

Un Estudio sobre el Virus del Síndrome de Hidropericardio en Pollo

Cardoso Simone¹, Tabosa Carvalho², Setúbal Machado³

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Valladolid, Spain

²Facultad de Ciencias Clínicas, Universitat d'Alacant, Spain

³Facultad de Biología, Universidad de Extremadura, Spain

Resumen: Los adenovirus de las aves causan muchas afecciones como hepatitis del cuerpo de inclusión, enfermedad respiratoria del síndrome de hidropericardio, tenosinovitis, retraso del crecimiento, reducción de la producción de huevos, anemia aplásica, atrofia de la bursa y la enteritis del timo y conjuntivitis en aves y otras aves. Los once serotipos de FAdV se han aislado de infecciones naturales de aves de corral y otras aves y las cepas de FAdV4 causan el síndrome de hidropericardio en el pollo.

Palabras clave: Pollo, Síndrome de Hidropericardio, Adenovirus, ELISA.

1. Introducción

Los adenovirus de las aves (FAdV) causan muchas enfermedades como hepatitis del cuerpo de inclusión (IBH), enfermedad respiratoria del síndrome de hidropericardio (HPS), tenosinovitis, retraso del crecimiento, producción reducida de huevos, anemia aplásica, atrofia de la bursa y enteritis del timo y conjuntivitis en aves y otras aves. Los once serotipos de FAdV se han aislado de infecciones naturales de aves de corral y otras aves y las cepas de FAdV4 causan el síndrome de hidropericardio en pollo[1].

El síndrome de hidropericardio, una enfermedad principalmente de aves de engorde, ha sido un grave peligro para la industria avícola desde que se diagnosticó en 1987. Durante los brotes de campo, casi todos los pollos susceptibles expuestos pueden verse afectados y la mortalidad puede variar del 20% al 80%. La acumulación de líquido gelatinoso color paja / ámbar en el saco pericárdico caracteriza principalmente la enfermedad. Otras lesiones predominantes incluyen hígado agrandado y descolorido con focos de hemorragia y / o necrosis y riñones agrandados con túbulos distendidos[2]. Los estudios histológicos, microscópicos electrónicos y serológicos han demostrado que el agente causal es un serotipo 4 de adenovirus de aves. En este informe, presentamos los resultados de un estudio sobre aspectos de la patogénesis de HPS después de la administración oral e intramuscular de un aislado de campo (HPS-R) a pollos de 3 semanas de edad. Utilizamos la técnica de inmunofluorescencia indirecta para detectar antígenos virales en una variedad de tejidos y ELISA para estudiar la respuesta inmune humoral durante el curso de la infección[3].

2. Material y métodos

En el presente estudio se utilizó un aislado del virus HPS recuperado de un brote natural y propagado en células de hígado de embrión de pollo (CEL) y caracterizado serológicamente.

Pollos de engorde de un día fueron adquiridos de un criadero comercial en Haldwani, Uttarakhand. Los polluelos fueron criados en cama profunda en una unidad de aislamiento hasta las 3 semanas de edad y luego transferidos a jaulas de baterías antes de la inoculación. Los pollitos de control no inoculados y los pollitos infectados se mantuvieron en una unidad de aislamiento separada[4].

El suero hiperinmune se produjo contra el virus de referencia mediante la inoculación subcutánea de pollos de 3 semanas de edad con extracto de homogeneizado de hígado al 20% (p / v) como se describió anteriormente para su uso en el presente estudio. Las gammaglobulinas del suero hiperinmune se purificaron e incubaron con un volumen igual de una suspensión de células de hígado de pollo sanas al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente[5].

Las secciones de sangre periférica y tejido fueron recolectadas y preparadas según lo descrito por Fasina y Fabricant. El procedimiento de tinción y el sistema de puntuación se siguieron según lo descrito por los trabajadores anteriores. En todos los casos, solo la fluorescencia intranuclear relativamente homogénea se consideró positiva. En ocasiones, se pudo observar material particulado fluorescente en el citoplasma de las células de las aves infectadas y de control, lo que se consideró un artefacto no específico[6-8].

