

ENFERMEDADES INFECCIOSAS DE LAS AVES

ENFERMEDADES CAUSADAS POR BACTERIAS

TUBERCULOSIS AVIAR

La enfermedad tiene una distribución mundial y se da en muchas clases de aves, aunque no todas las variedades presentan igual susceptibilidad. El microorganismo origina tuberculosis en pollos y aves de corral así como en otras aves (aves domésticas y silvestres) pero también puede afectar a una amplia variedad de diferentes especies animales como cerdos, ganado bovino, ciervos, ovejas, cabras, caballos, gatos, perros y especies exóticas.

La tuberculosis aviar es muy frecuente y su incidencia es alta en las pequeñas granjas campesinas en donde las gallinas se mantienen muchos años, y los corrales e instalaciones están contaminados. En las granjas industriales la infección ocurre raramente, debido a la reposición rápida de las aves, las condiciones de mantenimiento y las medidas de higiene. La tuberculosis de los pavos está asociada a la de gallinas infectadas.

Los patos y gansos son poco susceptibles a *M. avium*.

Agente etiológico: la bacteria ***Mycobacterium avium* (bacilo)** de crecimiento lento, no fotocromógeno y ácido-alcohol resistente.

Modo de transmisión: *M. Avium* es diseminada por ingestión de comida o agua contaminada por heces de aves que lo diseminan. Los animales con tuberculosis deben eliminarse. La fuente primaria de infección es el ambiente contaminado con este agente.

La vía de infección es la digestiva con lesiones predominantes en hígado, bazo, intestino y médula ósea, pocas veces en los pulmones y riñones.

Síntomas: En aves, ***M. avium*** causa una enfermedad debilitante crónica con nódulos tuberculares, Las lesiones tuberculosas se encuentran con más frecuencia en el tracto intestinal, en el hígado y en el bazo.

Hallazgos en la necropsia: se observa granulomas que presentaron centro caseonecrotico no mineralizado con bacilos ácido-alcohol resistentes en la histopatología.

Zoonosis: En los humanos, *M. avium* es capaz de inducir una enfermedad progresiva que es resistente al tratamiento. Todas las operaciones que impliquen el manejo de cultivos vivos abiertos de *M. avium*, o de material de aves infectadas, deben realizarse con un nivel adecuado de contención del biorriesgo.

En humanos, las infecciones por *M. avium* pueden causar infecciones locales con nódulos linfáticos inflamados en ciertas regiones. La infección es más severa en individuos inmunocomprometidos.

El potencial zoonótico de esta enfermedad ha adquirido relevancia con la pandemia de HIV por ello todas las maniobras que involucren la manipulación de microorganismos viables, deben ser llevadas a cabo con adecuadas medidas de bioseguridad.

Diagnóstico: El diagnóstico de la tuberculosis en aves depende de la demostración de *M. avium* en aves muertas o de la detección de una respuesta inmune, celular o humoral, en aves vivas. Identificar mediante histopatología, bacteriología y biología molecular la etiología de lesiones compatibles con tuberculosis. Pruebas bacteriológicas y por PCR en las cepas aisladas.

- **Identificación del agente:** Para establecer un diagnóstico positivo es suficiente la observación de síntomas clínicos en la población, la presencia de lesiones típicas de tuberculosis en las necropsias de las aves o la demostración de bacilos ácido-alcohol resistentes en los frotis o secciones de los órganos de los animales afectados. Si las aves presentan síntomas o lesiones típicas pero no se detectan bacilos ácido-alcohol resistente, debe intentarse el cultivo del microorganismo. Esto puede realizarse en medios de cultivo artificiales. Cualquier microorganismo ácido-alcohol resistente aislado debe identificarse por criterios bioquímicos, de semejanza de ácidos nucleicos, o por métodos serológicos o cromatográficos (cromatografía de lípidos en capa fina). En algunos casos (sobre todo si el aislamiento no corresponde a los serotipos 1, 2 y 3), se debe demostrar la virulencia del aislamiento mediante inoculación de la especie aviar afectada.
- **Prueba de la tuberculina y pruebas serológicas:** Normalmente estas pruebas se emplean para determinar la prevalencia de la enfermedad en una población o para detectar aves infectadas. Cuando se utilizan para detectar la presencia de tuberculosis a nivel poblacional, las pruebas deben confirmarse en la necropsia de cualquier ave que presente reacciones positivas.

En las aves de corral, la prueba de elección es la prueba de la tuberculina en la barbilla. Esta prueba es menos útil en otras especies de aves. Una prueba mejor, especialmente para aves acuáticas, es la prueba de aglutinación de sangre completa con antígeno coloreado (Rozanska), que resulta más fiable y tiene la ventaja de dar resultados en unos cuantos minutos, mientras aún se mantiene al ave. Estas pruebas no son fiables en aves enjauladas.

La inoculación de la tuberculina se realiza en los pollos en el pliegue de la barbilla. La dosis indicada es de 0,1 ml de una concentración 0,5 mg/ml de PPD aviar. La lectura se realiza después de las 48 hs, observándose en los animales positivos un engrosamiento edematoso

Tratamiento: *M. Avium* es altamente resistente a antibióticos. La operación de para remover los nódulos linfáticos es frecuentemente necesaria para eliminar la infección.

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: No existen vacunas para utilización en aves. Se dispone de una preparación de antígeno coloreado con 1% de verde malaquita para la prueba de aglutinación de sangre completa. En la prueba de la tuberculina para aves domésticas la preparación estándar es un derivado proteico purificado de la tuberculina aviar.

COLERA AVIAR (Pasteurellosis aviar)

El cólera aviar es una enfermedad infecciosa de tipo septicémico, ocasionada por *Pasteurella* spp, un bacilo gram-negativo. Este germen puede ser fácilmente controlado mediante terapia antimicrobiana ya que, entre otros, es sensible a principios activos tales como la enrofloxacina, la flumequina o la doxiciclina.

Tema aparte lo constituyen las gallinas ponedoras, ya que de forma invariable y salvo excepciones eritromicina sigue estando prohibido el uso de estos productos en aves de puesta o bien se indica que no deben consumirse los huevos de aves tratadas con un tiempo de espera que no sea inferior a 7 días para huevos y 28 días para carne. Para evitar las pérdidas económicas que conlleva la aparición de todo brote de cólera aviar, se impone el estudio profundo de esta enfermedad, de su agente causal y sobre todo de sus vías de transmisión, que nos permite llevar a cabo una correcta profilaxis mediante vacunación, el establecimiento de medidas de bioseguridad y el control higiénico y sanitario de la explotación para evitar el contagio o su propagación.

Agente etiológico: Una bacteria llamada **Pasteurella multocida** subespecie multocida, aunque P.multocida subespecies septica y gallicida pueden también, en cierta medida, provocar enfermedades afines. Es un bacilo Gram-negativo que, en general, ataca a todo tipo de aves. Se han aislado 16 serotipos de Pasteurella aviarias, pero los más frecuentes en los brotes naturales corresponden a los serotipos 1, 3, 4 y 5. Por ello las vacunas suelen contener estos serotipos de Pasteurella multocida. Bacteria anaerobia facultativa que crece mejor a 37°C.

Transmisión: Puede ser horizontal, por contacto, o bien por contaminación del pienso o del agua por excretas o desechos procedentes de animales enfermos. La enfermedad no se transmite a través de los huevos.

Entra en el organismo a través del aparato digestivo o a través del sistema respiratorio. La Pasteurella multocida puede sobrevivir hasta un mes en los excrementos, tres meses en los desechos contaminados y de dos a tres meses en el suelo.

El período de incubación es de 1 a 4 días. El brote se presenta entre los cuatro y nueve días después de contraída la infección. Generalmente se observa en pavos de más de 8 semanas de edad y pollos mayores de 12 semanas, aunque también se describe en broilers a partir de las 3 semanas de edad.

Síntomas: Infección aguda o septicémica: alta morbilidad y mortalidad, muerte súbita, cianosis, tortícolis, problemas respiratorios, descarga mucosa por boca y fosas nasales.

- **Infección crónica:** menor índice de mortalidad, pérdida del apetito, depresión, barbillas inflamadas, azuladas y edematosas, conjuntivitis, abscesos caseosos, descenso en la producción de huevo del 5 – 15%.
Cuadro anatomopatológico
- **Infección aguda o septicémica:** hepatomegalia con focos necróticos (punteado blanquecino), aerosaculitis, pericarditis, celulitis, endocarditis, además suele observarse: consolidación de pulmones en pavos, peritonitis y ooforitis en reproductores.
- **Infección crónica:** barbilla azulada y edematosa, sinovitis, otitis, osteomielitis, conjuntivitis, abscesos y exudados caseosos en peritoneo,

además suele observarse: abscesos en el esófago en aves rapaces.

Diagnóstico: Aislamiento y/o identificación del microorganismo. El uso de ELISA para la detección de anticuerpos de Pasteurella.

Pasteurella multocida es fácil de aislar, con frecuencia en cultivo puro, de vísceras y órganos como el pulmón, hígado y bazo, médula ósea, gónadas o sangre del corazón de aves que mueren por la forma bacterémica aguda de la enfermedad, o de los exudados caseosos característicos de las lesiones del cólera aviar crónico.

La identificación de Pasteurella multocida se basa en resultados de pruebas bioquímicas, que incluyen fermentación de carbohidratos, producción de enzimas y producción de determinados metabolitos.

Pruebas serológicas: Para el diagnóstico del cólera aviar se usan raramente pruebas serológicas. La facilidad de obtener un diagnóstico confirmativo mediante aislamiento e identificación del organismo causal evita por lo general la necesidad del serodiagnóstico.

Tratamiento Y Control

Sulfamidas, penicilina, enrofloxacin, flumequina, ácido oxolínico, espectinomicina, tetraciclina, doxiciclina, eritromicina y estreptomycin.

Es por ello que se recomienda la vacunación como medida preventiva. Lamentablemente, dadas las dificultades que todavía plantea la elaboración de vacunas vivas eficaces y seguras, en la mayoría de las ocasiones la lucha contra la enfermedad sigue dependiendo de vacunas preparadas con bacterinas, que presentan notables desventajas en comparación con las vacunas vivas.

No se transmite a través del huevo. Criar las aves en aislamiento, lejos de aves que pudieran ser portadoras. Recoger y destruir todas las aves enfermas y muertas antes de ser canibalizadas. Bacterinas y vacunas vivas. Después de un

brote de cólera se debe depopular, limpiar y desinfectar. Medicación (muy cara). Reducir el número de roedores, animales de carroña, y depredadores.

Dx diferencial: Debe diferenciarse de erisipelas, colibacilosis aguda y ORT.

TIFOIDEA AVIAR

Las aves de corral y los pájaros son susceptibles a varias infecciones, La Tifoidea Aviar no se debe confundir con la fiebre tifoidea que afecta a los humanos. Esta última es causada por un organismo muy diferente. Cualquier ave de cualquier edad se puede infectar con Tifoidea Aviar, pero la enfermedad ocurre principalmente en pollos y pavos en crecimiento o adultos jóvenes (generalmente mayores de doce semanas de edad). El porcentaje de mortalidad varía de menos de un por ciento a más del cuarenta por ciento, pero un índice de mortalidad más alto se ha observado, especialmente en pollos.

Aunque un brote de tifoidea-pulorosis causa grandes pérdidas por muerte, algunas aves sobrevivirán y serán portadores de la enfermedad de por vida. Si estos pájaros se introducen en una nueva bandada, ellos pueden comenzar el ciclo de la enfermedad de nuevo, y los sobrevivientes pueden convertirse en portadores y volver a iniciar el ciclo de la enfermedad. Debido a que los organismos pueden permanecer vivos durante meses, la bacteria de la tifoidea se puede transmitir mecánicamente de un sitio a otro por medio de los zapatos, la ropa o el equipo que no ha sido desinfectado apropiadamente.

Etiología: salmonella gallinarum y S. pullorum pertenecen a la especie S. enterica, que se clasifica dentro del grupo de la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos que miden entre 1 y 2,5 μ de longitud, Gram negativos y anaeróbicos facultativos. A diferencia del resto de las salmonelas son siempre inmóviles, siendo ésta una de las características diferenciales en el momento del diagnóstico. Sin embargo se debe tener en cuenta que en las aves también pueden detectarse otras cepas inmóviles de salmonella spp., como por ejemplo aquellas del grupo somático 4, 5, 12 (22). Ambas biovariedades pertenecen al Grupo serológico D y presentan idéntica estructura antigénica (1, 9, 12: -), razón por la que no pueden diferenciarse entre sí mediante pruebas serológicas

Especies a las que ataca: pollos, gallinas, patos así como aves domésticas y silvestres.

Transmisión: a través del huevo, transmisión de madre a hijo, por la contaminación de aves enfermas con las sanas, vía exudados nasales, saliva y excrementos.

El excremento de los pájaros portadores está contaminado, y las gallinas pueden pasarle bacterias a los polluelos (o pollitos) por medio de los huevos. Muchos de estos huevos cargados de bacterias no romperán el cascarón, o los polluelos morirán poco después de salir del huevo. Los polluelos sobrevivientes pueden estar débiles y soñolientos y tener diarrea blanca y pastosa alrededor de las plumas cercanas al ano.

Síntomas:

Mortalidad repentina o esporádica, apatía, diarrea verde o amarilla (acompañada de la adhesión de las plumas cercanas al ano), pérdida de apetito, incremento de sed y una apariencia pálida de la cresta y carúncula, los pollitos suelen agruparse como si tuvieran frío, con ciertos síntomas respiratorios, las aves de mayor edad tienden a tomar mucho agua y las heces son diarreicas de color verdoso.

Después de un período de incubación de 3 a 21 días, las aves de corral jóvenes exhibirán falta de ánimo o encorvamiento, plumas erizadas, respiración forzada, y pueden aparentar que sufren de frío. La pulorosis también puede causar que los pájaros desarrollen inflamación en las coyunturas. Muchas enfermedades de las aves de corral y pájaros pueden presentar signos similares.

Dx diferencial: coccidiosis intestinal y coccidiosis cecal

Medidas de Bioseguridad en la Finca:

Los propietarios y productores de aves de corral siempre deben seguir buenas prácticas de bioseguridad para prevenir la introducción de enfermedades en su bandada. Las buenas prácticas incluyen lo siguiente:

- Usar una filosofía de "todo entra, todo sale" en el manejo de bandadas.

- Limpiar y desinfectar completamente el equipo, y las llantas y la armazón inferior de los vehículos que entran o salen de la finca (rancho).
- No prestar ni pedir prestado equipo ni vehículos de otras operaciones de aves de corral.
- Permitir que solo los trabajadores y vehículos esenciales entren a la finca.
- Proporcionar instalaciones limpias para que los empleados que trabajan con aves de corral puedan guardar su ropa y desinfectarse.
- Proteger a las aves de corral evitando que entren en contacto con aves silvestres o migratorias.
- Mantener a las aves de corral lejos de cualquier fuente de agua que puede haber sido contaminada por aves silvestres o aves acuáticas migratorias.
- Evitar las visitas a otras fincas de aves de corral. Si usted debe ir a otra finca o a un mercado de aves vivas o mercados de pulgas, cámbiese la ropa y los zapatos antes de trabajar con sus propias bandadas.
- No lleve aves a su bandada a menos que conozca el estado de salud de la bandada de origen.

Diagnostico:

Serológicas: Se han utilizado varias pruebas serológicas para la detección de la Tifoidea Aviar en aves reproductoras. En las granjas la prueba de elección es el antígeno “pullorum” teñido que directamente se usa con una gota de sangre completa y en el laboratorio se pueden utilizar la prueba serológica rápida (SR) en portaobjetos, la aglutinación en tubo (AT), la prueba de micro-aglutinación utilizando antígenos teñidos con tetrazolium o verde brillante o equipos de ELISA para la detección de salmonella spp. Del grupo somático 1, 9, 12.

Bacteriología Los órganos de elección para el aislamiento *S. galinarum* son el hígado, bazo y contenido de ciegos. Las muestras de materia fecal pueden contener con frecuencia salmonelas de este grupo pero existen casos de enfermedad septicémica aguda en los cuales no existe excreción fecal durante ciertos períodos de la enfermedad. En pollitos jóvenes es esencial la toma de muestras del saco vitelino. En aves con enfermedad crónica las muestras de elección son óvulos afectados, testículos o el contenido de articulaciones afectadas. Cuando la enfermedad es aguda, la bacteria puede aislarse fácilmente a partir del cultivo directo mediante improntas de órganos en placas de agar. En aves con septicemia la bacteria puede aislarse también de la médula ósea del tarsometatarso, siendo esta técnica ideal para examinar aves que se encuentran muertas en los galpones y cuyos órganos están contaminados. Cuando se trata de

pollitos BB ó aves adultas con enfermedad crónica el número de bacterias suele ser muy bajo, siendo entonces recomendable cultivar previamente las muestras en caldos de enriquecimiento selectivo.

Vacunación: Si bien experimentalmente se han evaluado distintas vacunas vivas e inactivadas para el control de la TA, en Argentina y en varios países de Latinoamérica sólo ha tenido uso generalizado la vacuna viva basada en la cepa 9R30, que es la única aprobada por las autoridades sanitarias para la prevención de la TA en gallinas ponedoras. Con esta vacuna se ha demostrado que el empleo combinado de las vías oral e inyectable brinda protección más completa.

También se efectuaron ensayos con otras cepas atenuadas de *S. gallinarum*, pero las mismas no demostraron ser mejores que la cepa 9R. Por otro lado, las vacunas inactivadas, utilizando células enteras, no tienen uso generalizado por su poca efectividad. Sin embargo, experimentalmente se ha demostrado que si se usan las proteínas purificadas de la membrana externa de *S. gallinarum* existe una mayor exclusión de las salmonelas patógenas de los órganos internos que cuando se emplea la cepa 9R (5).

ENFERMEDAD RESPIRATORIA CRÓNICA

Chronic Respiratory Disease (CRD)

MICOPLASMOSIS

Se han aislado varias especies de *Mycoplasma* de los huéspedes aviares; *M. gallisepticum*, *M. iowae*, *M. meleagridis* y *M. synoviae* son los patógenos más importantes. Los micoplasmas son bacterias exigentes, de 0,3 a 0,8 μ m de diámetro, carecen de pared celular y necesitan un medio de crecimiento rico con suero. No sobreviven durante más de unas horas o días fuera del huésped y son vulnerables a los desinfectantes comunes. Cada una presenta características epidemiológicas y patológicas distintivas.

INFECCION POR MYCOPLASMA GALLISEPTICUM

(Infección por organismo similar a pleuroneumonía; enfermedad respiratoria crónica; sinusitis infecciosa)

La infección por *M. gallisepticum* se conoce comúnmente como enfermedad respiratoria crónica en los pollos y como sinusitis infecciosa en los pavos. Se observan afecciones similares en los faisanes, perdices chukar y pavos reales. La infección en los pichones, codornices, patos, gansos y aves psitacinas debe ser

considerada. Las aves de tipo paserina son bastante resistentes. La enfermedad se observa en el mundo entero. Sus efectos son más graves en las granjas comerciales grandes durante el invierno.

M. gallisepticum es el micoplasma aviar más patogénico; sin embargo, las cepas pueden diferir mucho en su virulencia. El aislamiento primario se logra en medio de caldo enriquecido que contiene 10 a 15% de suero, y luego se coloca en placas de agar. Las colonias típicas se identifican por inmunofluorescencia.

IMPORTANCIA DE LA CRD

- 1-7% de mortalidad
- 10% de disminución de la puesta y del crecimiento (lotes desiguales)
- 10-15% de problemas de eclosión de pollitos
- 5-7% descenso de rendimiento en carne (aumento de los decomisos) en granjas con infecciones inaparentes.
- Gastos de medicación sistemática
- Gastos de profilaxis sanitaria y médica.

ETIOLOGÍA:

- ***Mycoplasma gallisepticum*.**

Cepas de variada virulencia.

También causa la **sinusitis infecciosa en pavos**.

- Clase Mollicutes, sin pared celular.
- Pueden multiplicarse en medios artificiales enriquecidos.
- Crecen profundamente en el agar y forman colonias diminutas con aspecto de huevo frito.

EPIDEMIOLOGIA

- Sensibilidad:

- Varias especies aviares.
- Todas las edades:
- Futuras ponedoras: 4-8
 - semanas antes de iniciar la puesta.
- Broilers: a las 4 semanas de edad.

TRANSMISIÓN:

- **Horizontal**
- **Vertical** y después por vía horizontal al resto de pollitos.

DISTRIBUCIÓN Y PRESENTACIÓN:

- Mundial.
- Infecciones inaparentes
- Factores ambientales desfavorables
- Cambios en los métodos de producción
- Después de vacunar
- Más grave asociada a otras infecciones respiratorias.

CUADRO CLINICO

- Tropismo respiratorio: sinusitis, aerosaculitis.
- Periodo de incubación: 5-21 días, Mb 80-100% y Mt 5- 20%
- Tos, estornudos y secreciones serosas que evolucionan a purulentas, acompañadas de sacudidas de cabeza.

Ponedoras:

- disminuyen el porcentaje de puesta

- Flujo nasal maloliente.

Broilers (3-8 semanas):

- dejan de comer
- Adelgazamiento extremo y muerte (hasta el 30%).

Pavos:

Sinusitis infraorbitaria uni o bilateral (“cabeza de lechuza”). Traqueitis y tortícolis.

LESIONES

- Inflamación catarral o purulenta.
- **Triada de lesiones**

(También se describen en la ornitosis y en infecciones por E. coli). Aerosaculitis, Pericarditis adhesiva, pericarditis y perihepatitis fibrinosa.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL:

Pollos:

- BIA, NC (MG suele ser complicante)
- Coriza, cólera, E.coli (cultivo).

Pavos:

- TRT (Pneumovirus)
- Coriza del pavo (B. avium)
- ORT (O. rhinotracheale)
- Ornitosis (C. psittaci)
- Mycoplasma meleagridis
- Influenza.

DIAGNOSTICO LABORATORIO:

- Cultivo: EP o en medios enriquecidos con suero, extracto de levadura y NAD (colonias en huevo frito).
- Detección de micoplasma sobre tejidos: IF.
- Serología: aglutinación rápida (reacción cruzada con *M. synoviae*) y ELISA.

TRATAMIENTO

- La producción de una manada infectada con baja prevalencia sale más rentable que hacer tratamiento sistemático.
- Eliminar fuentes de stress y mejorar las condiciones de manejo.
- Antibióticos durante 5 días, en agua de bebida, pienso o vía parenteral:
 - Tetraciclinas
 - Macrólidos (tilosina, espiramicina)
 - Aminoglicósidos (lincomicina+espectinomicina, neomicina, gentamicina)
 - Fluoroquinolonas (enrofloxacina, danofloxacina)
 - Tiamulina

PROFILAXIS

- **Mejorar condiciones de manejo.**

- **Saneamiento:**

Desechar animales infectados y comprar sanos con elevada inmunidad materna.

Separar los seropositivos haciendo controles periódicos.

Administrar antibióticos de forma periódica.

- **Tratamiento huevos:**

con antibióticos (inoculación o inmersión con cambio de presión)

con calor (46°C durante 11-14 horas).

VACUNAS VIVAS (cepa F):

Exposición controlada durante el período de crecimiento, para desplazar a MG patógenos del tracto respiratorio. Vía ocular o spray a los 10 días de edad.

- Bacterinas para evitar la caída de la puesta.

AEROSACULITIS DEL PAVO

Agente etiológico: *Mycoplasma meleagridis*.

Aerosaculitis en pavos recién nacidos, pero inaparente en reproductores.

TRANSMISIÓN:

- **Vertical:** infección endógena durante el desarrollo embrionario, infección ascendente de cloaca o bolsa de Fabricio, semen contaminado.
- Horizontal: aerógena, contacto indirecto.

Posibles cuadros clínicos:

- Alteraciones respiratorias (similar a CRD)
- Osteodistrofia
- Sinovitis y artritis.
- Síndrome TS-65 (1-6 semanas de edad): deficiencias de crecimiento y plumaje, condrodistrofia, aerosaculitis y diarrea.

Tratamiento

No hay vacunas.

CORIZA INFECCIOSO

Enfermedad de curso agudo o crónico, propia de las gallinas.

Síntomas:

- Produce conjuntivitis, secreción oculonasal, inflamación de senos infraorbitarios, edema facial y estornudos. Frecuente como complicante de otras infecciones respiratorias, dando cuadros clínicos prolongados y aves antieconómicas.
- Importancia en producción avícola intensiva, si no se vacían nunca las instalaciones.

ETIOLOGÍA:

Haemophilus paragallinarum (species incertae sedis)

Bacilo inmóvil, Gram negativo.

NAD dependientes, crecimiento en agar chocolate o agar sangre satélite a *S. aureus*, en condiciones de microaerofilia,

Tres serogrupos antigénicos (A,B,C), aglutinantes.

Cápsula y antígeno HA: colonización.

EPIDEMIOLOGÍA

Sensibilidad:

- Pollos > faisanes y gallinas de guinea. (*Bordetella avium*: coriza pavos).
- Todas las edades, más grave cuanto mayor es el animal. Los brotes naturales suelen afectar a pollos en mitad de engorde o mayores.

Distribuida por todo el mundo.

Aves portadoras enfermas o aparentemente sanas (recuperadas) actúan como reservorios en la manada.

TRANSMISIÓN:

- Inhalación de aerosoles infecciosos procedentes de la tos o por ingestión de alimento o agua contaminados.
- No hay transmisión vertical.

PATOGENIA Y CUADRO CLÍNICO

- Gravedad y duración variables según cepas.
- Periodo de incubación: 1-3 días.
- Tropismo por epitelio respiratorio ciliado. Migra a sacos aéreos y pulmones cuando interacciona con otros agentes (virus, MG, bacterias) o en condiciones ambientales desfavorables y/o inmunosupresoras.
- Reducción del consumo de alimento y de la producción de huevos.
- Estornudos, sacudidas de cabeza por secreción oculonasal de serosa a mucopurulenta.
- Conjuntivitis con adherencia de párpados, edema de la cara (raramente de las barbillas), ruidos respiratorios y algunas veces diarrea.
- Posteriormente, inflamación de los senos infraorbitarios y/o exudado en el saco conjuntival.
- Duración del cuadro respiratorio entre 10 días (forma leve) y 3 semanas

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

- **CRD**: más crónica, aves jóvenes.
- **SHS**: edema pruriginoso facial, morbilidad, grave en jóvenes, tortícolis.
- **Cólera aviar**: edema barbillas

DIAGNOSTICO Laboratorio

- Frotis de exudado sinusal (sacrificio de un ave afectada) y tinción de Gram.
- Cultivo del exudado sinusal recogido asépticamente.
- Identificación definitiva por pruebas bioquímicas o por inmunofluorescencia.
- Serología: aglutinación (serogrupos), IHA, IFI y ELISA.

TRATAMIENTO

- Quimioterápicos en alimento o agua de bebida:

Sulfonamidas, Tetraciclinas, Quinolonas.

Buena respuesta al tratamiento aunque se producen recaídas por persistencia en algunos animales o en el ambiente.

PROFILAXIS

- **Despoblación.** Dejar libres las instalaciones durante al menos 1 semana después de limpiarlas y desinfectarlas cuidadosamente. Repoblar con pollos libres de coriza de 1 día de edad.
- **Bacterina** para pollos (3-4 semanas) y futuras ponedoras (14 semanas). Repetir a las 3-5 semanas. Usar bacterinas elaboradas a partir de la cepa de campo aislada (ausencia de protección cruzada total).
- **Exposición controlada** de las ponedoras al inicio de la puesta. Preferible usar una bacterina 2 semanas antes para mejorar la inmunidad y reducir la gravedad de la infección.

INFECCIONES DE ARIZONA

Infecciones por Arizona (Arizonosis), Las infecciones por Arizona son causadas por la bacteria *Salmonella arizona*. *S. arizona* se encuentra alrededor del mundo. Se presenta mas frecuentemente en los reptiles y las aves, pero todos los animales son probablemente susceptibles. Los mas jóvenes tienen mayor riesgo.

En muchas especies de aves la infección por *S. arizona* resulta en una baja producción de huevo e incubabilidad. Los pollos muestran debilidad, anorexia y escalofríos. Las epidemias en pavos, pollos y canarios llegan hasta 60% de mortalidad. En humanos, la diarrea es mas común. Muchas infecciones son subclínicas.

El periodo de incubación es de 6-72 horas, aunque 12-36 es lo mas común. La transmisión es por vía fecal-oral. Puede existir alguna transmisión por medio de

los huevos. Las aves infectadas pueden ser portadoras por mucho tiempo, numerosos antibióticos pueden reducir la mortalidad, pero no eliminan la bacteria de los intestinos. S. arizona es menos dura que la salmonela pero puede sobrevivir por meses en el suelo, alimento o agua.

CUADRO 1. Serovariedades de salmonelas paratífoides aisladas de aves 1976-1986.

Serogrupo	Serovariedad	Hospedero	Aislamiento	Porcentaje
B	S. typhimurium	Rep; H.C; Canario	3	3,44
	S. typhimurium	Rep; P.E; Pav.	6	6,89
	S. derby	P.E	1	1,14
	S. schwarzengrund	P.E; Rep	2	2,29
	S. saint-paul	Rep; P.E; Pav; Can	4	4,59
	S. agona	P.E; H.C	4	4,59
C	S. ohio	Rep; H.C	3	3,44
	S.	P.E	1	1,14
	S. infantis	P.E; H.C;	5	5,74
	S. kentucky	Rep; P.E;	5	5,74
	S. heardt	P.E; H.C	2	2,29
	S. albanus	P.E; H.C	2	2,29
	S.	P.E	1	1,14
	S. newport	Rep	2	2,29
	S.	P.E	1	1,14

	S. isanqi	P.E; H.C	2	2,29
	S. braenderup	P.E	1	1,14
D	S. javiana	P.E	1	1,14
	S.	Rep; P.E	2	2,29
	S. fresno	H.C	1	1,14
E	S. anatum	Rep; P.E; Cor	9	10,34
	S. orion	P.E; H.C	2	2,29
	S. senftenberg	Rep; P.E; HC;Pav	6	6,89
G	S. havana	P.E	4	4,59
	S.	P.E; H.C	4	4,59
	S. poona	P.E	1	1,14
	S. cubana	P.E	1	1,14
J	S. michigan	P.E	1	1,14
K	S. cerro	P.E	1	1,14
O	S. alachua	P.E	1	1,14
R	S. johannesburg	Rep; P.E; H.C	8	9,19
Rep = Reproductoras H.C = Huevos de consumo P.E = Pollos de engorde				Pav = Pavos Cor = Corocoras Pat = Patos

ENFERMEDADES VIRALES EN LAS AVES

VIRUELA AVIAR

La viruela aviar tiene una distribución mundial y está causada por un virus con ADN del género Avipoxvirus de la familia Poxviridae (14, 18). Su incidencia es variable en áreas diferentes debido a diferencias climáticas, de administración y de higiene, o a la práctica de una vacunación regular. La enfermedad puede originar reducciones en la puesta de huevos o un retraso en el crecimiento de los pollos más jóvenes.

La viruela aviar es una enfermedad vírica de pollos y pavos de extensión lenta, que en la forma cutánea (viruela seca) se caracteriza por la aparición de lesiones proliferativas, que varían de pequeños nódulos a masas esféricas verrucosas sobre la piel de la cresta, barbillas y otras áreas sin plumas. En la forma diftérica (viruela húmeda) se desarrollan en las membranas mucosas nódulos opacos blancos, ligeramente elevados, cuyo tamaño aumenta con rapidez hasta formar una membrana diftérica amarillenta. Las lesiones se presentan en las membranas mucosas de la boca, esófago, laringe o tráquea. La tasa de mortalidad es mayor en la forma diftérica que en la cutánea, alcanzando a veces el 50% (19), sobre todo en aves jóvenes.

Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004 999

viruela aviar se ha observado la integración de secuencias del virus de la reticuloendoteliosis (REV) (10). Es

cinteresante que este caso de inserción ocurriera hace más de 50 años (7). Mientras que la mayoría de las cepas naturales contienen el provirus del REV, las cepas vacunales solo tienen residuos de las largas repeticiones terminales (13). La virulencia de las cepas naturales del virus de la viruela aviar aumenta con la presencia del provirus del REV en el genoma. Se ha secuenciado por completo el genoma de una cepa similar a la cepa vacunal del virus de la viruela aviar (1).

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

El virus de la viruela aviar se multiplica en el citoplasma de las células epiteliales formando grandes cuerpos de inclusión intracitoplásmica (cuerpos de Bollinger) que contienen cuerpos elementales más pequeños (cuerpos de Borrel). Las inclusiones se pueden demostrar en cortes de lesiones cutáneas y diftéricas

utilizando tinción con hematoxilina y eosina (H&E), con naranja de acridina o con Giemsa (17). Los cuerpos elementales se pueden detectar en frotis de lesiones, por ejemplo, por el método de Giménez (16) que se describe más adelante. Se puede utilizar la microscopía electrónica para demostrar las partículas víricas con morfología típica de los poxvirus, mediante tinción negativa o en cortes ultrafinos de tejidos infectados (3).

a) Técnica de frotis para la viruela aviar

- i) Colocar en un porta limpio una gota de agua destilada y la lesión (cutánea o diftérica). Preparar un frotis fino presionando la lesión con otro porta limpio y rotando varias veces el porta superior.
- ii) Secar al aire y fijar el frotis con cuidado a la llama.
- iii) Teñir el frotis durante 5–10 minutos con colorante recién preparado (8 ml de solución stock¹ de fucsina básica mezclada con 10 ml de tampón fosfato², pH 7,5, y filtrado por papel de filtro Whatman número 1.
- iv) Lavar cuidadosamente con agua del grifo.
- v) Colorear para tinción de contraste con verde malaquita (0,8% en agua destilada) durante 30–60 segundos.
- vi) Lavar el frotis con agua del grifo y secar a continuación.
- vii) Examinar el frotis con aceite de inmersión. Los cuerpos elementales aparecen rojos y de un tamaño aproximado de 0,2–0,3 µm.

b) Aislamiento del virus

El virus de la viruela aviar se puede aislar inoculando el material sospechoso en huevos embrionados. Se inoculan la membranas corioalantoideas (MCAs) de embriones de pollo de 9–12 días de desarrollo con aproximadamente 0,1 ml de suspensión del tejido cutáneo o de la lesión diftérica con la concentración adecuada de antibióticos. Los huevos se incuban a 37°C durante 5–7 días y después se examinan para aparición de focos blancos de lesiones o un engrosamiento generalizado de las MCAs. El examen histológico de las lesiones en la MCA revelará cuerpos de inclusión intracitoplásmicos y eosinófilos tras tinción con H&E.

Para propagar el virus de la viruela aviar también pueden emplearse fibroblastos primarios de embrión de pollo, células renales de embrión de pollo, células dérmicas de embrión de pollo o la línea celular permanente QT–35 de codorniz. La adaptación de las cepas de virus a los cultivos celulares es un requisito importante para la formación de placas o calvas, y no todas las cepas formarán inicialmente placas.

c) Métodos moleculares

El análisis de los productos de endonucleasas de restricción es un método útil para comparar ADN de genomas estrechamente relacionados y puede utilizarse

para comparar aislamientos naturales y cepas vacunales del virus de la viruela aviar.

1. Solución stock: Se añade lentamente una solución de fucsina básica (5 g) en etanol al 95% (100 ml) a una segunda solución de fenol cristalino (10 g) en agua destilada (900 ml). Esta solución stock se mantiene en una botella de cristal con tapón de rosca bien cerrada y se incuba durante 48 horas a 37°C; luego se mantiene a temperatura ambiente.
2. Tampón fosfato, pH 7,5: En 1000 ml de agua destilada se añade $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2,47g) y Na_2HPO_4 (11,65 g) y se mantiene a 4°C.

Los fragmentos genómicos clonados del virus de la viruela aviar se pueden emplear con eficacia como sondas de ácido nucleico para el diagnóstico. El ADN vírico aislado de lesiones puede detectarse por hibridación con sondas genómicas, marcadas radioactivamente o sin marcar. Este método es especialmente útil para diferenciar infecciones de viruela aviar y de laringotraqueitis cuando se presentan lesiones traqueales.

Por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden amplificar secuencias genómica de ADN de varios tamaños utilizando cebadores específicos. Recientemente se ha descrito una prueba de PCR anidada para la detección de la viruela aviar. Esta técnica es útil cuando solo se dispone de una cantidad muy pequeña de ADN vírico en la muestra.

2. Pruebas serológicas

Aunque en las infecciones por poxvirus tanto la inmunidad mediada por células (IMC) como la inmunidad humoral desarrollan un papel importante, no resulta conveniente utilizar pruebas de la IMC para uso rutinario. Por tanto, se usan pruebas serológicas para medir la respuesta de anticuerpos humorales específicos, del tipo de la neutralización vírica (NV), inmunodifusión en gel de agar (IGDA), hemaglutinación pasiva y pruebas con anticuerpos fluorescentes así como enzimoimmunoensayos. La evidencia de una inmunización favorable por la vacuna se puede demostrar examinando una bandada a los 7–10 días de la vacunación para "tomas". Una toma consiste en un hinchamiento de la piel o una costra en el sitio de inoculación de la vacuna, y su presencia denota una inmunización acertada.

a) Neutralización vírica

Después de la interacción virus/suero, la actividad del virus residual puede probarse en huevos embrionados o en cultivos celulares. Esta prueba es técnicamente exigente y puede no resultar conveniente para diagnósticos rutinarios. Solo unas cuantas cepas de virus tienen capacidad para formar placas en células de embrión de pollo. Los anticuerpos neutralizantes aparecen a las 1–2 semanas de la infección.

b) Inmunodifusión en gel de agar

Los anticuerpos precipitantes se pueden detectar haciendo reaccionar los sueros con los antígenos víricos.

El antígeno puede derivar de lesiones de piel infectada o de lesiones de MCA después de la sonicación y homogenización, así como de cultivos celulares infectados tratados . Se centrifuga la suspensión lisada y el sobrenadante se utiliza como antígeno. El medio de difusión se prepara con 1% de agar, 8% de cloruro sódico y 0,01% de tiomersol. El antígeno vírico se coloca en el pocillo central y los sueros problema en los pocillos periféricos. Es importante incluir un control de suero negativo y suero positivo. Las placas se incuban a temperatura ambiente y las líneas de precipitación aparecen a las 24–48 horas después de la incubación del antígeno con el anticuerpo contra cepas homólogas o estrechamente relacionadas. La prueba es menos sensible que el ELISA o que la prueba de hemaglutinación pasiva.

c) Hemaglutinación pasiva

Los eritrocitos de oveja o caballo se sensibilizan con un antígeno parcialmente purificado de la viruela aviar . El antígeno se prepara de MCAs infectadas o de células La hemaglutinación pasiva es más sensible que la IGDA. La prueba origina reacciones cruzadas entre los poxvirus aviares.

d) Pruebas de inmunofluorescencia

Las pruebas de inmunofluorescencia directa o indirecta revelan una fluorescencia intracitoplásmica específica en células infectadas. La prueba indirecta es de uso común y consta de dos pasos: el anticuerpo contra el virus de la viruela aviar reacciona primero con el antígeno en las células infectadas y después con un anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína contra la gammaglobulina de pollo (por ejemplo, suero anti-pollo obtenido en cabra). Estos anticuerpos marcados están comercializados. A este respecto, para pruebas con anticuerpo fluorescente se pueden utilizar con eficacia los cortes de tejidos fijados con formalina.

e) Inmunoperoxidasa

La tinción específica de las inclusiones citoplásmicas es el resultado de la reacción de un anticuerpo policlonal específico contra la viruela aviar, que está conjugado con peroxidasa de rábano, y los cortes hidratados de tejidos (MCA o piel) o de cultivos fijados e infectados con viruela aviar. Se obtienen resultados similares cuando se utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales en una prueba indirecta.

Una ventaja de la técnica es que los cortes se pueden observar por microscopía de luz visible y se pueden guardar durante mucho tiempo sin pérdida de color (17).

f) Enzimoimmunoensayo

Se han desarrollado ELISAs para detectar anticuerpos humorales contra el virus de la viruela aviar. Son capaces de detectar anticuerpos 7–10 días después de la infección (2), pero estas pruebas todavía no se han comercializado.

Los antígenos del virus de la viruela aviar se preparan de monocapas de células QT–35 infectadas, o de lesiones de MAC. Las células QT infectadas se precipitan (700 g durante 10 minutos a 4°C), se lavan con tampón isotónico (Tris 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, etilén diamino tetra–acético [EDTA] 5 mM), y se lisan en tampón hipotónico (Tris 10 mM, pH 8,0, KCl 10 mM, EDTA 5 mM) con Triton X–100 al 0,1% y beta– mercaptoetanol al 0,025%. Los núcleos y los restos celulares se eliminan por centrifugación a baja velocidad (500 g durante 5 minutos a 4°C) y el sobrenadante se utiliza como fuente de antígenos del virus de la viruela aviar para ELISA o para inmunotransferencia. Para aislar antígeno vírico de lesiones de MCA, se necesita una dispersión inicial de las lesiones mediante tratamiento con detergentes como se describió anteriormente. También se ha empleado como antígeno el virus propagado en fibroblastos o en células dérmicas de embrión de pollo. La preparación del antígeno es como la descrita para las células QT. Los pocillos de la placa de microtitulación se antigenizan con 1 µg de antígeno soluble vírico de la viruela aviar en 100 µl de tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, pH 9,6) y se incuban durante toda la noche a 4°C (2, 19). Cada pocillo se lava después una vez con solución de lavado (NaCl 0,29 M, Tween 20 al 0,05%) y se bloquea con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4), que contenga 3% de seroalbúmina bovina (BSA), durante 1 hora a 37°C. Después de un lavado, se añaden a los pocillos diluciones seriadas de los sueros problema en PBS con 1% de BSA. Tras agitar durante 2 horas a 37°C, los pocillos se lavan tres veces antes de añadir 100 µl/pocillo de anticuerpos IgG (H+L) anti–pollo obtenidos en cabra conjugados con peroxidasa de rábano³, a una dilución recomendada en PBS. Después de 2 horas de incubación a 37°C y tres lavados subsiguientes, se añaden a cada pocillo 100 µl del sustrato de la peroxidasa TBM3. Las reacciones se terminan por adición de ácido fosfórico 1 M y se registra la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas ELISA4.

g) Inmunotransferencia

Las variaciones antigénicas que ocurren entre las cepas del virus de la viruela aviar pueden determinarse por medio de inmunotransferencia. En este método, los antígenos se separan por SDS–PAGE (electroforesis en gel de poliácridamida con dodecil sulfato sódico) y reaccionan con anticuerpos policlonales o monoclonales contra el virus de la viruela aviar (6, 12, 14).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

Los estudios iniciales indicaron la posibilidad de proteger a los pollos de la viruela aviar mediante la utilización de virus de la viruela de paloma o de gallina (20). La vacunación se recomienda en áreas donde la viruela aviar es endémica o en instalaciones donde se ha diagnosticado previamente la enfermedad. Se han comercializado vacunas vivas de poxvirus de gallina y de paloma y también

vacunas en vectores que protegen contra la enfermedad. Estas vacunas proceden de embriones de pollo o de cultivos de células aviares.

Debe tenerse en cuenta la inmunidad adquirida pasivamente durante la vacunación de la descendencia de bandadas que han sufrido una infección natural reciente o que se han vacunado recientemente. Como la inmunidad pasiva (durante 2–3 semanas) puede interferir la multiplicación del virus vacunal, la descendencia solo debería vacunarse tras el descenso de los anticuerpos de adquisición pasiva. La vacuna contra la viruela aviar se aplica por el método de la punción en la membrana alar.

1. Control del inóculo

a) Características del inóculo

Se debe establecer un inóculo primario o maestro de virus (MSV) y usarlo según un sistema de lotes de siembra. Se debe mantener un registro de su origen, historia de pases y características. Los virus pueden ser de viruela aviar o de viruela de paloma.

b) Método de cultivo

El MSV debe propagarse en embriones de pollo libres de patógeno específico (SPF), utilizando las MCAs, o en cultivos celulares aviares, como fibroblastos primarios de embriones de pollo, riñón o dermis de embrión de pollo.

c) Validación como vacuna

i) Pureza Antes de probarlo para pureza, el MSV se puede neutralizar con un suero hiperinmune específico.

Debido a la dificultad de neutralizar el poxvirus aviar, se acepta tratar el MSV por centrifugación a 1.000 g durante 20 minutos y después filtrarlo por un filtro de 0,2 µm. El MSV neutralizado o filtrado se usa luego en pruebas para demostrar la ausencia de agentes extraños. Estas pruebas deben realizarse en huevos embrionados o en cultivos celulares aviares para demostrar la inexistencia de replicación vírica y en pollos SPF para demostrar la ausencia de anticuerpos frente a agentes extraños.

ii) Inocuidad

Las vacunas solo deben prepararse de una cepa de virus estable y atenuada o de aislamientos naturales de baja virulencia.

La vacuna debe ser inocua por la ruta de administración recomendada, que es por punción en la membrana alar, a todas las edades en aves susceptibles. Una prueba adecuada es tomar 10 pollos SPF e inocular cada uno pinchando la membrana alar con una aguja mojada en la vacuna. Las aves se observan durante 7–10 días para evidencia de "tomas" y para la ausencia de efectos adversos atribuibles a la vacuna. Una "toma" es una inflamación de la piel o una costra en el sitio de aplicación

de la vacuna e indica una vacunación adecuada. La prueba de inocuidad debe repetirse después de al menos seis pases seriados del virus en pollos SPF, para mostrar que no ha habido reversión a la virulencia.

iii) Eficacia

Deben obtenerse datos utilizando el nivel de pases más alto y el título más bajo de virus que se va a utilizar en el producto final: se da una dosis de vacuna por el método recomendado a 20 pollos SPF de la edad menor indicada para la vacunación. Estos pollos, junto con otros 20 no vacunados de la misma edad y origen, son inoculados en desafío 3 semanas después por escarificación con una cepa virulenta de virus de la viruela aviar. Las aves se observan durante 3 semanas. El noventa por ciento de las aves control deben presentar lesiones debidas al virus de desafío y al menos el 90% de las aves vacunadas deben estar libres de tales lesiones.

2. Método de fabricación

La vacuna se fabrica por un sistema de lotes de inóculo con el MSV validado. Esto debe realizarse en instalaciones aprobadas y diseñadas para evitar el riesgo de contaminación. Todos los medios y cultivos celulares deben probarse para asegurar la ausencia de contaminación.

3. Control del proceso

Durante el proceso de validación como vacuna, se deben comparar los datos de eficacia con el contenido del virus de la vacuna. Se puede establecer así una potencia adecuada. La vacuna debe dispensarse en los recipientes finales para asegurar que cada recipiente tiene virus suficiente para alcanzar la potencia especificada.

4. Control de lotes

a) Potencia

Deben realizarse pruebas sobre el contenido vírico en al menos tres recipientes. Las diluciones deben de abarcar un rango de infectividad de 0–100%, usando saltos de dilución de 1/5 y siete réplicas por dilución.

