

## Hallazgos histopatológicos en gallinas ponedoras afectadas por el virus de la bronquitis infecciosa aviar

✉ Manuel Colás<sup>1</sup>, Ana M Acevedo<sup>2</sup>, Alejandro Merino<sup>3</sup>, María del Carmen Lamazares<sup>3</sup>, Yaima Burgher<sup>2</sup>, Julia Noda<sup>1</sup>, Dasha Fuentes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Aviar, Lida, Instituto de Investigaciones Avícolas, IIA Ave. 361, No. 16632 entre 166<sup>a</sup> y 184, Reparto Mulgoba, Boyeros, CP 19290, La Habana, Cuba

<sup>2</sup>Laboratorio de Virología Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Censa Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, La Habana, Cuba

<sup>3</sup>Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Agraria de La Habana Fructuoso Rodríguez Pérez Carretera de Tapaste y Autopista Nacional, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba  
E-mail: viacan@cenai.inf.cu, lidaiia@cenai.inf.cu

### RESUMEN

Con el objetivo de determinar los cambios histopatológicos causados por el virus de bronquitis infecciosa aviar en gallinas ponedoras vacunadas, afectadas con síndrome respiratorio crónico, en una unidad avícola, se seleccionaron 35 gallinas White Leghorn, entre 9 y 10 meses de postura (27 con diagnóstico clínico presuntivo de enfermedad respiratoria y ocho sin alteraciones aparentes). Se le realizó el examen clínico y la necropsia, y se clasificaron en cuatro grupos según el proceso clínico-patológico: leve, moderado, severo y control sano. Se tomaron muestras de los senos paranasales, la tráquea y los pulmones (histopatología) y mezclas de muestras de tráquea-pulmón, de tres y cuatro aves para el aislamiento del coronavirus de la bronquitis infecciosa y el análisis de biología molecular, respectivamente. Se aplicó la técnica histoquímica no enzimática del ácido periódico de Schiff, para demostrar la presencia de moco; y se cuantificaron las glándulas de la mucosa de la tráquea (histomorfometría). Se compararon las proporciones de las lesiones histopatológicas y se hizo un análisis de varianza de una vía para determinar las pérdidas de las glándulas en la tráquea, con un nivel de significación en ambos análisis de  $p < 0.05$ . Mediante técnicas histopatológicas, en el epitelio de los senos paranasales, la tráquea y los bronquios, se observó erosión del epitelio y exudado mucoso e hiperplasia del tejido linfoide asociado a mucosa. En los senos paranasales se observaron quistes glandulares y en la tráquea se observó metaplasia epitelial. A partir de muestras originales y pases en embrión de pollos se aisló e identificó el coronavirus de la bronquitis infecciosa.

**Palabras clave:** atrofia glandular, bronquitis infecciosa aviaria, metaplasia epitelial, tejido linfoide asociado a bronquio

*Biotechnología Aplicada 2012;29:218-223*

### ABSTRACT

**Histopathological findings in egg-laying hens infected with avian infectious bronchitis virus.** In order to dissect the histopathological changes produced by the infection of avian infectious bronchitis virus in previously vaccinated egg-laying hens from a poultry farming unit, 35 White Leghorn egg-laying hens that had been in production for 9 to 10 months (twenty seven of which had clinical symptoms corresponding to respiratory disease and eight apparently healthy individuals) were selected for further study. After clinical examination and necropsy, they were classified into apparently healthy, mild, moderate or severe according to the severity of the clinical-pathological process. Samples were taken from paranasal sinuses, trachea and lungs for histopathological study, and trachea-lung pools were prepared from four individuals for virus isolation and molecular biology assays. The presence of mucus was evidenced with Schiff's non-enzymatic histochemical staining, and histomorphometric analyses were used to estimate the number of glands in the tracheal mucosa. The proportions of histopathological lesions were compared, using one-way Anova to determine gland loss at the tracheae with a significance level of  $p < 0.05$  in both cases. Histopathological analysis of the epithelia of paranasal sinuses, trachea and bronchia revealed the presence of epithelial erosion, mucous exudate and hyperplasia of mucosa-associated lymphoid tissue. Glandular cysts were observed at the paranasal sinuses, and epithelial metaplasia was detected in the trachea. It was possible to isolate and identify infectious bronchitis coronavirus from the original samples and from samples passaged in chicken embryos.

**Keywords:** glandular atrophy, avian infectious bronchitis, epithelial metaplasia, bronchus-associated lymphoid tissue

### Introducción

La gallina ponedora es una especie híbrida altamente especializada, que requiere un manejo adecuado, medidas y prácticas de bioseguridad extremas en los segmentos de la cadena productiva, con la finalidad de lograr su potencial genético y productivo. En ocasiones, esto no se puede lograr por la incidencia de factores que propician infecciones respiratorias agudas

y crónicas, como bacterias, micoplasmas aviarios, hongos patógenos y virus [1, 2]. En este último grupo, sobresale el virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV), que es un gammacoronavirus perteneciente a la familia Coronaviridae, del orden Nidovirales [3].

