

**ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LAS
ALTERACIONES PRODUCIDAS POR LA
VARIEDAD H-52 DEL VIRUS DE LA
BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR.**

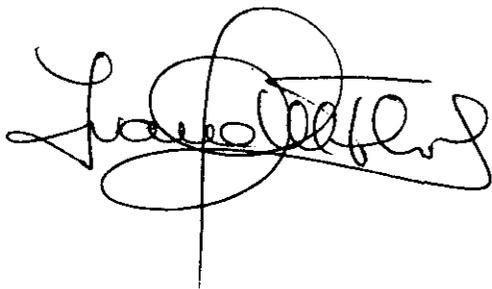
**RICARDO MARTINEZ-ALESON SANZ
MADRID, 1992**

a mi familia...

Dña. Juana María Flores Landeira y D. Manuel Pizarro Díaz, directores del trabajo titulado "Estudio experimental de las alteraciones producidas por la variedad H-52 del virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar", realizado por D. Ricardo Martínez-Alesón Sanz.

CERTIFICAN: que el trabajo anteriormente citado, reúne las condiciones necesarias para optar al GRADO DE DOCTOR.

Madrid, a 14 de Mayo de 1992.



Dña. Juana M^a Flores Landeira.



D. Manuel Pizarro Díaz

AGRADECIMIENTOS

La idea de éste trabajo surgió del Dr. Van der Heide, gran conocedor del mundo avícola y su patología, gracias por tu ayuda y el interés que te has tomado siempre por mi trabajo.

A la Dra. Juana M^a Flores Landeira y Dr. Manuel Pizarro Díaz por acceder a la codirección de este trabajo de investigación; sin su dedicación y buena guía éste estudio no se hubiera podido finalizar.

La Dra. María Castaño Rosado, es el investigador que siempre se quiere tener como maestro, conoce la palabra adecuada para el fenómeno que se desea describir y la gran experiencia que aclara muchas dudas. Gracias por tu colaboración.

A la Dra. Paloma García Fernandez, sin cuya ayuda no habría sido posible la realización de este trabajo.

D. Simón Vivas González y D. Pedro José Aranda Espinosa , han sido las personas que han llevado a cabo todo el procesado y preparación de los cortes. La calidad de su trabajo ha sido de inestimable ayuda.

A todas las personas que integran el Departamento de Patología a Animal II, de la Facultad de Veterinaria de Madrid, sin vuestra colaboración y ayuda desinteresada, no habríamos podido finalizar este trabajo.

D. Ricardo Martínez-Alesón Tamayo, mi padre. El me inició en el campo de la avicultura y es para mi un ejemplo constante de compañerismo, competencia e integridad profesional. Sin él no hubiera llegado al nivel profesional en el que hoy me encuentro.

Hemos de agradecer igualmente, la colaboración y ayuda, tanto material como humana, que nos han prestado desinteresadamente, las siguientes entidades y las personas que las integran: GALLINA BLANCA AVICOLA (Madrid); INSTITUTO DOORN DE SANIDAD AVIAR (Holanda); LABORATORIOS INTERVET (Salamanca y Madrid); NANTA Y TROUW IBERICA S.A. Gracias a todos por su ayuda.

No queremos finalizar este apartado sin mencionar al gran número de compañeros y amigos que sin figurar en él, de una manera directa o indirecta han colaborado en su realización.

ÍNDICE

Abreviaturas y símbolos

1. Introducción	1
2. Revisión Bibliográfica	5
2.1. Etiología	6
2.2. Epizootiología y patogenia	10
2.3. Sintomatología	13
2.4. Lesiones macroscópicas	17
2.5. Lesiones microscópicas	20
2.6. Diagnóstico	25
2.7. Tratamiento y profilaxis	30
2.8. Inmunidad	36
3. Material y Métodos	40
3.1. Animales de Experimentación	41
3.2. Alojamiento y manejo de las aves	41
3.3. Tratamientos previos complementarios	43
3.4. Virus infectante	44
3.5. Protocolo de la Primera experiencia	45
3.6. Protocolo de la Segunda experiencia	50
3.7. Estudio clínico	56
3.8. Análisis serológicos	56
3.9. Sacrificios, necropsias y toma de muestras	58
3.10. Inclusión, obtención de cortes y tinción	59
3.11. Estudio de las preparaciones	60
3.12. Análisis microbiológicos	61
4. Resultados	62
4.1. Resultados de la primera experiencia	63
4.1.1. Resultados clínicos	63
4.1.2. Resultados serológicos	64
4.1.3. Resultados anatomopatológicos	69
4.1.3.1. Estudio macroscópico	69

4.1.3.2.	Estudio histológico	70
4.1.3.2.1.	Lesiones Renales	70
4.1.3.2.2.	Lesiones Traqueales	73
4.1.3.3.	Estudio inmunocitoquímico	76
4.1.3.4.	Estudio ultraestructural	77
4.1.3.4.1.	Lesiones renales	77
4.1.3.4.2.	Lesiones traqueales	80
4.2.	Resultados de la segunda experiencia	81
4.2.1.	Resultados clínicos	81
4.2.2.	Resultados serológicos	82
4.2.3.	Resultados anatomopatológicos	89
4.2.3.1.	Estudio macroscópico	89
4.2.3.2.	Estudio histológico	90
4.2.3.2.1.	Lesiones Renales	90
4.2.3.2.2.	Lesiones Traqueales	92
4.2.3.3.	Estudio inmunocitoquímico	93
4.2.3.4.	Estudio ultraestructural	94
4.2.3.4.1.	Lesiones renales	95
4.2.3.4.2.	Lesiones traqueales	96
4.3.	Iconografía	97
5.	Discusión119
6.	Conclusiones139
7.	Resumen143
8.	Summary146
9.	Bibliografía149

ABREVIATURAS

Å	Angström
C.R.D.	Chronic Respiratory Disease
D.I.C.T.-50	Dosis Infecciosa Citotóxica-50
D.I.E.-50	Dosis Infecciosa Embrión-50
d.p.i.	días post infección
E.	Enfermedad
H.	Harinas
H.A.	Hemoaglutinación
H.I.	Inhibición de la hemoaglutinación
I.B.D.	Infectious Bursal Disease
I.B.V.	Infectious Bronchitis Virus
I.F.I.	Inmuno Fluorescencia Indirecta
i.m.	intramuscular
L.T.	Laringotraqueitis Infecciosa
Mass	Serotipo Massachusetts del I.B.V.
M.G.	Mycoplasma Gallisepticum
M.S.	Mycoplasma Sinoviae
N.D.	NewCastle Disease
p.p.m.	partes por millón
Ref.	Referencia
sem.	semana
S.C.	Subcutáneo
S.L.C.	Suero del lote control
S.L.I.	Suero del lote infectado
S.N.	Seroneutralización
U.F.P.	Unidades formadoras de placa

1. INTRODUCCIÓN

La Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV) es una enfermedad vírica, producida por un coronavirus, que cursa principalmente con sintomatología respiratoria. Dependiendo de las cepas infectantes, grado de infección y estado de las aves afectadas, se pueden producir otras alteraciones y deficiencias en la reproducción.

La enfermedad fue diagnosticada por primera vez en Dakota del Norte (U.S.A.) por Schalk y Hawn en 1930, con posterioridad, el virus fue aislado en otras partes de los Estados Unidos de América, encontrándose distintos serotipos y variantes en todo el mundo. En Holanda, se diagnosticó la infección en 1947, observándose los primeros casos en la Península Ibérica en los años 50. A lo largo de la década de los 60 fue considerada ésta, como una enfermedad de distribución cosmopolita.

La Bronquitis infecciosa aviar, cursa en principio, como una afección de pollitos jóvenes aunque posteriormente, se diagnosticó en aves adultas y en otras especies distintas de las gallinas como son, codornices y faisanes.

La sintomatología general respiratoria, es más característica de la infección en pollos jóvenes y aves en crecimiento, como consecuencia de ésta se produce en los lotes infectados, descenso en el consumo de pienso, retraso en el crecimiento, leve aumento en el número de bajas y empeoramiento del índice de conversión. En aves adultas además de la citada sintomatología, se aprecia descenso notable en la producción de huevos, así como la puesta de huevos de deficiente calidad, tanto interna como externa.

Las pérdidas económicas, producidas en explotaciones avícolas infectadas por el I.B.V. han sido y son considerables, por lo que la lucha contra esta enfermedad sigue siendo uno de los puntos de investigación más importantes, dentro de la patología infecciosa aviar.

Por la etiología vírica de la infección y su gran difusión dentro de la producción avícola, la única forma eficaz de lucha, es el tratamiento preventivo, la profilaxis vacunal ha sido la única forma de evitar esta infección. Por este motivo a lo largo de la historia de la enfermedad se han producido distintos tipos de vacunas, que cada vez han sido más eficaces y fiables.

Desde las primeras vacunas vivas con cepas virulentas, vacunas vivas con cepas no virulentas, vacunas vivas con asociación de serotipos, vacunas inactivadas

simples o con varios serotipos y las vacunas atenuadas por pases seriados en embrión de pollo, utilizando cepas de gran poder antigénico, hasta las modernas vacunas inactivadas en suspensión oleosa. Las más utilizadas han sido las vacunas vivas atenuadas por pases seriados en embrión de pollo, obtenidas a partir de la cepa Massachusetts M-41, y su homóloga Holandesa (H), denominadas H-120 y H-52, dependiendo del número de pases realizados.

Debido al interés y actualidad de la Bronquitis infecciosa aviar, fundamentalmente basado en el incremento del número de casos diagnosticados de la enfermedad, las pérdidas económicas ocasionadas en el sector avícola, el grado de complicación de los programas de vacunación, la variedad y tipos de vacunas que están apareciendo en el mercado así como los nuevos aislamientos, cada vez más numerosos de variantes y serotipos distintos del IBV. Nos proponemos realizar un estudio experimental basado en la infección de aves con la cepa vacunal H-52, del virus de la Bronquitis infecciosa aviar (virus vivo atenuado por 52 pases en huevos embrionados).

Mediante los dos protocolos experimentales ideados, nos proponemos conocer en profundidad, la cinética lesional de la cepa mencionada, su posible nefropatogenicidad y su evolución en el tiempo, así como la trascendencia e importancia de las posibles lesiones renales en las

aves. Esto será acompañado del estudio anatomopatológico de las vías respiratorias de las aves infectadas, así como con el estudio serológico e inmunocitoquímico con el fin de comprobar la respuesta inmunitaria.

La cepa de virus elegida para el estudio experimental, está lógicamente contraindicada como primovacuna-
ción en los protocolos vacunales utilizados en explotacio-
nes avícolas industriales, ya que para su uso es necesaria
la primovacunación con cepas más atenuadas del mismo sero-
tipo Mass o variedad H-120, de escaso poder patógeno y de
menos capacidad inmunógena.

En la actualidad, se han planteado ciertas con-
troversias, en cuanto a la patogenicidad de la cepa vacu-
nal H-52, aunque no en cuanto a su poder inmunológico.
Esto nos ha motivado a idear los protocolos experimentales
que en esta tesis proponemos, con el fin de profundizar en
el estudio de la nefropatogenicidad de la cepa en cuestión
y clarificar, si fuera posible, la controversia planteada
en cuanto a la patogenicidad de la cepa H-52. Pues como se
refleja en la revisión bibliográfica realizada, está cien-
tíficamente demostrada, la idónea protección e inmunidad
que adquieren las aves vacunadas con la variedad H-52 del
IBV.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ETIOLOGÍA

2.2. EPIZOOTIOLOGÍA Y PATOGENIA

2.3. SINTOMATOLOGÍA

2.4. LESIONES MACROSCÓPICAS

2.5. LESIONES MICROSCÓPICAS

2.6. DIAGNÓSTICO

2.7. TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

2.8. INMUNIDAD

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En este apartado, pretendemos realizar una revisión general de la Bronquitis Infecciosa Aviar, ya que un conocimiento amplio de la enfermedad, nos permitirá establecer y justificar el trabajo experimental que proponemos, así como los objetivos del mismo.

2.1. ETIOLOGÍA

El agente causal de la Bronquitis Infecciosa Aviar (I.B.V.) es un virus RNA de la familia Coronaviridae, género coronavirus, del que se han indentificado distintas variedades antigénicas (72, 115, 250). El virus fue observado al microscopio electrónico en 1948 (130). Más tarde, se demostró que la partícula vírica es capaz de atravesar filtros de 0.1 μm , denotándose una considerable pérdida de título (93, 240).

El I.B.V. posee una morfología esférica característica, apreciándose en ocasiones cierto pleomorfismo, dependiendo del medio de cultivo en que se encuentre. En la periferia presenta unas proyecciones características, dispuestas uniformemente en forma de corona. Su tamaño es variable, y el diámetro total de la partícula vírica, in-

cluyendo las citadas proyecciones, oscila entre 80 y 200 nm (16, 37, 38, 70, 176, 205).

Del I.B.V. se han estudiado sus distintas propiedades y características. En un principio se consideraba a éste como un virus no hemoaglutinante, pero al ser tratado con fosfolipasa C, la partícula vírica, adquiere propiedades hemoaglutinantes (20, 106).

Desde su descubrimiento hasta nuestros días el I.B.V. ha sido considerado, extremadamente lábil, ya que se inactiva a temperaturas y tiempos moderados (56°C durante 15 minutos). Los ácidos al igual que las elevadas temperaturas ejercen un efecto nocivo sobre el I.B.V. (130, 164).

La demostrada labilidad del I.B.V. hace que el virus sea muy sensible a los desinfectantes comúnmente utilizados en ganadería, ya que a temperatura ambiente con una concentración de fenol del 1%, el virus se inactiva (251).

Algunos estudios inmunológicos, demuestran la presencia de tres antígenos solubles en el virus infectante extraído de líquido alantoideo y membrana corioalantoidea por la técnica de Difusión en Gel de Agar (A.G.P.) (176, 235).

Con el avance de las técnicas virológicas e inmunológicas, se han aislado e identificado distintas cepas o serotipos del I.B.V.

- Cepas Americanas: Massachusetts (Mass-41), Beaudete (B-42), Connecticut, Florida, Clark-333, Arcansas-99, Gray, Iowa-97, Iowa-609, Delaware-6897, Delaware-2868, J.M.K., Holte, Georgia, New Hampshire (17, 18, 56, 57, 58, 70, 90, 95, 103, 104, 120, 136, 137, 147, 148, 149, 150, 173, 241, 251, 265).
- Cepa Australina, cepa T. (65).
- Cepas variantes Holandesas: D-207, D-212, D-174, D-1466, D-3128, D-3896, (87, 88, 166, 181).
- Cepas japonesas: Takeshima, 7073, 0353, Saw, Tochigi, Shizuoka, S.S., Kanagawa, B-42, KH, A5968, (121, 189).
- Cepas aisladas en el Reino Unido (51, 52).
- Cepas Italianas, Nefrotóxicas (262).
- Cepas Francesas (209).
- Cepas Canadienses (167, 192).
- Cepas Finlandesas (93).

A partir de la cepa Massachusetts y su homóloga Holandesa (H), se obtienen los serotipos vacunales, atenuados por pases seriados en embrión de pollo, H-120 y H-52 (182, 184, 222). Estos serotipos vacunales confieren protección a las aves, produciendo una inmunidad cruzada frente a las cepas variantes Holandesas y los serotipos:

Massachusetts, Connecticut, Delaware y Gray, no induciendo inmunidad frente a la cepa T. Australiana (76, 77, 78, 102, 132).

Para el estudio, aislamiento, conservación y multiplicación del I.B.V. se utilizan distintos medios de cultivos celulares, que permiten la replicación del virus. Las líneas celulares utilizadas son principalmente de riñón, pulmón, tráquea e hígado de embriones de pollo y células vero (4, 7, 41, 45, 47, 50, 70, 217, 224).

A partir de 1975 se realizaron numerosas investigaciones sobre el pH de cultivo y formación de placas en los medios celulares infectados con I.B.V. (1, 26, 74, 109, 128, 130, 211).

De igual forma, se investigó la infección en animales de experimentación, tales como ratones, monos y murciélagos, no obteniéndose resultados significativos. Los hospedadores de laboratorio más utilizados, son los embriones de pollo, en los que la replicación del virus, así como las lesiones producidas, son extremadamente significativas (73, 130, 164).

2.2. EPIZOOTIOLOGÍA Y PATOGENIA

La Bronquitis Infecciosa Aviar es una enfermedad de distribución cosmopolita, que se manifiesta en todos los países del mundo con sintomatología similar y etiología variable, dependiendo de las cepas de virus de campo de la región. La diseminación del virus se produce, con gran rapidez y facilidad de una región a otra, a través del aire, por los propios portadores naturales y por el comercio y transporte de aves y sus productos (164).

La patogenicidad del I.B.V. se manifiesta prácticamente en todas las especies de aves domésticas, gallinas, faisanes, perdices y codornices (13, 171). En pavos y gallinas de Guinea, tras la inoculación intravenosa del virus y posterior localización tisular del mismo no se ha conseguido reproducir el cuadro sintomático ni lesional de la enfermedad (5, 93).

Al producirse pases seriados del virus en embriones de pollo, tras 100 ó 200 pases, se denota una pérdida del poder patógeno del virus infectante, no reproduciéndose la sintomatología típica de la infección en aves inoculadas con este virus atenuado, que estimula el sistema inmunitario del ave infectada manifestándose un aumento en la inmunidad local y circulante (105, 168).

Cuando las aves sufren una infección por cepas atenuadas de I.B.V., el virus persiste en los tejidos del sistema respiratorio y secreciones, al menos 5 semanas después de la infección. Se han descrito casos de aves, que tras infecciones repetidas con I.B.V., eliminan virus en las heces hasta 150 días después de la infección (130, 154).

El I.B.V. infecta inicialmente las células epiteliales de las vías respiratorias altas, propagándose después hacia las células de tráquea y pulmones, donde se replican nuevamente desde las 24 horas hasta el 8º d.p.i. Tras este período, pasa por vía sanguínea (viremia) y por difusión, desde los sacos aéreos a otros órganos (ovarios, oviducto, riñones, intestino, bazo, bolsa de Fabricio, etc.) donde se multiplica, lesionando los tejidos infectados (67, 91, 101, 214).

La transmisión o difusión del I.B.V., además de producirse de forma vertical (de las reproductoras a su descendencia) se realiza entre las aves de un mismo lote por vía aerógena, transmisión horizontal. Dada la difusibilidad del virus, éste infecta a todas las aves de un mismo lote rápidamente. Pollos libres del virus, puestos en contacto con otros infectados, reprodujeron los síntomas típicos de la infección dos días más tarde (125, 164, 233).

Numerosos autores demuestran la propagación de la infección a través del aire (en las partículas de polvo y gotas de agua en suspensión). Por lo que lotes de aves libres del virus, se ven infectadas por estar próximas a lotes infectados (114).

La infección se propaga igualmente por el tráfico de personal y utillaje entre las granjas de producción avícola. Por lo que son consideradas de extrema importancia para la prevención de la enfermedad, las medidas de aislamiento y los sistemas de crianza "todo dentro, todo fuera" (70, 212).

En infecciones experimentales, el período de incubación del I.B.V. es de 18 a 72 horas, dependiendo de la concentración vírica inoculada y la vía de administración utilizada. El tiempo de incubación, en caso de infecciones naturales por vía aerógena, oscila entre las 36 y 72 horas (49, 130, 141).

Cuando la infección se produce en una explotación avícola, se ven afectadas la mayoría de las aves del lote alcanzándose una morbilidad de un 60 a un 98%, y mortalidad variable dependiendo de la cepa de I.B.V. infectante y estado inmunitario de las aves (49, 146, 164).