Si es posible, la prueba debe llevarse a cabo en paralelo con una vacuna estándar. Cada lote de vacuna se titula en el diluyente suministrado para dicho uso. Normalmente, el título de virus no debe ser mayor que 1/10 de la dosis a la que se ha demostrado que la vacuna es segura ni inferior al título determinado en la prueba de eficacia. Una potencia adecuada para una vacuna viva contra la

viruela aviar suele estar en la zona de 105 EID₅₀ (dosis infectiva del 50% para embriones) por ml.

b) Duración de la inmunidad

La prueba de eficacia presentada en la Sección C. 1. c. iii puede usarse para determinar la duración de la inmunidad (aproximadamente 6–12 meses) mediante pruebas a intervalos después de la vacunación, usando grupos distintos de aves en cada prueba.

c) Estabilidad

Para justificar la caducidad, deben presentarse evidencias sobre la estabilidad. Éstas deben basarse en titulaciones víricas realizadas periódicamente hasta 3 meses más allá de la caducidad propuesta y verificadas en, por lo menos, seis lotes de vacuna mantenidas en las condiciones recomendadas de almacenamiento.

d) Conservantes

No se utilizan conservantes en vacunas vivas.

e) Precauciones (riesgos)

Normalmente se recomienda no vacunar a las aves que están de puesta. Se debe evitar el contacto de la vacuna viva con el hombre. La vacuna estándar contra la viruela aviar no se usa con palomas, que pueden vacunarse con la vacuna contra el poxvirus de las palomas. En muchos países, la vacuna de las palomas se ha visto reemplazada por la vacuna viva atenuada contra la peste aviar diseñada para utilizar en pollos de un día de edad. Estos productos se han utilizado con seguridad en palomas a falta de vacuna disponible contra el poxvirus de las palomas.

http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.7.12_Viruela_aviar.pdf

Viruela Aviar

Sinónimos: difteria aviar, difteroviruela, epiteloma contagioso de las aves, enfermedad de Kikuth

Es una de las enfermedades más antiguas de las aves de que se tenga noticias, afectando especies domésticas y silvestres de cualquier edad y sexo.

La viruela es causada por un poxvirus que causa lesiones citoplasmáticas características en el tejido epitelial afectado. El virus se desarrolla bien en la membrana corio-alantoide de huevos embrionados y en cultivo celular.

En la membrana corio-alantoide, prolifera determinando el apareamiento de lesiones focales y difusas, visibles al ojo humano.

Tipos de virus.

Existen varios subgrupos de poxvirus de viruela aviar en la naturaleza. Los más conocidos son los virus de: gallina, de paloma, de pavo y de canario. Una particularidad interesante del virus del canario es que puede causar lesiones cutáneas en la gallina, pavo y pato. En la paloma, además de las lesiones cutáneas puede causar también infecciones generalizadas. Los canarios no son sensibles al virus de la gallina, pavo o paloma.

Últimamente nuevos tipos de virus vienen encontrándose causando la enfermedad en aves silvestres, ellos presentan semejanzas entre sí, en sus propiedades físicas y químicas y también como su crecimiento en los cultivos celulares demuestra, forman parte de nuevas variedades de poxvirus, muchas especies de aves son sensibles a más de un tipo de virus, hay una tendencia de afirmar que existen en la naturaleza tipos de virus mixtos que son capaces de infectar a más de una especie de ave.

En las aves silvestres por ejemplo, ciertos poxvirus son patógenos para algunas especies, y no lo son para otras. Varios trabajos de investigación vienen siendo hechos con la finalidad de verificar la patogenicidad de los linajes víricos que ocurren en las aves silvestres y su comportamiento en las especies domésticas, estos estudios son importantes para la industria avícola, pues las aves silvestres representan una constante amenaza a la salud de las aves de granja.

Transmisión.

El poxvirus se transmite por contacto directo entre el ave enferma y el ave sana. El virus penetra a través de líquidos en contacto con la piel y de lesiones de la mucosa y de la picadura de artrópodos. Estos últimos son considerados vectores mecánicos de virus. Entre los artrópodos, los mosquitos del género *Culex* y *Aedes* y los ácaros *Dermanyssus* y *Argas*, son citados como los principales vectores de virus.

La transmisión de viruela puede darse también a través de comederos, bebederos y otros utensilios contaminados por el virus. También las mismas personas que tienen contacto con un animal enfermo pueden vehicular la enfermedad llevando partículas infectantes de virus en los zapatos, ropas, etc.

Los estudios experimentales de la infección demuestran que el poxvirus no es capaz de penetrar a través de la piel sana, pero basta una pequeña herida para que se instale la enfermedad. Hay citas en la literatura de transmisión de la viruela a través de la vía nasal, subcutánea, endovenosa y sobre la piel de donde se arrancaron plumas, en este caso, la penetración del virus se daría por el folículo de la pluma.

Formas de la enfermedad.

La viruela puede presentarse bajo tres formas: cutánea, diftérica y cutáneo-diftérica.

- **Forma cutánea.**

La forma cutánea se manifiesta por la presencia de nódulos localizados principalmente en las regiones sin plumas. En los canarios, ellos se localizan con mayor frecuencia en las extremidades de los dedos; en otras especies de aves, la región de la comisura del pico y la región peri-ocular son las más afectadas.

En los pies, la lesión inicial surge alrededor de la uña y se presenta como una proliferación epitelial de coloración blanquecina y con aspecto húmedo. Con la evolución de la enfermedad se transforma en un nódulo que adquiere grandes proporciones.



•
Forma

diftérica.

La forma diftérica se caracteriza por la formación de pequeñas pseudo membranas localizadas en la cavidad bucal, faringe y laringe.

La lesión inicial se presenta como una pequeña placa redondeada de color blanca. En seguida surgen nuevas lesiones que acaban por unirse y aparecen extensas membranas que están fuertemente adheridas a la mucosa, provocando sangrado en caso de ser removidas. Unos de los grandes problemas de la forma diftérica en los pájaros es el taponamiento de la laringe, por la membrana, provocando asfixia y muerte.

- **Forma cutáneo-diftérica.**

Esta forma es menos común, y en ella hay asociaciones de lesiones en la piel y de las pseudo membranas en la mucosa.

Síntomas.

En la forma cutánea, los síntomas iniciales dependen de la locación de los nódulos en el cuerpo del ave. Si ellos están localizados en los pies, el ave tendrá dificultad para apoyarse en el posadero, y deberá mantener uno de los pies en el aire. La proporción de nódulos crece, aparentemente el dolor también aumenta y muchas veces el ave desciende para el fondo de la jaula y allí permanece apoyada sobre los tarsos.

Si las lesiones están localizadas en la región del pico, el ave procurara ingerir los alimentos blandos, dejando de lado aquellos que puedan provocar dolor, tales como los granos de semillas duros.

Cuando los nódulos están localizados alrededor de los ojos, o en otras regiones de la cabeza, el ave tentara refregarlos en las rejas de la jaula o también en el palo, es muy común que haya contaminación secundaria en las lesiones cutáneas por bacterias, principalmente staphylococcus aureus, apareciendo la formación de pus.

Cuando los nódulos se localizan en las proximidades de los ojos, pueden adquirir grandes proporciones, en este caso pueden perder la visión. Muchos animales perecen cuando sufren de esta forma de dolencia, pues no consiguen alimentarse, una vez que la deficiencia visual impide que ellas encuentren su alimento.

En la forma diftérica, los síntomas se relacionan con la localidad bucal, faringe y laringe, afligiendo también otras partes del tracto digestivo, las perturbaciones orgánicas digestivas y respiratorias son frecuentes.

Uno de los primeros problemas que el ave afectada por la forma diftérica presenta es la dificultad para ingerir alimentos. Las placas blanquecinas generalmente se extienden por toda la cavidad bucal, inclusive la lengua y el paladar. En la fase final de la dolencia, toda la mucosa de la boca se muestra tomada por extensas camadas de tejido de coloración blanquecina.

Las aves padecen de gran sufrimiento y cuando las pseudo membranas se sitúan en la laringe, la dispnea se presenta; es inicialmente discreta y de poco se va agravando causando la muerte por asfixia.

Durante el curso de la enfermedad las aves se presentan soñolientas, abatidas, pierden el apetito, enflaquecen y muchas veces sufren de diarrea. Las perturbaciones del tracto respiratorio se traducen por: secreción nasal acentuada, estertores, y dispnea. Cuando ha comprometido los senos infraorbitarios hay concomitantemente edemas de cara y cabeza.

Lesiones que el poxvirus causa.

Las lesiones pueden ser encontradas tanto en la piel como en los órganos internos. Las lesiones cutáneas aparecen conforme ya fue dicho bajo la forma de nódulos que tienen un crecimiento rápido.

Las células epiteliales sufren un proceso de tumefacción y presentación citoplasmáticas llamadas inclusiones de Bollinger, en el interior de las cuales encontramos los corpúsculos de Borrel, que son considerados como corpúsculos elementales del virus. Este proceso en la célula es acompañado de la degeneración y destrucción del núcleo. Las lesiones de la piel tienen un carácter prolífico, caracterizado no solo por el aumento de volumen de la célula epitelial, sino también por el aumento del número de células.

En la forma diftérica, las lesiones de la mucosa del tracto digestivo se caracterizan por la formación de las pseudo membranas de coloración blanquecinas. Ellas pueden también afectar los senos nasales.

En los órganos internos tenemos las siguientes lesiones: esófago y buche con lesiones diftéricas que pueden raramente aparecer también en el intestino, bazo e hígado hipertrofiado; pericardio espesado con cavidad pericárdica conteniendo exudado; neumonía y sacos aéreos turbios.

Diagnostico.

El diagnostico clínico puede ser establecido a través de observaciones de las lesiones cutáneas o diftéricas.

El diagnostico de laboratorio puede ser realizado inoculando fragmentos de los nódulos de la piel, y órganos del tracto respiratorio, en huevo embrionado vía membrana corioalantoide.

El examen histopatológico de las lesiones permite al patologista identificar los corpúsculos de Bollinger, y es uno de los métodos mas seguros para llegar al diagnostico de la dolencia.

Otros métodos de diagnostico también pueden ser usados, pero son mas complejos y por lo tanto poco aplicados en la rutina de los laboratorios. Son ellos: virus neutralización, test de inmunodifusión y precipitación.

El diagnostico diferencial será realizado con: candidiasis (en la forma digestiva) y avitaminosis A.

Pronostico.

Cuando en la forma cutánea, las lesiones son aisladas, el pronóstico es bueno, pero el apareamiento de muchos nódulos agrava el cuadro clínico.

En la forma diftérica, el pronóstico es siempre muy grave, con alto índice de mortalidad.

Tratamiento.

No hay un tratamiento eficaz para la viruela aviar, en tanto tratándose de aves de compañía, podemos tentar la recuperación del animal suministrándole vitaminas "A" ayudando a la regeneración epitelial, el uso de antibióticos que actúen bien sobre bacterias gram positivas es útil cuando hay infección por staphylococcus aereus.

En estos casos, lo ideal es que sea hecho el cultivo y antibiograma para poder escoger el antibiótico más eficaz.

La limpieza de la cavidad bucal con medicamentos a base de carboxisulfamidacrisoidina o nuevoarsenobenzol, parece traer algún alivio para el ave que sufre la forma diftérica de la enfermedad.

Para aplicación tópica en las lesiones cutáneas podemos hacer uso de la glicerina yodada, de cremas con acción antiinflamatorias, antipruriginosa y cicatrizantes. El uso del siguiente preparado: cromato de mercurio (1 a 3 %) en alcohol a 70 grados con trazos de acetona, dos veces al día, durante una semana, trae algún beneficio al tratamiento de los nódulos.

Vacunación.

La vacunación de canarios ha sido objeto de estudio por varios estudiosos, y ya fueron fabricadas vacunas que confieren protección a estos animales, a partir del virus atenuado a través de centenas de pasajes en cultivos celulares.

Profilaxis.

- Al adquirir nuevas aves, dejarlas en cuarentena después de un cuidadoso examen clínico.

- Combatir mosquitos, ácaros y cualquier otro vector de la dolencia.
- En caso de dolencia, aislar a las aves enfermas y medicarlas en caso de que se trate de aves de estimación; en los grandes criaderos la medida de profiláctica correcta sería el sacrificio de los enfermos y quema de los cadáveres.
- Desinfección rigurosa de las jaulas, viveros y utensilios.
- Mantener la vigilancia permanente en las aves sanas que tuvieron contacto con las enfermas.
- Administrar vitamina "A" a las aves sanas como preventivo, para la protección del epitelio.

<http://aviarioangelcabrera.com/articulos/viruelaaviar.htm>

LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA

La Laringotraqueitis, conocida también como LT, es una enfermedad respiratoria de aves caseras causadas por un virus de herpes. La LT es una enfermedad que debe ser reportada a la Comisión de Salud Animal de Texas (TAHC), que es la agencia estatal reguladora de la salud ganadera y aviar.

➤ Especies afectadas

La LT generalmente afecta a los pollos, pero en algunos casos raros se ha encontrado la LT en faisanes, pavos y guajolotes (chompipes). El virus nunca se ha recuperado de otra especie aviar.

➤ Cómo afecta la enfermedad a las aves

El virus generalmente ingresa en una bandada de aves por la exposición a o por la introducción de aves portadoras (aves que llevan la enfermedad, pero que no muestran los signos clínicos), o por el movimiento del personal, los visitantes y/o el equipo contaminado. Una vez que ha sido introducida a una bandada susceptible, el virus de la LT se disemina rápidamente por contacto. Las aves que se recuperan de la enfermedad pueden continuar transmitiendo el virus por períodos prolongados de tiempo. El virus entra en el sistema respiratorio o en el área de los ojos, replicándose en las células que forran la laringe y la traquea, causando que las células de esta área se mueran. A medida que el forro se desprende, los vasos sanguíneos de abajo se exponen, causando que las aves infectadas tengan dificultad de respirar. Las aves caseras infectadas exhiben un número de signos, que pueden incluir los siguientes:

- toser y jadear

- ojos lacrimosos
- senos nasales hinchados
- descarga nasal
- secreciones sangrientas de la traquea

El signo más típico es jadear para poder respirar. Las aves infectadas deben estirar sus cuellos hacia adelante y hacia arriba con cada aliento. Pueden toser expulsando sangre, salpicando las paredes y pisos. Muchos brotes de la LT hoy en día son leves, pareciéndose a un leve brote de bronquitis infecciosa o de otras enfermedades respiratorias de las aves. Las pérdidas causadas por la enfermedad en las bandadas afectadas pueden ser severas, debido a la producción reducida (tanto de huevo como de carne), así como también pérdidas por muerte (hasta de un 50% en brotes severos).

➤ El Período de Incubación

El período de incubación de la LT es generalmente de 6-15 días, pero la evidencia de la enfermedad se ha visto en dos días después de la exposición natural. En áreas endémicas, se debe activar un programa especial de vigilancia, usando órdenes y regulaciones estrictas con respecto a la vacunación apropiada de todos los pollos.

➤ La Vacuna

Sólo hay una vacuna aprobada para la LT en Texas. Esta vacuna es la cultura de tejido modificado de la Laringotraqueitis y se puede usar en Texas sin restricción. Otra vacuna, la vacuna del Origen de Embrión del Polluelo (CEO por sus siglas en inglés) se puede usar en otros estados de los Estados Unidos. En Texas, se puede usar sólo con la aprobación por escrito de la TAHC. Las aves vacunadas con CEO pueden llegar a infectarse con la LT y a transmitir el virus sin mostrar los signos clínicos de la enfermedad. El virus de la vacuna que ha sido transmitido puede causar la enfermedad en pollos que no han sido vacunados. En Texas, los pollos vacunados con la vacuna de CEO se consideran infectados.

http://www.tahc.state.tx.us/animal_health/LT_span.pdf

Actualización en Laringotraqueítis Infecciosa

Introducción. La frecuencia de casos de Laringotraqueítis infecciosa (LTI) se ha incrementado muy significativamente en forma reciente en el continente americano y también en otras regiones incluyendo Australia. Las herramientas disponibles para el control de LTI son prácticamente las mismas que se han utilizado por

muchos años e incluyen la bioseguridad, vacunación y manejo racional de aves y material de cama contaminado. Además, hoy se cuenta con nuevos tipo de vacunas que han sido utilizadas por relativamente poco tiempo y aun no se ha hecho una evaluación completa de ellas. Los sistemas de diagnostico han evolucionado para proporcionarnos mayor información acerca de los virus que circulan en el campo. Los sistemas de detección son relativamente más sensibles que antes, especialmente aquellos que dependen de la detección molecular del virus de LTI. Sin embargo, la detección de LTI aún depende de la observación clínica, lesiones macroscópicas, y aplicación correcta de pruebas de diagnóstico en el laboratorio. Dado que la vacunación es un componente fundamental del control de LTI es importante conocer las características de cada una de las vacunas disponibles, los métodos correctos de vacunación para cada tipo de ave y para cada tipo de vacuna, y conocer aspectos básicos de la epidemiología y patogenia de esta enfermedad para controlarla efectivamente.

Patogenia de LTI. El virus de LTI es un herpesvirus que puede infectar pollos o gallinas a partir de los 10 días de edad aproximadamente. El periodo de incubación es de aproximadamente 5-7 días bajo situaciones experimentales; sin embargo, en el campo el periodo de incubación puede ser ligeramente más prolongado (7-14 días). Pueden presentarse casos clínicos debidos a infección de campo o a infección con virus vacunales mal aplicados, cuyo caso se conoce como LTI “vacunal”. El virus (vacunal o de campo) se disemina muy rápidamente durante el periodo anterior a los primeros signos clínicos. Los primeros tejidos en infectarse son la conjuntiva, mucosa nasal, hendidura palatina, laringe y tráquea. Posteriormente el virus induce degeneración y necrosis del epitelio del aparato respiratorio superior hasta que finalmente establece latencia en las aves sobrevivientes. El periodo de latencia puede durar toda la vida económica del ave o parvada, o bien, puede interrumpirse ante un episodio de tensión, inmunosupresión, o enfermedad concomitante. Esta interrupción se conoce como “recrudescimiento” e involucra la reinfección de tejidos epiteliales respiratorios con el mismo virus que originalmente infectó a las aves. Cuando se da oportunidad a los virus vacunales o a los virus de campo de circular y de producir pases

regresivos en aves susceptibles puede incrementarse progresivamente la virulencia de ellos hasta inducir LTI en forma clínica.

Es muy importante considerar la secuencia de eventos que ocurren durante la infección y las respuestas de las aves infectadas. Después de la infección de los tejidos del tracto respiratorio se inicia la replicación viral. Aproximadamente 3-5 días después de la infección ya puede detectarse una concentración importante de virus. Dentro de los primeros 5-7 días post-infección y antes de la aparición de los primeros signos clínicos existe una diseminación de virus muy activa. Esto es muy importante desde el punto de vista epidemiológico pues este periodo representa un riesgo muy alto de diseminación de la enfermedad en forma inadvertida. El personal y fomites que entran en contacto inadvertidamente con aves infectadas fácilmente pueden contribuir a la transmisión del virus a otras granjas. Los primeros cambios que ocurren después de la infección incluyen la disminución en el consumo de alimento y agua. Posteriormente se inicia un periodo de incremento en la mortalidad, la cual se duplica progresivamente cada día hasta alcanzar un máximo de mortalidad aproximadamente 5-7 días después de la aparición de los primeros signos clínicos. Estos signos incluyen inicialmente una disminución en el consumo de alimento y agua y posteriormente se presentan los signos respiratorios y lesiones características de la enfermedad. Las aves sobrevivientes producen una respuesta inmunológica compleja que involucra la participación de anticuerpos y de células inmunológicas efectoras. El virus establece latencia y permanece en forma latente por un periodo indefinido. La infección puede o no recrudecerse y esto depende de muchos factores como la inmunosupresión, enfermedades concomitantes, stress, etc. Tanto los virus vacunales como los virus de campo establecen latencia y ambos pueden recrudecer. Esto significa que en cualquier momento el virus puede reiniciar su replicación y ser transmitido a otras aves o a otras parvadas. Cada pase regresivo entre aves representa una oportunidad más para que el virus gane virulencia. Por ello, es fundamental que la aplicación de vacunas sea óptima para evitar o reducir la oportunidad de que se presenten pases regresivos de aves infectadas (o vacunadas) a aves susceptibles (o no vacunadas).

Tipos de vacunas. Las vacunas más comúnmente usadas en el campo son las producidas en embrión de pollo (CEO) o en cultivo celular (TCO). Existen además vacunas recombinantes que utilizan como vectores virus de viruela aviar o herpesvirus de pavo. Es muy importante conocer las características de cada vacuna y sus métodos de aplicación correctos. Los aspectos mas relevantes a conocer de las vacunas se enlistan a continuación:

- a. Tipo de vacuna (tradicional o recombinante)
- b. Substrato (cultivo celular o embrión de pollo)
- c. Virulencia o reactividad esperada.
- d. Transmisibilidad.
- e. Vías y edades de aplicación autorizadas.
- f. Protección esperada.
- g. Posibilidad de reversión a la virulencia

También es fundamental conocer lo mejor posible los sistemas de vacunación disponibles y supervisar los procesos de aplicación de vacunas y las reacciones que se producen después de la vacunación.

Vacunación por zonas. Cuando se cuenta con sistemas de informática que permiten la localización geográfica rápida de granjas y vías de transporte puede implementarse un sistema de vacunación por zonas. En forma simplista, la vacunación por zonas consiste en que todas las granjas en un radio determinado alrededor del foco de infección son vacunadas y todas dejan de ser vacunadas simultáneamente. Este sistema solo funciona cuando existe un sistema de comunicación efectivo y honesto entre empresas que comparten un mismo territorio.

Manejo epidemiológico preventivo. El control de LTI no depende exclusivamente del uso racional de vacunas. Se requiere de varios enfoques que incluyen (no exclusivamente):

- a. Bioseguridad, limpieza y desinfección.
- b. Uso de sistemas de informática para localización satelital de granjas afectadas.
- c. Detección y notificación oportuna de casos de LTI.
- d. Transporte de aves vivas infectadas a través de rutas sanitarias alternativas.
- e. Manejo y transporte sanitario y racional de material de cama contaminado.

Sistemas de detección de infección. Los sistemas de detección de infección también han evolucionado de manera que son actualmente más sensibles y rápidos. Sin embargo, los sistemas de diagnóstico tradicionales continúan siendo muy útiles y populares. A continuación se incluye un segmento presentado en AMEVEA, Cartagena, Colombia que resume algunos conceptos importantes relacionados con la detección de infección:

- a. **Muestras de campo.** Considerando la patogenia de la LTI, las aves a muestrear deben incluir aves con signos clínicos agudos antes de la complicación con bacterias o antes de alcanzar la fase crónica (después de 7 días de infección). Las muestras más adecuadas incluyen los párpados, la laringe y el tercio proximal de la tráquea para histopatología. Para aislamiento viral se recomienda la obtención de tráqueas y laringes afectadas, o hisopados de la hendidura palatina, tráquea y laringe. Para detección molecular las muestras más adecuadas incluyen la laringe y la tráquea. Las muestras destinadas a histopatología deben ser fijadas en formol amortiguado al 10% inmediatamente después de haber sido colectadas. Para detección molecular o aislamiento viral las muestras deben ser refrigeradas

inmediatamente después de haber sido colectadas, o congeladas si es que no pueden ser procesadas inmediatamente. Pueden colectarse tráqueas y laringes en refrigeración para detección de proteínas virales mediante inmunofluorescencia. Cualquier muestra debe ser envuelta apropiadamente en algún contenedor o bolsa de plástico doble. Los contenedores o bolsas deben ser desinfectados por fuera para evitar la diseminación de virus.

- b. **Pruebas de laboratorio.** Las pruebas de laboratorio más prácticas y comunes incluyen: a) inmunofluorescencia directa; b) PCR; c) PCR de tiempo real; d) aislamiento viral; y d) histopatología. La mayoría de los laboratorios utilizan histopatología como primera opción.

Inmunofluorescencia directa. Las tráqueas y laringes son sometidas a un raspado para desprender las células epiteliales. La inmunofluorescencia directa requiere anticuerpos contra el virus y marcados con isotiocianato de fluoresceína. Las células son colocadas sobre una lámina para microscopía, fijadas y teñidas con los anticuerpos fluorescentes. Al observarlas al microscopio de luz fluorescente las células infectadas fluorescen y ofrecen un diagnóstico positivo. Esta prueba requiere muestras de aves con signos clínicos muy incipientes y generalmente no funciona en aves con infecciones de más de 5-7 días. El costo es mínimo y puede producirse un diagnóstico positivo en espacio de 3-4 horas. La inmunofluorescencia directa tiene una correlación de más de 90% con histopatología y PCR o PCR de tiempo real.

- i. **PCR y PCR de tiempo real.** Para estas pruebas se hace una extracción y purificación de ADN para lograr la detección molecular de alguno de los genes del virus. Existen varias opciones que detectan genes de expresión temprana, genes reguladores, o genes responsables de la expresión de proteínas estructurales. Ambas pruebas (PCR y PCR de tiempo real) son sumamente sensibles y pueden ofrecer resultados conclusivos en espacio de 2-4 horas. La correlación de la detección molecular con la inmunofluorescencia o con la histopatología es de más de 90%.

ii. **Aislamiento viral.** Aunque el aislamiento e identificación viral es la prueba estándar, esta prueba requiere muchas veces de varios pasajes de virus en embriones de pollo o en cultivos celulares, es poco sensible, costosa y su correlación con otras pruebas diagnósticas es muy baja (menos de 80%).

iii. **Histopatología.** El examen microscópico de tejidos sospechosos es muy sencillo, rápido, económico, sensible y fácil de interpretar. Es fundamental obtener para este propósito muestras de párpados, laringes y tráqueas de aves con laringotraqueítis severa pero no crónica o con exceso de exudado fibrinopurulento. La correlación de los resultados de histopatología con los de inmunofluorescencia o detección molecular es muy alta (más del 90%), y por ello debe considerarse como la primera opción. Las lesiones microscópicas son patognomónicas e incluyen la formación de sincitios y la presencia de corpúsculos de inclusión intranucleares Cowdry tipo A.

iv. **Pruebas de laboratorio de utilidad mínima o impráctica.** Las pruebas serológicas (ELISA) tienen muy poca utilidad, pues puede haber resultados positivos en lotes no infectados o sin signos clínicos. Además, la prueba ELISA no tiene ningún valor predictivo en cuanto a protección, dado que la inmunidad no depende exclusivamente de la presencia de anticuerpos. Es decir, el título de anticuerpos no refleja el nivel de protección. La única circunstancia en la prueba ELISA podría ser de utilidad es cuando existen zonas avícolas en donde no se practica la vacunación y donde la prueba ELISA indica que existen niveles de anticuerpos muy altos. En este último caso la prueba ELISA puede ayudar a orientar el diagnóstico, pero este último nunca debe depender exclusivamente de los resultados de serología. Otras pruebas diagnósticas que han caído en desuso por imprácticas o costosas son la microscopía electrónica y la inmunocitoquímica.

v. **Interpretación de resultados.** La interpretación de los resultados es muy simple en el sentido de que los resultados positivos indican en todos los casos que el virus de LTI está circulando y está presente en las muestras de campo. La única situación en la que puede generarse confusión es cuando se quiere determinar si la infección es causada por algún virus vacunal o de campo, en cuyo caso es necesario hacer pruebas de secuenciación de nucleótidos y/o

pruebas de RFLP que permitan distinguir los virus de campo de los virus vacunales. En forma práctica, la gran mayoría de los virus detectados en el campo están íntimamente relacionados con los virus vacunales. Esto no significa que debe culparse a las vacunas comerciales. Es bien sabido que algunos virus vacunales son capaces de revertir a la virulencia y por ello debe prestarse especial atención a los métodos de vacunación para evitar que las aves mal vacunadas den oportunidad a los virus vacunales para replicarse más allá de lo deseable.

En resumen, existen múltiples pruebas diagnósticas pero las de mayor uso y practicidad incluyen la histopatología, detección molecular, inmunofluorescencia y aislamiento viral. Las vacunas tradicionales continúan siendo de gran utilidad siempre y cuando sean usadas apropiadamente y es fundamental conocer sus características y métodos y edades de aplicación óptimos. Debe tenerse en cuenta que las vacunas a virus activo han sido derivadas de virus de campo que fueron atenuados en el laboratorio pero que siempre conservan su potencial patogénico. Por ello no deben menospreciarse las metodologías correctas para aplicación de vacunas. La vacunación por zonas y el control de manejo de cama y aves infectadas o vacunadas por zonas han sido críticos para el control de LTI. El conocimiento de la patogenia de LTI puede contribuir a optimizar los sistemas de prevención y control. Finalmente, el manejo juicioso de aves infectadas y de material de cama contaminado juegan un papel primordial en el control de LTI en el campo.

www.cadenaavicola.com.ar/.../ACTUALIZACION%20EN%20LARINGOTRAQUEITIS%...

EL COMPLEJO DE LEUCOSIS AVIAR:

El virus de la leucosis aviar es un tipo de retrovirus que se conoce solamente causar infección natural en Gallus gallus, aunque experimentalmente se puede infectar a otras especies de aves, o incluso a mamíferos.^[1] Existen diferentes formas de la enfermedad virósica, incluyendo linfoblástica, eritroblástica, osteopetrótica.

Enfermedad de Newcastle

ETIOLOGÍA

Clasificación del agente causal

Virus de la familia Paramyxoviridae, género Rubulavirus

Temperatura: Inactivado a 56°C/3 horas, 60°C/30 min

pH: Inactivado a pH ácido

Productos químicos: Sensible al éter

Desinfectantes: Inactivado por formalina y fenol

Supervivencia: Sobrevive durante largos períodos a temperatura ambiente, especialmente en las heces

EPIDEMIOLOGÍA

Huéspedes

- Muchas especies de aves tanto domésticas como salvajes
- Los índices de mortalidad y de morbilidad varían según las especies y en función de la cepa viral
- Las gallinas son las aves de corral más susceptibles, los patos y los gansos son las menos susceptibles
- Puede existir un estado portador en las psitacinas y en algunas otras aves salvajes

Transmisión

- Contacto directo con las secreciones de las aves infectadas, especialmente las heces
- Comida , agua, instrumentos, locales, vestimentas humanas, etc., contaminados

Fuentes de virus

- Secreciones respiratorias, heces
- Todas las partes de las aves muertas
- El virus es transmitido durante el período de incubación y por un período limitado durante la convalecencia.
- Se ha demostrado que algunos psitácidos transmiten durante más de un año el virus de la enfermedad de Newcastle de manera intermitente

Distribución geográfica

La enfermedad de Newcastle es endémica en muchos países del mundo. Durante años algunos países europeos no han tenido esta enfermedad

Para más detalle sobre la distribución geográfica, véanse los últimos números de Sanidad Animal Mundial y el Boletín de la OIE

DIAGNÓSTICO

El período de incubación de 4-6 días

Diagnóstico clínico

- Síntomas respiratorios y/o nerviosos:
 - jadeo y tos
 - alas caídas, arrastran las patas, cabeza y cuellos torcidos, desplazamientos en círculos, depresión, inapetencia, parálisis completa.
- Interrupción parcial o completa de la producción de huevos.
- Huevos deformados, de cáscara rugosa y fina y que contienen albúmina acuosa
- Diarrea verde acuosa
- Tejidos hinchados en torno a los ojos y el cuello
- La morbilidad y mortalidad dependen de la virulencia de la cepa del virus, del grado de inmunidad a la vacunación, de las condiciones ambientales y del estado de las aves de la explotación.

Lesiones

- La enfermedad de Newcastle no produce lesiones patognómicas macroscópicas
- Varias aves deben ser examinadas para realizar un diagnóstico tentativo.
- Para el diagnóstico final se debe esperar el aislamiento del virus y su identificación
- Las lesiones que se pueden encontrar son:
 - edema del tejido intersticial o peritraqueal del cuello, especialmente cerca de la entrada torácica
 - congestión y algunas veces hemorragias en la mucosa traqueal
 - petequia y pequeñas equimosis en la mucosa del proventrículo, concentradas alrededor de los orificios de las glándulas mucosas
 - edema, hemorragias, necrosis o ulceraciones del tejido linfóide en la mucosa de la pared intestinal
 - edema, hemorragias o degeneración de los ovarios

Diagnóstico diferencial

- Cólera aviar
- Influenza aviar
- Laringotraqueítis
- Viruela aviar (forma diftérica)

- Psitacosis (clamidiosis) (Aves psitácidas)
- Micoplasmosis
- Bronquitis infecciosa
- Enfermedad de Pacheco del papagayo (Aves psitácidas)
- También errores de manejo, tales como falta de agua, aire, alimentación

Diagnóstico de laboratorio

Procedimientos

Identificación del agente

- Inoculación de los huevos de gallina de 9-11 días de embrionados y a continuación:
 - examen de la actividad de hemaglutinación,
 - inhibición de la hemaglutinación mediante un antisuero específico a la enfermedad de Newcastle.

Evaluación de la patogenicidad

- Prueba de las placas en cultivos de fibroblastos de embriones
- Tiempo medio de mortalidad medio de los huevos de gallina que están embrionando
- Índice de patogenicidad intracerebral en pollitos de 1 día
- Índice de patogenicidad intravenoso en pollos de 6 semanas

Pruebas serológicas

- Prueba de inhibición de la hemaglutinación
- ELISA

Muestras

Identificación del agente

- Torundas de tráquea y cloaca (o muestras de heces) de aves vivas o de grupos de órganos y heces de aves muertas

Pruebas serológicas

- Muestras de sangre coagulada o suero

PREVENCIÓN Y PROFILAXIS

No hay tratamiento

Profilaxis sanitaria

- Aislamiento estricto de los focos
- Destrucción de todas las aves infectadas y expuestas a la infección
- Limpieza y la desinfección a fondo de los locales
- Destrucción adecuada de las aves muertas
- Control de plagas en las explotaciones

- Respetar un plazo de 21 días antes de la repoblación
- Evitar el contacto con aves cuya situación sanitaria se desconoce
- Control de desplazamientos humanos
- Se recomienda la cría de un grupo de edad por granja

Profilaxis médica

- La vacunación a partir de vacunas con virus vivo y/o en emulsión oleosa puede reducir sensiblemente las pérdidas en las explotaciones avícolas
- Se administran cepas activas B1 y La Sota en agua potable o por aspersión. Algunas veces son administradas por vía intranasal o intraocular. Los pollitos en buen estado pueden ser vacunados desde el 1-4 día de vida, pero la eficacia de la vacunación aumenta si se espera hasta la segunda o tercera semana
- Algunas otras infecciones (por ejemplo, *Mycoplasma*) pueden agravar la reacción a la vacuna. En ese caso se debe usar vacunas con virus inactivados

http://www.oie.int/esp/maladies/fiches/e_a160.htm

ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

La enfermedad de Newcastle velogénico viscerotrópico (ENVV) es también conocida como enfermedad de Newcastle exótica. En algunas ocasiones es referida como la forma asiática o de Doyle de la enfermedad de Newcastle.

Definición:

La ENNV es la cepa más virulenta del virus de la enfermedad de Newcastle, y es probablemente, la enfermedad de las aves más importante del mundo después de la influenza aviar por las características de zoonosis de esta última. Esta forma patogénica de la enfermedad se caracteriza por las lesiones que produce en el tracto gastro-intestinal. En los pollos susceptibles las tasas de morbilidad se aproximan al 100% y las de mortalidad pueden exceder el 95%. Para la OIE la enfermedad de Newcastle es una enfermedad de las aves provocada por las cepas aviares del paramixovirus 1, cuya virulencia es significativamente superior a la de las cepas lentógenas, cepas vacunales Hitchner B1 y La Sota, por ejemplo. Algunas especies de aves pueden estar infectadas por cepas virulentas del virus de la enfermedad de Newcastle y no manifestar ningún signo clínico.

Enfermedad viral producida por un virus de la familia Paramyxoviridae, del género Rubulavirus; altamente contagioso, que se caracteriza por producir trastornos respiratorios, diarreas y signos nerviosos con incoordinación en sus movimientos, de gran impacto a la industria avícola y al comercio internacional, por lo cual los países establecen acciones específicas o programas nacionales para evitar su ingreso, su diseminación o minimizar su impacto y erradicarla en caso de ocurrencia.

Muchas especies de aves son afectadas por el virus, tanto domésticas como salvajes; pero principalmente las gallinas domésticas.

La mortalidad y la morbilidad pueden llegar a ser tan altos como el 95 y 100% respectivamente; esto puede variar según las especies y en función de la cepa viral.

La transmisión se puede dar por:

- Contacto directo con las secreciones de las aves infectadas, especialmente las heces.
- Comida, agua, instrumentos, locales, vestimentas humanas, etc., contaminados.

La fuente del virus puede ser:

- Secreciones respiratorias, heces.
- Todas las partes de las aves muertas.
- El virus es transmitido durante el período de incubación y por un período limitado durante la convalecencia.
- Se ha demostrado que algunos psitácidos transmiten durante más de un año el virus de la enfermedad de Newcastle de manera intermitente.

Influenza aviar altamente patógena (peste aviar)

ETIOLOGÍA

Clasificación del agente causal

Virus de la familia Orthomyxoviridae, género Influenzavirus A, B. Hasta la fecha todos los microorganismos altamente patógenos aislados han sido virus A de influenza de los subtipos H5 y H7

Resistencia a la acción física y química

Temperatura: Inactivación por 56°C/3 horas; 60°C/30 min

pH: Inactivado a pH ácido

Productos químicos: Inactivado por agentes oxidantes, dodecil sulfato de sodio, disolventes de lípidos, β-propiolactona

Desinfectantes: Inactivado por formalina y compuestos de yodo

Supervivencia: Sigue siendo viable durante mucho tiempo en los tejidos, las heces y el agua

EPIDEMIOLOGÍA

- Altamente contagiosa

Huéspedes

- Los microorganismos aislados de influenza aviar altamente patógena se han obtenido principalmente en gallinas y pavos
- Es razonable suponer que todas las especies aviares son susceptibles a la infección

Transmisión

- Contacto directo con secreciones de aves infectadas, especialmente heces
- Alimentos, agua, equipo y ropa contaminados
- Las aves acuáticas y marinas clínicamente normales pueden introducir el virus en las granjas avícolas

- Huevos rotos contaminados pueden infectar a los pollitos en la planta de incubación

Fuentes de virus

- Heces, secreciones respiratorias
- Los virus altamente patógenos pueden seguir siendo viables durante largo tiempo en heces infectadas, pero también en tejidos y en el agua

Distribución geográfica

Los virus A de influenza no patógenos o ligeramente patógenos están presentes en todo el mundo. Los virus A de la influenza altamente patógena (HPAI) de subtipos H5 y H7 HA se han aislado ocasionalmente en aves en libertad en Europa y otras regiones. Focos producidos por HPAI se registraron en la zona de Pennsylvania, Estados Unidos de América, en los años 1983-84. Más recientemente se han producido focos en Australia, Pakistán y México. Hay indicaciones de que los virus H5 de baja patogenicidad pueden mutar y convertirse en altamente patógenos.

Las infecciones por HPAI se observan rara vez, y no se deben confundir con virus de baja patogenicidad, que también pueden ser de los subtipos H5 o H7

Para más detalles sobre la distribución geográfica, véanse los últimos números de Sanidad Animal Mundial y el Boletín de la OIE

DIAGNÓSTICO

El período de incubación es de 3-5 días

Diagnóstico clínico

- Depresión severa, inapetencia
- Marcada disminución de la producción de huevos
- Edema facial con crestas y barbillas tumefactas y cianóticas
- Hemorragias petequiales en las superficies de las membranas internas
- Muertes súbitas (la mortalidad puede alcanzar 100%)
- Aislamiento del virus necesario para un diagnóstico definitivo

Lesiones

Gallinas

- Las lesiones pueden estar ausentes en los casos de muerte súbita
- Congestión grave de la musculatura
- Deshidratación
- Edema subcutáneo de la cabeza y del cuello
- Secreciones nasal y oral
- Congestión grave de la conjuntiva, a veces con petequia
- Exudación mucosa excesiva en el lumen de la tráquea o traqueítis hemorrágica grave

- Petequias en el interior del esternón, en la grasa serosa y abdominal, en las superficies serosas y en la cavidad corporal
- Congestión renal severa, a veces con depósitos de urato en los túbulos
- Hemorragias y degeneración de los ovarios
- Hemorragias en la superficie de la mucosa del proventrículo, particularmente en la unión con la molleja
- Hemorragias y erosiones de la mucosa de la molleja
- Focos hemorrágicos en los tejidos linfoides de la mucosa intestinal

Las lesiones en los pavos son similares a las de las gallinas, pero pueden ser menos marcadas. Los patos infectados por HPAI y que excretan el virus pueden no presentar ningún síntoma clínico ni lesión

Diagnóstico diferencial

- Cólera aviar agudo
- Forma velogénica de la enfermedad de Newcastle
- Enfermedades respiratorias, especialmente laringotraqueítis infecciosa

Diagnóstico de laboratorio

Procedimientos

Identificación del agente

- Inoculación de huevos de gallina embrionados de 9-11 días de edad seguida por:
 - demostración de la hemaglutinación
 - prueba de inmunodifusión para confirmar la presencia del virus de la influenza A
 - determinación del subtipo con antisueros monoespecíficos
 - evaluación de la virulencia de la cepa: evaluación del índice de patogenicidad intravenoso en gallinas de 4-8 semanas de edad

Pruebas serológicas

- Hemaglutinación y prueba de inhibición de hemaglutinación
- Inmunodifusión en gel de Agar

Muestras

Identificación del agente

- Torundas de tráquea y cloaca (o heces) de aves vivas o de distintos órganos y heces de aves muertas

Pruebas serológicas

- Muestras de sangre coagulada o suero

PREVENCIÓN Y PROFILAXIS

No hay tratamiento

Profilaxis sanitaria

- Evitar el contacto entre aves de corral y aves salvajes, en particular aves acuáticas
- Evitar la introducción en las explotaciones de aves cuya situación sanitaria se desconoce
- Control de los desplazamientos humanos
- Métodos adecuados de limpieza y desinfección
- Se recomienda la cría de un grupo de edad por explotación

En los focos

- Sacrificio de todas las aves
- Eliminación de las canales y todos los productos animales
- Limpieza y desinfección
- Esperar al menos 21 días antes de la repoblación

Profilaxis médica

- En el pasado se consideraba contraproducente vacunar contra el HPAI ya que algunos individuos vacunados pueden, no obstante, infectarse y eliminar virus virulentos. Sin embargo, en los recientes focos de Pakistán y México se utilizaron vacunas inactivadas para luchar rápidamente contra la propagación de la enfermedad

http://www.oie.int/esp/maladies/fiches/e_A150.HTM

BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR

A. INTRODUCCIÓN

La bronquitis infecciosa aviar (BIA) se describió inicialmente en los 1930s, en los EE.UU. como una enfermedad respiratoria aguda presente sobre todo en pollos jóvenes. Se estableció su etiología vírica y se denominó al agente virus de la bronquitis infecciosa aviar. El virus de la bronquitis infecciosa (IBV) es un miembro del género Coronavirus, de la familia Coronaviridae, del orden Nidovirales. El virus tiene un genoma de una sola cadena con ARN no segmentado, y con polaridad de mensajero.

El IBV afecta a pollos de todas las edades, los cuales, con la excepción de los faisanes y las gallinas de guinea, son la única especie descrita como receptora de infecciones naturales. La BIA ocurre en todo el mundo y presenta varias formas clínicas, siendo la forma principal un síndrome respiratorio clásico. En las aves jóvenes que carecen de anticuerpos maternos, la infección del oviducto puede originar un daño permanente y, en las maduras, el cese de la puesta de huevos o la producción de huevos con cáscaras de paredes finas y sin color. La IB puede ser nefrotrópica, causando entonces nefritis aguda, urolitiasis y mortalidad (10). Después de una recuperación aparente, la nefritis crónica puede producir una

muerte súbita poco después, especialmente en aves de tonos pardos. El virus puede persistir en el tracto intestinal y secretarse, por tanto, durante mucho tiempo en las heces. Esto ocurre tanto con las cepas víricas vacunales como con las cepas naturales en condiciones de campo (2).

No ha habido descripciones de infección humana por el IBV.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

La confirmación del diagnóstico se basa en la demostración del virus, apoyada en ocasiones por datos serológicos. Se hace un uso muy amplio de vacunas vivas y de vacunas inactivadas, lo cual puede complicar el diagnóstico por métodos serológicos, porque los anticuerpos debidos a la vacunación y a la infección natural no siempre pueden distinguirse. La persistencia del virus de vacunas vivas también puede equivocar los ensayos de recogida del agente causal.

1. Identificación del agente

a) Muestreo

Las muestras tomadas de las aves deben relacionarse con la enfermedad investigada. Para enfermedades respiratorias agudas, los frotis del tracto respiratorio superior en el caso de aves vivas, o los tejidos traqueales o pulmonares en el caso de aves recién muertas, se deben mantener en hielo con un medio de transporte que contenga penicilina (10.000 Unidades Internacionales [UI]/ml) y estreptomina (10 mg/ml). Para aves con nefritis o problemas en la producción de huevos, también se pueden tomar muestras de los riñones o del oviducto, pero las mayores probabilidades de aislamiento del virus se han descrito a partir de muestras del intestino, en particular, del tejido amigdalino del ciego, o de las heces (2). Sin embargo, los aislamientos procedentes del tracto intestinal pueden no ser relevantes con respecto a la última infección o enfermedad clínica, por lo que en todas las investigaciones se deben tomar muestras del tracto respiratorio.

También se pueden enviar a los laboratorios especializados, para análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) (7), muestras de la tráquea, riñón, oviducto y tejido amigdalino del ciego en medio de transporte estéril con antibióticos (1) y frotis secos del tracto respiratorio o de la cloaca. Para muestras que requieran el envío a un laboratorio de diagnóstico resulta importante que las muestras se mantengan refrigeradas o congeladas en el medio de transporte durante el trayecto. Cuando es previsible un retraso superior a 3 días, las muestras se deben congelar antes del envío y enviar con hielo seco. También deben seleccionarse muestras de canales frescas para examen histopatológico. Igualmente, se deben someter a examen serológico muestras de sangre de aves con infección aguda.

b) Cultivo

Las suspensiones de tejidos (10–20% p/v) se preparan en solución salina tamponada con fosfato (PBS), o en caldo nutritivo para inoculación de huevos, o en medio de cultivo para inoculación de cultivos de órganos traqueales (TOC) (10, 16). Las suspensiones se clarifican por centrifugación a baja velocidad, y por filtración en filtros bacteriológicos (0.2 μ), antes de inocular en huevos o en TOCs.

Los huevos de gallina embrionados y los TOCs se utilizan mucho para titular el virus o hacer aislamientos primarios del mismo. Normalmente, para el aislamiento primario no se utilizan cultivos celulares, porque es necesario adaptar los aislamientos de IBV a crecer en embriones de pollo antes de ver los efectos citopáticos (ECP) de la infección vírica.