Se hicieron dos grupos de 10 y un grupo de control de 05 polluelos de 25 aves de tres semanas de edad. Todos los pollitos fueron probados para detectar la presencia de anticuerpos contra el HPSV antes del comienzo del

experimento. Los pollos en el grupo I se inocularon por vía oral con sobrenadante de cultivo celular CEL (virus del décimo pase con un título de \log_{10} 6.2 TCID₅₀ / ml) a 0,75 ml / polluelo por vía oral. Los pollos en el Grupo II se inocularon con la misma preparación de virus por vía intramuscular (i.m.). Los pollitos del grupo III se mantuvieron como control sin inocular[9].

Todos los grupos se criaron por separado bajo un sistema de camada profunda durante todo el curso del experimento. Se recolectaron diferentes órganos, a saber, hígado, riñón, corazón, bazo, pulmón, bolsa, intestino y ciego sacrificando dos polluelos cada uno del grupo I y II y uno del grupo III los días 1, 2, 3, 5 y 10 días después de la inoculación. Todos los órganos se mantuvieron a -800° C hasta que se procesaron para la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT). Antes de la necropsia, se hicieron frotis de sangre de cada pollo para la detección de antígenos virales. También se recogió sangre cada día para la determinación de los títulos de anticuerpos en suero mediante ELISA según el método de Kumar[10-12].

3.Resultados

No hubo signos clínicos aparentes en los pollitos durante el período experimental. Sin embargo, el examen post mortem indicó que el hígado estaba agrandado y de color rojo oscuro y mostraba focos necróticos desde el segundo día posterior a la infección (DPI) en adelante, mientras que los riñones estaban pálidos y hemorrágicos y los cambios eran visibles desde el tercer DPI[13]. Se observó congestión del corazón en los días 2, 3 y 5 DPI y se pudieron aspirar aproximadamente 2,0 ml de líquido del saco pericárdico en los días 2 y 5 PI. La ampliación de la bolsa de Fabricius y el bazo y la congestión de los pulmones se observaron hasta 10° DPI. El bazo también mostró focos necróticos en los días 5 y 10 PI, sin embargo, el intestino y el ciego no mostraron ningún cambio apreciable en ningún día PI. En el día 10 PI, se registraron focos hemorrágicos en los músculos del seno en aves infectadas a las 13:00 h. ruta. Además, las adherencias en el corazón también fueron evidentes[14].

No se detectaron antígenos virales en frotis de sangre de polluelos inoculados por vía oral, sin embargo, los antígenos virales se detectaron extracelularmente de pollos inoculados vía i.m. ruta en menor cantidad en el día 1 PI. En el día 2 y el día 3 PI, los frotis de sangre preparados a partir de los pollitos infectados a través de ambas rutas revelaron la presencia intracelular y extracelular de antígenos virales. Sin embargo, en comparación con el día 2PI, la cantidad de antígeno parecía ser menor en el día 3 PI. El día 5 y 10, los antígenos virales PI se detectaron solo extracelularmente en frotis de sangre preparados a partir de pollitos infectados por ambas vías. Las tablas 1 y 2 muestran los resultados detallados de los estudios sobre la localización del antígeno viral HPS en tejidos de pollos infectados con ambas rutas.

De los dos pollos sacrificados en un día PI, IFAT no pudo demostrar los antígenos virales en los tejidos, excepto ciego e intestino de aves infectadas por vía oral. El día 2 PI, el hígado, riñón, bazo, intestino, ciego y bolsa de Fabricius mostraron la presencia de antígenos virales. Las observaciones fueron similares para ambas rutas de inoculación pero, en el hígado y el riñón, la participación del tejido fue mayor en pollos infectados por vía intramuscular en comparación con la vía oral. Los tejidos en otros órganos mostraron cambios más o menos similares, sin embargo, el pulmón y el corazón no mostraron la presencia de antígenos virales. En el día 3 PI, solo el hígado, el riñón, la bolsa de Fabricius y el bazo revelaron la presencia de antígenos virales. La cantidad de antígeno, según lo indicado por un menor número de focos fluorescentes, fue menor en comparación con el día 2 PI. La implicación del tejido fue bastante similar en ambos polluelos infectados a través de ambas rutas. No se detectaron antígenos virales en corazón, intestino, ciego y pulmones. En el día 5PI, se detectaron antígenos virales en la bolsa de Fabricius, riñón y bazo y no se detectaron en hígado, pulmón, ciego e intestino. La participación del tejido fue mayor en el tejido renal de las aves infectadas por vía oral en comparación con la vía intramuscular. En el día 10 PI, se detectaron antígenos virales en el bazo y el ciego del riñón y no se detectaron en el hígado, el corazón, los pulmones, la bolsa de Fabricius y el intestino de los pollitos infectados por i.m. ruta, mientras que los antígenos virales se detectaron solo en el bazo de los pollitos infectados por vía oral.

