

HEPATITIS POR CORPÚSCULOS DE INCLUSIÓN. I. AISLAMIENTO DE UN VIRUS

JOSÉ LOTSY^{1,2}

M.V.Z., ALFONSO SOLÓRZANO y S.¹

M.V.Z., JESÚS GONZÁLEZ DEL ÁNGEL¹

DR. KAREL A. SCHAT^{2,3}

Resumen

Se aisló un virus a partir de una suspensión de hígados sospechosos de hepatitis por corpúsculos de inclusión. El virus HCI-6 tuvo algunas características del grupo adeno y fue capaz de reproducir la enfermedad en pollitos.

Introducción

Existe poca información respecto a las infecciones causadas por el grupo de adeno virus en pollos. Yates y Fry (1957), aislaron un virus de este grupo, que causó mortalidad al ser inoculado a embriones de pollo. Y que aparentemente se trató de un virus muy semejante, al que produjo Bronquitis en codornices cara blanca (*Colinus virginianus*) (Olson, 1950). Según Yates (comunicación personal), el aislamiento de adeno virus en el campo, no resulta muy difícil y aparentemente no siempre representa un problema patológico.

Hemboldt y Frazier (1963), informaron sobre una enfermedad caracterizada por una hepatitis necrótica y corpúsculos de inclusión del tipo A en los hepatocitos. A principios de la década de 1970, se informó en diferentes países del mundo la aparición de una nueva enfermedad en pollos, la cual fue notificada por diversos autores como: Howell, Mac Donald y Christian (1970) en Canadá; Young, Purcell y Kavanagh (1972) en Irlanda; Wells y Harrigan (1974) en Australia y Antillón y Lucio (1975) en México. Los diferentes au-

lores mencionados, informaron que la enfermedad se presenta tanto en pollos de reemplazo como en el pollo de engorda entre las 5 y 10 semanas de edad. Clínicamente la enfermedad se caracteriza por erizamiento de la pluma, tristeza y una mortalidad rápida en la parvada. A la necropsia se observan hemorragias en los músculos pectorales y en los muslos, el hígado se caracteriza por un cambio de coloración con hepatitis necrótica y hemorrágica. Microscópicamente se observa una anemia aplásica en la médula ósea y corpúsculos de inclusión en los hepatocitos, por lo que se le ha dado en llamar a esta enfermedad "hepatitis por corpúsculos de inclusión" (HCI), dichos cuerpos pueden ser eosinofílicos o basofílicos, esta diferencia puede tener relación con una de las fases de replicación viral (Maeda, Okaniwa y Kawamura, 1967). Los corpúsculos ocupan todo el núcleo o únicamente parte de él. También se pueden presentar lesiones en la Bolsa de Fabricio, en donde se observa una disminución de linfocitos.

Bickford, Krasovich y Fadly (1973), mediante estudios de microscopía electrónica, detectaron un virus en hígados afectados con características muy semejantes a los adeno virus. Fadly y Winterfieid (1974), aislaron un virus a partir de pollos con signos clínicos de HCI en embriones de pollos de 5 días de edad libres de patógenos específicos (SPF) inoculados por vía saco vitelino. Posteriormente Di-Franco *et al.* (1974) y Wells y Harrigan (1974) confirmaron que el agente causal era un virus adeno. Durante la mesa

Recibido para su publicación el 25 de abril de 1975.

¹ Depto. de Virología del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SAG. Apdo. Postal 42-652 México 10, DF.

² Estudiante del último año de la Fac. de Vet. de la Universidad de Utrecht, Holanda.

³ Investigador de los países bajos, Secretaría de Cooperación Técnica.

redonda de la XXIV Western Poultry Diseases Conference en Davis California (1975) los investigadores ahí reunidos llegaron a la conclusión que la HCI es causada por un adeno virus.

Material y métodos

Embriones de pollo. Se utilizaron embriones de pollo SPF, los cuales se inocularon entre los 5 y 8 días de incubación con 0.1 ml de suspensión de hígados de pollos afectados provenientes del Estado de Coahuila, los cuales fueron enviados para su estudio congelados o en solución de caldo triptosa fosfato. Los embriones fueron observados a través del ovoscopio diariamente, descartando los embriones que murieron 72 horas después de la inoculación, en cambio aquellos que murieron después de ese lapso o que eran sospechosos de muerte embrionaria, se extraían con el objeto de buscar lesiones macroscópicas y microscópicas, cosechando líquido alantoideo, saco vitelino e hígado. A todas las muestras colectadas se les practicaron pruebas bacteriológicas con la finalidad de descartar la presencia de contaminantes.