En todo trabajo de cultivo del IBV, los huevos utilizados deben proceder de aves que no hayan sido infectadas ni vacunadas. Tales huevos deben ser preferentemente de gallinas libres del patógeno específico (SPF). Por lo general, se inoculan 0,1–0,2 ml de sobrenadante de la muestra en la cavidad alantoidea de embriones de 9–11 días. Los embriones se examinan después diariamente. Se supone que cualquier muerte que ocurra en las 24 horas siguientes es inespecífica, y se eliminan los huevos. Normalmente, el inóculo inicial no suele tener efecto en el embrión, a menos que la cepa derive de una vacuna que ya esté adaptada al huevo. Los líquidos alantoideos de todos los huevos se juntan a los 3–7 días después de la infección; este depósito se diluye 1/5 o 1/10 con caldo con antibióticos y se pasa a otro grupo de huevos. El proceso se repite según se desee. Típicamente, una cepa natural induce cambios teratológicos en el embrión después del segundo o tercer pase que consisten en la aparición de embriones enanos o enroscados, con distrofia de plumas y depósitos de ureato en el mesonefros embrionario. Puede ocurrir alguna muerte en pases posteriores. Otros virus, sobre todo los adenovirus, pueden producir también lesiones embrionarias indistinguibles de las del IBV. El líquido alantoideo no debería aglutinar eritrocitos, y el aislamiento de IBV debe confirmarse con pruebas inmunológicas o genotípicas. Los líquidos alantoideos infecciosos se guardan a -60°C o a temperatura inferior durante plazos largos, o a 4°C después de su liofilización.

Para aislar el IBV directamente del material de campo se pueden utilizar TOCs a partir de embriones de 20 días. Es aconsejable un cortador automático de tejidos para la producción a gran escala de secciones de corte o de anillos de la tráquea por esta técnica (20). Los anillos son de un grosor de 0,5–1,0 mm y se mantienen en medio de Eagle con ácido N–2–hidroxiethylpiperazina N´–2–etanosulfónico (HEPES) en botellas rotatorias (15 rev/hora) a 37°C . La infección de cultivos del órgano traqueal produce estasia de los cilios en 24–48 horas. La cilioestasia puede producirse por otros virus, y los casos sospechosos de IBV se deben confirmar por métodos inmunológicos o genotípicos.

c) Métodos de identificación

Para la identificación resultan útiles la prueba de neutralización de virus (NV) en huevos embrionados y la técnica de inmunodifusión (ver más adelante). Las pruebas con anticuerpos fluorescentes en las células presentes en el líquido alantoideo de huevos infectados también pueden demostrar la presencia del IBV (11), y la microscopía electrónica directa con tinción negativa puede revelar la presencia de partículas con la morfología típica de los coronavirus en concentrados del líquido alantoideo o de TOC. La presencia específica del IBV en el líquido alantoideo infeccioso se puede detectar por amplificación con RT–PCR y mediante una prueba de hibridación puntual utilizando una sonda de ADN (27). Se ha descrito la tinción directa por inmunofluorescencia de TOCs infectados para la detección rápida de la presencia del IBV (3). En membranas corioalantoideas

infectadas se puede utilizar la inmunohistoquímica, con un anticuerpo monoclonal específico de grupo, para identificar el IBV (35).

d) Identificación del serotipo

La variación biológica y antigénica entre las cepas de IBV está bien documentada (10, 15, 22, 23, 26), pero en la actualidad no hay acuerdo sobre un sistema de clasificación definitivo. Sin embargo, las relaciones y diferencias antigénicas entre las cepas son importantes, pues las vacunas basadas en un subtipo particular pueden mostrar escasa o nula protección frente a los virus de un grupo antigénico distinto. Como consecuencia de la aparición regular de variantes antigénicas, los virus, y por lo tanto la enfermedad y las vacunas, pueden ser muy diferentes en sitios geográficos distintos. Es necesaria una determinación constante de los virus presentes en el ambiente natural para producir vacunas que sean eficaces de cara a las variantes antigénicas que puedan surgir. El serotipado de aislamientos y de cepas de IBV se ha realizado utilizando pruebas de NV en huevos embrionados (22), en TOCs (21) y en cultivos celulares (24). También se ha empleado la neutralización de focos fluorescentes para diferenciar cepas (18). La prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI) se ha utilizado para serotipar el IBV (1, 29) y ha resultado útil para el uso de probar respuesta temprana en los sueros.

Los anticuerpos monoclonales (MAbs), que normalmente se utilizan en enzimoimmunoensayos (ELISA), han resultado útiles para agrupar y diferenciar las cepas de IBV (25, 31). Las limitaciones de la definición del serotipo de la BIA mediante análisis por MAbs derivan de la falta de disponibilidad de MAbs o de hibridomas y de la necesidad de producir nuevos MAbs con especificidad apropiada al mismo ritmo con el que emergen los nuevos serotipos variantes de BIA (28).

e) Identificación genotípica

Se han investigado las bases moleculares de la variación antigénica, generalmente mediante secuenciación de los nucleótidos del gen que codifica la proteína de las proyecciones o espículas (S) o, más específicamente, por secuenciación de los nucleótidos del gen que codifica la subunidad S1 de la proteína S (5, 33), que es donde se encuentra la mayoría de los epitopos a los que se unen los anticuerpos neutralizantes (32). No se ha detectado una correlación exacta con los resultados de NV, pues, mientras los distintos serotipos suelen tener grandes diferencias (20–50%) en la secuencia deducida de aminoácidos de la subunidad S1 (33), otros virus que son claramente distintos en las pruebas de neutralización solo muestran un 2–3% de diferencia en la secuencia de aminoácidos (5). No obstante, en general hay una buena correlación entre los datos representados por la secuencia de S1 y el serotipo por NV, y eventualmente será posible seleccionar cepas vacunales teniendo en cuenta los datos de las secuencias. Se ha sugerido que la nucleoproteína puede tener un papel importante en la inducción de la protección contra los virus de la BIA. Recientemente, se ha comprobado que los coronavirus aislados de pavos y faisanes son genéticamente similares a IBV, mostrando una identidad nucleotídica de aproximadamente el 90% en la región II muy conservada del extremo 3' no traducible (UTR) del genoma del IBV (8, 9).

Con cebadores adecuados, la técnica más empleada para diferenciar cepas de IBV es la secuenciación de nucleótidos (particularmente de la región del gen S) y ha llegado a superar la utilización del análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) y el uso de sondas de ADN. La secuenciación nucleotídica también ha suministrado evidencia de que a menudo se da una recombinación entre cepas de IBV (6, 40). En varios laboratorios de diagnóstico (30) se está utilizando RT-PCR para secuenciar y caracterizar un amplio espectro de serotipos variantes de muchos países.

2. Pruebas serológicas

Se han descrito varias pruebas. Las que se consideran aquí comprenden la NV (22), la inmunodifusión en gel de agar (IGDA) (39), la HI (1) y los ELISAs (34). Cada prueba tiene sus ventajas e inconvenientes respecto a la realización, la especificidad, la sensibilidad y el coste. En general, para pruebas serológicas rutinarias, las pruebas de NV son demasiado costosas y poco prácticas y las de tipo IGDA carecen de sensibilidad. Las pruebas de HI y de ELISAs son adecuadas para serología de rutina, aunque difieren en su especificidad. Como los ELISAs están disponibles como preparaciones comerciales y con instrucciones detalladas para su empleo, se describe con detalle la prueba HI más adelante. El control regular de los sueros de las poblaciones aviares respecto a los títulos de anticuerpo contra BIA puede servir de ayuda para indicar el nivel de respuesta a la vacuna. Debido a que muchos sueros de pollo, especialmente aquellos de los de más edad, contienen anticuerpos que presentan fuerte reacción cruzada contra cepas antigénicamente no relacionadas, no se puede utilizar el serodiagnóstico de brotes sospechosos de la enfermedad con un grado alto de seguridad.

a) Neutralización del virus

En las pruebas NV, todos los sueros se deben calentar primero a 56°C durante 30 minutos. El virus se mezcla con suero y se incuba durante 30–60 minutos a 37°C o a temperatura ambiente. El sistema más empleado son los embriones de pollo, pero los anticuerpos también pueden medirse utilizando TOCs o cultivos celulares. Se han empleado dos métodos para estimar los anticuerpos neutralizantes. Uno emplea una concentración constante de suero que reacciona con varias diluciones de virus (el método alfa) y otro emplea una cantidad constante de virus y varias diluciones de suero (el método beta).

En el método alfa, se enfrentan diluciones decimales de virus adaptado a huevo con una dilución fija de antisuero (normalmente 1/5) y las mezclas se inoculan en grupos de cinco a diez huevos. En paralelo, se titula el virus solo. Se calculan los puntos finales por el método de Kärber o por el de Reed y Muench. Los resultados se expresan como un índice de neutralización (NI) que representa la diferencia en log₁₀ de los títulos del virus solo y de los de las mezclas virus/antisuero. Los valores de NI pueden alcanzar 4,5–7,0 en el caso de mezclas homólogas de virus/suero; valores < 1,5 son inespecíficos, y un virus heterólogo puede dar valores tan bajos como 1,5.

El método beta es la prueba de neutralización utilizada con más frecuencia para el ensayo de anticuerpos con embriones de pollo. Se enfrentan diluciones dobles o cuádruples de antisuero con un volumen igual de una dilución de virus, que normalmente se fija en 100 o 200 EID₅₀ (dosis infecciosas medias para

embriones) por 0,05 ml, y se inoculan 0,1 ml de cada mezcla en la cavidad alantoidea de cinco a diez huevos embrionados. Simultáneamente, se realiza un control de titulación de virus para confirmar que la dilución fijada de virus en las mezclas virus/suero está entre 101.5 y 102.5 EID₅₀. Como antes, se determinan los títulos de los sueros a punto final por el método de Kärber o por el de Reed y Muench, pero aquí se expresan como recíprocos de los log₂ de las diluciones. Este método de virus fijo/suero variable también se puede emplear para pruebas de neutralización en cultivos de órganos traqueales utilizando cinco tubos por dilución de suero, como suele ser convencional con otros virus (21). Los resultados se calculan según Reed y Muench y los títulos víricos se expresan como dosis cilioestáticas medias por unidad de volumen (log₁₀ CD₅₀). Los títulos del suero se expresan de nuevo como recíprocos de los log₂ de las diluciones. Esta prueba es más sensible que otras, pero los aspectos técnicos limitan una adopción más extendida.

b) Inhibición de la hemaglutinación

Se ha descrito un protocolo estandarizado para la prueba HI con IBV (1), y el procedimiento que se detalla a continuación está basado en dicho estándar. Se ha visto que muchas cepas y aislamientos de IBV aglutinan eritrocitos de pollo (RBCs) después de un tratamiento enzimático. Los virus seleccionados para la producción de antígeno pueden variar, en función de las necesidades del diagnóstico.

• Preparación del antígeno

El antígeno del IBV necesita un tratamiento enzimático para tener actividad hemaglutinante (HA). Inicialmente esto se facilitaba con fosfolipasa C comercial de tipo 1, y se recomendaba mezclar la suspensión de virus con un volumen igual del enzima a una concentración final de 1 unidad/ml en el mismo tampón. Sin embargo, se ha demostrado después que es más eficaz utilizar filtrados crudos de cultivos de *Clostridium perfringens*, y parece ahora posible que el constituyente responsable de esta actividad fuera un enzima contaminante más bien que la fosfolipasa C. Trabajos posteriores han indicado que, muy probablemente, este enzima sea una neuraminidasa (36). El líquido alantoideo infeccioso se centrifuga a 30.000 g durante 3 horas y el precipitado se resuspende, concentrado unas 100 veces, en un filtrado de *Clostridium perfringens* tipo A, incubándose a 37°C durante 2 horas.

Para las pruebas de HA y de HI, los procedimientos se realizan mejor a 4°C.

• Prueba de hemaglutinación

i) Colocar 0,025 ml de PBS isotónico, pH 7,0–7,4, en cada pocillo de una placa de microtitulación de plástico.

ii) Colocar 0,025 ml del antígeno vírico en el primer pocillo. Para una determinación ajustada del contenido HA, esto se debe hacer a partir de una serie inicial de diluciones de pequeño rango, es decir 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, etc.

iii) Hacer diluciones dobles de volúmenes de 0,025 ml del antígeno vírico a los largo de la placa.

iv) Colocar 0,025 ml adicionales de PBS a cada pocillo.

- v) Depositar en cada pocillo 0,025 ml de una solución al 1% (v/v) de RBCs de pollo.
- vi) Mezclar, golpeando la placa muy ligeramente, y dejar que los RBCs sedimenten durante 40 minutos a 4°C, cuando los RBCs control formen un botón definido por sedimentación.
- vii) La HA se determina inclinando la placa y observando la presencia o ausencia de desplazamiento de los RBCs sedimentados en forma de lágrima. La titulación debe leerse como la dilución mayor que da una HA completa sin ese tipo de desplazamiento; esto representa el 100% de HA y 1 unidad de HA (HAU) y se puede calcular de modo ajustado el valor de las diluciones iniciales.

• Prueba de inhibición de la hemaglutinación

La prueba HI se utiliza en el diagnóstico y en el control rutinario de las respuestas a la vacuna de poblaciones aviarias.

- i) Colocar 0,025 ml de PBS en cada pocillo de una placa de microtitulación de plástico.
- ii) Colocar 0,025 ml del suero (5) en el primer pocillo.
- iii) Hacer diluciones dobles de volúmenes de 0,025 ml suero a lo largo de la placa.
- iv) Añadir a cada pocillo 0,025 ml con 4 HAU de antígeno vírico y dejar durante 30 minutos.
- v) Añadir a cada pocillo 0,025 ml de una solución al 1% (v/v) de RBCs de pollo y, después de mezclar cuidadosamente, dejar durante aproximadamente 40 minutos que sedimenten los RBCs, a cuyo tiempo los RBCs control forman por sedimentación un botón definido.
- vi) El título por HI es la dilución más alta de suero que origina la inhibición completa de 4 HAU de antígeno. La aglutinación se determina de modo más exacto inclinando la placa. Solamente se considera que muestran inhibición los pocillos donde los RBCs se desplazan del mismo modo que en los pocillos control (que contienen sólo 0,025 ml de RBCs y 0,05 ml de PBS).
- vii) La validez de los resultados se contrasta contra un suero control negativo, que no debería de dar un título >22, y con un suero control positivo, cuyo título debería estar dentro de una dilución del título conocido.
- viii) Por lo general, los sueros se consideran positivos si tienen un título de 24 o superior. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, incluso en poblaciones SPF, una pequeña proporción de pájaros puede mostrar un título inespecífico de 24, aunque normalmente se trata de aves con más de 1 año de edad.

c) Enzimoimmunoensayo

La técnica ELISA es el método serológico más sensible y que suministra las reacciones más rápidas y los títulos de anticuerpos más altos que otras pruebas (34). Carece de especificidad de cepa o de tipo, pero es adecuado para analizar respuestas a la vacunación en condiciones de campo. Existen preparaciones comercializadas de ELISA –que se basan en estrategias diferentes para la detección de anticuerpos contra IBV. Normalmente dichas pruebas se han evaluado y validado por el fabricante, y, por lo tanto, es importante para su uso seguir cuidadosamente las instrucciones que se especifican. Los enzimoimmunoensayos se utilizan ampliamente para identificar poblaciones

infectadas por IBV (pollos para asar) mediante el reconocimiento de títulos elevados de anticuerpos. Si en la granja se vuelve a presentar la IB en la siguiente población de aves, se realizan intentos para aislar el virus y se establece su genotipo por secuenciación de RFLP o S1.

d) Inmunodifusión en gel de agar

La prueba IGDA se puede utilizar en el diagnóstico (39). El antígeno se prepara de un homogenado de las membranas corioalantoideas de embriones de pollo infectados. Para producir antígeno, a menudo se utiliza la cepa Beaudette, que es letal para los embriones. La prueba carece de sensibilidad y es responsable de proporcionar resultados poco fiables, ya que la presencia y la duración de los anticuerpos precipitantes puede variar en las aves a nivel individual.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

Todos los virus presentes en vacunas con virus vivos deben estar atenuados o ser naturalmente no patógenos. Muchos países sólo permiten en la actualidad vacunas vivas que estén basadas en el tipo Massachusetts. Es improbable que una inoculación única de una vacuna inactivada para la BIA confiera una protección completa hasta el final de la puesta, a menos que esté precedida por una respuesta primaria, generalmente inducida por una vacuna viva. Las vacunas inactivadas tienen que administrarse a las aves individualmente, mediante inyección intramuscular o subcutánea, mientras que las vacunas vivas se pueden dar como aerosoles o en el agua de bebida, o por gota en el ojo. Las vacunas vivas producen una mejor inmunidad local en el tracto respiratorio y pueden proteger frente a un espectro más amplio de antígenos de cepas naturales (16, 17). Puede que las vacunas vivas no protejan durante toda la vida de la población ponedora, ya que el desafío por cepas de serotipo variante es un hecho muy común en granjas con aves de edades múltiples, y los descensos de producción son corrientes hacia las 40 semanas de edad. El uso de algunas vacunas vivas conlleva el riesgo de patogenicidad residual asociada con el pase de la vacuna en la población. Sin embargo, el empleo de técnicas apropiadas de distribución masiva (por ejemplo, aerosoles o agua de bebida) para asegurar una cobertura y una distribución uniforme de la vacuna en la población, y el evitar el uso de dosis fraccionadas subóptimas de la vacuna, generalmente, tiene como resultado una aplicación segura de las vacunas vivas. Se pueden evitar las preocupaciones por el uso de vacunas vivas utilizando vacunas inactivadas.

Las recientes vacunas inactivadas emulsionadas en aceites son ahora más eficaces, en especial cuando están precedidas por una vacuna con virus vivo. También estimulan una respuesta de anticuerpos más persistente. Hay perspectivas de vacunas diseñadas por ingeniería genética (4), y se están desarrollando sistemas de vacunación in ovo (38).

En el Capítulo I.1.7. Principios de producción de vacunas veterinarias, se presentan directrices para la producción de vacunas veterinarias. Las normas dadas aquí y en el Capítulo I.1.7. son de carácter general. En los países en que se producen las vacunas contra la BIA, hay que cumplir estándares nacionales e internacionales. La autoridad que concede el permiso de producción debe suministrar información y apoyo sobre los requisitos particulares. A menudo, éstos

se presentan en términos generales de aplicación a todas las vacunas –para aves y mamíferos, vivas o inactivadas, víricas y bacterianas. Puede haber también requisitos específicos que se aplican a las vacunas contra la BIA, vivas y atenuadas. Como ejemplos, se indican las referencias de las regulaciones aplicables en Europa y en EE.UU. (12–14, 37).

La lista de agentes exógenos que deben estar ausentes continúa aumentando. Los fabricantes deben conocer aquellos que sean de aplicación actual en su país. Las adiciones más recientes a la lista son el virus de la nefritis aviar y el neumovirus aviar.

En las vacunas contra la BIA, existen diferencias importantes entre los diversos países en lo que respecta al virus de desafío que se emplea en las pruebas de potencia y en su validación. Tradicionalmente, se ha utilizado para pruebas de desafío una cepa virulenta M–41 del tipo Massachusetts, tanto para vacunas vivas como inactivadas. Aunque este tipo es todavía común, en muchos países no es a menudo el tipo único o el dominante, y puede ser aconsejable preparar vacunas de otros tipos. Es lógico que los desafíos se realicen con el mismo tipo presente en la vacuna. Establecer criterios para validar el virus de desafío puede ser más difícil para otros tipos que no sean el Massachusetts debido, en general, a su menor virulencia. Normalmente, se piensa que las vacunas inactivadas protegen contra el descenso de la producción de huevos. El virus de desafío tradicional M–41, como se describe en este capítulo, causa un descenso de al menos el 67% en controles no vacunados, pero cuando se usan otros tipos, se pueden considerar satisfactorios unos descensos mucho menores, dependiendo de la evidencia publicada sobre los efectos de estas cepas en condiciones de campo. Hay también una tendencia a relajar los criterios para desafíos con el tipo Massachusetts, y la Farmacopea Europea define ahora que un descenso satisfactorio con los tipos Massachusetts es de al menos el 35%, y, para tipos no Massachusetts, de al menos el 15%, con tal de que el descenso sea "proporcionado a la evidencia documentada" (14).

1. Control de inóculo

a) Características del inóculo

Para cualquier tipo de vacuna que se produzca y para cepas de desafío se debe emplear un sistema de lotes de inóculo. Cada virus debe designarse según la cepa y el origen, y debe estar libre de contaminación con otras cepas de IBV. Se debe disponer de servicios de conservación separados para las cepas de virus empleadas como vacuna y las empleadas para desafío.

En vacunas con virus vivos, muchos países sólo permiten cepas del tipo Massachusetts. Algunos países permiten otras cepas, normalmente teniendo en cuenta que tales cepas ya están presentes en sus poblaciones nacionales. El tipo antigénico incorporado, tanto en vacunas vivas como inactivadas, requiere justificación, si existe duda respecto a su existencia en un país.

b) Método de cultivo

Todos los virus de inóculo se crecen en el saco alantoideo de embriones de pollo en desarrollo o en cultivos celulares adecuados. Los huevos deben proceder de una población SPF.

c) Validación como vacuna

• Pureza

Cada lote de siembra debe estar libre de contaminación por bacterias, hongos, micoplasmas y virus.

Para la detección de virus extraños, el inóculo se trata primero con un antisuero monoespecífico de título elevado, preparado contra la cepa examinada o contra una de idéntico tipo. Esta mezcla se cultiva de varios modos, designados para confirmar la ausencia de virus que por experiencia previa puedan ser contaminantes potenciales. El antisuero no debe contener anticuerpos contra adenovirus, virus de la encefalitis aviar, rotavirus aviares, virus de la anemia de los pollos, viruela aviar (poxvirus aviar), virus de la laringotraqueitis infecciosa, virus de la influenza A, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la enfermedad bursal infecciosa, virus de la leucosis, reovirus, virus de la enfermedad de Marek, herpesvirus del pavo, virus asociados a los adenovirus, virus del síndrome 76 de descenso de la postura (producción de huevos) (EDS76), virus de la nefritis aviar, neumovirus aviar o virus de la retículo–endoteliosis. El inóculo suministrado a cada unidad del sistema de cultivo debe contener una cantidad de IBV neutralizado que tenga una infectividad inicial de al menos diez veces la dosis mínima de campo. Estos sistemas incluyen:

1. Embriones de pollo SPF, incubados durante 9–11 días, inoculados en el saco alantoideo y en la membrana corioalantoidea (dos pases).
2. Cultivos de fibroblastos de embrión de pollo, para los subgrupos A y B del virus de la leucosis. La prueba COFAL (prueba para la leucosis aviar utilizando fijación de complemento) o el ELISA tipo "sandwich" de doble anticuerpo, para el antígeno de la leucosis específico de grupo, se llevan a cabo en extractos celulares recogidos a los 14 días. Para el virus de la retículo–endoteliosis, se realiza una prueba de inmunofluorescencia sobre cubres, en cultivos después de dos pases.
3. Cultivos de riñón de pollo SPF que se examinan para ECPs, inclusiones celulares y agentes hemoadsorbentes, y que se cultivan hasta durante 20 días de incubación total, con pases realizados al menos cada 5 días.
4. Pollos SPF de edad mínima de vacunación que se inoculan intramuscularmente con 100 dosis de campo y en la conjuntiva con 10 dosis de campo; esto se repite 3 semanas más tarde, cuando los pollos se inoculan también en la base de la pata e intranasalmente con diez dosis de campo. Las observaciones se hacen en conjunto durante 6 semanas, y se recoge el suero para pruebas de encefalomiелitis aviar, enfermedad bursal infecciosa, enfermedad de Marek, enfermedad de Newcastle e infección por Salmonella pullorum.

- **Potencia**

Las vacunas dirigidas a proteger contra la pérdida de producción de huevos deben probarse en cuanto a duración de la respuesta de anticuerpo. Los títulos medios de HI deben ser $>6 \log_2$ hasta por lo menos las 60 semanas de edad. Las pruebas serológicas deben hacerse a intervalos frecuentes para ver que los títulos no han aumentado debido a una respuesta secundaria por infección con un IBV extraño. Las vacunas dirigidas a proteger contra la forma respiratoria de la enfermedad en pollos para asar o en pollos de cría, deben probarse también en cuanto a duración de la respuesta de anticuerpo; en el caso de pollos para asar, esto debe hacerse hasta la edad normal del sacrificio, y en casos de pollos de cría hasta la edad en que se debería administrar una vacunación de refuerzo (a menudo a las 16–18 semanas).

- **Inocuidad**

Las pruebas sobre el inóculo de virus deben incluir una prueba de la capacidad potencial para revertir la virulencia. Las vacunas vivas y las inactivadas deben ensayarse para inocuidad.

- **Eficacia**

Para demostrar la eficacia, se debe hacer un ensayo de vacuna con el inóculo primario y con el inóculo de trabajo después de cinco pases del inóculo primario, y realizar pruebas para demostrar su efecto protector.

Para las vacunas vivas, se vacuna un mínimo de diez pollos SPF de 3–4 semanas con la dosis recomendada, intranasalmente o por gota en ojo. Se mantienen por separado diez pollos control no vacunados de la misma edad y origen. Después de 3–4 semanas, todas las aves de ambos grupos se inoculan en desafío, intranasalmente o por gota en ojo, con 103.0–103.5 EID₅₀ de la cepa virulenta Massachusetts M–41. Después de 4–5 días del desafío, se toma un frotis traqueal de cada ave y se coloca en 3 ml de caldo con antibióticos. Cada líquido se prueba

para IBV inoculando (0,2 ml) cinco huevos embrionados de 9–11 días de incubación. Una prueba alternativa a la de tomar frotis consiste en sacrificar las aves a los 4–6 días de la inoculación de desafío y examinar microscópicamente los anillos traqueales para actividad de los cilios (19). La incapacidad de resistir un desafío se refleja en la pérdida de la movilidad de los cilios. La vacuna viva es adecuada para su empleo si, después del desafío, al menos el 90% de las aves vacunadas no muestran evidencia del IBV en sus tráqueas, mientras que en el 80% o más de las aves control debería de haber evidencia de la presencia del virus.

Para valorar una vacuna inactivada dirigida a proteger aves ponedoras, se vacunan 30 o más pollos SPF según se recomiende, a la edad más temprana permitida. Si se realiza antes una vacunación primaria con vacuna viva, a un grupo adicional de aves se administra solo la vacunación primaria. En ambos casos, estas vacunaciones primarias no deben hacerse después de las 3 semanas de edad. La vacuna inactivada se administra 4–6 semanas después. Otro grupo control de 30 aves se deja sin vacunar. Todos los grupos se mantienen por separado hasta 4 semanas antes de la producción máxima de huevos, y luego se mantienen juntos. Se controla la producción individual de huevos y, una vez que se normaliza, todas las aves reciben una inyección de desafío y se registra la producción de huevos durante otras 4 semanas. El inóculo de desafío debe ser lo bastante fuerte como para asegurar una pérdida de producción en las 3 semanas siguientes al desafío. La pérdida en el grupo control debe ser por lo menos del 67%; el grupo que recibió la vacunación primaria con virus vivos y después la vacuna inactivada debe mantener el nivel de producción previo, y el grupo que sólo recibió la vacunación primaria debe mostrar una pérdida intermedia de producción. Se toman sueros de todas las aves al tiempo de vacunación, 4 semanas después, y en el desafío; no debería haber respuesta en las aves control.

Para valorar una vacuna inactivada diseñada para proteger las aves contra la enfermedad respiratoria, se vacunan 20 pollos SPF de 4 semanas como se recomiende. Junto con este primer grupo, se mantiene otro de 20 aves de la misma edad y origen como control. Se determinan las respuestas de anticuerpos 4 semanas después; no debería haber respuesta en las aves control. A continuación todas las aves se inoculan en desafío con 103 CID50 (50% de dosis infecciosa en pollo) de virus virulento, se sacrifican 4–7 días después y se examinan secciones traqueales para observar la movilidad de los cilios. Al menos el 80% de los controles no vacunados deben mostrar una cilioestasia completa, mientras que los cilios traqueales deben permanecer sin ser afectados en un porcentaje similar de las aves vacunadas.

En algunos países hay vacunas disponibles, tanto vivas como atenuadas, que contienen también el virus de la enfermedad de Newcastle, el de la enfermedad bursal infecciosa, reovirus y el virus EDS76. La eficacia de los diferentes componentes de estas vacunas se debe establecer de forma independiente y luego en forma conjunta, para determinar si existe interferencia entre los diferentes antígenos.

2. Método de producción

Todas las cepas de virus destinadas a vacunas vivas se cultivan en el saco alantoideo de embriones de pollo SPF o en cultivos celulares adecuados. Para las vacunas inactivadas, se pueden utilizar huevos de gallina de poblaciones sanas que no sean SPF. El líquido reunido se clarifica y se titula para infectividad. Para vacunas vivas este líquido se liofiliza en viales, y para vacunas inactivadas se mezcla con aceite mineral de grado alto hasta formar una emulsión a la que se añade un conservante.

3. Control de procesos

El contenido antigénico necesario se basa en las pruebas iniciales con lotes de vacunas de eficacia demostrada en ensayos de laboratorio y de campo. Las titulaciones sobre infectividad se realizan en embriones de pollo.

Las vacunas vivas deben contener por lo menos 103.5 EID₅₀ por dosis y por ave hasta la fecha de caducidad indicada, y no menos de 102.5 EID₅₀ por dosis y por ave después de una incubación a 37°C durante 7 días a la fecha de envase. Para las vacunas inactivadas, el agente inactivante y el proceso de inactivación deben ser eficaces durante la producción tanto sobre el IBV como sobre los contaminantes potenciales. Con la utilización de beta-propiolactona o formalina, cualquier virus vivo de la leucosis o cualquier especie de Salmonella deben eliminarse; y con otros agentes inactivantes, se debe hacer inactivo el espectro completo de posibles contaminantes. Es importante asegurar la homogeneidad de las suspensiones antes de los procesos de inactivación y, después de la inactivación, se debería llevar a cabo una prueba de inactivación en cada lote de la masa del material cosechado, así como en el producto final.

Las pruebas de inactivación deben ser apropiadas para la vacuna particular y deben comprender dos pases en cultivos celulares, en embriones o en pollos, inoculando 0,2 ml y haciendo diez réplicas en cada pase.

4. Control de lotes

a) Esterilidad

Cada lote de vacuna viva debe probarse para ausencia de agentes extraños como en el inóculo de virus

b) Inocuidad

• Para vacunas vivas

Utilizar no menos de diez pollos de una población SPF que sean de la edad mínima para la vacunación que se establezca en el prospecto. Administrar a cada pollo, por gota en ojo, diez dosis de la vacuna una vez reconstituida para obtener una concentración adecuada a la prueba. Observar los pollos durante 21 días. Para vacunas dirigidas a pollos de 2 o más semanas de edad, utilizar los pollos inoculados según la "prueba para agentes extraños utilizando pollos" (ver Sección C.1.c.4.). Si durante el período de observación más de dos pollos mueren por causas no relacionadas con la vacuna, se repite la prueba. La vacuna satisface la prueba si ningún pollo muestra síntomas clínicos serios, particularmente signos respiratorios, y si no muere ningún pollo por causas atribuibles a la vacuna.

- **Para vacunas inactivadas**

Inyectar diez pollos de 14–28 días de edad, de una población SPF, con una dosis doble de vacuna por la ruta recomendada. Observar los pollos durante 21 días. Verificar que no ocurren reacciones anormales locales o sistémicas.

c) Potencia

La prueba de potencia se establece a partir de los resultados de las pruebas de eficacia del inóculo primario de virus. Las vacunas vivas se prueban para potencia por titulación de la infectividad, y las inactivadas se prueban midiendo la producción de anticuerpos. La prueba de potencia para un lote de vacuna inactivada consiste en vacunar 20 pollos SPF de 4 semanas de edad y demostrar que cuatro semanas después su título HI medio no es inferior a $6 \log_2$.

d) Duración de la inmunidad

Debe mostrarse que la vacuna tiene la potencia necesaria para lograr la duración pretendida de inmunidad al final del período de caducidad.

e) Estabilidad

Se deben probar al menos tres lotes para estabilidad y deben dar resultados satisfactorios pasados 3 meses de la fecha de caducidad.

La estabilidad de una vacuna viva debe medirse por el mantenimiento de un título de infectividad adecuado.

La estabilidad de una vacuna inactivada debe medirse a intervalos por pruebas de potencia de los lotes. Debería determinarse a través del período de validez la concentración y persistencia del conservante. No debería producirse ningún cambio físico en la vacuna y debería adquirir su estado inicial de emulsión después de una agitación rápida.

f) Conservantes

Existen unos niveles máximos para el empleo de antibióticos, conservantes, y agentes inactivantes residuales.

g) Precauciones (riesgos)

No se conoce que el IBV represente por sí mismo un peligro para el personal empleado en la producción o prueba de las vacunas. Sin embargo, los agentes indeseables pueden ser peligrosos y las fases iniciales de la manipulación de un nuevo inóculo de virus deben realizarse en una cabina de seguridad. Una precaución deseable en la producción de todas las vacunas es tomar medidas para reducir la exposición del personal a aerosoles de proteínas extrañas. En este trabajo nunca se debe emplear a personas que sean alérgicas a materiales del huevo.

5. Pruebas sobre el producto final

a) Inocuidad

En cada lote del producto final se debe realizar una prueba de inocuidad.

b) Potencia

En cada lote de producto final se debe realizar una prueba de potencia, como en la Sección C.4.c., en la fecha de producción y al final del período de caducidad indicado.

http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.7.06_Bronquitis_infecciosa_aviar.pdf

SINOVITIS INFECCIOSA

Descripción de la Enfermedad

La Sinovitis Infecciosa es una infección de la cápsula articular y de las vainas tendinosas de las articulaciones tarsianas y de los dedos, así como de la bolsa sinovial del extremo anterior de la quilla esternal de las aves. Se observó con carácter epizootico por primera vez en América en 1954

Presentación:

Las gallinas pueden enfermar desde muy corta edad y los pavos generalmente a partir de la décima semana.

Etiología y contagio:

En el origen de las artritis bacterianas intervienen los más diversos agentes, como salmonelas, estreptococos, pasteurelas y colibacilos. Los micoplasmas tienen mayor importancia por su carácter epizootico. La Sinovitis Infecciosa se transmite por contacto directo entre gallinas infectadas y sanas y a través del huevo.

Sintomatología:

El período de incubación varía de 24 a 80 días en la infección natural. Los animales infectados presentan el plumaje erizado y cojean a los pocos días de contraer la enfermedad. La mortalidad puede ser muy elevada. Llamam la atención los engrosamientos de las articulaciones tarsianas y de los dedos, también las llamadas ampollas pectorales en la quilla esternal. Las aves enfermas de sinovitis detienen su desarrollo.

Diagnóstico:

El diagnóstico específico requiere la intervención del laboratorio, dada la posible participación de agentes etiológicos diversos. En el interior de la articulación, de las vainas tendinosas, de la bolsa sinovial y de la quilla esternal se observa un líquido blanco-gris-amarillento, floculento y viscoso. La secreción es caseosa en las formas crónicas. El bazo está hipertrofiado, casi siempre y el hígado se halla sembrado a menudo de pequeños focos, puntiformes, de necrosis. En las tumefacciones articulares de los pollos, sobre todo de razas pesadas, puede considerarse también la rotura del tendón flexor profundo de la articulación tarsiana.

Tratamiento:

La Sinovitis Infecciosa causada por micoplasmas puede ser detenida con antibióticos administrados en el alimento o en el agua, pero esto no ha impedido la transmisión del agente causal al huevo.

Profilaxis: Las medidas profilácticas descritas para *Mycoplasma gallisepticum* son válidas para *Mycoplasma sinoviae*.

http://www.aviculturaargentina.com.ar/sanidad/microplasmosis_aviar.pdf

Encefalomiелitis Aviar

La encefalomiелitis aviar es una infección viral del sistema nervioso central y de los órganos internos que puede afectar a pollos, gallinas, pavos, faisanes y codornices. La encefalomiелitis aviar es producida por un picornavirus (virus ARN pequeño y sin envoltura) resistente al medio ambiente.

La enfermedad es de distribución mundial, siendo prevalente en granjas de edades múltiples. Las diferentes cepas del virus pertenecen a un mismo serotipo, sin embargo, existen diferencias en el grado de patogenicidad entre las cepas de campo y las cepas adaptadas a embrión de pollo. Las cepas de campo se caracterizan por su enterotropismo, infectividad por vía oral y excreción a través de las heces.

En reproductoras de engorde infectadas a una edad adulta, no se manifiestan los signos clínicos neurológicos de la enfermedad. Sin embargo, se pueden observar bajas de postura (de hasta un 10% a un 15%) y una reducción en el número de nacimientos (de hasta un 5%). Durante la fase aguda de la infección, la cual puede tomar hasta un mes, el virus de la encefalomiелitis aviar se transmite de forma intermitente a través de los huevos. Dicha transmisión vertical ocasiona una disminución en el porcentaje de nacimientos y la presencia de un gran número de pollitos con signos clínicos nerviosos. Los pollitos infectados verticalmente excretan el virus en el medio ambiente, lo cual contribuye a la transmisión horizontal del virus a pollitos no infectados. El desarrollo de una respuesta inmune en reproductoras, alrededor de 4 semanas después de la infección, interrumpe la transmisión vertical del virus a la progenie.

En pollitos infectados verticalmente, los signos clínicos de la encefalomiелitis aviar se observan principalmente entre la primera y la tercera semana de vida. Entre los signos clínicos encontramos diarrea, ataxia, parálisis y especialmente los signos neurológicos típicos (tremor epidémico), los cuales se agravan cuando las aves se

encuentran en estado de agitación. Los lotes afectados pueden presentar una morbilidad de hasta un 40% a un 60%, alcanzando mortalidades del 25% al 50%. Algunas pocas aves se pueden recuperar completamente de la enfermedad, sin embargo, presentaran retardo en el crecimiento y una reducción en la producción de huevos.

En pollonas de levante (6-16 semanas de edad), las infecciones por encefalomiелitis aviar cursan por lo general sin la presencia de signos clínicos. Sin embargo, en ponedoras comerciales infectadas a edades adultas, se observa una baja considerable en la postura. Al igual que en las reproductoras de engorde, las reproductoras de líneas de postura infectadas durante el ciclo de producción presentarán una baja en la postura y la transmisión vertical del virus a la progenie, con la presencia de mortalidad embrionaria y pollitos con manifestaciones nerviosas entre la primera y tercera semanas de vida.

El control de la encefalomiелitis aviar radica en la vacunación de ponedoras comerciales y reproductoras tanto de líneas de engorde como de postura antes del inicio del ciclo de producción. Una vacunación adecuada protege a las aves contra las bajas de postura y previene la transmisión vertical del virus a la progenie. Las cepas vacunales excesivamente adaptadas a embrión de pollo tienden a replicarse en el tejido nervioso, pudiendo ocasionar signos clínicos de la enfermedad en algunas aves. Por lo tanto, durante la fabricación de vacunas vivas contra la encefalomiелitis aviar es fundamental el mantener un equilibrio en el grado de adaptación de las cepas vacunales a embrión de pollo con el fin de preservar características importantes de las cepas de campo, tales como su enterotropismo, infectividad por vía oral y excreción a través de las heces.

<http://www.lah.de/Encefalomiелitis-Aviar.96.0.html?&L=6>

ENFERMEDADES CAUSADAS POR PROTOZOOS

COCCIDIOSIS AVIAR (Eimeriosis)

Definición

La coccidiosis es una enfermedad producida por parásitos que se encuentran en el tracto digestivo de los animales. Estos pueden ser de varios géneros, aunque

los que afectan a las aves son del género *Eimeria* (*E. tenella*, *E. acervulina*, principalmente).

Los coccidios invaden la pared intestinal de un animal para conseguir de éste los nutrientes que requieren para sobrevivir. En el interior del organismo, los coccidios se multiplican y son expulsados al exterior a través de las heces, infectando de nuevo a otros animales de la misma especie.

Taxonomía y morfología

La taxonomía se basa generalmente en la morfología del estadio del ooquiste esporulado. El ooquiste tiene una cubierta externa que consta de una o dos capas. En algunos casos hay una cubierta membranosa interna. En uno de los extremos del ooquiste dicha pared puede ser menos gruesa para formar un micropilo, mediante el cual se liberarán los esporozoitos.

El espacio interno del ooquiste está relleno de una sustancia en la que se presentan suspendidos los esporoquistes. En el interior de estos se encuentran los esporozoitos. A menudo puede diferenciarse un núcleo en el interior de cada esporozoito.

Otras características para diferenciar las especies es el tiempo necesario hasta la esporulación, la especificidad del hospedador, la localización en el hospedador, la morfología de las fases endógenas, sus relaciones con las células hospedadoras y el poder patógeno.

Ciclo de vida del coccidio

Los coccidios, una vez dentro del hospedador y en un número suficiente, comienzan a infestar al animal parasitado. En las aves, los coccidios están en forma de ooquistes, que son semejantes a "huevos", una vez en el interior del organismo, comienzan a multiplicarse, originando un solo ooquiste de *Eimeria* 4 esporocistos. A su vez estos esporocistos forman cada uno de ellos 2 esporozoitos, es decir, de cada ooquiste se forman 8 esporozoitos.

Para liberar los esporocistos y los esporozoites la pared protectora del ooquiste se destruye en la molleja de las aves. Los esporocistos, con la presencia de sustancias químicas que se encuentran en el T.I. de los animales como la bilis y la tripsina, pierden su pared protectora y se liberan los esporozoitos.

Luego se trasladan a las células epiteliales de las vellosidades de la pared intestinal de los animales.

Una vez los esporozoitos se introducen en las células epiteliales pasan a ser trofozoitos de primera generación. En este proceso el agente infectante adopta una morfología circular. Luego pasa a denominarse esquizonte de primera generación. En el interior de este completamente desarrollado se encuentran gran número de merozoitos de primera generación, que salen del esquizonte de primera generación y van a infectar a otras células epiteliales.

Así, el merozoito de primera generación forma el trofozoito de segunda generación. Este a su vez pasa a ser esquizonte de segunda generación, que de nuevo forma gran número de merozoitos de segunda generación, los cuales pueden invadir nuevas células epiteliales si la infestación sigue en curso. Dependiendo del coccidio puede desarrollar varias generaciones. Al menos todas las especies de coccidios de los pollos producen un mínimo de dos generaciones de esquizontes

“La edad del hospedador en el momento de la infección influye en el desenquistamiento de los ooquistes, siendo menor en los pollitos de uno o tres días, la causa podría ser la capacidad de la molleja para romper los ooquistes”

Factores de riesgo

La coccidiosis se transmite mediante la ingestión de ooquistes eliminados en las heces y que han esporulado en el suelo, la tasa de difusión depende de la densidad de la población hospedadora, del intervalo de tiempo que se mantienen las heces contaminadas y de la facilidad que los hospedadores presentan para acceder a las heces contaminadas. Estos factores de riesgo se dan en las explotaciones avícolas industriales en las que los animales viven hacinados y con fácil acceso a los ooquistes (malas condiciones de higiene) durante todo el ciclo productivo,

Patogenia

La destrucción de las células epiteliales es el principal mecanismo de patogenia que subyace en la pérdida de la productividad, desencadenando un síndrome de mala absorción, por ende pérdida de peso, descenso de la postura, alteraciones en la calidad de la carne y de los huevos.

Especies de eimeria responsables de los cuadros clínicos más graves:

E. tenella y E. necatrix: son productoras de hemorragias intestinales a partir de finales del 4 y 5 día postinfección, causan una elevada tasa de mortalidad.

E. brunetti y E. máxima: enteritis mucoide, frecuentemente con sangre, ocasionando a veces mortalidad.

E. acervulina: enteritis catarral.

Formas Clínicas y Lesiones

Coccidiosis cecal (E. tenella.):

El cuadro sobreagudo se observa en animales jóvenes ó en aquellos que no han tenido contacto previo con el parásito. El único síntoma que se manifiesta es la eliminación de heces diarreicas con sangre en forma de coágulos oscuros, a los 2-3 días se observa alta mortalidad (80-100%.)

El cuadro agudo se observan heces diarreicas sanguinolentas, los animales se muestran hipoactivos e hipotérmicos, la cresta y la barbilla tienen aspecto pálido, con mortalidad de 50-80%, (sobrevivientes muestran un notable retraso del crecimiento).

El cuadro crónico se observa en animales adultos, con un descenso en la producción, a veces se observa diarrea sanguinolenta, mortalidad del 5-10%.

En necropsia se observa tiflitis hemorrágica, en la mucosa de los ciegos se observan desde petequias a hemorragias dependiendo de la gravedad del proceso.

Coccidiosis intestinal (E. necatrix, E. brunetti, E. máxima y E. acervulina)

El cuadro agudo se desencadena en animales jóvenes. Cuando es ocasionado por E. necatrix, E. brunetti, y E. máxima, se observa una diarrea sanguinolenta que nunca llega a ser hemorrágica. Cuando es por E. acervulina se produce una diarrea mucosa de color blanco amarillento que humedece la cama y por ello los

animales muestran las plumas manchadas. La mortalidad varía dependiendo de la especie, *E. necatrix* (20%) en cambio *E. acervulina*, no produce bajas.

En el cuadro crónico los animales eliminan heces pastosas y hay disminución brusca de la producción. Las lesiones se localizan en intestino delgado y grueso, dependiendo de la especie:

E. necatrix: lesiones en yeyuno puntiformes y blanquecinas.

E. brunetti: mucosa de ileon y recto con petequias

E. máxima: mucosa del yeyuno con petequias

E. acervulina: mucosa del duodeno con lesiones puntiformes que pueden fusionarse hasta formar bandas, hay contenido de color amarillo.

Control

En la actualidad se dispone de vacunas a partir de parásito vivo, que presentan buena capacidad de inmunización, se debe tener en cuenta que estén constituidas por las 7 especies de interés económico, ya que la inmunidad es específica de la especie que desencadene el estado de protección. Algunos nombres comerciales de vacunas Coccivac lab.Sterwng, Immucox, Paracox, Livacox, todas se suministran en agua de bebida, unica dosis durante la primera semana de vida.

Loa altos niveles de vitamina A y K reducen la mortalidad y aceleran la recuperación, respectivamente, utilizar anticoccidiales en alimento, hacer una exposición moderada a los ooquistes para desarrollo de inmunidad.

Tratamiento

Nombre comercial	Compuesto activo	Dosis (ppm)	Periodo de retiro (días)
Amprolmix	Amprolio	133	3
Aviax	Ionóforo	25	5
Elancoban/coban	Ionóforo	125	3
Maxiban	Ionóforo/carbanilida	100	7

Monteban	Ionóforo	70	5
Sacox/bio.cox	ionóforo	70	5

ENTEROHEPATITIS (Histomoniasis, Cabeza negra)

Definición

Enfermedad protozoaria que afecta a los pavos, pavos reales, urogallos, codornices y con menor incidencia a pollos. Los pavos son los principales afectados, siendo susceptible a cualquier edad, pero la mortalidad mayor se observa en aves de doce (12) semanas de vida.

Etiología

Es producida por un protozoario flagelado, *Histomonas meleagridis*, que se localiza en hígado y ciego de aves hospedadoras. La transmisión se da mas a menudo en huevos fecundados del nematodo cecal *Heterakis gallinarum*, Tres especies de lombrices de tierra pueden albergar larvas de *Heterakis gallinarum*, las cuales son infectantes para pollos y pavos.