Antes de la administración del virus, el suero de todas las aves resultó negativo para anticuerpos contra HPSV. En los pollitos inoculados por vía oral, los títulos de anticuerpos a 1, 2, 3, 5 y 10 días PI fueron 26.02, 28.96, 36.04 55.84 y 23.29, respectivamente. Títulos de ELISA registrados en pollitos infectados vía i.m. ruta a 1, 3, 5 y 10 días PI fueron 1,48, 19,45, 155,47 y 299,04, respectivamente.

Las lesiones post mortem predominantes, según lo descrito por varios investigadores, también se observaron en el presente estudio. Sin embargo, la dilatación del ventrículo derecho observada en el síndrome de ascitis no se observó en la presente investigación y no se detectaron antígenos virales en el tejido cardíaco. Por lo tanto, parece lógico que la causa del hidropericardio en el SPH sea diferente de la de la ascitis. En general, en animales

que no sean pollos, la enfermedad crónica induce hidropericardio. Sin embargo, en el síndrome de hidropericardio, el período para formar hidropericardio es muy corto. Por lo tanto, parece que la hidremia aguda e hipoproteinemia resultante pueden causar hidropericardio en pollos. El hidropericardio también puede ser causado por un derrame masivo inmediato de líquido a través de capilares del epicardio hacia el saco pericárdico. El hidropericardio en sí mismo puede deprimir la función cardíaca, lo que puede amortiguar los ruidos cardíacos y, si es grave, produce un defecto de llenado y baja presión.

En el presente estudio se intentó estudiar la patogénesis del virus del síndrome de hidropericardio en pollos de engorde de 3 semanas de edad por IFAT. Dos rutas diferentes de inoculación, a saber, oral e i.m. se usaron para infectar a los pollitos con virus de cultivo celular de hígado de embrión de pollo (CEL). IFAT de frotis de sangre sugirió que el virus estaba presente principalmente en forma extracelular en el plasma sanguíneo, sin embargo, las células sanguíneas probablemente revelaron fluorescencia intracelular, lo que sugiere que había una cierta cantidad de virus dentro de estas células. Saiffudin y Wilks informaron que los antígenos virales se detectaron solo en la fracción plasmática de la sangre de pollos de engorde infectados experimentalmente con el virus de la hepatitis del cuerpo de inclusión (IBH). Se presume que ese virus que se replica en el tracto intestinal llegó al torrente sanguíneo a través del drenaje de los conductos linfáticos y torácicos. Los pollos no tienen ganglios linfáticos discretos como los mamíferos; existe una distribución irregular de un tejido linfático rico, acumulativo y difuso (análogo a los parches de Peyer) a lo largo del tracto alimentario desde la faringe hasta la cloaca. Esto se suma a los tejidos linfoides asociados al intestino más concentrados que se producen en las amígdalas cecales y la bolsa de Fabricius. El pollo también tiene un sistema de vasos linfáticos que recolectan líquido de los tejidos y lo pasan primero a un par de conductos torácicos y luego a la vena cava superior. Pequeñas partículas, como los adenovirus, pueden ser absorbidas de la luz intestinal por las células absorbentes que utilizan un aparato tubular-vacuolar. Este proceso es independiente de la infección y replicación de virus dentro de la célula. Este proceso puede haber contribuido a la aparición temprana de viremia en estas aves.