El IBV está ampliamente distribuido en el mundo y causa una enfermedad muy contagiosa, que provoca

1. Parra T. La calidad de la materia prima y el alimento terminado. *Rev Acontecer Avícola*. 1999;7(50):26-8.

2. Chapter 3. Vaccination. In: Alexander DJ, Bell JG, Alders RG, editors. *A technology review: Newcastle disease with special emphasis on its effect on village chickens*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2004. p. 16-22.

pérdidas económicas significativas en la industria avícola, debido a que los animales ganan poco peso, disminuyen la producción y calidad de los huevos, la fertilidad y aumentan los decomisos en las plantas procesadoras [4, 5]. La morbilidad generalmente es alta (entre 90 y 100%), pero la mortalidad es baja (5%). Esta última aumenta cuando intervienen cepas nefropatógenas [6, 7].

Las principales manifestaciones clínicas en las gallinas ponedoras son la conjuntivitis serosa, la disnea y la asfíxia posterior. La afectación más importante es la baja producción de huevos, que en casos crónicos puede llegar al 40%. Esta se recupera después de 4 a 5 semanas, aunque no se alcanzan los niveles de productividad anteriores. Los huevos se observan deformes, blanquecinos, porosos, con excrecencias calcáreas, muy raras veces sin cáscara (en fãrfara), el albumen es ambarino, y no se define la parte acuosa de la densa. En infecciones respiratorias leves se observan alteraciones renales como inflamación y palidez de los riñones, presencia de sales de urato en los uréteres (urolitiasis) y gota visceral. Los patotipos nefropatógenos del IBV pueden ocasionar estas alteraciones [8].

En la forma respiratoria leve se aprecian lesiones anatomopatológicas. Hay un exceso de moco, que puede llegar a ser caseoso, en especial en el pollo de ceba. Se observa congestión pulmonar y opacidad, con cierto engrosamiento de las paredes de los sacos aéreos. En la forma severa, aparece abundante moco, que a los pollos en edades avanzadas les causa inflamación severa con enrojecimiento de los anillos traqueales y a los pollos jóvenes les causa asfíxia [9]. Histológicamente, la tráquea y los bronquios muestran hiperplasia epitelial y metaplasia con pérdida de cilios, a menudo con engrosamiento de las células superficiales. El marcado engrosamiento subepitelial incluye edema e infiltración de la lámina con predominio de monocitos y linfocitos [10].

El diagnóstico de este agente en laboratorio requiere el aislamiento o la detección directa del virus, aunque la serología puede ser útil en algunas circunstancias. Se realizan ensayos de inhibición de la hemaglutinación para determinar los serotipos y ELISA para el diagnóstico serológico. También se han empleado otras técnicas como la microscopía electrónica [9], los anticuerpos monoclonales [11], la neutralización de los virus [12] y más recientemente los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR) en combinación con el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) para la identificación de los genotipos del virus [13-15].

La aparición emergente y continua de nuevos serotipos ha complicado el diagnóstico y el diseño de programas de control adecuados, por la variación antigénica y el bajo grado de protección cruzada de las vacunas contra las cepas de campo de los genotipos o serotipos poco relacionados [16].

En muchos países, se controla el IBV con acciones de bioseguridad y mediante la aplicación de vacunas vivas e inactivadas, que confieren una respuesta inmune específica [17]. En Cuba existen programas de inmunización contra el IBV mediante la aplicación de vacunas vivas e inactivadas en reproductores

y ponedoras, respectivamente [18, 19]. En la crianza intensiva de aves, aunque se establecen medidas de control y prácticas de bioseguridad, continúan los brotes del síndrome respiratorio con alta morbilidad y baja mortalidad.

Por estas razones nos propusimos determinar los cambios histopatológicos ocasionados por el IBV en gallinas ponedoras vacunadas, afectadas por el síndrome respiratorio crónico.

## Materiales y métodos

### Selección de las aves

Se seleccionaron aleatoriamente 35 gallinas ponedoras de la raza White Leghorn con alrededor de 38 semanas de edad, procedentes de una unidad avícola; 27 con diagnóstico clínico presuntivo de enfermedad respiratoria y ocho sin alteraciones aparentes (que conformaron el grupo control del ensayo, control sano).

La alimentación fue balanceada y el manejo general siguió las indicaciones del instructivo técnico vigente en el país desde la década de 1980 [20].

### Esquema de inmunización

Las aves en estudio recibieron tres dosis de vacuna viva (cepa H120, serotipo Massachusetts) los días 1, 35 y 85 de vida, de acuerdo con el programa de inmunización vigente en Cuba [20].

### Inspección clínica y sacrificio de las aves

La inspección clínica y el sacrificio de las aves se efectuaron según la metodología descrita por Sánchez [21]. Durante la necropsia se hizo una evaluación macroscópica teniendo en cuenta la severidad de las manifestaciones clínicas y las lesiones anatomopatológicas en las aves. Posteriormente se conformaron cuatro grupos según el grado de las alteraciones clínico-anatomopatológicas macroscópicas (Tabla): leve, moderado, severo y control sano.

### Muestreo y procesamiento

#### Órganos para el estudio histopatológico

Se tomaron fragmentos de los senos paranasales, de la tráquea y los pulmones, que se conservaron en solución de formol con tampón fosfato salino al 4%. Las muestras de los senos paranasales se depositaron en una solución de descalcificación para su reblandecimiento durante 21 días.