Patogenia

Produce cambios inflamatorios pronunciados, úlceras y necrosis en ciego, causando peritonitis y afectando a otros órganos, hay perforación de capilares y vasos linfáticos de la pared cecal. Las lesiones hepáticas son circulares, verde amarillentas y característicamente deprimidas, las lesiones hepáticas deben diferenciarse de tuberculosis, leucosis, tricomoniasis aviar y micosis. Además del daño tisular, permiten la colonización por varias bacterias dañinas como *Clostridium perfringens* que origina una enteritis necrótica, ó *Salmonella thyphimurium*.

Hallazgos Clínicos

Los signos son aparentes 7 a 12 días después de la infección, estos incluyen apatía, alas caídas, plumas descuidadas y heces de color de azufre. La cabeza puede estar cianótica, de ahí el nombre de “Cabeza Negra”, los pollos jóvenes sufren una enfermedad más aguda y mueren a los pocos días de aparecer los signos. Las aves más viejas pueden presentar enfermedad durante algún tiempo y emaciación pronunciada antes de la muerte.

En animales jóvenes la mortalidad puede ser hasta del 100%, en aves mayores alcanza el 25%, la gallina por lo general no muestra signos de enfermedad presentando heces hemorrágicas, y a veces cresta y barbillas cianóticas.

Control y Tratamiento

Cuando en una explotación se crían pavos y gallinas se deben utilizar sitios separados, personal diferente para cada especie ó extremar precauciones (cambio de vestimenta), realizar quicio-prevención, evitar el ingreso de gusanos de tierra, éstos son frecuentes después de las lluvias (buenos drenajes en las producciones), criar aves susceptibles en tierra arenosa, seca y suelta.

Dimetridazol 100-200 ppm en el pienso ó 100g/15 lt. En agua de bebida, durante 5 días

Furazolidona 0.01-0.02% en pienso

Dimetridazol Furazolidona 0.04% en pienso.

HEXAMITIASIS

Definición

Enteritis catarral de los pavos, perdices chukar, codornices, faisanes y pavos reales. No se ha observado infección natural en pollos. Los pichones son susceptibles a otra especie de examita. Ataca preferentemente a los pavos menores de 10 semanas, causando en ocasiones hasta un 100% de mortalidad. Cuantos más jóvenes son las aves, más elevada es la mortalidad ante un brote de esta enfermedad.

Etiología

El parásito protozoario causante, *Hexamita meleagridis* tiene forma abusada de un promedio de 8 µm por 3 µm y presenta seis flagelos anteriores y dos posteriores.

No se ha cultivado todavía en medios artificiales, aunque se ha criado en la cavidad alantónica de embriones de pollo y pavo en desarrollo

Transmisión

El agente causante de esta enfermedad es un protozoo que se transmite a través de las heces de aves infectadas. Cualquier material contaminado por heces de aves enfermas o portadoras contiene por lo tanto este protozoo, las aves sufren un brote luego de ingerir este tipo de material.

La enfermedad suele presentarse en los nacimientos provenientes de plantales viejos, a menudo cuando dichos reproductores ya se han enviado a consumo. El organismo desarrolla su capacidad de provocar exposiciones más severas con cada lote de aves que entra en las instalaciones.

Síntomas

En los primeros estados, las aves están nerviosas y pían constantemente. Aunque parecería que comen más, se presenta una pérdida de peso.

Las aves presentan escalofríos, se amontonan y suelen caminar a zancadas. Es característico que las aves enfermen y mueran de repente, y la mortandad llega al pico en un lapso de 3 a 7 días luego de la aparición de síntomas. Las heces suelen ser blancas, tostadas o espumosas.

Lesiones

En aquellas aves que mueren al poco tiempo de aparecer los síntomas, se ve enteritis catarral. Las aves se deshidratan rápidamente y el músculo del pecho suele estar seco y de color rojo oscuro. El contenido intestinal varía de la mucosidad espesa a un material acuoso, fino o espumoso. Es necesario llevar a cabo pruebas en el laboratorio para llegar a un diagnóstico seguro de la enfermedad.

Prevención y Tratamiento

Destinar unidades separadas para reproductores y pavipollos, así como también distintos cuidadores. Usar suelos elevados, con plataformas de alambre para comederos y bebederos. No juntar aves de distintas edades y especies (faisanes y codornices pueden ser portadores).

Dimetridazol, furazolidona, clortetraciclina, oxitetraciclina y butinorato han sido usadas exitosamente en la prevención y tratamiento de la hexamitiasis.

TRICOMONIASIS AVIAR (Cancro o Llagas)

Definición

Enfermedad de las aves domesticas, pichones, palomas y halcones, caracterizada en la mayoría de los casos por acumulaciones caseosas en la garganta, generalmente acompañadas de perdida de peso. Se ha denominado "ulceras", "moquillo" y en los halcones "frounce".

Etiología

El microorganismo causante es un protozoario flagelado, *Trichomonas gallinae* que habita en los senos paranasales, cavidad oral, garganta, esófago y otros órganos de las aves. Algunas cepas de *T. gallinae* son altamente letales en pichones y palomas, los halcones pueden contraer la enfermedad después de consumir aves infectadas y normalmente muestran lesiones hepáticas con o sin afección de la garganta. El agua contaminada es probablemente la fuente mas importante de infección para pollos y pavos

Hallazgos Clínicos

El curso de la enfermedad es rápido, las primeras lesiones aparecen como áreas pequeñas, amarillentas en la mucosa oral. Estas lesiones crecen rápidamente y se unen para formar masa que a menudo bloquea completamente el pasaje esofágico y puede impedir que el ave cierre el pico, puede acumularse mucho liquido en la cavidad oral. Hay una descarga ocular acuosa y en las etapas más avanzadas la producción de exudados alrededor de los ojos puede finalmente causar ceguera. Hay pérdida de peso, el ave se debilita y se vuelve apática. La

muerte ocurre en 8 a 10 días. En las infecciones crónicas, el ave esta aparentemente sana, aunque normalmente se pueden demostrar tricomonas en el raspado de las membranas mucosas de la garganta.

Lesiones

El ave puede estar llena de focos necróticos caseosos, la cavidad oral y esófago son una masa de material necrótico que puede extenderse al cráneo y algunas veces a través de los tejidos circundantes del cuello afectando la piel. En esófago y buche las lesiones pueden tomar la forma de áreas amarillas redondeadas elevadas con una espuela caseosa crónica, central, “botón amarillo”. El buche puede estar cubierto de una membrana diftérica amarillenta que puede extenderse al estomago glandular, no hay afección en la molleja o intestino. Las lesiones de los órganos internos son mas frecuentes en hígado; pueden variar desde unas pocas áreas pequeñas e necrosis amarilla a un reemplazo casi completo del tejido hepático por desechos necróticos caseosos. Las adherencias y afección de los órganos internos parece ser extensiones por contacto de las lesiones hepáticas grandes.

Tratamiento y Prevención

Se realizará una prueba de sangre para identificar el parásito específico, y luego prescribirá medicina antiparasitaria. Esta se administra oralmente, bien sea con alimento o agua.

La tricomoniasis a menudo se evita almacenando el alimento del ave con cuidado e higiénicamente. Las aves deben separarse inmediatamente de los pichones luego de evidenciar la enfermedad

Metronidazol 60 mg/Kg de peso corporal (vía oral)

Dimetridazol 50 mg/Kg de peso corporal (vía oral)

LEUCOCITOOZONOSIS

Enfermedad causada por protozoarios transmitidos por artrópodos que se asemejan al Plasmodium excepto que carecen de merozoítos en las células sanguíneas circulantes y no presentan gránulos de pigmento, estos se encuentran en diversos órganos. Los gamontos que agrandan y deforman las células del huésped hasta que ya no pueda reconocerse, se observa en eritrocitos y leucocitos.

La especie mas importante es la *L. smithi* afectando a pavos y *L. andrewsi* y *L. caulleryi* en pollos. Las aves salvajes son reservorios y son responsables de iniciar la infeccion en bandadas domesticas

La forma aguda se observa en aves jóvenes en temporada de moscas y aves viejas en cualquier temporada con parasitemia normal baja. La mortalidad depende de las condiciones en las que se de la enfermedad, llegando hasta el 100%

Hallazgos Clínicos y Lesiones

Presentan decaimiento, anemia, leucocitosis, taquipnes, diarrea con heces verdes, signos referidos al SNC; una semana después de la infeccion presentan notable bajo consumo de alimento e inicia la parasitemia. A los 7 o 10 días mueren o pueden recobrase con secuelas notables

La muerte es el resultado de la obstrucción de los vasos sanguíneos por merozoitos grandes, o dificultad respiratoria subsiguientes al bloqueo de capilares pulmonares por numerosos parásitos y anemia causada por hemorraias. Se observa también esplenomegalia y hepatomegalia.

Tratamiento y Control

El tratamiento es normalmente eficaz con una combinación de pirimetamina (1ppm) y sulfadimetoxina (10ppm) en la racion *L.caulleryi*

Clopidol (1.25 – 2.5 ppm) *L. smithi*

ESPIROQUETOSIS AVIAR

Definición

Enfermedad aguda, febril, septicémica de origen bacteriano, en una gran variedad de aves. Causada por una espiroqueta activante móvil que habita en sangre *Borrelia anserina*

El vector mundial de la enfermedad es *Argas persicus* o garrapata aviar

Transmisión

La garrapata infecta durante larva, pupa o adulto. En la ingestión de heces manchadas con bilis o canibalismo, se puede causar la infección. El periodo de incubación es de 4 a 7 días

Hallazgos Clínicos

Se dan dependiendo de la virulencia, incluyendo apatía, depresión, somnolencia, escalofríos, aumento de sed; siendo más severos en aves pequeñas, presentando diarrea amarillo verdosa, el curso de la enfermedad es de 1 a 2 semanas, reportando mortalidad superior al 90%

Lesiones

Bazo grande con hemorragias petequiales o equimóticas, hígado tumefacto con áreas focales de necrosis, riñones agrandados y pálidos, enteritis catarral verde.

Tratamiento y Control

El control debe dirigirse principalmente al vector biológico "garrapata *Argas*" y la higiene de la producción.

Los agentes quimioterapéuticos eficaces son: derivados de penicilinas (usados más ampliamente), siendo eficaces la estreptomycinina y tetraciclina

Formalina (al 0.2%) para inactivar las espiroquetas

ALGUNAS ENFERMEDADES INCLUIDAS EN LA (OIE)

CLAMIDIOSIS AVIAR

La clamidiosis aviar (CA) está producida por la bacteria *Chlamidophila psittaci*. En las aves la enfermedad se denominó inicialmente psitacosis, pero con posterioridad se introdujo el término ornitosis para diferenciar la enfermedad en aves domésticas y silvestres de la enfermedad en las aves psitácidas. Actualmente se considera que ambos síndromes son uno solo (5). Su distinción inicial estaba basada en la suposición de que la ornitosis en humanos es una enfermedad más suave que la psitacosis. Sin embargo, debe advertirse que la enfermedad contraída por el hombre a partir de pavos y patos es a menudo tan grave como la contraída a partir de las aves psitácidas.

En aves, *Chlamidophila psittaci* produce una enfermedad sistémica y ocasionalmente mortal. Los síntomas clínicos son muy variables por lo que respecta a la gravedad y dependen de la especie y de la edad del ave así como de la cepa de clamidia. La CA puede producir letargo, hipertermia, excreciones anormales, descargas nasales y oculares, y una reducción en la producción de huevos. La mortalidad es muy variable. En aves domésticas los síntomas clínicos más frecuentes son anorexia y pérdida de peso, diarrea, deposiciones amarillentas, sinusitis, conjuntivitis, biliverdinuria, descarga nasal, estornudo, lagrimeo y dificultad respiratoria (27). Muchas aves, especialmente las aves psitácidas viejas, pueden carecer de síntomas clínicos; sin embargo, liberan el agente durante períodos largos. La necropsia de aves afectadas revela a menudo un aumento del bazo y del hígado, inflamación fibrinosa de los sacos aéreos, pericarditis y peritonitis (5, 40). Las lesiones histológicas no son patognomónicas a menos que vayan acompañadas de la identificación de clamidias.

La gravedad de la enfermedad en los pavos depende de la cepa de clamidia y de la presencia de otras enfermedades. Las cepas del serotipo D suelen ocasionar los cuadros más graves y son particularmente peligrosas para trabajadores de granjas. Cuando se alcanza el pico de la enfermedad en una población infectada con cepas del serotipo D, el 50–80% de las aves puede mostrar síntomas clínicos, y la mortalidad alcanza con frecuencia el 30–50% (5). En pavos de engorde, se han descrito mortalidades de hasta el 80% (41). Las cepas de otros serotipos, como B y E, suelen dar lugar a unas tasas de morbilidad del 5–20% y de mortalidad por debajo del 5%.

En los pavos, los síntomas clínicos y las lesiones observadas en las necropsias son muy variables. Los pavos infectados con cepas muy virulentas muestran caquexia, anorexia y temperaturas elevadas. Las deposiciones son gelatinosas y de color amarillo grisáceo. En gallinas ponedoras, la producción de huevos desciende rápidamente y permanece baja hasta la recuperación total. En pavos de engorde, se ha descrito un síndrome respiratorio que presenta las características de una rinitis (41). Los síntomas son conjuntivitis, inflamación de los senos infraorbitales y estornudo. En pavos infectados con cepas de baja virulencia los síntomas de la enfermedad son más suaves y generalmente incluyen anorexia y, en algunos casos, deposiciones sueltas y grisáceas. En pavos, también se ha asociado la infección por *Chlamydia psittaci* con problemas en las patas (artritis). En la necropsia de aves infectadas con cepas virulentas, las lesiones más características son la inflamación del bazo y del hígado, y la presencia de un exudado entre fibrinoso y fibrinopurulento en las superficies respiratorias,

peritoneales y pericárdicas. Las lesiones también pueden incluir sinusitis, traqueitis, inflamación de los sacos aéreos, neumonía y enteritis. En general, la neumonía sólo se observa en aves que mueren por la infección. En aves infectadas con cepas de virulencia baja las lesiones son similares, pero no son tan severas o extendidas.

En muchas partes del mundo, la clamidiosis en los patos es importante económicamente y como problema sanitario público. Normalmente la enfermedad es grave, con una morbilidad del 80% y una mortalidad que varía de 0 al 40% en función de la edad de los patos y la presencia de infecciones concurrentes (5). Los síntomas clínicos incluyen temblores de cabeza, andar inestable, conjuntivitis, descargas nasales serosas o purulentas, depresión y muerte. En la necropsia es corriente apreciar el aumento del bazo, necrosis focales en el hígado, poliserositis fibrinosa y neumonía. En los últimos años se ha reconocido una forma leve de la enfermedad con signos mínimos o ausentes, en la que la muerte se asocia con el estrés del manejo o con otras enfermedades.

Se sabe que se producen infecciones en humanos debidas al manejo o sacrificio de aves tanto con infección clínica como con infección inaparente.

Se ha descrito en varias partes del mundo la clamidiosis en el avestruz y en el ñandú. Los únicos aislamientos serotipados fueron de serotipo E, que también se ha aislado de palomas, patos y humanos. Se supone que el reservorio son las palomas u otras aves silvestres. Los avestruces y el ñandú se crían normalmente en exteriores donde están expuestos a estas aves. La clamidiosis se presenta por lo general en aves jóvenes, pero puede presentarse en adultas. Suele ser muy aguda y con alta mortalidad; sin embargo, los estudios no dan el porcentaje de aves infectadas que manifiestan signos clínicos. Debido a la presencia tan extendida de la enfermedad en estas especies de aves (avestruz, ñandú, emu, chirique, etc.) y la transmisión potencial al hombre, se deben manejar con cuidado las aves clínicamente enfermas.

La familia Chlamydiaceae se ha reclasificado recientemente en dos géneros y nueve especies según el análisis de secuencias de sus genes de rARN 16S y 23S (15). Los dos nuevos géneros, *Chlamydia* y *Chlamydophila*, se corresponden con las antiguas especies *Chlamydia trachomatis* y *C. psittaci*. El género *Chlamydia* agrupa *C. trachomatis* (humanos), *C. suis* (cerdos) y *C. muridarum* (ratón, hamster). El género *Chlamydophila* agrupa *C. psittaci* (aves), *C. felis* (gatos), *C. abortus* (ovejas, cabras, ganado bovino), *C. caviae* (cobayas), y las antiguas especies *C. pecorum* (ovejas, ganado bovino) y *C. pneumoniae* (humanos).

Los dos géneros y nueve especies tienen entidad tanto a nivel molecular como por su espectro de hospedadores y enfermedades clínicas. Las especies muestran un alto grado de correlación con el tipo de hospedador, el síndrome producido y la virulencia, favoreciendo la comprensión de la epidemiología de las diversas especies y serotipos que afectan al ganado y a las aves. Los términos "clamidiosis" y "clamidias" se emplean de forma genérica para designar miembros de uno u otro género. Sin embargo, los nuevos nombres científicos se utilizan para referirse a una especie de clamidia determinada.

Todas las cepas aviares pertenecen a la especie *Chlamydophila psittaci*. Esta especie incluye seis serotipos aviares conocidos y dos serotipos en mamíferos, el M56 de la rata almizclera y el WC del ganado bovino (15). Tanto M56 como WC se aislaron de un brote único. Los seis serotipos aviares se designan con letras de la A a la F, y cada uno muestra especificidad de hospedador. Los hospedadores asociados a cada serotipo son: A, aves psitácidas; B, palomas; C, patos y ocas; D, pavos; E, palomas, avestruces y ñandú; y F, que corresponde a un aislamiento único de un ave psitácida. Se desconoce cuántas de estas aves y mamíferos son hospedadores naturales del correspondiente serotipo.

Las cepas aviares de clamidias pueden infectar al hombre y se deben manejar con cuidado bajo condiciones de biocontención (12, 13). La mayoría de las infecciones ocurren por inhalación de aerosoles infecciosos. El examen post-mortem de aves infectadas y la manipulación de los cultivos debe realizarse en cabinas de flujo laminar o con equipo protector adecuado. La infección en el hombre puede provenir de exposiciones transitorias. El período de incubación suele ser de 5–14 días, aunque se conocen períodos de incubación más largos. En humanos, las infecciones varían desde una forma inaparente a una enfermedad sistémica grave con neumonía

intersticial y encefalitis. En pacientes con un tratamiento adecuado, la enfermedad es raramente mortal; por tanto, son importantes el conocimiento del riesgo y un diagnóstico temprano. Típicamente, la infección en humanos cursa con dolor de cabeza, escalofríos, malestar y mialgia, con o sin signos de implicación pulmonar. La manifestación pulmonar es corriente; no obstante, los resultados por auscultación pueden parecer normales o minusvalorar la extensión de la infección. El diagnóstico puede resultar difícil y por lo general se realiza mediante la prueba de fijación del complemento (FC) sobre sueros pareados para detectar la presencia de anticuerpos anticlamidia. Salvo contraindicaciones, la tetraciclina, la deoxiciclina y la azitromicina son los compuestos más indicados en el caso de infección humana. La duración del tratamiento dependerá del antibiótico, pero con tetraciclina debe continuar por lo menos durante 14 días.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

El método preferido para la identificación de la CA es el aislamiento e identificación del organismo. A menudo se usan otras técnicas debido al tiempo requerido, la necesidad de muestras de alta calidad y el peligro que supone para el personal de laboratorio. Éstas incluyen la tinción histoquímica de frotis de exudados y heces, los frotis por impresión de tejidos, el marcaje inmunohistoquímico de preparaciones citológicas e histológicas, el ensayo de inmunocaptura por captura de antígeno (ELISA), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la PCR-RFLP (análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción).

a) Recogida y tratamiento de las muestras

Las muestras a recoger dependen de los síntomas de la enfermedad. Deben tomarse asépticamente. Las bacterias contaminantes pueden interferir con el aislamiento de las clamidias. En los casos agudos, las muestras deben incluir exudados inflamatorios o fibrinosos del interior y la periferia de los órganos que muestren lesiones, exudados oculares y nasales, sangre completa, y muestras de tejido de riñón, pulmón, pericardio, bazo e hígado. En los casos con diarrea, debe cultivarse el contenido del colon o las heces. En aves vivas, las mejores muestras son los frotis faríngeos y nasales (2). También deben tomarse muestras de heces, frotis de la cloaca, raspado conjuntival y exudado peritoneal.

Es importante un manejo adecuado de las muestras clínicas para evitar la pérdida de infectividad de las clamidias durante el envío y el almacenamiento. Se ha desarrollado un medio especial para rickettsias que resulta satisfactorio para el transporte de muestras de campo de clamidias y que está compuesto por sacarosa/fosfato/glutamato (SPG). El medio, tal como se recomienda para clamidias (36), consiste en tampón SPG: sacarosa (74.6 g/litro); KH_2PO_4 (0.512 g/litro); K_2HPO_4 (1.237 g/litro); y ácido L-glutámico (0.721 g/litro), que se puede esterilizar en autoclave o por filtración. A esto se añade suero fetal bovino (10%), vancomicina y estreptomocina (200–500 $\mu\text{g/ml}$), nistatina y gentamicina (50 $\mu\text{g/ml}$). La adición de antibióticos reduce el efecto de la contaminación, incluso aunque las muestras se envíen a temperatura ambiente. Este medio también puede usarse como diluyente en el laboratorio y para congelar las clamidias.

Las muestras contaminadas deben pretratarse antes de emplearlas para inocular animales o cultivos celulares. Hay tres métodos básicos: tratamiento con antibióticos (7, 8), tratamiento con antibióticos junto a centrifugación a baja velocidad (4, 5) y tratamiento con antibióticos y filtración (4, 7, 8, 11). Se pueden utilizar varios antibióticos que no inhiben a las clamidias. Las muestras se homogenizan en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7.2, que contenga como máximo lo siguiente: estreptomocina (1 mg/ml), vancomicina (1mg/ml) y kanamicina (1 mg/ml). También se puede utilizar gentamicina (200 $\mu\text{g/ml}$). Se puede añadir anfotericina B (50 $\mu\text{g/ml}$) para controlar el crecimiento de hongos y levaduras. A menudo se utilizan otras soluciones de antibióticos. Se debe evitar el uso de penicilina, tetraciclina y cloranfenicol porque inhiben el crecimiento de las clamidias.

Cuando la contaminación es ligera, se deben homogenizar las muestras en una solución de antibiótico antes de su inoculación en embriones de pollo o cultivos de tejidos. Las muestras se suelen dejar reposar en la solución de antibióticos durante 24 horas a 5°C antes de la inoculación. Las muestras muy contaminadas, como las muestras fecales, deben homogenizarse con los antibióticos y centrifugarse

después a 500 x g durante 20 minutos. La capa superficial y el sedimento se eliminan. Se recoge el sobrenadante y se re-centrifuga. El sobrenadante final se utiliza para la inoculación. Si la contaminación persiste, las muestras se deben pasar por un filtro con tamaño de poro medio de 450–800 μm .

b) Aislamiento en cultivo celular

El cultivo celular es el método más conveniente para el aislamiento de *C. psittaci*. Las líneas celulares resultan satisfactorias, y las más usadas son las células de riñón de mono verde (BGM y Vero), McCoy,

HeLa, y L (39). Las células se cultivan para conseguir crecimiento en monocapa utilizando medios estándar de cultivo que contengan 5–10% de suero fetal bovino y antibióticos que no inhiban las clamidias (como se ha descrito anteriormente).

Cuando se selecciona un sistema de cultivo celular es importante recordar que:

i) Las clamidias se pueden identificar mediante inmunofluorescencia directa o indirecta o por otras técnicas de tinción adecuada.

ii) El inóculo se suele centrifugar sobre la monocapa para aumentar su infectividad.

iii) La muestra puede requerir un pase a los 5–6 días para aumentar la sensibilidad del aislamiento.

iv) Se debe examinar la muestra dos o tres veces en cada pase; y

v) Las clamidias pueden ser infecciosas para el hombre.

Estos condicionamientos pueden cumplirse con los viales pequeños de fondo plano y con cierre (3.7ml, 15x45mm) o las botellas que contienen cubreobjetos de 12 mm de diámetro (7, 8, 11). Se

inoculan varios viales con cada muestra, normalmente cuatro o seis, para permitir la fijación y tinción a distintos tiempos y para hacer pases nuevos a los 6 días de la inoculación en caso de muestras que sean

aparentemente negativas. Cuando se prueban muchas muestras, se pueden utilizar placas con 96 pocillos que tienen la ventaja de ahorrar trabajo. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la contaminación cruzada entre muestras puede ser un problema.

Las clamidias se pueden aislar sobre células que se están dividiendo normalmente, pero es preferible utilizar células que no se dividen porque éstas pueden suministrar más nutrientes para el crecimiento de las clamidias. Además, las células quiescentes se pueden observar durante períodos más largos. La división de la célula hospedadora se puede inhibir por radiación o, más corrientemente, por agentes citotóxicos. Éstos últimos incluyen la 5–yodo–2–deoxiuridina, la citocalasina B, la cicloheximida y el hidrocloreto de emetina

(32). La cicloheximida es la más frecuentemente utilizada y se puede añadir al medio a 0,5–2,0 µg/ml al mismo tiempo que la inoculación de la monocapa. La emetina se elimina tras el tratamiento y se sustituye

por medio (4, 5, 7, 8). Primero se trata la monocapa con emetina (0.5 µg/ml) durante 5 minutos, después de lo cual se elimina y se sustituye por medio de cultivo; la monocapa queda entonces en condiciones de

utilización. El crecimiento de la mayoría de las cepas de clamidias se estimula por el tratamiento de la monocapa con uno de estos compuestos, y no tiene efecto sobre el crecimiento de otras cepas.

La unión de las clamidias a las células se incrementa cuando el inóculo se centrifuga sobre la monocapa a 500–1.500 x g durante 30–90 minutos a 37°C. Después se elimina el volumen de inóculo y se reemplaza con medio de cultivo de tejidos que contenga un inhibidor de la división celular, incubándose a 37–39°C.

Los cultivos se examinan para detectar clamidias a intervalos regulares utilizando un método de tinción apropiado. Normalmente se hace el día 2 o 3, así como el día 5 o 6. Los cultivos que parecen negativos al sexto día se recogen y se vuelven inocular en medio nuevo. Cuando se hacen pases sucesivos de clamidias, se deben pasar tanto las células como el medio de cultivo, y se debe evitar la congelación y descongelación para romper las células ya que esto puede destruir las clamidias.

Antes de teñir los cultivos, primero se elimina el medio, se lavan con PBS y se fijan con acetona durante 2– 10 minutos. El tiempo de fijación del cultivo depende del recipiente de cultivo utilizado. Como la acetona ataca a la mayoría de los plásticos, puede ser preferible utilizar una mezcla de 50% de acetona y 50% de alcohol metílico. Se pueden emplear varios métodos de tinción para demostrar las inclusiones de las clamidias. El método preferido es la inmunofluorescencia directa (4, 7, 28). Se aplica a las células

infectadas un antisuero contra clamidias conjugado con fluoresceína y se incuba 30 minutos en una cámara húmeda a 37°C. A continuación se lavan los cubres tres veces con PBS, se secan al aire, se montan y se examinan. Las inclusiones de clamidias emiten fluorescencia de color verde. Existen preparaciones comerciales de conjugados muy específicos que emplean anticuerpos monoclonales (MAbs). También se pueden preparar sueros policlonales, pero es importante que sean antisueros específicos y de título alto.

Los antisueros policlonales se pueden obtener en conejos, cobayas, ovejas o cabras. Las ovejas y las cabras son una fuente excelente dado el volumen y los títulos altos que se pueden obtener fácilmente después de la infección. Los conjugados se preparan utilizando técnicas estándar (4, 5, 7).

Las inclusiones de clamidias también se pueden demostrar por técnicas de inmunofluorescencia indirecta y de inmunoperoxidasa (4, 6, 28). Se puede hacer tinción directa mediante las técnicas de Gimenez, de Giemsa, de Ziehl–Neelsen, o de Machiavello. A diferencia de la inmunofluorescencia, estas técnicas tienen la ventaja de que permiten el uso de microscopios estándar de fondo claro.

c) Aislamiento en huevos

Para el aislamiento primario de clamidias todavía se utilizan los embriones de pollo. El procedimiento estándar consiste en inocular hasta 0,5 ml de inóculo en el saco vitelino de un embrión de 6–7 días libre de patógenos específicos (4, 5). Los huevos se incuban a 39°C mejor que a 37°C, ya que la multiplicación de las clamidias es mucho mejor a temperaturas más altas. Generalmente la multiplicación del microorganismo causa la muerte del embrión a los 3–10 días. Si no ocurriera la muerte, se hacen dos pases adicionales antes de dar como negativa cualquier muestra. Las infecciones por clamidias producen una congestión vascular típica de las membranas del saco vitelino. Los sacos se recogen y se homogenizan para hacer una suspensión al 20% en tampón SPG, y se pueden congelar para mantener la cepa o se inoculan en huevos o en cultivos celulares.

El microorganismo puede identificarse preparando un antígeno de un saco vitelino infectado y examinándolo por tinción directa de los frotis mediante colorantes

apropiados o utilizando el antígeno en una prueba serológica. Los cultivos celulares en monocapa se pueden inocular con la suspensión del saco vitelino y observar la presencia de inclusiones de clamidias por inmunofluorescencia directa 48–72 horas más tarde. Las inclusiones típicas son cuerpos intracitoplásmicos, redondos, o con forma de sombrero. En el caso de algunas cepas virulentas, las inclusiones se rompen con facilidad y el antígeno de las clamidias se dispersa por el citoplasma.

d) Diferenciación entre especies/cepas

Como se indicó anteriormente, todos los aislados aviares son del grupo de *Chlamidophila psittaci* (15). Las cepas aviares se pueden distinguir de otras clamidias mediante PCR–RFLP del gen de la MOMP o del operón rADN 16S–23S (14). Se puede hacer una tipificación provisional de *C. psittaci* sabiendo el origen del aislamiento y la utilización de MAb's específicos de cada serotipo.

Las cepas aviares de *C. psittaci* pertenecen a varios serotipos específicos (1, 3, 6). Los síndromes causados por las distintas cepas son muy específicos y el espectro de hospedadores naturales de una cepa particular puede ser también bastante específico. Existen por lo menos seis serotipos que infectan aves. Se designan con letras de la A a la F. Los hospedadores de los que suelen aislar son: serotipo A, aves psitácidas; serotipo B, palomas; serotipo C, patos; serotipo D, pavos; E, palomas, avestruces y ñandú; y serotipo F, que corresponde a un aislado de un ave psitácida.

Se han desarrollado MAb's específicos para cada serovariedad o serotipo y se están utilizando en un número limitado de laboratorios para serotipar nuevos aislamientos (1, 3). También las técnicas PCR–RFLP permiten diferenciar las cepas (3, 35, 38) aunque su utilización es principalmente experimental, y sólo un número limitado de laboratorios utiliza la técnica PCR–RFLP o MAb's específicos de serotipo. El serotipado es relativamente fácil de realizar y los laboratorios que lo necesiten pueden poner en marcha las técnicas fácilmente.

e) Tinción histoquímica

Las tinciones de Giemsa, de Giménez, de Ziehl–Neelsen y de Machiavello son las más utilizadas para detectar clamidias en frotis de hígado y bazo. En varios laboratorios se utiliza la siguiente técnica modificada de Gimenez (4).

• Técnica modificada de Gimenez o tinción de Pierce—van der Kamp

• Reactivos:

Solución 1: Se añaden H₂O destilada (450.0 ml) y fenol (5,0 ml) a fucsina básica (2,5 g) y etanol al 95% (50 ml). Se incuba 48 horas a 37°C. Se filtra y se guarda en la oscuridad a temperatura ambiente.

Solución 2: Na₂HPO₄ (11.65 g); NA₂HPO₄.H₂O (2.47 g); H₂O destilada, pH 7,5 (hasta un litro).

Solución 3: Solución 1 (20,0 ml) y Solución 2 (25,0 ml). Dejar reposar 10 minutos, filtrar y usar.

Solución 4: Ácido cítrico al 0,5%.

Solución 5: Verde rápido (Fast green) (0,2 g); H₂O destilada (100.0 ml); y ácido acético glacial (0,2 ml).

Solución 6: Solución 5 (20,0 ml) y H₂O destilada (50,0 ml).

• El procedimiento para los frotis es el siguiente:

- i) Fijar en metanol durante 5 minutos.
- ii) Teñir con Solución 3 durante 10 minutos y lavar con agua del grifo.
- iii) Teñir con la solución de contraste 6 durante 2 minutos.
- iv) Lavar con agua del grifo y secar al aire.

• El procedimiento para cortes en parafina es el siguiente:

- i) Eliminar la parafina e hidratar con H₂O destilada.
- ii) Teñir con Solución 3 durante 10 minutos y lavar con agua del grifo.
- iii) Sumergir en la Solución 4 hasta que el corte no suelte más color rojo. Lavar con agua del grifo.
- iv) Teñir con la solución de contraste 6 mediante 20 inmersiones.
- v) Sumergir la preparación en dos cambios de alcohol al 95%, con cinco inmersiones en cada caso.

Deshidratar, clarificar y montar.

Las clamidias aparecen rojas sobre un fondo verde.

f) Tinción inmunohistoquímica

Se puede utilizar una tinción inmunohistoquímica para detectar clamidias en preparaciones citológicas o histológicas. Esta técnica es más sensible que la tinción histoquímica, pero requiere cierta experiencia ya que la existencia de reacciones cruzadas con algunas bacterias y hongos requiere considerar la morfología.

Los procedimientos de tinción inmunohistoquímica más usuales se pueden adaptar para obtener resultados satisfactorios. Es muy importante la selección del anticuerpo primario. Se han utilizado tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Debido a que el formol afecta a los antígenos de las clamidias, es recomendable que los anticuerpos policlonales se obtengan contra clamidias purificadas e inactivadas con formol. La cepa de clamidia utilizada no es importante, pues los anticuerpos reaccionan principalmente con los antígenos de grupo. También deben seleccionarse MAbs que reaccionen con clamidias fijadas con formol, Se puede utilizar un panel de MAbs específicos de grupo.

g) Enzimoimmunoensayos

El método ELISA es una técnica relativamente nueva que ha sido ampliamente promocionada en forma de kits comerciales para su utilización en el diagnóstico de la clamidiosis humana. Estos kits detectan el antígeno del lipopolisacárido (LPS) (antígeno de grupo) y detectan todas las especies de clamidias. Se han probado varios de estos kits para detectar clamidias en aves (42), pero ninguno ha sido autorizado para la detección de *C. psittaci*. Un problema con algunas de estas pruebas es que el LPS de las clamidias comparte algunos epítomos con otras bacterias Gram negativas, y estos epítomos pueden originar reacciones cruzadas, originando un número elevado de resultados positivos falsos. En algunos kits desarrollados más recientemente, este problema se ha reducido o eliminado

mediante una selección cuidadosa de los MAbs utilizados. Tales preparaciones, sin embargo, carecen aún de sensibilidad porque se requieren centenares de microorganismos para dar una reacción positiva. La opinión de los técnicos es que se puede realizar un diagnóstico de la CA cuando se obtiene un resultado fuertemente positivo mediante una reacción ELISA en aves con signos de psitacosis. Debido al número de falsos positivos, un resultado positivo en un ave individual sin signos de enfermedad no se considera relevante e indica la necesidad de más pruebas utilizando métodos diferentes.

h) Reacción en cadena de la polimerasa

Se han descrito técnicas de PCR para la detección de clamidias en animales. Las pruebas actuales de PCR para la detección de *C. psittaci* se centran en los genes de la MOMP o del rARN 16S–23S (16, 22, 26, 37).

La sensibilidad y la especificidad dependen de la muestra y de la prueba de PCR. La sensibilidad aumenta amplificando un fragmento de ADN relativamente corto, utilizando un procedimiento mixto o las nuevas técnicas de PCR de ciclo rápido en tiempo real. El procedimiento mixto incrementa el riesgo de contaminación. La PCR en tiempo real requiere una sonda marcada y un equipo especial que aumenta los costes. El centrarse sobre el gen 16S–23S también eleva la sensibilidad ya que normalmente en el microorganismo están presentes múltiples copias; sin embargo, las reacciones cruzadas con otras bacterias pueden ser un problema. La secuenciación del producto permitirá su comparación con las secuencias de

aislados de clamidias aviares de referencia y se puede utilizar la secuencia en análisis filogenéticos con fines taxonómicos y epidemiológicos. La preparación de muestras de ADN ha mejorado con la disponibilidad de kits de extracción comercializados que funcionan con la mayoría de las muestras clínicas.

2. Técnicas serológicas

a) Prueba de la fijación directa de complemento modificada para Chlamydia

El método que se describe es una técnica directa de FC modificada para detectar anticuerpos, muy utilizada. Los reactivos son relativamente fáciles de preparar y estandarizar. Existen otras pruebas de FC, cada una con sus ventajas. La prueba modificada de FC directa se realiza en placas con 96 pocillos de fondo redondo. Las incubaciones se hacen normalmente dejando la placa flotar sobre un baño de agua a 37°C. El antígeno de clamidia se puede preparar a partir de saco vitelino infectado o de cultivos celulares.

La prueba modificada de FC directa difiere de la prueba de FC directa en que a la dilución de complemento se añade suero normal no calentado de pollo sin anticuerpo contra las clamidias. El suero normal incrementa la sensibilidad de la FC, de modo que puede usarse para probar sueros de especies aviares cuyos anticuerpos normalmente no fijan complemento de cobaya.

• Procedimiento de la prueba

i) Dilución de los sueros

La figura 1 indica un esquema para realizar la prueba en placas con 96 pocillos de fondo redondo.

Antes de usarse, todos los sueros deben inactivarse por calor a 60°C durante 30 minutos. Los sueros se diluyen en solución salina tamponada con Veronal (barbiturato) (VBS).

1. Las diluciones se hacen en la placa de pocillos múltiples añadiendo 100 µl de VBS a cada pocillo de las filas A y E y luego 25 µl de suero problema sin diluir, de suero positivo (control positivo) o de suero negativo (control negativo) a cada uno de tres pocillos (ver figura 1). Esto origina una dilución inicial al 1/5. A continuación, se añaden 25 µl de VBS a cada pocillo de las filas B a D y de las filas F a H.

Utilizando una micropipeta de 25 µl se hacen diluciones dobles de la fila A a la D, y de la fila E a la H.

De las filas iniciales y finales se eliminan los volúmenes apropiados para que queden 25 µl por pocillo.

Las pipetas de dilución se lavan dos veces con H₂O destilada y una con VBS entre suero y suero.

Dilución del suero

A cada pocillo de las columnas 1, 4, 7, y 10, se añaden 25 µl de antígeno de clamidia. En las columnas 2, 5, 8, y 11, se añaden 25 µl de VBS (pocillos de control del poder anti complementario del suero), y en las columnas 3, 6, 9, y 12, se añaden 25 µl de antígeno negativo (saco vitelino o cultivo celular normales preparados de la misma manera que el antígeno de clamidia). Los antígenos de clamidia se guardan sin diluir a 4°C y se diluyen a la concentración apropiada con VBS antes de su utilización.

iii) Adición de complemento

El complemento (C') se guarda a -70°C y debe descongelarse y diluirse antes de la adición de antígeno. Antes de diluir el C', se añade suero fresco de pollo para que quede a una concentración del 5% en el complemento. Las diluciones de complemento se hacen como en pruebas previas o según la titulación del mismo. Debe dejarse que el C' repose 15 minutos en un baño de hielo para estabilizarse. El C' diluido debe guardarse a 4°C después de la estabilización y debe usarse en un período de 2 horas. A cada pocillo se añaden 50 µl de C' diluido inmediatamente después de la adición de los antígenos. Las placas se incuban sin tapar en un baño a 37°C durante 2 horas.

iv) Adición de eritrocitos de oveja

Se mezcla una suspensión estandarizada de eritrocitos (SRBCs) de oveja con el mismo volumen de VBS. A esto se añade otro volumen igual de hemolisina diluida en VBS. La dilución final se incuba en un baño a 37°C durante 15 minutos para sensibilizar los SRBCs. A cada pocillo se añaden 50 µl de SRBCs sensibilizados. Las placas se incuban luego 1 hora en un baño a 37°C. Las placas se pueden centrifugar a 400 x g durante 5 minutos antes de la lectura o pueden dejarse refrigeradas toda la noche a 4°C antes de la lectura.

v) Interpretación de los resultados

Los pocillos se suelen valorar 1+, 2+, 3+, o 4+ dependiendo de si la reducción de hemólisis es respectivamente del 25, 50, 75 o 100%. Una reacción positiva es 2+ o superior, lo que equivale a un 50% o menos de lisis de los SRBCs. Esto indica que el C' fue fijado por el anticuerpo antes de añadir los SRBCs. Los pocillos negativos son los que presentan una lisis completa de las células: el C' permanece sin unirse y reacciona con los SRBCs y la hemolisina para producir la lisis de los SRBCs. La prueba no es válida cuando el suero es anticomplementario y se da una reacción positiva en la dilución con VBS como antígeno. Los sueros con reacciones inespecíficas dan reacciones positivas tanto en el pocillo positivo como en el negativo.

• Reactivos

i) Preparación del antígeno

El método más sencillo comienza con el crecimiento de las clamidias en cultivo celular. Los dos métodos que se describen a continuación producen antígenos que pueden utilizarse en pruebas de micro-FC. Los procedimientos son muy similares: ambos incluyen el crecimiento de las clamidias en cultivo celular, la inactivación de las clamidias, la purificación parcial del antígeno, la rotura mecánica y la dilución en un tampón apropiado. El método seleccionado dependerá del equipo disponible.

El primer procedimiento (17,19) comienza con la recogida de las clamidias y los restos del tapiz celular cuando se aprecia efecto citopático. El cultivo se inactiva añadiendo fenol a una concentración final de 1%, incubando 24 horas a 37°C y concentrando por centrifugación a 10.000 x g durante 1 hora. El sedimento se diluye al 10% de su volumen original utilizando VBS, pH 7.2, que contenga 1% de fenol y 1% de glicerol.

El sedimento se homogeniza a continuación en un omnimixer al máximo de velocidad, durante tres períodos de 1 minuto en baño de hielo. Para eliminar restos, el homogenizado se centrifuga 15 minutos a 100 x g. Algunos procedimientos sugieren calentar el antígeno en ese momento con agua hirviendo durante 30 minutos. El sobrenadante se conserva y se diluye a la concentración deseada.

En el segundo procedimiento para la producción de antígeno para prueba de FC (9, 10), el antígeno se prepara a partir de células L infectadas con una cepa de C. psittaci. Se elimina el medio de cultivo y las células se calientan 40 minutos a 56°C. Las células se lisan en agua destilada, las clamidias se liberan por ultrasonificación y la preparación se hace isotónica con VBS. El antígeno se prueba frente a un suero de oveja convaleciente y se usa como 2 unidades en la prueba de micro-FC.

Existen varios procedimientos para la preparación de antígeno a partir de sacos vitelinos infectados, algunos de ellos muy elaborados. Sin embargo, con el siguiente procedimiento resulta relativamente fácil preparar un antígeno crudo de saco vitelino infectado que funciona bien en la prueba modificada de FC directa. Se utiliza una cepa de clamidia adaptada a huevo para inocular huevos embrionados de gallina de 6-7 días a través del saco vitelino. Se recogen los sacos vitelinos de embriones que mueran entre los 3 y 7 días post-inoculación y la mezcla se diluye al 1/3 en PBS, tampón Tris, o medio de cultivo, y luego se

autoclava durante 20 minutos. La suspensión se enfría y se homogeniza cuidadosamente. Se recomienda utilizar un homogenizador de tejidos de alta velocidad durante 3–5 minutos. Después de la homogenización, se añade fenol a una concentración final de 0.5% (preparar un stock de fenol al 5% y añadir 1 ml por cada 9 ml de antígeno). La preparación de antígeno se mantiene en reposo durante 3 días y, a continuación, se usa después de centrifugar 20 minutos a $1.000 \times g$. El antígeno se puede conservar durante largos períodos de tiempo a $4^{\circ}C$.

ii) Preparación de SRBCs sensibilizados

Se conservan los SRBCs desfibrinados mezclándolos con un volumen equivalente de solución de Alsever. Se pueden mantener a $4^{\circ}C$ durante 4 semanas. Lavar 25 ml de la preparación stock de SRBCs con 25 ml de VBS. Centrifugar a $400 \times g$ durante 10 minutos. Eliminar el VBS por aspiración y resuspender en 50 ml de VBS. Repetir el lavado tres veces. Tras el lavado final, diluir los SRBCs a razón de 2,2 ml de SRBCs sedimentados por cada 98 ml de VBS. A continuación los SRBCs pueden estandarizarse por densidad óptica: mezclar 1 ml de los SRBCs diluidos y lavados con 14 ml de H₂O destilada, determinar la absorbancia en un espectrofotómetro, y estandarizar a 0,25 a una longitud de onda de 550 nm. La lectura obtenida se puede utilizar en la siguiente fórmula para determinar la dilución requerida:

$0.25 \text{ absorbancia a deseada volumen final de SRBCs} = (\text{absorbancia leída} \times \text{volumen actual})$

Los SRBCs se sensibilizan añadiendo rápidamente un volumen igual de de VBS que contenga la dilución apropiada de hemolisina (dilución determinada por titulación). Incubar a $37^{\circ}C$ durante 15 minutos antes de utilizarse

iii) Solución salina en tampón Veronal

VBS se prepara como una solución concentrada 5x que se diluye al 1/5 antes de uso. La siguiente fórmula es para 4 litros. Diluir en agua destilada barbital sódico (7,5 g); barbital H₂O (disolver en H₂O hirviendo) (11,5 g); MgSO₄·7H₂O (4.056 g); NaCl (170,0 g); y CaCl₂ (0,078 g). Añadir H₂O destilada hasta 4 litros.

iv) Titulación del complemento

El complemento (C') es inestable y se deteriora si no se maneja adecuadamente. Normalmente se mantiene congelado a $-70^{\circ}C$ en alícuotas que se utilizan cada vez para evitar volver a congelarlo.

Para obtener la concentración de trabajo deseada (2 unidades por pocillo de ensayo) añadir primero 5% de suero de pollo normal para efectuar la modificación que aumenta la sensibilidad como se Describió antes. Luego, estimar un punto de inicio basándose en lotes previos. Un buen punto de inicio es una dilución 1/30 después de añadir el suero de pollo. Disponer una serie de tubos con cantidades Variables de complemento en VBS. El VBS debe contener el antígeno que se va a utilizar en la reacción y hay que considerar cualquier actividad anti complementaria

del antígeno. Un método usual es hacer diluciones mezclando 0,10 ml de C' + 0,90 ml de VBS; 0,12 ml de C' + 0,88 ml de VBS, etc.

