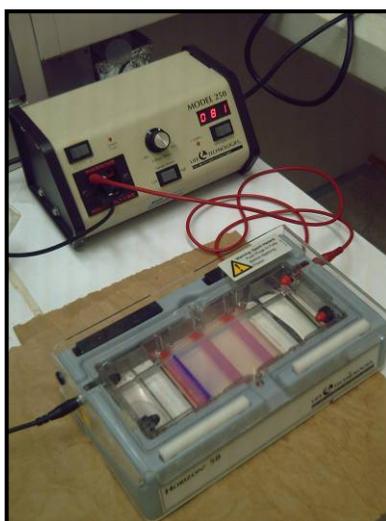


Figura 6.6. Cámara de electroforesis conectada para el corrimiento.

Se visualizaron las bandas de los amplificadores en el transluminador (Syngene®) y por último se utilizó el programa IMAGE-Pro Plus para fotografiar los corrimientos.

VIII. Resultados

VIII.1. Distribución geográfica de los ejemplares muestreados.

La selección de los psitácidos se realizó de manera aleatoria, tomando como fuente de información a M.V.Z. y particulares, propietarios o no de aves; lo anterior dentro del área de influencia de la FES Cuautitlán. La distribución de los individuos resultó como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 7.1. Cantidad de individuos muestreados por municipio.

Municipio de residencia:	# de individuos
Cuautitlán Izcalli	37
Cuautitlán de Romero Rubio	5
Tepotzotlán	8
Tultitlán	1
Total:	51

Como se muestra en la Figura 7.1. el mayor porcentaje se encontró en el municipio de Cuautitlán Izcalli.

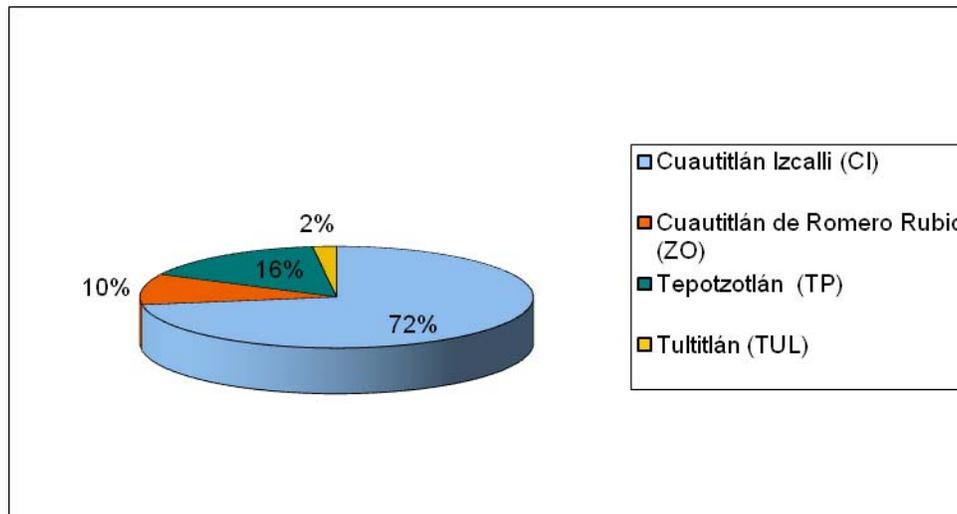


Figura 7.1. Porcentaje de individuos muestreados por municipio.

VIII.2. Especies de psitácidos encontradas.

Las especies encontradas, las cuales fueron identificadas por medio de un análisis morfométrico (Forshaw, 2006), son originarias en su mayoría del territorio nacional.

De los 51 individuos muestreados, se identificaron 30 del género *Amazona*, incluyendo a una de las seis especies de psitácidos endémicas para el país; 14 del género *Aratinga*, dentro de este género se encontró a una especie exótica (Sudamericana), y a 7 psitácidos de especies exóticas (Tabla 7.2).

Tabla 7.2. Especies identificadas.

Especie	No. de individuos
<i>Amazona autumnalis</i>	14
<i>Amazona albifrons</i>	7
<i>Amazona oratrix</i>	4
<i>Amazona auropalliata</i>	2
<i>Amazona finschi</i>	2
<i>Amazona farinosa</i>	1
<i>Aratinga mitrata</i>	7
<i>Aratinga canicularis</i>	6
<i>Aratinga nana</i>	1
<i>Ara chloroptera</i>	1
<i>Myopsitta monachus</i>	2
<i>Pionus maximiliani</i>	1
<i>Psittacus erithacus</i>	3
Total=	51

* Las especies en rojo = exóticas

En la Figura 7.2 se puede apreciar que la especie más encontrada en este estudio fue *Amazona autumnalis* (26%), seguida de *Amazona albifrons* (14%) y *Aratinga mitrata* (14%). Las especies exóticas en conjunto representaron el 27% del total de aves encontradas.

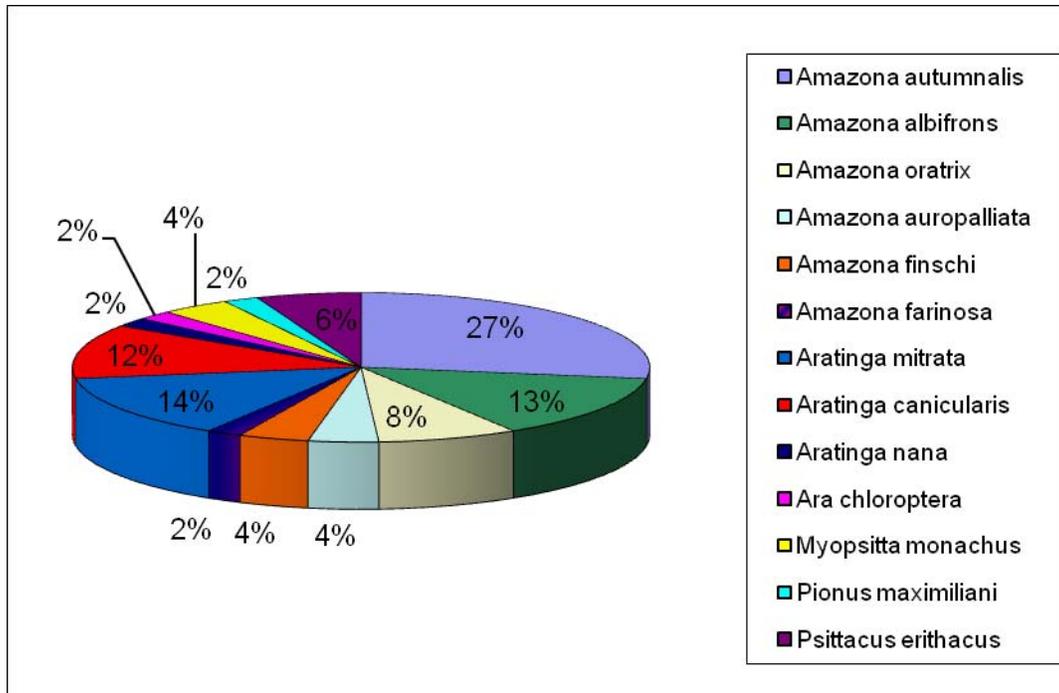


Figura 7.2. Porcentaje de especies estudiadas.

VIII.3. Historia clínica dirigida.

VIII.3.1. Edades.

Dentro de la reseña de la Historia clínica se preguntaron las edades de los loros a los propietarios, en algunos casos no se obtuvo el dato debido a que se desconocía por parte de los propietarios y a que una vez que llegan a la adultez es difícil determinar su edad. Se ordenaron en cinco categorías: aquellos menores a tres años, de tres a siete años, de ocho a quince años, más de quince años y sin dato (Tabla 7.3).

Tabla 7.3. Edades encontradas.

Rangos de edades:	# de individuos
< 3 años	30
3-7 años	10
8-15 años	4
> 15 años	3
sin dato	4
Total:	51

La Figura 7.3 nos muestra que el mayor porcentaje pertenece al rango de edad menor a los 3 años con más de la mitad de los individuos y en contraste muy pocos llegan a sobrepasar los 15 años (6%).

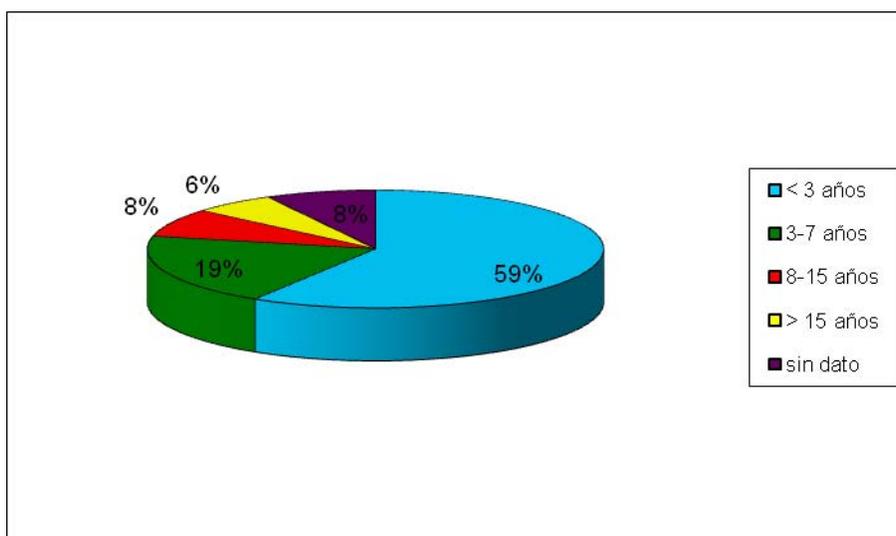


Figura 7.3. Porcentajes de rangos de edades.

VIII.3.2. Evaluación del aspecto clínico.

A los ejemplares de nuestro trabajo se les evaluó el aspecto que presentaban, clasificándolo en dos: aparentemente sanos, los cuales no presentaban signos visibles de enfermedad y en enfermos, los cuales manifestaban algún signo de alteración, ya fuere en su comportamiento o como lo fue en su mayoría (12 individuos) en la capa (Tabla 7.4).

Tabla 7.4. Aspecto clínico de los sujetos de estudio.

	Aparentemente sanos	Enfermos	Total
# de individuos	37	14	51

En la Figura 7.4 se puede apreciar que la mayoría no presentaban signos de enfermedad y del porcentaje de enfermos la mayoría era por un mal aspecto de las plumas faltándoles la

tonalidad de sus colores, alteraciones en su distribución o en su estructura. Otro caso por alteraciones en su pico, además de en la capa (Figura 7.5).