#### Órganos para el estudio virológico y molecular

Se tomaron fragmentos de la tráquea y los pulmones y se mezclaron por órgano en 2 grupos de 4 y uno de 3, aleatoriamente (11 aves en total), en tubos plásticos estériles de 50 mL sin medio de cultivo y se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento.

#### Técnica histopatológica

Los fragmentos de los senos paranasales, la tráquea y los pulmones, conservados en solución de formol con tampón fosfato salino al 4%, se procesaron en parafina, y los cortes se colorearon con hematoxilina-eosina. Además se les realizó la técnica histoquímica no enzimática del ácido periódico de Schiff descrita por Vacca [22].

3. De Groot RJ, Ziebuhr J, Poon LL, Woo PC, Talbot P, Rottier PJM, et al. Revision of the family Coronaviridae Taxonomic proposal to the Coronavirus Study Group to the ICTV Executive Committee; 2008 [cited 2011 Nov 18]. Available from <http://talk.ictvonline.org/media/p/1230.aspx>

4. Wang L, Xu Y, Collisson EW. Experimental confirmation of recombination upstream of the S1 hypervariable region of infectious bronchitis virus. *Virus Res.* 1997;49(2):139-45.

5. Cavanagh D, Gelb J. Infectious bronchitis. In: *Diseases of poultry*. Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE, editors. Oxford: Wiley-Blackwell; 2008. p. 117-35.

6. Ziegler AF, Ladman BS, Dunn PA, Schneider A, Davison S, Miller PG, et al. Nephropathogenic infectious bronchitis in Pennsylvania chickens 1997-2000. *Avian Dis.* 2002;46(4):847-58.

7. Zanella A, Lavazza A, Marchi R, Moreno Martin A, Paganelli F. Avian infectious bronchitis: characterization of new isolates from Italy. *Avian Dis.* 2003;47(1):180-5.

8. Valencia B. Bronquitis infecciosa: soluciones prácticas [Internet]. In: Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Avicultura del Ecuador, editores. *Memorias Congreso Nacional de Avicultura*; 2007 [cited 2010 Feb 16]. Available from: <http://www.amevea-ecuador.org/memorias.htm>

9. Lamazares-Pérez MC. Algunos aspectos de la epizootiología y de diagnóstico del complejo respiratorio crónico de las aves en Cuba [dissertation]. Tesis de Doctorado. Košice: Escuela Superior de Veterinaria de Košice; 1987.

10. Jordan FTW. Bronquitis infecciosa. In: Jordan FTW, Pattison M, editors. *Enfermedades de las aves*. 3rd ed. México: El Manual Moderno, S.A.; 1998. p. 171-7.

11. De Wit JJ. Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 2000;29(2):71-93.

12. Kant A, Koch G, van Roozelaar DJ, Kusters JG, Poelwijk FA, van der Zeijst BA. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. *J Gen Virol.* 1992;73(Pt 3):591-6.

13. Meir R, Rosenblut E, Perl S, Kass N, Ayali G, Perk S, et al. Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. *Avian Dis.* 2004;48(3):635-41.

14. Stachowiak B, Key DW, Hunton P, Gillingham S, Nagy E. Infectious bronchitis virus surveillance in Ontario commercial layer flocks. *J Appl Poult Res.* 2005;14:141-6.

15. Grgic H, Hunter DB, Hunton P, Nagy E. Vaccine efficacy against Ontario isolates of infectious bronchitis virus. *Can J Vet Res.* 2009;73(3):212-6.

16. Cowen BS, Hitchner SB. Serotyping of avian infectious bronchitis viruses by the virus-neutralization test. *Avian Dis.* 1975;19(3):583-95.

17. Cavanagh D. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.* 2003;32(6):567-82.

Tabla. Clasificación de los grupos experimentales de acuerdo con la severidad del proceso respiratorio (n = 35)

Grupos	Proporción	Signos clínicos	Lesiones macroscópicas	Lesiones microscópicas
Leve	8	Secreción nasal serosa, conjuntivitis, disnea, estornudo, retracción de la cresta y barbilla, enflaquecimiento ligero	Rinitis serosa, atrofia genital, degeneración ovárica	Discreta hiperplasia del TLAM* de los senos paranasales y tráquea Erosión parcial del epitelio respiratorio con pérdidas de los cilios en tráquea Discreta hiperplasia del TLAM* de los senos paranasales y tráquea Erosión parcial del epitelio respiratorio con pérdidas de los cilios en tráquea Discreta degeneración glandular del epitelio glandular de los senos paranasales
Moderado	8	Tumefacción facial, lagrimeo, conjuntivitis, secreción nasal serocatarral fibrinosa, estornudo, disnea, plumas roídas, retracción de la cresta y barbilla, enflaquecimiento	Rinitis serocatarral, rinitis fibrinosa, esplenomegalia, focos de necrosis en hepática, degeneración ovárica con folículos deformes	Hiperplasia del TLAM, erosión moderada y daños en las glándulas del epitelio respiratorio de los senos paranasales y la tráquea Exudado mucofibrinoso en los senos paranasales
Severo	11	Tumefacción facial de consistencia dura con pérdida de la visión, lagrimeo, conjuntivitis, disnea, secreción nasal catarral	Rinoconjuntivitis fibrinocatarral, neumonía focal, degeneración hepática, congestión hepática	Hiperplasia del TLAM y atrofia de las glándulas del epitelio respiratorio de los senos paranasales, la tráquea y los bronquios Degeneración quística glandular Metaplasia del epitelio respiratorio Bronquitis y bronquiolitis catarral
Control sano	8	Sin signos clínicos	Sin alteraciones aparentes	Sin alteraciones aparentes

\*TLAM: Tejido linfoide asociado a mucosa.