Hasta 0,25 ml de C' + 0,75 ml de VBS. Incubar los tubos 2 horas en un baño a 37°C. Añadir 0,5 ml de SRBCs sensibilizados a cada tubo. Incubar otra hora en un baño a 37°C. La mayor dilución que

Proporciona una hemólisis completa es equivalente a 1 unidad. Dos veces dicha cantidad son 2 unidades. Se puede utilizar la siguiente fórmula para obtener 2 unidades/0,05 ml:

$$x = (di) (v) / 2dh$$

Donde:

x = inverso de la dilución de C' deseada para obtener 2 unidades de C'/pocillo

di = inverso de la dilución inicial de C' utilizada en la titulación (1/30)

v = volumen de C' diluido que se debe añadir

dh = doble del volumen de C' que origina hemólisis completa en la titulación

v) Titulación de la hemolisina

La hemolisina puede obtenerse comercialmente. Debe estandarizarse por titulación. Se recomienda el siguiente procedimiento.

Preparar una dilución al 1/100 del stock de hemolisina en VBS. A partir de ésta, preparar en tubos diluciones 1/300, 1/400 y 1/500. De cada una de estas diluciones, hacer diluciones dobles en VBS en volúmenes de 0,5 ml para una titulación en bloque.

Para determinar la concentración de hemolisina, añadir a 0,5 ml de cada dilución lo siguiente: 0,5 ml de C' a dilución 1/30, 0,5 ml de SRBCs no sensibilizados con densidad óptica de 0,25, y 1,5 ml de VBS. Incubar 1 hora a 37°C y después centrifugar a 400 x g durante 5 minutos. Una unidad de hemolisina es la dilución que permite una lisis completa de los SRBCs. La solución de hemolisina se prepara en VBS a la dilución que contenga 2 unidades de hemolisina. Ésta se añade luego a un volumen igual de SRBCs a la concentración apropiada.

vi) Titulación del antígeno y del control de suero positivo

Para estandarizar la prueba de FC, también se necesita conocer los títulos del antígeno y del control de suero positivo. Si se conoce el título de uno de ellos, entonces el del otro componente se puede determinar realizando la prueba de FC utilizando diluciones del componente que se va a titular. Si se desconoce tanto el título del suero positivo como el del antígeno, se puede utilizar una titulación en bloque (por tablero de ajedrez o doble entrada) para determinar las diluciones límites del antígeno y del anticuerpo donde comienza la hemólisis. Es muy importante obtener estos títulos con precisión.

Se utilizan 4 unidades tanto de antígeno como de suero control positivo. Una unidad es la dilución más alta que da un resultado positivo. Es decir, si una dilución de 1/160 da una prueba positiva, entonces una dilución 1/40 tiene 4 unidades y se utiliza en la prueba.

Los anticuerpos fijadores de complemento aparecen generalmente a los 7–10 días de la infección.

Para un diagnóstico positivo, se requiere un aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos FC.

Sólo se puede hacer un diagnóstico presuntivo de una población mediante pruebas serológicas, si se presentan los síntomas clínicos típicos y la mayoría de las aves tienen anticuerpos a títulos $>1/64$.

b) Otras pruebas

Se han desarrollado otras pruebas, pero su especificidad aún no ha sido evaluada suficientemente. La prueba ELISA para anticuerpos específicos de grupo contra clamidia es más rápida y sensible que la prueba de FC; además puede ser automatizada. Las evaluaciones de ELISA para la detección de anticuerpos contra *C. trachomatis* y *C. psittaci* (15, 24, 33, 34) indican que en la mayoría de los casos puede sustituir a la prueba FC. Sin embargo, aún debe ensayarse más extensamente; los estándares para su utilización no se han establecido, y no hay conjugados comerciales disponibles para todas las especies de aves.

Otras pruebas son la prueba de inmunodifusión en medio sólido (29), la prueba de aglutinación con látex (LA), la prueba de aglutinación de los corpúsculos elementales (EBA) (18, 21) y la prueba de micro-inmunofluorescencia (MIFT). La inmunodifusión es menos sensible que la prueba FC. La prueba LA detecta anticuerpos contra *C. psittaci* y es rápida y fácil de realizar (20). Las bolas de látex se recubren con antígeno purificado de la clamidia, se mezclan cuidadosamente con el suero problema en una placa de vidrio, y se rotan durante 2 minutos para favorecer la aglutinación. La prueba se lee contra un fondo oscuro.

Los sueros que dan reacción positiva deben probarse de nuevo con bolas no recubiertas para eliminar la posibilidad de aglutinación inespecífica. Las pruebas LA y FC directa se correlacionan en un 72.5% de las pruebas con sueros pareados. La prueba LA tiene una sensibilidad de 39.1% y una especificidad de 98.1% con respecto a la prueba FC directa (20). La prueba detecta tanto IgG como IgM, pero es mejor para IgM.

Se ha sugerido su empleo para detectar infecciones recientes o activas. La prueba EBA detecta solamente IgM y es indicativa de una infección actual. La prueba MIFT es rápida y fácil de realizar; sin embargo, no siempre están disponibles los sueros antiespecie conjugados con fluoresceína.

BURSITIS INFECCIOSA

A. INTRODUCCIÓN

La bursitis infecciosa (BI) está causada por un virus que es miembro del género Avibirnavirus, de la familia

Birnaviridae. La enfermedad clínica sólo la presentan los pollos, si bien se pueden infectar pavos, patos, gallinas de Guinea y avestruces. Únicamente se ven afectadas a nivel clínico las aves jóvenes. La enfermedad aguda y severa de las aves de 3–6 semanas de vida se asocia con una mortalidad elevada, pero es habitual una enfermedad subclínica o menos aguda en aves de 0–3 semanas de vida. Puede causar problemas secundarios debido al efecto del virus en la bolsa de Fabricio. El virus de la BI (IBDV) provoca un descenso en la cantidad de linfocitos de la bolsa y si esto se produce en las 2 primeras semanas de vida, puede conducir a una reducción significativa de la respuesta inmune humoral. Se sabe que existen dos serotipos distintos de la BI. El virus del serotipo 1 causa una enfermedad clínica en pollos de menos de 10 semanas. Normalmente los pollos

de más edad no muestran signos clínicos. A veces los anticuerpos se encuentran en otras especies aviares, pero no se aprecian signos de infección. Los anticuerpos del serotipo 2 se encuentran muy extendidos en los pavos y, en ocasiones, en pollos y patos. No existen pruebas de la enfermedad clínica debida a la infección por el serotipo 2 vírico (19).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

El aislamiento y la identificación del agente proporcionan el diagnóstico más certero de la BI, pero habitualmente no se intentan con fines de diagnóstico rutinario porque el virus puede resultar difícil de aislar (22). En la práctica, el diagnóstico de laboratorio de la BI depende de la detección de anticuerpos específicos inducidos por el virus o de la detección del virus en los tejidos, utilizando métodos inmunológicos o moleculares.

1. Identificación del agente

La BI clínica presenta de forma clara signos característicos y lesiones post mortem. El grupo de aves afectado mostrará una morbilidad muy elevada acompañada de una depresión grave en la mayoría de las aves, lo que dura unos 5–7 días. La mortalidad se eleva drásticamente durante 2 días y a continuación desciende de forma rápida durante los siguientes 2–3 días. Normalmente, muere entre el 5% y el 10% de las aves, pero la mortalidad puede alcanzar el 30–40%. Los principales signos clínicos son diarrea acuosa, plumaje erizado, apatía, anorexia, temblores y postración. Entre las lesiones post mortem destacan la deshidratación de los músculos con numerosas hemorragias equimóticas, el agrandamiento y decoloración anaranjada de los riñones, con la presencia de uratos en los túbulos. Las bolsas de Fabricio muestran las lesiones diagnósticas principales. Las aves que mueren en el momento más álgido del brote de la enfermedad, presentan una bolsa agrandada e inflamada con una decoloración amarilla pálida. Pueden presentar hemorragias intrafoliculares y, en algunos casos, la bolsa puede estar completamente hemorrágica con la apariencia de una cereza oscura. En muchas bolsas estarán presentes edemas de color pajizo peribursales. Es mejor realizar las pruebas de confirmación de la enfermedad clínica o de detección de la enfermedad subclínica utilizando ensayos inmunológicos, ya que el IBDV es difícil de aislar. Para el aislamiento vírico, se deberían seguir los métodos descritos más abajo. La diferenciación entre los serotipos 1 y 2 o entre los subtipos o patotipos del serotipo 1 la debería realizar un laboratorio especializado (p. ej. los Laboratorios de Referencia de la OIE para la Bursitis infecciosa).

a) Preparación de las muestras

Se separan las bolsas de Fabricio de forma aséptica a partir de unos cinco pollos infectados en las etapas tempranas de la enfermedad. Se cortan las bolsas con dos escalpelos, añadiendo una cantidad pequeña de caldo de peptona que contenga penicilina y estreptomina (1000/ml en cada caso) y se homogeniza en una picadora de tejidos. El homogeneizado se centrifuga a 3.000 g durante 10 minutos. Se recoge el sobrenadante para utilizarlo en las investigaciones descritas más adelante. Puede que se necesite filtrar a través de un filtro de 0,22 µ para un

control posterior de la contaminación bacteriana, aunque esto puede ocasionar la reducción del título vírico.

b) Identificación mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar

En la Sección B.2.a. se describe un protocolo para realizar la prueba de IGDA. Para detectar el antígeno en la bolsa de Fabricio mediante una prueba de IGDA, se deben extraer de forma aséptica las bolsas de aproximadamente diez pollos en la etapa aguda de la infección. Las bolsas se pican empleando dos escalpelos con un movimiento de tijeras y después las piezas pequeñas se colocan en los pocillos de una placa de IGDA enfrentándolas a sueros positivos conocidos. Se puede facilitar la liberación de los antígenos del IBDV a partir del tejido bursal infectado, realizando ciclos de congelación-descongelación del tejido picado y a continuación se puede emplear el exudado congelado-descongelado para rellenar los pocillos.

c) Identificación mediante inmunofluorescencia

Se preparan las secciones de bolsa con un microtomo criostático, se secan a temperatura ambiente y a continuación se fijan en acetona fría. Se aplican a las secciones antisueros específicos del IBDV con marcaje fluorescente; posteriormente se incuban a 37°C durante 1 hora en una atmósfera húmeda. Al final del periodo de incubación se lavan durante 30 minutos en solución salina tamponada con fosfato (PBS), Ph 7,2, y se lavan con agua destilada. Las secciones se montan empleando glicerol tamponado, pH 7,6 y se examinan por microscopía ultravioleta para detectar la posible fluorescencia específica del IBDV (24).

d) Identificación mediante enzimoimmunoensayo de captura antigénica (AC-ELISA)

Se han descrito protocolos diferentes para detectar el serotipo 1 del IBDV utilizando un enzimoimmunoensayo de captura antigénica (AC-ELISA) (11, 18, 33). Brevemente, se cubren las placas ELISA con los anticuerpos específicos del IBDV. Dependiendo del protocolo AC-ELISA elegido, el anticuerpo de captura puede ser un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IBDV (MAb), o una mezcla de tales MAbs, o un suero policlonal de pollo anti-IBDV post-infección. Se ha sugerido que los AC-ELISAs que emplean anticuerpos policlonales pueden tener mayor sensibilidad. Se realizan diluciones de las muestras de los homogeneizados bursales (véase más arriba) desde la 1/10 a la 1/25 (p/v) en un tampón de dilución adecuado y se incuban en los pocillos cubiertos con anticuerpos. Al final del periodo de incubación, se eliminan los antígenos no unidos con un tampón de lavado adecuado (p. ej. PBS, pH 7,2 + Tween 20 al 0,2%). A continuación, los antígenos de captura se revelan, como en un ELISA indirecto, con un anticuerpo de detección (que debe haberse desarrollado a partir de especies animales diferentes a las de los anticuerpos de captura), seguido de un conjugado enzimático que se una para detectar sólo el anticuerpo, seguido del sustrato enzimático. Finalmente, las densidades ópticas, que son proporcionales a la cantidad de antígenos de captura del IBDV, se leen con un lector de ELISA.

El AC-ELISA se basa en la utilización de muestras que posiblemente contienen el virus vivo, y se debería llevar a cabo sólo en instalaciones de contención

adecuadas, tales como una cabina de seguridad de la clase II. Se debería considerar que todo el líquido (tampones de lavado) y residuos sólidos están contaminados por el IBDV y, antes de su eliminación, hay que descontaminarlos de forma adecuada. Las etapas críticas en la puesta en práctica y valoración del AC-ELISA son

- i) la necesidad de realizar lavados a fondo entre cada una de las etapas de la reacción para mantener bajas las reacciones de fondo,
- ii) el requisito de incluir en cada ensayo muestras conocidas positivas y negativas como controles, y
- iii) la necesidad de que tanto los anticuerpos de captura como los de detección reaccionen positivamente con todas las cepas del serotipo 1 del IBDV (p. ej. ni los de captura ni los de detección deberían depender de manera acusada de la variación antigénica del IBDV que existe entre las cepas del serotipo 1).

e) Identificación mediante técnicas moleculares

Se han desarrollado técnicas de virología molecular que permiten identificar el IBDV más rápidamente que mediante el aislamiento vírico (7, 15, 40). El método molecular que con más frecuencia se utiliza es el de la detección del genoma del IBDV mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) (21, 40). Este método permite detectar el genoma del IBDV, cuya replicación es inestable en cultivo celular, porque no es necesario que se multiplique el virus antes de su amplificación.

La RT-PCR se realiza en tres etapas: extracción de los ácidos nucleicos a partir de la muestra estudiada, transcripción inversa (RT) del ARN del IBDV en ADNc, y amplificación del ADNc resultante mediante PCR.

Las dos últimas etapas requieren que el usuario seleccione los oligonucleótidos cebadores que son secuencias cortas complementarias a la secuencia nucleotídica específica del virus. Se amplificarán zonas diferentes del genoma dependiendo de la localización a partir de la cual se han seleccionado los cebadores. El ejemplo que se indica más abajo permite la amplificación del tercio medio del gen que codifica la proteína externa de la cápsida (8, 9).

• Extracción de los ácidos nucleicos

El ARN monocatenario es extremadamente susceptible a la degradación por ARNasas. El genoma de ARN bicatenario (ARN_{2c}) del IBDV resiste la degradación por ARNasas. Sin embargo, las células infectadas también contienen especies de ARN monocatenario de sentido positivo derivado del IBDV que pueden utilizarse como templado en la etapa de RT y pueden contribuir a mejorar la sensibilidad del ensayo. Así, es importante que la extracción del ARN se lleve a cabo utilizando guantes y material de laboratorio y reactivos libres de ARNasa.

El ARN del IBDV se puede extraer de tejidos infectados utilizando algunos kits comerciales de distribuidores de reactivos de biología molecular. Alternativamente, el ARN del IBDV se puede extraer añadiendo dodecilsulfato sódico al 1% y 1 mg/ml de proteinasa K a 700 µl de suspensión vírica (p. ej. Homogeneizado bursal). Se incuba 60 minutos a 37°C. Los ácidos nucleicos se obtienen utilizando un protocolo estándar de extracción con fenol/cloroformo (precaución: el fenol debe manipularse y eliminarse teniendo en cuenta que es tóxico). Los ácidos

nucleicos se recogen a partir de la fase final acuosa mediante precipitación con etanol y se resuspenden en agua destilada libre de ARNasa o tampón adecuado. El ARN diluido en agua debería mantenerse congelado a una temperatura por debajo de -20°C hasta su uso.

• **Trascricción inversa**

Se dispone comercialmente de una variedad de transcriptasas inversas. Se deben seguir las instrucciones del suministrador para preparar la mezcla de reacción de la RT. Se utiliza el cebador de la PCR "inferior" (complementario a la cadena positiva del genoma del IBDV, véase más abajo) para la trascricción inversa, ya que esto permite la síntesis del ADNc tanto a partir de la cadena positiva del genoma ARN2c del IBDV como a partir de los ARNs monocatenarios de sentido positivo derivados del IBDV contenidos previamente en las células infectadas. La matriz del ARN del IBDV debe desnaturalizarse antes de transferirla a la mezcla de reacción de la RT.

Se añade dimetilsulfóxido de calidad para biología molecular al 20% (volumen) a una solución descongelada del ARN del IBDV. Se calienta durante 3 minutos a 92°C y se enfría en hielo; un método alternativo consiste en calentar durante 5 minutos e inmediatamente incubar la mezcla en nitrógeno líquido.

Se transfiere el volumen pertinente de matriz desnaturalizada a la mezcla de reacción. Se incuba de acuerdo con las instrucciones del suministrador enzimático.

La solución del ADNc obtenida después de la etapa de RT se debería congelar a una temperatura inferior a -20°C . Un retraso en la etapa de PCR de varias semanas después de la síntesis del ADNc puede causar resultados negativos falsos en la PCR.

• **Reacción en cadena de la polimerasa**

Se dispone comercialmente de una variedad de polimerasas de ADN adecuadas para la PCR. Se deben seguir las instrucciones del fabricante para preparar la mezcla de reacción de la PCR. El par U3/L3 de cebadores de la PCR indicados más abajo se consideran útiles para amplificar el tercio medio del gen VP2 de las cepas del serotipo 1 del IBDV (8, 9).

Secuencia de nucleótidos cebadores U3 y L3 para la PCR específicos del IBDV:

Superior U3: 5'-**TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT**-GCA-TGC-GGT-ATG-TGA-GGC-TTG-GTG-AC-3' Inferior L3: 5'-**CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC**-GAA-TTC-GAT-CCT-GTT-GCC-ACT-CTT-TC-3' Los cebadores U3 y L3 son cebadores híbridos de 44 nucleótidos de longitud. Contienen un extremo 3' específico del IBDV (en letra itálica en la secuencia mostrada más arriba) y abarca de la posición 657 a la 676 y de de la 1193 a la 1212 del segmento A del IBDV, respectivamente (se numera como el segmento A de la cepa P2, Acc No X84034). El extremo específico del IBDV se empareja a un extremo 5' anti-IBDV (en negrita en la secuencia de más arriba) que corresponde a los cebadores universales M13 y RM13 en los cebadores U3 y L3, respectivamente. Los cebadores universales M13 y RM13 son muy utilizados en las reacciones de secuenciación del ADN, por eso los productos purificados de la PCR que resultan de la amplificación con los cebadores U3 y L3 se secuencian con facilidad. Finalmente, se incluyen en los

cebadores U3 y L3 los puntos de restricción para las endonucleasas de restricción SphI y EcoRI, respectivamente (subrayado en la secuencia de más arriba), para que si es necesario se puedan clonar los productos amplificados de la PCR con el par U3/L3 utilizando estos puntos. El par U3/L3 genera un producto de 604 pares de bases (bp), de los cuales 516 bp son específicos de la secuencia amplificada del IBDV.

Se realiza una etapa inicial de desnaturalización como recomienda el suministrador de la ADN polimerasa, seguida de 35 ciclos, en cada uno de los cuales se incluye una etapa de desnaturalización, una de templado para permitir la hibridación y una de extensión. En tales ciclos se puede utilizar una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos y una hibridación a 64°C durante 45 segundos con el par U3/L3 (la temperatura de hibridación se debe adaptar si se utilizan otros cebadores). Se deberían establecer los parámetros para la etapa de extensión de acuerdo con las recomendaciones del suministrador.

El revelado se puede llevar a cabo mediante una electroforesis de los productos de la PCR y los marcadores de peso molecular del ADN en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (precaución: el bromuro de etidio es tóxico y carcinogénico. Debería ser manipulado y eliminado de acuerdo con ello). Para cada muestra de ADNc (puro, 10 y 100 veces diluido) se deberían realizar tres reacciones de PCR para evitar resultados negativos falsos debidos a la inhibición de la PCR en las mezclas que contienen cantidades elevadas de preparación de ADNc.

Se deberían incluir en cada PCR reacciones control positivas y negativas. Se han desarrollado protocolos que incluyen un control interno para detectar la presencia de inhibidores de la PCR (32).

Un retraso de la PCR de varias semanas después de la etapa de RT puede causar resultados negativos falsos en la PCR.

f) Aislamiento del virus en cultivo celular

Se inoculan con 0,5 ml de muestra, cuatro cultivos recientemente confluentes de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) (a partir de una fuente libre de patógenos específicos [SPF]) en frascos de 25 cm². Se adsorben a 37°C durante 30–60 minutos, se lavan dos veces con solución salina balanceada de Earle y a cada frasco se le añade medio de mantenimiento. Los cultivos se incuban a 37°C, y se observan a diario para detectar posibles efectos citopáticos (ECPs). Se caracterizan por ser células refráctiles redondas y pequeñas. Si después de 6 días no hay ECPs, se elimina el medio y, a continuación, los cultivos se congelan y descongelan y el lisado resultante se inocula en cultivos frescos. Puede ser necesario repetir este procedimiento al menos tres veces. Si se observan ECPs, se debería ensayar el virus frente al antisuero del IBDV en una prueba de neutralización vírica (NV) en cultivo de tejidos (véase más abajo). Habitualmente las cepas más patogénicas del IBDV no se pueden adaptar a crecer en CEF a menos que el virus se haya sometido primero a un pase seriado extensivo en embriones (véase más adelante).

g) Aislamiento del virus en embriones

Se inoculan 0,2 ml de muestra en el saco vitelino de cinco embriones de pollo de 6–8-días de vida sin anticuerpos específicos (SAN) y en la membrana

corioalantoidea de cinco embriones de pollo SAN de 9–11 días de vida. Los embriones SAN proceden de grupos de aves que demuestran ser sero-negativos frente al IBDV. Se vigilan a diario y se eliminan los embriones muertos hasta 48 horas después de la inoculación. Los embriones que mueran después de este tiempo se examinan para detectar posibles lesiones. El serotipo 1 de la BI produce enanismo del embrión, edema subcutáneo, congestión y hemorragias subcutáneas o intracraneales. Normalmente el hígado está inflamado con congestión variable que produce un efecto moteado. En las muertes posteriores, el hígado puede estar inflamado y verdoso, con áreas de necrosis. El bazo está agrandado y los riñones inflamados y congestivos, con un efecto moteado.

Habitualmente el serotipo 1 del IBDV provoca la muerte en al menos alguno de los embriones durante el aislamiento primario.

El serotipo 2 del IBDV no induce edema o hemorragias subcutáneas en los embriones infectados, pero los embriones son de un tamaño menor y presentan una decoloración amarilla pálida.

Para preparar el virus empleado como base de propagación por embrión o para los pases sucesivos, se recogen asépticamente los embriones con lesiones o los que se sospeche que estén infectados, respectivamente. Se eliminan sus cabezas y miembros y se pica el cuerpo principal tal y como se describe en la Sección B.1.a. para la preparación de una suspensión vírica.

h) Aislamiento del virus en pollos

Este método se ha utilizado en el pasado pero ya no se recomienda debido al interés actual por el bienestar animal. Se administran por la vía de la gota en el ojo 0,05 ml de muestra en cinco pollos susceptibles y cinco inmunes a la BI (de 3–7 días de vida). Los pollos se sacrifican 72–80 horas después de la inoculación y se examinan sus bolsas de Fabricio. Las de los pollos infectados con el serotipo 1 virulento del IBDV aparecen amarillentas (en ocasiones hemorrágicas) e hinchadas, con estriaciones prominentes. A veces se presenta edema peribursal y, ocasionalmente, aparecen pulmones con material caseoso. Las plicas están petequiadas.

La presencia de lesiones en las bolsas de los pollos susceptibles acompañadas de la ausencia de lesiones en los pollos inmunes constituye un diagnóstico de la BI. Las bolsas de ambos grupos se pueden utilizar como antígeno en una prueba de inmunodifusión en gel de agar (IGDA), enfrentándolo a un antisuero positivo de la BI (véase Sección B.1.b).

La extensión del daño bursal puede variar considerablemente con la patogenicidad de la cepa del IBDV estudiada. Sin embargo, como las muestras sometidas al aislamiento vírico pueden variar en su contenido vírico, la extensión del daño bursal que se observa en los pollos susceptibles en la etapa de aislamiento proporciona un indicio limitado de la patogenicidad de la cepa.

Las bolsas de los pollos infectados con el serotipo 2 del IBDV no muestran ninguna lesión global.

i) Diferenciación de cepas

Las cepas del IBDV se pueden identificar para comprobar su patogenicidad en pollos SAN, investigando su reactividad antigénica en pruebas de NV cruzada o con MABs, determinando la secuencia de nucleótidos de los productos de

amplificación de la RT-PCR derivados del genoma del IBDV, o estudiando el número y tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos después de la digestión de los productos de la RT-PCR con endonucleasas de restricción. Se han descrito varios protocolos para cada uno de estos abordajes. Las pruebas deberían ser llevadas a cabo por laboratorios especializados e incluirse un cuadro con las cepas de referencia utilizadas como controles. A pesar de que en la actualidad se conoce mejor la base molecular de la variación antigénica, todavía no se ha descrito un marcador de virulencia validado.

• **Pruebas de patogenicidad**

Los estudios para comparar la patogenicidad de las cepas del IBDV se deben realizar en instalaciones de biocontención segura para impedir la diseminación del virus estudiado (véase el Apéndice I.1.6.1. del Capítulo I.1.6. Transporte internacional y contención en laboratorios de agentes patógenos de origen animal). Se deben emplear aves SAN con estado microbiológico conocido (lo más adecuado es utilizar pollos SPF) con el fin de evitar interferencias debidas a agentes contaminantes.

Las variables principales al comparar los resultados de los ensayos de patogenicidad son la raza, la edad y el estado inmune de los pollos desafiados, la dosis y la vía de administración del virus de desafío y la posible presencia de agentes contaminantes en el inóculo. Se ha descrito que las aves ponedoras de raza ligera son más susceptibles que los pollos de ceba pesados (39). También pueden tener lugar diferencias en el grado de susceptibilidad entre las líneas de pollos SPF. La mayor susceptibilidad a la forma aguda de la BI se presenta en pollos de entre 3 y 6 semanas de vida (22). (En la Sección C se describe la influencia del estado inmune). Es necesaria una dosis elevada de virus de desafío, tal y como se recomienda en la Sección C.1.c., para que se infecten todos los pollos inoculados a la vez, sin que sea necesaria la transmisión ave a ave del virus inoculado. Finalmente, la presencia de agentes contaminantes en el inóculo, tales como adenovirus o virus que producen anemia infecciosa en los pollos, puede modificar la severidad de la BI y los signos que se observan después del desafío (29).

Se han utilizado los términos “variante”, “clásico” y “muy virulento” para calificar a las cepas del IBDV que muestran una patogenicidad diferente. Basándose en los signos y lesiones observadas en dos líneas de pollos SPF White Leghorn durante la BI experimental aguda después de un desafío con una dosis infectiva 50% de huevo (EID₅₀) de 10⁵, los IBDVs “variantes” norteamericanos inducen poco o casi ningún signo clínico y no provocan mortalidad pero causan lesiones bursales marcadas; los IBDVs “clásicos” inducen aproximadamente una mortalidad del 10–50% acompañada de lesiones y signos típicos, en tanto que los IBDVs “muy virulentos” inducen aproximadamente una mortalidad del 50–100% y lesiones y signos típicos (Etteradossi et al., observación personal).

• **Pruebas de antigénicidad**

Se puede ensayar la relación antigénica entre las cepas del IBDV mediante pruebas de NV cruzada, lo que correlaciona mejor con la protección cruzada. Tales pruebas han de llevarse a cabo en huevos embrionarios SAN cuando los

virus estudiados no crezcan en cultivos de CEF (p. ej. IBDV muy virulento [vvIBDV]). Las diferencias en los resultados de la prueba de NV cruzada entre las cepas del serotipo 1 del IBDV han conducido a la definición de “subtipos” del serotipo 1, algunos de los cuales son aislados de los IBDVs norteamericanos antigénicamente “variantes” (14).

Otra aproximación al estudio de la relación genética entre las cepas se basa en la utilización de MAbs de ratón que se unen a epítomos neutralizantes del IBDV. Existen en todo el mundo varios cuadros de MAbs (11, 12, 34). Se han introducido algunos de estos MAbs en kits comerciales, pero aún no se ha propuesto un cuadro unificado de MAbs. Todos los epítomos neutralizantes del IBDV caracterizados hasta la fecha se sitúan en un dominio inmunológico principal del tercio medio (de la posición 200 a la 340 de aminoácidos) de la proteína VP2 de la cápsida externa (9, 30, 37). Esta región se denomina “dominio variable de la VP2” debido al hecho de que la mayoría de los cambios observados en los aminoácidos de las cepas del IBDV se agrupan ahí. En el vVP2, existen cuatro tramos de aminoácidos de importancia crítica para la antigenicidad y se denominan picos hidrofílicos del vVP2. Son los aminoácidos de las posiciones 210 a la 225 (pico A principal), de la 249 a la 252 (pico 1 secundario), de la 281 a la 292 (pico 2 secundario) y de la 313 a la 324 (pico B principal) (2, 38). Tanto los IBDVs “muy virulentos” como los “variantes” norteamericanos exhiben en estas regiones de aminoácidos unos cambios que se correlacionan con la variación de los epítomos (8, 37).

Hasta la fecha, no se ha demostrado que ningún marcador antigénico se correlacione estrictamente con la patogenicidad del IBDV.

• **Identificación molecular**

La mayoría de los esfuerzos para la identificación molecular se han centrado en la caracterización del segmento mayor del IBDV (segmento A) y, especialmente, de la región que codifica el vVP2. Se han publicado diversos protocolos sobre la caracterización basada en el empleo de endonucleasas de restricción de los productos de la RT-PCR. Estos enfoques se conocen como RT-PCR/RE o RT-PCR-RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) (16, 21, 42). La utilidad de la información que suministran depende de la identificación de enzimas que corten en los puntos de restricción que son relevantes desde el punto de vista fenotípico. Ya se han identificado algunos puntos implicados en la antigenicidad (véase más arriba), sin embargo, todavía es necesario definir y validar los sitios de restricción relacionados con la virulencia. La secuenciación de los nucleótidos de los productos de la RT-PCR, aunque es más cara que el análisis de restricción, sirve para valorar con más precisión la relación genética entre las cepas del IBDV. Experimentalmente se han demostrado algunos marcadores, mediante un enfoque genético inverso, para las cepas adaptadas al cultivo celular, que exhiben los pares de aminoácidos 279 N– 284 T (20) o 253 H– 284 T (25). En los virus más virulentos están presentes cuatro aminoácidos típicos (222 A, 256 I, 294 I y 299 S) (3, 8, 21). Sin embargo, todavía no se sabe si estos aminoácidos juegan un papel en la virulencia o si meramente son un indicio del origen clonal de la mayoría de los aislados vvIBDV.

2. Pruebas serológicas

a) Prueba de inmunodifusión en gel de agar

La prueba de IGDA es la prueba serológica más ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos específicos en el suero, o para detectar los anticuerpos o el antígeno vírico en el tejido bursal. Se deberían tomar las muestras de sangre en la etapa temprana de la enfermedad y repetir la toma de muestras 3 semanas más tarde. Como el virus se propaga con rapidez, sólo es necesario muestrear una pequeña proporción de la parvada. Habitualmente son suficientes 20 muestras de sangre. Para la detección del antígeno en la bolsa de Fabricio, se deben extraer de forma aséptica la bolsa de aproximadamente diez pollos en la fase aguda de infección. Las bolsas se pican con dos escalpelos realizando un movimiento de tijeras, y después las piezas pequeñas se colocan en los pocillos de una placa de IGDA enfrentándolas a un suero positivo conocido. Los ciclos de congelación-descongelación del tejido picado pueden favorecer la liberación de los antígenos a partir del tejido bursal infectado.

• Preparación del antígeno control positivo

Se inoculan pollos susceptibles de 3–5 semanas de vida, por la vía de la gota en el ojo, con un homogeneizado bursal clarificado al 10% (p/v) que se sepa que contiene el IBDV viable¹. Las aves se sacrifican 3 días después de la inoculación y se recogen las bolsas de forma aséptica. Se eliminan las bolsas hemorrágicas y se juntan las restantes, después de pesarlas se les añade un volumen equivalente de agua destilada fría y un volumen equivalente de cloruro de metileno no diluido. La mezcla se homogeneiza a fondo en una picadora de tejidos y se centrifuga a 2000 g durante 30 minutos. Se recoge el sobrenadante y se distribuye en alícuotas para conservarlas a –40°C. El antígeno contiene el virus vivo y sólo se debería manipular en instalaciones adecuadas tales como las cabinas de seguridad de la clase II.

• Preparación del antisuero control positivo

Se inoculan pollos susceptibles de 4–5 semanas de vida, por la vía de la gota en el ojo, con 0,05 ml de un homogeneizado bursal clarificado al 10% (p/v) que se sepa que contiene el IBDV viable¹. Se los extrae la sangre 28 días después de la inoculación. El suero se junta y se conserva en alícuotas a –20°C.

• Preparación del agar

Se disuelve cloruro sódico (80 g) y fenol (5 g) en agua destilada (1 litro) (precaución: se debería manipular y eliminar el fenol teniendo en cuenta que se tóxico). Se añade el agar (12,5 g) y se calienta hasta que se disuelva. Mientras aún está muy caliente la mezcla, se filtra a través de unas láminas de celulosa cubiertas por unas capas de gasa. El medio se distribuye en volúmenes de 20 ml en botellas de cristal y se conserva a 4°C hasta que se haya de utilizar.

• Procedimiento de la prueba

i) Se preparan las placas entre 24 horas y 7 días antes de ser utilizadas. El agar se disuelve en una vaporera o en un baño de agua hirviendo. Se debe evitar que el agua entre al interior de las botellas.

1 La cepa 52/70 es una cepa adecuada del IBDV (serotipo 1, patotipo clásico) que se obtiene de los Laboratorios de Referencia de la OIE.

ii) Se vierte el contenido de una botella en la cantidad necesaria de placas de Petri de plástico de 9 cm situándolas en una superficie nivelada. (Algunos laboratorios prefieren verter el gel en portas de 25 × 75 mm, y 3 mm de profundidad).

Notas:

1. Es preferible el modelo lineal de pocillos, aunque puede utilizarse el modelo hexagonal. Cada suero o bolsa problema se debería colocar junto a un control positivo de anticuerpo (AB) o de antígeno (AG), respectivamente.

2. Se utilizan pocillos de 3 mm de profundidad, 6 mm de diámetro y están separados 3 mm (o pocillos de cualquier otro tamaño que previamente se haya demostrado que son efectivos).

iii) Se cubren las placas y se deja solidificar el agar y después se conservan a 4°C. Las placas vertidas se pueden conservar hasta 7 días a 4°C. (Si las placas tienen que utilizarse el mismo día que se han vertido, se las seca colocándolas abiertas pero invertidas a 37°C durante unos 30-60 minutos).

iv) Se cortan tres filas verticales de pocillos de 6 mm de diámetro y 3 mm de separación utilizando un cortador tubular y una plantilla.

v) Se extrae el agar de los pocillos mediante aspiración o se elimina utilizando una punta de bolígrafo con cuidado de no dañar las paredes de los pocillos.

vi) Con una pipeta, se distribuyen 50 µl de los sueros problema en los pocillos.

O, para la detección de los antígenos del IBDV en las bolsas:

Se colocan en los pocillos pequeñas cantidades de las bolsas problema finamente picadas mediante unas pinzas de punta fina curvada, como se muestra en la Figura 2, en cantidad suficiente para llenar los pocillos. Alternativamente, puede utilizarse el exudado congelado-descongelado de los tejidos picados.

vii) Se distribuyen 50 µl de los reactivos control positivo y negativo en los pocillos pertinentes.

viii) Las placas se incuban entre 22°C y 37°C hasta 48 horas en una cámara húmeda para evitar que se seque el agar.

ix) Se examinan las placas enfrentándolas a un fondo oscuro con una fuente de luz oblicua después de 24 y 48 horas.

• Pruebas cuantitativas de inmunodifusión en gel de agar

La prueba de IGDA se puede utilizar también para medir los niveles de anticuerpos, empleando diluciones del suero en los pocillos problema y considerando el título como la dilución mayor que produce una línea de (8) precipitación. Puede resultar muy útil para medir los anticuerpos maternos o vacunales y para decidir sobre cuál puede ser el mejor momento para la vacunación. Sin embargo, esta prueba de determinación cuantitativa de IGDA se ha reemplazado en la actualidad, en gran medida por el ELISA.

b) Pruebas de neutralización vírica

Las pruebas NV se llevan a cabo en cultivo celular. La prueba es más laboriosa y costosa que la prueba de IGDA, pero es más sensible para detectar anticuerpos. La sensibilidad no es necesaria para diagnósticos rutinarios, pero puede ser útil

para evaluar las respuestas de las vacunas o diferenciar entre los serotipos 1 y 2 del IBDV.

En primer lugar, se colocan 0,05 ml del virus diluido en el medio de cultivo de tejidos hasta obtener 100 DICT50 (dosis infectivas 50% en cultivo de tejido) por 0.05 ml en cada pocillo de una placa de microtitulación para el cultivo de tejidos (Spearman–Kärber [1] o la Reed & Muench [27]). Los sueros problema se inactivan por calor a 56°C durante 30 minutos. Se hacen diluciones seriadas al doble de los sueros problema en los pocillos del virus diluido. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, en cada pocillo se distribuyen 0,2 ml de una suspensión de fibroblastos de embriones de pollos SPF, con una densidad celular que permita que se obtenga la confluencia de las capas después de 24 horas de incubación. Las placas se sellan e incuban a 37°C durante 4–5 días, y después se observan las monocapas al microscopio para detectar ECPs típicos. El punto final (título del suero) se expresa como el inverso de la dilución mayor del suero que no muestra ECP. Para reducir la variación de prueba a prueba y de operador a operador, se puede incluir en cada lote de pruebas un antisuero estándar de referencia².

c) Enzimoimmunoensayo

Los ELISAs se emplean para la detección de anticuerpos producidos frente a la BI. Para cubrir con antígeno las placas hace falta una preparación vírica purificada, o al menos semipurificada, y se necesitan destreza y técnicas especiales. En 1980 Marquardt et al. Describieron los métodos de preparación de los reactivos y de la aplicación del ensayo (23). Se dispone de kits comerciales.

Se diluyen los sueros problema de acuerdo al protocolo establecido o a las instrucciones del kit y se distribuyen en la cantidad necesaria de pocillos. Después de la incubación bajo las condiciones adecuadas, se eliminan de las placas, y los pocillos se lavan a fondo. Se añaden a los pocillos inmunoglobulinas antipollo conjugadas a un enzima y, de nuevo, se incuban las placas de manera apropiada. Se vacían y vuelven a lavar antes de adicionar el sustrato que contiene un cromógeno que cambia de color en presencia del correspondiente enzima. Después de una etapa final de incubación, se para la reacción sustrato/cromógeno añadiendo una solución de parada adecuada y se cuantifican las reacciones de color midiendo la densidad

óptica de cada pocillo. Para cada muestra problema se calcula la relación Muestra respecto a Positivo (S/P).

d) Interpretación de los resultados

La prueba de IGDA es extremadamente sensible, aunque no tanto como la prueba de NV; con frecuencia, esta última da un título cuando la prueba de IGDA da un resultado negativo. Las reacciones positivas indican infección en las aves no vacunadas y sin anticuerpos maternos. A título orientativo, una reacción positiva de IGDA en un ave vacunada o un ave joven con anticuerpos maternos indica un nivel de anticuerpos protector. El ELISA proporciona resultados más rápidos que la NV o la IGDA y es menos costoso en términos de trabajo, aunque los reactivos son más caros. Los títulos de NV y IGDA se correlacionan bien, pero al ser más sensible la NV, los títulos de IGDA son proporcionalmente inferiores. La correlación entre el ELISA y la NV y entre el ELISA y la IGDA es más variable y

depende de la fuente de los reactivos empleados en el ELISA. Cuando se analiza el descenso del título de los anticuerpos maternos (MDA), no es común encontrar anticuerpos de NV residuales a una edad en la que ya son negativos los resultados del ELISA. Se ha ideado una fórmula que permite utilizar los títulos del ELISA para calcular la edad óptima de vacunación (17), que puede variar dependiendo de la vacuna que se emplee. Pueden producirse reacciones positivas inespecíficas con la mayoría de los ELISAs porque, normalmente, están diseñados para controlar las respuestas de las vacunas, en cuyo caso la sensibilidad se considera más importante que la especificidad. Se debería tener esto en cuenta al utilizar la técnica ELISA para el diagnóstico. En las parvadas de pollos comerciales, no se puede excluir la posibilidad de que el antígeno ELISA del serotipo 1 también detecte los anticuerpos inducidos por la infección natural con el IBDV del serotipo 2, sin embargo, todavía no se ha demostrado que esta posible reacción cruzada interfiera con los programas de control de la BI basada en el ELISA.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

Principalmente se dispone de dos tipos de vacunas para el control de la BI. Estas son vacunas vivas atenuadas, o vacunas inactivadas y con adyuvante en emulsión oleosa (36). También se ha autorizado recientemente una vacuna viva recombinante que expresa los antígenos del IBDV.

Las directrices a seguir para la producción de las vacunas de interés veterinario se indican en el Capítulo I.1.7. Principios de producción de vacunas veterinarias. Las directrices dadas aquí y en el Capítulo I.1.7. son de carácter general, y pueden ser complementadas ante requerimientos regionales y nacionales.

2 Se puede obtener un antisuero de referencia adecuado a partir de los Laboratorios de Referencia de la OIE (véase la Cuadro de la Parte 3 de este Manual para animales terrestres).

Hasta la fecha, se han producido vacunas de la BI sólo con el serotipo 1 del IBDV, aunque se ha detectado entre los pollos el virus del serotipo 2. El virus del serotipo 2 no se ha asociado con la enfermedad, pero su presencia estimulará la producción de anticuerpos. Los anticuerpos del serotipo 2 no confieren protección contra la infección por el serotipo 1, y no interfieren con la respuesta de la vacuna del tipo 1. Existen numerosas descripciones de las variantes antigénicas del virus del serotipo 1 (28). Los estudios de protección cruzada han demostrado que las vacunas inactivadas preparadas a partir del virus del serotipo 1 “clásico” requieren un alto contenido antigénico para proporcionar una protección buena contra alguna de estas variantes. Actualmente están autorizadas las vacunas de la BI que contienen tanto virus del serotipo 1 de la BI clásica como variante.

Desde 1986 han emergido cepas vvIBDV con cambios antigénicos limitados si se las compara con los virus del serotipo 1 “clásico”. La inmunización activa con el virus del serotipo 1 “clásico” o con la vacuna proporciona una protección buena contra los vvIBDVs (10), sin embargo, estos últimos virus son menos susceptibles a la neutralización por los anticuerpos maternos que los virus patogénicos “clásicos” (39).

• Vacunas vivas: métodos de utilización

Las vacunas vivas de la BI se preparan a partir de cepas total o parcialmente atenuadas del virus, conocidas como "suave", "intermedia", o "más que intermedia" ("caliente"), respectivamente. Las vacunas suaves e intermedias se utilizan en pollos progenitores para producir una respuesta primaria previa a la vacunación cerca del momento de la puesta empleando la vacuna inactivada. Son susceptibles al efecto de los MDA por lo que se deberían administrar únicamente después de que se haya reducido la cantidad de MDA.

La aplicación se realiza mediante una inyección intramuscular, por rociado o en el agua de bebida, normalmente a las 8 semanas de vida (31).

Se utilizan vacunas intermedias o más que intermedias para proteger a los pollos de ceba y a las aves ponedoras comerciales de reemplazo. También se emplea alguna de estas vacunas en pollos progenitores jóvenes si existe un riesgo elevado de infección natural con el virus virulento de la BI. Aunque las vacunas intermedias son susceptibles a la presencia de MDA, en ocasiones se administran al día de vida, en forma de rociado grosero, para proteger a cualquier pollo de la parvada que pueda o no tener únicamente niveles mínimos de MDA. A su vez, esto ayuda a establecer un reservorio del virus de la vacuna en la parvada que permite la transmisión lateral a otros pollos cuando se reduce la cantidad de MDA. Habitualmente se administran segundas y terceras aplicaciones, en especial cuando existe un riesgo elevado de exposición a las formas virulentas de la enfermedad o cuando los polluelos vacunados muestran niveles desiguales de MDA. El calendario de las aplicaciones adicionales dependerá de los títulos de anticuerpos de las aves progenitoras en el momento de la puesta de los huevos. A modo orientativo, normalmente la segunda dosis se administra a los 10-14 días de edad en el momento en el que aproximadamente el 10% de la parvada es susceptible a la BI, y la tercera dosis 7-10 días más tarde. La vía de administración es mediante rociado o en el agua de bebida. Rara vez se emplea la inyección intramuscular. Si la vacuna se suministra en el agua de bebida, se debe utilizar agua limpia con pH neutro libre de olor o sabor de cloro o metales. Se puede añadir leche en polvo desnatada en una proporción de 2 g por litro. Se debe procurar que todas las aves reciban su dosis de vacuna. Con este fin, se debería eliminar todo el agua (cortar) durante 2-3 horas antes del suministro del agua con el medicamento y se debe procurar que no permanezca agua residual en las cañerías de drenaje ni en los bebederos. Es posible dividir el agua medicamentada en dos partes, suministrándoles la segunda parte 30 minutos después de la primera.

Recientemente se ha desarrollado una tecnología para proporcionar la vacuna viva a los huevos durante el periodo de incubación. El virus de la vacuna viva se mezcla con anticuerpos de la BI y se inyecta el complejo in ovo a los 18 días de la incubación. Los huevos se incuban hasta la eclosión y el virus de la vacuna se libera cuando los polluelos tienen aproximadamente 7 días de vida. De esta forma, se supera el problema de los anticuerpos maternos de la BI y los polluelos están inmunizados de manera efectiva (13).

Recientemente en Europa se ha autorizado una vacuna viva recombinante que expresa el antígeno VP2 del IBDV. (Existe limitada información disponible sobre el uso de esta vacuna) Generalmente, las vacunas vivas de la BI se consideran compatibles con otras vacunas aviares. Sin embargo, es posible que las vacunas

de la BI que causan daño bursal puedan interferir con la respuesta a otras vacunas.

Únicamente se deberían vacunar aves sanas. Los viales de la vacuna liofilizada se deberían mantener a temperaturas entre 2°C y 8°C hasta que se vayan a utilizar.

• **Vacunas inactivadas: métodos de utilización**

Las vacunas inactivadas de la BI se utilizan para producir niveles elevados, uniformes y de larga duración de

anticuerpos en las gallinas de cría que previamente han sido tratadas con la vacuna viva o han estado expuestas al virus de campo durante la crianza (5). El programa habitual de administración de la vacuna viva comienza aproximadamente a las 8 semanas de vida. A ésta le sigue la vacuna inactivada cuando tienen 16–20 semanas de edad. La vacuna inactivada se produce en forma de emulsión de agua en aceite, y tiene que ser inyectada a cada una de las aves. Las vías preferidas son la intramuscular en el músculo de la pierna, evitando la proximidad de las articulaciones, tendones o los vasos sanguíneos principales o bien la vía subcutánea. Se puede emplear una jeringa multidosis. Todo el equipamiento que se vaya a utilizar debería estar limpio y estéril entre parvadas y los equipos de vacunación deberían ejercer un estricto control de higiene al pasar de una parvada a otra. Se debería conservar la vacuna entre 4°C y 8°C. No se debería congelar o exponer a luz intensa o a temperaturas elevadas.

Solamente se deberían vacunar las aves sanas que estén sensibilizadas por la exposición previa al IBDV.