En el pronóstico de la infección (morbilidad, mortalidad y pérdidas económicas) juegan un papel importante las condiciones de manejo (ventilación, temperatura, humedad, densidad de aves, etc.) practicadas en la nave, por la importancia que tienen las complicaciones secundarias que puedan producirse, ya que la mortalidad puede oscilar entre un 25 y un 50%, en función de las complicaciones microbianas secundarias (28, 225, 226, 233).

2.3. SINTOMATOLOGÍA

La sintomatología que presentan las aves infectadas por I.B.V. es variable y depende de la cepa de virus infectante, edad de las aves, estado inmunitario de éstas y condiciones de manejo.

En aves jóvenes, la sintomatología es característica, manifestándose ésta con evidente dificultad respiratoria; estornudos, ruidos y estertores traqueales, acompañado de destilación nasal y ojos húmedos (febriles). El estado general de las aves, es de depresión y falta de vitalidad con inapetencia, descenso del consumo de pienso, pérdida de peso y retraso en el crecimiento. En aves de dos o tres semanas de edad el cuadro sintomático se ve agravado por infecciones bacterianas secundarias aprecián-

dose un considerable aumento en la mortalidad media del lote (156, 214, 239).

Cuando la infección por I.B.V. se produce en pollos en crecimiento, de más de cuatro o cinco semanas de edad, la enfermedad se manifiesta con la sintomatología respiratoria descrita. En algunos casos estos síntomas pueden pasar desapercibidos si no se observan las aves cuidadosamente, cuando esto ocurre, se aprecian únicamente las secuelas de la infección, escasa mortalidad, descenso de consumo, pérdida de peso y retraso de crecimiento (208).

La temperatura ambiente, no tiene gran incidencia en la presentación de la Bronquitis Infecciosa Aviar, cuando afecta principalmente a pollos en crecimiento y aves adultas. La infección puede presentarse en cualquier época del año, aunque el cuadro sintomático general se agrava considerablemente cuando las condiciones ambientales y de manejo (humedad, temperatura, ventilación, etc.) no son las adecuadas (212, 213).

La infección por I.B.V. en gallinas adultas, ya sean éstas ponedoras o reproductoras, se manifiesta en una primera fase, que puede ser durante el período de cría, recría o producción, con la sintomatología respiratoria característica ya descrita. Si la infección o reinfección

ocurre en la fase de producción, se provoca en las aves una situación de stress, disminución del consumo de pienso con el consiguiente descenso en la producción de huevos, pudiendo llegar a disminuir la puesta hasta un 50%, dependiendo del momento del ciclo productivo, estado inmunitario de las aves y complicaciones secundarias que puedan presentarse. Las aves infectadas durante la última fase del ciclo de producción o durante la muda, manifiestan un descenso en la producción en el siguiente ciclo productivo (196, 197, 226).

Al producirse la infección en un lote de gallinas ponedoras, antes o durante el ciclo productivo, además de una disminución en la producción de huevos, que se recupera en dos o tres semanas, alcanzándose de nuevo la tasa de producción normal, se produce un aumento en el número de huevos de mala calidad. Los huevos manifiestan alteraciones externas con deformaciones características en la cáscara, huevos asimétricos, deformes, en fáfara, con cáscara rugosa, deficiencias en la calcificación y fragilidad excesiva. De igual forma se aprecian deficiencias en la calidad interna del huevo, el albumen se encuentra indefinido, disminuido de volumen y altura, excesivamente fluido, la yema presenta deficiencias en la pigmentación (28, 53).

Las alteraciones en la calidad y morfología de los huevos, aparecen por norma general, dos o tres semanas después de haberse manifestado la sintomatología respiratoria. Estudios experimentales demuestran que tras la inoculación del I.B.V. en las aves y la aparición de huevos con alteraciones externas e internas, aumenta el porcentaje de gallinas cluecas (64, 194).

En gallinas reproductoras, además de la sintomatología ya descrita, se produce un notable descenso de la fertilidad, aparición de huevos claros y muerte embrionaria. Al ser una infección de transmisión "horizontal y vertical", los huevos procedentes de gallinas infectadas por el I.B.V. son portadores del virus, produciéndose el nacimiento de pollitos infectados o la muerte embrionaria dependiendo de la cepa infectante (173).

En la sangre de las aves infectadas por el I.B.V. se aprecia: leucopenia durante los 3 primeros días de la infección, seguida de leucocitosis que disminuye a partir del 7º u 8º d.p.i., hasta alcanzarse los valores normales después de 15º d.p.i. (130, 131).

Los síntomas descritos pueden verse complicados por los producidos por otros gérmenes oportunistas secundarios que aprovechan el estado de enfermedad de las aves y la inmunodepresión existente, para infectar los órganos

y tejidos previamente lesionados por el virus. Bacterias, Micoplasmas, Hongos o incluso otros virus que habían permanecido latentes, infectan los órganos lesionados, principalmente las vías respiratorias altas agravándose la sintomatología respiratoria, así mismo se produce un incremento de la mortalidad, retraso del crecimiento y descenso de las producciones y empeoramiento de los índices zootécnicos, dependiendo del tipo de producción de que se trate (140, 141).

2.4. LESIONES MACROSCÓPICAS

En la necropsia de aves infectadas por I.B.V. se observan lesiones localizadas principalmente en el sistema respiratorio.

Además de una rinitis serosa, en algunas ocasiones se observa congestión y edema de senos nasales, conjuntivitis catarral, traqueitis con exudado seroso e incluso caseoso, dependiendo de los gérmenes complicantes. Según la evolución del proceso puede producirse aerosaculitis con opacidad de sacos aéreos con exudado caseoso y congestión pulmonar (29, 130).

En aves muertas por I.B.V. suele encontrarse exudado caseoso en la parte baja de la luz traqueal y bronquial (164).

En el aparato reproductor de gallinas infectadas por I.B.V. es difícil apreciar lesiones macroscópicas que justifiquen las alteraciones internas y externas que se observan en los huevos. Se han descrito alteraciones morfológicas como leve regresión del oviducto y excesiva fragilidad del mismo. La longitud total del oviducto y su peso pueden encontrarse ligeramente disminuidos en relación con los de gallinas no infectadas, aunque con el tiempo, estas diferencias se recuperan, llegando a alcanzar el oviducto su estado y tamaño normal (63, 226, 252).

Algunos autores han descrito lesiones graves en el tercio medio del oviducto de aves infectadas por I.B.V. aunque otros consideran que las alteraciones más severas se producen en el istmo y en el magnum del oviducto, siendo este punto muy discutido, ya que estas lesiones no aparecen de forma sistemática en todas las aves infectadas (62, 63, 151).

Cuando la infección ocurre por transmisión vertical, puede producirse la muerte embrionaria entre el 12 y el 19 día de incubación. En los embriones abortados se aprecia una serie de lesiones características dependiendo

de la virulencia de la cepa infectante. Dentro de estas lesiones se pueden destacar: Retraso del desarrollo embrionario (enanismo); rotura de la cámara de aire; abortos con embriones en posición esférica; amnios adherido al embrión, saco vitelino retraído y localizado en el exterior del embrión; carga de uratos en riñones y uréteres y rotura de la cavidad abdominal con salida de su contenido (130, 174).

El cuadro de nefritis-nefrosis, como lesión renal causada por algunas cepas nefrotóxicas del I.B.V., fue descrito por primera vez en 1963, en aves infectadas por la cepa T. (Australiana). Macroscópicamente, la lesión renal se caracteriza por: disminución de la consistencia, palidez y tumefacción, que se producen en estos órganos. En fases avanzadas se pueden observar en riñones y uréteres, acúmulos de uratos. Estas lesiones macroscópicas, aparecen igualmente en aves infectadas por las cepas Holte y Gray del I.B.V. (66, 157, 246, 248).

En infecciones experimentales realizadas con estas cepas, se observa a los 7º d.p.i. tumefacción renal, con coloración gris turbia y depósito de uratos en riñones y uréteres, con lo que el cuadro Nefritis-Nefrosis, se puede reproducir de forma experimental (157, 230, 248).

2.5. LESIONES MICROSCÓPICAS

Histopatológicamente lo más característico que aparece en aves infectadas por el I.B.V., son las lesiones localizadas en las vías respiratorias altas (senos nasales y mucosa traqueal), siendo discretas las alteraciones pulmonares (225, 250, 253).

Las alteraciones microscópicas que aparecen en las tráqueas, en casos de infecciones agudas de "Bronquitis Infecciosa Aviar", se caracterizan por la presencia de infiltrados inflamatorios y edema en la mucosa y submucosa; aunque por norma general no se producen ulceraciones ni pérdida del epitelio. En la luz traqueal se aprecia un exudado con elementos celulares descamados y en ocasiones deciliación epitelial. Así mismo se describe en la mucosa hiperplasia del epitelio (94, 130). Por otro lado en fases evolutivas correspondientes a los 4 ó 5 d.p.i., se produce proliferación de células mononucleares en la lámina propia, quedando intacto el epitelio cilíndrico ciliado, aunque algunos investigadores describen hiperplasia de la mucosa (164, 214, 215).

En la fase inmune, a partir del 15-18 d.p.i. se aprecia restauración total de la mucosa, así mismo a partir de las 3 ó 4 semanas post infección no se observan lesiones microscópicas en la tráquea (215).

En los pulmones se observa leve neumonía con congestión pulmonar e infiltración linfocitaria peribronquiolar (130).

En las revisiones bibliográficas realizadas en los últimos años, sobre patología renal de las aves (229, 230), se determina como lesión característica de las infecciones producidas por algunas cepas de I.B.V., un cuadro de nefritis intersticial que evoluciona hacia un proceso de nefrosis (119, 221); sin embargo también puede observarse este síndrome en infecciones por el virus de la E. de Gumboro, por Picornavirus, clamidias, bacterias y hongos (130, 142, 143, 144, 188, 195, 202, 227, 228, 230). En estas infecciones, al igual que en los casos de Bronquitis Infecciosa Aviar, se produce un cuadro de nefritis intersticial con posterior degeneración, fibrosis y atrofia renal que evoluciona hacia un proceso de urolitiasis, lesión que puede llegar a ser fatal (55).

La nefritis intersticial, se aprecia en aves infectadas por algunas cepas I.B.V., que además de las lesiones respiratorias ya descritas producen estas lesiones renales, que complican el cuadro patológico, agravando el proceso y el pronóstico de la infección (65, 67, 230).

En los primeros casos diagnosticados de I.B.V. que cursaban con cuadros de nefritis intersticial y poste-

rior nefrosis con acúmulo de uratos en túbulo renales y uréteres, sin lesiones glomerulares, se aislaron las cepas Holte, Gray y la cepa T (Australiana). Posteriormente se aislaron otras cepas y variantes del I.B.V. que producen las lesiones renales mencionadas, en los distintos países (2, 42, 157, 201, 210, 215, 225, 227, 230, 262).

En 1976 la cepa vacunal H-52, variedad Holandesa, homóloga del serotipo Massachusetts del I.B.V., es considerada como potencialmente nefropatógena, cuando se administra a altas dosis por vía intra-traqueal, reproduciéndose igualmente las lesiones respiratorias propias de la infección (182). Otros autores confirmaron la nefropatogenicidad de ésta y otras cepas tanto en pollos jóvenes como en ponedoras adultas (61, 108, 153).

La complicación del proceso respiratorio con la insuficiencia renal que se produce por el cuadro de nefritis intersticial, que progresa hacia un cuadro de nefrosis con presencia de uratos en túbulo y uréteres renales, distensión de uréteres, degeneración tubular y fibrosis; hace que las infecciones por serotipos nefropatógenos del I.B.V. sean considerados de peor pronóstico que las infecciones por cepas no nefropatógenas (203).

La reproducción experimental del síndrome nefritis-nefrosis producido por el I.B.V. se ha realizado ino-

culando variedades o serotipos nefropatógenos como la cepa T (Australiana). Con estas experiencias se demostró que en la fase aguda, la médula renal es la parte más afectada con presencia de infiltrados de células linfoides y heterófilos.

En la fase crónica, se observa dilatación de túbulos renales con presencia de uratos y posterior nefrosis y fibrosis intersticial, apareciendo aumentado el número de figuras mitóticas en células epiteliales y la carga de uratos (14, 19, 32, 60, 67, 68, 159, 210, 216).

La utilización de la técnica de P.A.S. revela la presencia de corpúsculos de Russel en las células plasmáticas que se encuentran en la zona medular del parénquima renal, durante la fase crónica de la infección (230, 231).

Otros estudios comparativos, entre distintas cepas y variantes del I.B.V. confirman la nefropatogenicidad de los serotipos citados, algunos autores inoculando la cepa T vía intravenosa, o en el agua de bebida demuestran que se produce una elevada mortalidad, reproduciéndose el cuadro sintomático y lesiones descritas, que evoluciona hasta la producción de un proceso de gota visceral con marcada fibrosis y degeneración tubular (5, 15, 39, 96, 153, 229).

Dada la importancia que las infecciones por I.B.V. tienen en gallinas ponedoras y con el fin de justificar alteraciones internas y externas de los huevos puestos por aves infectadas, se han realizado numerosos estudios histológicos de los oviductos. Encontrándose una reducción en la altura de las células epiteliales con hipoplasia y atrofia, disminuyendo tanto el número de células como de cilios. Otros autores describen lesiones que justifican la hipofuncionalidad de glándulas en la zona media del oviducto. En la lámina propia y estroma peritubular se observa una gran infiltración linfocitaria y de heterófilos así como la presencia de evidentes formaciones linfoides (152, 164, 221, 226).

Estudios realizados sobre las lesiones histológicas de oviductos de pollitas expuestas al I.B.V. por aerosol, demuestran la presencia de infiltrados linfoides en el oviducto al tercer día de la infección y áreas focales de linfocitos a los 11 d.p.i. (62).

En la actualidad se considera como lesión más importante del oviducto, la hipoplasia que se aprecia a partir del 23 d.p.i., responsable de las alteraciones morfológicas que aparecen en los huevos (215).

Tras la inoculación de huevos embrionados con cepas patógenas de I.B.V. así como en embriones proceden-

tes de aves infectadas por el virus se observan las siguientes lesiones: congestión y manguitos perivasculares; necrosis hepática a los 6 d.p.i.; neumonía con congestión pulmonar e infiltración inflamatoria; presencia de exudado seroso en sacos aéreos; nefritis intersticial con edema y distensión de túbulos contorneados proximales; edema en membranas corioalantoideas y amnióticas (46, 69, 130, 138, 174).

El estudio de la patología embrionaria en casos de infecciones de I.B.V., es considerado de gran valor para el diagnóstico y justifica los abortos que se producen en huevos procedentes de gallinas infectadas (174).

2.6. DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico de la Bronquitis Infecciosa Aviar, las pruebas laboratoriales son decisivas.

DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO: El aislamiento e identificación del agente causal de la infección es determinante del padecimiento de la misma, por lo que este tipo de diagnóstico es considerado el más fiable (7, 59).

El aislamiento de I.B.V. en aves infectadas, se realiza comúnmente a partir de exudados y macerados de

vísceras, convenientemente tratados para inocularse en medios de cultivos virales (16, 76):

- * Huevos embrionados (178).
- * Cultivos celulares (1, 50, 74, 224).
- * Animales de experimentación (118).

En estos medios de cultivo, el virus es capaz de replicarse produciendo una serie de lesiones específicas que permiten la identificación del virus problema (40).

Existen además técnicas histológicas e inmunocitoquímicas, específicas, por las que se puede visualizar la presencia de antígenos virales en cultivos y órganos infectados (155, 224).

Dada la complejidad en la realización de este tipo de diagnóstico, aparecieron otras técnicas analíticas, capaces de confirmar de forma eficaz la infección.

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: Este tipo de diagnóstico en infecciones por I.B.V., se basa en demostrar por técnicas serológicas, la presencia de una elevada tasa de anticuerpos circulantes en aves sospechosas de padecer la infección (178).

En caso de tratarse de aves vacunadas contra I.B.V., que deben de tener anticuerpos vacunales, lo que se pretende es estudiar la "seroconversión" o variaciones de la cantidad de anticuerpos circulantes, en distintos momentos de la vida de las aves. En caso de apreciarse una variación notable en el nivel de anticuerpos, no imputable a una vacunación, se puede atribuir este hecho a una infección por virus de campo (237, 248).

La gran cantidad de serotipos distintos identificados de I.B.V., con su consiguiente variedad antigénica hace que sea necesario detectar los distintos tipos de anticuerpos que se pueden producir frente a cada una de las variedades antigénicas de I.B.V. (89, 90, 163).

Algunos autores han observado una notable capacidad neutralizante del suero de aves infectadas con I.B.V., quedando el suero inactivado al mantenerse a 55°C durante 30 minutos (18, 75, 110, 173).

En 1974 se demostró que los anticuerpos circulantes alcanzan su máximo nivel en el suero entre la primera y tercera semana después de la inoculación de I.B.V., disminuyendo paulatinamente después de este período (109).

Las técnicas serológicas utilizadas más comúnmente para el diagnóstico y control de I.B.V. son las siguientes (112, 138):

- Seroneutralización (S.N.) (75).
- Precipitación en Gel de Agar (A.G.P.) (99, 258).
- Inmunofluorescencia indirecta (I.F.) (27, 73, 155, 175).
- Hemoaglutinación (H.A.) (7, 16).
- Inhibición de la Hemoaglutinación (H.I.) (6, 10, 117, 134).
- Fijación de complemento (F.C.) (25).
- Enzimoimmunoensayo (ELISA) (34, 35, 190, 199, 264).

De las técnicas serológicas enunciadas unas son CUALITATIVAS (A.G.P., H.A.) y otras CUANTITATIVAS, que permiten conocer la cantidad de anticuerpos circulantes. Hoy en día las más utilizadas son las segundas y de éstas la Inhibición de la Hemoaglutinación y el test ELISA, que por su fiabilidad, rapidez y sencillez han sido adoptadas por la mayoría de los laboratorios de diagnóstico y control (24, 97, 162, 200, 245).

DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO: Se basa en la observación de lesiones anteriormente citadas en los apartados 2.4. y 2.5.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL: Siempre que se realice un diagnóstico sintomático de la enfermedad, ha de descartarse la posibilidad de que se trate de otras infecciones que cursen con sintomatología respiratoria similar, como ocurre en el caso de: E. de Newcastle, Laringotraqueitis infecciosa, coriza u otros problemas causados por un manejo inadecuado (21).

Comúnmente la E. de Newcastle cursa de forma más severa que la infección por I.B.V., apreciándose marcada sintomatología nerviosa y digestiva (130).

La laringotraqueitis se disemina de forma más lenta que el I.B.V. pero cursa con sintomatología respiratoria más grave y severa, notándose un considerable aumento en el número de bajas (164).

El coriza infeccioso es fácil de diferenciar por sus síntomas y lesiones al igual que la colibacilosis y la Enfermedad Crónica Respiratoria (C.R.D.) que pueden presentarse como procesos secundarios complicantes de un proceso de I.B.V. (140).

En la actualidad continúan estudiándose nuevas técnicas de diagnóstico altamente especializadas como es el estudio de la motilidad de los cilios de la mucosa tra-

queal y su relación con el estado inmunitario de las aves (8, 191, 232).

2.7. TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

En la actualidad, no se conoce un tratamiento etiológico específico para las infecciones por I.B.V., aunque siempre está indicado realizar un tratamiento sintomático, con el fin de reducir la sintomatología y evitar complicaciones secundarias.

