

COM-04

Microscopía electrónica como herramienta diagnóstica de poxvirus en gallinas ponedoras

E. MONTERO CORTIJO^{1*}, A. BARRAGÁN HERNÁNDEZ¹, M. SORIANO NAVARRO³, C. GARCÍA BOVER² y P. CATALÁ GREGORI²

¹Dpto. PASAPTA - Patología y Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad CEU Cardenal Herrera. Av. Seminario s/n. 46113 Moncada, Valencia; ²CECAV: Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana. C/ Nules 16, Alquerías del Niño Perdido, 12539 Castellón; ³CIPF: Centro de Investigación Príncipe Felipe C/ Eduardo Primo Yúfera 3, 46012 Valencia.

*e-mail: moncorest@alumnos.uchceu.es

Una de las patologías en el sector avícola es la viruela aviar, causada por un poxvirus del género Avipoxvirus, afectando a aves domésticas y a más de 60 especies silvestres. La importancia de esta enfermedad reside en la bajada de la producción de huevo y en un retraso en el crecimiento del pollito, por lo que provoca a la larga una disminución en la producción y pérdidas económicas. La infección sucede por contacto directo del virus con heridas cutáneas donde los artrópodos son los vectores más comunes. El poxvirus tiene dos presentaciones, la forma cutánea y la forma húmeda o diftérica, siendo esta última la que tiene mayor tasa de mortalidad. En el presente trabajo se examinaron las cabezas de 6 gallinas sospechosas de padecer la enfermedad, de 58 semanas de vida, de las cuales se tomaron muestras y se fijaron en formol al 4%. Posteriormente se hizo un estudio histopatológico con microscopio óptico de las lesiones de piel después de una tinción básica de hematoxilina – eosina. Paralelamente, se procesaron algunas de estas muestras, realizando una inclusión en resina epoxi y unos cortes ultrafinos para su estudio mediante microscopía electrónica de transmisión. En este caso, uno de los principales diagnósticos diferenciales era una infección por Poxvirus, sin embargo, el estudio histopatológico no fue concluyente, por lo que se recurrió a la microscopía electrónica como método diagnóstico definitivo. En el estudio con microscopio electrónico, se observó la presencia de vesículas ovaladas de un tamaño de 250 a 450 nm, rodeadas de una membrana. En su interior se identificó un núcleo bicóncavo denso flanqueado por dos cuerpos laterales, típico hallazgo de Poxvirus. Como conclusión, la microscopía electrónica se mostró como una herramienta para el diagnóstico y un método que complementa las técnicas tradicionales y básicas, además a un coste similar al de la histopatología tradicional.

One of the diseases in the poultry sector is fowl pox, caused by a poxvirus Avipoxvirus gender, affecting domestic birds and 60 wild species. The importance of this disease resides in the decrease in egg production and delayed the growth of the chick, so that ultimately causes a decrease in the production and economic loss. Infection occurs through direct contact with skin wounds virus where arthropods are the most common vectors. The poxvirus has two presentations, the cutaneous form and wet form or diphtheria, the latter which is still higher mortality rate. In this work the heads of six chickens suspected of having the disease, 58 weeks

old, from which samples were taken and fixed in 4% formaldehyde were examined. Eosin - then histopathology with optical microscope of skin lesions after basic hematoxylin it was made. Simultaneously, some of these samples processed, including performing an epoxy resin and an ultrathin sections for examination by transmission electron microscopy. In this case, one of the main differential diagnosis was poxvirus infection, however, histopathology was inconclusive, so was used as the electron microscopy definitive diagnosis method. In the electron microscope study, the presence of vesicles oval size 250 to 450 nm surrounded by a membrane was observed. Inside a thick biconcave core flanked by two lateral bodies, typical finding of Poxvirus he identified. In conclusion, electron microscopy showed as a diagnostic tool and method which could be combined with traditional basic techniques. In addition cost of it is similar as traditional histopathology.