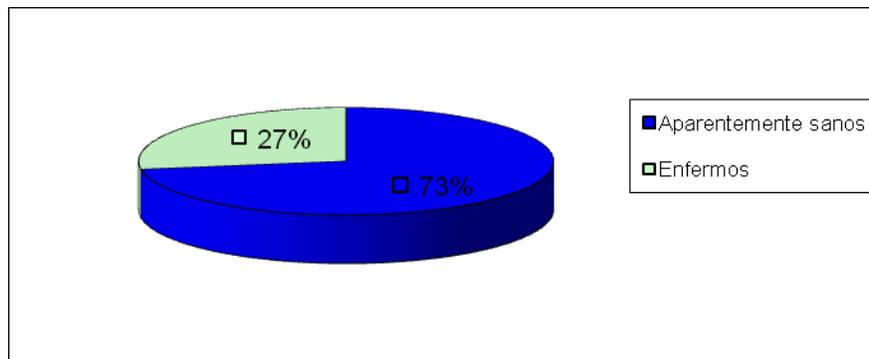


Figura 7.4. Porcentajes hallados de acuerdo al aspecto clínico.



Figura 7.5. Deformación del pico en un *Amazona oratrix*.

VIII.3.3. Peso/ Condición corporal.

Los sujetos también se pesaron y se les relacionó su peso con la condición corporal que poseían (Tabla 7.5) para determinar así si se encontraban con sobrepeso, normales o bajos de peso, ya que algunas ocasiones el ave puede estar dentro del rango de peso y presentar emaciación o también obesidad (Ritchie *et al.*, 1999).

Tabla 7.5. Condición corporal

Condición corporal	# de individuos
2	5
3	37
4-5	9
Total	51

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos en los pesos tomando en cuenta la condición corporal:

Tabla 7.6. Pesos de los sujetos de estudio.

Especie	Bajo de peso	En rango	Sobrepeso	Rango*
<i>Amazona autumnalis</i>	1	11	2	314-485g
<i>Amazona albifrons</i>	1	4	2	188-242g
<i>Amazona farinosa</i>	0	1	0	705-766g
<i>Amazona oratrix</i>	0	1	3	380-565g
<i>Amazona auropalliata</i>	0	1	1	380-596g
<i>Amazona finschi</i>	0	2	0	310-350g
<i>Aratinga mitrata</i>	0	7	0	200-240g
<i>Aratinga canicularis</i>	0	6	0	70-75g
<i>Aratinga nana</i>	0	0	1	73-85g
<i>Myopsitta monachus</i>	1	1	0	127-140g
<i>Pionus maximiliani</i>	1	0	0	233-293g
<i>Psittacus erithacus</i>	0	3	0	375-450
<i>Ara chloroptera</i>	0	1	0	1050-1320g
TOTAL=	4	38	9	

*Fudge, 2000;Forshaw, 2006

A pesar de que el mayor problema encontrado fue una mala alimentación de los ejemplares, se puede observar que la mayoría se encuentran dentro del rango de peso y la mayor alteración es el sobrepeso más que la baja de peso (Figura 7.6).

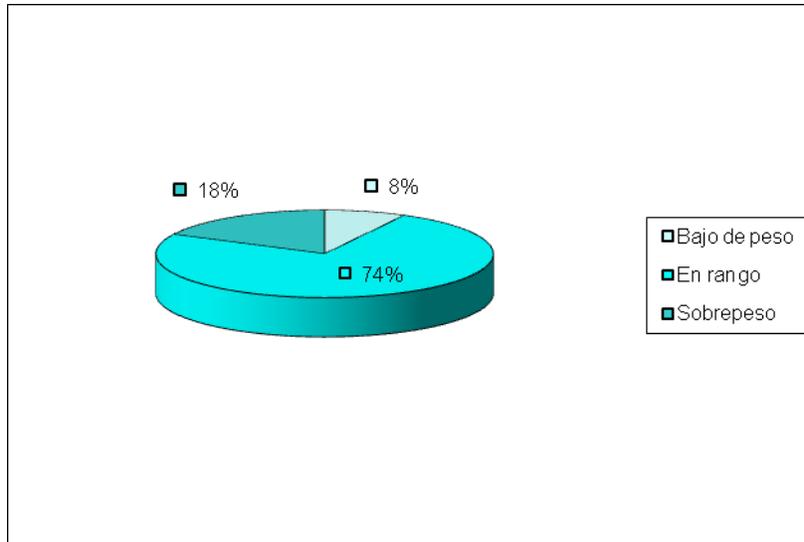


Figura 7.6. Porcentajes de peso.

VIII.3.4. Instalaciones.

Se observaron y midieron los recintos en los que se encontraban las aves, encontrándose mayormente el tipo de jaula cilíndrica o también mal llamada para loros (Figura 7.7) y por el contrario las instalaciones tipo aviario sólo se localizaron con un propietario, el cual tenía nueve aves (Tabla 7.7).

Tabla 7.7. Tipos de recintos.

Tipo de jaula	# de individuos
Rectangular (40l x 30h x 30a)	10
Rectangular grande (1.5m l x 1m h x 80cm a)	9
Cilíndrica (40 d, 60 h)	23
Aviario	9
Total	51

* a = ancho, l = largo, h = alto, d = diámetro



Figura 7.7. Jaula tipo cilíndrica.

VIII.3.5. Alimentación.

Los diferentes tipos de dieta proporcionadas a los psitácidos se dividieron en cinco tipos de acuerdo a los ingredientes que las componían y sus proporciones; la primera estaba constituida únicamente por semillas de girasol, la segunda se componía a base de semilla de girasol en combinación con algunas frutas y verduras en menor proporción, de aproximadamente el 20% de frutas y verduras y 80% semilla de girasol, la tercera era una dieta variada en la que se incluían semilla de girasol o cacahuete en un 60% y se complementaba con frutas, verduras, otras semillas, tortilla o pan; la cuarta dieta estaba formada por alimento comercial especial para psitácidos más frutas, verduras crudas y semillas y la quinta dieta era pan con leche (Tabla 7.8).

Tabla 7.8. Tipos de alimentación.

Tipo de alimentación:	# de individuos
Girasol	6
Base girasol	25
Variada	16
Alimento comercial+complementos	2
Pan con leche	2
Total	51

En la Figura 7.8 se aprecia que el mayor porcentaje corresponde a aquellas dietas realizadas a base de semilla de girasol y la combinación de un alimento comercial, que no sea a base de semillas, más la complementación con diferentes frutas y verduras crudas tiene uno de los porcentajes más bajos.

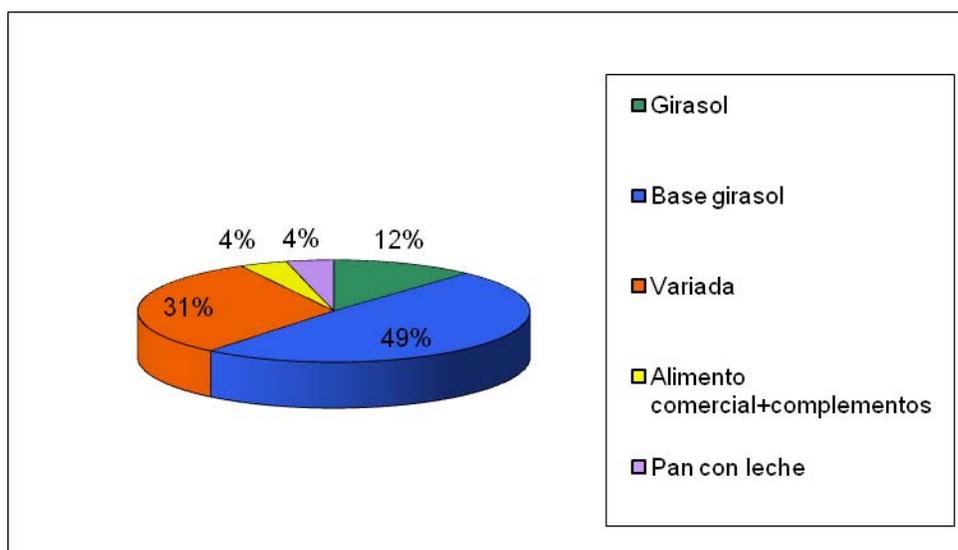


Figura 7.8. Proporción de los diferentes tipos de dieta.

VIII.3.6. Atención médico veterinaria.

Dentro de la historia clínica se les preguntó a los dueños acerca de si habían llevado o no a su ave con un M.V.Z. y en cuántas ocasiones, así como los motivos por los que decidieron hacerlo (Tabla 7.9).

Tabla 7.9. Atención veterinaria.

Atención Veterinaria	SI	NO	Total
# Individuos:	19	32	51

En la Figura 7.9 se puede observar que la mayoría de individuos no han sido supervisados ni los propietarios asesorados por un médico veterinario.

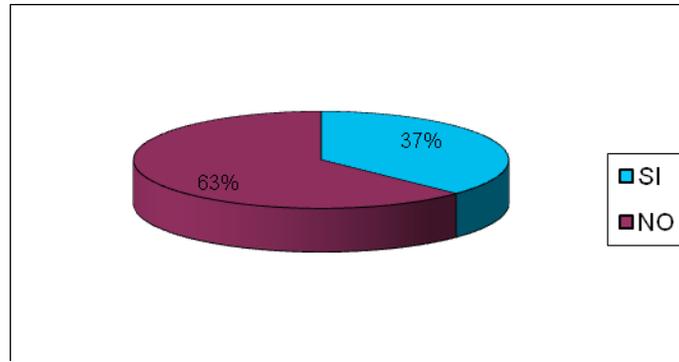


Figura 7.9. Porcentaje de sujetos con atención médica.

VIII.3.7. Otros.

También se preguntó en la historia clínica de la procedencia de sus aves, resultando como ya es sabido que la gran mayoría provenía de lugares y personas dedicadas al tráfico ilegal y por lo tanto también fueron muy pocos los animales que contaban con documentos legales (Figuras 7.10 y 7.11).

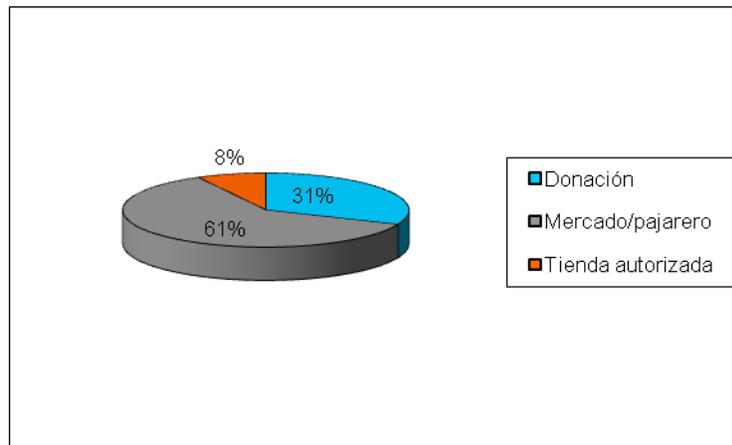


Figura 7.10. Procedencia de los ejemplares.