### Cuantificación de las glándulas del epitelio de la tráquea de los distintos grados de severidad del proceso respiratorio

Se utilizaron 35 anillos de la tráquea de las 35 aves estudiadas. Para la determinación de la atrofia de las glándulas, se realizó la histomorfometría en un anillo tomado de la tráquea de cada animal en los distintos grados de clasificación del síndrome respiratorio crónico, acorde con las características clínicas-anatomopatológicas macroscópicas descritas.

### Aislamiento viral e identificación molecular

Se tomaron muestras de la tráquea y los pulmones de 11 aves en grupos de tres y cuatro aves, después de la necropsia. Estas muestras se procesaron y conservaron a -80 °C hasta su inoculación en embriones de pollo.

Los homogenatos de órganos se inocularon en embriones de pollo de 9 a 11 días de incubados. Se utilizaron a razón de 10 embriones por muestra y por la cavidad alantoidea se inocularon 0.25 mL por embrión. Los embriones se incubaron a 37 °C y diariamente se chequeó su viabilidad. A las 72 horas de la inoculación, se cosechó el líquido alantoideo y se realizaron de dos a tres pases ciegos en embrión de pollo.

Cada pase (líquido alantoideo) se evaluó mediante la técnica de RT-PCR, para la detección del IBV.

Como control positivo se utilizó la vacuna H120 que se utiliza en el programa de inmunización en vigente en Cuba [20].

### Extracción de ARN

Para la extracción del ARN viral se utilizó el reactivo TRI Reagent® LS según las instrucciones del fabricante (Sigma, EE.UU.). El ARN se resuspendió en 10 µL de agua libre de nucleasas (Promega, Madison, WI, EE.UU.).

### Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa

A partir del ARN total extraído, se realizó la detección del virus mediante RT-PCR semianidado utilizando

los cebadores de la región 3' no traducida (UTR) altamente conservada entre los genotipos de bronquitis: sentido UTR 41- 5' ATG TCT ATC GCC AGG GAA ATG TC 3'; antisentidos UTR 11- 5' GCT CTA ACT CTA TAC TAG CCT A 3' y UTR 31- 5' GGG CGT CCA AGT GCT GTA CCC 3' [23].

### Análisis estadístico

Se compararon las proporciones de las principales lesiones histopatológicas y se realizó un análisis de varianza de una vía (Anova) para las pérdidas de las glándulas del epitelio de la tráquea, apoyados en los paquetes estadísticos Comprop-1 y Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corporation, EE.UU.). Los niveles de significación en ambos análisis fueron de  $p < 0.05$ .

### Resultados

Los principales cambios histológicos en los senos paranasales, la tráquea y los pulmones de las gallinas ponedoras, según la clasificación de las alteraciones macroscópicas se agrupan en la tabla.

18. Viamontes O. Impacto económico de una adecuada estrategia de inmunización contra la enfermedad de Newcastle. In: Memorias del V Congreso de Avicultura; 2006 Mar 11-13: La Habana, Cuba. La Habana: Instituto de Investigaciones Avícolas; 2006. Available from: <http://www.iaa.cu/congreso/seminario.htm>

19. Cuello S, Noda J, Alfonso P, Perera CL. Bronquitis Infecciosa Aviar. Cinética de anticuerpos posvacunales en reproductoras y su transferencia a la progenie. Rev Salud Anim. 2004; 26(1):42-7.

20. Unión de Empresas del Combinado Avícola Nacional. Instructivo técnico para el manejo de las gallinas ponedoras y sus reemplazos. La Habana: Instituto de Investigaciones Avícolas, Ministerio de Salud Pública; 2007.

21. Sánchez A. Asistencia veterinaria a unidades avícolas de producción. Sánchez A. Manual de Enfermedades de las Aves. La Habana: Editorial Félix Varela; 1990. p. 5-100.