Palabras clave: Poxvirus; ponedoras; microscopía electrónica

Keywords: poxvirus; laying; electron microscopy

Introducción

La viruela aviar es una enfermedad infecciosa común en aves (Cox, 1998; Smits et al., 2005), que se repite anualmente de forma epidémica en numerosos países (Kligler et al., 2001), afectando a las aves domésticas y a más de 60 especies silvestres de alrededor 20 familias (Thipathy et al., 1999; Uzcategui et al., 2007; U.S. Government et al., 2013). Su incidencia es variable dependiendo de las diferencias climáticas, de administración, higiene y vacunación (Thipathy et al., 1999; OIE, 2004; Uzcategui, 2007). Como regla general la patología no es grave y no zoonótica (Uzcategui et al., 2007; Skinner, 2008; U.S. Government et al., 2013), sin embargo, provoca una depresión en la actividad de la puesta de huevos de aves infectadas, que conduce a una gran pérdida económica (Cox, 1998; Price et al., 1999; Kligler et al., 2001), además de una disminución en el crecimiento y en el peso del animal (Moyle et al., 2014).

El poxvirus es un virus DNA grande y complejo (Weli et al., 2011) que forma parte del género Avipoxvirus de la familia *Poxviridae* (Thipathy et al., 1999; Skinner, 2008; U.S. Government et al., 2013) de distribución mundial. La infección sucede por contacto directo del virus con heridas cutáneas donde los artrópodos son los vectores más comunes, como por ejemplo los mosquitos del género *Culex* y *Aedes* (Uzcategui et al., 2007). Es un virus resistente a factores ambientales, pero requiere de erosiones en la piel, ya que si no, es incapaz de penetrar en la epidermis (Vargas et al., 2011). Es una transmisión lineal, ya que los mosquitos se alimentan de un ave infectada que tiene el virus circulando en sangre, o cuando un mosquito se alimenta de las secreciones de erosiones o heridas cargadas de virus, y luego se alimenta de otra ave susceptible a la cepa del virus (U.S. Government et al., 2013). También se pueden infectar de aerosoles generados de aves infectadas, o de la ingestión de agua o comida contaminada (Vargas et al., 2011).

La viruela aviar tiene dos presentaciones, la forma seca o cutánea y la forma húmeda o diftérica, siendo esta última la que tiene mayor tasa de mortalidad y morbilidad (U.S. Government et al., 2013). La forma seca o cutánea produce vesículas en zonas de la piel desprovistas de plumas, estas lesiones empiezan como pequeñas ampollas que progresan a nódulos y finalmente a costras secas, y la forma húmeda produce lesiones en la mucosa de las vías respiratorias y digestivas superiores donde aparecen nódulos de color blanquecino, estos crecimientos pueden llegar a ser lo suficientemente graves como para interferir en comer, beber o incluso respirar. En estos casos, las infecciones bacterianas

secundarias son comunes contribuyendo a la mortalidad (Weli et al., 2011; U.S. Government et al., 2013; Moyle et al., 2014;). En algunos casos, el animal puede desarrollar ambas presentaciones. (Minbay et al., 1990; Price et al., 1999).

Las técnicas de diagnóstico disponibles son la microscopia óptica, las técnicas de análisis de DNA (PCR), las pruebas serológicas, las pruebas de inmunodetección, el aislamiento del virus y la microscopia electrónica (OIE, 2008).

Material y métodos

En el presente trabajo se examinaron las cabezas de 6 gallinas sospechosas de padecer la enfermedad, de 58 semanas de vida, de las cuales se tomaron muestras y se fijaron en formol al 4%. Posteriormente se hizo un estudio histopatológico con microscopio óptico de las lesiones de piel después de una tinción básica de hematoxilina – eosina, y se llevó a cabo el análisis mediante microscopia electrónica. Aunque el protocolo rutinario para la fijación de muestras para microscopía electrónica incluye la fijación durante 24 h mediante la adición de 2% de glutaraldehído y 2% de paraformaldehído en tampón fosfato al 0,1 M, en este caso se analizaron las muestras fijadas en formol al 4%. Las muestras se post-fijaron con 2% de osmio, se aclararon y se deshidrataron. Posteriormente se incluyeron en resina Durcupan (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Las muestras se cortaron con un Ultracut UC-6 (Leica, Heidelberg, Alemania) en secciones semifinas (1,5 μm) y posteriormente se tiñeron con 1% de azul de toluidina. Los cortes seleccionados semifinos fueron pegados en el portaobjetos con Super Glue-3, Loctite (Henkel, Düsseldorf, Alemania) y fueron sometidos a congelación y descongelación en nitrógeno líquido. Las secciones ultrafinas (0,07-0,09 μm) se tiñeron con citrato de plomo. Por último, las microfotografías se obtuvieron con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 Spirit (FEI Europe, Eindhoven, Netherlands) usando una cámara digital (Olympus Soft Image Solutions GmbH, Münster, Germany).