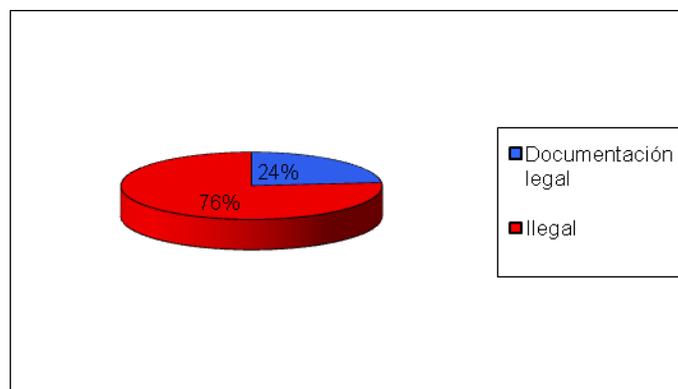


Figura 7.11. Documentación oficial.

VIII.4. Pruebas de laboratorio.

VIII.4.1. Determinación de Hematocrito.

Las muestras de sangre remitidas al laboratorio fueron procesadas para la obtención del hematocrito, por medio de la técnica de microhematocrito lo cual contribuyó para conocer el estado fisiológico en el que se encontraban los individuos, los resultados hallados se muestran en la Tabla 7.10.

Tabla 7.10. Resultados del hematocrito.

Género	# de individuos:			Rango**
	Abajo del rango (anemia)	En rango	Arriba del rango (policitemia)	
<i>Amazona spp.</i>	10	16	4	41.96-52.5%
<i>Aratinga spp.</i>	2	10	0	42.3-57.7%
<i>Ara spp.</i>	0	1	0	41.7-53.9%
<i>Psittacus spp.</i>	0	3	0	41.1-53.5%
<i>Pionus spp.</i>	0	1	0	35-54%
<i>Myopsitta monachus</i>	0	2	0	45-58%
*Total:	12	33	4	

* De los 51 individuos muestreados a dos de ellos no se les pudo determinar el hematocrito debido a que presentaron hemólisis sus muestras.

**Fudge, 2000; Carpenter, 2006.

Observando en la Figura 7.11 nos podemos dar cuenta de que más del 50% de los individuos se encuentran en rango y que se presentó más la anemia que la policitemia.

También se presentaron más alteraciones en el hematocrito en los individuos del género *Amazona* (Figura 7.13).

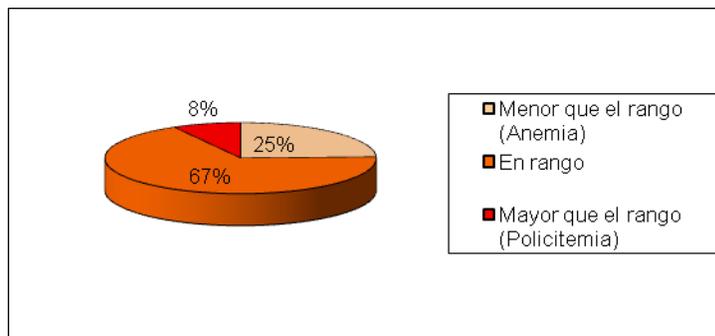


Figura 7.12. Porcentajes de los resultados del hematocrito.

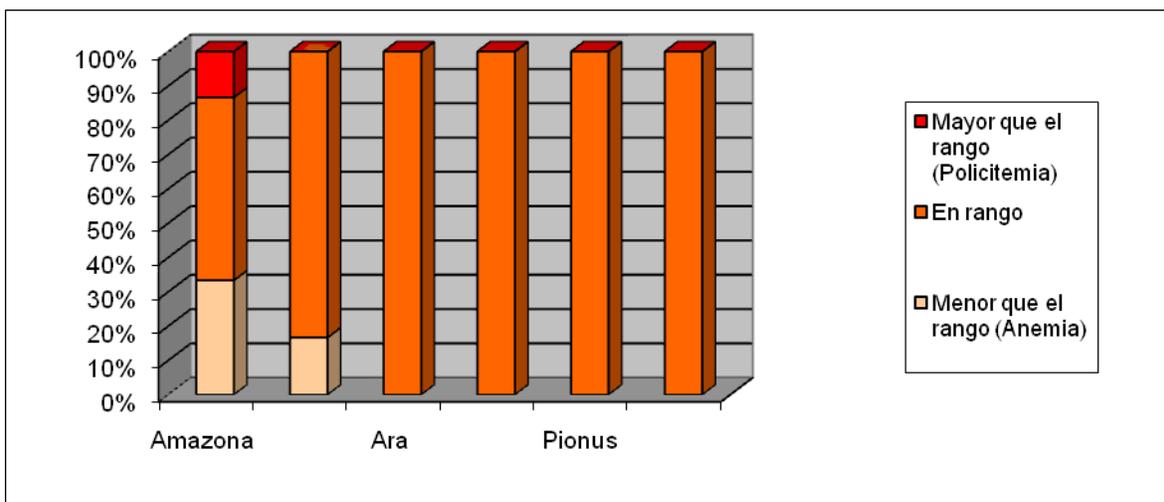
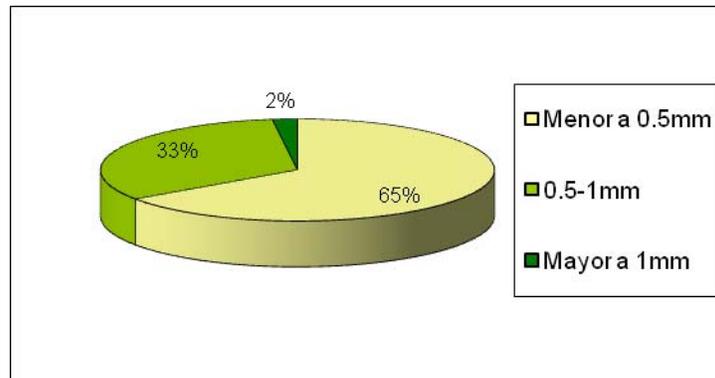


Figura 7.13. Proporción de los valores de hematocrito según cada género.

También es de gran interés el saber que de las 49 muestras utilizadas, 32 presentaron una capa flogística de menos de 0.5mm (Figura 7.14).



**De las 51 muestras tomadas, a dos no se les midió la capa flogística debido a que presentaron hemólisis.

Figura 7.14. Porcentaje de los diferentes resultados de la medición de la capa flogística.

En cuanto a los individuos que presentaron lipemia en sus muestras, nos encontramos con que menos de una cuarta parte la presentó, uno de los individuos se encontraba en ayunas (Figura 7.15).

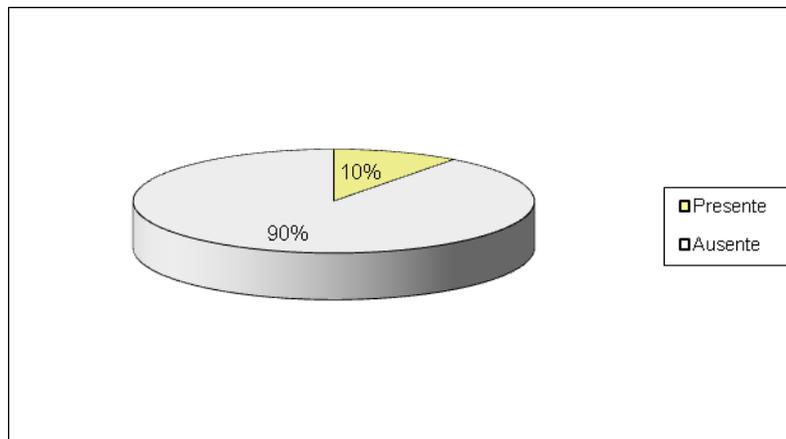


Figura 7.15. Porcentaje de individuos que presentaron lipemia.

VIII.4.2. Determinación de proteínas totales (PT).

En cuanto a la determinación que se realizó de las PT, los resultados encontrados se muestran en la Tabla 7.11.

Tabla 7.11. Resultados de la determinación de PT.

Género	# de individuos:			Rango (g/L)**
	Hipoproteinemia	En rango	Hiperproteinemia	
<i>Amazona spp.</i>	4	23	3	26-45
<i>Aratinga spp.</i>	3	8	1	25-37
<i>Ara spp.</i>	0	1	0	24-44
<i>Psittacus spp.</i>	1	2	0	27-44
<i>Pionus spp.</i>	1	0	0	32-46
<i>Myopsitta spp.</i>	1	0	1	25-37
Total:	10	34	5	49*

*De las 51 muestras tomadas, a dos no se les determinaron las PT debido a que presentaron hemólisis.

** Fudge, 2000; Carpenter, 2006.

Se demostró que la mayoría de los casos se encontraban en rango y que la alteración más frecuente era la hipoproteinemia en los individuos (Figura 7.16).

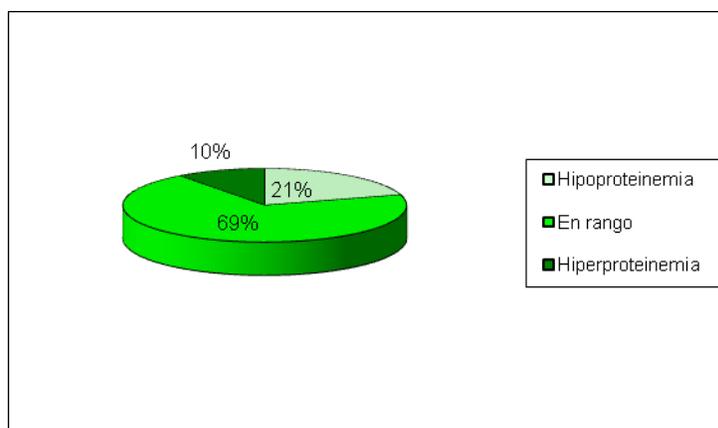


Figura 7.16. Porcentajes de la determinación de PT.

VIII.5. Técnica de la PCR.

En la Tabla 7.12 se observan los cambios que se realizaron al método de extracción utilizado por Wu *et al.* (2007) y en la Tabla 7.13 los realizados al método ocupado por Laroucau *et al.* (2001).

Tabla 7.12. Diferencias entre el trabajo de Wu *et al.* (2007) y el presente trabajo.

