

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL

**INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *Escherichia coli* Y VIRUS DE LA
BRONQUITIS INFECCIOSA EN POLLOS LIBRES DE PATÓGENOS
ESPECÍFICOS**

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.

VÍCTOR RODRIGO ÁLVAREZ FARÍAS

VALDIVIA – CHILE

2006

A mis padres y hermanos,
sin su cariño esto no sería posible.

ÍNDICE

Capítulo	Página
1 RESUMEN	1
2 SUMMARY.....	2
3 INTRODUCCIÓN.....	3
4 MATERIAL Y METODOS.....	10
5 RESULTADOS.....	15
6 DISCUSIÓN.....	23
7 BIBLIOGRAFIA.....	27
8 ANEXOS.....	33
9 AGRADECIMIENTOS.....	41

1. RESUMEN

La avicultura mundial ha sido llevada a niveles de producción cada vez más intensivos para satisfacer las necesidades del mercado, sin embargo, esta alta intensividad propicia las condiciones para que ciertos patógenos, como *Escherichia coli* (*E. coli*), encuentren condiciones óptimas para ejercer su efecto. Es así como esta bacteria se ha convertido en una de las causas de mayores pérdidas a la industria.

Para determinar si la acción de *E. coli* se ve potenciada por el virus de la bronquitis infecciosa, se inocularon intranasalmente 50 aves libres de patógenos específicos de 14 días de edad, distribuidas en 5 grupos. El primer grupo recibió un placebo, el segundo la bacteria, el tercero el virus de la bronquitis infecciosa, el cuarto recibió una combinación de ambos agentes al mismo tiempo, todos estos grupos fueron inoculados intranasalmente; por el contrario, el quinto grupo recibió primero el virus por vía intratraqueal y cinco días después la bacteria por la misma vía. Para evaluar los efectos de la infección se registró signología clínica diariamente, además los días 4, 9, 15 y 21 se realizaron necropsias para determinar lesiones macroscópicas, actividad ciliar de tráquea, recuperación de la bacteria y cortes histológicos para determinar lesiones microscópicas.

La signología clínica observada fue concordante a la producida por el virus de la bronquitis infecciosa en todos los grupos que recibieron este agente, también en estos grupos hubo un descenso de la actividad ciliar entre los días 4 y 9, posterior a esto, la actividad ciliar se recuperó llegando a valores normales. La mayor severidad de lesiones fue observada en los grupos que recibieron ambos agentes, observándose lesiones como: hiperplasia epitelial e infiltración linfocitaria en tráquea, congestión e hiperemia en pulmones, congestión, hiperemia y degeneración tubular en riñones, hiperplasia y congestión en bazo. En todos los grupos que recibieron la bacteria, se la pudo recuperar desde el tracto respiratorio, además en el grupo 5 fue posible recuperarla desde otros órganos como riñón, corazón, bazo e hígado.

De estos resultados se puede concluir que la infección previa o conjunta del virus de la bronquitis infecciosa favorece la acción de *E. coli*, dándole la posibilidad que pueda ingresar al organismo, potenciando la severidad de las lesiones producidas.

Palabras claves: *Escherichia coli*, bronquitis infecciosa, aves LPE.

2. SUMMARY

EXPERIMENTAL INFECTION WITH *Escherichia coli* AND INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS IN SPECIFIC PATHOGENS FREE BIRDS

The worldwide poultry has been taken to increasingly more intensive production levels in order to satisfy the market needs. Nevertheless, this high intensivity has also caused the optimal conditions for certain pathogens, like *Escherichia coli* (*E. coli*) to exert their effect. For these reasons, this bacterium has become one of the greatest causes of economic losses in the industry.

To determine if the action of *E. coli* can be facilitated by certain agents and/or conditions, 50 birds of 14 days of age were intranasally inoculated and distributed in 5 groups. The first group received a placebo, the second the bacterium, the third the virus of the infectious bronchitis, the fourth and fifth a combination of both agents, all these groups were intranasally inoculated; on the contrary the fifth group received first the virus by intratracheal way and five days after the bacterium by the same way. The daily clinical signology was observed and in addition, necropsies at days 4, 9, 15 and 21 were made to determine macroscopic injuries, ciliary activity of trachea, recovery of the bacterium and histologic cuts for determination of microscopic lesions.

The observed clinical signology was concordant with infectious bronchitis in all the groups that received the virus; also in these groups there was a reduction of the ciliary activity between days 4 and 9, later to this, the ciliary activity recovered to normal values. The greater severity of lesions was observed in the groups that received both agents, and injuries were: epithelial hyperplasia and linfocitary infiltration in trachea, lung congestion and hiperaemia, in kidneys hiperaemia and tubular degeneration, spleen hyperplasia and congestion. In all the groups that received the bacterium, the microorganism was recovered from the respiratory tract; in group 5 it was possible to recover it from other organs like kidney, spleen heart and liver.

In conclusion, the previous or combined action of the virus of the infectious bronchitis, favors the action of *E. coli*, giving the possibility to enter the organism, increasing the severity of the lesions it can produce.

Key words: *Escherichia coli*, Infectious bronchitis, SPF birds.

3. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli (*E. coli*) está clasificada dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, género *Escherichia*, es un bacilo corto Gram negativo que alcanza dimensiones de 1,1-1,5 μm x 2,0-6,0 μm , anaerobio facultativo y móvil. Las cepas se subdividen serológicamente por la presencia de factores de virulencia. La serotipificación completa incluye a los antígenos somático (O), capsular (K) y flagelar (H) (Holt y col 2000).

Esta bacteria está presente en gran cantidad en el intestino grueso y algunas veces en la parte posterior del intestino delgado de aves sanas, en concentraciones de 1×10^6 y 1×10^9 unidades formadoras de colonia (UFC) por centímetro de intestino (Harry y Hemsley 1965, Dominik y Jensen 1984). Las cepas que normalmente predominan no son patógenas cuando existen buenas condiciones de mantenimiento de las aves (Harry y Hemsley 1965), sin embargo, bajo ciertas circunstancias, pueden producir infecciones generalizadas (Gordon 1980). En pollos sanos, 10 a 15% de los coliformes intestinales pertenecen a serotipos potencialmente patógenos para las aves (Harry y Hemsley 1965).

Las cepas de *E. coli* en aves son consideradas el patógeno secundario de mayor relevancia y en la actualidad son una de las causas más importantes de pérdidas económicas para el sector avícola (Stordeur y Mainil 2002). En conjunto, las infecciones con participación de *E. coli* son responsables de cerca del 43% de los decomisos de aves de engorda durante el procesamiento (Yogarathnam 1995).