Usándose de esta manera la vacuna debería inducir tal respuesta de anticuerpos que los pollos eclosionados a partir de estos progenitores presentaran protección pasiva contra la BI aproximadamente hasta los 30 días de vida (41). Esto abarca el periodo de mayor susceptibilidad a la enfermedad y previene el daño bursal en el

momento en el que éste podría provocar inmunosupresión. Se ha demostrado que el daño bursal que se produce aproximadamente después de los 15 días de vida tiene poco efecto en la inmunocompetencia ya que en ese momento las células inmunocompetentes han migrado a los tejidos linfoides periféricos. Sin embargo, si existe una amenaza de exposición a la infección con el virus muy virulento de la IBDV, se deberían aplicar las vacunas vivas como se ha descrito anteriormente. El nivel preciso y la duración de la inmunidad conferida con las vacunas inactivadas de la BI dependerán principalmente de la concentración del antígeno presente por dosis. El objetivo de producción debería ser obtener una concentración de antígeno elevada y por tanto una vacuna muy potente.

1. Control del inóculo

a) Características del inóculo

• **Vacuna viva**

Se debe demostrar que el virus del inóculo está libre de virus extraños, bacterias, micoplasmas y hongos, en particular patógenos aviares. Esto supone la demostración de la ausencia de contaminación con otras cepas del IBDV. Para las cepas de vacuna que tengan que ser atenuadas y no inmunosupresoras, se debe

demostrar que el virus del inóculo es estable, sin tendencia a revertir al estado virulento. Se puede confirmar llevando a cabo al menos cinco pases consecutivos pollo a pollo a intervalos de 3-4 días utilizando una suspensión bursal como inóculo en pollos SPF de edad mínima recomendada para la vacunación. Se debe demostrar que se transmitió el virus. Posteriormente se realiza una comparación histológica para comprobar que no hay diferencias entre las bolsas de las aves inoculadas con el material inicial y el del pase final. Se han desarrollado técnicas para la valoración bursal (26) y de imagen.

Prueba de inmunosupresión: Una característica importante que debe cumplir la vacuna es que el virus no produzca en la bolsa de Fabricio un daño de tal gravedad que cause inmunosupresión en las aves susceptibles. (Pueden estar autorizadas las vacunas vivas del tipo “intermedia” y “más que intermedia” incluso aunque puedan ser capaces de causar inmunosupresión). La vacuna se administrará por inyección o por la vía de la gota en el ojo, una dosis de campo por ave, a 20 pollos SPF de 1 día de vida. A un grupo adicional de aves de la misma edad y fuente se les aloja separadamente como controles. A las dos semanas de vida, a cada ave de ambos subgrupos se le da una dosis de campo de la vacuna viva de la enfermedad de Newcastle por la vía de la gota en el ojo. Alternativamente, se puede administrar la vacuna de la BI a la edad mínima recomendada para la vacunación, y la vacuna de la enfermedad de Newcastle en el momento en el que sean máximas las lesiones bursales inducidas por la vacuna del IBDV. Dos semanas después de su administración se determina la respuesta de inhibición de la hemaglutinación (HI) de cada ave a la vacuna de la enfermedad de Newcastle y la protección frente al desafío con 105.0 a 106.5 ELD₅₀ (dosis letales 50% en embrión) de la cepa Herts 33/56 (o similar) del virus de la enfermedad de Newcastle.

La vacuna de la BI no pasa la prueba si la respuesta de HI y la protección proporcionada por la vacuna de la enfermedad de Newcastle es significativamente inferior (<0,01) en el grupo al que se le ha administrado la vacuna respecto al grupo control. En países en los que el virus de la enfermedad de Newcastle es exótico, una alternativa consiste en utilizar como antígeno de la prueba eritrocitos de oveja o antígeno de Brucella abortus muerta, valorando la respuesta mediante la prueba de hemaglutinación o de aglutinación del suero, respectivamente. Sin embargo, es preferible otra vacuna viva como sistema de prueba, ya que también se evalúa la inmunidad mediada por células.

- **Vacuna muerta**

Las características más importantes de las vacunas muertas son la producción elevada y la buena antigenicidad. Se han empleado tanto cepas virulentas como atenuadas. Se debe demostrar que el virus del inóculo está libre de virus extraños, bacterias, micoplasmas y hongos, particularmente patógenos aviares (35).

b) Método de cultivo

El virus del inóculo se puede propagar en varios sistemas de cultivo, tales como fibroblastos de embrión de pollo SPF, o embriones de pollo. En algunos casos, se puede utilizar la propagación en la bolsa. La mayor parte se distribuye en alícuotas y se liofilizan en contenedores sellados.

c) Validación como vacuna

Antes de que comience la producción de la mayor parte de la vacuna se deberían obtener los datos de eficacia. La vacuna se debería administrar a aves por la misma vía que se utilizará en el campo. Se puede administrar la vacuna viva a las aves jóvenes y valorar la respuesta mediante pruebas serológicas y por su resistencia al desafío experimental. En el caso de las vacunas muertas, la prueba se debe llevar a cabo en aves mayores que continúen hasta la puesta, utilizando el programa recomendado de vacunación, de modo que su progenie se podrá desafiar para determinar la resistencia debida a los MDA al comienzo y fin de la puesta.

• Vacuna viva

Prueba de eficacia: Se administra una dosis de campo al mínimo título recomendado a 20 pollos SPF de edad mínima de vacunación. Se inoculan grupos separados para cada una de las vías recomendadas de aplicación. Se cogen 20 pollos del mismo tiempo de eclosión como controles no inoculados. Después de 14 días, se desafían cada uno de los pollos por la vía de la gota en el ojo con aproximadamente 100 CID50 (dosis infectivas 50% en pollos) de una cepa virulenta del IBDV como recomienda uno de los Laboratorios de Referencia de la OIE para la BI (véase Cuadro de la Parte 3 de este Manual para animales terrestres). Los pollos se observan a diario durante 10 días. Se registra el número de aves que mueren o que exhiben signos de BI. La vacuna no pasa la prueba a menos que como mínimo el 90% de los pollos vacunados sobreviva sin mostrar signos clínicos o lesiones severas en las bolsas de Fabricio al final del periodo de observación. Si más de la mitad de los controles no muestra signos de la BI, o uno o más de los pollos control no exhiben lesiones severas en la bolsa de Fabricio, la prueba no es válida. Se consideran las lesiones severas si al menos el 90% de los folículos muestran más del 75% de reducción de linfocitos. Si se comprueba que los resultados son satisfactorios, esta prueba necesita llevarse a cabo tan sólo en un lote de todos los preparados a partir de la misma porción de inóculo.

• Vacuna muerta

Prueba de eficacia: Se les administra una dosis de vacuna al menos a 20 aves SPF no estimuladas y a la edad recomendada (cerca de la puesta) mediante una de las vías recomendadas, y se mide la respuesta de anticuerpos entre 4 y 6 semanas después de la vacunación mediante una prueba de neutralización del suero con referencia a un antisuero estándar³.

Se recogen los huevos para incubarlos 5–7 semanas después de la vacunación y posteriormente se desafían 25 pollos de la progenie a las 3 semanas de vida mediante gota en el ojo con aproximadamente 100 CID50 de una cepa virulenta reconocida del IBDV. También se desafían diez pollos control del mismo tiempo de eclosión pero procedentes de progenitores no vacunados. Se evalúa la protección 3-4 días después del desafío extrayendo la bolsa de Fabricio de cada una de las aves; entonces cada bolsa se somete a examen histológico o se analiza para detectar la presencia del antígeno de la BI mediante la prueba de precipitina en gel de agar. No deberían mostrar evidencias de infección por el IBDV más de tres pollos procedentes de progenitores vacunados, mientras que deberían verse afectados todos los procedentes de los no vacunados.

Se deberían repetir estos procedimientos hacia el final del periodo de puesta cuando las aves vacunadas tengan al menos 60 semanas de vida, pero en esta ocasión se debería establecer el desafío de la progenie cuando tengan 15 días. La prueba de eficacia se debería repetir en aves estimuladas vacunadas mediante el programa recomendado. La dosis final de la vacuna muerta se administra a la edad más temprana recomendada. Se realizan pruebas con los pollos eclosionados a partir de los huevos fértiles recogidos al comienzo y final de la puesta para determinar el grado de protección frente al desafío, como se ha descrito más arriba. Solo se necesita realizar estas pruebas una vez con un lote típico de vacuna.

2. Método de producción

La vacuna se debe producir en un lugar adecuado, limpio y seguro, bien separado de las instalaciones de diagnóstico y de las aves de corral comerciales.

La producción de la vacuna debería realizarse con un sistema del lote de inóculo utilizando una cepa adecuada del virus de origen e historia de pases conocida. Se deben emplear huevos SPF para todos los materiales empleados en la propagación y ensayos de la vacuna. Las vacunas vivas se preparan creciéndolas en huevos o en cultivos celulares. Las vacunas inactivadas de la BI pueden hacerse utilizando el virus virulento crecido en las bolsas de aves jóvenes o empleando cepas del IBDV atenuadas, adaptadas al laboratorio, crecidas en cultivo celular o en huevos embrionarios. Se necesita una concentración vírica elevada. Estas vacunas se fabrican en forma de emulsiones de agua en aceite. Una fórmula típica es utilizar aceite mineral al 80% en una suspensión del material bursal al 20% en agua, con los agentes emulsionantes adecuados.

3. Control del proceso

Contenido antigénico: Una vez cultivado el virus a concentración elevada, se debería ensayar su título para ser utilizado en cultivos celulares, embriones o pollos según la forma más apropiada de la cepa vírica que se esté usando. El contenido antigénico necesario para producir lotes satisfactorios de vacuna se debería basar en las determinaciones hechas en la vacuna de prueba que ha demostrado ser efectiva en los ensayos de laboratorio y de campo.

Inactivación de las vacunas muertas: Con frecuencia se hace con beta-propiolactona o formalina. Se debe demostrar que, bajo las condiciones de producción de la vacuna, tanto el agente inactivador como el procedimiento de inactivación producen la inactivación del virus de la vacuna y de cualquier otro potencial contaminante, p. ej. bacterias, que pueda proceder de los materiales iniciales. Antes de la inactivación de las vacunas muertas es necesario que se consiga una suspensión homogénea y libre de partículas para asegurar que el agente inactivador podría no haber penetrado. Se debería realizar una prueba de inactivación de la vacuna en cada lote tanto del producto sin procesar después de la inactivación como del producto final. La prueba seleccionada debería ser apropiada para el virus de la vacuna que se esté utilizando y debería consistir en al menos dos pases en cultivos celulares susceptibles, embriones o pollos, con

diez réplicas por pase. No se debería detectar la presencia de ningún virus o microorganismo vivo.

Esterilidad de las vacunas muertas: El aceite que se emplea en la vacuna debe esterilizarse por calor a 160°C durante una hora, o por filtración, y se debe demostrar que el procedimiento es efectivo. En cada lote de vacuna final se realizan pruebas apropiadas para las vacunas en emulsión de aceite como se describe, por ejemplo, en la Farmacopea Europea.

4. Control de lotes

a) Esterilidad

b) Inocuidad

• Prueba de inocuidad de la vacuna viva

Se administran diez dosis de campo de vacuna por la vía de la gota en el ojo a 15 pollos SPF de la edad mínima recomendada para la vacunación y no mayores de 2 semanas. Se observan los pollos durante 21 días. La prueba debe repetirse si más de dos pollos mueren debido a causas no relacionadas con la vacuna. La vacuna no consigue pasar la prueba si cualquiera de los pollos muere o muestra signos de enfermedad atribuibles a la vacuna. Esta prueba se realiza en cada lote de la vacuna final.

• Prueba de inocuidad de la vacuna muerta

Se inoculan diez aves SPF, de 14-28 días de vida, por las vías recomendadas con el doble de la dosis de campo. Se observan las aves durante 3 semanas. No deberían desarrollar reacción sistémica o local anormal. La prueba se realiza en cada lote de la vacuna final.

c) Potencia

• Prueba de potencia de la vacuna viva

Puede llevarse a cabo una prueba de potencia (titulación del virus) en huevos o en cultivos celulares en cada serie (lote) de vacuna producida. Además, se debe utilizar el método descrito en la Sección C.1.c. "Vacuna viva (prueba de eficacia)" en cada lote representativo de todos los preparados a partir de la misma porción de inóculo.

• Prueba de potencia de la vacuna muerta

Se vacunan 10 pollos SPF, de aproximadamente 4 semanas de vida, con una dosis de vacuna administrada por la vía recomendada. Se alojan junto con los vacunados 10 aves adicionales control de la misma fuente y edad. Se determina la respuesta de anticuerpos de cada ave 4-6 semanas después de la vacunación en una prueba de NV con referencia a un antisuero estándar. El nivel medio de anticuerpos de las aves

vacunadas no debería ser significativamente menor que el nivel conseguido en la prueba de protección. No se deberían detectar anticuerpos en las aves control. Esta prueba debe realizarse en cada lote de vacuna final.

d) Estabilidad

Se deberían conseguir evidencias en tres lotes de vacuna que demuestren que la vacuna pasa la prueba de potencia de lotes 3 meses más allá del periodo de validez solicitado.

e) Conservantes

Normalmente es necesario un conservante para la vacuna en los contenedores multidosis. Se debería comprobar la concentración del conservante en la vacuna final y su persistencia a lo largo del periodo de validez. Para tales propósitos se debería utilizar un conservante previamente establecido.

f) Precauciones (riesgos)

Las vacunas en emulsión de aceite causan lesiones graves al vacunador si se inyecta accidentalmente en la mano o en otros tejidos. En el caso de que una persona sufra tal accidente, debería ir de inmediato al hospital y llevar consigo a la vez el paquete de la vacuna. Cada paquete y botella de vacuna se debería rotular de forma clara con una advertencia de las consecuencias serias que entraña la lesión accidental. El médico que atienda a la víctima debería tratar tal herida considerándola como “herida por inyección de grasa”.

CÓLERA AVIAR (Pasteurelisis aviar)

A. INTRODUCCIÓN

El cólera aviar es una enfermedad contagiosa bacteriana de especies de aves domésticas y salvajes causada por la infección con *Pasteurella multocida*. Típicamente se presenta como una enfermedad fulminante con bacteremia masiva y alta morbilidad y mortalidad. También ocurren infecciones crónicas con síntomas clínicos y lesiones relacionadas con infecciones localizadas. El sistema pulmonar y los tejidos asociados con el sistema músculoesquelético son a menudo los asientos de la infección crónica. La pasteurelisis aviar y la septicemia aviar hemorrágica son sinónimos del cólera aviar. Esta enfermedad no se considera con potencial zoonótico ya que los aislamientos aviares no son generalmente patogénicos para mamíferos expuestos por vía oral o subcutánea. Otras enfermedades bacterianas pueden presentar síntomas clínicos y lesiones similares al cólera aviar, como la salmonelosis, colibacilosis y listeriosis en pollos, y seudotuberculosis, erisipelas y clamidiosis en pavos. La diferenciación se basa en el aislamiento e identificación, ya que en los casos de cólera aviar *P. multocida* es fácilmente cultivable.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

El cólera aviar (pasteurelisis aviar) es una enfermedad aviar común que afecta a todos los tipos de aves y que es a menudo mortal (3, 7). En la forma aguda, el cólera aviar es una de las enfermedades más virulentas e infecciosas de las aves de granja. El diagnóstico depende de la identificación de la bacteria causante, *P. multocida*, después de su aislamiento de aves con síntomas y lesiones correspondientes a esta enfermedad. El diagnóstico preliminar puede basarse en la observación de síntomas típicos y lesiones y/o en la demostración microscópica

de bacterias con tinción bipolar en frotis de tejidos, como sangre, hígado o bazo. Pueden ocurrir formas suaves de la enfermedad.

Todas las especies de aves son susceptibles a *P. multocida*, aunque los pavos pueden ser los más gravemente afectados. Con frecuencia, el primer síntoma de la enfermedad es la muerte de aves. Otros síntomas incluyen: fiebre, anorexia, depresión, descargas mucosas por la boca, diarrea, plumas rizadas, descenso en la producción de huevos acoplado a una disminución de sus tamaños, aumento de la velocidad respiratoria, y muerte con cianosis. Las lesiones que se observan más a menudo son: órganos congestionados con hemorragias serosas, hígado y bazo agrandados, múltiples áreas necróticas pequeñas en el hígado y/o bazo, neumonía, ascitis suave y edema pericárdico. Las aves que superan el estado septicémico agudo, o las infectadas con microorganismos de baja virulencia, pueden desarrollar cólera aviar crónico, caracterizado por infecciones localizadas. Estas infecciones afectan con frecuencia a las articulaciones, plantas de las patas, vainas tendinosas, bursa del esternón, conjuntivas, barbas, faringe, pulmones, sacos aéreos, oído medio, médula ósea y meninges. Las lesiones de estas infecciones son normalmente resultado de colonización bacteriana con necrosis, exudados fibrinosupurativos, y grados de fibroplasia. El diagnóstico depende del aislamiento e identificación del microorganismo causante.

1. Identificación del agente

Pasteurella multocida es una bacteria anaerobia facultativa que crece mejor a 35–37°C. El aislamiento primario se realiza generalmente utilizando medios como agar sangre, agar tripticosa-soja o agar dextrosaalmidón, y el aislamiento mejora suplementando estos medios con 5% de suero inactivado por calor. Los medios de mantenimiento no suelen requerir suero suplementario. Las colonias varían de 1 a 3 mm. De diámetro después de 18–24 horas de incubación. Normalmente son aisladas, circulares, convexas, traslúcidas y oleosas. Las colonias mucoide acuosas, que se observan frecuentemente en el tracto respiratorio de los mamíferos, son muy raras en los aislamientos aviares. Las células son cocobacilos o bacilos cortos de un tamaño de 0,2–0,4 x 0,6–2,5 µm, Gram negativas y, por lo general, se presentan aisladas o en pares. Los microorganismos recién aislados o los que se encuentran en frotis de tejidos muestran tinción bipolar con tinción de Wright o de Giemsa, o con azul de metileno, y normalmente son encapsulados. El aislamiento del microorganismo es por lo general fácil de realizar a partir de órganos y vísceras como el hígado, médula ósea, bazo o sangre del corazón de aves que mueren por la forma aguda de la enfermedad, o de lesiones exudativas en las aves con la forma crónica de la enfermedad. El aislamiento es a menudo difícil a partir de aves con infección crónica, sin más evidencia de enfermedad que extenuación y letargia. En esta condición, o cuando ha ocurrido descomposición del hospedador, el tejido de elección para el aislamiento es la médula ósea.

La superficie del tejido a cultivar se cauteriza con una espátula al rojo y la muestra se obtiene insertando una torunda de algodón estéril en un asa de siembra de metal o de plástico, a través de la superficie esterilizada por calor. La muestra se inocula directamente en el medio sólido o bien en triptica u otro medio líquido, se

incuba durante unas pocas horas, se transfiere a medio sólido y se incuba de nuevo.

La identificación se basa fundamentalmente en los resultados de pruebas bioquímicas. Las reacciones de fermentación de carbohidratos son esenciales. Los carbohidratos que resultan fermentados son: glucosa, manosa, galactosa, fructosa y sacarosa. Los no fermentados son: ramnosa, celobiosa, rafinosa, inulina, eritritol, adonitol, m-inositol, y salicina. Generalmente el manitol es fermentado. Normalmente, la arabinosa, maltosa, lactosa y dextrina no son fermentadas. Con la xilosa, trehalosa, glicerol y sorbitol, ocurren reacciones variables.

Pasteurella multocida no causa hemólisis, no es móvil y crece muy raramente en agar MacConkey. Produce catalasa, oxidasa y ornitina decarboxilasa, pero no produce ureasa, lisina decarboxilasa, beta-galactosidasa o arginina dihidrolasa. La producción de fosfatasa es variable. El nitrato resulta reducido; se produce indol y sulfhídrico, y las pruebas del rojo de metilo y de Voges-Proskauer son negativas. La detección de la producción de sulfhídrico puede requerir tiras de papel saturadas con acetato de plomo, suspendidas sobre un medio líquido modificado para detectar H₂S (8). Se dispone de kits comerciales para pruebas bioquímicas.

La diferenciación de *P. multocida* de otras especies de *Pasteurella* y de *Riemerella* (*Pasteurella*) anatipestifer se puede llevar a cabo mediante las pruebas y resultados que se indican en el Cuadro 1. La experiencia de laboratorio indica que *P. multocida* es más fácilmente identificable por su morfología colonial y por su apariencia en tinciones de Gram. Las indicaciones bioquímicas más útiles son las reacciones positivas para el indol y la ornitina decarboxilasa.

La caracterización antigénica de *P. multocida* se realiza por determinación de los serogrupos capsulares y los serotipos somáticos. Los serogrupos capsulares se establecen por una prueba de hemaglutinación pasiva (1, 2).

Se han descrito los serogrupos A, B, D, E y F; todos se han aislado de aves excepto el E. Se ha desarrollado una prueba no serológica de difusión en disco que utiliza mucopolisacaridasas específicas para diferenciar los serogrupos A, D y F (6).

Los serotipos somáticos se determinan generalmente por una prueba de inmunodifusión en agar (IGDA) (4, 5).

Se han descrito serotipos del 1 al 16; los 16 serotipos se han aislado de aves (8). La caracterización más eficaz implica la determinación del serogrupo y del serotipo. Esto requiere un laboratorio especializado con reactivos apropiados de diagnóstico. Para determinar el serotipo, el laboratorio prepara el cultivo bacteriano desconocido como antígeno para la prueba IGDA y lo prueba contra todos los antisueros específicos de los 16 serotipos. Los antígenos presentes en un único aislamiento pueden reaccionar con varios antisueros específicos de serotipo resultando en serotipos binomiales o trinomiales, como ilustran las cepas 3,4 y las cepas 3, 4,12 (8).

El análisis del ADN de *P. multocida* con endonucleasas de restricción (REA) se ha mostrado muy valioso en investigaciones epidemiológicas de cólera aviar en aves de granja. Los aislamientos de *P. multocida* con serogrupo capsular y serotipo somático comunes se pueden distinguir por REA. Se analizan geles de agarosa

teñidos con bromuro de etidio después de electroforesis del ADN digerido con endonucleasas HhaI o HpaII (10).

2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas para la presencia de anticuerpos específicos no se emplean para el diagnóstico del cólera aviar. La facilidad de obtener un diagnóstico definitivo por aislamiento e identificación del microorganismo causante evita la necesidad del serodiagnóstico. Se han utilizado experimentalmente pruebas serológicas, como la aglutinación, IGDA, y hemaglutinación pasiva, para demostrar anticuerpos contra *P. multocida* en el suero de aves; ninguna fue muy sensible. Las determinaciones de los títulos de anticuerpo empleando enzimoimmunoensayo se han usado con éxito variable en intentos de analizar la seroconversión en aves vacunadas, pero no para diagnóstico.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

El cólera aviar puede estar causado por cualquiera de los 16 serotipos Heddleston de *P. multocida*, aunque algunos serotipos parecen asociados más a menudo con la enfermedad. Las vacunas de uso general contra *P. multocida* son bacterinas, que contienen hidróxido de aluminio o aceite como adyuvante, preparadas con células inactivadas de determinados serotipos en función de la información epidemiológica. Las bacterinas comerciales están compuestas normalmente de los serotipos 1, 3 y 4. La vacunación juega un papel importante en el control de esta enfermedad. En general, las vacunas vivas que contienen *P. multocida* modificada no se utilizan, excepto en Norteamérica.

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se presentan en el Capítulo I.1.7. Principios de producción de vacunas veterinarias. Las normas dadas aquí son de naturaleza general y pueden suplementarse con requisitos nacionales y regionales.

La bacterina se administra normalmente por inyección intramuscular en los músculos de la pata o del pecho, o subcutáneamente detrás del cuello. Típicamente se administran dos dosis a intervalos de 2–4 semanas. Como la mayor parte de las vacunas inactivadas, no se puede esperar una inmunidad completa hasta aproximadamente 2 semanas después de la segunda dosis de una vacunación primaria. Las vacunas vivas se suelen administrar en el agua de bebida. Debe evitarse la vacunación de aves enfermas o en estado nutricional pobre, ya que en tales circunstancias puede no generarse una respuesta inmune satisfactoria.

1. Método de producción

El método general para la producción de bacterinas de *P. multocida* se presenta aquí. Se preparan cultivos de producción de cada aislamiento bacteriano para incluirse en el producto final. Típicamente, los cultivos se inician en pequeños recipientes y se subcultivan en volúmenes de medio progresivamente mayores hasta alcanzar el volumen deseado de producción. Cada cultivo de producción se inactiva con formalina o por otro medio aceptable. Todos los cultivos componentes se mezclan y, antes de llenar los recipientes estériles finales, se completan normalmente con un adyuvante.

La siguiente sección se basa en los requisitos para bacterinas y vacunas de *P. multocida* tal como se expresan en el Título 9 del Código de Regulaciones Federales de los EE.UU. Otros países pueden tener requisitos ligeramente diferentes.

2. Control del inóculo inicial

a) Características del inóculo

Todas las cepas de *P. multocida* que se incorporan en una bacterina o vacuna deben estar bien caracterizadas, ser de serotipo conocido, puras, seguras e inmunogénicas. El cultivo evaluado y caracterizado se designa por un número de lote y se considera un inóculo primario. Todos los cultivos empleados en la producción de bacterinas o vacunas autorizadas deben derivar de un inóculo primario aprobado y deben de estar dentro de un margen aceptado de número de pases desde el inóculo primario.

b) Validación como vacuna

i) Eficacia

Los productos preparados de inóculos primarios deben ser eficaces frente a una infección de desafío.

La eficacia debe demostrarse en cada especie animal (pollos, pavos, patos, psitácidos) y por cada ruta de administración que se recomienda para el producto, y la protección debe manifestarse contra cada serotipo que se declara proteger. El lote del producto empleado para demostrar la eficacia debe ser el de número de pases más alto permitido desde el inóculo primario.

Para vacunas aviares vivas contra *Pasteurella* se utilizan 20 animales vacunados y 10 controles en cada ensayo de eficacia. Las aves se inoculan en desafío después de 14 días de la vacunación y se observan durante 10 días después del desafío. Una prueba satisfactoria requiere que al menos ocho de los controles mueran y que al menos 16 de los vacunados sobrevivan.

La media aritmética de las unidades formadoras de colonias en el lote del producto utilizado para demostrar la eficacia se emplea como un estándar mínimo (estándar de inmunogenicidad) para todos los lotes subsiguientes de producción de vacuna.

La eficacia de las bacterinas debe demostrarse de modo similar antes de la aprobación. Sin embargo, no se derivan estándares de inmunogenicidad del lote utilizado para demostrar la eficacia inicial; cada lote de producción se prueba satisfactoriamente en ensayos de vacunación y desafío antes de su distribución y venta.

ii) Inocuidad

La seguridad de los inóculos primarios utilizados en la producción de vacunas vivas debe estimarse antes de la autorización. La inocuidad debe probarse en cada especie animal (pollos, pavos, patos, psitácidos) para la que se recomienda el producto. A cada una de 10 aves se le suministra el equivalente de 10 dosis de vacuna y se observa durante 10 días. Al menos 8 de las 10 aves no deben mostrar reacciones desfavorables atribuibles al inóculo primario. Además, los inóculos

primarios deben probarse para reversión a virulencia y evaluarse para excreción del hospedador y transmisión a otra especie animal.

3. Control del proceso.

En cada fase de producción previa a la inactivación se determina la pureza de los cultivos. Esto puede realizarse por examen microscópico (por ejemplo, microscopía de contraste de fases, tinción de Gram) y/o por cultivo. Los cultivos inactivados se prueban para determinar el grado de inactivación. Se realizan ensayos analíticos sobre la vacuna total para determinar niveles de formaldehído u otros conservantes, y deben estar dentro de límites especificados. Durante la fabricación, los parámetros de producción deben controlarse de modo muy estricto para asegurar que todas las series (lotes) se producen de la misma manera que para producir las series utilizadas en estudios de inmunogenicidad.

4. Control de lotes

a) Esterilidad

Las pruebas de esterilidad se hacen en la vacuna envasada. Cada lote debe superar unos requisitos de seguridad, como los detallados en el título 9 del Código de Regulaciones Federales, parte 113.26 o 113.27

b) Inocuidad

La prueba de inocuidad se realiza en cada lote de vacuna completa o envasada. Las vacunas vivas se prueban conforme al método descrito en C.1.c.ii, excepto que solo se emplea una especie representativa.

Las bacterinas se administran de acuerdo con las indicaciones de la etiqueta y las aves se observan durante 14 días; al menos 18 de las 20 aves no deben mostrar signos adversos atribuibles a la bacterina.

c) Potencia

Cada lote de producción de bacterina o de vacuna viva debe probarse para potencia mediante una prueba relacionada con la eficacia y que sea predictiva para este parámetro. Las pruebas de potencia se realizan en la forma final del producto.

Las bacterinas se prueban para potencia en un ensayo de vacunación y desafío. Se deben desafiar grupos separados de aves (20 vacunadas, 10 controles) con cada uno de los serotipos de *P. multocida* frente a los que se pretende lograr protección. Las bacterinas se administran según la dosis y ruta recomendada en la etiqueta. Se administran dos dosis separadas 3 semanas, y todas las aves se inoculan en desafío 2 semanas después de la segunda dosis. Las aves se observan durante 14 días después del desafío. En una prueba satisfactoria, al menos 14 de las 20 aves vacunadas deben sobrevivir y 8 de los controles morir.

La potencia en lotes de vacunas vivas se establece por determinación del número de bacterias en el producto liofilizado reconstituido en su recipiente final. La media del número de bacterias de cualquier lote de vacuna en preparación debe ser lo suficientemente alta como para asegurar que, en cualquier momento antes de la fecha de caducidad, el número es al menos el doble que el estándar de

inmunogenicidad. (La Farmacopea Europea requiere que el número sea al menos igual al estándar de inmunogenicidad).

d) Estabilidad

La duración aceptable de una vacuna se confirma probando el producto para potencia al final de su período aprobado de validez. Se prueba un mínimo de tres lotes de vacuna y deben superar requisitos establecidos de potencia. Las vacunas se guardan a 2–7°C y se protegen de la congelación. Los envases parcialmente utilizados deben eliminarse al final de las operaciones diarias.

e) Conservantes

Cualquier conservante debe encontrarse entre límites especificados. Los conservantes se añaden por lo general a las vacunas para limitar el crecimiento de algún contaminante introducido al perforar el tapón de goma con una aguja. Idealmente debería usarse un equipo multidosis de vacunación para penetrar una sola vez el envase de vacuna con una aguja estéril.

f) Precauciones (riesgos)

Las vacunas que se preparan con adyuvantes que contienen aluminio pueden causar nódulos temporales en el lugar de la inyección. La autoinyección del operador no plantea problemas inmediatos, pero debe buscarse consejo médico al haber riesgo de infección por una aguja contaminada.

Las vacunas que contienen adyuvantes lipídicos pueden causar reacciones más graves en el sitio de la inyección, que pueden manifestarse como grandes nódulos. Debe tenerse cuidado en la correcta administración de estas vacunas. La autoinyección del operador requiere atención médica inmediata que implica una incisión rápida con irrigación del sitio.

ENFERMEDAD DE MAREK

A. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Marek (EM) (22, 25, 33) es una enfermedad de las aves domésticas (pollos) causada por un herpesvirus. Aparece a las 3–4 semanas de edad, o después, y es más común entre las 12 y 30 semanas. En la forma clásica de la enfermedad, que se caracteriza principalmente por complicaciones nerviosas, la mortalidad no suele superar el 10–15% y puede durar de unas cuantas semanas a muchos meses. En la forma aguda, en la que normalmente hay formación de linfomas en las vísceras, es corriente una incidencia del 10–30% en las aves y pueden ocurrir brotes con hasta el 70%. La mortalidad puede aumentar rápidamente en unas cuantas semanas y luego cesar, o puede continuar de modo estabilizado o con un lento descenso durante varios meses. La forma aguda de la enfermedad, con linfomas viscerales extendidos, es la más común en la actualidad. En su forma clásica, el síntoma clínico más corriente de la EM es la parálisis parcial o completa de las patas y las alas. En la forma aguda, las aves muestran a menudo una grave depresión y algunas pueden morir sin mostrar signos previos.

En la forma clásica, resulta característico el engrosamiento de uno o más nervios periféricos. Los más afectados normalmente y los mejor vistos en análisis post-mortem son los plexos braquiales y ciáticos, el plexo celíaco, el vago abdominal y el nervio intercostal. Los nervios afectados suelen tener un grosor doble o triple del normal, con pérdida de la estriación cruzada normal y de su aspecto brillante, y pueden aparecer grises o amarillentos, y a veces edematosos. A veces se presentan linfomas en la forma clásica de la EM, con frecuencia como pequeños tumores grisáceos y blandos en el ovario y, a veces, también en los pulmones, riñones, corazón, hígado y otros tejidos. El “ojo gris”, que está causado por una iridociclitis que incapacita al ave para acomodar el iris en respuesta a la luz y origina una pupila distorsionada, es más común en aves viejas (16–18 semanas), y puede ser el único signo que se presente.

En la forma aguda, el hallazgo típico es una extensión linfomatosa difusa en el hígado, gónadas, bazo, riñones, pulmones, proventrículo y corazón. A veces también aparecen linfomas en la piel rodeando los folículos de las plumas y en los músculos esqueléticos. Las aves afectadas suelen tener afectados los nervios periféricos, como en la forma clásica. En aves jóvenes el aumento del hígado suele ser moderada, pero en las adultas puede estar muy aumentado y con apariencia idéntica a la que se presenta en la leucosis linfoide, de la que se debe distinguir. A menudo no hay lesiones nerviosas en aves adultas con EM.

Tanto en la forma clásica de EM como en la aguda, la enfermedad comienza con la proliferación de las células linfoides, que es progresiva en algunos casos y regresiva en otros. Los nervios periféricos pueden estar afectados por cambios proliferativos, inflamatorios o de infiltración menor, que se denominan respectivamente lesiones de tipo A, B, y C. Las de tipo A comprenden infiltración de linfoblastos proliferativos, de linfocitos pequeños y medianos, y de macrófagos, y parecen ser de naturaleza neoplásica. Las lesiones de tipo B se caracterizan por edema interneurítico, infiltración de linfocitos mayoritariamente pequeños y células plasmáticas, y por proliferación de células de Schwann, y parecen ser inflamatorias. Las de tipo C comprenden una leve dispersión de linfocitos principalmente pequeños, y a menudo aparecen en aves que no muestran lesiones gruesas o síntomas clínicos. Se consideran lesiones inflamatorias regresivas. La desmielinización que ocurre con frecuencia en los nervios con lesiones de tipo A o B es la responsable de la parálisis clínica.

Los linfomas en los órganos viscerales y en otros tejidos son citológicamente similares a las proliferaciones linfoides en los nervios de las lesiones de tipo A. Normalmente, las células linfoides son de tipos mixtos, con una frecuencia mayor de linfocitos pequeños y medios, aunque a veces predominan los linfocitos grandes y los linfoblastos, particularmente en aves adultas con EM crónica.

Las poblaciones heterogéneas de linfocitos en los linfomas de la EM, como se observa en secciones teñidas con hematoxilina–eosina o en frotis de linfomas por la tinción de May–Grünwald–Giemsa, es una característica importante para diferenciar esta enfermedad de la de la leucosis linfoide, donde las infiltraciones linfomatosas comprenden linfoblastos uniformes. Otra diferencia importante es que en la leucosis linfoide ocurren linfomas grandes en la bolsa de Fabricio, y que los tumores tienen un origen y un modelo de proliferación intrafolicular.

Aunque en la EM la bolsa está en ocasiones implicada en la proliferación linfoide, el tumor se localiza de modo difuso entre los folículos y es menos aparente. Las

lesiones nerviosas periféricas no son características de la leucosis linfoide, como lo son en la EM. La mayor dificultad consiste en distinguir entre la leucosis linfoide y las formas de EM que se ven a veces en aves adultas, en las que el tumor es linfoblástico con una marcada inflamación del hígado y ausencia de lesiones nerviosas. Entonces puede ser necesario acudir a técnicas especializadas, como la detección por inmunofluorescencia de los antígenos de células T activadas presentes en la superficie de células tumorales de EM (antígeno superficial asociado a tumores de EM, o MATSA), o de antígenos de células B o IgM en las células tumorales de la leucosis linfoide. Sin embargo, se puede realizar normalmente un diagnóstico basado en lesiones gruesas y en histopatología cuando se examinan post-mortem varias aves afectadas.

Las lesiones nerviosas y las proliferaciones linfomatosas inducidas por algunas cepas del virus de la reticuloendoteliosis son similares a las que se presentan en la EM, tanto a nivel global como microscópico.

Aunque el virus de la reticuloendoteliosis no es común entre las aves de corral, debería tenerse en cuenta como una posible causa de tumores linfoides; su reconocimiento depende de pruebas virológicas y serológicas en las aves. El virus de la reticuloendoteliosis también puede causar una enfermedad neoplásica en pavos, patos, codornices y otras especies. También los retrovirus pueden originar una enfermedad proliferativa linfoide en los pavos. Aunque los pollos pueden ser seropositivos para el virus de la reticuloendoteliosis, la enfermedad neoplásica es rara. Las principales características para un diagnóstico diferencial entre EM, leucosis linfoide y reticuloendoteliosis. No existen riesgos sanitarios conocidos para la salud humana cuando se trabaja con el virus de la MD (MDV) o con el herpesvirus relacionado de pavos (HVT).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

La infección de una población por MDV puede detectarse aislando el virus de tejidos de pollos infectados. Las fuentes más usadas son leucocitos de muestras de sangre con heparina o suspensiones de células de linfoma o de bazo. Se sugiere que, cuando estas muestras se toman en el campo, se transporten al laboratorio en condiciones refrigeradas. Como el MDV está muy asociado a células, es importante que estas suspensiones contengan células viables. Las suspensiones se inoculan en cultivos celulares en monocapa de células de riñón de pollo o fibroblastos de embrión de pato (los fibroblastos de embrión de pollo son menos sensibles para el aislamiento primario del virus). Los virus de serotipo 2 y 3 (ver Sección C.1.a) son más fáciles de aislar en fibroblastos de embrión de pollo que en células de riñón de pollo. Normalmente se inoculan 0,2 ml de una suspensión que contenga 10⁶–10⁷ células vivas en monocapas duplicadas crecidas en placas de plástico para cultivo celular (de 60 mm de diámetro). Los cultivos inoculados y los no inoculados como control, se incuban a 38.5°C en un incubador con humedad que contenga 5% de CO₂. Alternativamente, se pueden utilizar recipientes de cultivo cerrados. El medio se reemplaza cada dos días. Las áreas con efecto citopático, denominadas placas, aparecen a los 3–5 días y se pueden contar a los 7–10 días.

A efectos de diagnóstico, otra fuente menos común de MDV son los extremos de las plumas, de las que se puede extraer el MDV libre de células. Los extremos de

5 mm de largo, o trozos de piel cortados que contengan los extremos de las plumas, se suspenden en un tampón SPGA/EDTA (sacarosa, fosfato, glutamato y albúmina/ ácido etilén diamino tetra-acético) para la extracción y titulación del MDV libre de células (6). El tampón se hace así: 0,2180 M de sacarosa (7.462 g), 0,0038 M de fosfato monopotásico (0,052 g), 0,0072 M de fosfato dipotásico (0,125 g); 0,0049 M de L-glutamato monosódico (0,083 g); 1% de albúmina bovina en polvo (1 g); 0,2% de EDTA (0,2 g); y agua destilada (100 ml). El tampón se esteriliza por filtración y debe tener un pH aproximado de 6,5. Esta solución se somete a ultrasonificación y se filtra por filtros de membrana de 0,45 µm para inoculación en una monocapa de células de riñón de pollo desecada durante 24 horas. Después de una absorción de 45 minutos, se añade medio y el cultivo se incuba como antes durante 7–10 días.

Utilizando estos métodos, se pueden aislar los serotipos 1 y 2 de MDV, junto con el HVT (serotipo 3), si está presente a consecuencia de una vacunación. Con experiencia, se pueden diferenciar de modo muy ajustado las placas causadas por los diferentes serotipos de virus teniendo en cuenta el tiempo de aparición, la velocidad de desarrollo y la morfología de las placas. Las placas de HTV aparecen antes y son mayores que las de serotipo 1, mientras que las placas de serotipo 2 aparecen más tarde y son más pequeñas que las de serotipo 1.

Las placas causadas por el MDV y el HVT pueden identificarse como tales utilizando anticuerpos fluorescente específicos obtenidos en pollos. También se pueden utilizar anticuerpos monoclonales para diferenciar los serotipos (16,28).

• **Reacción en cadena de la polimerasa**

Se han secuenciado los genomas de los tres serotipos (1, 15, 17). Se han descrito pruebas mediante la reacción en cadena de la polimerasa que permiten distinguir algunas cepas oncogénicas y no oncogénicas de MDV de serotipo 1, y de cepas vacunales de los serotipos 2 y 3 (2, 3, 27, 34). También se puede utilizar la PCR para cuantificar la concentración de virus en los tejidos (3, 4, 24) o para la detección diferencial de MDV y HVT en la sangre o en el extremo de las plumas (11, 13).

2. Pruebas serológicas

La presencia de anticuerpos contra el MDV en pollos no vacunados de unas dos semanas de edad constituye una indicación de infección. Antes de esa edad tales anticuerpos pueden representar una transmisión materna de anticuerpos a través de la yema vitelínica y no constituyen una prueba de infección activa.

Normalmente los virus, los antígenos y los antisueros están disponibles en los laboratorios de referencia de la OIE para la Enfermedad de Marek (ver Cuadro en la Parte 3 de este Manual), pero aún no se han fabricado reactivos estandarizados internacionalmente.

a) Inmunodifusión en medio sólido

No hay ninguna prueba prescrita para comercialización, pero para detectar anticuerpos normalmente se emplea la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IGDA). La prueba se hace en portas de vidrio que contienen agar al 1% en solución salina tamponada con fosfato que contiene 8% de cloruro sódico. Se

llenen pocillos adyacentes con antígeno o suero y se incuban a 37°C durante 24 horas en un incubador con humedad para que tenga lugar la difusión; los sueros positivos muestran reacciones de identidad con muestras conocidas de suero positivo y antígeno. El antígeno usado en esta prueba consiste en células rotas de cultivos celulares infectados por el MDV o un extracto de extremos de plumas, o piel de animales infectados por MDV que contenga zonas plumosas. El antígeno del cultivo celular se prepara propagando el MDV en células de riñón de pollo o fibroblastos de embrión de pollo. Cuando el efecto citopático muestra confluencia, las células se separan del recipiente del cultivo y se suspenden en medio de cultivo o en solución salina tamponada con fosfato sin caldo de triptosa fosfato (la presencia de caldo de triptosa fosfato puede producir líneas inespecíficas de precipitación a una concentración aproximada de 1×10^7 células/ml. Luego esta suspensión se congela y descongela tres veces y se usa como antígeno.

• Procedimiento de la prueba

- i) Hacer una solución de Bactoagar de Difco al 1% en cloruro sódico al 8%, poniendo la mezcla al baño maría.
- ii) Pipetear 4 ml de la solución de agar sobre portas para microscopio de 7.5 cm x 2,5 cm y dejar reposar.
- iii) Cortar agujeros sobre al agar utilizando un molde y un agujereador de corcho No.1. El diámetro de los pocillos debe ser 5 mm., y los pocillos deben estar separados 2 mm. Eliminar los bloques de agar resultantes con un palito de algodón o una plumilla.
- iv) Pipetear los sueros problema en los pocillos de las filas de abajo y de arriba, y suero estándar positivo y antígeno alternativamente en la fila central.
- v) Incubar el porta 24 horas a 37°C en un recipiente con humedad y leer los resultados sobre una lámpara en una habitación a oscuras.

Se puede utilizar una variación de la prueba IGDA para detectar el antígeno MDV en extremos de plumas como una indicación de infección por MDV. Se preparan portas de vidrio con agarosa al 0.7% (por ejemplo, A37) en cloruro sódico al 8%, que contengan el antisuero contra MDV. Se toman los extremos de pequeñas plumas de los pájaros a examinar y se insertan verticalmente en el agar, manteniéndose los portas como se ha indicado antes. El desarrollo de zonas radiales de precipitación alrededor de los extremos de las plumas denota la presencia de antígeno NDV en la pluma y, por lo tanto, la infección del ave.

b) Otras pruebas

Otras pruebas para detectar anticuerpos contra MDV son las pruebas de inmunofluorescencia directa e indirecta. Éstas demuestran la capacidad de un determinado antisuero para marcar las placas de MDV en cultivos celulares (16, 29). Estas pruebas son específicas para cada grupo y más sensibles que la prueba IGDA. También se puede emplear una prueba de neutralización para ver la capacidad que tiene un suero para neutralizar la propiedad del MDV de formar placas (5). Sin embargo, esta prueba es más adecuada para propósitos de investigación que para el diagnóstico rutinario. Hay disponible un

enzimoinmunoensayo (ELISA) para detectar anticuerpos contra MDV (7, 12). En la preparación de antígeno para la prueba ELISA, se recubren los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con fibroblastos de embrión de pollo infectados por MDV. Se han publicado los detalles del procedimiento (7, 25).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

Los productos biológicos comercializados para controlar la EM son virus vivos MVD o HVT respectivamente (11) asociados a células o libres de células (liofilizados) (ver más adelante). Aunque se han desarrollado vacunas recombinantes por ingeniería genética (20,23), no están en uso comercial en la actualidad. Las vacunas contra la enfermedad de Marek se inyectan in ovo el día 17 o 18 de la embriogénesis (26) o subcutáneamente después del nacimiento.

1. Control del inóculo

a) Características del inóculo

Los virus del grupo MDV se clasifican en tres serotipos –1, 2 y 3– por su relación antigénica.

Serotipo 1: Éste incluye todas las cepas patógenas del virus, desde las cepas que son muy muy virulentas (por ejemplo, la 648A), hasta las muy virulentas (Md/5, Md/11, Ala–8, RB–1B), las virulentas (HPRS–16, JM GA), las de virulencia media (HPRS–B14, Conn A), y finalmente las débilmente virulentas (CU–2, CVI–988).

Estas cepas se pueden atenuar por pases en cultivos celulares, perdiendo las propiedades patogénicas pero con retención de la inmunogenicidad, originando cepas que se han usado como vacunas. Entre las usadas comercialmente se encuentran las cepas atenuadas HPRS–16 y CVI–988 (Rispens). Las variantes atenuadas de las cepas muy virulentas se han usado como vacunas experimentales para proteger contra la forma aguda de EM causada por las cepas muy virulentas, y la cepa vacunal R2/23 derivada de la Md/5 está autorizada en los Estados Unidos de América. Las vacunas contra el serotipo 1 se preparan en forma asociada a células (“mojadas”) y deben mantenerse en nitrógeno líquido.

Serotipo 2: Éste incluye cepas naturales avirulentas de MDV (como por ejemplo, SB–1, HPRS–24, 301B/1, HN–1) y se ha visto que algunas de éstas confieren protección contra las cepas virulentas. Las cepas SB–1 y 301B/1 se utilizan comercialmente, en particular con HVT, en forma de vacunas bivalentes para protección contra las cepas muy virulentas. Las vacunas de serotipo 2 solo existen en forma asociada a células.