En aves que padezcan la infección es aconsejable aumentar la temperatura de la nave, favorecer la ventilación, evitar las situaciones de stress, aumentar ligeramente la ración de pienso y mantener una correcta humedad relativa. De igual forma, la administración de un tratamiento antibiótico preventivo, de amplio espectro, evitará la proliferación de gérmenes (E. Coli, Mycoplasmas, pasteurellas, etc.) que pueden complicar el proceso. La administración de un complemento polivitamínico, favorece la pronta actuación del sistema inmunitario ya que los propios anticuerpos producidos por el ave va a ser el único mecanismo capaz de neutralizar la infección, impidiendo que ésta se haga crónica e irreversible (83, 130).

Las medidas profilácticas, juegan un papel importantísimo en evitar las infecciones por I.B.V. El manejo adecuado, así como mantener un estricto aislamiento, con programas de crianza "todo dentro-todo fuera", es la única forma de evitar la infección en las aves, siempre que éstas vengan libres de virus; por otro lado, los modernos programas de vacunación e inmunización se hacen indispensables hoy día para la lucha contra esta enfermedad (79, 100, 165, 180, 238).

La primera inmunización en la historia de la Bronquitis Infecciosa Aviar, fue realizada en 1941 en la región de Nueva Inglaterra (U.S.A.), inoculándose el I.B.V. a un pequeño número de pollos, diseminándose el virus por todas las aves de la explotación de forma natural, esto se realizó entre las 7 y 12 semanas de edad de las aves, que era cuando se había observado que se producía la infección natural por el virus de campo (243).

Con esta experiencia se observa, que los problemas por infecciones de I.B.V. eran más graves en otras aves de la zona, que en las que estos investigadores, habían inoculado. Al realizar la inmunización a esta edad, se conseguía una protección suficiente de las aves y en ponedoras se conseguía alcanzar el pico de puesta sin problemas de infecciones por I.B.V.

Posteriormente, se analizó y valoró el riesgo de este procedimiento, siendo considerada esta técnica como peligrosa, ya que se utilizaban cepas patógenas del virus de campo y las aves desarrollaban de forma controlada la sintomatología, pudiéndose diseminar la enfermedad por una zona que estuviera libre de ella.

Con la aparición de estos inconvenientes, se trató de encontrar cepas "no virulentas", que confirieran inmunidad a las aves sin riesgo de producir y diseminar la enfermedad (169).

Se utilizaron vacunas inactivadas con formalina al 0,2%, y se realizaron experiencias en pollos con estas vacunas, obteniéndose resultados serológicos variables a las pocas semanas de su administración, lo que demostraba que las aves no producían una inmunidad suficiente y por consiguiente eran susceptibles de ser infectadas por el virus de campo (54, 194, 236, 249).

En 1968 se comprobó que las vacunas inactivadas inducían cierta inmunidad local, principalmente en el aparato reproductor, pero no protegían el sistema respiratorio, de forma eficaz (100, 194).

Con posterioridad se ratificaron estas experiencias llegando a la conclusión de que las vacunas comercia-

les inactivadas, que habían aparecido hasta este momento, no eran capaces de proteger a las aves suficientemente frente al I.B.V. (122, 219, 256).

En la actualidad, además de las vacunas inactivadas, se utilizan vacunas vivas, atenuadas por pases sucesivos en embrión de pollo, lo que hace perder virulencia a la cepa de virus empleada en la fabricación de estas vacunas (Mass. 41 y H.) (116).

Las vacunas vivas atenuadas son administradas varias veces a lo largo de la vida de las aves, con el fin de conseguir el efecto "booster", lo que permite que se potencie la inmunidad tras varias aplicaciones, haciéndose ésta, más elevada y duradera (107, 222).

Los principales objetivos que pretende, el instaurar un programa de vacunación frente a I.B.V. en pollos son:

- Evitar la infección por virus de campo, manteniendo un nivel de anticuerpos suficiente durante la vida de las aves.
- Mejorar los rendimientos productivos del lote.
- Conferir anticuerpos frente a I.B.V. a la descendencia, en su caso.

Esto sólo se conseguirá si se practican las vacunaciones y revacunaciones suficientes con las cepas de virus necesarias y por la vía de inoculación más adecuada (23).

Dada la variedad antigénica existente entre los distintos serotipos del I.B.V. y que el serotipo Massachusetts es el que posee mayor relación antigénica con el resto de cepas aisladas, induciendo una inmunidad cruzada en las aves, este serotipo es utilizado en la mayoría de las vacunas vivas atenuadas (86, 102, 123, 159, 218, 263).

En 1961 se estudió la patogenicidad de la cepa Mass-41, después de 300 pases seriados en embriones de pollo y se observó que antes del pase 144, al inocular el virus obtenido, en aves sanas que no habían estado en contacto con el I.B.V., no se reproducía el cuadro respiratorio típico de la Bronquitis Infecciosa (168).

Tras estas experiencias se comenzaron a comercializar vacunas vivas atenuadas, a partir de la cepa Mass-41, apareciendo así las cepas vacunales H-120, de escaso poder patógeno e inmunógeno, y la cepa H-52, de mayor poder patógeno e inmunógeno, no recomendándose su uso como primovacunación (184, 187).

La aplicación de un programa de vacunación con vacunas vivas atenuadas H-120 y H-52 confiere a las aves una inmunidad circulante elevada así como una inmunidad local, que no se consigue con la utilización de vacunas inactivadas.

Existen igualmente vacunas específicas frente al resto de variedades y serotipos de I.B.V. conocidos. La eficacia de vacunas bivalentes o polivalentes que incluyen dos o más serotipos distintos de I.B.V. está igualmente constatada y se recomienda su uso en zonas donde esté demostrada la presencia de estos serotipos variantes del I.B.V. (33).

Otro de los puntos a tener en cuenta a la hora de establecer el programa de vacunación frente a I.B.V. son los métodos, momentos y vías de administración de la vacuna, siendo las técnicas más utilizadas para la vacunación frente a I.B.V. (9, 113):

- Vacunación por Spray (82, 254).
- Instilación óculo-nasal (84).
- Aplicación en el agua de bebida.

La elección de la vía de administración, dependerá de las exigencias de las aves y del tipo de explotación de que se trate, por lo que se utilizará, valorando

sus ventajas e inconvenientes la vía de inoculación más adecuada en cada caso (128, 186).

Dado el complejo programa de vacunación requerido hoy día, es usual, aplicar conjuntamente vacunas frente a distintas enfermedades, así por ejemplo es corriente realizar la vacunación conjunta frente a I.B.V. y N.D., consiguiéndose buenos resultados en la práctica, con una correcta respuesta inmunitaria. Este punto ha sido discutido por algunos autores que recomiendan la separación de unos días, entre la aplicación de ambas vacunas, al poderse producir interferencia en la respuesta inmunitaria, provocada por la inoculación conjunta de antígenos diferentes (220, 238, 250, 255).

2.8. INMUNIDAD

En las aves infectadas por I.B.V., se produce una respuesta inmunitaria específica que condiciona la evolución y pronóstico de la infección. La inmunidad la podemos clasificar en:

- INMUNIDAD PASIVA
- INMUNIDAD ACTIVA

INMUNIDAD PASIVA: Los huevos procedentes de aves con anticuerpos frente a I.B.V. son portadores de anticuerpos, por lo que el embrión durante el período de incubación y el pollito durante los primeros días de vida, tendrá una protección natural adquirida a través del vitelo (81, 162, 259).

Los niveles de inmunidad pasiva, son elevados en pollitos procedentes de reproductoras correctamente inmunizadas, descendiendo rápidamente durante el transcurso de las dos primeras semanas de vida de los pollos, siendo este momento cuando las aves son más susceptibles de contraer la infección (82, 234).

INMUNIDAD ACTIVA: Las aves que han pasado la infección de I.B.V., bien sea por contacto con el virus de campo (infección natural), o por la administración de vacunas (infección controlada), se hacen resistentes a una nueva infección con cepas homólogas, no produciéndose la enfermedad con el cuadro sintomático y lesional habitual, con lo que se evitan las consecuencias de la segunda infección (127).

Las aves que sufren este tipo de inmunización activa, natural o artificial, con cepas de I.B.V. vivas, atenuadas o muertas, adquieren un elevado nivel de anticuerpos frente a la enfermedad, suficiente para resistir

la infección por el virus de campo, después de la inmunización. Con el paso del tiempo, los anticuerpos producidos, ya sean éstos circulantes o locales, van disminuyendo, por lo que para conseguir una inmunidad suficiente y duradera es necesario realizar inmunizaciones seriadas a lo largo de la vida de las aves (113, 243, 261).

En la inmunización activa, además de los anticuerpos circulantes, juegan un papel importante, en las infecciones por I.B.V., los anticuerpos locales o inmunidad tisular, en la tráquea y otras regiones de las vías respiratorias altas, ya que la vía de infección del I.B.V. es fundamentalmente aerógena (160).

La inmunización con cepas vivas, atenuadas por pases seriados en embriones de pollo, donde se ve disminuida la virulencia del I.B.V., proporciona una inmunidad local suficiente en tráquea y mucosas de las vías respiratorias altas, capaz de combatir la entrada de otros agentes virales con similares características antigénicas al virus vacunal (113).

Se ha de tener en cuenta que la cepa vacunal del I.B.V. Mass-41, variedad H-52 está considerada como potencialmente patógena, pudiendo reproducir la infección en las aves si no se aplica tras la previa inoculación de la cepa Mass-41, variedad H-120, que confiere al ave una in-

munidad inicial capaz de resistir el efecto de la vacunación con la variedad H-52 (80, 82, 84, 116).

En 1974 se realizaron estudios basados en la detección de anticuerpos locales en tráquea pudiéndose establecer equivalencias con los anticuerpos circulantes existentes tras la aplicación de vacunas vivas atenuadas (43, 111, 133, 146).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- 3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**
- 3.2. ALOJAMIENTO Y MANEJO DE LAS AVES**
- 3.3. TRATAMIENTOS PREVIOS COMPLEMENTARIOS**
- 3.4. VIRUS INFECTANTE**
- 3.5. PROTOCOLO DE LA PRIMERA EXPERIENCIA**
- 3.6. PROTOCOLO DE LA SEGUNDA EXPERIENCIA**
- 3.7. ESTUDIO CLÍNICO**
- 3.8. ANÁLISIS SEROLÓGICOS**
- 3.9. SACRIFICIOS, NECROPSIAS Y TOMA DE MUESTRAS**
- 3.10. INCLUSIÓN, OBTENCIÓN DE CORTES Y TINCIÓN**
- 3.11. ESTUDIO DE LAS PREPARACIONES**
- 3.12. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS**

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En nuestro estudio, se han realizado dos experiencias, aplicando una serie de inoculaciones de I.B.V., con el fin de contrastar diferentes grados de infección, así como la evolución en el tiempo de los síntomas y lesiones producidas en las aves.

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Las dos experiencias se realizaron en pollitas reproductoras, de la estirpe Arbor Acres, similares a las utilizadas en explotaciones industriales. El número de aves fue de 70 pollitas para la primera experiencia y 40 para la segunda.

3.2. ALOJAMIENTO Y MANEJO DE LAS AVES

Las aves destinadas a cada una de las experiencias, fueron alojadas desde el primer día de edad en salas de experimentación del Dto. de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid, Universidad Complutense.

Para la primera experiencia se utilizaron, previa desinfección, dos salas de experimentación similares, aisladas y separadas, con el fin de alojar en lugares distintos, los lotes infectados y lotes control, procurando en todo momento evitar infecciones cruzadas. Las pollitas fueron alojadas en el suelo, suministrándose agua y pienso comercial "ad libitum", practicándose un sistema de crianza convencional, similar al realizado en explotaciones avícolas industriales.

Para la segunda experiencia, las aves fueron alojadas, desde el primer día de edad en jaulas, suministrándose agua y pienso comercial "ad libitum":

- CARACTERÍSTICAS DEL PIENSO:

Humedad	13%
Proteína bruta	21,2%
Grasa bruta	3,5%
Fibra bruta	3%
Almidón	37,7%
Azúcares totales	4%
Cenizas totales	5,5%
Vitamina A	6000 U.I./kgr.
Vitamina D	1200 U.I./kgr.
Calcio	0,7%

Fósforo	0,6%
Cloruro sódico	0,5%

- COMPOSICIÓN PORCENTUAL DE INGREDIENTES:

Cereales	63%
Harinas de tortas oleaginosas	31%
Grasa	1,3%
Harina de carne	3%
Compuestos minerales y vitamínicos	4,7%
Etoxiquin	62,5 p.p.m.
Nitrovin	10 p.p.m.
Nicarbacina	125 p.p.m.

3.3. TRATAMIENTOS PREVIOS COMPLEMENTARIOS

Todas las aves fueron vacunadas el primer día de edad contra la enfermedad de Marek, aplicando una dosis de 0,5 ml. de Virus Marek, Herpes de pollo homólogo, cepa C.V.I.-988 Rispens $\geq 10^3$ DICT-50, inoculada por vía subcutánea.

Las pollitas fueron vacunadas a los 14 días de vida frente a la Enfermedad de Gumboro, utilizando la vacuna "GUMBORO D-78 Nobilis, cepa clone D-78, polvo liofi-

lizado oral" cepa atenuada y clonada con 10^{35} U.F.P. que se administra vía agua de bebida.

A los catorce días de edad, las aves fueron vacunadas igualmente frente a la enfermedad de NewCastle con la vacuna "V.P. Nobilis, cepa Hitchener B.1, polvo liofilizado oral" a una dosis de 10^6 D.I.E.-50, administrada en el agua de bebida.

3.4. VIRUS INFECTANTE

Las aves destinadas a la infección (Lotes Infectados) de ambas experiencias, fueron puestas en contacto con el virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar (I.B.V.), virus vivo, tipo Massachussetts, cepa H-52, con una concentración por dosis de 10^4 D.I.E.-50. "IB VACUNA NOBILIS, cepa H-52, polvo liofilizado oral".

La infección se realizó sobre cada una de las aves de los lotes destinados a este fin, por instilación óculo-nasal, a las edades indicadas en los protocolos de cada una de las experiencias.

3.5. PROTOCOLO DE LA PRIMERA EXPERIENCIA

Tal como se expresa en la "Tabla resumen de la primera experiencia" (tabla 1), a los 28 días de edad, las 70 aves que habían sido criadas conjuntamente, tras realizarse los tratamientos previos descritos, fueron separadas en dos lotes:

- Lote C; Control con 35 pollitas
- Lote I; Infectado con 35 pollitas

Las 35 pollitas del "Lote I" se trasladaron a otra sala de iguales características, practicando el mismo sistema de crianza.

Tres días después del traslado, tiempo conveniente para la aclimatación de las aves a su nuevo alojamiento, el lote I se puso en contacto, por instilación óculo-nasal en cada una de las pollitas, con el virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar, cuyas características ya se han descrito.

En este momento, a los 31 días de edad de las aves, día "0" de la experiencia, comienzan a contar los "días post-infección" (d.p.i.), que servirán como referencia general para la identificación y control de las mues-

tras objeto de estudio, que se van obteniendo en cada momento de la experiencia.

El lote C control, permaneció en iguales condiciones de crianza que el lote I, pero sin ponerse en contacto con el virus de la Bronquitis Infecciosa (I.B.V.).

A partir del 2º d.p.i., se realizaron sacrificios en días alternos, de dos de las aves del lote I y dos del lote C, hasta el 32º d.p.i. Seis de las aves (3 del lote C y 3 del lote I), fueron sacrificadas durante las 4 semanas siguientes al 32 d.p.i., según se indica en el "cuadro resumen de la 1ª experiencia".

En cada una de las aves sacrificadas, se practicó la necropsia completa y se tomaron de muestras para estudios posteriores.

Durante el transcurso de la experiencia se realizaron tomas de sangre, de ambos lotes, para su estudio serológico (determinación y evolución de la tasa de anticuerpos circulantes), con el fin de confirmar la infección por el I.B.V., así como para descartar otras infecciones secundarias, como son: E. de Gumboro, E. de NewCastle, Reovirus, Encefalomiелitis aviar y Mycoplasmosis. Con este fin se realizaron las siguientes extracciones de sangre (8 aves por lote):

<u>Referencia</u>	<u>Lote</u>	<u>Días de vida</u>	<u>d.p.i.</u>
1.- S.L.C.	C,I	26	- 5
2.- S.L.C.	C,I	31	0
3.- S.L.C.	C	40	-
4.- S.L.I.	I	40	9
5.- S.L.C.	C	52	-
6.- S.L.I.	I	52	20

En la tabla resumen de la primera experiencia, confeccionada a modo de calendario de la misma, que a continuación se expone, se expresan los siguientes datos:

- Número de aves alojadas en cada momento, por lotes.
- Tratamientos previos realizados.
- Edad de las aves expresadas en días y en semanas.
- Sacrificios realizados e identificación de muestras.
- Controles de pesos individuales.
- Extracciones de sangre e identificación de las mismas.
- Momento de la infección, exposición al I.B.V.
- Días post-infección transcurridos.

TABLA RESUMEN 1ª EXPERIENCIA

Nº AVES TOT		EDAD	LOTE C			LOTE I			d.p.f.																																					
TRAT. GEN.	DIAS-SEM	Nº-AVES	NECROSIAS	PESADAS	SANGRÍAS	Nº-AV	NECROSIAS	PESADAS	SANGRÍAS																																					
70	1	1ª Sem.																																												
	2																																													
	3																																													
	4																																													
	5																																													
	6																																													
	7																																													
	8																																													
	9																																													
	10																																													
	VAC+BD+ND	11								2ª Sem.																																				
		12																																												
		13																																												
		14																																												
		15																																												
		16																																												
		17																																												
		18																																												
		19																																												
		70								20								3ª Sem.																												
										21																																				
										22																																				
										23																																				
										24																																				
										66																25	4ª Sem.			1SLC			C.P.													
																										26																				
																										27																				
																										28																				
29																																														
58	30	5ª Sem.			2SLC	35	IBV inoculación		0																																					
	31																																													
	32																																													
	33																																													
	34																																													
	62									35								6ª Sem.									1 C 2 C									33	1 I 2 I		1							
										36																																				
										37																																				
										38																																				
										39																																				
54		40										3 C 4 C		31	3 I 4 I		2																													
		41																																												
		42																																												
		43																																												
		44																																												
	50	45																																							5 C 6 C		29	5 I 6 I		3
		46																																												
		47																																												
		48																																												
		49																																												
		50																		7 C 8 C		27	7 I 8 I		4																					
		51																																												
		52																																												
		53																																												
		54																																												
		55																											9 C 10 C	3SLC	27	9 I 10 I	4SLI	5												
		56																																												
		57																																												
		58																																												
		59																																												
		60			C.P.		25	C.P.		6																																				
		61																																												
		62																																												
		63																																												
		64																																												
	65																																													
	66																																													
	67																																													
	68																																													
	69																																													
70																																														

TABLA RESUMEN 1ª EXPERIENCIA (Cont.)

NºAVES TOT	DIAS EDAD		LOTE C			LOTE I			d.p.i.		
	TRAT.SEM	SEM	Nº-AV	NECROSIAS	PESADAS	SANGRÍAS	Nº-AV	NECROSIAS		PESADAS	SANGRÍAS
46		43		11C 12C				11I 12I			12
		44	23				23				13
		45		13C 14C				13I 14I			14
42		46	21				21				15
		47		15C 16C				15I 16I			16
38		48	19				19				17
		49		17C 18C				17I 18I			18
34		50	17				17				19
		51		19C 20C		5SLC		19I 20I		6SLI	20
30		52	15				15				21
		53		21C 22C				21I 22I			22
26		54	13				13				23
		55		23C 24C				23I 24I		C.P.	24
22		56	11		C.P.		11				25
		57		25C 26C				25I 26I			26
18		58	9				9				27
		59		27C 28C				27I 28I			28
14		60	7				7				29
		61		29C 30C				29I 30I			30
10		62	5				5				31
		63		31C 32C				31I 32I			32
6		64	3				3				33
		65									34
		66									35
		67									36
		68									37
		69									38
		70									39
		72		33C				33I			46
4		72	2				2				
		89		34C				34I			
2		89	1				1				53
		85									54
		86									55
		87									56
		88									57
		89									58
		90									59
		91		35C				35I			60
		92									61
			0				0				

3.6. PROTOCOLO DE LA SEGUNDA EXPERIENCIA

Con el fin de ampliar y completar la primera experiencia, se diseñó el siguiente protocolo, que permite confirmar y estudiar la evolución de las lesiones en un mayor período de tiempo y analizarlas en caso de una infección y posterior reinfección por I.B.V.