Resultados y discusión

Los hallazgos macroscópicos más representativos de las 6 gallinas examinadas fueron: costras en zonas desprovistas de plumas (pico, cresta, en la zona palpebral de los ojos y carúncula), con un tamaño entre 1-2 mm de diámetro, de distribución multifocal. Algunas costras aparecían de forma coalescente, sobretodo en la zona palpebral (Figura 1).

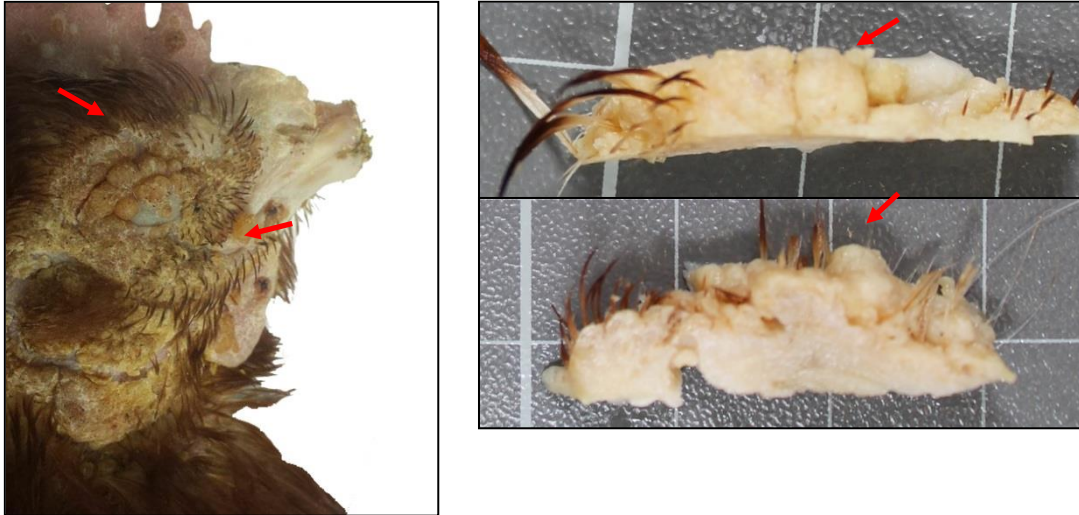


Figura 1. Fotografías de las costras. De izquierda a derecha y de arriba a abajo: Costras en diferentes localizaciones en zonas desprovistas de plumas, corte transversal de las costras en vista dorsal y corte transversal de las costras en vista lateral.

Microscópicamente se observó la presencia de hiperplasia e hipertrofia (Cox, 1998; Vargas et al., 2011) de moderada a severa de los queratinocitos, los cuales presentaban degeneración baloniforme (Figura 2). Estas lesiones se suelen asociar a infecciones por Poxvirus (Graham, 1996), aunque en estos casos no se observó ningún cuerpo de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos (cuerpos de Bollinger), hallazgo patognomónico de ese tipo de infecciones (Vargas et al., 2011; Weli et al., 2011).

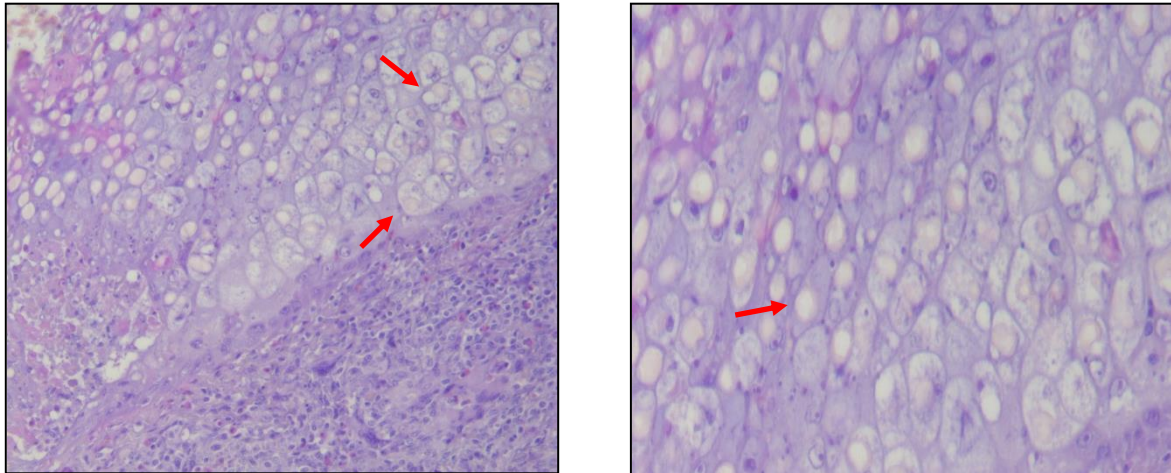


Figura 2. Fotografías histológicas. De izquierda a derecha: hiperplasia e hipertrofia de las células epiteliales, a más aumentos se observa la presencia de hinchazón celular multifocal o degeneración baloniforme (tinción hematoxilina-eosina, HE)