22. Vacca LL. Laboratory manual of histochemistry. New York: Raven Press; 1985.

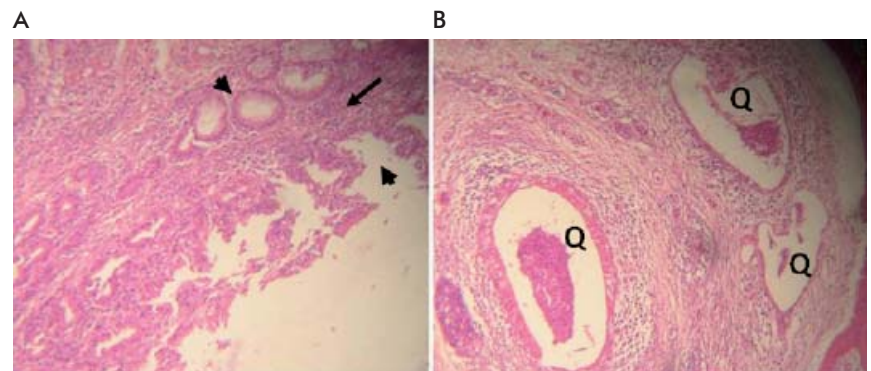


Figura 1. Microfotografías de los senos paranasales (región respiratoria; 400 x), mediante tinción con hematoxilina-eosina. A) Se observan hiperplasia del tejido linfoide asociado a la nasofaringe (flecha) y erosión marcada del epitelio respiratorio y degeneración de las glándulas tubuloacinosas (cabeza de flecha). B) Quistes glandulares (Q).

Se observó una marcada erosión del epitelio respiratorio y la degeneración de las glándulas tubuloacinosas. En los grupos clasificados como severos se formaron quistes glandulares con exudación mucosa (Figura 1).

Otro de los elementos histopatológicos importantes es la hiperplasia de las glándulas tubuloacinosas repletas de moco, que vierten su contenido hacia la zona de luz, con cierta distensión (Figuras 2A y B), como se describe en la tabla.

En la tráquea hubo pérdida moderada de los cilios, hiperplasia del tejido linfóide asociado a la tráquea (TLAT). En el estadio avanzado de la infección respiratoria se observó metaplasia del epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado a células planas, con engrosamiento de la submucosa (Figuras 2C y D).

En la histopatología del sistema respiratorio también hubo cambios en los bronquios, tales como hiperplasia del TLAT y una respuesta inflamatoria exudativa catarral a nivel glandular del epitelio y en el interior de la luz bronquial (Figuras 2E y F).

Al evaluar el resultado de la técnica del ácido periódico en el epitelio respiratorio de los senos paranasales, la tráquea y los bronquios, se confirmó la presencia de exudado catarral (mucoso) (Figura 3).

Hubo diferencias significativas en la pérdida de las glándulas del epitelio de un anillo traqueal, entre los grupos con alteraciones clínico-patológicas del síndrome respiratorio crónico y el grupo control, en el que no se observaron alteraciones. El tercer grupo (severo) fue el de mayor significación patológica (Figura 4).

Los resultados del aislamiento viral en los embriones de pollo, después de tres pases sucesivos revelaron una multiplicación viral determinada por lesiones similares a las producidas por el IBV: mortalidad, disminución del crecimiento y embriones hemorrágicos. Este aislamiento viral se confirmó en las muestras clínicas por RT-PCR donde se obtuvieron bandas de la talla aproximada esperada (179 pb), específicas para los cebadores utilizados (Figura 5).

**Discusión**

La infección por el IBV se inicia en el sistema respiratorio superior, y provoca secreción de moco por las células caliciformes del epitelio de la mucosa [24]. Se plantea que la mayoría de las cepas de este virus se replican en el tracto respiratorio superior, sin que se evidencien signos clínicos y la progresión de las lesiones en este sistema se divide en tres etapas: degenerativa, hiperplásica y de regeneración [25]. Los hallazgos histopatológicos evidencian las etapas descritas por las que se clasificaron los grupos con infección respiratoria (leve, moderada y severa). Entre los daños destacan la erosión del epitelio con degeneración de las glándulas de los senos paranasales, hiperplasia del TLAT, hiperplasia glandular con hipersecreción de moco en todo el epitelio respiratorio con pérdidas de los cilios (senos paranasales, tráquea y bronquios primarios). Estos últimos cambios microscópicos específicamente en la tráquea, son mecanismos de defensa debido al movimiento de los cilios y la exudación de moco de las células caliciformes, ante la infección por el IBV [26]. Se plantea que la tráquea es el órgano selecto para describir tales alteraciones en la fase aguda