Para ello se dividió el número total de aves en tres lotes distintos:

- Lote C. Control, con 12 pollitas
- Lote I. Infectado, con 14 pollitas
- Lote II. Infectado y reinfectado, con 14 pollitas

Al día de edad, se alojaron las 40 pollitas en jaulas en la misma sala, convenientemente aislada y desinfectada, practicándose los tratamientos previos ya expresados y suministrándose agua y pienso comercial "ad libitum".

A los 20 días de edad se separaron los tres lotes, siendo alojados de igual forma en jaulas, en salas de experimentación separadas y aisladas con el fin de evitar posibles infecciones cruzadas.

Las aves de los lotes I y II fueron expuestas por instilación óculo-nasal a los 27 días de edad, al virus I.B.V. de características ya descritas.

A los 56 días de edad, 29 días después de la primera inoculación de I.B.V., las aves del lote II fueron expuestas a una segunda dosis del virus infectante.

Durante el transcurso de la experiencia y después de las inoculaciones de I.B.V., se realizaron sacrificios semanales de dos aves, efectuando la correspondiente necropsia y toma de muestras de los órganos objeto de estudio, tal como se indica en el calendario "resumen de la 2ª experiencia".

Al igual que en el primer experimento, se practicaron extracciones de sangre, con el fin de conocer la evolución y nivel de anticuerpos circulantes frente al virus y comprobar la ausencia de otras patologías. Las extracciones de sangre se realizaron en 5 aves de cada lote, según el siguiente esquema:

<u>Ref.</u>	<u>Lote</u>	<u>Días de vida</u>	<u>d.p.1ºi.</u>	<u>d.p.2ºi.</u>
1. S.L.C.	C, I, II	27	-1	-
2. S.L.I.	I, II	33	6	-
3. S.L.C.	C	33	-	-
4. S.L.I.	I, II	56	29	-
5. S.L.C.	C	56	-	-
6. S.L.I.	I	70	43	-
7. S.L.II.	II	70	-	14
8. S.L.C.	C	70	-	-

En la tabla resumen de la segunda experiencia, que a continuación se expone, se reflejan los siguientes datos:

- Número de aves alojadas por lote.
- Vacunaciones y tratamientos previos realizados.
- Edad en días y semanas.
- Identificación de sacrificios realizados en los tres lotes.
- Identificación de las extracciones de sangre en los tres lotes.
- Momento de la infección con I.B.V. en el lote I.
- Momento de la infección y reinfección con I.B.V. en el lote II.
- Días post 1ª inoculación de I.B.V.
- Días post 2ª inoculación de I.B.V. para el lote II.

TABLA RESUMEN 2ª EXPERIENCIA

Nº AVES TOT.	DÍAS EDAD	LOTE C		LOTE I		LOTE II		dp 1ªI	dp 2ªI
TRAT. GEN.	SEM.	Nº AV	SACRIFICIOS SANGRIAS	Nº AV	inoculación IBV, SACRIFICIOS, SANGRIAS	Nº AV	inoculación IBV, SACRIFICIOS, SANGRIAS		
40VAC.MAREK	1								
40	2								
40	3								
40	4								
40	5								
40	6								
40	7 1 sem								
40	8								
40	9								
40	10								
40	11								
40 1ªIBD+ND	12								
40	13								
40	14 2 sem								
40	15								
40	16								
40	17								
40	18								
40	19								
40	20								
40	21 3 sem			NAV		NAV			
40	22	12		14		14			
40	23	12		14		14			
40	24	12		14		14			
40	25	12		14		14			
40	26	12		14		14			
40	27	12	1 SLC	14	1ª IBV	14	1ª IBV	0	
40	28 4 sem	12		14		14		1	
40	29	12		14		14		2	
40	30	12		14		14		3	
40	31	12		14		14		4	
40	32	12		14		14		5	
40	33	12	3 SLC	14	IR-1	14	IR-1	6	
38	34	12	CR-1	13		13		7	
37	35 5 sem	11		13		13		8	
37	36	11		13		13		9	
37	37	11		13		13		10	
37	38	11		13		13		11	
37	39	11		13		13		12	
37	40	11		13		13		13	
37	41	11		13	IR-2	13	IR-2	14	
35	42 6 sem	11		12		12		15	

TABLA RESUMEN 2ª EXPERIENCIA (Cont.)

Nº AV TOT	DÍAS EDAD	LOTE C		LOTE I		LOTE II		dp 1ºI	dp 2ºI				
	SEM	Nº AV	SACRIFICIOS	SANGRIAS	Nº AV	SACRIFICIOS	SANGRIAS	Nº AV	INOCULACIÓN IBV	SACRIFICIOS	SANGRIAS		
35	43	11			12			12				16	
	44	11			12							17	
	45	11			12							18	
	46	11			12							19	
35	47	11			12	IR-3		12	II R-3			20	
33	48	11	CR-2		11			11				21	
32	49	10			11							22	
	50	10			11							23	
	51	10			11							24	
	52	10			11							25	
	53	10			11							26	
	54	10			11							27	
	55	10			11							28	
32	56	10		5SLC	11	IR-4	4SLI	10	2ª IBV	II R-4		29	0
30	57	10	CR-3		10							30	1
29	58	9			10							31	2
	59	9			10							32	3
	60	9			10							33	4
	61	9			10							34	5
29	62	9			10	IR-5			II R-5			35	6
27	63	9	CR-4		9			9				36	7
26	64	8			9							37	8
	65	8			9							38	9
	66	8			9							39	10
	67	8			9							40	11
	68	8			9							41	12
	69	8			9							42	13
26	70	8		8SLC	9	IR-6	6SLI		II R-6		7SLII	43	14
24	71	8	CR-5		8			8				44	15
23	72	7			8							45	16
	73	7			8							46	17
	74	7			8							47	18
	75	7			8							48	19
23	76	7			8	IR-7			II R-7			49	20
21	77	7	CR-6		7			7				50	21
20	78	6			7							51	22
	79	6			7							52	23
	80	6			7							53	24
	81	6			7							54	25
	82	6			7							55	26
20	83	6			7	IR-8			II R-8			56	27
18	84	6	CR-7		6			6				57	28

TABLA RESUMEN 2ª EXPERIENCIA (Cont. II)

Nº AV.TOT	DIAS EDAD		LOTE C		TOTE I		TOTE II		d.p.i.1º	d.p.i.2º		
	SEM	Nº-AV	SACRIFICIOS	SANGRÍAS	Nº-AV	SACRIFICIOS	SANGRÍAS	Nº-AV			SACRIFICIOS	SANGRÍAS
17	85	5			6			6			58	29
	86										59	30
	87										60	31
	88										61	32
17	89					IR9			IR9		62	33
15	90		CR8		5			5			63	34
14	91	13ª Sem.					9SLI			9SLII	64	35
	92			11SLC							65	36
	93										66	37
	94										67	38
	95										68	39
	96										69	40
14	97					IR-10			IR-10		70	41
12	98	14ª Sem.	CR-9		4			4			71	42
11	99				3						72	43
	100										73	44
	101										74	45
	102										75	46
	103										76	47
11	104					IR-11			IR-11		77	48
9	105	15ª Sem.	CR-10		3			3			78	49
8	106				2						79	50
	107										80	51
	108										81	52
	109										82	53
8	110										83	54
	111				2	IR-12		2	IR-12		84	55
6	112	16ª Sem.	CR-11								85	56
5	113				1						86	57
	114										87	58
	115										88	59
	116										89	60
	117										90	61
5	118				2	IR-13		2	IR-13		91	62
3	119	17ª Sem.	CR-12		1			1			92	63
2					1			1				

3.7. ESTUDIO CLÍNICO

Durante el transcurso de ambas experiencias y en cada uno de los lotes, se realizó una observación diaria y pormenorizada de las aves, intentando detectar la aparición de signos y síntomas propios del padecimiento de la Bronquitis Infecciosa Aviar (toses, ruidos traqueales, estertores, lagrimeo o dificultad respiratoria).

De igual forma, se comprobó que las aves no mostraban ningún síntoma de otras enfermedades.

3.8. ANÁLISIS SEROLÓGICOS

Estos análisis complementarios, se plantearon con el fin de confirmar la infección experimental, realizada con el I.B.V., así como para descartar posibles infecciones secundarias ajenas al planteamiento de las experiencias, que pudieran desvirtuar los resultados de las mismas.

Los estudios serológicos se realizaron sobre las muestras de sangre recogidas de las aves de cada uno de los lotes, en los distintos momentos indicados en los protocolos de las experiencias, por punción en la vena subclavia.

Con los sueros obtenidos en las distintas extracciones y por las técnicas que a continuación se exponen, se realizaron las siguientes determinaciones:

1. Por la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (H.I.), se determinaron los niveles de anticuerpos circulantes frente al I.B.V. serotipo Massachusetts (Mass-41) y Enfermedad de Newcastle (N.D.), a partir de los sueros de aves de la 1ª experiencia.
2. Mediante la técnica de Precipitación en Gel de Agar (A.G.P.) se determinó la presencia de anticuerpos frente a la Enfermedad de Gumboro (I.B.D.), sobre los sueros de aves de la 1ª experiencia.
3. Aplicando la técnica de Aglutinación rápida en placa (H.A.) se determinó la presencia de anticuerpos frente a *Mycoplasma Gallisepticum* (M.G.) y *Mycoplasma Sinoviae* (M.S.) en sueros de aves de ambas experiencias.
4. Los anticuerpos circulantes frente a I.B.V., I.B.D., N.D., Reovirus, M.G., en los sueros de aves de los lotes de la 2ª experiencia fueron determinados mediante la técnica de ELISA.

Con los análisis realizados para determinar los niveles de anticuerpos circulantes frente al I.B.V. se pretende estudiar la seroconversión producida en las aves de los lotes infectados, en contraposición con la ausencia de anticuerpos frente a I.B.V. que debe producirse en los lotes controles, no infectados.

3.9. SACRIFICIOS, NECROPSIAS Y TOMAS DE MUESTRAS

Los sacrificios de las aves, fueron realizados, en ambas experiencias, por dislocación cervical, efectuándose posteriormente la necropsia sistemática, ordenada y completa. En el curso de la misma, se prestó un especial interés al estudio macroscópico de tráqueas y riñones, así como al resto de órganos, con el fin de comprobar otras lesiones.

Durante el transcurso de las necropsias, se realizaron fotografías macroscópicas de todos los órganos, comparándose, los de las aves infectadas con los de las aves de los lotes control.

De forma inmediata después del sacrificio, se tomaron muestras de los órganos diana objeto de estudio: tráqueas y riñones, para la realización de los estudios histológicos e inmunocitoquímicos, así como del resto de

los órganos con el fin de descartar otras posibles enfermedades.

Las piezas destinadas al estudio de microscopía óptica convencional, fueron talladas con un tamaño inferior a 0,5 cm. de espesor y fijadas en formol al 10% donde permanecieron hasta su inclusión.

Las piezas destinadas al estudio inmunocitoquímico fueron talladas de igual forma, fijadas en solución Bouin, durante 24 horas y conservadas en alcohol de 40° hasta su posterior inclusión.

Las piezas destinadas al estudio ultraestructural se fraccionaron en porciones de 2 x 2 mm. y se fijaron en solución Buffer - Milloning Glutaraldehido al 2% durante 2 horas, utilizándose como post-fijador tetróxido de osmio al 1%.

3.10. INCLUSIÓN, OBTENCIÓN DE CORTES Y TINCIÓN

Las piezas para microscopía óptica se incluyeron en parafina sintética, con un punto de fusión de 56°C-57°C, mediante un procesador de tejidos automático Shandon-Elliot modelo Bench SCE-0400.

Las muestras fueron cortadas, empleando un microtomo tipo Minnot, realizándose cortes seriados de un grosor de 4 μ m.

Los cortes fueron teñidos por las técnicas de Hematoxilina-Eosina, Método de Gallego IV variante, método de P.A.S.

Las piezas destinadas al estudio ultraestructural fueron incluidas en Epon-Araldita y se realizaron cortes con un ultra-microtomo modelo L.K.B. III, de un espesor de 40 a 60 nm, siendo contrastados con citrato de plomo y acetato de uranilo. Los cortes semifinos se tiñeron con Azul de Metileno.

El estudio inmunocitoquímico se realizó por la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, utilizando suero anti-gamma globulina G de pollo obtenido en conejo (Miles Martin) y fluoresceína ligada a Ig G anticonejo (Miles Martin).

3.11. ESTUDIO DE LAS PREPARACIONES

Las preparaciones histológicas fueron observadas mediante microscopios de la marca Ostoplan-Leitz y Zeiss. Las microfotografías fueron realizadas con una cámara Orthomat Transistorizada, incorporada al microscopio

Orthoplan y con una cámara Olympus convencional con adaptador para microfotografías, acoplada al microscopio Zeiss.

El estudio ultra-estructural fue realizado con un microscopio electrónico Jeol modelo JEM-100B, a 80 KV, del servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Veterinaria de Madrid. Las fotografías en dicho microscopio fueron obtenidas, utilizando placas fotográficas de 6 x 9 cm.

Las preparaciones sobre las que se realizó el estudio inmunocitoquímico fueron observadas en microscopio de fluorescencia, realizándose fotografías de igual forma que en el estudio microscópico ordinario.

3.12. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Se realizaron igualmente análisis bacteriológicos, micológicos y parasitológicos de las aves, con el fin de descartar infecciones como: salmonelosis, pasteurellosis, colibacilosis, micosis y parasitosis, que junto con las enfermedades víricas y mycoplásmicas analizadas serológicamente, pudieran interferir y enmascarar los resultados obtenidos.

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DE LA PRIMERA EXPERIENCIA

4.1.1. Resultados clínicos

4.1.2. Resultados serológicos

4.1.3. Resultados anatomopatológicos

4.1.3.1. Estudio macroscópico

4.1.3.2. Estudio histológico

4.1.3.2.1. Lesiones Renales

4.1.3.2.2. Lesiones de la Tráquea

4.1.3.3. Estudio inmunocitoquímico

4.1.3.4. Estudio ultraestructural

4.1.3.4.1. Lesiones renales

4.1.3.4.2. Lesiones traqueales

4.2. RESULTADOS DE LA SEGUNDA EXPERIENCIA

4.2.1. Resultados clínicos

4.2.2. Resultados serológicos

4.2.3. Resultados anatomopatológicos

4.2.3.1. Estudio macroscópico

4.2.3.2. Estudio histológico

4.2.3.2.1. Lesiones Renales

4.2.3.2.2. Lesiones de la Tráquea

4.2.3.3. Estudio inmunocitoquímico

4.2.3.4. Estudio ultraestructural

4.2.3.4.1. Lesiones renales

4.2.3.4.2. Lesiones traqueales

4.3. ICONOGRAFÍA

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DE LA PRIMERA EXPERIENCIA

4.1.1. Resultados clínicos

Tras la instilación oculonasal del virus de la Bronquitis infecciosa, las aves manifestaron los síntomas propios de la infección: leve dificultad respiratoria, toses y ruidos traqueales. Dichos síntomas se apreciaron el 2º d.p.i., acentuándose el 3º d.p.i. y desapareciendo completamente el 6º d.p.i.

Durante los días en que se manifestó la sintomatología respiratoria descrita, se observó un leve descenso del consumo de pienso en el lote Infectado (I.), con respecto al lote Control (C.) no infectado; aunque la ganancia del peso de las aves de ambos lotes, durante el período total de la experiencia, fue la misma.

La sintomatología respiratoria se manifestó en un 45% ($\pm 5\%$) de las aves del lote I, con mayor intensidad, durante el 3º y 4º d.p.i., no apreciándose otros síntomas ni mortalidad durante el transcurso de toda la experiencia (12 semanas).

Las aves del lote C, no manifestaron sintomatología ni alteraciones evidentes en el transcurso del experimento.

4.1.2. Resultados serológicos

Los análisis serológicos se realizaron en seis sueros de aves del lote control y seis del lote infectado. Se practicaron extracciones de sangre en ambos lotes, en distintos momentos de la experiencia, con el fin de estudiar la evolución serológica y nivel de anticuerpos circulantes específicos de las aves del lote infectado, tras la inoculación del I.B.V. variedad H-52, tal y como figura en las tablas I y II y Gráficas I y II.

Tabla I

Títulos medios, obtenidos por la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (H.I.); Anticuerpos específicos circulantes frente a I.B.V. serotipo Massachusetts, Lote Infectado.

Ref: suero	Días de vida	d.p.i.	Título H.I.
1 S.L.C, I.	26	-4	3.5
2 S.L.C, I.	31	0	3.4
4 S.L.I.	40	9	4.7
6 S.L.I.	52	20	5.6

Tabla II

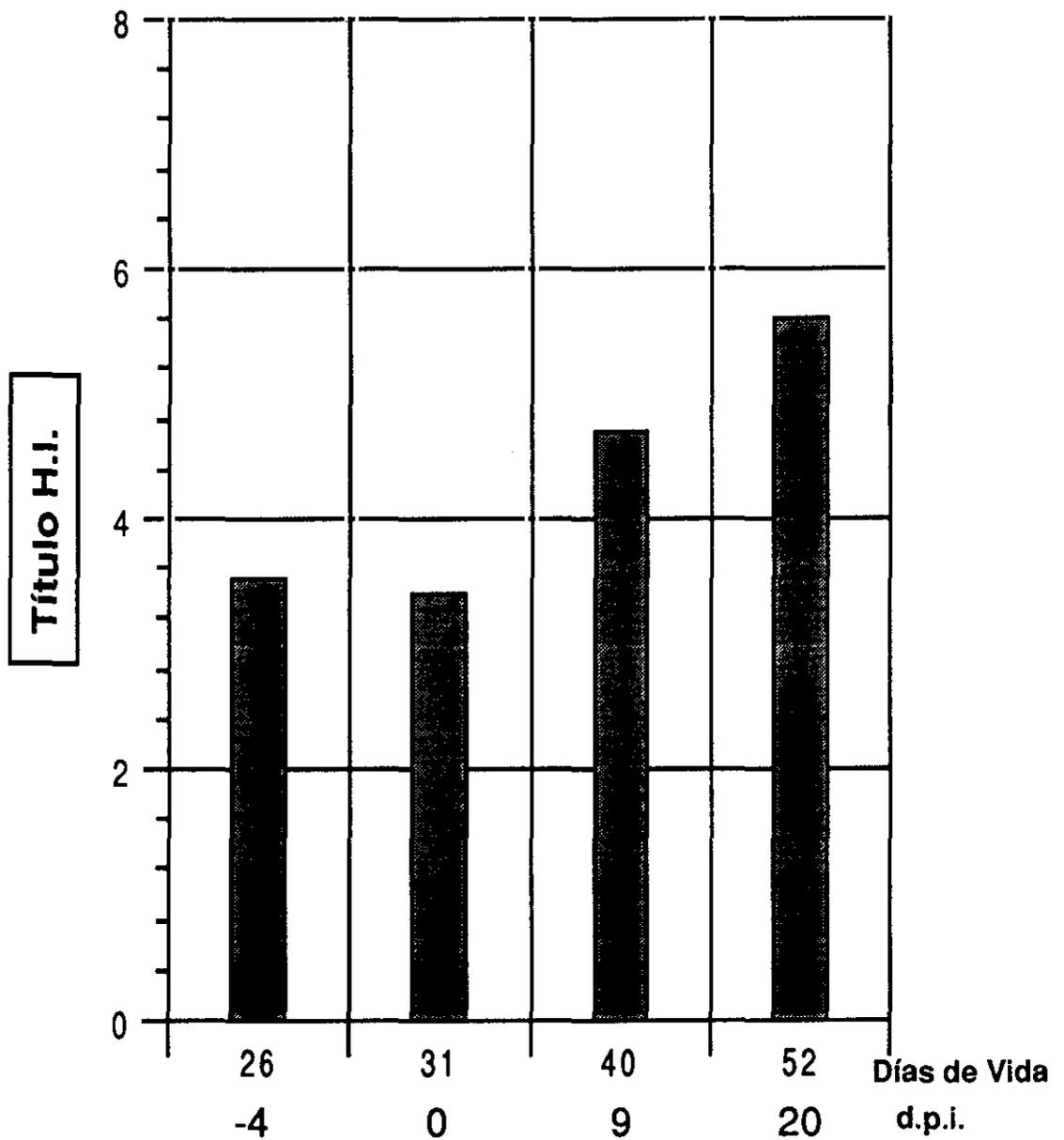
Títulos medios obtenidos por la técnica de inhibición de la Hemoaglutinación (H.I.). Anticuerpos específicos circulantes frente a I.B.V. serotipo Massachusetts. Lote control.