Cultivos celulares. Se prepararon cultivos celulares de riñones de embrión de pollo (CREP). a partir de embriones de 20 días de edad, siguiendo las técnicas usuales. Las células se sembraron en cajas de petri (Lux Corporation) de 60x15 mm en cantidades de 10^6 por ml y se incubaron a 39°C, con una atmósfera conteniendo 5% de CO₂. Los medios usados fueron los descritos por Schat y González (1971). A los 3 días de haber obtenido el monoestrato completo, éste se inoculó con el agente en estudio; para esto se quitó el medio de cultivo y se infectó con 0.2 ml, se incubó durante 30 min. a 39°C. Posteriormente se agregó el medio de mantenimiento.

Con objeto de investigar el tipo de ácido nucleico contenido en el agente viral aislado, se agregaron al medio de mantenimiento 50 microgramos por ml (250 microgramos por caja de petri) de desoxibromouridina (DBRU). Para constatar la ausencia de lipoproteínas del virus, se mezcló cloroformo y virus en partes iguales y se incubó durante 30 min. Posteriormente se separaron las dos sustan-

cias y se tituló el virus. Las titulaciones con la DBRU, cloroformo y testigos no tratados, se realizaron por medio de diluciones dobles, haciendo la lectura 5 días después de la inoculación.

Aves experimentales. Con la finalidad de reproducir la enfermedad se usaron pollitos SPF de 3 días de edad los cuales fueron inoculados por vía intraperitoneal con 0.2 ml y sacrificados 17 días posteriores a la inoculación.

Histopatología. Se colectaron muestras de hígados de pollos afectados los cuales se fijaron en formol al 10%, se incluyeron en parafina y se practicaron cortes con el micrótopo de parafina a 5 micras y se tiñeron con las técnicas usuales de eosina y hematoxilina.

Resultados

Los signos clínicos observados en las aves en donde apareció el brote de HCI y de las cuales se colectaron las muestras en estudio, se caracterizaron por presentar anorexia, anemia y diarrea, presentándose la muerte a las 48 horas. A la necropsia se observaron hemorragias y necrosis en los hígados así como también en los músculos pectorales, pericardio, duodeno y riñón. En los estudios de histopatología se observó que los núcleos de los hepatocitos contenían corpúsculos de inclusión de tipo basofílico que no ocupaban totalmente el núcleo y la cromatina se localizaba alrededor del mismo. Los estudios bacteriológicos fueron negativos.

Aislamiento del virus en huevos SPF.

En el Cuadro N° 1 se muestran los resultados obtenidos al inocular embriones SPF, de 5 días de edad por vía saco vitelino encontrando mortalidad embrionaria entre los 5 y 11 días posinoculación. En los embriones que murieron durante ese período se observaron hemorragias, enanismo y contracción (fotografía 1). Los hígados embrionarios presentaron hemorragias y focos de necrosis; en cambio en los embriones que se dejaron como controles negativos, no hubo ninguna alteración macroscópica visible.

CUADRO 1

Mortalidad embrionaria usando un inoculo de muestras sospechosas de hepatitis por corpúsculos de inclusión (HCI)

Número de pases en embriones de pollo	Número de embriones inoculados	MORTALIDAD EN DÍAS POSINOCULACION							Número de embriones ¹ muertos/Inoculados
		5	6	7	8	9	10	11	
1	10				1				1/2
2	5				1	1	1		3/4
3	4			1	1		2		3/4
3 ²	4		1		1	1	1		4/4
4	10	1				1	1	2	5/8

¹ Se excluyó la mortalidad inespecífica.

² Filtrado a través de filtro Millipore de .22 mieras.