	Wu <i>et al.</i> (2007)	Presente trabajo
Sangre completa	80µl	52µl
Tris-HCl	10mM	10mM
NaCl	150mM	100mM
EDTA	10mM	10mM
Vol. sol. de lisis	3ml	3ml
NH ₄ Cl 10%	100µl/ ml	100µl/ ml
Proteinasa K	10mg/ml	0.250mg/ml
Colagenasa	25µl	no utilizada
SDS 10%	200µl	200µl (1%)
Tiempo incubación	24h (55°C)	12h (55°C)
Congelación/ Descongelación	no	si
Extracción	Fenol cloroformo	Fenol cloroformo
Precipitación	Isopropanol	Isopropanol
Disolución	H ₂ O doble destilada	H ₂ O desionizada estéril

Tabla 7.13. Diferencias entre Laroucau *et al.* (2001) y el presente trabajo.

	Laroucau <i>et al.</i> (2001)	Presente trabajo
Volumen ADN	2µl	2.5µl
Volumen final	25µl	25µl
<i>Iniciadores</i>	2µM/ <i>primer</i>	52.5nM/ 45.58nM <i>primer</i>
dNTP's	200µM	200µM
Tris-HCl	10mM (pH 8.3)	100mM (pH 8)
MgCl ₂	3.0mM	1.5mM
Taq polimerasa	0.5U	1U

VIII.6. PCR para la detección de *Chlamydomophila psittaci*.

La prueba se utilizó para detectar el ADN de *Chlamydomophila psittaci* en las muestras de los sujetos de estudio, obteniendo el 100% de la población negativa (Figura 7.17).

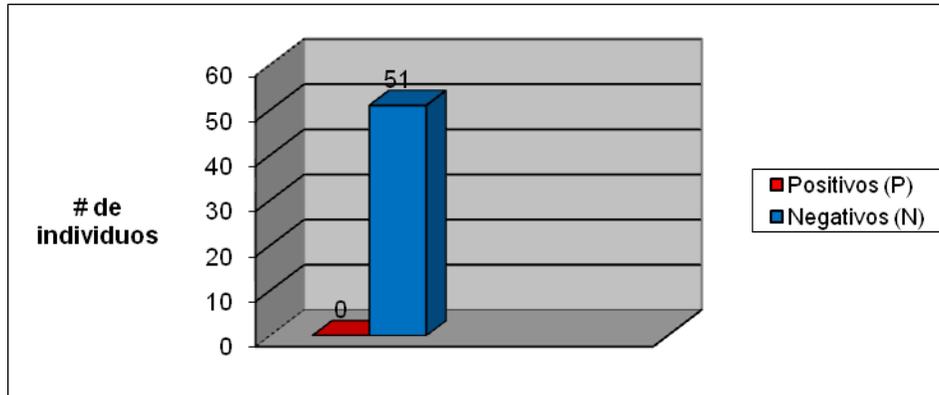


Figura 7.17. Resultados obtenidos para *Chlamydomophila psittaci*.

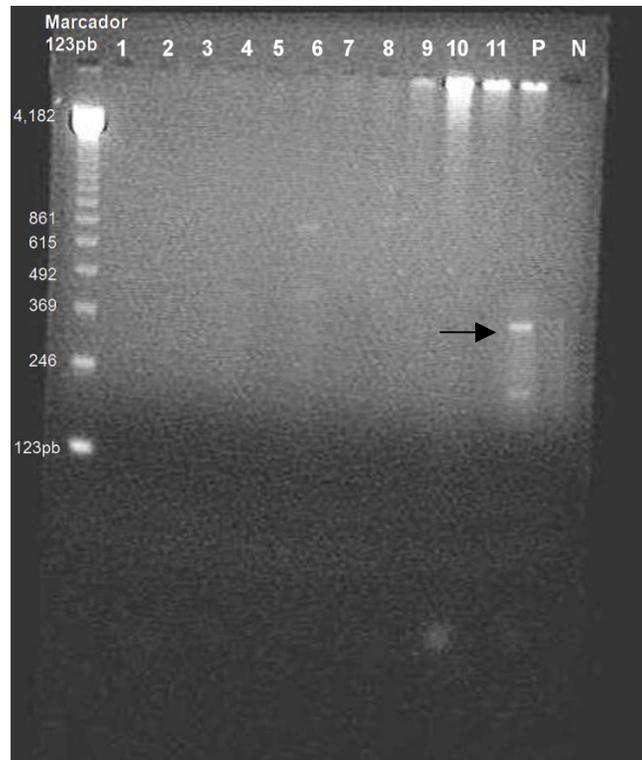


Figura 7.18. Electroforesis del gel con los amplificados del PCR de las muestras de ADN problema para *Chlamydomophila psittaci*. Donde de la línea 2-12 son los corrimientos de los amplificados problema (1-11), P control +, N control interno sin ADN.

El tamaño esperado para los amplificadores utilizando los iniciadores de los genes *pmp* es en promedio de 300pb, debido a que corresponden a secuencias de cuatro genes *pmp91A*, *pmp90A*, *pmp91B* y el *pmp90B* obteniéndose amplificadores de 315, 303, 306 y 303pb respectivamente (Laroucau *et al.*, 2001).

VIII.7. PCR para la detección del virus de la Enfermedad del Pico y Pluma (vEPP).

Para el caso de la PCR empleada para detectar el vEPP, los resultados también resultaron ser negativos para todos los individuos muestreados como podemos observar en la Figura 7.19.

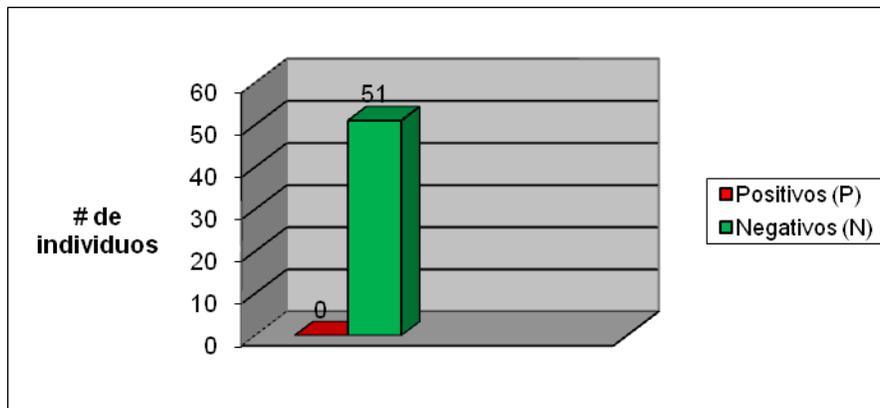


Figura 7.19. Resultados obtenidos para la detección del vEPP.

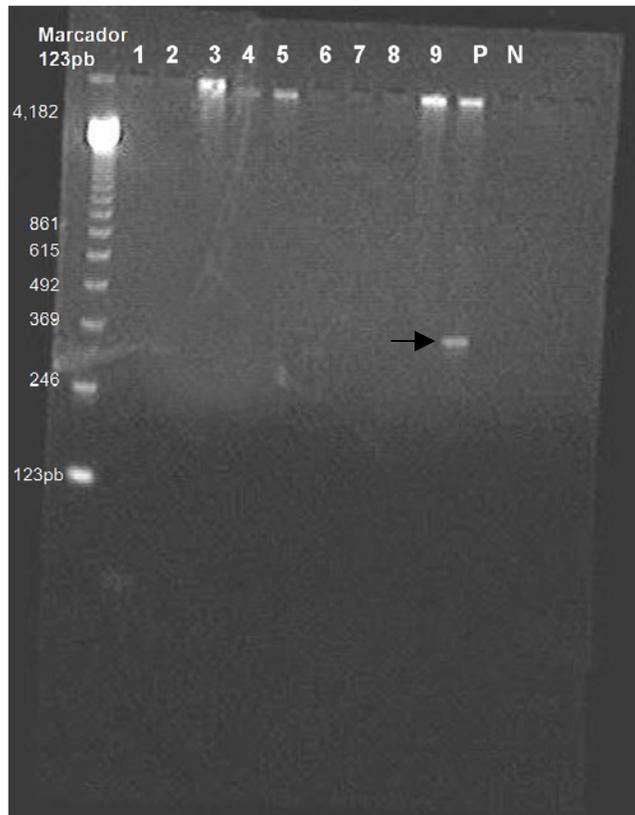


Figura 7.20. Electroforesis del gel con los amplificados del PCR de las muestras de ADN problema para circovirus. Donde de la línea 2-10 son los corrimientos de los amplificados problema (1-9), P control +, N control interno sin ADN.

Con los iniciadores utilizados para detectar el circovirus el tamaño esperado de los amplificados es de 717pb.

IX. Discusión

El presente estudio pretende colaborar en el comienzo del proceso de investigación (Rojas, 1996; Morales, 2006) acerca del estado actual de salud real de las poblaciones de psitácidos mantenidos en cautiverio de la zona centro del país, con respecto a dos de las enfermedades más importantes en los psitaciformes.

IX.1. Distribución geográfica y especies encontradas.

Con respecto a la cantidad de ejemplares por municipio, más de la mitad son procedentes de Cuautitlán Izcalli, no significando esto que en este municipio se encuentre el mayor número de psitácidos en cautiverio. Una de las explicaciones puede ser que 13 de los 51 individuos (25.5%), fueron pacientes del MVZ Rodolfo Córdoba Ponce el cual realiza su práctica profesional en su clínica ubicada en este municipio.

El grupo más encontrado en este trabajo fue del género *Amazona sp.* el 59% (30/ 51) (Morales, 2006; Schenker, 2007) y las especies con mayor número de ejemplares *A. autumnalis*, *A. albifrons* y *Aratinga canicularis* (33, 14 y 12% respectivamente) lo cual coincide con lo reportado en otros trabajos (Cantú *et al.*, 2007) y en la página oficial del Instituto Nacional de Ecología con respecto a que son las tres especies más decomisadas por la Profepa además de ser las tres especies que han tenido un periodo más grande con autorización de captura (legal), entre 19 y 23 años (Cantú *et al.*, 2007). También se encontraron especies exóticas, siendo *Psittacus erithacus* y *Myopsitta monachus* las principales en número de aves encontradas, estas especies ocupan el 7° y 8° lugar respectivamente dentro de las especies más importadas a México entre 1995 y el 2005 (Cantú *et al.*, 2007). También concuerda con lo referido por Tully *et al* (2000) y Schenker *et al* (2007) de que las especies más comunes en cautiverio son el loro Africano (*Psittacus erithacus*) y los loros del género *Amazona spp.* La especie *Aratinga mitrata*, a pesar de que se encontraron 7 ejemplares, no se puede incluir dentro de las especies exóticas más encontradas, debido a la subjetividad del caso ya que los siete ejemplares pertenecían a la misma persona.