En el día 1 PI, el virus se detectó solo en dos tejidos (intestino y ciego) de pollos infectados por vía oral. Luego, en el día 2PI, se extendió al hígado, riñón, intestino, bolsa de Fabricius, bazo y ciego. La gravedad de la infección fue mayor en el hígado y el riñón de i.m. que los pollos infectados por vía oral. En el día 3 PI, los antígenos virales se detectaron solo en el hígado, riñón, bolsa de Fabricius y bazo. Además del hígado y los riñones, los órganos linfoides, es decir, el bazo, el timo y la bolsa de Fabricius y las amígdalas cecales, son otros órganos de predilección por el virus del síndrome de hidropericardio y el virus de los órganos linfoides fue capaz de causar enfermedades cuando se inoculó en pollos sanos. Esta predilección del virus también explica su efecto inmunosupresor.

4. Conclusión

Solo el riñón y la bolsa de Fabricius mostraron la presencia de antígenos virales en el día 5 PI, mientras que en el día 10 PI, solo el riñón, el bazo y el ciego de los pollitos infectados a través de i.m. La ruta exhibió la presencia de antígenos virales, mientras que los antígenos virales solo pudieron detectarse en el bazo de los pollitos infectados por vía oral. Estos hallazgos corroboran la suposición de que los órganos linfoides son sitios de predilección por el virus HPS y también sugieren que probablemente los riñones permanezcan infectados durante un período más prolongado que el hígado. Los resultados del presente estudio también sugieren que para establecer la infección en pollitos experimentales, i.m. La ruta es superior a la ruta oral. Los adenovirus son resistentes a los ácidos; por lo tanto, son capaces de sobrevivir al paso a través del estómago e infectar el epitelio intestinal. Kohn también informó que el tracto alimentario en lugar del tracto respiratorio es el sitio principal de replicación del aviadenovirus (AAV). Saiffudin y Wilks estudiaron la patogénesis de la hepatitis del cuerpo de inclusión por ELISA e inmunohistoquímica. Se detectaron antígenos virales de 12 h a 13 días PI y en el plasma sanguíneo por 24 h PI. Los antígenos se detectaron por primera vez en el hígado desde el día 2 y alcanzaron niveles máximos en el día 6 PI. Inicialmente, los antígenos virales en el hígado se restringieron a las células que recubren los sinusoides, pero con el tiempo se produjo una mayor participación de los hepatocitos. Se detectaron pequeñas cantidades de antígeno viral en otros tejidos. Cook demostró la distribución de AAV en diferentes tejidos, incluida la sangre, pero no demostró cuándo se infectó un órgano en particular. Kawamura y col también demostraron viremia a 4^o DPI y diseminación del virus en el cuerpo después de la infección por AAV – 1 (cepa Ote).

Es evidente a partir de nuestros hallazgos que la mayoría de los órganos se infectaron entre los días 3 y 5 PI y la puntuación media de la concentración de antígeno también fue alta durante el período. Cook también informó que el período de incubación de IBH fue de 3 a 8 días. Durante este período, el virus se propaga y se multiplica rápidamente a los órganos objetivo, incluidos el intestino y el hígado, y produce una enfermedad clínica. El título de anticuerpos y la gravedad de la infección tienen una relación inversa a medida que el título de

anticuerpos aumenta la gravedad de la infección, disminuye y un menor número de órganos revela la presencia de antígenos HPSV. También se puede concluir de nuestros hallazgos que i.m. La ruta es mejor que la ruta oral para la producción de suero hiperinmune contra el virus HPS. Saiffudin y Wilks informaron que los anticuerpos VN en aves infectadas experimentalmente con el virus de la hepatitis del cuerpo de inclusión (IBH) se detectaron por primera vez en la sangre a los 7 días y aumentaron a títulos altos (título medio 448) en 13° DPI cuando los antígenos virales eran indetectables en la mayoría órganos. Muestra una relación directa entre la aparición de anticuerpos y la recuperación de la infección con el virus HPS.