Serotipo 3: Éste contiene las cepas de HVT naturales avirulentas (como la FC126, PB1) que se utilizan mucho como vacuna monovalente, y también en combinación con cepas de serotipo 1 y 2 como vacunas bivalentes o trivalentes contra las cepas muy virulentas de MDV. Se puede preparar HVT en forma libre de células como una vacuna liofilizada o bien en forma asociada a células (“mojada”).

b) Método de cultivo

Los substratos usados para la producción comercial de vacuna son fundamentalmente fibroblastos primarios de embrión de pollo (CEF) derivados de aves libres del patógeno específico (SPF) o fibroblastos de embrión de pato. Los

CEF de aves SPF son preferibles a las células de pato porque se conoce más sobre de los patógenos transmitidos por el embrión de pollo y sobre los métodos de su detección.

c) Validación como vacuna

Hay métodos disponibles para ensayar las aves SPF en cuanto a ausencia de infección (19,39). Los pollos de aves SPF deben estar libres de adenovirus aviáres, incluyendo el virus 76 del síndrome de la puesta, del virus de la encefalomiélitis aviar, los virus de la leucosis aviar (subgrupos A, B y J), el virus de la nefritis aviar, los reovirus y rotavirus aviáres, el virus de la anemia del pollo, el poxvirus de la gallina, el virus de la bronquitis infecciosa, el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa, el virus de la laringotraqueitis infecciosa, el virus de la gripe tipo A, MDV, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la reticuloendoteliosis, *Salmonella* spp, y virus de la rinotraqueitis del pavo. Las poblaciones de patos SPF deben carecer de adenovirus aviáres, reovirus aviáres, *Chlamydia*, virus de la enteritis del pato, virus tipo I y II de la hepatitis del pato, virus de la gripe tipo A, virus de la enfermedad de Newcastle, *Pasteurella* (ahora *Riemerella*) anatipestifer, virus de la reticuloendoteliosis, e infecciones por *Salmonella*. También puede ser necesario determinar la ausencia de otras infecciones a medida que se vayan reconociendo. Para comprobar que el inóculo primario del virus no es patógeno para los pollos, se inocular diez veces la dosis de campo en pollos SPF de 1 día susceptibles a la EM, para asegurar que no causa lesiones globales o microscópicas significativas debidas a la EM cuando tengan 120 días de edad. Debe advertirse que algunas cepas vacunales de MDV y HTV pueden producir lesiones nerviosas microscópicas leves y transitorias en estas circunstancias.

No debe ocurrir un aumento de la virulencia después de seis pases seriados de la cepa vacunal en pollos SPF de 1 día susceptibles a la EM. Primero se inocular diez veces la dosis de campo y luego se hacen los pases inoculando sangre con heparina a intervalos de 5–7 días, y realizando pruebas de viremia para comprobar que el virus se transfiere en cada pase. Las aves que reciben el último pase se mantienen durante 120 días y deben carecer de lesiones de la EM. No obstante, algunas cepas como la de Rispen, pueden originar lesiones leves de EM. La cuestión clave es que la virulencia no debe variar. Ésta es una prueba difícil porque la resistencia genética de los pollos influye fundamentalmente en la virulencia aparente de los virus, y, por tanto, en el tipo de inóculo. Después de superar con éxito las pruebas de inocuidad de laboratorio, se debe confirmar la inocuidad de la cepa en numerosos ensayos de campo. El virus de inóculo debe estar libre de los agentes señalados para poblaciones SPF y de otros contaminantes que se puedan adquirir en el laboratorio. Una cepa vacunal que derive de pavos debe carecer también del virus de la enfermedad linfoproliferativa y del virus de la enteritis hemorrágica.

Se debe determinar la capacidad del virus del inóculo primario –y de los virus derivados después de los pases usados para producir el virus vacunal (por lo general, no más de cinco pases en cultivo de tejidos) – para proteger contra la EM. Se han publicado pruebas de protección estandarizadas. Implican la vacunación de pollos SPF de 1 día susceptibles a la EM y reinoculación de desafío 8 días después con suficiente MDV como para causar al menos un 70% de incidencia de

EM en pollos no vacunados. Se utilizan dos tipos de prueba. En la prueba del índice de protección, se vacuna con una sola dosis de campo (1000 PFU) (unidades formadoras de placas) y se compara la aparición de EM en aves vacunadas y no vacunadas. Los índices de protección deben ser superiores a 80, es decir, las aves vacunadas deben mostrar al menos un 80% de reducción en la aparición de EM en comparación con los controles no vacunados.

También se usa una prueba PD50 (dosis media de protección), que supone la inoculación de cinco diluciones seriadas de vacuna, a un cuarto cada dilución, elegidas para dar protección por encima y por debajo del 50%, y luego proceder a un inóculo de desafío 8 días después para determinar el valor PD50.

Los ensayos se realizan utilizando una vacuna estándar de referencia como comparación. La PD50 puede ser tan baja como 4 PFU, pero se pueden obtener valores superiores dependiendo de la cepa vacunal, de si libre de células o está asociada a células, y de la presencia o ausencia de anticuerpos maternos en los pollos de ensayo. Con los datos de la prueba PD50, se ha sugerido que la dosis mínima de vacuna en condiciones de campo debe ser superior a dos valores: 103 PFU, o, 100 PD50.

Se deben hacer numerosos ensayos de campo en presencia del virus natural de desafío, utilizando diferentes razas de aves con un estado variable en cuanto a anticuerpos maternos contra el MDV, para asegurar la eficacia y duración de la inmunidad. La experiencia indica que la inmunidad por vacunación, una vez adquirida, dura toda la vida.

2. Método de fabricación

Las células usadas como substrato se siembran en recipientes de fondo liso para incubación estacionaria o en recipientes cilíndricos para incubación rotatoria. Los medios más usados son el medio mínimo de Eagle, o el medio 199, tamponado con bicarbonato sódico y suplementado con 5% de suero de ternero. La incubación se hace a 38–39°C durante 48 horas.

Para vacunas asociadas con células, los cultivos se infectan con stock del virus de siembra HVT o MDV para producción, en forma asociada a células, que por lo general tiene dos pases adicionales más que el stock primario de virus. Los cultivos se incuban 48 horas y luego se recogen las células tratando la monocapa celular lavada con una solución de EDTA/tripsina para favorecer que las células se despeguen. Los recipientes se devuelven al incubador (38.5°C) para permitir la liberación completa. Las células se someten a centrifugación a baja velocidad y después se resuspenden en una mezcla de congelación formada por medio de crecimiento con 7.5–15% de dimetil sulfóxido, y se mantienen a 4°C o se distribuyen de inmediato en los recipientes para la vacuna final, que suelen ser ampollas de vidrio, que se cierran a la llama y se congelan en nitrógeno líquido.

Las vacunas liofilizadas, sin células, se pueden preparar de cepas de HTV, pero no de cepas de MDV. Para la producción de esta forma de vacuna, los cultivos infectados por HTV se incuban 72 horas, las células infectadas se separan del recipiente como se indica arriba, o se raspan de las paredes del recipiente. Las células se suspenden en un volumen pequeño de medio de crecimiento, se centrifugan, y se resuspenden en una solución tamponada con estabilizador que contenga sacarosa al 8%, pero que esté libre de proteína para impedir la formación de espuma. La suspensión se sonica para liberar el virus y los restos

celulares se eliminan: luego, se diluye la suspensión con un estabilizador completo –como SPGA– añadido en los recipientes finales, y se liofiliza.

Las diluciones para las vacunas asociadas a células o para las libres de células se basan en la experiencia previa, como el número de dosis necesario por recipiente, ya que el contenido en virus del material recogido no se puede ensayar antes del llenado de los recipientes. La carga de virus del producto final se puede consignar luego en la etiqueta.

3. Control interno

Para tener óptimos resultados en la preparación de la vacuna asociada a células, es esencial una velocidad lenta de congelación (1–5°C por minuto) y una rápida descongelación. El título de infectividad de las células infectadas, y por tanto el número de dosis por ampolla, se determina después del llenado de las ampollas. De modo similar, el contenido en virus de la suspensión final de las vacunas liofilizadas, y por tanto el número de dosis por recipiente, se determinan tras el llenado.

4. Control de lotes

a) Identidad

Utilizando un suero neutralizante monoespecífico, se debe comprobar que el producto es de la misma Especificidad que el virus de inóculo. Esto se realiza mejor utilizando anticuerpos monoclonales.

b) Inocuidad y esterilidad

Se requiere realizar muchas pruebas sobre los materiales utilizados para producir la vacuna y sobre el producto final. Las células de substrato deben proceder de una población de aves SPF que estén libres de agentes transmitidos verticalmente. Las sustancias de origen animal usadas en la preparación de vacunas, como el suero, tripsina y seroalbúmina bovina, deben carecer de agentes indeseables.

Los lotes de vacuna final producida deben probarse para ausencia de bacterias contaminantes, hongos, micoplasmas, y los virus indicados para poblaciones SPF; también deben realizarse pruebas de pureza de los diluyentes. Varias instituciones oficiales recomiendan pruebas adecuadas para la detección de agentes indeseables en todas las etapas de producción de vacunas (19, 21, 30). Se debe inocular diez veces la dosis vacunal, o una cantidad de diluyente equivalente a dos veces la dosis vacunal, en pollos SPF de 1 día. No deberían ocurrir reacciones adversas durante un período de observación de 21 días.

c) Potencia

La dosis estándar de cada tipo de vacuna es 1000 PFU por pollo o por huevo. Los ensayos sobre contenido vírico se realizan en lotes de vacuna para confirmar que se alcanzará la dosis correcta de vacuna por ave.

d) Duración de la inmunidad

Para la duración de la inmunidad sólo se realiza una prueba con el virus de inóculo. En apariencia, tal inmunidad es duradera para toda la vida.

e) Estabilidad

Las pruebas de estabilidad se hacen con seis lotes representativos de la vacuna para demostrar que se mantiene el título de virus durante la caducidad indicada para la vacuna. Estas pruebas deben realizarse bajo las condiciones de almacenamiento de la vacuna. El producto liofilizado debe tener una caducidad de 12 meses cuando se mantiene a 2–8°C. Los fabricantes pueden doblar el contenido de virus para compensar alguna pérdida en la titulación durante el almacenamiento. Se suministran líquidos adecuados para dilución con las vacunas asociadas a células y con las liofilizadas. Se debe probar la estabilidad de la vacuna reconstituida en un período superior a 2 horas.

f) Conservantes

No se incluyen conservantes en la vacuna o los diluyentes.

g) Precauciones (riesgos)

Con las vacunas asociadas a células, es necesario evitar daños en las ampollas, que pueden explotar al retirarlas del nitrógeno líquido. Se debe utilizar protección ocular. Durante el uso, las vacunas reconstituidas se deben mantener en frío, y las asociadas a células deben agitarse para mantener las células en suspensión.

HEPATITIS VÍRICA DEL PATO

La hepatitis del pato está causada por al menos tres virus diferentes, concretamente los virus de la hepatitis del pato (DHV) tipos I, II y III. El DHV de tipo I es el más común, y es un enterovirus. El DHV de tipo II se considera un astrovirus, y el DHV de tipo III se considera un picornavirus.

Estos virus que causan infecciones agudas no deberían confundirse con el virus de la hepatitis B del pato, un hepadnavirus clasificado en el mismo grupo que los virus de la hepatitis B de mamíferos. La relevancia de esta infección en el pato no se entiende completamente.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

a) DHV de tipo I

El DHV de tipo I causa una infección altamente contagiosa en los patos. Se desconoce su relevancia en la salud pública. La enfermedad consiste en una infección viral aguda, a menudo fatal, de propagación rápida en patitos jóvenes. Normalmente afecta a patitos por debajo de las 6 semanas de edad y a menudo más jóvenes. La enfermedad clínica se caracteriza por letargo y ataxia. Los patitos pierden su estabilidad, caen sobre sus costados y patean espasmódicamente antes de la muerte. Durante la muerte la cabeza se coloca hacia atrás en posición de opistotono. La secuencia completa de la enfermedad es rápida y puede durar no más de 1–2 horas. La mortalidad completa en una bandada tendrá lugar

prácticamente en 3–4 días, con la mayoría de las muertes en el segundo día. Los cambios patológicos patentes aparecen sobre todo en el hígado, el cual se encuentra agrandado y muestra hemorragias definidas puntuales y equimóticas. También puede ser aparente un aumento del tamaño del bazo e hinchazón de los riñones, junto con congestión de los vasos sanguíneos renales. Los cambios microscópicos en el hígado se caracterizan por la extensa necrosis de los hepatocitos y la hiperplasia del conducto biliar, junto con diversos grados de respuesta de inflamación celular y hemorragia.

Las observaciones clínicas y patológicas son altamente indicativas de una infección por DHV de tipo I. El virus puede ser recuperado fácilmente a partir del tejido hepático mediante homogenización como una suspensión al 20% (p/v) en tampón salino. La suspensión se clarifica y puede además tratarse (si se desea) con cloroformo al 5% (v/v) durante 10–15 minutos a temperatura ambiente. El DHV de tipo I es resistente a este tratamiento.

La presencia de DHV de tipo I se confirma generalmente mediante uno o más de los siguientes procedimientos:

i) Mediante inoculación subcutánea o intramuscular del aislado en patitos de entre 1 y 7 días de edad que son susceptibles a DHV de tipo I. Continuaría la enfermedad clínica característica, ocurriendo las muertes entre las 18–48 horas de la inoculación, y a menudo por debajo de las 24 horas. Los patitos deberían mostrar la patología evidente atribuible al DHV de tipo I. El virus debería ser reaislado a partir de los hígados.

ii) Mediante inoculación de diluciones seriadas del homogenizado de hígado en el saco alantoideo de huevos embrionados de pato (10–14 días) o huevos de pollo (8–10 días). Los embriones de pato mueren entre 24 y 72 horas más tarde, mientras que los embriones de pollo son más variables y erráticos en su respuesta, y usualmente tardan 5–8 días en morir. Los cambios patológicos evidentes en los embriones incluyen atrofia y hemorragias subcutáneas en todo el cuerpo, especialmente con edema en la región abdominal y extremidades posteriores. Los hígados de los embriones pueden estar rojos, amarillentos e hinchados, y mostrar algunos focos necróticos. En los embriones que tardan más tiempo en morir el color verdoso del alantoide es más pronunciado, y las lesiones hepáticas y la atrofia se hacen más evidentes.

iii) Mediante inoculación en cultivos primarios de células de hígado de embrión de pato (DEL), los cuales son particularmente sensibles (10). Las diluciones del homogenizado de hígado que contienen DHV de tipo I causan un efecto citopático (ECP) que se caracteriza por el redondeo celular y la necrosis. Cuando se cubre con un medio de mantenimiento que contiene un 1% de agarosa, el ECP da lugar a placas de diámetro de aproximadamente de 1 mm.

• Ensayos inmunológicos

Estas pruebas no se han utilizado extensivamente para la identificación de rutina de la infección por DHV de tipo I. Se han descrito varios ensayos de neutralización viral (NV), los cuales pueden tener una mayor importancia si las infecciones por los DHV de tipo II y III llegan a generalizarse. Las pruebas que se han descrito (2, 10–12) incluyen:

i) La inmunización pasiva subcutánea de patitos de 1–7 días de edad susceptibles frente a DHV de tipo I con 1–2 ml de suero específico hiperinmune, o anticuerpo

específico de yema de huevo. Estos patitos se estimulan intramuscularmente o subcutáneamente 24 horas más tarde con al menos 103.0 LD50 (50% de la dosis letal) del aislado viral. De manera similar se estimula un grupo de patitos no inoculados. La identificación de la infección se basa en la supervivencia de un 80–100% de los patitos inmunes pasivamente y el 80–100% de mortalidad en los controles.

ii) Se descargan intramuscularmente o subcutáneamente patitos de 1–7 días de edad, susceptibles a DHV–I e inmunes por vía materna a DHV de tipo I, con al menos 103.0 LD50 del aislado viral. La identificación se basa en las pérdidas del 80–100% de los patitos susceptibles y la supervivencia del 80–100% de los patitos inmunes por vía materna.

iii) Se mezclan diluciones seriadas decimales del aislado viral con volúmenes iguales de suero hiperinmune específico frente a DHV de tipo I y diluidos 1/5 y 1/10. Las muestras se dejan reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora, y entonces se inoculan (0.2 ml) subcutáneamente en patitos susceptibles, y también en la cavidad alantoidea (0.2 mL) de huevos de pato embrionados, y en cultivos primarios de monocapas de células DEL. En cada caso los controles consisten en el aislado viral mezclado con el suero control.

Existe escasa evidencia de variación antigénica entre los aislados de DHV de tipo I. Sin embargo, una variante, el DHV de tipo Ia, aislado en los Estados Unidos de América (USA), solamente reacciona parcialmente con el virus clásico de tipo I en pruebas cruzadas de neutralización de suero (7, 13). Se han descrito otras variantes en India y Egipto, pero no se conoce más sobre ellas.

b) DHV de tipo II

La infección de los patos por DHV de tipo II solamente se ha descrito en el Reino Unido (1, 4). Se trata de una infección aguda y fatal de los patitos que produce unos signos clínicos y patológicos similares al DHV de tipo I. Las aves afectadas pueden mostrar signos de polidipsia y normalmente mueren entre 1–2 horas después de mostrarse enfermos.

Los cambios patológicos generales incluyen hemorragias múltiples, bandas puntuales y confluentes en el hígado, riñones pálidos e hinchados con vasos sanguíneos congestionados, y bazo hipertrofiado. A menudo el tracto alimentario se encuentra vacío, aunque el intestino delgado puede contener moco, y ocasionalmente se observan zonas hemorrágicas. Ocasionalmente se observan hemorragias petequiales en el corazón. Histológicamente, los cambios en el hígado son parecidos a los observados en infecciones por DHV de tipo I; el alcance de la hiperplasia del conducto biliar puede ser mayor que con el DHV de tipo I, pero esto es relativo. La microscopía electrónica de preparaciones del hígado y fecales ha puesto de manifiesto partículas virales de 28–30 nm de diámetro con una morfología que recuerda la de los astrovirus (4).

El virus se puede recuperar en suspensiones homogenizadas de hígado al 20 % (p/v) en tampón salino. Se puede utilizar para inocular:

i) patitos susceptibles, en los que la respuesta puede ser variable. Puede aparecer un porcentaje de mortalidad de hasta un 20% en un periodo de 2–4 días. La patología general es similar a la observada en casos de campo (4). Esto contrasta con las características de la infección por DHV de tipo I, que es más virulenta y rápida en sus efectos.

ii) huevos de pollo o pato embrionados, bien por vía de la cavidad amniótica o en el saco de la yema. Pueden responder de manera imprevisible después de cuatro pases, pero pueden no observarse muertes durante los pases más tempranos. Los embriones tardan 6–10 días en mostrar evidencia de infección; cuando esto ocurre existe atrofia con hígados verdes necróticos.

• **Ensayos inmunológicos**

Los ensayos inmunológicos no se han empleado rutinariamente ya que la respuesta serológica en los patitos y embriones de pato frente a la infección es pobre. Sin embargo se ha aplicado un ensayo de neutralización (4) para la identificación del virus inoculando embriones de pollo en la cavidad amniótica con mezclas de suero constante/virus variable.

Se han llevado a cabo pruebas de protección cruzada en patitos de 2–4 días de edad (4); se inoculan con antisuero frente a los tipos I o II y se estimulan 3 días más tarde con el aislado viral. Esta técnica puede distinguir el DHV de tipo II de los tipos I y III.

c) DHV de tipo III

El DHV de tipo III ha sido descrito solamente en EE.UU. Aparecen pérdidas de hasta el 20% en patitos inmunes al DHV de tipo I (5, 8). El DHV de tipo III causa una infección aguda en patitos jóvenes con signos clínicos similares a los observados en las infecciones de de tipo I.

La patología general es también parecida a la infección de de tipo I. La superficie del hígado es pálida y vetada con muchas bandas rojas y algunas hemorragias petequiales. El bazo está más pálido, aunque no notoriamente hinchado, y los riñones pueden mostrar una congestión desigual.

El virus se puede recuperar a partir de suspensiones homogenizadas de hígado y es resistente al tratamiento con cloroformo al 5%. El virus se puede aislar:

i) Inoculando intramuscularmente el aislado en patitos susceptibles. El porcentaje de mortalidad puede alcanzar un 20%, con un 60% de morbilidad. No aparecen muertes durante las primeras 24 horas y todas las pérdidas siguen entre el día 2 y 4 después de la inoculación. La inoculación intravenosa es más efectiva; la infección de tipo III es menos virulenta que la de tipo I.

ii) Inoculando el aislado en la membrana corioalantoidea (CAM) de huevos embrionados de pato de 10 días de edad. La respuesta es imprevisible, pero siempre se dan algunas muertes del embrión entre 7–10 días. Las membranas adoptan un aspecto seco y crujiente, por debajo de ellas se encuantran edematosas. Los embriones pueden encontrarse atrofiados y edematosos con hemorragias en la piel. El hígado, riñones y bazo están hinchados.

Los intentos para cultivar el virus en huevos de gallina no han tenido éxito.

Los intentos con el virus para inducir una ECP en cultivos de tejidos no han tenido éxito, pero el virus ha sido detectado mediante inmunofluorescencia indirecta en cultivos en monocapa de células DEL y riñón de embrión de pato (DEK) infectadas experimentalmente.

2. Pruebas serológicas

Estas pruebas no se emplean para el diagnóstico ya que la enfermedad clínica es demasiado aguda.

Los tres tipos de DHV se han utilizado en ensayos de neutralización de virus in ovo, pero su éxito depende de la expresión del virus en el sistema de ensayo utilizado; con los virus de tipo II y III esto puede ser un problema. Se han desarrollado pruebas in-vitro para el DHV de tipo I; incluyen un ensayo de reducción de placa y una prueba de microtitulación (10, 11). El ensayo de reducción de placa se puede realizar utilizando bien células DEK o DEL. Se preparan cultivos monocapa de células primarias en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) que contiene suero bovino fetal (FCS) al 5–10%, glutamina 2mM, 0.17% de bicarbonato sódico y gentamicina. Las células tripsinizadas se siembran en placas de Petri de 5 cm de diámetro, y se incuban a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las monocapas deberían estar casi confluentes a las 24–48 horas post-siembra. Las monocapas se lavan dos veces con MEM libre de suero o solución balanceada salina de Hank para eliminar toda traza de FCS antes de infectar con el DHV de tipo I. Se mezclan volúmenes iguales de DHV de tipo I resuspendido en MEM libre de suero y ajustado a 200 unidades formadoras de placa (PFU) por 0.1 ml con volúmenes iguales de suero de pato diluido seriadamente (diluciones dobles en MEM). Las muestras de suero deberían inactivarse a 56°C durante 30 minutos antes de probarse. Las mezclas virus/suero se incuban a 37°C durante 1 hora, y entonces se añaden alíquotas de 0.1 ml a las monocapas celulares confluentes, a tres placas por dilución. Las placas se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente (20–22°C), y entonces se recubren con medio de mantenimiento con agarosa (MEM que contiene suero de pollo al 2% y 0.1–0.2% de FCS al que se ha añadido agarosa hasta una concentración final del 1% [p/v]). las placas se colocan entonces a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Se registra el número de placas producidas después de una incubación de 48 horas. Las placas pueden observarse utilizando una fuente de luz indirecta, o alternativamente las monocapas se pueden fijar con tampón salino con formol al 10% y ser teñidas con cristal violeta al 1%. Los títulos séricos del anticuerpo se expresan como el inverso de la dilución más alta de suero que reduce el conteo de placas en un 50%.

Se puede llevar a cabo un ensayo de neutralización por microtitulación empleando células primarias DEK. Se preparan diluciones seriadas dobles de cada muestra de suero (inactivado por calor) en 50 µl de medio basal de Eagle (BME) libre de suero en placas de microtitulación. Se añaden a cada pocillo aproximadamente 102.0 DIC50 (50% de la dosis infectiva de cultivo celular) unidades de DHV de tipo I en 50 µl de BME, y las mezclas se dejan reaccionar a 37°C durante 1 hora. Las células primarias DEK se resuspenden en BME suplementado con caldo de triptona fosfato al 10%, 2mM glutamina, 0.17% de bicarbonato sódico y 2–4% de suero de pollo, y se ajustan para contener 3 x 10⁵ células/ml. Se añaden las células a las placas a 100 µl por pocillo, y las placas se incuban hasta 96 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Después de la incubación, las células se fijan con tampón salino con formol al 10% y se tiñen con cristal violeta al 1%. Las placas se leen entonces macroscópicamente. El título de la actividad neutralizante del virus se expresa como el inverso de la dilución más alta de suero a la que creció una monocapa, es decir, no existe evidencia de ECP y por tanto ha tenido lugar la neutralización completa del virus. Un título menor de log₂ 4 se considera negativo.

Estas pruebas de neutralización se han usado para probar las respuestas inmunes humorales frente a la vacunación y para encuestas epidemiológicas, así como para la identificación del virus.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

El DHV tipo uno puede controlarse mediante el uso de una vacuna viral viva atenuada. Se administra a patos reproductores de manera que la inmunidad se transmite a través de la yema a las aves recién salidas del huevo. La vacuna viral viva también puede utilizarse para inmunizar activamente patitos recién salidos del huevo susceptibles a DHV de tipo I (3). También es efectiva una vacuna inactivada de DHV de tipo I cuando se administra a patos reproductores que han sido sensibilizados con la vacuna viva o expuestos previamente en el ambiente a DHV de tipo I; la progenie de estos reproductores recibe inmunidad vía materna (11). Los patos también pueden ser protegidos pasivamente mediante inoculación de anticuerpos de la yema de huevo de pollo.

Se ha utilizado una vacuna viva de virus DV de tipo II para proteger a los patitos únicamente bajo condiciones experimentales (4).

Las infecciones por DHV de tipo III han sido controladas mediante el uso de vacunas de virus vivos atenuados administradas a patos reproductores, de forma que la inmunidad se transfiere a través de la yema a los patitos eclosionados.

Las guías para la producción de vacunas veterinarias se dan en el Capítulo I.1.7. Principios de producción de vacunas veterinarias. Las directrices dadas aquí y en el Capítulo I.1.7 están destinadas a ser de naturaleza general y pueden ser complementadas por requisitos nacionales o regionales.

1. Control del inóculo

a) Características del inóculo

La vacuna del virus de tipo I más comúnmente utilizada en Europa está derivada de un aislamiento pasado en huevos embrionados de pollo 53–55 veces, el de EE.UU. para vacunas vivas e inactivadas se ha pasado 84–89 veces.

El inóculo del virus de tipo II se originó a partir de un aislamiento atenuado mediante 25 pases seriados en huevos embrionados de pollo (1), y ha sido utilizado experimentalmente sólo bajo condiciones de campo (R.E. Gough, comunicación personal).

El inóculo de la vacuna de tipo III ha sido atenuado mediante 30 pases seriados en huevos de pato embrionados inoculados vía CAM.

b) Método de cultivo

Los inóculos de los virus tipos I y II se manejan de manera similar. Deberían prepararse en huevos embrionados de pollo específicamente libres de patógenos (SPF) de 8–10 días de edad a través de la ruta alantoidea, e incubados a 37°C. Se pueden almacenar como homogenizados de embrión en tampón salino a –70°C o a una temperatura menor durante varios años.

El virus de tipo III se prepara en embriones de pato de 10 días de edad, inoculados en la CAM, e incubados durante 6–10 días a 37°C. Se puede

almacenar como un homogenizado de la CAM y los embriones a -70°C o a menor temperatura.

c) Validación como vacuna

Todos los inóculos de los virus deberían encontrarse libres de virus externos que son patógenos para los patos, pollos o pavos. Los inóculos deberían encontrarse libres de toda contaminación microbiológica y fúngica.

En el caso de patitos recién salidos del huevo, el DHV de tipo I vivo atenuado se replica rápidamente y resulta en inmunidad entre las 48–72 horas de la vacunación. Esta inmunidad persiste durante el tiempo de vida susceptible (3). Sin embargo, en patitos protegidos mediante vacunación de sus padres, el nivel de inmunidad derivada a través de la madre disminuye durante las 2 primeras semanas de vida, aunque dichos patitos pueden ser reinmunizados activamente con virus atenuado administrado subcutáneamente u oralmente alrededor de los 7–10 días de edad (6, 9). Alternativamente, la inmunidad se puede mejorar mediante la administración de suero específico hiperinmune o de anticuerpo de yema de huevo preparado a partir de huevos puestos por pollos inmunizados activamente frente a DHV de tipo I.

Los patos reproductores estimulados con DHV de tipo I vivo y administrados intramuscularmente con una dosis única de vacuna de tipo I inactivada produjeron una progenie inmune vía materna a través de un ciclo completo de puesta (11).

2. Método de fabricación

Los virus de DHV tipos I y II se manejan de forma similar. La vacuna se produce en huevos embrionados de pollo SPF de 8–10 días de edad inoculados a través de la ruta alantoidea e incubados a 37°C . Las mayoría de las muertes de los embriones ocurren entre 2–3 días en el caso del DHV de tipo I, pero con el de tipo II las muertes no ocurren hasta 6–10 días después de la inoculación, aunque se recogen a los 3–5 días para obtener un máximo rendimiento de virus. Los concentrados de embriones se homogenizan en tampón salino y se clarifican mediante centrifugación a baja velocidad. La preparación se diluye apropiadamente y se distribuye en viales que preferiblemente se congelan rápidamente a -70°C o a menor temperatura. Posteriormente se pueden almacenar de manera satisfactoria entre -20 y -40°C . La vacuna atenuada de DHV de tipo I también se encuentra disponible como una preparación liofilizada que puede almacenarse a $2-8^{\circ}\text{C}$. La vacuna reconstituida se puede utilizar con o sin la incorporación de hidróxido de aluminio en el diluyente.

En el caso de la vacuna inactivada de DHV de tipo I, los concentrados de embriones se homogenizan y clarifican mediante centrifugación a baja velocidad y posteriormente se purifican mediante tratamiento con cloroformo (concentración final del 10% [v/v]). Entonces esta preparación se inactiva con etilenimina binaria (BEI) recién preparada. El virus inactivado se mezcla con un adyuvante como el LSE–STM1; y como conservante se añade un 0.2% (v/v) de formol (11).

La vacuna de tipo III se prepara en huevos de pato SPF de 10 días de edad inoculados a través de la CAM con DHV de tipo III atenuado, e incubados a 37°C . La mayoría de las muertes de los embriones ocurren entre 6 y 10 días. Los huevos que contienen los embriones muertos junto con sus CAMs se concentran y homogenizan en tampón salino y se clarifican mediante centrifugación a baja

velocidad. La preparación se diluye adecuadamente y se dispensa en viales que preferiblemente se congelan rápidamente a -70°C o a menor temperatura.

La vacuna se produce en huevos de pollo embrionados de 8–11 días de edad inoculados en la CAM e incubados a 37°C . La mayoría de las muertes del embrión ocurren entre las 48 y 96 horas después de la inoculación. Se centrifugan los embriones, sus CAMs y los fluidos corioalantoideos, se juntan y se homogenizan en tampón salino, y se clarifican mediante centrifugación a baja velocidad (1800 g). La preparación se diluye apropiadamente y se incorpora un estabilizante. Entonces se reparte en viales y preferiblemente se congelan rápidamente a -70°C o a menor temperatura.

• **Anticuerpo de yema de huevo**

El DHV de tipo I virulento preparado a partir de hígados de patitos o el virus atenuado se puede utilizar para hiperinmunizar pollos SPF con vistas a la producción de anticuerpo en yema de huevo. Se recogen los huevos a partir de aves hiperinmunizadas y se almacenan a 4°C hasta el momento de la producción. Se separan las yemas, se juntan y se mezclan con un agente antiespumante. La mezcla se diluye con tampón salino que contiene no más de un 0.2% (v/v) de formol como conservante. El producto dispensado se almacena a 4°C y tiene una vida media de 1 año. Se llevan a cabo pruebas de esterilidad de forma habitual para garantizar la ausencia de contaminantes.

3. Control interno

Todo embrión dentro de las 24 horas de inoculación debe ser descartado por muertes no específicas.

La identidad del tipo de virus debe ser confirmada mediante prueba de NV realizada con antisuero específico mediante método de suero constante/virus variante. En el caso de los Tipos de virus I y II, la prueba se realiza en huevos embrionados de pollo, con virus de Tipo III la prueba se realiza con huevos embrionados de pato. El antisuero debe reducir el título de virus específico por lo menos 10(2) ELD50 (59% dosis letal de embrión).

4. Control de lotes

a) Esterilidad

b) Inocuidad

Un grupo de patitos de 1–3 días de edad susceptibles al virus de que se trate debería inocularse subcutáneamente o intramuscularmente (en el caso de los tipos I y II), o subcutáneamente (en el caso del de tipo III), con la vacuna atenuada a diez veces la dosis recomendada, y mantenerlos bajo observación para la aparición de alguna reacción adversa entre 10 y 21 días. Las vacunas vivas atenuadas deberían ser estables y no revertir a virulentas en pases repetidos en patitos susceptibles.

1 Una preparación de *Salmonella typhimurium* (STM), un mitógeno de células B, en un sistema de emulsión lípido (LES). Disponible en Ribic Inmunochem Research, Hamilton, Montana 59840, USA

Se realiza una prueba de inocuidad con la vacuna inactivada de DHV de tipo I inoculando la dosis recomendada (0.5 ml) intramuscularmente en un grupo de patitos de un día de edad; no deberían observarse efectos adversos durante el periodo de prueba.

Las pruebas de inocuidad con el anticuerpo de yema de huevo se realizan inoculando subcutáneamente 1 ml en cada uno de los patitos de un grupo, los cuales se mantienen bajo observación de síntomas de efectos adversos durante 3 días.

c) Potencia

Para los virus DHV de los tipos I y II, el título viral de la vacuna debería determinarse en huevos de pollo embrionados de 8–10 días de edad inoculados en la cavidad alantoidea e incubados a 37°C. La inmunogenicidad de la vacuna para los patitos susceptibles a los virus de tipo I o II se puede valorar inoculando subcutáneamente un mínimo de 103.0 LD₅₀ de virus DHV virulento de tipo I o II por patito (3). Al menos deberían sobrevivir un 80% de las aves vacunadas y, en el caso del de tipo I, al menos un 80% de los controles deberían morir; en el caso del de tipo II, es más realista una mortalidad del 20% de los controles.

La inmunogenicidad de la vacuna inactivada se considera satisfactoria si se puede demostrar un incremento de cuatro o más veces en el título de neutralización del anticuerpo después de la administración a patitos que han sido previamente sensibilizados con el DHV de tipo I vivo atenuado.

Para el virus de tipo III, el título de la vacuna debería determinarse en huevos embrionados de pato de 10 días de edad inoculados en la CAM. Las pruebas de inmunogenicidad en patitos han mostrado ser difíciles debido a la patogenicidad variable del virus administrado en los patitos.

Los ensayos de potencia con el anticuerpo de yema de huevo se realizan determinando el índice de neutralización (NI) para el producto en huevos embrionados de gallina utilizando el método yema de huevo constante/ virus variable. Se considera satisfactorio un NI mínimo de 103.0. La eficacia del producto se determina inoculando un grupo de patitos susceptibles con la dosis recomendada de anticuerpo de yema de huevo. Se deja un segundo grupo sin tratar. Después de 24 horas cada grupo se inocula con virus DHV de tipo I virulento. El producto se declara eficaz si al menos sobreviven un 80 % de los patitos tratados y mueren al menos un 80% de los controles.

d) Duración de la inmunidad

Los patos reproductores administrados con vacuna viva atenuada de DHV de tipo I dos o tres veces a las 12, 8 y 4 semanas antes de entrar en la puesta, y los patos reproductores administrados con vacuna viva atenuada de DHV de tipo III dos veces en las semanas 12 y 4 antes de entrar en la puesta, deberían producir una progenie inmunizada pasivamente a lo largo de una temporada de cría. Sin embargo, por lo general se recomienda revacunar cada tres meses con vacuna DHV de tipo I y cada 6 meses con vacuna DHV de tipo III después del comienzo de la puesta. La vacuna atenuada de DHV de tipo I también puede ser suministrada como una preparación liofilizada que justo antes de la administración se mezcla con un diluyente que contiene hidróxido de aluminio. Esta se administra

a las 7 semanas de edad con una segunda dosis 2 semanas antes del comienzo de la puesta. Este método debería proporcionar inmunidad maternal a la progenie a lo largo de un ciclo completo de puesta. No existe información disponible sobre el uso de la vacuna de DHV de tipo II en patos reproductores.

La vacuna viva atenuada de DHV de tipo I o de tipo II administrada subcutáneamente o intramuscularmente a patitos de 1 día de edad protege frente a la enfermedad durante la duración de su susceptibilidad. No existe información disponible sobre el uso de la vacuna de DHV de tipo III para inmunizar activamente patitos de 1 día de edad.

Los patos sensibilizados con vacuna viva de DHV de tipo I, y administrados con una sola dosis intramuscular de vacuna inactivada de DHV de tipo I, deberían producir una progenie inmunizada maternalmente durante un ciclo completo de puesta (11).

El anticuerpo de yema de huevo ofrece inmunización pasiva en el inicio de un brote. La duración de su eficacia es efímera.

e) Estabilidad

Las preparaciones acuosas de las vacunas vivas atenuadas de DHV de tipo I, II y III deberían permanecer estables durante al menos 1 año cuando se almacenan congeladas a -70°C o a menor temperatura. Una vez descongeladas, estas vacunas deberían mantenerse a 4°C y ser usadas en una semana. Las vacunas vivas liofilizadas pueden almacenarse a $2-8^{\circ}\text{C}$ y deberían retener su potencia durante al menos 1 año.

La vacuna inactivada de DHV de tipo I se mezcla con un adyuvante y puede almacenarse a 4°C durante al menos 20 meses sin pérdida de inmunogenicidad.

El anticuerpo de yema de huevo puede almacenarse durante 1 año a 4°C .

f) Conservantes

No se añaden conservantes a las vacunas vivas atenuadas de DHV de tipo I, II y III.

Se añade formol (hasta un 0.2% [v/v]) a la vacuna inactivada de DHV de tipo I y a la preparación de anticuerpo en yema de huevo.

g) Precauciones (riesgos)

La vacuna inactivada de DHV de tipo I debería agitarse bien para asegurar que está completamente mezclada antes de usarse.

http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/

RINOTRAQUEÍTIS DEL PAVO

La Rinotraqueitis Aviar (ART) es una infección aguda y altamente contagiosa que afecta el tracto respiratorio de pavos y pollos. Fue descrita por primera vez en Sudáfrica en 1978, donde tuvo un efecto devastador en la industria del pavo, denominándose Rinotraqueitis del Pavo (TRT).

Posteriormente fueron reportados brotes de TRT en pavos de: Gran Bretaña (1985), Francia (1986), República Dominicana (1990), Brasil (1992), Taiwán (1994), Japón (1995), México (1996), España, Alemania, Hungría, Italia, Países Bajos (1997). En el año 1983 fue descrita en Sudáfrica una enfermedad llamada Síndrome de la Cabeza Hinchada de las gallinas; estudios realizados por Wyeth y col. (1987) en pollos con esta enfermedad, determinaron la presencia de anticuerpos contra el Pneumovirus aviar, implicándolo como causante de la misma (Nagaraja y col., 2001). Debido a la naturaleza altamente contagiosa de la enfermedad, se siguen detectando numerosos focos de la enfermedad en diversas zonas del mundo como países de África, Europa y Oriente Medio.

En la actualidad las empresas productoras avícolas consideran esta enfermedad como una de las principales amenazas sanitarias del futuro, indicando su gran potencial para instaurarse en forma endémica a nivel mundial, por lo que se han abocado a investigar en la prevención de la misma.

Agente etiológico

El agente etiológico primario de la Rinotraqueitis Aviar es el Pneumovirus aviar, virus ARN de la familia Paramixoviridae, subfamilia Pneumovirinae, subgrupos A y B, género Metapneumovirus (De Rosa, 2000). Es pleomórfico, mide de 80- 200 nm de diámetro, sensible a los disolventes lípidos orgánicos (éter y cloroformo).

Se inactiva a 56 C durante 30 minutos, es estable a pH de 3 a 9. Se distingue de otros Paramixovirus por el número de genes (10 en los Pneumovirus, 6-7 en otros Paramixovirus) y en la disposición de estos en el genoma del ARN (Yu y col. 1991).

A diferencia de otros miembros de la familia Paramixoviridae, Pneumovirus Aviar carece de la glicoproteína de membrana por lo que no presenta actividad de neuroaminidasa, tampoco presenta actividad de hemoaglutinina por lo que no tiene capacidad de aglutinar eritrocitos de pollo, ganso, cabra, cobayo o humanos (Pumarola, 1989, Álvarez y col. 2004).

Patogenia

El virus se replica en el tracto respiratorio superior (cornetes nasales, traquea) y en menor cantidad en pulmones y sacos aéreos de las aves principalmente entre la 5ta y 8va semana de edad. Está asociado a los cilios y células epiteliales ciliadas de los cornetes nasales y traquea, siendo el responsable directo de una lesión en el polo apical de las células epiteliales de vías respiratorias altas las cuales pierden los cilios. El virus penetra en el epitelio respiratorio, se multiplica y disemina por la nariz, traquea y resto del aparato respiratorio, además facilita el paso de otros virus y bacterias que darán lugar a procesos más graves.

Se ha observado que también se replica en tracto reproductor de aves adultas, donde coloniza, afectando pequeñas glándulas que excretan calcio y pigmentos durante la formación del huevo, lo cual causa despigmentación y anomalías del mismo. Esta condición va acompañada de ruidos respiratorios moderados y edema facial (Cook 2001).

La mayoría de de casos de aves infectadas con Pneumovirus aviar se complican con diversas infecciones bacterianas tales como: Escherichia coli, Bordetella avium, Ornithobacterium rinoatraqueale y Micoplasmas (Nagaraja y col. 2001; Jones, 2003), considerando entre las cepas mas patógenas las de E.coli, las

cuales actúan como oportunistas a nivel de fosas nasales y dan lugar a rinitis-sinusitis causando el típico signo de cabeza hinchada.

A partir de aquí pueden pasar a través de los huesos craneales dando lugar a fenómenos de meningitis, responsables de los síntomas nerviosos, o bien generalizarse provocando problemas septicémicos que son los responsables de la mayor parte de la poliserositis observadas (Pizarro, 1999).

Epidemiología

El Pnevumovirus aviar se encuentra en las aves a nivel de la nariz y la traquea, pero no se encuentra en las heces. Puede diseminarse rápidamente entre un lote, siendo la transmisión por aerosoles la ruta más importante. El virus persiste en aves por un tiempo muy corto, no mayor de 8 a 10 días después de la infección.

La ART es considerada una enfermedad altamente contagiosa, estando perfectamente comprobada la transmisión directa a partir de animales enfermos. La transmisión indirecta por el personal, utensilios y equipos contaminados, agua contaminada, movimiento de las aves afectadas, así como por vía aerosol a distancia son importantes en la diseminación de la enfermedad. No hay transmisión vertical a través del huevo. Los roedores, las aves silvestres y las aves migratorias son vehículos que juegan un importante papel en la transmisión del virus. (Nagaraja y col., 2001).

Síntomas clínicos

En pavos se caracteriza por presentar cuadros clínicos agudos incluyendo tos, movimientos de la cabeza, exudado turbido nasal y ocular, en pavas reproductoras es significativa la caída de la producción y la pérdida de la calidad del huevo (Vélez, 2000).

Las características de la enfermedad en gallinas reproductoras son caída en la producción de huevos, ya que el virus llega por vía sanguínea al oviducto y produce invasividad, provocando pérdidas en la producción y calidad del mismo (cáscara fina y deformada) Estas características son precedidas por signos respiratorios (Jones, 2000; Vélez, 2000).

En pollos de engorde la enfermedad produce una severa afección respiratoria, particularmente cuando es exacerbada por patógenos secundarios.

El cuadro clínico cursa con establecimiento de condiciones inmunosupresoras, estertores, alteración de los parámetros productivos ganancia de peso y conversión alimenticia (Fernández, 1998); a los dos a tres días post-infección las aves presentan depresión, tos, disnea e incoordinación, hay exudado nasal turbio y una descarga ocular posterior tipo espumosa a los siete a ocho días después de la infección (Jones, 2000).

El curso de la enfermedad suele ser de dos a tres semanas y en ocasiones también se describen signos nerviosos que llegan a afectar 5% del lote tales como: opistotonos, tortícolis, dilatación de las pupilas (Pizarro, 1999).

La morbilidad de esta enfermedad puede ser muy alta llegando a 100%, con un rango que va de 0.5% en aves adultas hasta un 85% en aves jóvenes (Gough y cols., 1998), debido a que la enfermedad puede afectar a aves (pavos y pollos) de cualquier edad, pero las más susceptibles son las aves en crecimiento entre las cinco y las ocho semanas de edad (Pizarro, 1999).

Lesiones macro y microscópicas

Las lesiones generalmente observadas son poliserosoitis, aerosaculitis, traqueitis e inflamación y fibrina en la superficie del pericardio, hígados, senos infraorbitales que aparecen repletos de exudados espesos (Pizarro, 1999). El edema facial comienza alrededor de los ojos luego se extiende por toda la cabeza y desciende hasta el tejido submandibular (Giambrone, 1997).

Microscópicamente se observa la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, eosinofílicos en las células epiteliales de los cornetes nasales y traquea, inflamación granulomatosa en el tejido subcutáneo del cráneo, la misma se encuentra en la dermis profunda y la hipodermis y está formada por granulomas con centro necrótico y con colonias de bacilos Gram negativos rodeando la reacción inflamatoria de células epiteliales y células gigantes multinucleadas.

En fases más crónicas existe infiltrado inflamatorio linfocítico, el epitelio de la conjuntiva está degenerado e hiperplásico. Se puede encontrar también heterófilos y fibrina en la superficie del pericardio, hígados y sacos aéreos. (Nunoya y cols., 1990).

Diagnóstico

El diagnóstico clínico es difícil ya que no existen signos patognomónicos y las lesiones son similares a las de otras enfermedades respiratorias. El aislamiento del virus debe realizarse a partir de secreciones nasales, cornetes, contenido del seno infraorbital o traquea. El medio de cultivo de traquea de embrión es el de elección para aislarlo, el virus provoca ciliotaxis a los 4-6 días post-inoculación en cultivos de pavos y en 6-8 días en cultivos de pollos (Jones, 2000).

También crece en fibroblastos y células renales de embrión tratados previamente con tripsina. Crece también en otras líneas celulares una vez adaptado como VERO, BMG y MA104 (Laboratorios Hipra 2004). Pueden utilizarse también huevos embrionados de pollos o pavos libres de anticuerpos, a los 6-7 días post-inoculación se observa falta de crecimiento de los embriones y mortalidad. (Gough y cols., 1998). Diagnóstico serológico se realiza mediante la técnica de ELISA, sero-neutralización y por Inmunofluorescencia directa en traquea (cuando es la fase aguda de la enfermedad).

PCR o reacción en cadena de la polimerasa es usada actualmente con mucho éxito, pero su uso es confinado a laboratorios especializados y puede ser diseñado para distinguir los subtipos A y B.