Otro hallazgo que se observó fue una foliculitis heterofílica multifocal y dermatitis heterofílica multifocal. En el interior de algunos folículos se observó la presencia de restos necróticos de plumas con presencia de colonias bacterianas en el interior y la presencia de macrófagos formando granulomas a nivel de la dermis (Figura 3). Estos hallazgos se pueden asociar a infecciones por *Staphylococcus aureus* o *Pasteurella sp.*

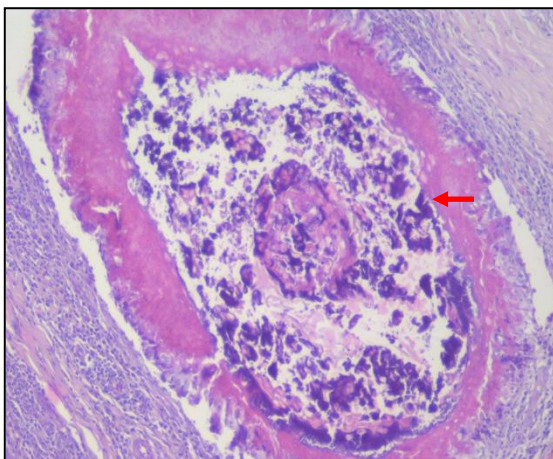


Figura 3. Fotografía histológica: colonias bacterianas y presencia de macrófagos (HE).

En este caso, uno de los principales diagnósticos diferenciales era una infección por Poxvirus, sin embargo, el estudio histopatológico no fue concluyente, por lo que se recurrió a la microscopía electrónica como método diagnóstico definitivo. En el estudio con microscopio electrónico, se observó la presencia de vesículas ovaladas de un tamaño de 250 a 450 nm, rodeadas de una membrana. En su

interior se identificó un núcleo bicóncavo denso flanqueado por dos cuerpos laterales (Figura 4), típico hallazgo de Poxvirus (Graham, 1996; Cox, 1998; Randall et al., 2004; Weli et al., 2011).

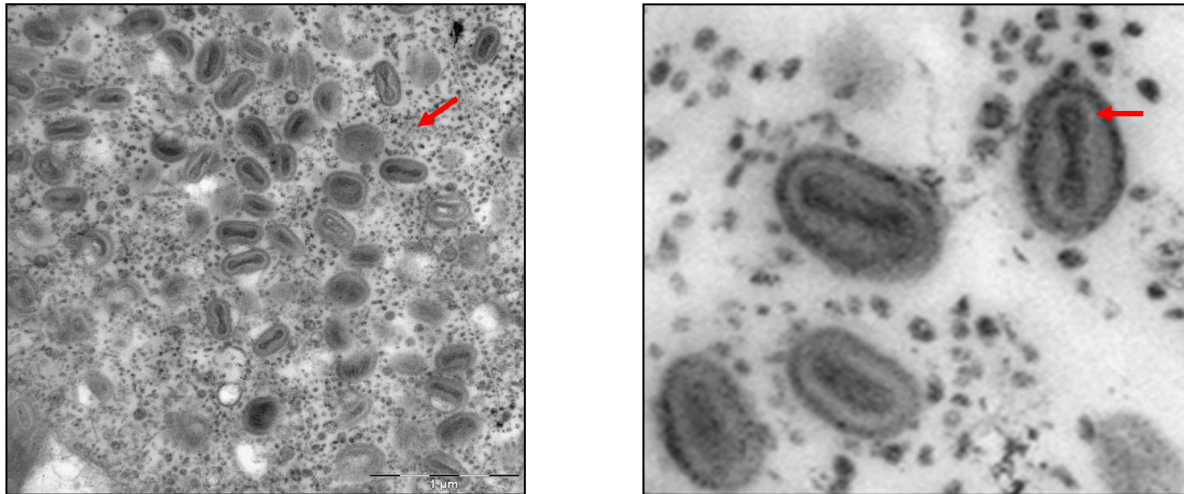


Figura 4. Fotografías de microscopía electrónica. De izquierda a derecha: vesículas ovaladas con la típica morfología de poxvirus, imagen con más aumentos donde se observa con más detalle el núcleo bicóncavo

Como conclusión, la microscopía electrónica se mostró como una herramienta para el diagnóstico y un método que complementa las técnicas tradicionales y básicas, además a un coste similar al de la histopatología tradicional.