3. 1 PATOLOGÍAS PRODUCIDAS POR *E. coli* EN AVES DE PRODUCCIÓN

Dentro de los cuadros patológicos posibles de presentarse en una infección con *E. coli* que variarán según la susceptibilidad del huésped y el serotipo infectante de la bacteria destacan:

3. 1. 1 Infección de las vías respiratorias

La enfermedad de los sacos aéreos se presenta sobre todo en pollos de 4-9 semanas de edad y muchas veces a la enfermedad resultante se le denomina enfermedad respiratoria crónica (ERC) (Barnes y Gross 1997).

Los sacos aéreos están recubiertos interiormente por una sola capa de células epiteliales que experimentan una inflamación intensa en respuesta a una injuria, los exudados producidos por los sacos aéreos inflamados no pueden ser evacuados, constituyendo un medio excelente para la multiplicación de agentes patógenos. Cualquier fluido que se acumule, sea sangre, líquido ascítico o exudado, acabará penetrando en los capilares aéreos del pulmón, inundándolos y asfixiando el ave (Steiner y Davis 1985).

3. 1. 2 Pericarditis

Gran parte de los serotipos de *E. coli* originan pericarditis luego de septicemia (Barnes y Gross 1997). La pericarditis se vincula por lo general con miocarditis y resulta en cambios notables en el electrocardiograma, muchas veces antes de que se presenten lesiones macroscópicas (Gross 1966).

3. 1. 3 Salpingitis

Este problema del tracto genital puede ser la consecuencia de una infección por vía ascendente consecuencia de una inseminación artificial, o estar asociada a lesiones de peritoneo o impactación del oviducto (Stordeur y Mainil 2002). Además, cuando el saco aéreo abdominal mayor izquierdo se infecta con *E. coli*, las hembras pueden desarrollar salpingitis crónica (Barnes y Gross 1997). Las aves enfermas mueren dentro de los 6 meses siguientes a la infección (Stordeur y Mainil 2002). Las lesiones consisten en una disminución del grosor de las paredes del oviducto, presencia de heterófilos, fibrina y necrosis de caseificación (Gross 1994).

3. 1. 4 Peritonitis

La infección por coliformes del peritoneo se desarrolla en gallinas ponedoras, sucede cuando las bacterias ascienden a través del oviducto y crecen con rapidez en el material de yemas depositadas en la cavidad peritoneal, se caracteriza por una mortalidad aguda y acumulación de fibrina en esta cavidad (Gross y Siegel 1959).

3. 1. 5 Septicemia aguda

Es una enfermedad infecciosa aguda semejante a la tifoidea y al cólera aviar de la cual se puede aislar *E. coli* y a veces la padecen pollitos y pavos en crecimiento y maduros. Las aves afectadas se encuentran en buena condición física y tienen buches llenos, lo que indica la naturaleza aguda de la infección (Barnes y Gross 1997).

3. 1. 6 Sinovitis (Osteomielitis)

Se ha aislado *E. coli* de infecciones articulares en pollos. A menudo la sinovitis es una secuela de la septicemia y puede desarrollarse en aves con inmunidad insuficiente (Barnes y Gross 1997). La diseminación hematógena de *E. coli* luego de la infección por el virus de la enteritis hemorrágica en pavos resulta en sinovitis, osteomielitis y decoloración verde del hígado en pavos (Droual y col 1996).

3. 1. 7 Panoftalmitis

Es una secuela poco común de la septicemia por *E. coli*. Existe hipopión, por lo general en un ojo, el cual está ciego. Gran parte de las aves mueren poco después del inicio de las lesiones, aunque algunas se recuperan (Barnes y Gross 1997).

3. 1. 8 Coligranuloma (enfermedad de Hjarre)

Esta enfermedad se expresa en aves adultas, asociada a mortalidad esporádica. Es poco frecuente, sin embargo, puede alcanzar una mortalidad del 75% en ciertos lotes. Las lesiones son características por la aparición de granulomas en el hígado, ciego, duodeno y el mesenterio, semejante a las lesiones de la leucosis. Las aves presentan pocos síntomas antes de morir, como pérdida de condición y abatimiento. La muerte ocurre como consecuencia de la ruptura de los granulomas (Stordeur y Mainil 2002).

3. 1. 9 Síndrome de cabeza hinchada (SCH)

Es una celulitis aguda a subaguda que afecta a los tejidos periorbitales y adyacentes de la cabeza (Barnes y Gross 1997), se describió por primera vez en aves de engorda en Sud África, relacionado a *E. coli* y una infección por un Coronavirus no identificados (Morley y Thomson 1984).

3. 1. 10 Celulitis aviar

Es una enfermedad cutánea crónica, que afecta el abdomen de los pollos de engorda, caracterizada por membranas de exudado caseoso con heterófilos en los tejidos subcutáneos (Barnes y Gross 1997).

3. 2 *E. coli* EN OTRAS ESPECIES AVIARES

E. coli no sólo afecta a las aves de producción como gallinas o pavos, sino también a otras especies, por ejemplo, en faisanes las mayores infecciones están relacionadas con las de aves galliformes, donde especialmente importantes son la colibacilosis y la salmonelosis (Swarbrick 1985). Puede causar enteritis en ratites en asociación con *Salmonella spp* y *Clostridium spp* (Kaneene y col 1985, Frazier y col 1993), dentro de este grupo la avestruz es particularmente susceptible a colibacilosis (Cooper 2005).

En el Reino Unido, un estudio de aves silvestres, principalmente gaviotas (*Larus spp*), arrojó cerca de un 2% de muestras positivas a *E. coli* O157 productora de verotoxina (Wallace y col 1997). Otro serotipo (O86: K61) fue sindicado como responsable de la muerte de lúganos (*Carduelis spinus*), y verderón común (*Carduelis choris*) durante el invierno (Pennycot y col 1998). Por otra parte, la flora bacteriana cloacal de la mayoría de los psitácidos es Gram positiva, aunque se han observado poblaciones de Gram negativos entre los que *E. coli* es predominante (Dorrestein y col 1985, Flammer y Drewes 1988).

3. 3 FACTORES PREDISPONENTES A INFECCIÓN POR *E. coli*

La acción de *E. coli* se ve favorecida por dos factores:

- Su presencia y concentración en el ambiente.
- Condiciones que produzcan un quiebre en los sistemas de protección del ave.