Referencias

- [1] Arango, L.J.T., Avendaño, P.A.S., Valderrama, A.I.C., Martínez, B.A.C., Ciro, S.A.Y., Giraldo, C.A.M., Sanin, Y.Y.L. (2012) "Didactic model of the chicken embryo development using modified Dawson's diaphanization and staining technique", *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(4), pp. 620-624.
- [2] Vásquez Vélez, I.C., Vásquez, A.H. (2012) "Pulmonary hypertension, time of exposure to hypobaric hypoxia, pulmonary / body weights ratio in broiler chickens, under temperature controlled conditions", *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(1), pp. 81-89.
- [3] Miguel, J.A., Escoda, L., Cubilo, M.D., Tor, M., Asenjo, B., Ciria, J., Francesch, A. (2011) "Effect of slaughter age in growth and carcass characteristics in chickens of Castellana Negra improved breed and crossbreed with Penedesenca Negra improved breed", *ITEA Informacion Tecnica Economica Agraria*, 107(3), pp. 226-238.
- [4] Schnettler, B., Miranda, H., Sepúlveda, J., Denegri, M., Sepúlveda, N. (2011) "Importance of origin in the purchase of chicken meat in Central-Southern Chile", *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, 21(4), pp. 317-326.
- [5] Liliana Betancourt, L., Claudia Ariza, N., Gonzalo Díaz, G., Germán Afanador, T. (2012) "Effect of different levels of essential oils of *Lippia origanoides* kunth in broiler chicken", *Revista MVZ Cordoba*, 17(2), pp. 3033-3040.
- [6] Betancourt, L.L., Ariza, C.J., Afanador, G. (2012) "Effects of supplementation with oregano essential oil on ileal digestibility, intestinal histomorphology, and performance of broiler chickens", *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(2), pp. 240-251.
- [7] Bautista, Y., Narciso, C., Pro, A., Hernández, A.S., Becerril, C.M., Sosa, E., Velasco, J. (2016) "Effect of heat stress and holding time ante-mortem on the physicochemical and quality characteristics of chicken meat", *Archivos de Medicina Veterinaria*, 48(1), pp. 89-97.
- [8] Valenzuela, C., Carvallo, F., Morales, M.S., Reyes, P. (2015) "The effects of using dried salmon silage in broiler chicken diets on productive performance and meat sensory quality", *Archivos de Medicina Veterinaria*, 47(1), pp. 53-59.
- [9] Milagro León, T., Gerardo Garrido, G., María Castañeda, D., de Emma Rueda, A. (2014) "Early feeding to modify digestive enzyme activity in broiler chickens", *Revista MVZ Cordoba*, 19(3), pp. 4316-4327.
- [10] Duarte, C.R.A., Bratti, F.C., Murakami, A.E., Fernandes, J.I.M., Ospina-Rojas, I.C., Furlan, A.C. (2014) "Effects of vitamin K3 supplementation on growth performance and bone quality of broiler chickens", *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(2), pp. 305-313.
- [11] Perez-Arevalo, M.L., Soto-Bracho, J., Ascanio, E., Arrieta-Mendoza, D. (2012) "Injuries in chickens new born produced by aflatoxin B1 transmitted ovarian route", *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, 22 (3), pp. 217-224.
- [12] Rojasu, M.T., Vera, C.V., Rosas, P.F., Romero, A.H.P., Vargas, E.S., Gonzalez, J.M.T. (2012) "Sero prevalence of mycoplasma gallisepticum and mycoplasma synoviae in cockfighting chickens from central Mexico highlands", *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, 22(2), pp. 135-138.
- [13] Rojas, M.T., Rodríguez, N.E.R., Bernabé, S.L., Rosas, P.F., Erasto, V.M., Vargas, E.E.S. (2011) "Genetic diversity of salmonella typhimurium (Group B) isolates from chicken livers intended for human consumption", *Tecnica Pecuaria en Mexico*, 2(4), pp. 371-380.
- [14] Meimandipour, A., Soleimanifarjam, A., Azhar, K., Hair-Bejo, M., Shuhaimi, M., Nateghi, L., Abd Manap, M.Y. (2011) "Age effects on short chain fatty acids concentrations and pH values in the gastrointestinal tract of broiler chickens", *Archiv fur Geflugelkunde*, 75(3), pp. 164-168.

A Study on Hydropericardium Syndrome Virus in Chicken

Abstract: Fowl adenoviruses cause many disease conditions like inclusion body hepatitis, hydropericardium syndrome respiratory disease, tenosynovitis, impaired growth, reduced egg production, aplastic anemia, atrophy of bursa and thymus enteritis and conjunctivitis in poultry and other birds. All eleven serotypes of FAdV have been isolated from natural infections of poultry and other birds and strains of FAdV4 cause hydropericardium syndrome in chicken.

Keywords: Chicken, Hydropericardium Syndrome, Adenoviruses, ELISA