IX.2. Datos de la Historia clínica.

IX.2.1. Edades.

Gracias a la información colectada, mediante la historia clínica se obtuvo una aproximación a las edades en las que oscilaban los sujetos de estudio, observando una marcada tendencia a aquellos menores a los tres años (59%) y en contraste el menor porcentaje lo presentaron los loros mayores de quince años (6%), a pesar de que todas estas especies tiene un promedio de vida superior a los 20 años en el caso de *Aratinga spp.*, *Pionus spp.* y *Myopsitta monachus* y en cuanto a las especies *Amazona spp.*, *Psittacus erithacus* y *Ara chloroptera* su longevidad es superior a los 40 años (Forshaw, 2006; www.parrots.org). Lo anterior puede ser un reflejo de la ignorancia en cuanto a los cuidados necesarios en estas especies, principalmente en cuestión de requerimientos nutricionales (como veremos más adelante), instalaciones, cuidados de la salud, entre otras; esto concuerda con lo que reporta Ritchie *et al* (1999) de que el promedio del rango de edad en la población de aves en cautiverio es menor a su potencial. Además de que en la mayoría de los casos se desconocía con exactitud la edad de las aves.

IX.2.2. Aspecto clínico.

La gran mayoría de los sujetos de estudio se encontraban aparentemente sanos (73%) a diferencia de lo que encontraron Deem *et al.* (2008) en su trabajo realizado en una población en cautiverio de *Amazona guildingii* en donde sólo el 19% se encontraba aparentemente sanos a la exploración física. Para decir esto se descartaron los signos generales de enfermedad como los son la variación en el consumo de alimento/ agua, somnolencia, indiferencia, disminución de la actividad, cojeras, disminución del vuelo (en caso de que sus instalaciones se lo permitan), plumas timoneras manchadas de heces, plumas desordenadas, erizadas y retraso en la muda, entre otros (Samour, 2000). De los enfermos, doce de ellos, se debió a un mal aspecto de la capa con plumas desordenadas, coloraciones anormales, opacas o ausencia de éstas en alguna zona del cuerpo (Figura 8.1). Con respecto al caso del ejemplar que presentaba la zona abdominal sin plumas, éste, no tenía un patrón que concordara con la enfermedad del pico y pluma, además de no presentar deformaciones en el pico, ni retención de cálamos (Ritchie *et al.*, 1999). De los otros dos, uno padecía de una deformación del pico refiriendo la propietaria que en su etapa juvenil había sido atacado por una guacamaya adulta, no pudiendo proporcionar más información

debido a que el loro tenía poco tiempo de vivir con ella, ya que lo había heredado; y el otro ejemplar (*Amazona autumnalis*) se encontraba con las plumas desordenadas, opacas, presentaba disnea, además de una disminución en la actividad, sin embargo si opuso resistencia al manejo y contención para la toma de muestra y el pesaje.



Figura 8.1. *Aratinga canicularis* con ausencia de plumas en la zona abdominal.

IX.2.3. Peso/ condición corporal.

El pesaje de los ejemplares se realizó según las recomendaciones de Samour (2000) en donde la mayoría (98%) se pesaron por medio de un contenedor (caja). Encontramos que más de la mitad de los psitácidos se encontraban en rango y que la cantidad de ejemplares con sobrepeso (18%) fue mayor que los que se encontraron por debajo del peso (8%). Lo anterior se concluyó, tomando en cuenta la condición corporal de tal forma que por ejemplo en el caso de un *Aratinga canicularis* que se encontraba por encima del rango de peso (70-75g) ya que pesaba 77g pero que su condición corporal fue de 3 (la óptima) no se le consideró que estuviera en sobrepeso coincidiendo con lo expuesto por Harrison y Lightfoot (2005), los cuales dicen que si el peso del ave sobrepasa al peso óptimo entre un 1-9% es aceptable y no se le considera con sobrepeso; lo cual para el caso del *Aratinga spp.* significa que tiene un rango entre 73 y 79g sin considerarse con sobrepeso (el peso óptimo se sacó de la media del rango de peso manejado $X \bar{=} 72.5g$). Otros autores también recomiendan que se pueden manejar rangos de peso relacionados con la condición corporal y el estado de salud aparente, por cada paciente en el caso de los que son pacientes de Médicos Veterinarios, haciendo un seguimiento del peso de las aves cada vez que acuden a

consulta, a manera de base de datos; además de estar familiarizados con el grado de desarrollo de los músculos pectorales por especie ya que se presentan cambios (Tully *et al.*, 2000). La determinación de la condición corporal es igual de importante que la determinación del peso, ya que la pérdida de condición corporal puede dar indicios del grado de severidad y cronicidad de algún proceso patológico (Ritchie *et al.*, 1999; Tully *et al.*, 2000).

IX.2.4. Instalaciones.

El tipo de jaula que predominó en cuanto a las instalaciones de los individuos, fue la mal llamada “jaula para loros” en un 45%; este tipo de jaula tan común tiene la gran desventaja de que desperdicia espacio a lo alto y en cambio no proporciona el espacio requerido por las aves para ejercitarse (volar) a lo largo (Ritchie *et al.*, 1999); Tully *et al.* (2000) recomienda mínimo 2m³ de espacio para aves grandes y 1m³ para aves pequeñas. El 20% tenían una jaula tipo rectangular pero sin las dimensiones necesarias para realizar vuelos. El 17.6% de los loros se encontraron en una jaula con las dimensiones que les permitiera realizar vuelos cortos. Y el otro 17.6% de psitácidos estaban en el tipo de instalación idónea, un aviario que contaba con enriquecimiento ambiental compuesto por perchas de diferentes tamaños, una pequeña cascada (teniendo las aves la posibilidad de tomar baños) y vegetación. Es de gran importancia el enriquecimiento ambiental para evitar la presencia de estereotipias en los ejemplares, entre las alternativas se encuentra la colocación de perchas de diferentes formas y tamaños y ser remplazadas sobre todo si se ensucian con heces (Ritchie *et al.*, 1999; Samour, 2000; Tully *et al.*, 2000; San San, 2002). Es trascendental saber las características climatológicas de los hábitats naturales de cada especie para poder implementarlas en sus recintos y así evitar diversas patologías (Samour, 2000). En el caso de recintos cerrados como el aviario encontrado, se deben de tener paneles que permitan el paso de la luz UV o colocar luz artificial y una buena ventilación para así evitar el exceso de humedad (Samour, 2000). Por lo tanto para elegir el tipo de jaula, se debe de prestar atención a que se tenga mayor longitud a lo ancho y largo que a lo alto, colocar las jaulas en alto por que es en la posición en la que los psitácidos se sienten seguros y la aportación de enriquecimiento (Ritchie *et al.*, 1999; Tully *et al.*, 2000). También fue importante inspeccionar las jaulas debido a que proporcionaron información

acerca del nivel de higiene, la dieta y la disponibilidad de agua (Tully *et al.*, 2000). En el caso de las jaulas cilíndricas, los recipientes tanto del agua como del alimento se encontraban en el suelo bajo la percha, provocando así su contaminación con heces.

IX.2.5. Alimentación/ nutrición.

En lo referente a la alimentación, que es uno de los aspectos más importantes en el cuidado de aves en cautiverio encontramos que casi la mitad de los ejemplares (49%) se encontraban mantenidos a base de una dieta con un alto porcentaje de semilla de girasol (>80% de la dieta) y el 12% de ejemplares con una dieta de semilla de girasol en su totalidad, siendo un dato relevante ya que en conjunto representan el 61% del total de individuos del estudio y que se ha reportado que las dietas a base de semillas son muy altas en energía, a pesar de que son un buen aporte de ácidos grasos esenciales Omega 6, son deficientes en los Omega 3; son altas en proteína pero no del grupo completo de aminoácidos (a.a.) esenciales ya que carecen de lisina y metionina, son deficientes en el aporte de Ca⁺⁺ y P entre otros macro y micro minerales, además de encontrarse invertida la proporción Ca:P, son también deficientes en vitaminas y precursores de vitaminas como la A, D, E, K, B₁₂, entre otras, en general son deficientes en 32 nutrientes de ocho grupos diferentes de éstos (Ritchie *et al.*, 1999; Tully *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2005).

También encontramos una porción importante de la población de estudio (31%) con una dieta variada la cual consistía en aquellas dietas con un 60% de semillas (principalmente girasol) más frutas, verduras, tortilla, pan; cabe señalar que se debe de tener en cuenta, la posibilidad de que no todos los propietarios siempre dieran en esta proporción las semillas. Como muestra la Tabla 8.1 hay una estrecha relación entre las dietas altas en lípidos y el sobrepeso, así como también pueden dar esta condición dietas ricas en carbohidratos (pan, pastas).

Tabla 8.1. Relación entre el tipo de dieta-individuos con sobrepeso.

Tipo de dieta	Individuos con sobrepeso (n=9)
G/ BG	5 (55.6%)
V	2 (22.2%)
PL	2 (22.2%)

*G = Girasol, BG = base girasol, V = variada, PL = pan con leche

En cuanto a las instalaciones de estos 9 sujetos, 8 se encontraban en jaulas “tipo para loro” y el noveno en una tipo rectangular, con esto podemos ver que también están involucradas las instalaciones en este problema del sobrepeso, impidiendo que el ave se ejercite adecuadamente (Tully *et al.*, 2000). De los dos individuos (4%) que contaban con una alimentación balanceada combinando alimento comercial más diferentes tipos de frutas y verduras, leguminosas y una pequeña ración de semillas y cereales, uno se encontraba en rango de peso y el otro por debajo de éste, pero debido a que era un ejemplar que se hallaba en recuperación de una dieta desbalanceada y en efecto el psitácido estaba recuperando peso y condición según nos informó el MVZ a cargo.

Además de las deficiencias de las dietas altas en lípidos, éstas disminuyen la velocidad de paso por el TGI, provocan obesidad la cuál predispone a presentar diabetes mellitus o a agravarla, es el principal factor para la presentación de lipidosis hepática, arteroesclerosis y enfermedad cardiaca congestiva (Ritchie *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2005; Schenker *et al.*, 2007). Algunas especies son más propensas a la obesidad por diversas causas como un menor requerimiento calórico por presentar una mejor absorción de energía o una disminución en el gasto de ésta, también puede ser por presentar algún problema en el centro de la saciedad en el hipotálamo; dentro de estas especies se reportan a los periquitos australianos (*Melopsittacus spp.*), cacatúas (*Cacatua spp.*) y el género *Amazona spp.* (Ritchie *et al.*, 1999), con lo cual concuerdan nuestros hallazgos de que de los nueve individuos con sobrepeso, el 89% eran del género *Amazona spp.* y lo encontrado por Deem *et al.* (2008) en el *Amazona guildingii*. No se encontró preferencia por algún rango de edad en los individuos con sobrepeso.