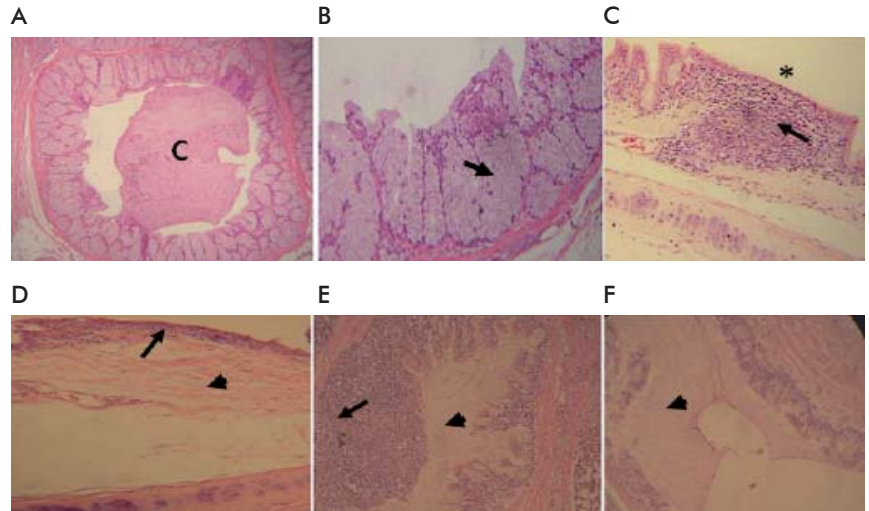


Figura 2. Microfotografía de los senos paranasales por tinción con hematoxilina-eosina (región respiratoria; 400 x). A) Coágulo de exudado fibrinoso (C). B) Hiperplasia de las glándulas tubuloacinosas (flecha). C) Pérdida de los cilios (asterisco) e hiperplasia del tejido linfóide asociado a la tráquea (flecha). D) Metaplasia del epitelio respiratorio (flecha) con engrosamiento de la submucosa (cabeza de flecha). E) Hiperplasia del tejido linfóide asociado a la tráquea (flecha) e hipersecreción de moco (cabeza de flecha) en los bronquios. F) Hipersecreción de moco (cabeza de flecha).

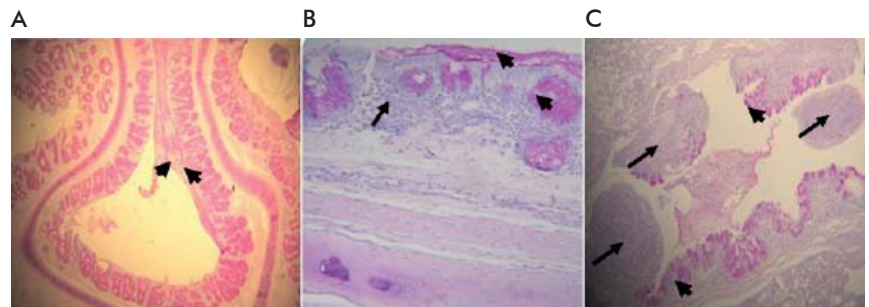


Figura 3. Microfotografía del órgano respiratorio (200 x), de los senos paranasales (A), tráquea (B) y bronquio terciario (C), mediante la aplicación de la técnica histoquímica no enzimática del ácido periódico de Schiff. Se observan hipersecreción de moco en epitelio y glándulas de la submucosa (cabeza de flecha). Hiperplasia del tejido linfóide asociado a la tráquea (flecha)..

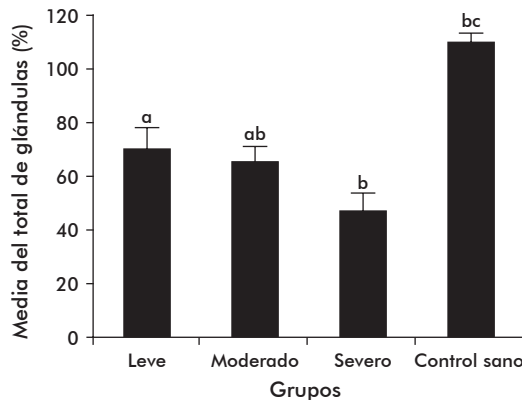


Figura 4. Cuantificación de las glándulas del epitelio en un anillo de la tráquea de los distintos grados de severidad del proceso respiratorio en cada grupo de gallinas ponedoras. Se muestran los datos transformados en frecuencia ± desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas (Anova de una vía, p < 0.05).

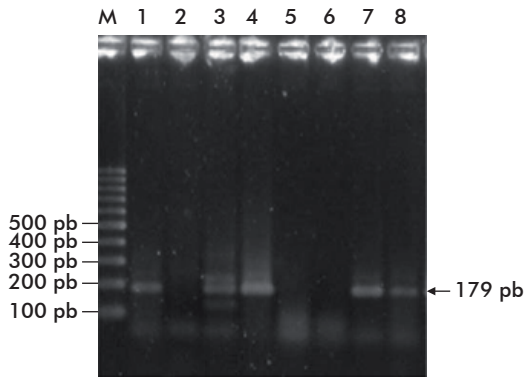


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa (2%) de RT-PCR para la detección de bronquitis infecciosa aviar en muestras de campo sospechosas. M: marcador de peso molecular de 100 pb (Promega); Carriles 1: control positivo (cepa M41); 2: control negativo (agua libre de nucleasas); 3: muestras originales de animales 13 al 15; 4: pase 2 en embrión de pollo a partir de animales 13 al 15; 5: muestras originales de animales 9 al 12; 6: pase 3 en embrión de pollo a partir de animales 9 al 12; 7: pase 3 en embrión de pollo a partir de animales 16 al 19; 8: pase 4 en embrión de pollo a partir de animales 16 al 19.

de la infección, mediante microscopía electrónica, por su simplicidad anatómica [9].

Se plantea que las cepas virulentas del IBV dañan el epitelio y causan la pérdida de cilios e hiperplasia, lo que predispone al ave para la coinfección por agentes patógenos oportunistas como *Escherichia coli* [27]. Esta enterobacteria agrava la infección respiratoria y en muchos casos provoca la muerte de las aves [28].

Otro importante hallazgo histopatológico es la metaplasia del epitelio con características de células planas y el engrosamiento de la submucosa de la tráquea; resultado que coincide con estudios en 2003 [29].