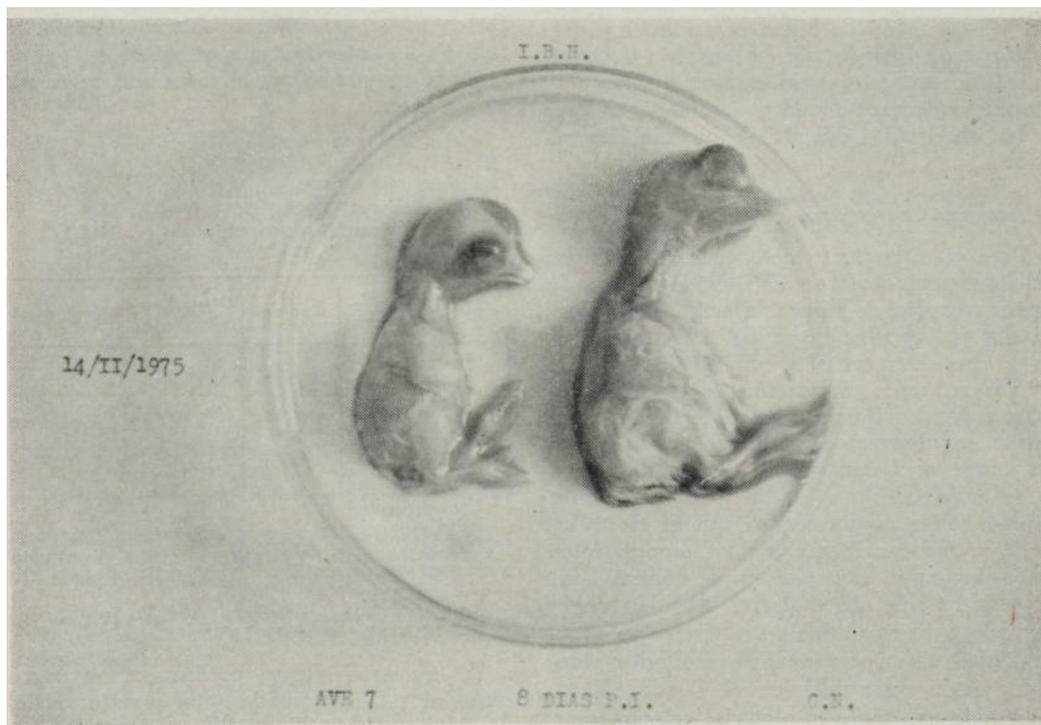


FOTO 1

Embrión con lesiones producidas por la cepa HCI-6 y control negativo. Nótese el enanismo y contracción del embrión.

CUADRO 2

Patogenicidad del virus del HCI-6 en su segundo pase en cultivos celulares a embriones de pollo de ocho días de edad

TIPO DE INOCULO	Número de embriones	MORTALIDAD EN DÍAS POSINOCULACION						Número de embriones ¹ muertos inoculados
		7	8	9	10	11	12	
Con células	5	1	1		1		1	4/4
Libres de células	5	1	1		2			4/4

¹ Se excluyó la mortalidad inespecífica.

En los estudios de histopatología de estos hígados se detectaron las siguientes lesiones: Infiltración de eritrocitos y leucocitos eosinófilos con destrucción de la estructura celular del hígado. Desde el segundo y tercer pase se observó la presencia de corpúsculos de inclusión de tipo eosinofílico que ocupaban completamente el núcleo.

El inóculo de células preparado a partir de la suspensión de hígados afectados y posteriormente filtrado por Millipore a 0.22 micras, fue patógeno para embriones de pollo, produciendo mortalidad y lesiones similares a las observadas cuando se inoculó con células.

Aislamiento en cultivos celulares.

Para el aislamiento del agente en cultivos celulares se inocularon CREP con 0.2 ml de una suspensión de hígados afectados. Al cuarto día posinoculación se detectaron lesiones en el monoestrato tales como: presencia de células redondas, formación de sincitios, células redondas flotando en el medio y finalmente se observaron áreas del monoestrato en donde se había perdido el contacto con la superficie de la caja. En total se hicieron 4 pases, observando siempre que el efecto citopático fue consistente. En los monoestratos utilizados como controles no se observó ninguna alteración. El material obtenido en el segundo pase se utilizó para probar su patogenicidad en embriones. Los resultados obtenidos están contenidos en el Cuadro N° 2, indicando que tanto el material celular como el material libre de células causó mortalidad en los embriones, produciendo las lesiones macroscópicas y microscópicas ya descritas.

Susceptibilidad del virus a DBRU y al cloroformo.

En el Cuadro N° 3 se presentan los resultados obtenidos al probar la susceptibilidad del virus a la DBRU y al cloroformo. En estos casos se encontró que la DBRU inhibe el crecimiento del virus, indicando que éste es un virus ADN. En las pruebas con cloroformo no se detectó una diferencia en el título de los lotes tratados y controles, por lo tanto se comprobó que el virus no tiene membrana externa.

CUADRO 3

Susceptibilidad del virus HCI-6 a la desoxibromo uridina (DBRU) y al cloroformo

NUMERO DE EXPERIMENTO	Control	Título final ² DBRU	Cloroformo ³
1	1/4000	1/500	NP ¹
2	1/4000	1/500	1/4000
3	1/4000	NP	1/4000

¹ No probado.

² Se utilizaron 50 mcrogramos por mililitro.