El 8% de los sujetos se encontraron por debajo del rango de peso, los cuatro presentaron dietas diferentes (Variada, base girasol, totalmente girasol y alimento comercial + variada), como ya mencionamos el que se encontraba recibiendo alimento comercial + variada estaba en recuperación. Existen diversas causas para la pérdida de peso como lo es una deficiencia en el aporte de proteína o una deficiencia en el aporte de lípidos (Tully *et al.*, 2000), siendo poco probable esta última en nuestro estudio debido a que dos de los cuatro individuos tenían dietas con exceso de lípidos.

Dentro de los ejemplares que presentaron la capa en mal estado, se puede observar también (Tabla 8.2) lo que se ha dicho con anterioridad de lo que provocan las dietas deficientes en nutrientes, siendo signos generales de un desbalance nutricional la presencia de alteraciones como las mudas incompletas, retención de vainas, coloración anormal en las plumas, hasta grados severos en donde hay pica y automutilación (Harrison *et al.*, 2005).

Tabla 8.2. Relación entre la dieta y los sujetos con mal estado de la capa.

Tipo de dieta	Individuos con mal estado de la capa (n = 14)
G/ BG	10 (71%)
V	1 (7%)
CV	1 (7%)
PL	2 (14%)

*G = Girasol, BG = base girasol, V = variada, CV = comercial + variada
PL = pan con leche.

En la formación de las plumas, su aspecto y coloración, intervienen diversos nutrientes entre los que se encuentran las proteínas que son de los más importantes, ya que las plumas están constituidas en un 90% de proteína, los aminoácidos más importantes son la lisina para la resistencia de las plumas, los aminoácidos sulfurados para evitar la curvatura del raquis y vainas deformes, la cisteína en particular, se encuentra en las barbas que salen del raquis y la deficiencia de metionina provoca las “líneas de estrés” que son líneas horizontales oscuras que salen en las plumas. En general en época de muda se aumenta de 4 a 8 veces los requerimientos de proteína por día. También se debe de aumentar la ingesta de energía para la termorregulación en la temporada de muda (Harrison *et al.*, 2005).

Como se puede observar las dietas que se les proporcionan a los psitácidos en cautiverio no cubren con los requisitos necesarios para que se encuentren en buenas condiciones; aunado a esto existe poca investigación de los requerimientos nutricionales por especie ya que se han encontrado variaciones en éstas (Ritchie *et al.*, 1999; Tully *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2005). Como una base general se ha hecho un estimado de los requerimientos en psitácidos como lo muestra la Tabla 8.3 (Ritchie *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2005). Además también

se debe de tener en consideración, para la formulación de las dietas, otros aspectos como el estado fisiológico y la etapa de vida de los individuos, ya que en las etapas de crecimiento, crianza, época de muda las demandas de proteína y energía se incrementan (Ritchie *et al.*, 1999); en el caso de las aves geriátricas faltan estudios sobre sus requerimientos. También existe poca información acerca de los requerimientos nutricionales en las enfermedades, pero algunos autores reportan que dentro de los más importantes están el aporte de agua, la energía, la ingesta de proteína y algunas vitaminas y minerales (Ritchie *et al.*, 1999; Harrison y Lightfoot, 2005).

Nutriente	Requerimiento (mantenimiento)
Proteína (%)	10.0-15.0
Lisina (%)	0.8-1.5
Energía (kcal/ kg)	3,000
Lípidos (%)	4.0
Vitamina A (UI/ kg)	5,000
Vitamina D3 (UI/ kg)	1,000
Vitamina K (ppm)	1.0
Calcio (%)	0.5
Fósforo disponible (%)	0.25
Hierro (ppm)	80.0
Relación Ca : P	1.5-2:1

* Harrison y Lightfoot, 2005; Ritchie *et al.*, 1999

Tabla 8.3. Requerimiento nutricional en psitácidos.

También encontramos que los propietarios referían que sus aves presentaban preferencias por ciertos alimentos, como menciona Ritchie *et al.* (1999) en donde dice que existen preferencias individuales principalmente en psitácidos en los cuales influyen: la presentación de los alimentos, su textura, color, contenido de grasas (palatabilidad) entre otros y que además los refuerzan los mismos propietarios ya que les proporcionan los alimentos que más les gustan a las aves sin ser necesariamente los más adecuados en cuanto a balance en el contenido de nutrientes.

En general se debe de tener en cuenta para la formulación de las dietas, la zona geográfica de procedencia de la especie, en el caso de las provenientes de bosque tropical y subtropical

su dieta se basa en la ingesta de una gran variedad de frutos y sus semillas, y de esta manera formular una dieta con la combinación de más de 40 nutrientes (Ritchie *et al.*, 1999).

IX.3. Hematocrito/ Proteínas totales.

El hematocrito es uno de los valores hematológicos que pueden dar los primeros indicios del estado fisiológico de las aves. Algunos autores reportan de manera general un valor por arriba del 39% en aves de diferentes especies; otros un rango entre un 35 a un 55% sin diferenciar tampoco entre especies (Ritchie *et al.*, 1999; Fudge, 2000). La mayoría de los valores de referencia tanto para el hematocrito como para otros valores hematológicos, varían entre diferentes reportes y entre especies de aves. También se ha encontrado variabilidad en estos valores, en aves de vida libre, en temporada de muda, reproducción y disminución en la disponibilidad de alimento (Fudge, 2000; Kraft *et al.*, 2000). Más de la mitad de los individuos del estudio (68%) resultaron dentro del rango normal de acuerdo a su género; un 24% mostró valores por debajo del rango (anemia), la cual fue la principal anomalía, lo cual concuerda por lo encontrado por Fudge (2000) en su laboratorio, en donde más del 12% de las muestras de aves recibidas han sido clasificadas como anémicas. La sospecha de anemia en el paciente, por la presencia de signos como palidez de las mucosas y en aquellos que presentan una anemia severa, se puede llegar a apreciar a la auscultación un murmullo sistólico cardiaco; se confirma con la determinación del hematocrito. En las aves existen diversas causas que provocan anemias, entre las más comunes se encuentran el parasitismo, intoxicaciones (aflatoxinas), septicemias, enfermedades crónicas (tuberculosis, clamidiosis, aspergilosis y neoplasias) y deficiencias nutricionales (hierro, ácido fólico). El grado de policitemia observada fue bajo, del 8% y posiblemente fue debido a una redistribución eritrocitaria durante el estrés de la sujeción. También algunos autores mencionan la posibilidad de la presencia de policitemia debida a un cuadro de deshidratación, siendo esto último, la causa más común en las aves (Ritchie *et al.*, 1999; Fudge, 2000).

En cuanto a la determinación de las proteínas totales, el 70% se encontró en rango; a pesar de que la determinación de las PT no es indicativa de un diagnóstico específico si da una idea general del estado de salud del individuo y se modifica sobre todo en alteraciones hepáticas, renales o gastrointestinales. El 30% no se encontró en rango siendo la hipoproteinemia la alteración más frecuente (20%) y la hiperproteinemia de un 10%.

Ritchie *et al.* (1999) menciona que relacionar la hipoproteïnemia con las deficiencias en la dieta es difícil de concluir e interpretar. En nuestro estudio se encontró una relación entre el tipo de dieta y la presencia de hipoproteïnemia, aunque esto se debe manejar con cautela debido a que son varios los factores que pueden intervenir en la disminución de proteínas como la edad, el grado de hidratación y algunas hormonas; en general se puede deber a una disminución en la síntesis de proteínas, a la pérdida de éstas, por inanición o malnutrición prolongadas. En cuanto a la hiperproteïnemia, ésta pudo deberse al método utilizado ya que, aunque algunos estudios reportan una buena correlación entre el método de biuret y el de refractometría para determinación de proteínas (Fudge, 2000; Harr, 2002; Campbell *et al.*, 2007), la concentración de proteína se puede ver elevada debido a la presencia de otros elementos que refractan la luz como son los lípidos y la glucosa (Campbell *et al.*, 2007), es por ello que en este trabajo, no se utilizaron muestras que presentaran lipemia o hemólisis. De las 51 muestras, el 10% presentó lipemia, las cuales eran de aves que tenían dietas a base de semillas o totalmente de semillas (4/5). Fudge (2000) menciona que la lipemia postprandial en aves no es un evento típico y que dentro de las causas probables también se debe contemplar la época reproductiva en las hembras y algún problema hepático; en el estudio de los 5 individuos que presentaron lipemia 3 eran hembras. Se deben manejar con cuidado las muestras que presenten lipemia, ya que interfieren con las pruebas de química sanguínea dando un falso aumento en la determinación de ácidos biliares, ácido úrico, Ca^{++} y P.

IX.4. PCR

La utilización de la PCR sirvió para identificar la presencia de *Chlamydophila psittaci* y vEPP. Se empleó de manera eficaz el método de extracción utilizado por Wu *et al.* (2007) para muestras de sangre, con sus modificaciones, adecuándose a las experiencias de trabajos anteriores realizados en el laboratorio de la UIMSA FESC utilizando la técnica de la PCR. Los iniciadores empleados comprobaron ser útiles, tal como sucedió en los trabajos de Greco *et al.* (2005), Laroucau (2007) y Sareyyupoglu *et al.* (2007) en donde se demuestra que este set de iniciadores es más sensible que otros comúnmente empleados, en el caso de *Chlamydophila psittaci* y en lo reportado por Ypelaar *et al.* (1999) y Khalesi *et al.* (2005) para detectar el circovirus de la EPP.

Los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo fueron del 100% de individuos negativos para ambos agentes; cabe aclarar que esto también incluye a aquellos sujetos que presentaban alteraciones, uno de ellos sugestivo de enfermedad respiratoria y trece con anormalidades en la capa, de estos últimos ninguno de la manera en la que se comporta el circovirus, ya que éste, provoca una distrofia simétrica de las plumas en la mayoría de los casos, sangrado y necrosis de las plumas, el pico y rara vez de las uñas, así como plumas curvadas y mucho dolor en las zonas afectadas (Ritchie *et al.*, 1999; Khalesi, 2007).