3. 3. 1 Presencia y concentración en el ambiente

Para que se produzca la infección del tracto respiratorio es necesario que el tracto intestinal sea un reservorio de cepas patógenas de *E. coli* y que luego éstas puedan establecerse en el sistema respiratorio (Gross 1961). Por lo que se espera que el tracto respiratorio sea infectado dependiendo del grado en el cual el medio ambiente esté contaminado. El hecho de que colibacilosis sea más frecuente en pollos broiler, sugiere que el sistema intensivo de manejo y alojamiento usado en la producción de este tipo de aves las expone a un alto grado de contaminación, a diferencia de granjas con un sistema de producción menos intensivo (Harry y Hemsley 1965, Barnes y Gross 1997). De la misma manera, la gran prevalencia de colisepticemia observada en invierno, cuando la ventilación es a menudo restringida para conservar calor, sugiere la importancia de la contaminación ambiental con *E. coli*. Factores que pueden favorecer la contaminación ambiental con *E. coli* son:

- Los roedores pueden ser transportadores de *E. coli* (Barnes y Gross 1997).
- Moscas y otros insectos pueden tomar parte en la introducción y diseminación de la enfermedad (Zander y col 1997). El ácaro *Dermanyssus gallinae* puede causar estrés, se alimenta de sangre por lo que su acción puede eventualmente llevar a anemia, además de poder actuar como vector de *E. coli* (Axtell y Arends 1990).

3. 3. 2 Daño a los sistemas de protección del ave a infecciones

En general el estrés incrementa la susceptibilidad a las enfermedades (Freeman 1976) y a la colibacilosis en particular (Leitner y Heller 1992, Barnes y Gross 1997). Una alta densidad de gallinas por jaula induce a estrés y dificulta el mantenimiento de un óptimo clima de alojamiento. También una alta producción de huevos está asociada a un quiebre del balance entre los niveles de estrógeno y progesterona, lo cual puede causar disminución de la resistencia a infecciones ascendentes desde el oviducto (Kohlert 1968). Un daño a la piel, por picaje por ejemplo, puede permitir la infección a través de las mucosas o piel comprometidas (Barnes y Gross 1997). Está descrito que infecciones con ciertos patógenos que producen lesiones en el sistema respiratorio, además de factores inmunosupresivos tales como la infección con virus Gumboro (Wyeth 1975, Nakamura y col 1990) o el virus de la Anemia Infecciosa y drogas inmunosupresoras (Sadler y Edgar 1969, Nakamura y col 1987) hacen a los pollos más susceptibles a colibacilosis (Barnes y Gross 1997). Es así como existen varios agentes infecciosos actualmente en la avicultura que pueden producir las condiciones anteriormente mencionadas, entre los que destacan:

3. 3. 2. 1 Virus de la enteritis hemorrágica (HEV)

Pierson y col (1996a) sugirieron que la mortalidad asociada con colibacilosis en pavos de 6-12 semanas de edad es el resultado de interacción entre múltiples agentes infecciosos primarios. Estos han sido identificados como el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), *Bordetella avium* (BA) y cepas virulentas y avirulentas (vacuna) del virus de la enteritis hemorrágica (HEV), siendo este último el agente más común asociado a *E. coli* (Larsen y Domermuth 1985). Se cree que el virus aumenta la susceptibilidad a la infección con la bacteria como resultado directo de degeneración de la mucosa intestinal (Larsen y Domermuth 1985). También HEV infecta y se replica en células del sistema inmune de pavos por lo que puede causar inmunosupresión (Nagaraja y col 1982ab, Larsen y Domermuth 1985, Nagaraja y col 1985, Van den Hurk 1990, Saunders y col 1993).

3. 3. 2. 2 Micoplasmas

Existe evidencia que indica que colisepticemia es primariamente una infección respiratoria como resultado de una infección asociada a virus bronquitis infecciosa o *Mycoplasma gallisepticum*. Gross (1958, 1961) demostró que ambos patógenos respiratorios producen cambios en los tejidos del tracto respiratorio que favorecen la invasión de *E. coli*.

3. 3. 2. 3 Adenovirus y Rotavirus

Se ha observado que colisepticemia puede ser un evento terminal y secundario a una enteritis necrohemorrágica producida por Adenovirus y/o Rotavirus, y también debido a una inmunosupresión producida por Adenovirus (Hines II y col 1995).

3. 3. 2. 4 Virus de la Bronquitis infecciosa (VBI)

Entre las infecciones respiratorias de pollos, la causada por VBI es una de las más contagiosas (Nakamura y col 1992, Cook y Mockett 1995, Glisson 1998). El virus pertenece al género *Coronavirus* de la familia *Coronaviridae* (Estola 1970). Se replica en tejidos de vías respiratorias, intestinos, riñones y oviducto (Ambali y Jones 1990, Lucio y Fabricant 1990). Al exámen microscópico la tráquea se observa edematosa y con pérdida de cilios (Ridell 1997), de esta manera las vías respiratorias dañadas se vuelven en extremo susceptibles a la invasión por *E. coli* que entra al organismo por esta vía (Gross 1961). Cuando se inocula solo *E. coli*, se replica difícilmente en el tracto respiratorio superior y no se recupera de órganos internos, sin embargo, cuando VBI se incluye en el inóculo, se aísla la bacteria en grandes cantidades del tracto respiratorio superior y también de órganos internos (Cook 1989a). Por lo tanto, las infecciones por la asociación *E. coli*-IBV son más graves que las originadas por los agentes en forma individual (Smith y col 1985).

En pollos jóvenes, la inoculación de cepas de VBI con serotipos patógenos de *E. coli*, causa alguna mortalidad, la cual puede llegar a ser apreciable en grandes planteles comerciales de broiler (Cook 1989b).

Droual y Woolcock (1994) en un informe de caso en California, con aves que presentaban síndrome de cabeza hinchada (SCH), aislaron una cepa de *E. coli* serotipo O78 de tráquea, sacos aéreos, cerebro, senos infraorbitarios, tejido subcutáneo y huesos, también aislaron VBI del serotipo Massachusetts de la cavidad nasal de las aves.

Matthijs y col (2003) compararon serotipos de campo y serotipos de vacunas de VBI en infección mixta con cepas de *E. coli*, en cuanto a su habilidad para inducir colibacilosis en aves de 29 días de edad. Se inocularon las aves con el virus y cinco días después se administró la bacteria, observándose un aumento en la mortalidad de las aves posterior a la inoculación y lesiones atribuibles a colibacilosis. No se encontraron diferencias significativas entre la capacidad de los serotipos de campo y los serotipos de vacunas para facilitar la acción de *E. coli*. En infecciones experimentales en pollos libres de patógenos específicos (LPE) por inoculación nasal de VBI y serotipos patógenos de *E. coli* se han descrito lesiones similares a las observadas en casos de campo de colibacilosis (Smith y col 1985, Bumstead y col 1989). Por lo tanto existe evidencia para suponer que una condición parecida a la enfermedad natural puede ser producida por inoculación de pollos con una mezcla de VBI y *E. coli* (Gross 1958, 1961, Fabricant y Levine 1962).