Referencias

- ALHELGER, R.B. and RANDALL, C.C.** (2004) Electron microscopic observations on the development of fowlpox virus in chorioallantoic membrane. *Virology*. Vol **22**: 59-66
- COX, WR.** (1998). Avian pox infection in a Canada goose (*Branta Canadensis*). *Journal of wildlife diseases*. Vol **15**: 623-626
- GRAHAM, CL.** (1996) Poxvirus infection in a spectacled Amazon parrot (*Amazona albifrons*). *Avian diseases*. Vol. **22**: 340-343
- KLIGLER, I.J., MUCKENFUSS, R.S. and RIVERS, T.M.** (2001) Transmission of fowl-pox by mosquitoes. *The journal of experimental medicine* vol.**49**: 38-41
- MINBAY, A. and KREIER, J.P.** (1990) An experimental study of the pathogenesis of fowlpox infection in chickens. *American association of avian pathologist*. Vol. **17**: 532-539
- MOYLE, J., TABLANTE, N., BAUTISTA, D. and DUSTAN, F.** (2014) Recognizing and preventing avian pox in small flocks. *University of Maryland extension and Maryland poultry*. FS-979
- PRICE, F.C., ADVISOR, F., COUNTY, S. and ROSENWALD, A.S.,** (1999) Preventing avian pox. *Extension poultry pathologist emeritus* **415**: 642-9300
- RANDALL, C.C., GAFFORD, L.G. and ARHELGER, R.B.** (2004) Electron microscopic examination of isolated fowlpox inclusions. *Virology*. Vol **14**: 380-382
- SENTIES-CUE, C.G., CHARLTON, B.R., WOOLCOCK, P., BICKFORD, A.A., COOPER, G. and BLAND, M.** (2010) Atypical distribution of fowl pox lesions in broilers. *Avian diseases* **54**: 1316-1318.

- SKINNER, M.A.** (2008) Fowlpox virus and other avipoxviruses. *Encyclopedia of virology*. Vol. **3**: 274-284
- SMITS, J.E., TELLA, J.L., CARRETE, M., SERRANO, D. and LÓPEZ, G.** (2005) An Epizootic of Avian Pox in Endemic Short-toed Larks (*Calandrella rufescens*) and Berthelot's Pipits (*Anthus berthelotti*) in the Canary Islands, Spain: *Vet Pathol* **42**:59-65
- TRIPATHY, D.N. and SCHNITZLEIN, W.M.** (1999) Fowlpox virus (*Poxviridae*). *Encyclopedia of Virology* **2**: 576-582
- U.S. Government, U.S. Department of the Interior, U.S. Geological Survey, Biological Resources Division.** (2013) Avian pox. *Field manual of wildlife diseases: General Field Procedures and Diseases of Birds* **16**, 163-170
- UZCATEGUI, J.G., WIEDENFELD, D.A., PARKER, P.G.** (2007). Fowlpox in wild species (Passeriformes) in Santa Cruz Island, Galapagos, Ecuador. *Brenesia* **67**: 29-34
- VAN KAMMEN, A. and SPRADBROW, P.B.** (2000) Rapid diagnosis of some avian virus diseases. *Avian diseases*. Vol. **20**: 200-204
- VARGAS, G.D; ALBANO, A.P., FISCHER, G., HUBNER. S., SALLIS, S.E., NUNES, C.F., RAFFI, M.B. and SOARES, M.P.** (2011). Avian poxvirus infection in a common barn owl (*Tyto alba*) in southern Brazil. *Pesquisa veterinaria brasileira* **31**: 620-622.
- WELI, S.C. and TRYLAND, M.** (2011) Avipoxviruses: infection biology and their use as vaccine vectors. *Virology* **438**: 49
- World Organisation for Animal Health.** (2004) Fowl-pox. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE vol. **2**: 998-1004
- World Organisation for Animal Health.** (2008) Fowl-pox. *Terrestrial Manual*. OIE vol. **6**: 531-537