IX.4.1. *Chlamydophila psittaci*

Nuestros resultados no concuerdan con lo encontrado por Rojas (1996) y Morales (2006) para el estudio de *Chlamydophila psittaci*, los cuales encontraron: un 100% positivos en el caso de Rojas y un 58% y 80% positivos a serología y aislamiento e identificación respectivamente, en el estudio de Morales; estos dos estudios son de importancia ya que fueron realizados en México y no se han publicado un gran número de estudios específicos de *Chlamydophila psittaci* en psitácidos de la zona centro del país. Esta discrepancia puede deberse a diversas causas como el tipo de técnica empleada, el tipo de muestra, la presentación clínica (sobregada, aguda, crónica y portador), así como la procedencia de los sujetos de estudio. En el estudio de Rojas se utilizó la inmunofluorescencia indirecta, obteniendo hisopados cloacal y conjuntival de aves procedentes tanto de particulares como de parques recreativos ninguno de los cuales presentaba signología sugerente de *Chlamydophila psittaci*; en su trabajo, Morales usó la prueba serológica de ELISA y el aislamiento en embrión de pollo (EP) o cultivo celular y la identificación por inmunofluorescencia directa, obteniendo muestras sanguíneas para la serología e hisopados cloacal, conjuntival y de senos paranasales de aves provenientes de criaderos y tiendas de mascotas en su mayoría, y de zoológicos y particulares, en su minoría; resultando positivos a serología 24 de las 25 aves que presentaban signología respiratoria; en cuanto a su aislamiento e identificación, fueron positivas 18 de las 19 aves con signología respiratoria. La procedencia de las aves estudiadas en los trabajos, tanto de Rojas (1996) como Morales (2006), son de sitios donde se manejan en parvadas en su mayoría (i.e. criaderos, tiendas de mascotas, zoológicos y parques recreativos) solamente los pertenecientes a particulares, como fue el caso de los ejemplares de nuestro trabajo, se encuentran en su mayor parte solos o en pequeños grupos (2-7 individuos), éstos, encontrados en solo dos casos de los 51

trabajados (3.9%); lo anterior tiene relevancia, ya que el hacinamiento y la convivencia en la misma jaula, aumentan la posibilidad de transmisión de unas aves a otras por la manera en que se transmite la psitacosis, donde los cuerpos elementales (CE) se encuentran en el polvo de las plumas y heces secas sobretodo y éstos penetran como aerosoles por vía respiratoria principalmente pero también digestiva; otros sitios donde son expulsados los CE son el exudado nasal, lagrimal, orina, secreciones oral y faríngea (Ritchie *et al.*, 1999; Fudge, 2000; Tully, 2000; Harcourt-Brown *et al.*, 2005; Morales, 2006). En cuanto a la diferencia con la muestra, en sangre periférica se detecta la enfermedad de clamidiosis en la fase aguda con mayor facilidad que en la crónica; debido al ciclo biológico de la *Chlamydomphila*, ésta va disminuyendo su presencia en sangre encontrándose mayormente en macrófagos convertidos en células epiteliodes cuando no se logra activar la respuesta de lisis adecuada por cepas de baja virulencia y los cuerpos reticulados (CR) permanecen en éstos por periodos prolongados, desconociéndose aún el tiempo exacto (Ritchie *et al.*, 1999); también permanecen en las células epiteliales de corazón, pulmones y sacos aéreos a las 96h post infección; aunado a esto en la etapa crónica la excreción de los cuerpos elementales (CE) es intermitente tanto en heces como en orina, fluido lacrimal, exudado coanal, faríngeo y cavidad oral (Ritchie *et al.*, 1999; Fudge, 2000; Morales, 2006) con lo cual se dificulta su detección y la variación en los resultados obtenidos.

En lo que se refiere al estudio realizado por Gilardi *et al.* (1995) en *Aratingas weddellii* y *Brotogeris sanctithomae* el resultado que obtuvieron concuerda con nuestro trabajo, el cual encontró un 100% negativos a *Chlamydomphila psittaci* para tres diferentes pruebas serológicas; también lo encontrado por DeFreitas *et al.* (2006) fue un porcentaje bajo de positivos a *C. psittaci* (6- 20%) por la técnica de PCR y (0- 4.8%) por fijación del complemento. Existen otras técnicas que se han empleado para la detección de *C. psittaci* como la aglutinación en látex (AL) así como la aglutinación de cuerpos elementales (ACE) las cuales son más sensibles detectando IgM o únicamente ésta (ACE), de tal forma que son útiles para detectar infecciones recientes que estén activas (Fudge, 2000; OIE, 2004). Debido a todas estas variantes y a la dificultad de su diagnóstico especialmente en ausencia de signos clínicos, en el compendio de medidas para el control de la infección por *Chlamydomphila psittaci* entre humanos y aves mascota redactado por la NASPHV (2008),

se sugiere emplear diferentes muestras en el caso de las técnicas moleculares (i.e. realizar la prueba tanto a hisopados conjuntival, coanal y cloacal así como a sangre) además que de manera general se maneja que una sola técnica para el diagnóstico no es lo adecuado, sino la combinación de pruebas serológicas (pareadas) y el cultivo, pero la intención es llegar a sustituir el cultivo, debido a sus exigencias y dificultad, por la técnica de PCR la cual presenta varias ventajas como su rapidez, sensibilidad y elevada especificidad ya que no se ha detectado que amplifique ADN de otras bacterias intracelulares o extracelulares (Laroucau *et al.*, 2001).

A pesar de lo encontrado en la literatura en donde ya se ha detectado a *Chlamydophila psittaci* en nuestro país, como Ramsey (2004) menciona un brote en humanos en México en 1930; Meyer en 1965 en palomas (Morales, 2006); Rojas (1996) en el centro de México aisló e identificó por inmunofluorescencia indirecta (IFI) a la bacteria; Urquiza (1997) la encontró en palomas (Morales, 2006), el cual también realizó un reciente estudio en la zona centro del país para aislar e identificar a *C. psittaci* tanto en aves como en humanos por detección de anticuerpos; la psitacosis, en México, se encuentra dentro del grupo I (enfermedades y plagas exóticas que no se encuentran en el territorio nacional, y que por su rápida diseminación e impacto económico para la población animal y riesgo para la salud pública son consideradas de notificación inmediata obligatoria a las autoridades competentes de sanidad animal del país) del acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades de los animales exóticas y endémicas de notificación obligatoria de la SAGARPA (DOF, 20 de septiembre del 2007); por lo que es conveniente notificar a las autoridades del estado real de la enfermedad en México y que éstas presenten atención a tales reportes; debido a su importancia e impacto en la salud pública. Lo anterior se debe al gran comercio que se realiza, tanto de importación como de exportación legal e ilegal (Cantú *et al.*, 2007). Y así las autoridades y la comunidad científica fomenten la realización de más estudios acerca de la presencia y epidemiología de *C. psittaci* en México, identifiquen las cepas que se encuentran en nuestro país, las principales zonas de donde se han obtenido aves positivas, así como de los principales grupos de riesgo en aves y en humanos. El riesgo zoonótico que representa esta enfermedad, sobre todo para aquellas personas que de una u otra manera están relacionadas con aves es de considerable

relevancia, demostrando lo anterior, está el hecho de que la psitacosis forma parte de la lista de las enfermedades aviarias de la Organización mundial de sanidad animal (OIE).

IX.4.2. Virus de la enfermedad del pico y pluma de los psitácidos.

El resultado que se obtuvo fue del 100% negativos a Circovirus; en México no se encuentran estudios publicados acerca de la prevalencia e incidencia de esta enfermedad en los psitaciformes. Khalesi (2007), encontró un 23% de positivos a la PCR en su estudio realizado en Australia, este alto porcentaje pudo deberse a que el Circovirus es endémico en ese país y que afecta más frecuente y severamente a las psitácidas pertenecientes a la familia *Cacatuidae* representando éstas el grupo más grande (45%) del total de aves estudiadas por Khalesi (2007). Debido al comercio que se lleva a cabo con otros países, existe la posibilidad de que el virus se encuentre en nuestro país; la SAGARPA no tiene a la enfermedad en ningún grupo dentro del acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos; la enfermedad más cercana reportada es la anemia infecciosa de los pollos (Gyrovirus) perteneciente a la misma familia que el vEPPP, la cual se encuentra dentro del grupo 3 (enfermedades que se encuentran presentes en territorio nacional consideradas como enzoóticas pero que representan un menor riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional son de notificación mensual obligatoria a las autoridades competentes de sanidad animal del país) del mencionado acuerdo (DOF, 20 de septiembre del 2007) y que anteriormente se encontraba dentro del grupo 1 (DOF, 1994). Entre ambos virus se han encontrado diferencias significativas para que se encuentren en géneros diferentes (Fauquet *et al.*, 2005). Esta enfermedad es de importancia para los psitaciformes ya que es en la mayoría de los casos reportados, una enfermedad terminal, en la que la muerte ocurre debido a las complicaciones bacterianas (i.e. Clamidiosis), virales o por la eutanasia recomendada en aquellos casos en donde las lesiones tanto de las plumas como del pico han evolucionado a tal grado que son muy dolorosas para los psitácidos (Ritchie *et al.*, 1999; Fudge, 2000; Dwight *et al.*, 2004). Anteriormente esta enfermedad sólo se reportaba en psitácidos del viejo mundo pero esto ha terminado debido a la movilización de aves por el mundo, ahora también se ha reportado en las del nuevo mundo (Ritchie *et al.*, 1999;

Khalesi, 2007). La mayoría de los ejemplares de nuestro estudio que presentaban anomalías en la capa, (10/12), tenían una dieta deficiente en diversos nutrientes, en el caso de los que afectan la apariencia de las plumas son los lípidos, proteínas, vitamina A y pigmentos (carotenos, xantofilas) (Tully *et al.*, 2000; 2003). Por lo que puede ser la respuesta a estos cambios de coloración en el plumaje, así como de apariencia despeinada. También hay que diferenciar las lesiones en el plumaje de otras etiologías como son la estereotipia de automutilación, ectoparásitos, origen genético y polyomavirus (Tully *et al.*, 2000).

La detección de este virus por la técnica de PCR en sangre es de las más recomendadas debido a su alta sensibilidad (Ritchie *et al.*, 1999; Fudge, 2000; Tully *et al.*, 2000; Khalesi, 2007), el fragmento elegido para los iniciadores por Ypeelar *et al.* (1999) no tiene una variabilidad en cuanto a sus pares de bases muy marcada; hasta la fecha se han publicado en el GenBank, 33 secuenciaciones del genoma completo de diferentes aislamientos en países como Australia, Sudáfrica, Japón, Portugal y E.U.A., en los que se muestra que puede variar el fragmento, en el número de base donde inicia o bien la sustitución en una base (Bassami *et al.*, 2001; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). En el presente trabajo, el tamaño del fragmento no fue el esperado en la muestra que se utilizó como referencia, como podemos observar en la figura 7.2, posiblemente debido a que la muestra tomada del ave sospechosa de la enfermedad no presentaba la infección por circovirus. Lo anterior puede deberse a que el género del ave (*Rhynchopsitta*) era perteneciente a la familia Psittacidae las cuales son menos susceptibles a este virus; el fragmento obtenido puede ser el resultado de un apareamiento inespecífico de los iniciadores con alguna sección de secuencia similar en el ADN estudiado. Debido a que el Circovirus está considerado como exótico en México y que no presenta una identidad genómica alta con algún otro virus, se presentó una gran dificultad para poder obtener el virus aislado y usarlo como control positivo.