En el presente trabajo se estudió en forma experimental el efecto de la administración de *E. coli* y virus Bronquitis infecciosa (en forma individual y asociados) a pollos LPE planteándose la siguiente hipótesis de trabajo:

- En infecciones asociadas, la acción patológica de *E. coli* se ve facilitada y potenciada por el virus de la bronquitis infecciosa aviar.

Con la finalidad de determinar la validez de la hipótesis de trabajo, se plantearon los siguientes objetivos:

- Evaluar la patogenicidad de una cepa de *E. coli* inoculada en forma individual y en asociación con virus Bronquitis Infecciosa en pollos LPE.
- Determinar la presencia de signos clínicos en las aves de los grupos experimentales en estudio.
- Determinar presencia de lesiones anatomopatológicas macroscópicas, en las aves de los diferentes grupos experimentales.
- Recuperar *E. coli* de aves de los grupos experimentales.
- Determinar cambios microscópicos en tráquea, pulmón, sacos aéreos y de cualquier otro órgano que se vea afectado macroscópicamente en las aves de los grupos experimentales.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Material biológico

4.1.1.1 Aves y huevos embrionados

En el ensayo se utilizaron 50 pollos LPE Leghorn sin sexar, de 14 días de edad y 50 huevos embrionados para titulación de la vacuna, procedentes del plantel de aves LPE del Instituto de Patología Animal de la Universidad Austral de Chile.

4.1.1.2 Virus

Se usó la vacuna “Bronchitis Vaccine Massachussets Type, Live virus” Merial[®].

4.1.1.3 Bacteria

Una cepa de *E. coli*, aislada de una muestra de aves con diagnóstico de colibacilosis en el laboratorio de Patología Aviar de la Universidad Austral de Chile.

4.1.2 Equipos de laboratorio y reactivos

Cinco unidades de aislamiento con aire filtrado y sistema de presión negativa.

Incubadora y nacedora de huevos (Werner Schumacher, Ing. Mod. VFG, Alemania).

Cámara de flujo laminar (Haroshet Ltda., mod. CH500, Israel).

Baño termorregulado (Kötteramann 3041, Alemania).

Agitador magnético termorregulado (Ika Werk, Mod. MCT, Alemania).

Microscopio (Zeiss).

Microscopio óptico invertido (Leitz, mod. Diavert, Alemania).

Cortador de tejido (Mc’ Iiwain Tissue chopper, The Mickle lab. Engeneering Co. Ltda. Inglaterra).

Horno.

Material de laboratorio y reactivos en general

4. 2 MÉTODO

4. 2. 1 Titulación

- La concentración de partículas virales de la vacuna fue determinada mediante la inoculación de diluciones seriadas base 10 en saco alantoideo de huevos embrionados LPE, el título fue calculado según el método de Reed y Muench (1938).
- La concentración de la suspensión bacteriana fue calculada mediante el sistema de recuento en placa por siembra en profundidad de diluciones seriadas base 10 (Chile 2002).

4. 2. 2 Grupos

Los pollos fueron mantenidos desde su nacimiento en condiciones de aislamiento en cámaras con aire filtrado y sistema de presión negativa, con alimentación de origen comercial y agua *ad libitum*.

Las aves al día de edad, se distribuyeron en 5 grupos de 10 aves cada uno y a los 14 días se les administró:

- **Grupo 1:** Control, recibió por instilación nasal 0,1 ml de suero fisiológico.
- **Grupo 2:** Inoculado por instilación nasal con 0,1 ml de una suspensión que contenía 9,0 UFC de *E. coli*.
- **Grupo 3:** Inoculado con la cepa vacunal de bronquitis infecciosa por instilación nasal, con $1 \times 10^{3,5}$ dosis infecciosa embrión 50% (DIE 50) en 0,1 ml.
- **Grupo 4:** Inoculado en forma simultánea con *E. coli* (9,0 UFC en 0,1 ml) y el virus ($1 \times 10^{3,5}$ DIE 50 en 0,1 ml) por instilación nasal.
- **Grupo 5:** Recibió el virus ($1 \times 10^{3,5}$ DIE 50 en 0,1 ml) por instilación traqueal y cinco días después una suspensión de *E. coli* (9,0 UFC) por la misma vía.

Cada grupo se mantuvo separado y aislado posterior a la inoculación (figura 1). La temperatura en la habitación fue registrada diariamente.



Figura 1. Aves mantenidas en cámara de aislamiento.

4. 2. 3 Determinación de signología clínica y necropsias

Se realizaron observaciones diarias para detectar signología clínica. Los días 4, 9 y 15 posterior a la inoculación se desensibilizaron y eutanasiaron mediante corte de la vena yugular, dos aves de cada grupo y se procedió a realizar necropsia. En el último muestreo realizado el día 21 se eutanasiaron 4 aves por grupo.

4. 2. 4 Determinación de actividad ciliar en tráquea

Para determinar el grado de lesión respiratoria, se usó el índice propuesto por Andrade y col (1982) que clasificaron las lesiones según la movilidad de los cilios del epitelio traqueal. Durante las necropsias, de cada ave fue recolectada la tráquea, limpiada externamente del tejido conectivo y grasa. De cada tráquea se obtuvieron anillos de aproximadamente 1 a 1,5 mm que se mantuvieron en tubos con medio esencial mínimo (MEM) y a baño maría a 40° C hasta su observación. Los anillos se observaron en forma individual en un microscopio invertido con 100 aumentos (figura 2). Se observaron 6 anillos traqueales por ave, dos de la parte proximal de la tráquea, dos de la media y dos de la distal, de los cuales se obtuvo un promedio para cada ave y a su vez un promedio por grupo experimental (figura 3).

La escala propuesta para determinar el grado de afección del epitelio ciliado es la siguiente:

- 0 = sin actividad ciliar.
- 1 = menos del 50 % del anillo con actividad ciliar.
- 2 = mas del 50 % del anillo con actividad ciliar.
- 3 = 100 % de actividad ciliar.



Figura 2. Microscopio invertido.