Ref: suero	Días de vida	Título H.I.
1 - S.L.C.I.	26	3.5
2 - S.L.C.I.	31	3.4
3 - S.L.C.	40	3.2
4 - S.L.C.	52	3.8

Con los títulos medios, obtenidos de ambos lotes, podemos apreciar la evolución serológica de los anticuerpos circulantes específicos frente a I.B.V. serotipo Massachusets a lo largo de la vida de las aves en ambos lotes, según se representa en las siguientes gráficas (Gráfica I y II).

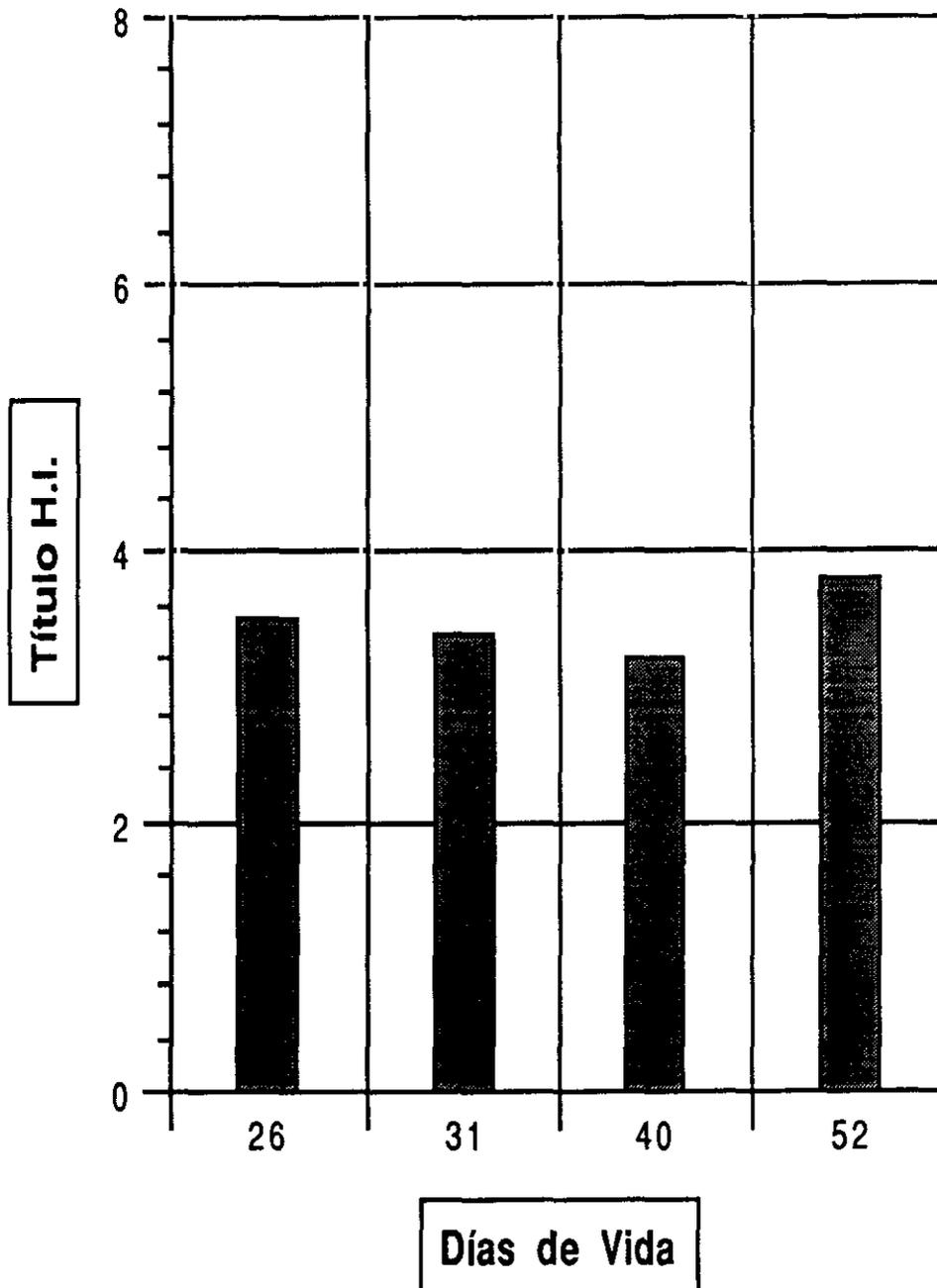
Gráfica I

EVOLUCIÓN SEROLÓGICA DE ANTICUERPOS CIRCULANTES, FRENTE A BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR SEROTIPO MASS-41 EN AVES DE LOTE INFECTADO.



Gráfica II

EVOLUCIÓN SEROLÓGICA DE ANTICUERPOS CIRCULANTES, FRENTE A
BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR SEROTIPO MASS-41 EN AVES DEL
LOTE CONTROL.



Los resultados serológicos obtenidos, muestran una significativa respuesta inmunitaria frente al antígeno inoculado, en el lote de aves infectadas (Gráfica I), en relación con el lote control (Gráfica II) no infectado. Lo cual nos permite afirmar que se ha producido una infección real del lote I, con el virus I.B.V.

Hemos realizado otros análisis serológicos complementarios, con el fin de descartar posibles infecciones secundarias que pudieran enmascarar o confundir los síntomas y lesiones en cada uno de los lotes. Así podemos asegurar que las aves objeto de estudio se encontraban libres de E. de Gumboro, E. de Newcastle, Reovirus, Encefalomiелitis aviar y Mycoplasmosis, resultando igualmente negativos los análisis microbiológicos realizadas (Salmonellosis, Pasteurellosis, Colibacilosis y Aspergillosis).

4.1.3. Resultados anatomopatológicos

4.1.3.1. Estudio macroscópico

En los riñones de las aves infectadas no se observaron lesiones durante los primeros 30 días de la experiencia. En estadios avanzados, a partir del 32 d.p.i. se apreciaron leves diferencias en riñones de dos de las aves del lote infectado, con respecto a del lote control, que

consistieron en una ligera hipertrofia y leve decoloración renal (Fig. 1).

En las tráqueas de aves infectadas, se detectó presencia de escasa cantidad de exudado mucoso el 4º y 5º d.p.i. No apreciándose otras lesiones macroscópicas en el resto de los órganos (Fig. 2).

4.1.3.2. Estudio histológico

Hemos dividido la experiencia en tres fases o estadios diferenciados:

Fase inicial; (del 1º al 14 d.p.i.)

Fase intermedia; (del 15º al 29 d.p.i.)

Fase final; (del 30º al 60 d.p.i.)

4.1.3.2.1. Lesiones renales

En la fase inicial: a partir del 8º d.p.i. y siempre en comparación con riñones de aves no infectadas, se aprecia escaso número de células inflamatorias en disposición peritubular, principalmente en la zona medular, destacando la presencia de linfocitos e histiocitos con células plasmáticas en muy escaso número (Fig. 3). En al-

gunas ocasiones se observan heterófilos y eosinófilos aislados.

Las células del epitelio tubular experimentan una progresiva vacuolización sobre todo en túbulos colectores observándose presencia de cilindros hialinos (Fig. 3 y 4).

De forma general se aprecia leve congestión e incipiente edema intersticial. Así mismo se observan formaciones linfoides dispuestas en la zona medular, que muestran ligera hipertrofia (Fig. 5).

Las formaciones linfoides se hacen más marcadas a partir del 15 d.p.i. en la fase intermedia, que es cuando aparecen claramente activadas dichas formaciones linfoides, observándose mitosis múltiples (Fig. 6).

En este momento, durante la **Fase Intermedia**, es cuando se aprecia mayor hipertrofia de las formaciones linfoides (Fig. 7), aunque los infiltrados inflamatorios encontrados fueron discretos, focales, y con tendencia a localizarse en la zona medular interna, no observándose en la zona cortical.

En la Fase Intermedia, desde el 16 d.p.i. hasta el 29 d.p.i. se puede resumir la evolución del cuadro his-

tológico renal, como una intensificación del proceso inflamatorio, observándose infiltrados de células mononucleares rodeando túbulos y conductos colectores. Dichas lesiones, presentan un marcado carácter focal (Fig. 8).

En los infiltrados inflamatorios se observa mayor número de células plasmáticas, que durante la fase inicial de la experiencia y éstas se disponen formando nidos o agrupaciones.

Los túbulos renales experimentan fenómenos regresivos, encontrándose imágenes de pseudoestratificación y evidente degeneración celular, lo cual da lugar al desprendimiento de fragmentos citoplasmáticos eosinófilos hacia la luz tubular. En los túbulos lesionados se aprecian algunas mitosis de células epiteliales con una finalidad reparadora (Fig. 8 y 9).

Durante el último estadio de la experiencia Fase Final, que comprende desde el 30 d.p.i., hasta el 60 d.p.i., se observa evidente nefritis intersticial, con abundantes infiltrados inflamatorios peritubulares intersticiales, compuestos en su mayoría por células mononucleares y abundantes células plasmáticas (Fig. 10 y 11). Dichos infiltrados se extienden por toda la zona medular interna, rodeando a los conductos colectores, que se observan dilatados y con su epitelio vacuolizado (Fig. 12),

ya que sus células muestran evidentes signos regresivos como: picnosis, eosinofilia del citoplasma y posterior necrosis. Así mismo, se aprecia una incipiente fibrosis intersticial. En ocasiones aisladas se pueden encontrar escasos infiltrados de heterófilos peritubulares así como cilindros hialinos y granuloso en la luz tubular. Las formaciones linfoides, aunque se muestran activadas, no presentan el grado de hipertrofia que se observaba durante la fase intermedia y las mitosis no son tan abundantes.

En los últimos estadios de la fase final se aprecia en el interior de los túbulos colectores, evidente dilatación con depósitos de uratos, sin embargo al igual que en las fases precedentes no se han observado alteraciones glomerulares (Fig. 13).

Durante el transcurso de la experiencia no se observaron en ningún momento lesiones glomerulares en ninguna de las aves.

4.1.3.2.2. Lesiones traqueales

En la Fase inicial histológicamente, las lesiones presentes en tráqueas procedentes de aves del lote Infectado se corresponden básicamente con las descritas en una infección por virus de campo, principalmente durante la fase inicial de la experiencia.

A partir del 2º d.p.i., se observaron signos de edema e inflamación, viéndose aumentado el número de células linfocitarias de la lámina propia, en comparación con tráqueas procedentes de aves no infectadas. Durante los días 4º y 6º p.i., se encontró disminuido y alterado el número de cilios en las células epiteliales, apreciándose aplanamiento y descamación de éstas (Fig. 14 y 15), así como aumento de las formaciones linfoides en la lámina propia y presencia escasa de infiltrados heterófilos (Fig. 16).

A partir del 8º d.p.i., se encontraron zonas de vacuolización epitelial e hipertrofia de células caliciformes, con aumento de la mucosidad en la luz traqueal y edema en la lámina propia (Fig. 17). En la tráquea de una de las aves infectadas se apreció en este período intensa congestión con presencia de focos hemorrágicos en la submucosa.

Las lesiones observadas pueden ser consideradas como progresivas hasta el 10º d.p.i., momento en el que permanece la reacción inflamatoria con escasos infiltrados linfocitarios y edema en la lámina propia, así como persiste la hipertrofia de células caliciformes; observándose un comienzo de organización conjuntiva que se hace más evidente entre los 12 y 14 d.p.i., período en el que disminuyen los infiltrados linfocitarios en la lámina propia

y comienza la reepitelización (Fig. 18), aunque se mantiene la hipertrofia de células caliciformes, pudiéndose hablar de restitución completa de la estructura de la mucosa traqueal a partir del 16º d.p.i.

Fase intermedia: Desde el día 16 p.i., hasta el final de la experiencia no se observaron lesiones traqueales significativas en aves del lote infectado.

En las tráqueas de aves del lote control (C) no infectado, no se observaron lesiones histológicas significativas a lo largo de toda la vida de los animales.

El estudio histológico realizado revela, que tras la infección, se produce una reacción inflamatoria de las vías respiratorias, que evoluciona hacia una reorganización epitelial a partir del 16 d.p.i.

Las lesiones respiratorias se manifiestan por tanto en la fase inicial (del 2º al 14º d.p.i.), y principio de la fase intermedia.

Fase final: sin lesiones histológicas en tráqueas.

4.1.3.3. Estudio inmunocitoquímico

Sólo fue significativo en riñón.

El estudio inmunocitoquímico realizado a partir de riñones de aves del lote control (C), resultó negativo durante toda la vida del lote, no observándose inmunofluorescencia en ninguna de las preparaciones realizadas.

En los riñones de las aves del lote infectado (I) se aprecia una mayor positividad a la Inmunofluorescencia Indirecta, durante la fase intermedia de la experiencia (entre los días 15 y 29 p.i.).

La reacción de fluorescencia apareció localizada en disposición intertubular, observándose a pocos aumentos, de forma difusa, ocupando la mayor parte de los espacios intertubulares (Fig. 19). Sin embargo a mayores aumentos se apreció la positividad localizada principalmente en el citoplasma de los elementos linfoides que integran los infiltrados linfocitarios (Fig. 20).

Esta Inmunofluorescencia comienza a disminuir a partir del 30º d.p.i., apreciándose total negatividad a la reacción desde el 48 d.p.i., lo que indica la disminución de la respuesta inmunitaria en el parenquima renal a partir de este día.

El estudio de las tráqueas no fue significativo.

4.1.3.4. Estudio ultraestructural

Mediante el empleo del microscopio electrónico hemos podido confirmar las lesiones descritas en los resultados histológicos, tanto en el riñón como en la tráquea, en las distintas fases de la experiencia. Así podemos destacar las alteraciones de las diferentes organelas celulares a nivel epitelial y la identificación de los distintos elementos que integran los infiltrados inflamatorios.

4.1.3.4.1. Lesiones renales

En los primeros días de la experiencia y junto a una ligera congestión y la aparición de algunos elementos de tipo inflamatorio, podemos ya visualizar un comienzo de tumefacción celular en los epitelios tubulares renales, que se manifiesta por dilataciones de la red citocavitaria fundamentalmente en las zonas periféricas del citoplasma y que es más marcada en el polo apical celular (Fig. 21), aunque en estas primeras fases las mitocondrias muestran imágenes similares a las normales, sobre todo en los túbulos proximales (Fig. 22).

En fases algo más avanzadas podemos identificar asimismo un mayor grado de alteración celular, incluso con desprendimiento de fragmentos citoplásmicos del polo apical, lo cual confirma la observación histológica de cilindros hialinos. Estos fragmentos aparecen cargados de un material amorfo o finamente granular, de densidad electrónica media, por lo que podrían interpretarse como de naturaleza proteica (Fig. 23).

Finalmente, en riñones con un mayor grado de lesiones hemos podido observar graves alteraciones celulares e incluso la descamación completa de estos elementos a la luz tubular, lo cual se corresponde con los cilindros granulosos descritos en los resultados histológicos (Fig. 24). En estos casos hemos podido apreciar un discreto engrosamiento de las membranas basales, así como una densificación del tejido conjuntivo intersticial.

En cuanto al proceso inflamatorio intersticial descrito, y como ya hemos adelantado, podemos confirmar una ligera congestión y la aparición de elementos linfoides ya desde fases muy incipientes (Fig. 21). En fases intermedias se desarrollan auténticos infiltrados inflamatorios con tendencia a la focalización, que están integrados fundamentalmente por elementos linfoides e histiocitarios (Fig. 25); entre los elementos linfoides destaca la

diferenciación plasmocitaria, lo cual nos indica un componente inmunitario de tipo humoral importante.

En las fases finales sin embargo confirmamos a nivel intersticial un mayor componente conjuntivo, siendo sustituido el infiltrado inflamatorio por fibroblastos jóvenes y fibras colágenas (Fig. 26).

Por otro lado, hemos confirmado la ausencia de lesiones glomerulares, ya que a pesar de la gran variabilidad morfológica de los glomérulos renales de las aves, no hemos encontrado lesiones destacables en ninguna de las fases del proceso. Únicamente en algunos glomérulos aislados se han podido apreciar algunas imágenes de epitelización, aumento de la población celular mesangial o ligero engrosamiento de membranas basales; sin embargo estas alteraciones han aparecido en muy baja proporción y siempre dentro de los límites considerados como normales en la literatura especializada (Fig. 27).

Tras el estudio ultraestructural renal en esta primera fase, podemos por tanto confirmar los procesos degenerativos epiteliales propios de la nefrosis y los inflamatorios propios de la nefritis intersticial.

4.1.3.4.2. Lesiones traqueales

En el estudio ultraestructural de las tráqueas correspondientes a los animales de la primera experiencia, destacamos la confirmación de las lesiones celulares en el epitelio, así podemos apreciar desde los primeros sacrificios vacuolizaciones de la red citocavitaria, acompañadas de amplias dilataciones del espacio intercelular que tiende a desorganizar el epitelio (Fig. 28). En fases algo más avanzadas podemos apreciar una mayor intensidad de lesiones con la aparición de elementos inflamatorios intraepiteliales (células emigrantes) y disminución del número y tamaño de cilios (Fig. 29).

Asimismo se observa un aplanamiento de las células con grave alteración de sus organelas, sobre todo de aquellas que aparecen próximas a la luz traqueal, las cuales, incluso pueden llegar a descamarse (Fig. 30 y 31). Las lesiones degenerativas epiteliales acompañan al proceso inflamatorio localizado en la lámina propia, y posiblemente estén determinadas por las graves alteraciones circulatorias que éste determina. Así los fenómenos de estasis y edema determinan una disminución de oxigenación y nutrición en el epitelio, lo cual unido a la presión mecánica determinada por los infiltrados inflamatorios darían lugar a las alteraciones hipóxicas observadas.

4.2. RESULTADOS DE LA SEGUNDA EXPERIENCIA

Con los resultados obtenidos en la 1ª experiencia, y al haberse observado en los cortes histológicos renales una evolución del proceso nefritis-nefrosis hasta los 60 d.p.i., momento en el que finalizó la primera experiencia, se planteó la necesidad de realizar un segundo experimento de iguales características que el primero, pero de mayor duración en el tiempo, con el fin de continuar estudiando la evolución de las lesiones renales observadas.