Un tema de suma importancia es la inclusión del artículo 60 bis 2 de la Ley general de vida silvestre en el año del 2008, en el que se prohíbe la comercialización de psitácidos endémicos de México, con lo cual se prevé un aumento en la importación de psitácidos de la familia Cacatuidae entre otros ya que son muy populares especies pertenecientes a ésta (e.g. *Cacatua* sp. y *Nymphicus hollandicus*). Por ello es importante realizar más estudios en

México, acerca del estado del Coronavirus para poder detectar y secuenciar los aislamientos que se realicen en el país y poder desarrollar iniciadores más específicos.

X. Conclusiones.

- ✓ Las especies más encontradas en el trabajo pertenecen al género *Amazona* spp (58.8%).
- ✓ Se encontró en mayor número especies autóctonas de México (72.6%).
- ✓ El 58.8% de las aves fueron menores a tres años de edad, lo que posiblemente indica una alta tasa de mortalidad de estos ejemplares como mascotas.
- ✓ La mayoría de los psitácidos, se encontraron aparentemente sanos, siendo la principal anomalía el sobrepeso; lo anterior se puede explicar con el hallazgo de dietas mal balanceadas las cuales estaban deficientes en ciertos nutrientes como el fósforo y excesivas en otros como los lípidos. Y por los malos diseños de las instalaciones, las cuales impiden a las aves realizar ejercicio físico, haciéndolas sedentarias.
- ✓ También se vio que más del 70% de las aves de estudio, proviene de pajareros y tianguis irregulares y del mercado ilegal.
- ✓ En la determinación del hematocrito más del 50% de los sujetos, estaba en rango así como de PT, siendo en éste, más del 70% de individuos en rango según lo señalado en la bibliografía consultada.
- ✓ Por medio de la técnica de PCR empleada no se encontró evidencia de la presencia en las muestras usadas de ninguno de los dos agentes para los cuales se realizó la prueba.
- ✓ La prueba de la PCR con las condiciones usadas en cuanto a reactivos y en cuanto a las condiciones empleadas en el ciclado, resultó ser efectiva en la detección de los controles positivos del trabajo.

XI. Recomendaciones.

- ✓ Se recomienda realizar estudios en donde se relacione el aislamiento e identificación de los agentes con la técnica de PCR.
- ✓ También la promoción de trabajos en otras zonas geográficas del país y en parvadas de psitácidos en vida libre para monitorear su estado respecto a estos dos agentes etiológicos; utilizando esta técnica en conjunto con serología o aislamiento e identificación.
- ✓ Se recomienda el análisis de campo de especies de Columbiformes con respecto a la presencia de *Chlamydophila psittaci* en éstas, ya que son de gran importancia epidemiológica y lo encontrado en estudios recientes efectuados en Europa (Magnino, et al., 2009; Sharples y Baines, 2009).

- Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Evol Microbiol* 1999; 49: 415-40.
12. **Everett** KDE. Chlamydia and Chlamydiales: More than meets the eye. *Vet Microbiol* 2000; 75: 109-26.
 13. **Fauquet** CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editores. Virus taxonomy 8th report of the international committee on taxonomy of viruses. China: Elsevier, 2005: 328-329.
 14. **Forshaw** JM. Parrots of the world: An identification guide. E.U.A.: Princeton university press, 2006.
 15. **Fudge** AM, editor. Laboratory medicine avian and exotic pets. E.U.A.: W.B. Saunder's company, 2000.
 16. **Gaede** W, Reckling K-F, Dresenkamp B, Kenklies S, Schubert E, Noack U *et al.* *Chlamydophila psittaci* infections in humans during an outbreak of psittacosis from poultry in Germany. *Zoonoses Public Health* 2008; 55 (4):184-8.
 17. **Gilardi** KVK, Lowenstine LJ, Gilardi JD, Munn CA. A survey for selected viral, chlamydial and parasitic diseases in wild dusky-headed parakeets (*Aratinga weddellii*) and tui parakeets (*Brotogeris sanctithomae*) in Peru. *J Wildl Dis* 1995; 31 (4): 523-8.
 18. **Greco** G, Totaro M, Madio A, Tarsitano E, Fasanella A, Lucifora G, Buonavoglia D. Detection of *Chlamydophila abortus* in sheep and goat flocks in southern Italy by PCR using four different primer sets. *Vet Res Commun* 2005; 29: 107-15.
 19. **Harcourt-Brown** N, Chitty J. Manual of Psittacine Birds. 2nd ed. India: BSAVA, 2005.
 20. **Harr** KE. Clinical Chemistry of Companion Avian Species: A Review. *Vet Clin Pathol* 2002; 31(3):140-151.
 21. **Harrison** GJ, Lightfoot L, editores. Clinical avian medicine. Vol. 1. Spix, 2005.
 22. **Heddema** ER, Ter Sluis S, Buys JA, Vanderbroucke-Grauls CM, Van Wijnen JH, Visser CE. Prevalence of *Chlamydophila psittaci* in fecal droppings from feral pigeons in Amsterdam, The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 4423-4425.
 23. **Hirsh** CD, Mac Lachlan NJ, Walker LR. Veterinary Microbiology. 2nd ed. EUA: Blackwell Publishing, 2004: 235-239; 309-311.

24. **Khalesi B**, Bonne N, Stewart M, Sharp M, Raidal S. A comparison of haemagglutination, haemagglutination inhibition and PCR for the detection of psittacine beak and feather disease virus infection and a comparison of isolates obtained from lorriids. *J Gen Virol* 2005; 86:3039-3046.
25. **Khalesi B**. Studies of beak and feather disease virus infection (tesis de doctorado). Australia: Murdoch university, 2007.
26. **Kraft W**, Dür UM. Diagnóstico clínico de laboratorio en veterinaria. 4ªed. España: Grass, 2000.
27. **Laroucau K**, Souriau A, Rodolakis A. Improved sensitivity of PCR for *Chlamydophila* using *pmp* genes. *Vet Microbiol* 2001; 82: 155-64.
28. **Laroucau K**, Trichereau A, Vorimore F, Mahé AM. A *pmp* genes-based PCR as a valuable tool for the diagnosis of avian clamidiosis. *Vet Microbiol* 2007; 121: 150-157.
29. **Levine BS**. Common disorders of Amazon, Austrlian parakeets, and African grey parrots. *Semin Avian and Exotic Pet Med* 2003; 12 (3): 125-30.
30. **Magnino S**, Haag-Wackernagel D., Geigenfeind I., Helmecke S., Dovc A., Prunkner-Radovcic E., Residbegovic E., Ilieski V., Laroucau K., Donati M., Martinov S., Kaleta E. Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications. *Vet Microbiol* 2009; 135: 54-67.
31. **Messmer TO**, Skelton SK, Moroney JF, Daugharty H, Fields BS. Aplication of a nested multiplex PCR to psittacosis outbreaks. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (8): 2043-46.
32. **Messmer TO**, Tully TNJr., Ritchie BW, Moroney JF. A tale of discrimination: Differentiation of Chlamydiaceae by polymerase chain reaction. *Seminars in avian and exotic pet medicine* 2000; 9: 36-42.
33. **Morales JC**. Determinación de la presencia de *Chlamydophila psittaci* en aves de compañía, aves silvestres en cautiverio y su relación con la enfermedad en humanos (tesis de maestría). D.F. México: FMVZ-UNAM, 2006.
34. **National Association of State Public Health Veterinarians, Inc** [en línea] The Association c1953-2008. Compendium of Measures To Control *Chlamydophila psittaci* Infection Among Humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Clamidiosis),

- 2008; [about 4 screens]. Disponible desde: <http://www.nasphv.org/Documents/Psittacosis.pdf>
35. **OIE** [en línea] World organization of animal health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 2004; [about 3 screens]. Disponible desde http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_INDEX.HTM.
 36. **Parrots.org** [página en internet] World Parrot Trust Org [actualización 2008; accesado 2008 Mar 19] Disponible desde: <http://www.parrots.org>.
 37. **Ritchie** BW, Harrison GJ, Harrison LR, editores. Avian Medicine: Principles and Application. EUA: HBD International Inc, 1999.
 38. **Rojas** AM. Aislamiento de *Chlamydia psittaci* en aves de ornato mediante cultivo celular y la prueba de inmunofluorescencia indirecta (tesis de licenciatura). D.F. México: FMVZ-UNAM, 1996.
 39. **Rupley** AE, editor. Veterinary clinics of North America. Exotic animal practice. Avian pet medicine. EUA: Saunders, 2005.
 40. **Samour** J, editor. Avian medicine. China: Harcourt publishers, 2000.
 41. **San San** NG. Environmental enrichment for parrots in naturalistic settings. International zoo news 2002; 49/2 (315).
 42. **Sareyyupoglu** B, Cantekin Z, Bas B. *Chlamydophila psittaci* DNA detection in the faeces of cage birds. Zoonoses Public Health 2007; 54 (6-7):237-42.
 43. **Schenker** OA, Hoop RK. Chlamydiae and atherosclerosis: Can psittacine cases support the link? Avian Dis 2007; 51:8-13.
 44. **Sharples** E, Baines SJ. Prevalence of *Chlamydophila psittaci* -positive cloacal PCR tests in wild avian casualties in the UK. Vet Record 2009; 164: 16-17.
 45. **Smith** KM, Karesh WB, Majluf P, Paredes R, Zavalaga C, Hoogesteijn AR, Stetter M, Braselton WE, Puche H, Cook RA. Health evaluation of free-ranging Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in Peru. Avian Dis 2007; 52 (1):130-135.
 46. **Songer** JG, Post KW. The genera *Chlamydia* and *Chlamydophila*. In: Songer JG, Post KW, editores. Veterinary microbiology. Bacterial and fungal agents of animal disease. China: Elsevier saunders's, 2005: 332-338.
 47. **Tully** TN, Lawton MPC, Dorrestein GM. Avian Medicine. Inglaterra: Butterworth-Heinemann, 2000.

48. **Wu** CP, Horng YM, Wang RT, Yang KT, Huang MC. A novel sex-specific DNA marker in Columbidae birds. *Theriogenology* 2007; 67: 328-33.
49. **Ypelaar** I, Bassami MR, Wilcox GE, Raidal SR. A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus. *Vet Microbiol* 1999; 68: 141-48.