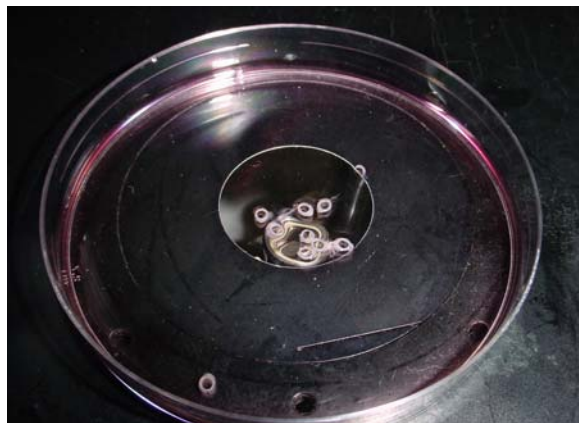


Figura 3. Placa con anillos traqueales en medio esencial mínimo para observación de actividad ciliar.

4. 2. 5 Recuperación de *E. coli* de aves infectadas

Durante la necropsia se tomaron muestras de dos grupos de órganos:

- Tráquea y pulmones.
- Bazo, hígado, corazón y riñones.

Los órganos de estos grupos fueron macerados y adicionados de caldo nutritivo para obtener una suspensión cercana al 10% peso/volumen, posteriormente se sembraron separados por grupo en agar McConkey e incubados en horno a 37° C por 24 a 48 h.

De las placas que presentaron crecimiento, las colonias fueron sometidas a pruebas para su completa identificación como *E. coli* (tinción de Gram, Catalasa, Oxidasa, Lactosa, Glucosa, producción de gas, H₂S, Citrato, Urea, Indol).

Los resultados se reportaron como:

- + = con crecimiento bacteriano.
- = sin crecimiento bacteriano.

4. 2. 6 Exámen histopatológico

Se obtuvieron muestras de tráquea, pulmones y sacos aéreos como rutina en la necropsia, así como de aquellos órganos que se encontraron alterados macroscópicamente. Los tejidos se depositaron en frascos con formalina al 10%, posterior a la fijación (48 h) los tejidos se laminaron, deshidrataron e impregnaron con parafina y cortaron con micrótopo a un grosor de 5 μm , finalmente se tiñeron las preparaciones con hematoxilina y eosina y fueron observadas en el microscopio para determinar lesiones histológicas.

En los cortes de tráquea se evaluó hiperplasia epitelial, pérdida de cilios, infiltración linfocitaria, congestión, hiperemia y hemorragia. En pulmones se evaluó congestión, hemorragia, hiperemia e infiltración linfocitaria. En riñón: congestión, hemorragia, hiperemia y degeneración tubular. En bazo: hiperplasia, hemorragia, congestión e hiperemia, asignando un puntaje a cada lesión en donde 0 correspondió a ausencia de lesión, 1 a lesión leve, 2 a lesión moderada y 3 a lesión severa.

5. RESULTADOS

5.1 SIGNOLOGÍA CLÍNICA

Aproximadamente 48 horas posterior a la inoculación, las aves del grupo 3, 4 y 5, presentaron signología clínica consistente en: decaimiento, ruidos respiratorios del tipo estertores crepitantes, conjuntivitis (figura 4a), estornudos, plumoerección (figura 4b) y. Los signos en los distintos grupos afectados continuaron por 9 días. Las aves del grupo 1 y 2 no presentaron signología clínica. No se registró mortalidad durante el ensayo.



Figura 4a. Ave que muestra decaimiento y alteración en la forma del ojo.



Figura 4b. Decaimiento y plumoerección.

5.2 HALLAZGOS DE NECROPSIA

Durante todo el periodo de muestreo no se observaron alteraciones en las necropsias de las aves de los grupos 1 y 2. Las aves del resto de los grupos presentaron alteraciones que se detallan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Resumen de hallazgos anatomopatológicos y cantidad de aves que presentaron alteraciones durante el período de estudio.

Grupo	Órgano	Necropsia día 4	Necropsia día 9	Necropsia día 15	Necropsia día 21
3	tráquea	Coloración rojiza en parte superior ^b . Secreción mucoespumosa ^b .	Coloración rojiza en parte superior ^b .		
	tráquea	Coloración rojiza en parte superior ^b . Secreción mucoespumosa ^b .	Coloración rojiza en parte superior ^b .		Puntos rojizos de 1-2 mm de diámetro ^e .
4	pulmones	Zonas de coloración rojiza ^b .	Zonas de coloración rojiza ^b .		Zonas de coloración rojiza ^c .
	bazo				Aumentado de volumen ^d .
5	tráquea	Coloración rojiza en parte superior ^b . Secreción mucoespumosa ^b .	Coloración rojiza en parte superior ^b .		Puntos rojizos de 1-2 mm de diámetro ^c .
	pulmones	Zonas de coloración rojiza ^b .	Zonas de coloraciones rojizas y violáceas ^a .		Zonas de coloración rojiza ^d .
	riñón	Zonas de coloración rojiza ^b .			Aspecto cerebroideo ^c .
	bazo			Aumentado de volumen ^a .	

(^a) = un ave presentó la lesión de dos aves muestreadas; (^b) = dos aves presentaron la lesión de dos aves muestreadas; (^c) = un ave presentó la lesión de cuatro aves muestreadas; (^d) = dos aves presentaron la lesión de cuatro aves muestreadas; (^e) = tres aves presentaron la lesión de cuatro aves muestreadas.

El grupo 3 presentó en las tráqueas durante las dos primeras necropsias una zona de coloración rojiza en la parte superior (figura 5), por otra parte sólo en el primer muestreo se encontró secreción muco espumosa dentro de ésta.

En las tráqueas del grupo 4 se observaron alteraciones similares a las del grupo 3, además de puntos rojizos de 1-2 mm de diámetro en el tercio medio de la tráquea en la cuarta necropsia (figura 6). También se vieron afectados pulmones que presentaron áreas focales de coloración rojiza (figura 7) y el bazo en la cuarta necropsia se observó aumentado de volumen (figura 8).

Las aves del grupo 5 presentaron hallazgos en común en tráquea y pulmones con los observados en el grupo 4. Además, un ave en la segunda necropsia presentó una zona violácea y rojiza que comprometía en gran medida el pulmón derecho (figura 9). Un ave en la tercera necropsia presentó el bazo aumento de volumen. A diferencia de los grupos anteriores se vio afectado el riñón en la primera y cuarta necropsia con zonas rojizas (figura 10) y aspecto cerebroideo respectivamente (figura 11).



Figura 5. Zona de coloración rojiza (flecha) en tráquea de ave del grupo 3.