Esta segunda prueba se complementó con el análisis de aves que habían sufrido dos inoculaciones del virus de la Bronquitis Infecciosa aviar, a fin de completar el estudio histopatológico.

4.2.1. Resultados clínicos

Al igual que en los primeros experimentos, el lote de pollitas I, sobre el que se practicó una única inoculación con el I.B.V., manifestó igual sintomatología a la ya descrita, no apreciándose otros síntomas ni mortalidad en las aves durante los 91 días del transcurso de la prueba.

El lote II, sobre el que se practicaron dos inoculaciones con el mismo virus I.B.V. y a la misma dosis, la primera de ellas a los 27 días de edad de las aves (de igual forma que el lote I) y la segunda inoculación a los 56 días de edad de las aves (29 días después de la primera inoculación) mostraron una sintomatología respiratoria semejante a las del lote I, tras la primera inoculación del I.B.V., no apreciándose sintomatología alguna, en los días que transcurrieron después de la segunda inoculación, ni en los días posteriores que duró la experiencia (91 días después de la primera inoculación).

Las aves del lote control, que no fueron expuestas al I.B.V., no mostraron sintomatología apreciable de ningún tipo durante las 17 semanas de vida de los animales.

4.2.2. Resultados serológicos

En los tres lotes objeto de estudio, se realizaron análisis serológicos, en distintos momentos de la vida de las aves, con el fin de estudiar la evolución del nivel de anticuerpos circulantes producidos frente al I.B.V. serotipo Massachusetts, en cada uno de los lotes, C (control), I (Infectado), II (infectado y reinfectado). Los análisis se realizaron por el test E.L.I.S.A., expresándo-

se los resultados como el título medio obtenido en cada uno de los análisis.

Durante el transcurso de la experiencia se practicaron extracciones de sangre en 5 aves de cada uno de los lotes, obteniéndose los siguientes títulos medios por el Test de Elisa (tablas III, IV y V) (gráficas III, IV y V):

Tabla III

Lote Control (C)		
Ref.	Días de vida	Título medio
1 - S.L.C.	27	4320
3 - S.L.C.	33	4200
5 - S.L.C.	56	4280
8 - S.L.C.	70	3860
11- S.L.C.	92	3680

Tabla IV

Lote Infectado (I)			
Ref.	Días de vida	d.p.i.	Título medio
2 - S.L.I.	33	6	5420
4 - S.L.I.	56	29	8680
6 - S.L.I.	70	43	8340
9 - S.L.I.	92	64	8910

En este lote no se practicó extracción de sangre el día de la inoculación por encontrarse las aves en el mismo status serológico que las aves del lote C.

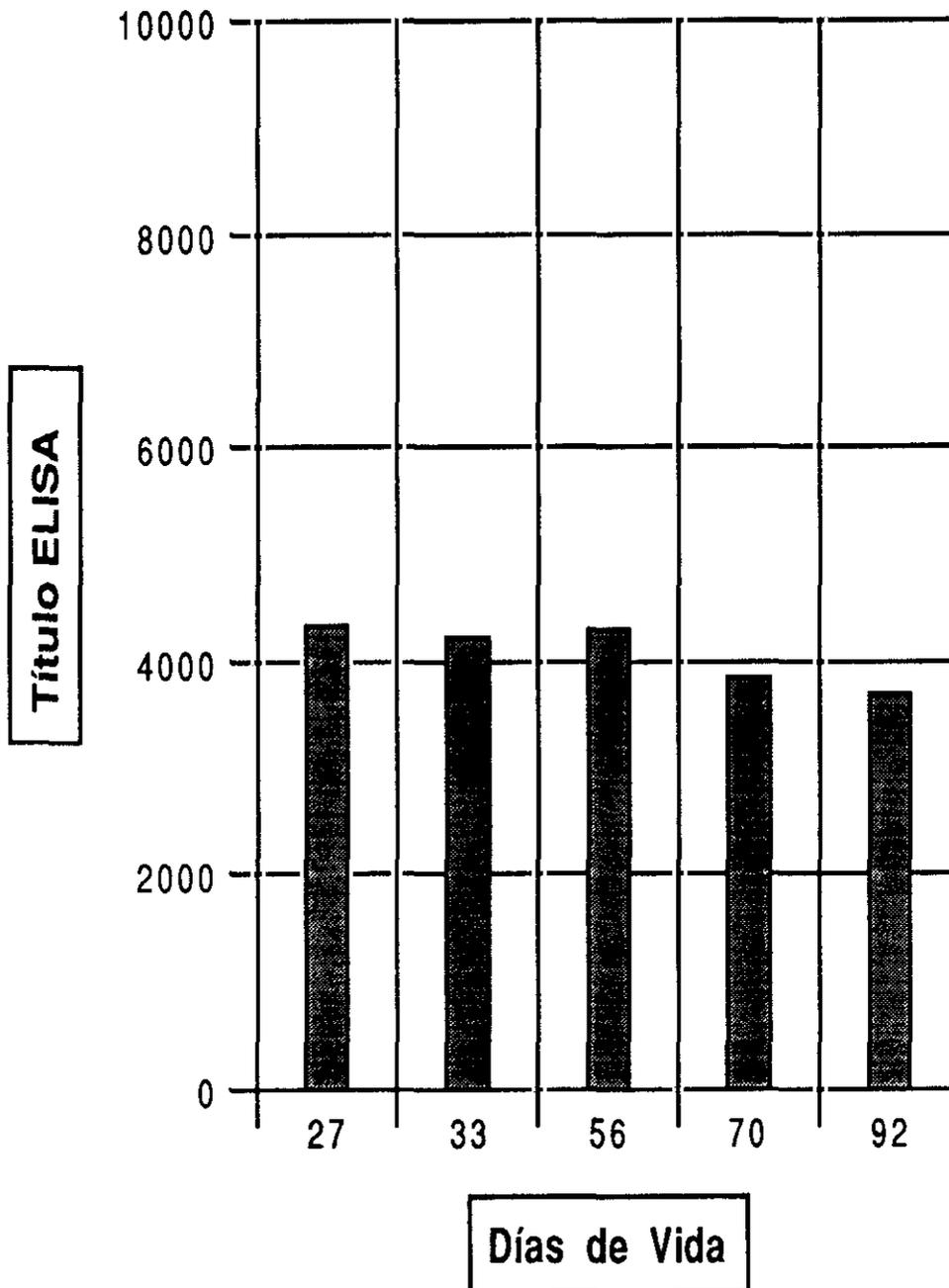
TABLA V

Lote infectado y reinfectado (II)				
Ref.	días de vida	d.p.1ºi.	d.p.2ºi.	Título medio
7 - S.L.II.	70	43	14	10020
10- S.L.II.	92	64	35	12100

En este lote no se tomaron muestras de sangre anteriores a la 2ª inoculación de I.B.V., por encontrarse las aves en el mismo estado inmunitario que en el lote I.

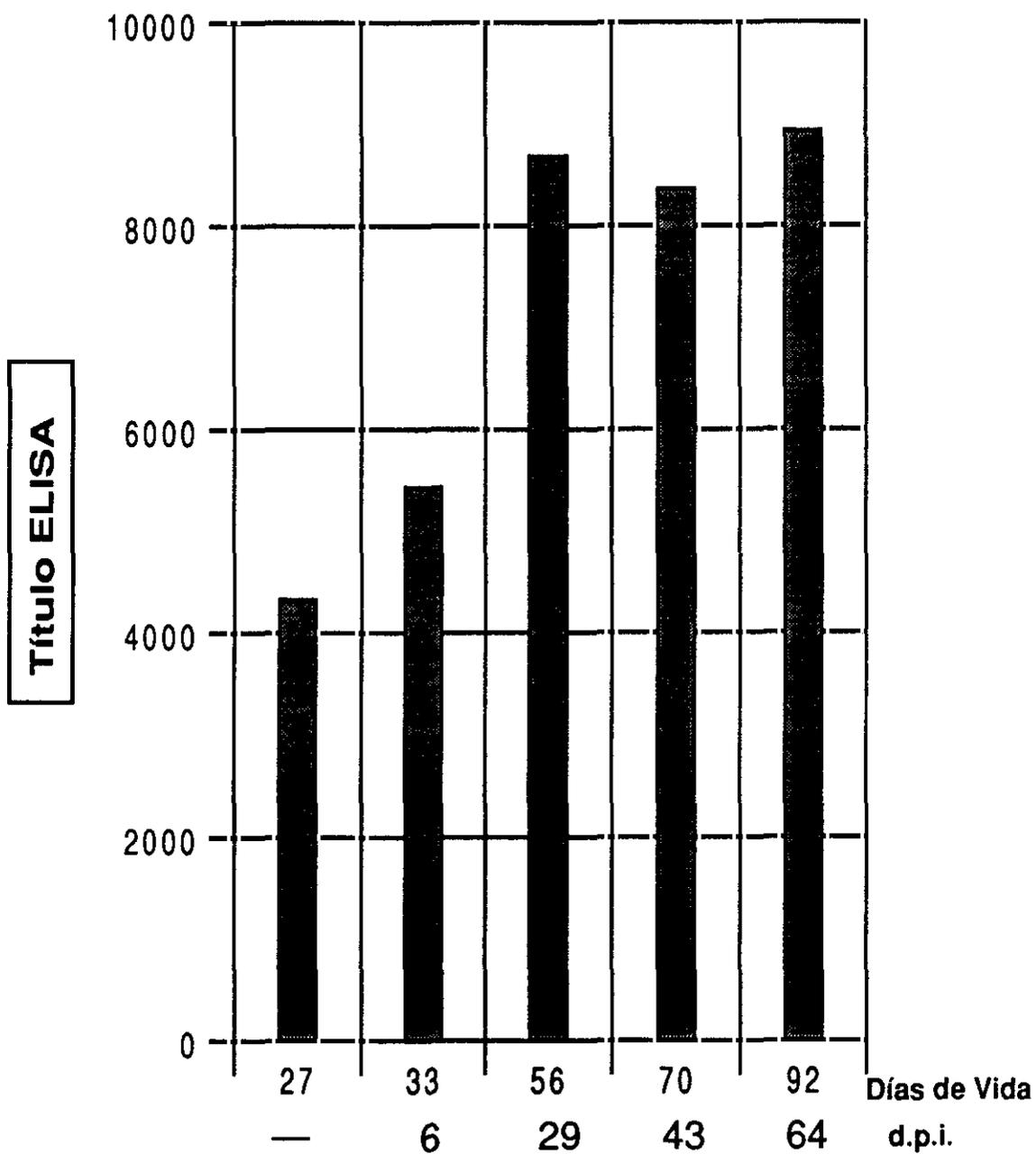
Gráfica III

EVOLUCIÓN SEROLÓGICA DE ANTICUERPOS CIRCULANTES FRENTE AL
SEROTIPO MASS-41 DEL I.B.V. EN LAS AVES DEL LOTE CONTROL



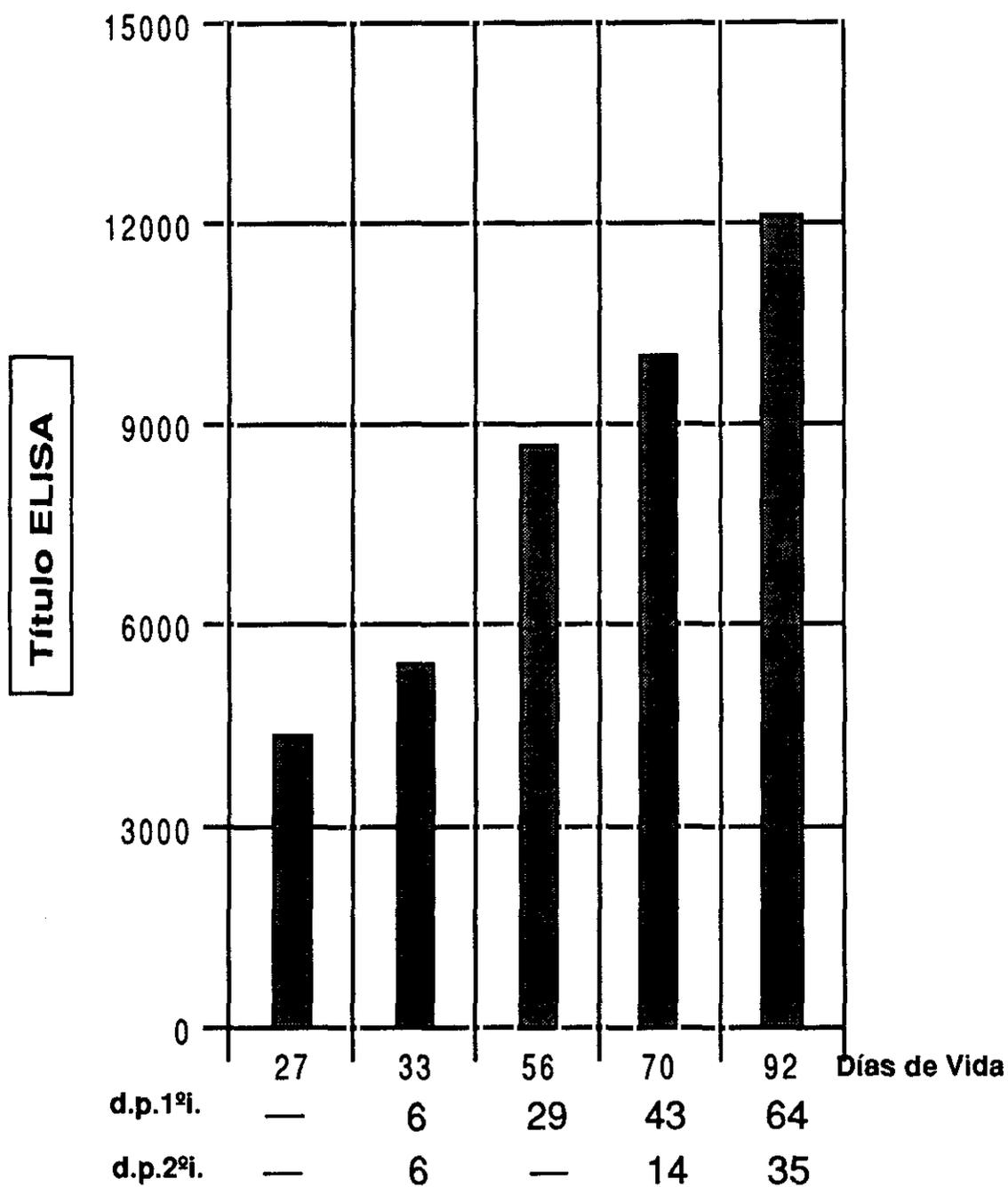
Gráfica IV

EVOLUCIÓN SEROLÓGICA DE ANTICUERPOS CIRCULANTES FRENTE AL
SEROTIPO MASS-41 DEL I.B.V. EN AVES DEL LOTE I



Gráfica V

EVOLUCIÓN SEROLÓGICA DE ANTICUERPOS CIRCULANTES FRENTE AL
SEROTIPO MASS-41 DEL I.B.V. EN LAS AVES DEL LOTE II



Los resultados de los análisis serológicos (tablas III, IV, V) en cada uno de los distintos lotes de esta segunda experiencia, realizados con el fin de determinar la tasa de anticuerpos circulantes producidos frente al I.B.V., revelan la infección real de las aves de los lotes inoculados, por la seroconversión producida en cada caso.

El lote control no presentó seroconversión positiva significativa, dato que junto con la negatividad observada en las pruebas inmunohistoquímicas realizadas y ausencia de lesiones observadas en las vísceras de aves de este lote C, demuestra que las aves del lote control, durante el transcurso de la experiencia (gráfica III) no sufrieron infección por el I.B.V.

Las aves infectadas desarrollan un elevado nivel de anticuerpos circulantes y locales, lo que justifica como veremos, que tras una segunda inoculación del virus de la Bronquitis, la sintomatología y lesiones que se producen sean menos significativas que las producidas tras la primera inoculación, al encontrarse los animales con elevada inmunidad específica (gráficas IV y V).

De igual forma que en la primera experiencia, en los distintos lotes de esta segunda, se realizaron otros análisis serológicos, con el fin de descartar posibles

infecciones secundarias, que de forma accidental podían haber contraído las aves. Con estos análisis se descartan en cada uno de los lotes infecciones la E. de Newcastle, la E. de Gumboro, Encefalomiелitis aviar, Reovirus y Mycoplasmosis. Otros análisis bacteriológicos y micológicos realizados descartan infecciones por salmonellas, E. coli, pasteurellas y hongos, al haber resultado todos ellos negativos.

4.2.3. Resultados anatomopatológicos

4.2.3.1. Estudio macroscópico

Las lesiones observadas en aves del lote I y lote II, tras la primera instilación oculonasal del I.B.V., son similares a las observadas durante el mismo período de la primera experiencia.

En las aves del lote II, una vez efectuada la segunda inoculación por la misma vía y a igual dosis, no se observaron lesiones macroscópicas significativas en el sistema respiratorio de las aves sacrificadas.

De forma aislada, en riñones de dos de las aves sacrificadas de este lote, se apreciaron leves signos de tumefacción a los catorce días de la segunda inoculación.

Las aves del lote control no manifestaron lesiones significativas en ninguno de sus órganos durante todo el transcurso de la experiencia.

4.2.3.2. Estudio histológico

4.2.3.2.1. Lesiones renales

Al observar los cortes renales de los tres diferentes lotes se puede destacar, que las lesiones del lote I evolucionan de idéntica forma que las lesiones renales observadas en las aves del lote infectado en la primera experiencia; hecho lógico ya que hasta el 60 d.p.i. el fundamento y el método de ambas experiencias fue el mismo. Las lesiones histológicas observadas en riñones de aves a los 43, 49 y 57 d.p.i., se corresponden con el cuadro descrito en riñones del lote infectado durante la última fase de la primera experiencia.

Los riñones de las aves del lote I, a los 61 y 70 d.p.i., presentaban marcada regresión de la dilatación de túbulos colectores que se había apreciado en los estudios anteriores, no encontrándose depósitos de uratos. De igual forma hay que destacar una ligera disminución de los infiltrados inflamatorios con disminución del tamaño de las formaciones linfoides y del número de mitosis, apare-

ciendo de forma muy aislada escasas áreas localizadas de fibrosis en el parenquima renal.

A partir del día 77 p.i., los riñones de las aves del lote I presentaron signos de regeneración, habiendo desaparecido las lesiones descritas en períodos anteriores.

Por otro lado hemos podido apreciar en algunos casos correspondientes a las fases finales de esta experiencia, áreas de tejido nefroblástico localizadas preferentemente en zonas periféricas y profundas del riñón que podrían interpretarse como zonas estimuladas en los períodos de reparación renal (Fig. 32 y 33).

Las lesiones histológicas renales observadas en aves del lote II, infectado por primera vez a los 27 días de vida (igual que el lote I) y reinfectado con I.B.V. a los 56 días de vida, fueron similares a las que se habían producido en el lote I, hasta el momento de la segunda inoculación, 29 días después de la primera infección.

Una vez realizada la segunda inoculación de I.B.V., no se observan cambios histológicos significativos en riñones, siendo las lesiones renales similares a las que se producen en aves del lote I, aunque éstas se prolongan por mas tiempo, encontrándose aumentado el número y

tamaño de formaciones linfoides e infiltrados inflamatorios hasta el día 84 posterior a la primera inoculación (55 días después de la segunda inoculación), y se aprecia un comienzo de restitución con ausencia de lesiones a partir del día 90 posterior a la primera inoculación (61 días después de la segunda inoculación (Fig. 34).