El control de la enfermedad por medio de la vacunación es extremadamente difícil y no siempre es exitoso, debido a la continua emergencia de múltiples serotipos y variantes del virus, y a la pobre protección cruzada entre ellos [30, 31]. La emergencia de esas variantes podría deberse a la presión inmunológica causada por el amplio uso de vacunas, a la recombinación como una consecuencia de infecciones mezcladas o a una disminución de los serotipos dominantes como resultado de la vacunación, que provoca la emergencia de otras cepas de campo [32, 33].

A escala mundial se han estudiado y utilizado numerosas vacunas contra el IBV, contra variantes de la cepa Massachusetts, y se ha determinado su efectividad en pollos y gallinas ponedoras. Sin embargo, se describe que en la mayoría de los casos causan la enfermedad y proporcionan una pobre o nula protección [34], tal como se reportó en 1992 en EE.UU. con la variante DE 072 [35, 36], GA98 [37, 38]. En Brasil, se ha descrito un solo grupo de cepas del IBV subdivididas en tres subgrupos, así como el genotipo 4/91 [39-41]. En Chile, en la década de 1980 se reportaron variantes de los serotipos de la cepa Massachusetts [42]. En Europa se describieron los serotipos holandeses (D207, D212, D3896 y D3128) [43]. En

África, en 1980 se aisló el IBV que causó severos problemas respiratorios [39, 44]. En Israel, a mediados de 1990 se reconocieron variantes de la cepa Massachusetts en serotipos [13, 45, 46] y en Korea se describieron las variantes del IBV a mediados de la década de 1980 [47]. En este último, la vacuna Massachusetts tuvo éxito al controlar la enfermedad, pero solo fue al inicio, porque desde 1990 ocurren brotes del IBV en animales vacunados, y una incidencia alta de problemas renales. Estudios desarrollados por Lee y cols. describen la diversidad genética entre las variantes aisladas del IBV en este país en grupos de animales enfermos [48]. Algunas de estas variantes son autóctonas, aunque otras comparten las relaciones genéticas con las variantes de otros países de la región [47]. Esto sugiere que los IBV en Korea están evolucionando continuamente [49]. Por los resultados en Cuba, pudieran estar circulando otras cepas o serotipos variantes de la cepa Massachusetts, aún no estudiados.

Existen otras brechas de riesgo que condicionan la infección por el IBV, como las fallas en la vacunación completa o parcial; el fracaso total de la protección inducida por la vacunación ante desafíos heterólogos y agentes inmunosupresores; intervalos muy cortos o largos entre las vacunaciones; inadecuada aplicación de la vacuna; variaciones en la técnica (diferentes cantidad, calidad y temperatura del agua de dilución de la vacuna y de la dosis); y la combinación de vacunas contra diferentes agentes [50, 51].

Se logró el aislamiento e identificación del IBV, a partir de la evaluación de los hallazgos histopatológicos en el sistema respiratorio. Algunos autores plantean que no siempre es posible que se pueda identificar el IBV en poblaciones de aves, por varias razones. Una de ellas es la mutación viral; no solo por los cambios individuales en los nucleótidos o por inserciones y eliminaciones, sino por la recombinación y que los pollos comúnmente se infectan con más de un tipo de IBV en un momento dado [23, 52]. En ocasiones, tales híbridos o quimeras tendrán ventajas en la replicación, pero las diferencias regionales son muy probables [53]. Otra razón es el movimiento del rebaño y los lotes múltiples en la categoría de gallinas ponedoras que propician varias infecciones recombinantes por el IBV.

En resumen, este trabajo permitió el estudio de los cambios histopatológicos en el epitelio de los senos paranasales, la tráquea y los bronquios de gallinas ponedoras afectadas por el coronavirus de la bronquitis infecciosa, lo cual se confirmó por el aislamiento en embrión de pollo y su identificación por RT-PCR.

## Agradecimientos

Al Dr. C. Nelson Merino García, por su apoyo al personal técnico del área de Anatomía Patológica por la obtención de las muestras clínico-patológicas y la interpretación histopatológica, y al histólogo José Suárez Alba del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, por la preparación de los histopreparados de hematoxilina-eosina y técnica histoquímica no enzimática en este estudio.

23. Cavanagh D, Mawditt K, Welchman D de B, Britton P, Gough RE. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically

closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. *Avian Pathol.* 2002;31(1):81-93.