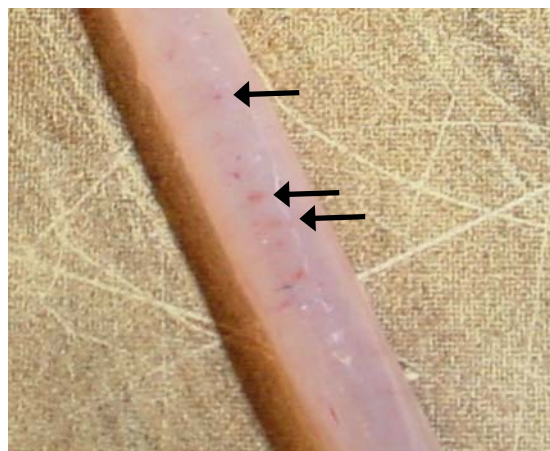


Figura 6. Puntos rojizos (flechas) de 1-2 mm de diámetro en tráquea de ave del grupo 4.

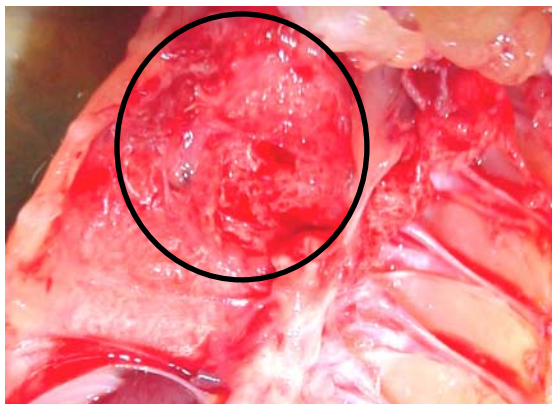


Figura 7. Zonas de coloración rojiza (circulo) en pulmón de ave del grupo 4.



Figura 8. Bazo aumentado de volumen de un ave del grupo 4 comparado con un bazo de un ave del grupo control.

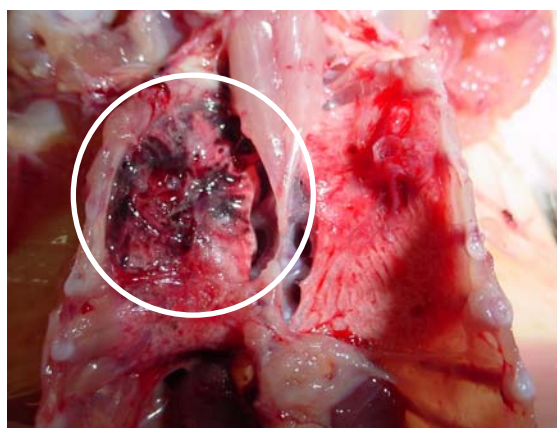


Figura 9. Zona de coloración rojiza y violácea (circulo) en pulmón derecho de un ave del grupo 5.

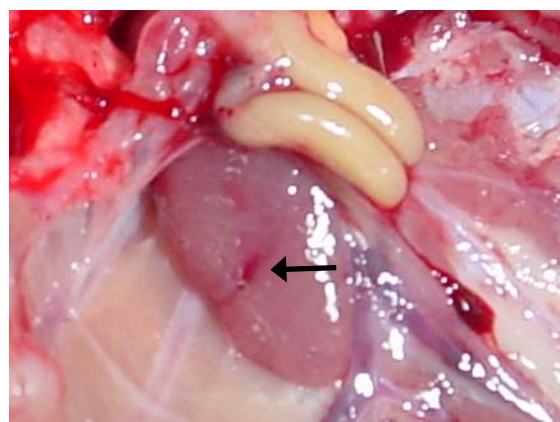


Figura 10. Zona rojiza (flecha) en riñón de un ave del grupo 5.

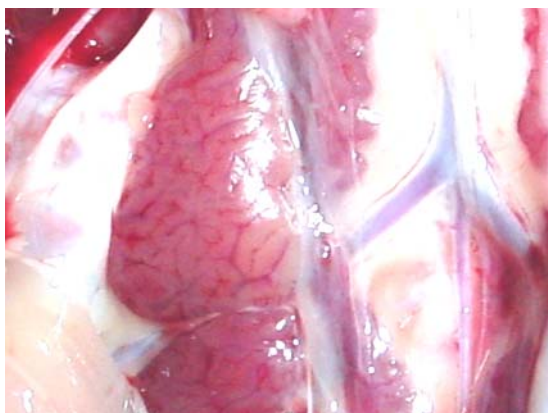


Figura 11. Riñón con aspecto cerebroideo encontrado en un ave del grupo 5.

5.3 ACTIVIDAD CILIAR EN TRÁQUEA

Los resultados de las observaciones de la actividad ciliar en tráqueas de los grupos experimentales se presentan en el cuadro 2. En la primera necropsia (día 4) se observó casi un 100% de cilioestasis en los grupos 3, 4 y 5. La situación se revirtió ya a partir del noveno día, observándose una completa recuperación en el último muestreo (día 21).

Cuadro 2. Promedio de la actividad ciliar en tráquea de las aves según grupos en estudio de acuerdo a índice propuesto por Andrade y col (1982).

Grupo	Necropsia día 4	Necropsia día 9	Necropsia día 15	Necropsia día 21
1	3	3	3	3
2	3	3	3	3
3	0	2,6	2,9	3
4	0,2	2,2	2,6	3
5	0,2	2	2,5	3

0 = sin actividad ciliar.

0,1-1 = menos del 50 % del anillo con actividad ciliar.

1,1-2 = más del 50 % del anillo con actividad ciliar.

2,1-3 = 100 % de actividad ciliar.

5.4 AISLAMIENTO BACTERIANO

La recuperación de *E. coli* durante el todo el periodo experimental se detalla en los cuadros 3 y 4.

Cuadro 3. Crecimiento bacteriano en placas sembradas con macerado de tráqueas y pulmones de las aves en estudio para recuperación de *E. coli*.

Grupo	Necropsia día 4	Necropsia día 9	Necropsia día 15	Necropsia día 21
1	-	-	-	-
2	+	+	+	-
3	-	-	-	-
4	+	+	+	-
5	+	+	-	+

+ = con crecimiento bacteriano

- = sin crecimiento bacteriano

Cuadro 4. Crecimiento bacteriano en placas sembradas con macerado de bazo, hígado, corazón y riñón de las aves en estudio para recuperación de *E. coli*.