En aves del lote II sacrificadas a los 62 y 70 días post 1º inoculación o 33 y 41 d.p. 2º i., respectivamente, se observaron lesiones renales caracterizadas por dilatación tubular y presencia de cristales de uratos en la luz de los túbulos colectores, no apreciándose lesiones glomerulares ni en éste, ni en ningún otro momento de la vida de las aves (Fig. 35).

4.2.3.2.2. Lesiones traqueales

Histológicamente las lesiones observadas en tráqueas del lote I evolucionaron de idéntica forma que en las aves del lote infectado de la primera experiencia, remitiendo totalmente las lesiones descritas, con una total regeneración de la mucosa traqueal a partir del 16 d.p.i., persistiendo en gran número las células caliciformes, no encontrándose otras lesiones significativas durante la vida del lote.

Las lesiones histológicas observadas en las tráqueas de aves del lote II, se correspondieron con las propias de la infección por I.B.V., ya descritas, durante los primeros días posteriores a la primera inoculación del virus. Después de la segunda inoculación se observaron ligeros signos de inflamación e infiltración linfocitaria en la lámina propia, entre el 2º y 5º d.p. 2º i., de igual forma se observa vacuolización epitelial e hipertrofia de células caliciformes. Estas lesiones fueron menos evidentes y en consecuencia pueden ser consideradas como de menor intensidad que las observadas tras la primera inoculación del I.B.V., notándose una completa regeneración epitelial a los 7 d.p. 2º i. (Fig. 38).

4.2.3.3. Estudio Inmunocitoquímico

Sólo significativo en riñones.

El estudio Inmunocitoquímico, anti-IgG de pollo realizado por la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, resultó positivo en riñones de aves infectadas entre los días 15 y 35 p.i. tanto en el lote I, como en el lote II. El 43 d.p.i. se aprecia un considerable descenso de la positividad de esta reacción llegando a considerarse negativa el 70 d.p.i., en las aves del lote I.

En los riñones de aves del lote II, infectado y reinfectado, hay que destacar que en las preparaciones procedentes de los animales sacrificados tras la segunda inoculación de I.B.V., entre los días 35 y 77 p. 1^oi., se aprecia una mayor intensidad anti IgG de pollo (Fig. 39), que comienza a disminuir a partir del 91 d.p.i. Lo que indica una reactivación inmunitaria local encontrándose activadas las formaciones linfoides en el parenquima renal tras la segunda inoculación del I.B.V.

En las aves del lote control, que se mantuvieron en alojamiento separado y aislado de las de lotes infectados, no se detectó positividad anti-IgG con las pruebas inmunocitoquímicas realizadas.

4.2.3.4. Estudio ultraestructural

Las observaciones realizadas con el microscopio electrónico confirman plenamente las alteraciones descritas con el microscopio convencional. Así, y como indicamos en los resultados histológicos de la primera parte, el lote I ha presentado lesiones similares a las de la primera experiencia; únicamente debemos destacar una disminución aún mayor de los infiltrados inflamatorios, así como un discreto incremento de la fibrosis; lo que se ha inter-

pretado como una progresión en la restitución de estructuras debida a la mayor duración de este experimento.

En cuanto al lote II, reinoculado a los 29 días de la primera toma de contacto con el virus, presentó alteraciones ultraestructurales que así mismo confirmaron nuestros resultados histológicos.

4.2.3.4.1. Lesiones renales

En riñón se reproducen las lesiones propias de la nefritis intersticial, con ausencia de alteraciones glomerulares, únicamente es de destacar una ligera prolongación en el tiempo de las lesiones, así como un mayor aumento de las formaciones linfoides, en las cuales se ha podido identificar un incremento de la población de elementos linfoides inmaduros, tales como linfoblastos con núcleos amplios y cromatina laxa y centroblastos con evidentes nucleolos; por otro lado apreciamos una mayor actividad mitótica (Fig. 40). Igualmente apareció un predominio de la diferenciación plasmoblástica o plasmocitaria tanto en los infiltrados inflamatorios intersticiales como en los folículos linfoides, observándose una gran proporción de elementos en las diferentes etapas evolutivas hasta las células plasmáticas (Fig. 41); las cuales en ocasiones mostraron dilataciones del retículo endoplásmico rugoso cargadas de un material finamente granular y de

mediana densidad electrónica, que podrían ser interpretadas en algunos casos como corpúsculos de Russell (Fig. 42). Estos fenómenos son indicativos morfológicos de una mayor reacción inmunitaria, basada fundamentalmente en la inmunidad humoral y por tanto con predominio de población linfoide tipo B.

4.2.3.4.2. Lesiones traqueales

Las tráqueas de las aves correspondientes al lote II, mostraron alteraciones ultraestructurales similares, aunque de menor intensidad que la del lote I, lo cual confirma así mismo nuestros resultados histológicos. De esta forma hemos podido identificar los elementos del infiltrado inflamatorio a nivel de la lámina propia y las dilataciones en la red citocavitaria en las células epiteliales, sobre todo en las regiones pericelulares (Fig. 43), destacando en algunos casos la pérdida de cilios, así como amplios fenómenos regresivos en las células más próximas a la luz traqueal, las cuales aparecen vacuolizadas (Fig. 44).

Finalmente, queremos indicar que con el empleo del microscopio electrónico no se han identificado partículas víricas en ninguna de las experiencias realizadas, tanto en las muestras analizadas de tráquea como de riñón.

4.3. ICONOGRAFIA

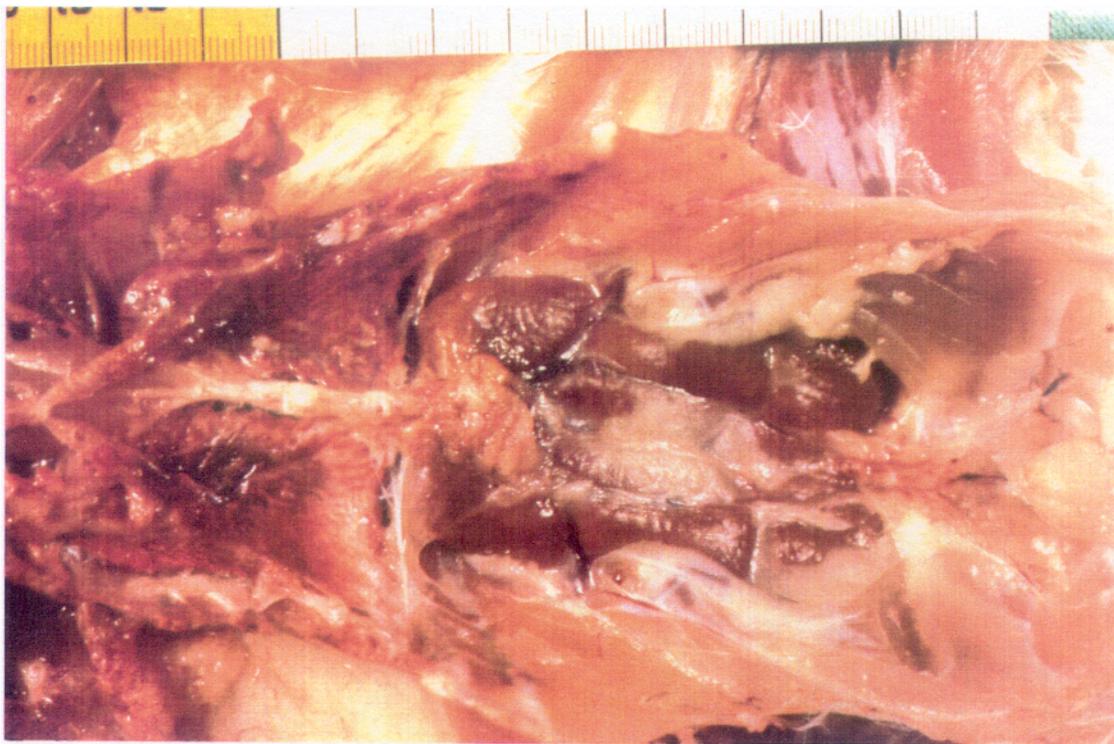


Fig. 1.- Riñón: Lote I, 32° d.p.i. Tumefacción renal. Se aprecia ligera hipertrofia y decoloración.



Fig. 2.- Tráquea: Lote I, 8° d.p.i. Sin lesiones macroscópicamente significativas.

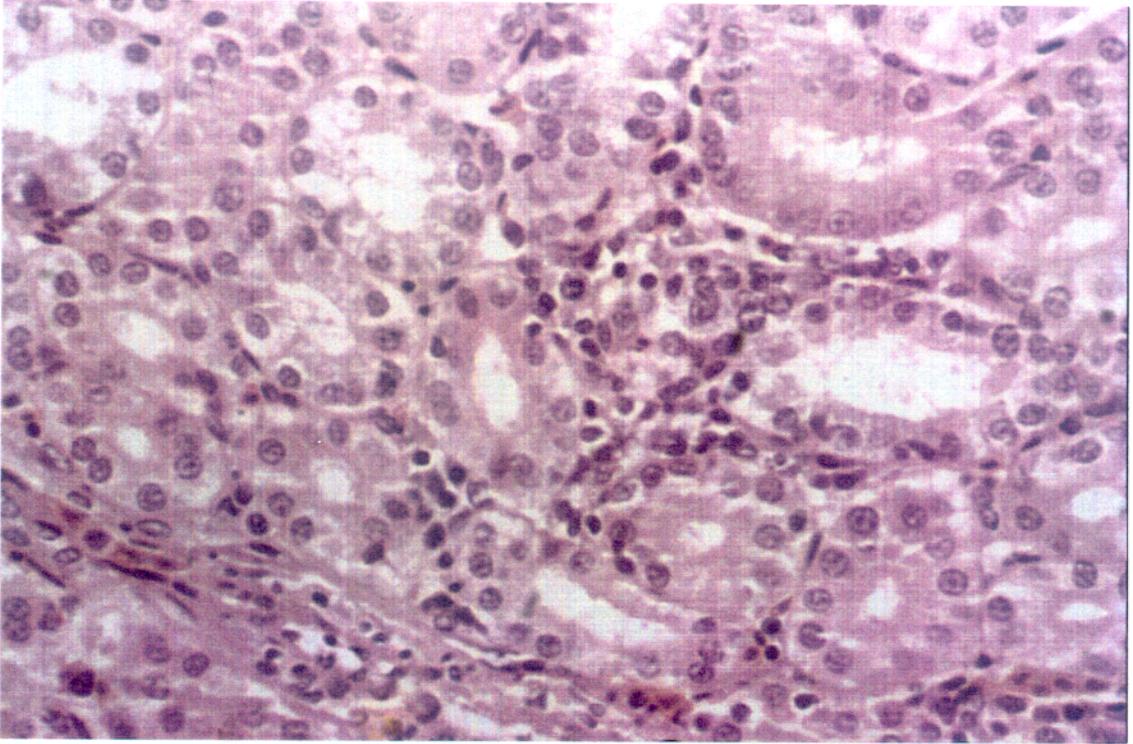


Fig. 3.- Riñón: Lote I, 10° d.p.i. Discreto infiltrado peritubular de células mononucleares; vacuolizaciones en células epiteliales de los túbulos. (H.E. x 500).

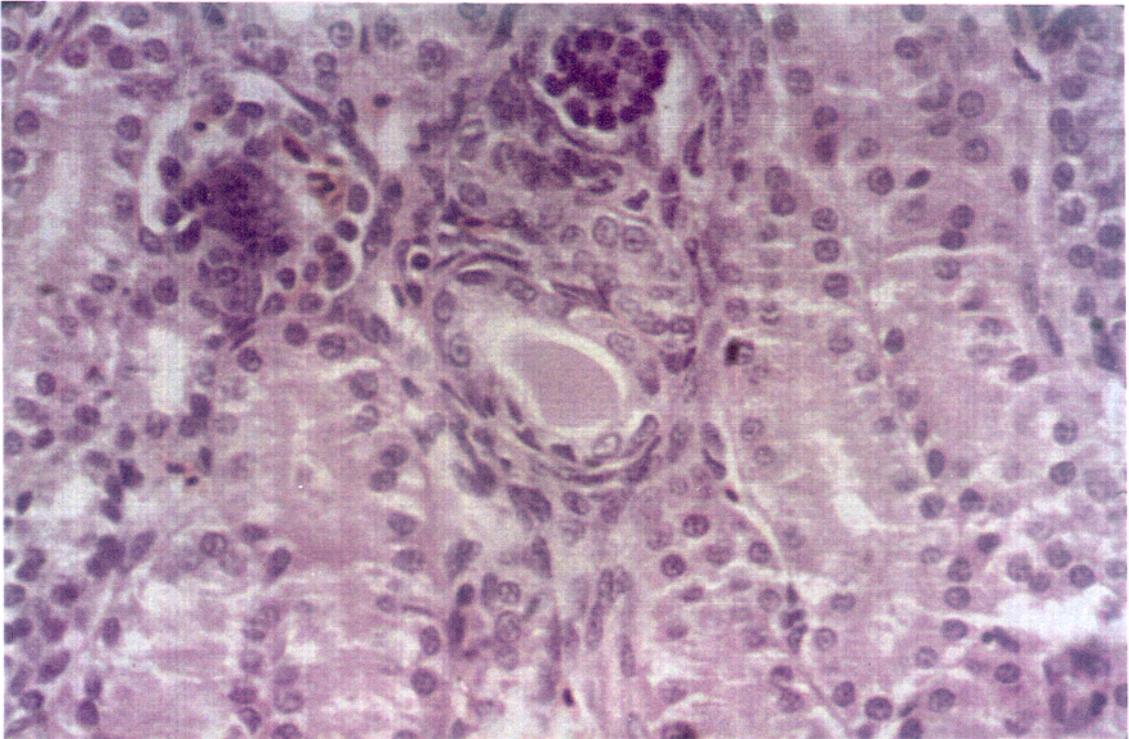


Fig. 4.- Riñón: Lote I, 10° d.p.i. Vacuolizaciones citoplásmicas en las células epiteliales de los túbulos, en el centro se aprecia la formación de un cilindro hialino. (H.E. x 500).

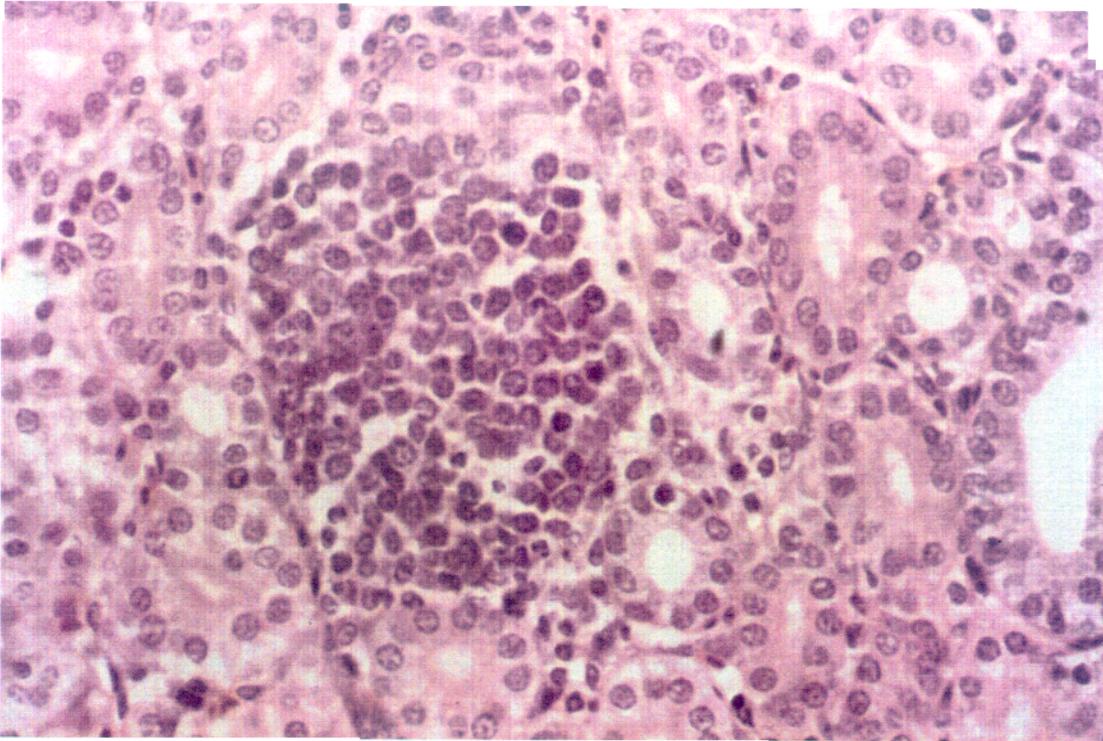


Fig. 5.- Riñón: Lote I, 12° d.p.i. Folículo linfoide en la zona medular del riñón en la que predominan linfocitos inmaduros. (H.E. x 500).

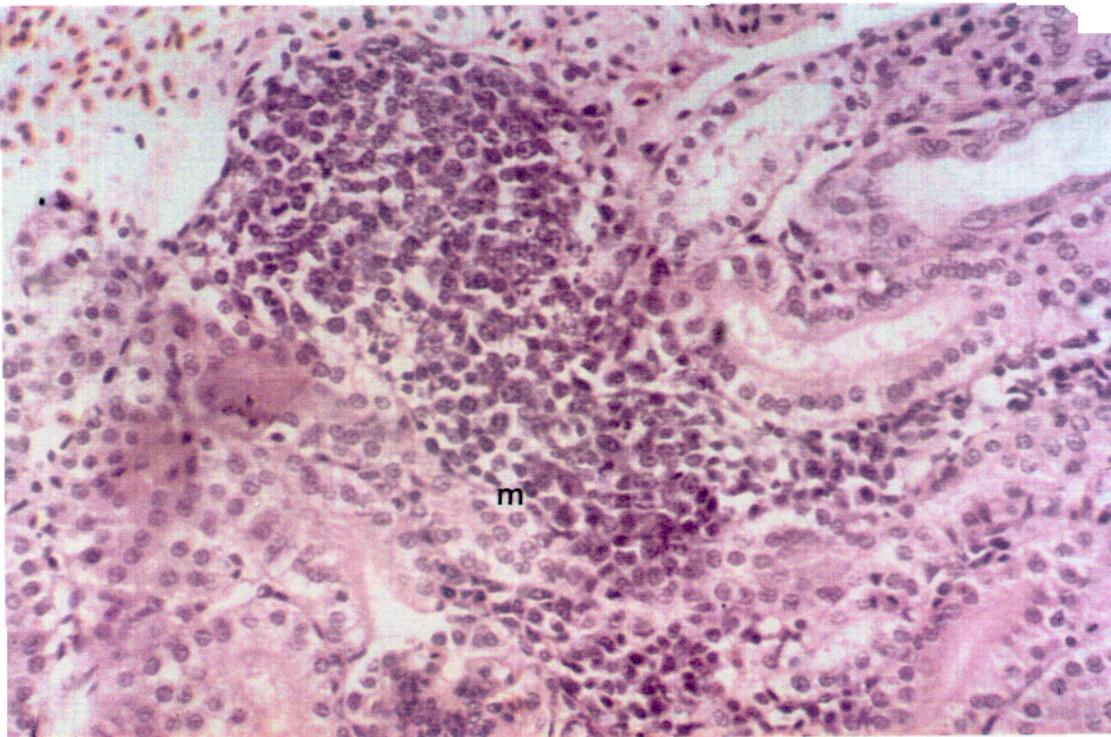


Fig. 6.- Riñón: Lote I, 18° d.p.i. Amplia formación linfoide activada en la que se pueden apreciar mitosis (m). (H.E. x 312).