24. Raj GD, Jones RC. Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathol.* 1996;26(4):677-706.

25. Cunningham CH. Avian infectious bronchitis virus isolation and identification. International symposium on requirements for poultry standard vaccines. *Develop Boil Standard*. 1974;25:211-8.
26. Rodrigo VA. Infección experimental con *Escherichia coli* y virus de la bronquitis infecciosa en pollos libres de patógenos específicos [dissertation]. Tesis de grado en Medicina Veterinaria; Valdivia: Instituto de Patología Animal, Universidad Austral de Chile; 2006.
27. Peighambari SM, Julian RJ, Gyles CL. Experimental *Escherichia coli* respiratory infection in broilers. *Avian Dis*. 2000; 44(4):759-69.
28. Vandekerckhove D, Herdt PD, Laevens H, Butaye P, Meulemans G, Pasmans F. Significance of interactions between *Escherichia coli* and respiratory pathogens in layer hen flocks suffering from colibacillosis-associated mortality. *Avian Pathol*. 2004;33(3):298-302.
29. Brett M, De Noguera C, Quiroz C, De Rolo M, Herrera A, Martínez J. Aislamiento e identificación de tres cepas nefropatógenas del virus de bronquitis infecciosa aviar en la región central de Venezuela. *Veterinaria Trop*. 2003;28(1):63-77.
30. Cavanagh D, Naqi S. Infectious Bronchitis. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW. *Diseases of poultry*. 11th ed. Ames: Iowa State University Press; 2003. p. 101-19.
31. Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res*. 2007; 38(2):281-97.
32. Lee CW. Evolution of avian infectious bronchitis virus: genetic drift and recombination. *Korean J Vet Serv*. 2002;25: 87-96.
33. Liu SW, Zhang QX, Chen JD, Han ZX, Liu X, Feng L, et al. Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. *Arch Virol*. 2006;151(6):1133-48.
34. Wit JJ de, Cook JKA, van der Heijden HMJF. Infectious bronchitis virus in Asia, Africa, Australia and Latin America - History, current situation and control measures. *Rev Bras Cienc Avic*. 12(2):97-106.
35. Gelb J Jr, Keeler CL Jr, Nix WA, Rosenberger JK, Cloud SS. Antigenic and S-1 genomic characterization of the Delaware variant serotype of infectious bronchitis virus. *Avian Dis*. 1997;41(3):661-9.
36. Lee CW, Hilt DA, Jackwood MW. Identification and analysis of the Georgia 98 serotype, a new serotype of infectious bronchitis virus. *Avian Dis*. 2001; 45(1):164-72.
37. Jackwood MW, Hilt DA, Sellers HS, Williams SM, Lasher HN. Rapid heat-treatment attenuation of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol*. 2010;39(3):227-33.
38. Hidalgo H, Gallardo R, Rosende S. Isolation of infectious bronchitis virus from broiler chickens in Chile. *Avian Dis*. 1976;20(3):601-3.
39. Cook JKA, Orbell SJ, Woods MA, Huggins MB. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol*. 1999;28(5):477-85.
40. Di Fabio J, Rossini LI, Orbell SJ, Paul G, Huggins MB, Malo A, et al. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. *Avian Dis*. 2000;44(3):582-9.
41. Villarreal LY, Sandri TL, Souza SP, Richzenhain LJ, de Wit JJ, Brandao PE. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. *Avian Dis*. 2010;54(2):894-8.
42. Cubillos A, Ulloa J, Cubillos V, Cook JK. Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. *Avian Pathol*. 1991;20(1):85-99.
43. Davelaar FG, Kouwenhoven B, Burger AG. Occurrence and significance of infectious bronchitis virus variant strains in egg and broiler production in the Netherlands. *Vet Q*. 1984;6(3):114-20.
44. Morley AJ, Thomson DK. Swollen-head syndrome in broiler chickens. *Avian Dis*. 1984; 28(1):238-43.
45. Meir R, Malkinson M, Weisman Y. Characterization of IBV isolates in Israel using RT-PCR and RFLP. In: Kaleta EF, Heffels-Redmann U, editors. *Proceedings of the International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry*; 1998 Jun 15-18; Rauschholzhausen, Germany. Giessen: Institut für Geflügelkrankheiten. 1998. p. 229-34.
46. Callison SA, Jackwood MW, Hilt DA. Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates. *Avian Dis*. 2001;45(2):492-9.
47. Song CS, Lee YJ, Kim JH, Sung HW, Lee CW, Izumiya Y, et al. Epidemiological classification of infectious bronchitis virus isolated in Korea between 1986 and 1997. *Avian Pathol*. 1998;27(4):409-16.
48. Lee SK, Sung HW, Kwon HM. S1 glycoprotein gene analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Korea. *Arch Virol*. 2004;149(3):481-94.
49. Lee EK, Jeon WJ, Lee YJ, Jeong OM, Choi JG, Kwon JH, Choi KS. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolates in Korea between 2003 and 2006. *Avian Dis*. 2008;52:332-7.
50. Jang JH, Sung HW, Song CS, Kwon HM. Sequence analysis of the S1 glycoprotein gene of infectious bronchitis viruses: identification of a novel phylogenetic group in Korea. *J Vet Sci*. 2007;8(4):401-7.
51. Jackwood MW, Hilt DA, McCall AW, Polizzi CN, McKinley ET, Williams SM. Infectious bronchitis virus field vaccination coverage and persistence of Arkansas-type viruses in commercial broilers. *Avian Dis*. 2009;53(2):175-83.
52. Cavanagh D, Mawditt K, Britton P, Naylor CJ. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol*. 1999;28(6):593-605.
53. Meulemans G, Boschmans M, De-caesstecker M, Berg TP, Denis P, Cavanagh D. Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986 to 1995. *Avian Pathol*. 2001;30(4):411-21.

Recibido en noviembre de 2011.

Aprobado en junio de 2012.