Grupo	Necropsia día 4	Necropsia día 9	Necropsia día 15	Necropsia día 21
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	+	+	+	-

+ = con crecimiento bacteriano

- = sin crecimiento bacteriano

Se logró la recuperación de la bacteria desde el tracto respiratorio en las aves que fueron inoculadas con ella (grupo 2, 4 y 5). En el grupo 2 y 3 se recuperó hasta el día 15, el grupo 5 tuvo resultado negativo el día 15 pero volvió a recuperarse el día 21. En la

recuperación de bazo, hígado corazón y riñón se lograron resultados positivos hasta el día 15 sólo del grupo 5.

5. 5 EXAMEN HISTOLÓGICO

Durante la observación de los cortes histológicos de tráquea se otorgó puntajes según severidad de las lesiones presentes. Hiperplasia epitelial presentó mayor severidad, seguida de pérdida ciliar y finalmente infiltración linfocitaria. Los puntajes dados a las lesiones fueron promediados y sumados, obteniéndose así el puntaje de lesión acumulado sobre un máximo puntaje posible de alcanzar (Anexos 2, 3 y 4). Del puntaje de lesión acumulado en tráquea durante el ensayo (cuadro 5) se observa una marcada diferencia entre los grupos que recibieron el virus (3, 4 y 5) y los que no recibieron el virus (grupo 1 y 2).

Cuadro 5. Grado de lesión acumulado por grupo de un máximo posible de 9, en tráqueas de aves LPE determinado durante el estudio.

Grupo	n	Puntaje de lesión acumulado / Máximo puntaje posible
1	10	0 / 9
2	10	0 / 9
3	10	3,4 / 9
4	10	3,5 / 9
5	10	3,5 / 9

n = número de aves muestreadas

En pulmones las principales lesiones observadas fueron congestión e hiperemia, se calculó el puntaje de lesión acumulado de la misma manera que para tráquea (Anexo 5 y 6). Del cuadro 6 se desprende que pulmones de aves de los grupos 1 y 2 (no recibieron el virus) no fueron afectados, por el contrario, los que si recibieron el virus (grupo 3, 4 y 5) presentaron lesiones pulmonares, destacándose la marcada diferencia entre el grupo que recibió sólo al virus (grupo 3) y los que recibieron una combinación de los agentes del estudio (grupo 4 y 5).

Cuadro 6. Grado de lesión acumulado por grupo de un máximo posible de 6, en pulmones de aves LPE determinado durante el estudio.

Grupo	n	Puntaje de lesión acumulado / Máximo puntaje posible
1	10	0 / 6
2	10	0 / 6
3	10	0,2 / 6
4	10	3,6 / 6
5	10	3,9 / 6

n = número de aves muestreadas

En cuanto a hallazgos macroscópicos ocasionales se vieron afectados riñones y bazo. Al someter los riñones al examen histopatológico las principales lesiones observadas fueron congestión, hemorragia, hiperemia y degeneración tubular. El puntaje de lesión acumulado se observa en el cuadro 7.

Cuadro 7. Grado de lesión acumulado por grupo de un máximo posible de 12, en riñones de aves LPE determinado durante el estudio.

Grupo	n	Puntaje de lesión acumulado / Máximo puntaje posible
1	2	0 / 12
2		N/R
3		N/R
4		N/R
5	2	4 / 12

n = número de aves muestreadas

N / R = no realizado

Las lesiones presentes en bazo alcanzaron un puntaje de lesión acumulado que se muestra en el cuadro 8.

Cuadro 8. Grado de lesión acumulado por grupo de un máximo posible de 9, en bazo de aves LPE determinado durante el estudio.

Grupo	n	Puntaje de lesión acumulado / Máximo puntaje posibles
1	4	0 / 9
2		N / R
3		N / R
4	1	2 / 9
5	3	1,5 / 9

n = número de aves muestreadas

N / R = no realizado

6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se observó una clara diferencia en la signología clínica de los grupos de aves en estudio. Los grupos inoculados con la cepa vacunal de virus bronquitis infecciosa mostraron signos de la enfermedad a partir del segundo día, al igual que lo indicado por Nakamura y col (1992) quienes estudiaron la asociación de *E.coli* con VBI, en comparación con las aves de los grupos inoculados con un placebo (grupo 1) y con la bacteria (grupo 2). En cuanto a intensidad o severidad de la signología, no fue posible determinar diferencias entre los grupos afectados. Los signos clínicos observados fueron los producidos por VBI y consistieron en depresión, estornudos y ruidos respiratorios crepitantes. Estos signos son similares a los observados por Hidalgo y col (1986) y Toro y col (1988) en ensayos con VBI. La duración del cuadro clínico de los distintos grupos fue en promedio 9 días, sobre esto, Butcher y col (1990) en un estudio con una cepa nefropatogénica de VBI señalan que la presentación de los signos fluctúa entre 7 y 10 días, en contraste, Zuñiga (1992) observó que la signología permaneció entre cuatro y ocho días.

Durante las necropsias (cuadro 1), se realizaron hallazgos en común en los grupos que recibieron al virus (grupos 3, 4 y 5), como fue la coloración rojiza en la parte superior de la tráquea de las aves y exudado mucoespumoso al interior de ésta, dejando de manifiesto el tropismo del virus por el respiratorio superior. En el examen microscópico, estas lesiones correspondieron a un infiltrado linfocitario y a hiperplasia de las células epiteliales, como fue descrito por Mac Donald y Mc Martin (1970).

En cuanto al compromiso de órganos, en el grupo que recibió sólo el virus (grupo 3) las lesiones se circunscribieron sólo a la parte superior de la tráquea, en cambio las aves de los grupos que recibieron al virus más la bacteria (grupos 4 y 5), vieron afectados además los pulmones con hemorragias; esto puede deberse a que según Ackermann y Cheville (1991), los capilares aéreos son el sitio de entrada de *E. coli* a la sangre. Otros órganos afectados fueron el bazo con esplenomegalia y riñones con hemorragia y aspecto cerebroideo. Estas observaciones hacen evidente que si las aves toman contacto con la bacteria conjuntamente o después de una exposición al virus, la asociación de los agentes es capaz de producir lesiones de mayor severidad y no sólo en el tracto respiratorio. Las lesiones anteriormente descritas contrastan con las registradas por Smith y col (1985), quienes observaron como principales lesiones en las aves que recibieron la mezcla del virus con la bacteria, una severa pericarditis y peritonitis. Además, Nakamura y col (1992) aparte de encontrar inflamación en pericardio y peritoneo, también observaron perihepatitis.