³ Se utilizó 50% de cloroformo y 50% de inoculo y se incubó durante 30'.

Reproducción de la enfermedad.

En un experimento preliminar, se logró reproducir la enfermedad con el virus aislado, al inocular pollos SPF a los 3 días de edad. A la necropsia de estas aves, se encontraron hígados con focos necróticos, hemorrágicos y palidez de la médula ósea. Las

lesiones histopatológicas observadas en el hígado fueron: Degeneración grasa, infiltración de eritrocitos y corpúsculos de inclusión de tipo basófilo en los núcleos de los hepatocitos.

Discusión

El virus aislado y denominado HCI-6, aparentemente tiene las características del agente causal de la HCI, ya que mediante las pruebas realizadas se encontró que el virus contiene ADN y no posee lípidos esenciales. Según el Dr. Bickford (comunicación personal), las lesiones encontradas en los embriones de pollo y cultivos celulares fueron similares a los que produce la cepa Tipton, aislada por Fadly y Winterfield (1973). En la actualidad se ha informado que existen 10 diferentes serotipos de virus Adeno en pollos (Calnek y Cowan,

1975), de los cuales sólo se encuentran cuatro que son patógenos. Desgraciadamente no fue posible determinar el serotipo de la cepa HCI-6. La prueba en pollitos SPF confirmó que el virus es capaz de reproducir ciertas lesiones características de esta enfermedad. Por lo expuesto se confirma el informe de Antillón y Lucio (1975), sobre la existencia de esta enfermedad en México.

Agradecimientos

Agradecemos al MVZ Francisco Trigo y al Pasante de Médico Veterinario Zootecnista Gilberto Ochoa de los Departamentos de Fisiopatología y Bacteriología, respectivamente, por los estudios de las muestras correspondientes. También agradecemos a los laboratorios Fort-Dodge-Nova, Salsbury y Serva la donación de huevos SPF.

Literatura citada

- ANTILLÓN, R.A. and B.M. LUCIO, 1975, Case Report: Inclusion body hepatitis in México, *Avian Dis.*, 19:195-197.
- BICKFORD, A.A., M.A. KRASOVICH and A.M. FADLY, 1973, Demonstration of virus particles in hepatic cells of chickens with inclusion body hepatitis, *Avian Dis.*, 17:629-638.
- CALNEK, B.W. and B.S. COWAN, 1975, Adenoviruses of chickens. Serological groups, *Avian Dis.*, 19: 91-103.
- DI FRANCO, E., G. LUSSIER, L. BERTHIAUME, S. CLUTIER ET P. MAROIS, 1974, Hepatite a corps d'inclusion chez poulet de grill isolement d'un agent viral, *Can. Vet. J.*, 15:144-147.
- FADLY, A.M. and R.W. WINTERFIELD, 1973, Isolation and some characteristics of an agent associated with inclusion body hepatitis, hemorrhages and aplastic anemia in chickens, *Avian Dis.*, 7:182-193.
- HEMBOLDT, C.F. and M.N. FRAZIER, 1963, Avian hepatic inclusion bodies of unknown significance, *Avian Dis.*, 7:446-450.
- HOWELL, J., D.W. MAC DONALD and R.G. CHRISTIAN, 1970, Inclusion body hepatitis in chickens, *Can. Vet. J.*, 11:99-101.
- MAEDA, M., OKANIWA and H. KAWAMURA, 1967, Morphological studies on intranuclear inclusion bodies in chicken kidney cell culture infected with avian adeno virus, *Nat. Inst. Hlth. Quart.*, 7: 164-177.
- OLSON, N.O., 1950, A respiratory disease (bronchitis) of quail caused by a virus, *Proc. 54th Ann. Meet. US. Livestock. Sanit. pp.* 171-174.
- SCHAT, K.A. and J. GONZÁLEZ DEL A., 1971, Informe preliminar de la presencia de anticuerpos precipitantes y aislamiento del virus herpes de la enfermedad de Marek en México, *Téc. Pec. Méx.* 19:37-40.
- WELLS, R.J.H. and K. HARRIGAN, 1974, A fatal adeno virus infection of broiler chickens: Inclusion body hepatitis, *Vet. Res.*, 94:481-482.
- YATES, VJ. and D.E. FRY, 1957, Observations on a chicken embryo lethal orphan (CELO) virus, *Am. J. Vet. Res.*, 17:657-660.
- YOUNG, J.A., D.A. PURCELL and P.J. KAVANASH, 1972, Inclusion body hepatitis outbreak in broiler flocks, *Vet. Res.*, 90:72.