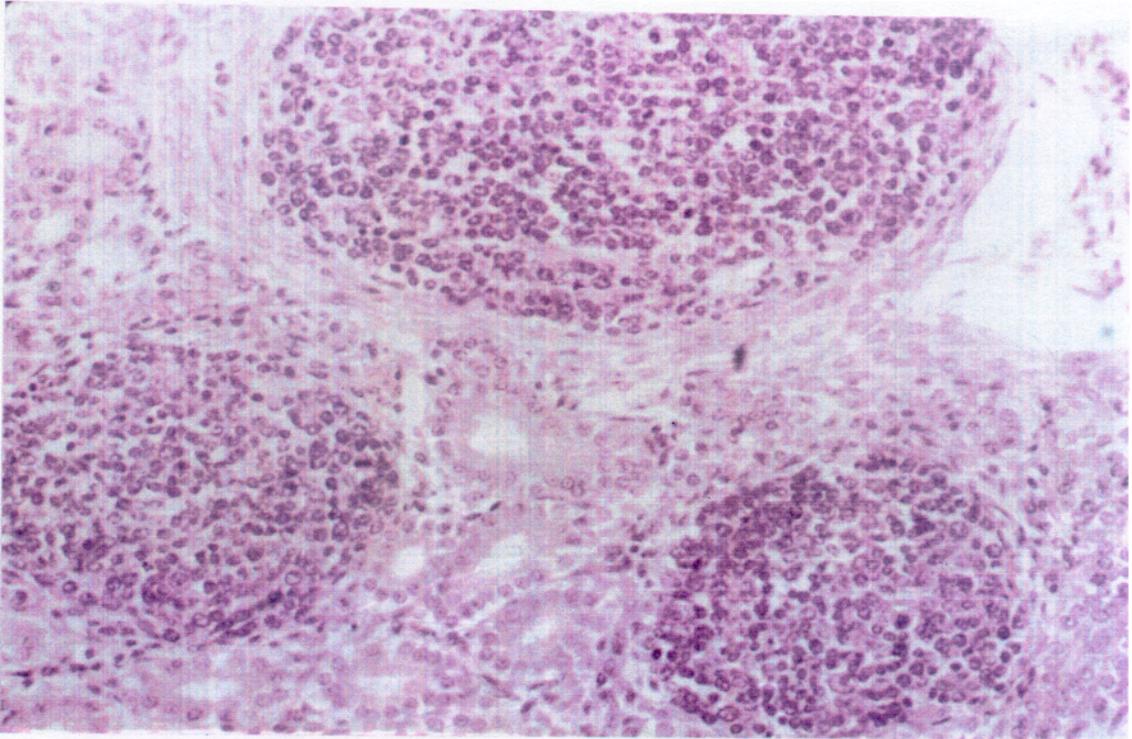


Fig. 7.- Riñón: Lote I, 18° d.p.i. Formaciones linfoides múltiples activadas en la zona medular renal. (H.E. x 312).

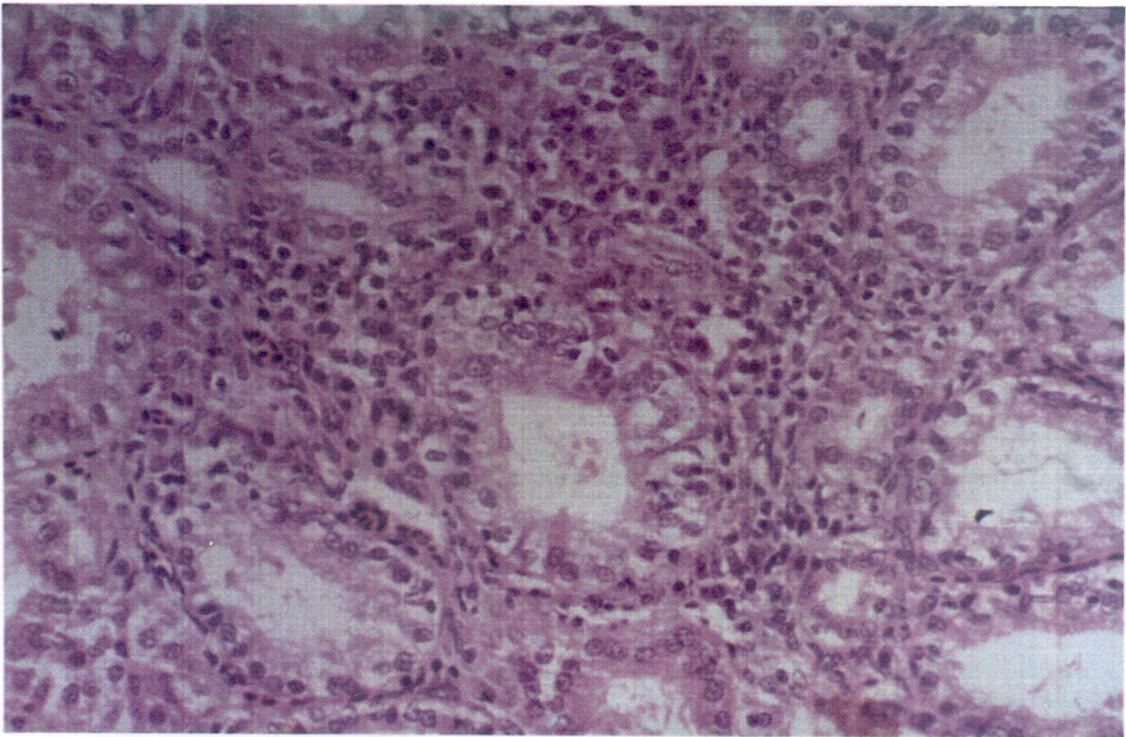


Fig. 8.- Riñón: Lote I, 24° d.p.i. Infiltrados inflamatorios mononucleares focales entre los túbulos. Se aprecian fenómenos regresivos en las células epiteliales tubulares. (H.E. x 312).

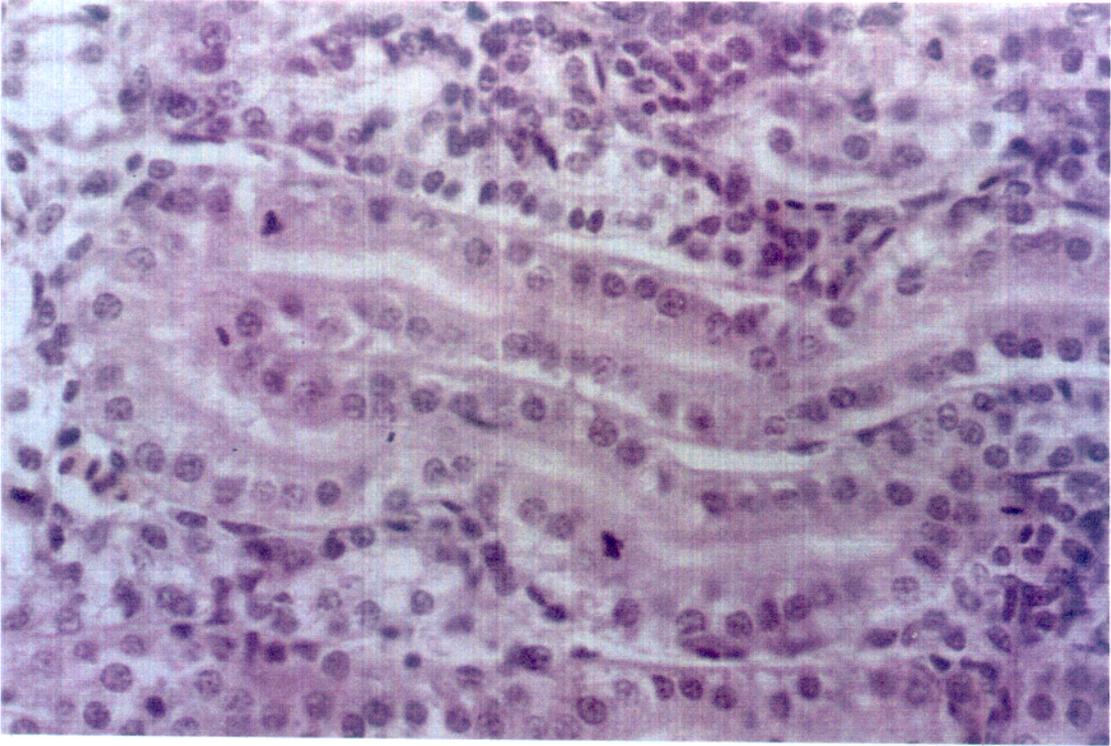


Fig. 9.- Riñón: Lote I, 24° d.p.i. Fenómenos regresivos de células epiteliales. Se aprecian figuras mitóticas. (H.E. x 500).

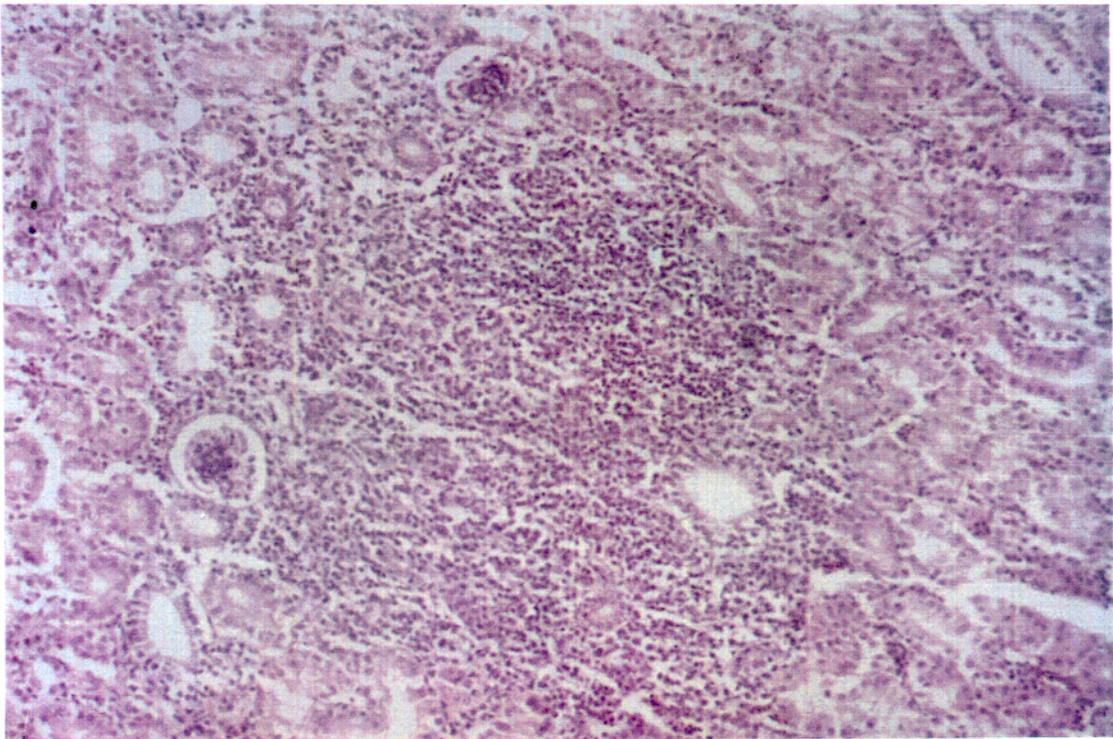


Fig.10.- Riñón: Lote I, 32° d.p.i. Extensos infiltrados inflamatorios intersticiales de células mononucleares. (H.E. x 125).

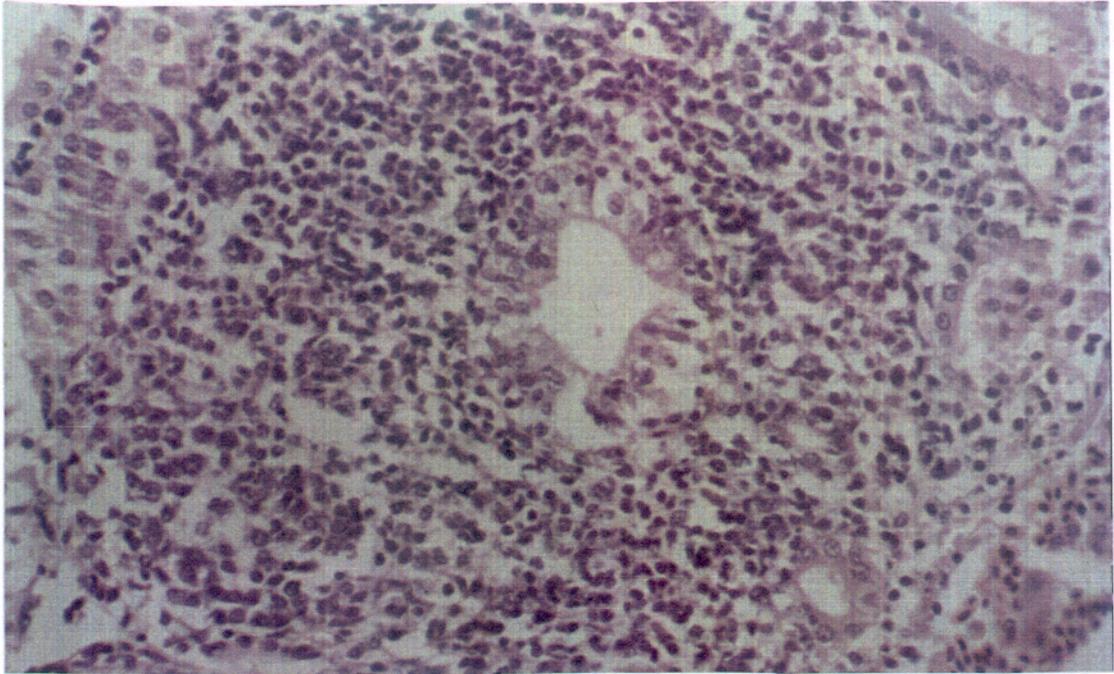


Fig. 11.- Riñón: Lote I, 32° d.p.i. Infiltrado inflamatorio peritubular con evidente vacuolización del epitelio tubular. (H.E. x 312).

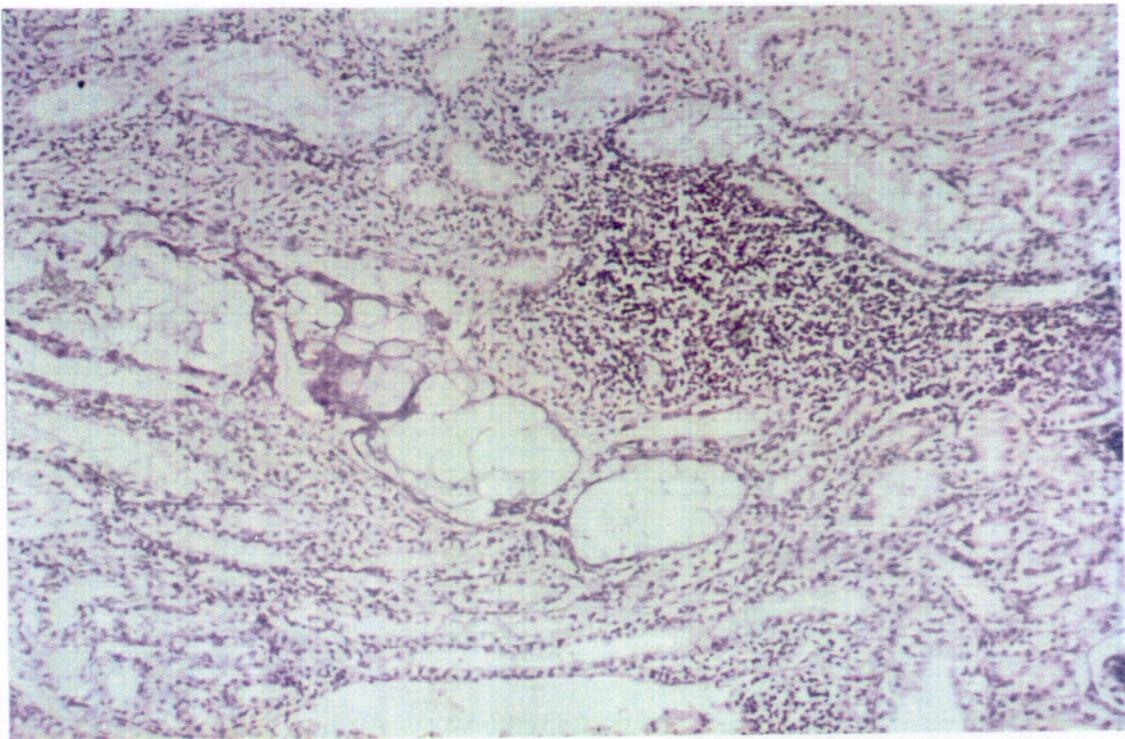


Fig. 12.- Riñón: Lote I, 60° d.p.i. Extenso infiltrado inflamatorio entre tubos colectores dilatados. Se aprecia tumefacción de las células epiteliales. (H.E. x 125).

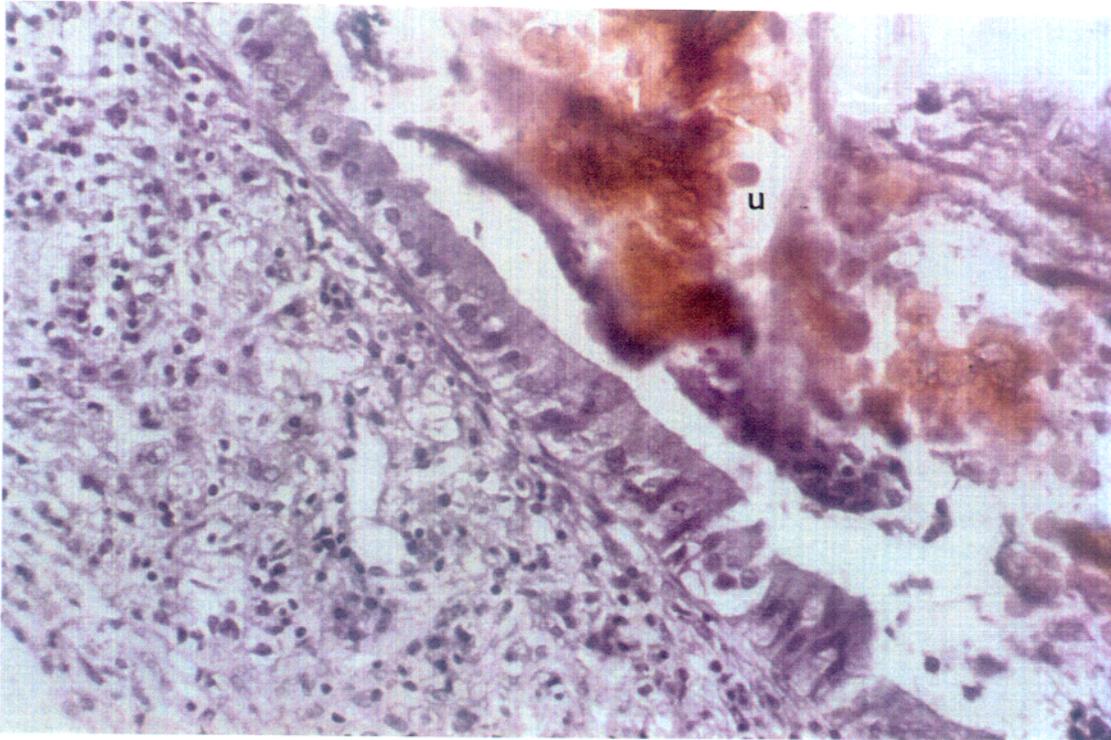


Fig. 13.- Riñón: Lote I, 60° d.p.i. Dilatación de tubos colectores con presencia de cristales de uratos (u), en su luz. (H.E. x 312).



Fig. 14.- Tráquea: Lote I, 2° d.p.i. Discreto edema y aumento de los elementos linfoides en lámina propia. (H.E. x 500).

ABRIR CONTINUACIÓN ICONOGRAFÍA