Técnica de Inmunohistoquímica en la que se utiliza peroxidasa (IP), esta técnica permite ver con más detalles la patogenia de la enfermedad. (Jirjis, F y cols., 2002).

Prevención y control

No hay tratamiento disponible para la ART por lo que la estrategia a utilizar es la vacunación y la prevención mediante el mejoramiento del manejo. Los tipos de vacunas que se utilizan son:

Vacunas vivas, derivadas de las cepas aisladas de las respectivas especies, son atenuadas a diferentes grados. Son administradas a las aves a través de spray o vía ocular. Se recomienda una o mas vacunas repetidas con este tipo de vacunas.

Son preparadas para el subtipo A o para el B. Vacunas Inactivadas generalmente en adyuvante oleoso, se utilizan después de la vacunación con vacunas vivas. Existe inmunidad cruzada entre ambos subtipos por lo que es indiferente con cual serotipos se vacune, aunque existen vacunas elaboradas con los dos serotipos, las mismas son monovalentes o combinadas con las vacunas de Newcastle (De Rosa, 2004). Como no existe tratamiento para la enfermedad se recomiendan medidas de manejo como: ajuste de la temperatura, optimización de la calidad de aire suspender los movimientos de la cama, tratar el agua con antibióticos cuando se sospeche de un problema respiratorio causado por bacterias como infección secundarias.

ENFERMEDADES DEL APARATO DIGESTIVO DE AVES

Es difícil localizarlas por la morfología de las aves.

Infecciones bacterianas.

Infecciones víricas.

Infecciones micóticas.

Infecciones parasitarias.

Infecciones nutricionales.

Neoplasias.

Tóxicos.

Traumatismos.

CAVIDAD ORAL

Bacterias → Gram positivas y negativas.

Víricas → Poxvirus.

Micóticas → Candidiasis.

Parasitarias → Trichomonosis.

Nutricionales → Hipovitaminosis A.

Neoplasias → Papilomas.

BACTERIANAS

La mayoría del digestivo de granívoras (paseriformes y psitáceas). Son gram positivos. Incluso las gram positivas son causa de enfermedad. La mayoría de gram negativos son enterobacterias, también Pseudomonas y Aeromonas.

La sintomatología de estomatitis varía según la especie. Si la lesión se encuentra en la cavidad oral, son normalmente úlceras.

VÍRICAS (POXVIRUS)

Son virus de DNA de gran tamaño. Son cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos caudales al corte histológico (cuerpos de Bohinger). Suele ser muy especie-específico.

Aviapox → siempre específicos y virulencia. Son muchas cepas diferentes por su virulencia. La transmisión se hace por:

- Animales infectados latentes asintomáticos.
- Vectores → mosquitos normalmente. Suele coincidir con la primavera y verano.

Los síntomas a final de verano y otoño.

- Sin heridas el Poxvirus no puede entrar.
- No existe entrada si no hay lesión epitelial.

La patogenia consiste en:

Entrada → replicación en el lugar de inoculación.

Primera viremia.

Hígado y médula ósea.

Segunda viremia.

Enfermedad generalizada.

No siempre el virus hace esta fase. A veces sólo se queda de forma cutánea. Las lesiones se pueden extender a hígado y aparato respiratorio.

La forma cutánea:

Las rapaces son diferentes de las passeriformes (canarios, diamantes, mandarines...) y columbiformes. Afecta sobretodo a áreas sin plumas por mosquitos.

Afecta a la comisura bucal, párpados y boca. Produce una lesión papular en las áreas sin plumas. Se coloca rojizo e inflamado al principio.

Degenera en infección secundaria por la inmunosupresión del ave.

Afecta a Amazonas y Pionus (psitáceas). Afecta ocularmente de forma muy importante y afectación respiratoria. Produce blefaritis con secreción serosa que degenera a mucopurulenta y acaba en lesión costrosa en los 2 párpados. Degenera el ojo y da lesión ocular muy importante.

La forma difteroide:

Sobretodo afecta a la mucosa oral, lengua, faringe, laringe...

Normalmente suele estar asociada a la forma cutánea.

Es típica en psitáceas y palomas.

La forma sistémica:

Es de las peores.

Cuando se encuentra en la segunda fase de viremia.

La sintomatología es muy inespecífica (letargia, sin comer, embolamiento).

Muere a los 3 días de síntomas digestivos o respiratorios.
No se suele encontrar junto a formas cutáneas o diftéricas.
Sobre todo en canarios: digestivo y respiratorio.
No hay tratamiento propio. Se hace terapia de soporte y se ponen medidas preventivas mediante mosquiteras.

ESÓFAGO-BUCHE

Infecciones bacterianas à gram positivas y negativas..
Infecciones víricas à Polyomavirus, PBFD (síndrome del pico y de las plumas), PDS (síndrome de Dilatación Proventricular).
Parásitos → Trichomonosis, Capillaria, Criptosporidiosis.
Micóticas à Candidiosis.
Nutricionales à deficiencia de vitamina E / Selenio.
Neoplasia → Papiloma.
Físicas à cuerpo extraño, papillas a temperatura no óptima, sobrealimentación...
Trauma à quemaduras, perforaciones.

CANDIDIOSIS

Enfermedad fúngica más importante de la clínica de aves.
Producida por Candida albicans aunque también hay otros agentes.
Es un patógeno oportunista.
Se produce en neonatos y jóvenes o en mala higiene como enfermedad del buche o secundaria , lo que retrasa el vaciamiento del buche.
La Candida es un habitante normal del tracto digestivo del buche.
El periodo de incubación es desconocido.
Es frecuente en neonatos.
Muchas veces es una enfermedad muy generalizada.
A veces sólo afecta al buche.
La ingluvititis afecta sólo al buche.
La gastroenteritis catarral mucosa afecta a todo el aparato digestivo.
La lesión más característica es la producción de placas blancas en la mucosa oral y buche.
Muchas veces se asocia o tiene afectación respiratoria.
Las Candidas suelen estar agrupadas y producen desgaste del animal y desaprovechamiento de la ingesta.
En la forma crónica, la mucosa está en forma de toalla.
Se diagnostica por citología y cultivo.
El tratamiento se hace mediante antifúngicos (Nistatina) à no se absorbe vía oral.
Si son resistentes, se usan derivados imidazólicos (Ketoconazol).

TRICHOMONOSIS

Protozoo flagelado formado por 4 flagelos y membrana recurrente.

La especie más importante es *Trichomonas gallinae*. Afecta a palomas, rapaces, paseriformes, psitácidas (sobre todo en cautividad en Lorís a base de papillas).

Se transmite por contacto directo.

Es una enfermedad primaria pero se asocia a la poca higiene, por mala higiene de los comederos en fermentación y superpoblación de animales.

Se producen lesiones en la orofaringe, esófago, buches, tráquea, pulmón e hígado. También en respiratorio.

Las placas blancas se dan en la mucosa digestiva, produciendo material caseoso.

Hay ingluvititis (buche) y estomatitis (cavidad oral), vómitos y diarreas.

El tratamiento consiste en nitroimidazoles (*Metronidazol*, *Amidazol* y derivados).

PAPILOMAS

Están producidos por *Papilomavirus*.

El crecimiento es proliferativo común en la mayoría de las especies. No se sabe si la afectación es por virus. Si se hace biopsia, se hace crecimiento proliferativo de piel sin partículas víricas.

Del trato digestivo a la cloaca.

Las psitácidas (*Amazonas* (la más importante), *Yacos*, *Carolinas*, *Periquitos*, *Guacamayos* (últimamente)).

Se busca en la mucosa oral en la coana (comunicación entre el aparato digestivo y respiratorio).

En la cloaca también alrededor del esfínter interno.

El diagnóstico diferencial se hace con tumores de células escamosas u otros tumores.

El vinagre, si se trata de un papiloma, lo vuelve blanco. Si no se vuelve, entonces es más grave. El papiloma es benigno en principio.

El tratamiento es quirúrgico o crioquirúrgico, radiocauterío o cremación con nitrato de plata.

Si queda un poco, puede volver a crecer. Como más se toca, más rápido crece.

Puede transmitirse al hígado y se asocia con concomitancia con *Herpesvirus*.

SÍNDROME DE DILATACIÓN PROVENTRICULAR (PDS)

También se llama *Macaw Wasting Syndrome*.

Es exclusivo de psitácidas. Cualquier especie de psitácidas.

Es una enfermedad del sistema nervioso. Hay encefalomielitis y ganglioneuritis mioentérica. Afecta a los ganglios nerviosos del plexo mioentérico (sobre todo buche, ventrículo y proventrículo). Se van inflando porque no detecta que está lleno. El problema principal son las enfermedades secundarias que vendrán después.

Se produce un retraso del vaciamiento. Las bacterias del digestivo se desequilibran. Sobre todo es frecuente encontrar *Candida* y *Capillaria*.

No existe tratamiento.

El diagnóstico se hace por radiografía confirmado con biopsia.

Es una enfermedad muy progresiva y lenta. Según el estado inmunitario del animal. Puede durar de 15 días a años. Se dan papillas a los animales para que puedan digerir.

El proventrículo es sólo un órgano de paso.

Sólo se puede confirmar por biopsia de buche, proventrículo o ventrículo. El proventrículo es más difícil. Siempre se recomienda acceder a buche, proventrículo y después ventrículo.

El hecho de no encontrar lesión no descarta la enfermedad.

La morbilidad es muy baja. En el criadero es mejor erradicarla. En animales de compañía se dan papillas.

GASTROENTERITIS

Enfermedades bacterianas.

Enterobacterias:

Gram negativos:

E. Coli → produce endo y exotoxinas que pueden dar, además, problemas nerviosos.

Citrobacter freundii.

Yersinia spp.

Salmonella spp → afecta al sistema nervioso y digestivo. Muy frecuente en palomas, da torticolis principalmente. Da diarrea, poliuria muchas veces y según la bacteria, muerte casi segura. Produce anorexia, adelgazamiento. Se hace un cultivo y antibiograma. En enfermedades con síndrome nervioso, hay que incluir Salmonella en el diagnóstico de ENC. Sobre todo se desarrolla en especies sin ciegos.

Klebsiella spp.

Gram positivos:

Clostridium → sobre todo colectiva. Esporulados. Suelen dar gastroenteritis hemorrágica necrotizante y altamente patógena.

Megabacterias → bacilos gram positivos que tienen un tamaño entre el hongo y la bacteria. Hasta hace poco no se consideraban microorganismos como tales. Dan infección gastrointestinal. Se da secundaria a otros procesos víricos. No tiene tratamiento, pero si se quiere probar, se da Anfotericina B. Aparecen bacterias en forma de Y.

Clamidia psittaci.

FLORA NORMAL GASTROINTESTINAL

Granívoras:

Bacterias gram positivas en el 90%: Bacillus. Lactobacillus. Streptococcus y Staphylococcus. En proliferación bacteriana uniforme no se debe pensar que es normal.

Bacterias gram negativas (escasas).

Levaduras (gram positivas), escasas y sin crecimiento.

Carnívoras à predominancia gram negativa.

PSITACOSIS

Producida por *Clamidia psittaci* (bacteria intracelular obligada).

La virulencia depende de la cepa y del hospedador. También influye en los signos clínicos.

Es una enfermedad diversificada de psitácidas. Son zoonosis transmisibles. Se llama:

-En psitácidas à psitacosis.

-En el resto de las especies → ornitosis.

Existen animales portadores, sobretodo carolinas.

La enfermedad primaria está relacionada intensamente con el estrés. Se elimina por heces, orina y secreciones corporales.

Los síntomas son:

-Digestivos à diarrea, anorexia, depresión, biliverdinuria (manchan los uratos de color verdoso).

-Respiratorios à estornudo, descarga nasal mucopurulenta, disnea, sinusitis, conjuntivitis.

Si se vuelve crónica:

-Mal plumaje, adelgazamiento, diarrea, conjuntivitis.

-SNC: temblores, convulsiones, opistótonos, parálisis.

Si el proceso es muy grave puede tener encefalopatía hepática.

Cualquier enfermedad que afecte a órganos de la cavidad celómica, comprime los sacos aéreos disminuyendo la capacidad respiratoria.

Es un animal que respira y da golpes de cola para evitar esta disminución (Tailbobby).

La sintomatología varía en función de la especie. En las palomas, sobretodo respiratorios. En psitácidas, es indiferente (respiratorios, digestivos, nerviosos...).

En la necropsia se ve:

-Aerosaculitis.

-Hepato y esplenomegalia.

-Enteritis y peritonitis (celomitis).

-Pericarditis, bronconeumonía.

-Sinusitis.

Cualquier enfermedad que dé sinusitis da afectación ocular (descarga serosa, purulenta o en función de la patología).

El diagnóstico se realiza por los síntomas clínicos y la patología clínica. El 99% de las aves salvajes son portadoras.

Se hace:

Radiología, citología (macrófagos con cuerpos de inclusión citoplasmáticos). Se hace una tinción de Stamp.

Cultivo y serología (algunos kits comerciales: ELISA) → dan falsos positivos.

Proteinograma → Hipoalbuminemia + hiperbeta/gammaglobulinemia de moderada a elevada.

Leucocitosis elevada con heterofilia. Recuento de 350000-40000 leucocitos / ml de sangre + signos clínicos que confirman la Clamydia.

Se trata mediante tetraciclinas y fluido, calor, higiene, agua y comida:

-Doxiciclinas 50-100 mg / Kg durante 45 días (Vibravenosa ® IM).

-Clortetraciclina.

Se dan oral o parenteralmente.

-Enrofloxacin.

El tratamiento de soporte se da mediante calor, fluidos...

Se debe hacer higiene diaria.

Suele curar si se coge a tiempo. Es una zoonosis.

ENFERMEDAD DE PACHECO

Está producida por Herpesvirus.

Sólo afecta a psitácidas, sobretodo a las del Nuevo Mundo (Sudamérica).

Mueren a las 48 horas en el 100% de los casos. No dan tiempo a actuar.

Los signos que presenta son diarrea, poliuria y signos respiratorios.

El Loro Patagonio (barranquero) y la Cotorra de Cabeza Negra (Nenday) son portadores.

La diseminación se hace por heces y secreciones respiratorias.

La incubación es de 3-14 días asintomáticas.

Los signos clínicos son muertes agudas con buena conformación corporal. Presentan algo de disnea, anorexia, depresión y biliverdinuria.

Hay estornudos, descarga nasal mucopurulenta, disnea, sinusitis, conjuntivitis.

El animal tiene adelgazamiento, disnea y conjuntivitis.

Es igual que Clamydia. Es altamente contagioso.

El diagnóstico siempre se hace por muerte. Hay hepato/esplenomegalia (cuerpos inclusión intranucleares).

Tratamiento por Aciclovir y soporte. No funciona bien.

La vacuna se hace mediante realizar autovacuna. Sobretodo en Yacos, cacatúas y Guacamayo ararcuna (azul y amarillo)

ENFERMEDADES DE LAS AVES TRANSMISIBLES A LOS HUMANOS

Introducción

Los productores de pollo y gallinas así como aves para cacería deben estar consientes que algunas enfermedades de las aves pueden ser transmitidas a los

humanos. Es importante hacer notar, sin embargo, que tales enfermedades no son tan comunes como para desalentar a los productores de aves. Para la mayoría de la gente las enfermedades de las aves no son cosa seria, pero los productores de aves deben de estar alertas y buscar asistencia medica si es necesario.

Zoonosis se refiere ha enfermedades infecciosas de animales que se pueden transmitir a los humanos. Los agentes infecciosos pueden ser protozoarios, hongos, bacterias, clamidias o virus. La susceptibilidad individual y la seriedad de estas infecciones por microbios varia con la edad, estado de salud, estado inmunitario y aun cuando la intervención de terapia temprana es solicitada. La habilidad de los microorganismos para hacer que una persona se enferme varia de acuerdo a la virulencia del organismo, las dosis a la cual la persona es expuesta, así como la ruta de infección.

La clamidiosis, salmonelosis, arizonosis y colibacilosis son las infecciones más comunes. clamidiosis, salmonelosis encefalitis equina del este y tuberculosis aviar pueden ser enfermedades muy serias y aun de tratamiento de por vida.

Clamidiosis

Chlamydia psittaci, es una bacteria inusual del organismo, existe a escala mundial y afecta a mas de 100 especies de aves. Causa una enfermedad llamada ornitosis cuando ocurre en aves y humanos.

En los EU, la clamidiosis es un gran problema en pavos, palomas y pericos. En Europa las principales especies atacadas son los patos y los gansos. Algunas aves son extremadamente susceptibles a la clamidiosis (pavos), mientras que otras son más resistentes (pollos).

La clamidiosis es principalmente transmitida por inhalación de polvo fecal contaminado y es diseminado por aves portadoras, que actúan como reservorios principales de la enfermedad. El organismo es excretado en las heces y secreciones nasales. Un estado de portador sano puede persistir por anos. El organismo sobrevive al secado, que facilita la diseminación oral y permite la transmisión de ropa y equipo contaminado. La clamidiosis puede ser transmitida de ave a ave, heces a ave, y ave a humano. La trasmisión de humano a humano puede ocurrir, principalmente por la exposición de la saliva de los pacientes.

Clamidiosis es considerada como de riesgo para personas que trabajan con pericos y palomas, o para gente trabajando con pavos en plantas de matanza y laboratorios de diagnostico avícola.

El periodo de incubación para clamidiosis es de 4-15 días, aunque 10 días es lo más común. En aves afectadas, es común la presencia de síntomas como la diarrea, tos y descargas nasales y oculares. Puede haber una alta tasa de mortalidad si la enfermedad no es tratada. En pavos hay una caída de la producción de huevo. En humanos, se manifiesta como enfermedad respiratoria febril. Hay una presencia repentina de escalofríos, dolor muscular y articulaciones, dolor de cabeza, tos, perdida de apetito, y dolor de pecho. Complicaciones pueden originar inflamación del bazo, inflamación del músculo cardiaco, y disminución del ritmo cardiaco.

Las aves afectadas deben tratarse con clorotetraciclina u otro antibiótico de amplio espectro similar por 45 días para eliminar la infección. Las palomas y pavos deben tener mas tiempo de tratamiento para eliminar los portadores.

Los humanos afectados son tratados con tetraciclinas por un periodo de 21 días. Debido a que este antibiótico puede ligarse irreversiblemente a ciertos minerales, el contenido de calcio de la dieta debe mantenerse bajo durante el tratamiento. En el estado de Florida, la clamidiosis es reportada como enfermedad zoonótica. El Departamento de Agricultura y Servicios al Consumidor debe ser notificado si se encuentran aves infectadas con *Chlamydia psittaci*. Si una persona se sospecha que tenga ornitosis, debe notificarse en la oficina de salud dentro de 48 horas.

Salmonelosis

Existen aproximadamente 200 serotipos de la especie *Salmonella*. La mayoría de los animales son susceptibles a la infección por salmonela. Esta enfermedad bacteriana ocurre más frecuentemente en individuos estresados. Muchas infecciones son subclínicas. Los síntomas más comunes en todas las especies son diarrea, vómito, fiebre leve. La infección puede originar deshidratación, debilidad, y algunas veces la muerte especialmente en los muy jóvenes o en los muy viejos. En casos muy severos puede haber fiebre alta, septicemia (envenenamiento de la sangre), dolor de cabeza, y enlargamiento del bazo. Las infecciones pueden incluir cualquier órgano incluyendo el corazón, riñones, articulaciones, meninges (membranas que rodean y protegen el cerebro y la espina dorsal), y el periostio (membrana fibrosa de tejido conectivo que envuelve todos los huesos excepto las articulaciones).

El periodo de incubación es de 6-72 horas, aunque de 12-36 es lo más común. La salmonela es transmitida por la ingestión o comida contaminada por materia fecal (ruta fecal-oral). La excreción de la bacteria comúnmente varía entre unos días y semanas. En algunos casos, (*S. typhi*, fiebre tifoidea) las personas infectadas pueden ser portadores de la bacteria de por vida, *S. enteritidis* en la materia fecal de las aves puede penetrar los cascarones del huevo, y puede estar presente en huevos sin cocinar.

En la mayoría de casos, el tratamiento de la salmonelosis simplemente se trata con fluidos y electrolitos. Antibióticos como el cloranfenicol, nitrofuranos, o ampicilinas son solamente cuando la bacteria ha sido localizada en áreas de la superficie corporal del tracto intestinal.

En el estado de Florida, la salmonelosis es reportada como enfermedad zoonótica. El Departamento de Agricultura y Servicios al Consumidor debe ser notificado si se encuentran aves infectadas con especies *Salmonella*. Si una persona se sospecha que tenga salmonelosis, debe notificarse en la oficina de salud dentro de 48 horas.

Colibacilosis

La colibacilosis es causada por una infección de *Escherichia coli*. *E. coli* es una bacteria que normalmente habita el tracto intestinal de todos los animales. Existen un número de diferentes estirpes, muchas especies específicas. No todas las estirpes son patógenas. En aves de corral las infecciones por *E. coli* pueden causar septicemia, enfermedad crónica respiratoria, sinovitis (inflamación de las articulaciones que pueden originar cojera), pericarditis (inflamación del saco que rodea al corazón), y salpingitis (inflamación del oviducto). Los humanos con colibacilosis usualmente manifiestan diarrea que puede complicarse con otros

síndromes dependiendo del serotipo de *C. coli*. Estas complicaciones pueden incluir fiebre, disentería, shock, y púrpura (pequeñas hemorragias múltiples en la piel y en las membranas de las mucosas). El periodo de incubación es de 12 horas a 5 días, aunque lo más común es de 12-72 horas. La transmisión es vía fecal-oral. En la mayoría de los casos, en el tratamiento sintomático se requiere de fluidos y antidiarreicos. En infecciones más severas, los antibióticos tales como la tetraciclina y cloranfenicol pueden ser necesarios.

En Florida, colibacilosis no es una enfermedad zoonótica reportada.

Infecciones por Arizona (Arizonosis)

Las infecciones por Arizona son causadas por la bacteria *Salmonella arizona*. *S. arizona* se encuentra alrededor del mundo. Se presenta más frecuentemente en los reptiles y las aves, pero todos los animales son probablemente susceptibles. Los más jóvenes tienen mayor riesgo.

En muchas especies de aves la infección por *S. arizona* resulta en una baja producción de huevo e incubabilidad. Los pollos muestran debilidad, anorexia y escalofríos. Las epidemias en pavos, pollos y canarios llegan hasta 60% de mortalidad. En humanos, la diarrea es más común. Muchas infecciones son subclínicas.

El periodo de incubación es de 6-72 horas, aunque 12-36 es lo más común. La transmisión es por vía fecal-oral. Puede existir alguna transmisión por medio de los huevos. Las aves infectadas pueden ser portadoras por mucho tiempo, numerosos antibióticos pueden reducir la mortalidad, pero no eliminan la bacteria de los intestinos. *S. arizona* es menos dura que la salmonela pero puede sobrevivir por meses en el suelo, alimento o agua.

En Florida, la infección por Arizona no es una enfermedad zoonótica reportada.

Encefalitis Equina del Este

La encefalitis equina del este (EEE) es causada por un virus RNA del género Alphavirus, familia Togaviridae, las epidemias pueden ocurrir en faisanes criados comercialmente, pollos, codorniz, patos, pavos, y emus. Distensión abdominal y disentería son los síntomas más comunes.

La EEE es llevada por un mosquito. El virus circula en un ciclo de mosquito-ave en las golondrinas y pájaros cantadores son el reservorio más común. Los mosquitos se infectan y contaminan alimento de los pájaros, caballos y humanos, difundiendo la infección. En faisanes, la infección inicial es originada por un mosquito, pero la diseminación ocurre por picarse unos a otros y por canibalismo.

Muchas epidemias ocurren entre agosto y la primera helada. También pueden ocurrir casos anuales en áreas como Florida que tiene una estación prolongada de mosquitos.

La EEE usualmente afecta a personas entre 15 y más de 50 años de edad. En adultos se presenta una fiebre alta espontánea, dolor de cabeza, vomito, y letargo, progresando rápidamente en rigidez del cuello, convulsiones, delirio y coma. En niños, la EEE es típicamente manifestada por fiebre, dolor de cabeza y vomito por 1-2 días. Después de una aparente mejoría, se produce una encefalitis (inflamación del cerebro) caracterizada por una aparición rápida y grandes complicaciones. Niños retardados u otras consecuencias neurológicas permanentes son comunes los sobrevivientes.

En Florida, la infección por EEE no es una enfermedad zoonótica reportada.

Tuberculosis Aviar

La tuberculosis aviar es causada por la bacteria *Mycobacterium avium* que está estrechamente muy relacionada con la bacteria de tuberculosis de los humanos y los bovinos. En aves, *M. avium* causa una enfermedad debilitante crónica con nódulos tuberculares. En humanos, las infecciones por *M. avium* pueden causar infecciones locales con nódulos linfáticos inflamados en ciertas regiones. La infección es más severa en individuos inmunocomprometidos. *M. Avium* es diseminada por ingestión de comida o agua contaminada por heces de aves que lo diseminan. Los animales con tuberculosis deben eliminarse.

Mientras que muchas infecciones por *Mycobacterium* se tratan con antibióticos, *M. Avium* es la excepción ya que es altamente resistente a antibióticos. La operación de para remover los nódulos linfáticos es frecuentemente necesaria para eliminar la infección.

En Florida, la tuberculosis aviar es reportada como enfermedad zoonótica para los animales y la salud. El Departamento de Agricultura y Servicios al Consumidor, debe ser notificado de aves contaminadas con *Mycobacterium avium*. Si se sospecha que una persona está contaminada con tuberculosis, debe notificarse a la oficina pública del condado en 48 horas.

Histoplasmosis

Algunos hongos prefieren crecer en el suelo enriquecido con heces de pollo. *Histoplasma capsulatum* es una de ellas. Los hongos también están asociados con la construcción de sitios y cuevas. Las aves no son susceptibles a la infección, pero los humanos sí pueden ser afectados por histoplasmosis, gatos, perros, bovinos, caballos, y muchos mamíferos salvajes.

El periodo de incubación es de 7-14 días. La mayoría de los casos en humanos son asintomáticos. La enfermedad puede ser manifestada de tres formas: daño pulmonar (el más común), cavidad pulmonar crónica, y diseminación. El daño pulmonar es como la influenza y puede durar varias semanas. Es caracterizada por escalofríos, dolor de pecho, tos, malestar y fiebre. La forma crónica ocurre en gente de más de 40 años y se parece a la tuberculosis. Es caracterizada por tos productiva, más una más de saliva (material expulsado de los pasajes respiratorios), pérdida de peso, y problemas para respirar. La forma diseminada ocurre en los más jóvenes o en los viejos. Las lesiones incluyen crecimiento de bazo e hígado, y ulceración de la mucosa. La forma diseminada de histoplasmosis puede ser fatal sino se trata. Anfotericina B ha sido utilizada para el tratamiento.

La transmisión ocurre por inhalación de las esporas producidas por el crecimiento del moho. Esta enfermedad no es contagiosa. El reservorio es el suelo, especialmente cuando se enriquece con heces de aves o murciélagos. Humedezca el área y utilice una máscara o un respirador cuando trabaje en áreas sospechosas. Esparcir el suelo con una solución de formaldehído ayuda a matar el hongo.

Aunque esta enfermedad está asociada con las aves, no es una enfermedad zoonótica, porque el reservorio es el suelo y no las aves. Esto es, sin embargo, una pequeña consecuencia de los infortunados que son infectados.

En Florida, la histoplasmosis es reportada como enfermedad zoonótica para los animales y la salud. Si se sospecha que una persona está contaminada con histoplasmosis, debe notificarse a la oficina pública del condado en 48 horas.

Criptococosis

Otro hongo que prefiere crecer en los suelos enriquecidos con heces de pollo es *Cryptococcus neoformans*. El periodo de incubación es de semanas. Las infecciones se presentan en muchos mamíferos, pero ocurre más frecuentemente en humanos, caballos, perros, y gatos. La infección es rara en aves.

La transmisión de criptococosis es usualmente por inhalación de levaduras parecidas a los hongos, aunque puede ocurrir ocasionalmente por ingestión. Los humanos pueden recoger esta enfermedad de los nidos de las palomas. En humanos, se manifiesta como meningitis o meningoencefalitis, y es usualmente precedida por una infección pulmonar con tos, estornudo con sangre, fiebre y malestar. El curso de esta enfermedad es usualmente crónico. Se presenta fiebre, tos, dolor de pecho, y escupen sangre del tracto respiratorio, seguido por dolor de cabeza, cuello rígido y molestias visuales.

Como en la histoplasmosis, esta enfermedad está asociada a las aves, pero no es una enfermedad zoonótica porque el reservorio es el suelo y no las aves.

En Florida, criptococosis no es una enfermedad reportable.

Criptosporidiosis

Esta enfermedad es causada por un protozoo del género *Cryptosporidium*. Existen tres especies conocidas, *C. baileyi*, *C. meleagridis* y una especie sin nombre en codorniz. Esta enfermedad normalmente causa problemas respiratorios en pollos y pavos. Puede causar también gastroenteritis y diarrea. En humanos causa dolor abdominal, náusea, y diarrea acuosa durante 3-4 días. En individuos con problemas de inmunidad, puede causar severo daño, diarrea persistente con mala absorción de nutrientes y pérdida de peso.

El periodo de incubación es de 3-7 días, y es esparcido por la vía fecal-oral por ingestión de oocitos infectados.

En Florida, la criptosporidiosis es reportada como enfermedad. Si se sospecha que una persona está contaminada, debe notificarse a la oficina pública del condado en 48 horas.

Alveolitis Alérgica

La alveolitis alérgica también es conocida como enfermedad del pulmón de la paloma, es una de las enfermedades zoonóticas más importantes. Puede presentarse en fase aguda, subaguda y crónica. Los signos clínicos son causados por una capacidad pulmonar reducida debido a una reacción de hipersensibilidad de las plumas, o pequeñas partículas de plumas, o polvo fecal. La inflamación de las unidades de intercambio de aire pulmonar (alvéolos) es la lesión provocada.

La forma aguda de la enfermedad es usualmente precipitada por atóxicada exposición de un individuo, como cuando limpia una caseta de palomas. Los síntomas se presentan en un periodo corto, en incluyen tos, dificultad para respirar, fiebre, y escalofríos. Si la exposición cesa en este punto, los síntomas se resuelven y no hay necesidad de tratamiento. Crónica, una exposición más ligera es más seria, y los síntomas se pueden confundir con un resfriado. Los individuos

afectados tienen una tos crónica, intolerancia al ejercicio, y pérdida de peso. Lesiones permanentes en el pulmón pueden desarrollarse, incluyendo fibrosis pulmonar que reduce el intercambio gaseoso y la capacidad pulmonar.

La alveolitis alérgica crónica puede desarrollarse tan rápido como en dos años, pero usualmente toma de 10-20 años. Pacientes diagnosticados con esta forma crónica no tienen más opción que dejar de convivir con las aves. La exposición de tan solo minutos a las plumas, o heces puede ocasionar la recurrencia de problemas respiratorios. La severidad de la enfermedad puede ser disminuida utilizando una máscara mientras limpian las jaulas, bañan las aves mascotas, e instalando sistemas de purificación del aire.

BOTULISMO

El botulismo es un estado de envenenamiento provocado por la ingestión de alimentos en descomposición. Se presenta preferentemente en pollas y pavos criados a campo, aunque también puede aparecer en aves criadas en cautiverio.

Transmisión.

El agente provocador de esta enfermedad es la toxina de una bacteria que forma esporas, el *Clostridium botulinum* ampliamente diseminado en el suelo; penetra con frecuencia en los alimentos en descomposición y en cadáveres en putrefacción. Los alimentos enlatados, carne y vegetales en descomposición y granos descompuestos, pueden contener la bacteria botulínica. Estos organismos se multiplican rápidamente y producen sustancias tóxicas dañinas para las aves. Las demás bacterias que producen envenenamiento a través del alimento en los seres humanos—tales como los estafilococos—no parecen causar dicho problema a las aves.

Síntomas.

Los primeros síntomas del botulismo pueden presentarse pocas horas después de la ingestión de materias en descomposición. Lo primero que suele notarse es parálisis de las patas y alas. Cuando están afectados los músculos del cuello, se nota flojedad en la cabeza y cuello que el ave arrastra a lo largo del piso o sobre el hombro en forma característica. De allí el nombre de “cuello flexible” que suele dársele a la enfermedad. En los primeros estadios del botulismo, las aves tienen los ojos apagados y están amodorradas. Es frecuente la parálisis de la membrana nictitante del ojo. Posteriormente las aves afectadas muestran temblores de las plumas que a menudo se aflojan y desprenden fácilmente. Ocasionalmente, hay diarreas.

Las aves gravemente afectadas pueden entrar en coma varias horas antes de morir. En los casos moderados, las aves pueden recuperarse espontáneamente a los dos o tres días.

Lesiones.

El botulismo en pollos da pocas lesiones internas. Puede haber distensión parcial de los intestinos y enteritis catarral y pequeñas zonas hemorrágicas intensas en el intestino. Tanto en pollos como en pavos se suele encontrar alimento en descomposición dentro del buche. La presencia de larvas de moscas sugiere la existencia de alimentos en descomposición.

Prevención, Control y Tratamiento.

Vigile el manejo a fin de que las aves no tengan acceso a alimentos en descomposición o cadáveres en putrefacción. Se debe construir una fosa especial para la eliminación de cadáveres. Las larvas de los moscones que se alimentan de cadáveres son peligrosas, ya que pueden contener la toxina del botulismo y las aves las comen a menudo. Ante la presentación del botulismo, las fuentes de infección se deben eliminar de inmediato.

A las aves de más valor debe administrárseles un laxante en el agua de bebida (14 litro de melaza en 20 litros de agua), durante 4 horas aproximadamente, luego quitar el laxante. Tratar a las aves individualmente si no pueden beber. Lavar el buche con agua tibia administrada a través de un embudo y un tubo de goma. Mantener a las aves en un lugar fresco y sombreado.

Lavarse las manos cuidadosamente luego de haber manipulado aves afectadas por botulismo.

Las antitoxinas polivalentes de clostridio son un tratamiento efectivo, pero algunas veces es un método poco práctico ya que son difíciles de obtener.

ONFALITIS

La onfalitis es una infección bacteriana del ombligo que sufren los pollos. Cuando el orificio umbilical no cierra debidamente después del nacimiento, constituye una ruta por donde pueden penetrar bacterias mezcladas al organismo del pollo.

Síntomas.

Los síntomas de la onfalitis son: debilidad general, tendencia a amontonarse cerca de la campana criadora y muerte súbita. Al manejar un pollito afectado por esta enfermedad, el cuerpo se siente flácido y el abdomen agrandado.

El orificio umbilical que normalmente cierra completamente en un lapso de 72 horas está inflamado y húmedo, tarda varios días en cerrarse, formándose a menudo una costra alrededor del mismo.

El curso de la enfermedad es rápido y con frecuencia el ave muere al día siguiente de notarse los síntomas. La mortandad que suele ser alta alcanza en ocasiones el 50%.

Lesiones.

En la necropsia se ve fluido en el abdomen y pecho. La yema no está absorbida y es anormalmente fluida, siendo frecuente que el saco de la misma esté roto. Hay inflamación generalizada del revestimiento interior de la cavidad del cuerpo, percibiéndose un olor fétido. En la granja de reproductores puede eliminarse la infección, manteniendo limpios los nidales para que no se contaminen los huevos para incubación.

La onfalitis se origina a veces en la incubación defectuosa o la falta de buena sanidad en la planta de incubación. Las precauciones sanitarias deben extremarse, limpiando las instalaciones antes y después de la incubación. No existe tratamiento efectivo contra la onfalitis en el gallinero de crianza.

ARTRITIS VIRAL

(Tenosinovitis, Tendonitis, Síndrome del tendón roto)

La artritis viral es una infección de los pollos que daña los tendones, las membranas sinoviales y el corazón.

Es causada por un reovirus. y se le culpa por un crecimiento y conversión deficiente y decomisos en el matadero. Puede complicarse con infecciones bacterianas. La enfermedad es diseminada por el tracto respiratorio y digestivo o a través del huevo.

Esta condición parece presentarse en ciclos, causando grandes pérdidas en los pollos de engorde y reproductores pesados.

Signos.

Los signos clínicos son más evidentes en aves más pesadas. En casos de campo, se pueden ver los resultados de la infección. Cuando las aves están severamente afectadas, sesientan en los corvejones y deben ser forzadas para que se muevan. El área superior e inferior de la articulación del corvejón puede estar agrandada. Varios grados de cojera pueden ser vistos y algunas aves pueden mostrar falta de crecimiento. La morbilidad puede ser hasta de un 100%, con una mortalidad relativamente baja.

Lesiones.

La hinchazón de los tendones y vainas por arriba y por abajo de la articulación del corvejón es notada más fácilmente cuando aves afectadas son comparadas con otras normales. Los tendones por detrás o por arriba del corvejón pueden estar rotos en infecciones severas. Puede ser vista una hemorragia masiva, o los músculos vecinos van aparecer severamente magullados.

A menudo, el corvejón contiene una pequeña cantidad de fluido color paja o un exudado sanguinolento. Cuando se ve una gran cantidad de este exudado, la condición semeja una sinovitis infecciosa. La inflamación del corvejón empeora y resulta en una condición crónica de endurecimiento y fusión de las vainas tendinosas.

Prevención.

No hay un tratamiento específico disponible Existen varias vacunas contra la artritis viral que son efectivas en prevenir la enfermedad en aves susceptibles.

Ayudas de Diagnóstico.

La prueba de inmunodifusión en agar es usada para detectar anticuerpos precipitantes, si embargo, las pruebas de suero-neutralización son . menudo más sensibles y más exactas. Raspados de tendones, vainas tendinosas y capsulas articulares pueden ser usadas para la identificación viral usando 1 técnica de anticuerpos fluorescentes.

INFECCIONES ESTREPTOCOCCICAS

Streptococcosis

Los pollos son huéspedes naturales del *Streptococcus* *zoopidemicus* anteriormente *Streptococcus* *gallinarum*, organismo que provoca la Streptococcosis.

Los pavos, palomas, patos, gansos, ratones blancos y conejos, son susceptibles a esta enfermedad. Luego de un brote los animales pueden volverse portadores, sirviendo de vía de introducción a la enfermedad en los lotes susceptibles.

Síntomas y Lesiones.

En los casos agudos, tanto en pollos como en pavos, se suele comparar a esta enfermedad con el cólera aún cuando las provoca un organismo diferente, debido a la infección generalizada y las muertes repentinas de aves aparentemente sanas. Las aves aparecen letárgicas y sus excrementos tienen un color amarillento. Las lesiones incluyen congestión y agrandamiento de los principales órganos de la cavidad abdominal los que también contienen exudado fibrinoso. Para llegar al diagnóstico definitivo se debe aislar el organismo causante de la enfermedad mediante pruebas de laboratorio.

Prevención y Tratamiento.

El uso de antibióticos eficaces contra los organismos gram-positivos, ayuda a prevenir las estreptococcias. En lo que se refiere a tratamiento, los antibióticos se usarán en niveles elevados.

INFECCIONES ESTAFILOCOCCICAS

Staphylococcosis

El microorganismo que provoca la staphylococcosis suele estar presente en casi todos los lotes de aves. El *Staphylococcus aureus* parecería ser el que causa mayores daños a pollos y pavos cuando estos animales sufren algún stress. La épocas lluviosas serían ideales para las infecciones por estafilococos y-en la cría a campo.

Las aves de 9 a 20 semanas de edad son las más susceptibles. La enfermedad adopta la forma aguda o la crónica según se den los siguientes factores:

- 1) virulencia del microorganismo estafilocócico (bacteria) y su resistencia

al tratamiento

2) cantidad de organismos que invadan el corriente sanguíneo del ave; 3) sanidad. Aunque se trata de una enfermedad infecciosa, no sí propaga con demasiada rapidez, por lo que la forma crónica es la más común, localizándose la enfermedad en las membranas sinoviales por regla general.

Transmisión.

Se cree que esta enfermedad se transmitió principalmente cuando las aves se lastiman, actuando la herida como vía de invasión que aprovecha el microorganismo, el cual también puede penetrar al ser ingerido por los animales.

Síntomas.

En su forma aguda, la enfermedad puede ser fatal en pocos días. Las aves afectadas de este modo padecen diarrea, depresión e hinchazón de las articulaciones. En la forma crónica, las aves suelen cojear con frecuencia se posan y son reacias a moverse. Hay emaciación gradual a la que sobreviene la muerte. La mortandad casi nunca excede el 20% del lote.

Lesiones.

En la forma aguda que puede ser una septicemia, el hígado, bazo, y riñones aparecen congestionados e hinchados. Los grandes focos necróticos de frecuente presentación en el hígado de los pavos se confunden a veces con las lesiones de *Escherichia coli* o cabeza negra.

En la forma crónica, la articulación de muslo inferior frecuentemente está hinchada aunque otras articulaciones pueden ser afectadas también. El material inflamado se torna luego caseoso endureciéndose la hinchazón de las articulaciones. Puede haber total destrucción de tendones.

La única forma de diagnosticar la enfermedad es el aislamiento de organismos, *aureus* en la sangre o articulaciones afectada del ave enferma.

Prevención.

La cama o el campo, según se trate de sistema de cría, debe estar libre de todo objeto que pueda provocar lastimaduras en las aves: clavos, vidrio alambre de púa, etc.; ya que el organismo puede penetrar a través de las heridas.

Es imprescindible la buena sanidad, tanto en lo que respecta a limpieza y desinfección de las instalaciones como a la provisión de agua de bebida. No se harán cambios radicales en el programa de alimentación. El manejo de la cama para prevenir las condiciones húmedas también es muy importante.

Tratamiento. Novobiocina, tetraciclinas, y sulfonamidas han sido agregadas en los alimentos, dando resultados satisfactorios.

ENTERITIS

Enteritis Ulcerativa

Enteritis Necrotica

Aun cuando la enteritis—tanto en pavos como en pollos— puede deberse a diversas causas, los diagnósticos de este tipo no son útiles, generalmente, a menos que se especifique el tipo de enteritis de que se trata o se conozca su causa. Ciertas formas de enteritis, por ejemplo, provienen del exceso de calor, frío, hacinamiento o ingestión de materias deficientes en la alimentación. Dado que estos problemas se suelen remediar cuando se corrigen los errores de manejo, no nos ocuparemos de ellos en la presente exposición. Existen otras formas de enteritis que suelen provenir de enfermedades tales como la coccidiosis, cresta azul o sustancias tóxicas del moho y que se tratan en otros capítulos de este Manual.

Los dos tipos de enteritis que no encuadran en ninguna de las categorías mencionadas son: la enteritis ulcerativa y la enteritis necrótica, enfermedades diferentes de los pollos que también tienen distinto origen.

La enteritis ulcerativa es causada por una bacteria, *Clostridium colinum*, mientras que el *Clostridium perfringens* es el agente etiológico de la enteritis necrótica. Los clostridios son sumamente resistentes a los factores del medio ambiente. Estas bacterias formadoras de esporas pueden sobrevivir en ebullición durante varios minutos.

A la enteritis ulcerativa se la suele llamar "enfermedad de la codorniz" ya que su presencia es común en esta especie de aves.

Síntomas.

La sintomatología de la enteritis ulcerativa y la enteritis necrótica son similares. Ambas provocan desórdenes en el tracto intestinal y la infección se inicia rápidamente. Los porcentajes de mortandad y morbilidad son elevados. En las dos enfermedades, el primer indicio notable es la aparición de aves muertas. Posteriormente comienzan a verse muchas adormiladas y deprimidas, descendiendo al mismo tiempo el consumo de alimento. Con frecuencia, la coccidiosis complica este cuadro.

Lesiones.

Las lesiones presentan las siguientes diferencias en las dos enfermedades: en la

enteritis ulcerativa, la lesión más llamativa es una úlcera circular que penetra a gran profundidad y tiene un centro necrótico (células muertas). Hay úlceras de este tipo a lo largo del tracto intestinal y en ocasiones aparecen también en los ciegos. También puede haber zonas necróticas en el hígado.

Por lo general, hay deshidratación del cuerpo. En la enteritis necrótica, gran parte de la superficie del tubo intestinal tiene un revestimiento superficial de tejido muerto de aspecto similar al de un felpudo y que comienza en la parte inferior. El tubo intestinal se ve muy distendido y frágil. En los casos precoces, el contenido del mismo es acuoso y color marrón verdoso.

A medida que el problema avanza, el contenido se va transformando en una falsa membrana de materia necrótica sobre la pared interior. En los casos graves, la materia se desprende y forma un núcleo. El hígado tiene una coloración caoba oscura y muestra a veces zonas necróticas. Es característica la deshidratación.

Prevención.

Dado que la causa de ambas enfermedades es un poco incierta, las medidas de prevención son generales. Se recomienda cuidar la sanidad y dar niveles bajos de antibióticos en el alimento.

Tratamiento.

Ambas enfermedades parecen responder bien a algunos antibióticos en dosis de tratamiento, siempre y cuando la coccidiosis no esté complicando el cuadro. De ser así, el tratamiento debe incluir también sulfas y otras drogas anticoccidias.

DERMATITIS GANGRENOSA

(Dermatitis necrótica, necrosis cutánea, putrefacción del ala)

Esta enfermedad parece atacar en su forma aguda en aves de 4 a 16 semanas de edad.

La misma es causada por un clostridio el cual puede ser secundario a otro tipo de lesión dérmica.

Los organismos estafilocócicos y el E. coli pueden estar involucrados. Las granjas que tienen el problema de la Enfermedad de la Bolsa pueden llegar a tener una incidencia elevada de esta enfermedad.

Síntomas.

El nombre "putrefacción del ala" es sumamente descriptivo ya que con frecuencia la enfermedad afecta las puntas de las alas. Puede afectar también los muslos, lomo y pecho y en ocasiones las patas y pies.

Poco después de los primeros síntomas, las aves suelen echarse muriendo a menudo pisoteadas. La mortandad en los casos graves llega hasta el 20%.

Lesiones.

La dermatitis gangrenosa se inicia, por lo general, con la aparición de pequeños granitos sobre la piel que pronto evolucionan hasta tomar una zona amplia que parecería entrar en putrefacción, presentándose un edema coloreado de sangre debajo de la piel. Las plumas se arrancan fácilmente. El curso de la enfermedad suele durar entre una semana y diez días.

Prevención.

El mejoramiento de las medidas sanitarias, así como también un efectivo programa de vacunación contra la infección de la bolsa, ayudara a disminuir la incidencia de la dermatitis gangrenosa.

Tratamiento.

A veces se ha logrado reducir las perdidas incluyendo niveles elevados de antibióticos en el alimento

INFOGRAFIA

<http://www.portalbesana.es/estaticas/gripeaviar/queesgripeaviar1.html>

<http://www.avicolametrenco.cl/Enfermedades%20de%20las%20Aves.pdf+Onfalitis+en+los+pollos&cd=4&hl=es&ct=clnk&gl=co>

http://www.senasa.gob.pe/0/modulos/JER/JER_Interna.aspx?ARE=0&PFL=1&JER=258

http://es.wikipedia.org/wiki/Gripe_aviar

<http://www.bmeditores.com/pdf/avicultores/artLAE57%202.pdf>