El hecho de que el grupo inoculado sólo con la bacterias (grupo 2) no haya mostrado signología clínica, ratifica a *E. coli* como un patógeno principalmente secundario (Goren 1978, Smith y col 1985, Ficken y col 1987, Bree y col 1989, Yoder y col 1989, Nakamura y col 1992, Pierson y col 1996b).

El aparato respiratorio cuenta con mecanismos de defensa, principalmente el movimiento de los cilios del epitelio traqueal y la producción de mucus de las células caliciformes. Como una forma de evaluar la mayor o menor oportunidad que la bacteria ingrese al organismo, se registró la actividad ciliar en tráquea, debido a que las cepas virulentas de VBI dañan el epitelio causando pérdida de cilios e hiperplasia, predisponiendo al ave a patógenos oportunistas como *E. coli* (Peighambari y col 2000). Los grupos inoculados con el virus mostraron una clara disminución de la actividad ciliar del epitelio, la que fue recuperándose paulatinamente. La observación de actividad ciliar prácticamente normal al noveno día posterior a la inoculación, está en concordancia con lo observado por Geilhausen y col (1973) y Schrier y Cornelissen (1988), quienes señalan que la actividad ciliar se recupera alrededor del octavo día posterior a la inoculación con IBV. Un aspecto diferencial fue la mayor rapidez de recuperación de la actividad ciliar en las aves del grupo 3 respecto a las de los grupos 4 y 5, efecto que puede ser atribuible a la ausencia de *E. coli* en el grupo 3.

El aislamiento de *E. coli*, resultó negativo en los grupos control y 3 (sólo VBI), lo que indica, que no hubo contaminación durante el periodo de observación. En las aves inoculadas sólo con la bacteria (grupo 2), no hubo recuperación de la bacteria desde el grupo de órganos bazo, hígado, corazón y riñón, situación que puede ser explicada por la falta de lesiones primarias en el respiratorio por la ausencia de VBI, las que facilitan el ingreso de la bacteria al organismo.

De los grupos que recibieron *E. coli* más IBV, en el grupo 4 se recuperó la bacteria desde el tracto respiratorio hasta el día 15 acercándose a lo observado por Nakamura y col (1992) quienes la aislaron desde el día 9 al 16, pero no pudo aislarse desde bazo, hígado, corazón y riñón, a pesar de que el virus actuó sobre la mucosa traqueal y causó daño característico, determinado por actividad ciliar y exámenes histopatológicos. En cambio en el grupo 5, además de recuperar la bacteria desde el tracto respiratorio, se recuperó también desde bazo, hígado, corazón y riñón. Esta diferencia en ambos grupos que se inocularon con ambos agentes, indica que no sólo es necesaria la acción primaria de VBI, sino también se requiere una concentración adecuada de bacterias para que puedan pesquizarse en órganos (Ackermann y Cheville 1991). Esto fundamentado principalmente en que las aves del grupo 4 recibieron los inóculos via intranasal, en donde parte fue deglutido por el ave, en contraste con las aves del grupo 5, que recibieron los inóculos directamente en la tráquea, contando con una mayor concentración de los agentes.

Las cepas no patogénicas de *E. coli* son rápidamente removidas de la sangre, antes que una multiplicación significativa pueda ocurrir; en contraste, *E. coli* patogénica es escasamente removida del flujo sanguíneo por macrófagos del hígado y bazo (Arp y Cheville 1981), pero esto no puede aplicarse a la diferencia en aislamiento de la bacteria en los grupos 4 y 5, ya que ambos grupos recibieron la misma cepa.

Las lesiones traqueales determinadas por microscopía en los grupos 3, 4 y 5 mostraron poca diferencia a igual que en el trabajo de Nakamura y col (1992). Las lesiones en los grupos fueron observadas desde el día 4 al 15 después de la inoculación. Las principales lesiones en la tráquea concuerdan con las producidas por IBV descritas por otros autores: ausencia de cilios (Purcell y col 1976, El-Houadfi y col 1986, Toro y col 1988, Butcher y col 1990, Urrutia 1993), hiperplasia en las células epiteliales (Gouffaux y col 1977, El-Houadfi y col 1986, Butcher y col 1990, Urrutia 1993) y también infiltración linfocitaria (Pohl 1974, Gouffaux y col 1977, Albassam y col 1985, El-Houadfi y col 1986, Toro y col 1988, Butcher y col 1990, Urrutia 1993).

En los exámenes histopatológicos de pulmón, los grupos afectados fueron el 3, 4 y 5, siendo los dos últimos los que alcanzaron un mayor puntaje de lesión acumulado por la participación de la bacteria, siendo congestión e hiperemia los principales hallazgos (Anexo 5 y 6).

Las lesiones histológicas en riñón en el grupo 5, concuerdan con lesiones atribuibles a VBI, debido a que el virus provoca degeneración, vacuolización y descamación del epitelio tubular (Whiteman y Bickford 1979). Los grupos 3 y 4 recibieron al virus, sin embargo, sus riñones no presentaron alteraciones evidentes. Al respecto Nakamura y col (1992) no observaron lesiones en riñones.

La esplenomegalia presentada por aves del grupo 4 y 5 fue provocada por una congestión e hiperplasia de células de la pulpa blanca. Al respecto, el único hallazgo que hicieron Nakamura y col (1992) en bazo fue una necrosis leve.

La existencia de lesiones en distintos órganos en el grupo 4, a pesar de que no pudo aislarse la bacteria desde otros órganos que no fueran los respiratorios, concuerda con lo observado por Peighambari y col (2000), quienes recuperaron *E. coli* de aves con lesiones y sin lesiones, no pudiendo establecer una correlación entre recuperación de la bacteria con la presencia de lesiones.

Por lo expuesto anteriormente se acepta la hipótesis de este trabajo y se concluye que:

- El efecto de la cepa de *E. coli* utilizada se hace evidente sólo en las aves de los grupos infectados previa o simultáneamente con VBI.
- No hay diferencia en cuanto al tipo y severidad de las lesiones en el aparato respiratorio, en los grupos inoculados con *E. coli* y VBI en forma conjunta por vía intranasal o separada en el tiempo por vía intratraqueal.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann MR, NF Cheville. 1991. Ultrastructural studies of the lung of turkeys (*Meleagris Gallipavo*) inoculated intratracheally with *Escherichia coli*. *Vet Pathol* 28, 183-191.
- Albassam MA, RW Winterfield, HL Thacker. 1985. Comparison of the nephropathogenicity of four strains of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 30, 468-476.
- Ambali AG, RC Jones. 1990. Early pathogenesis in chicks with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 34, 809-817.
- Andrade LF, P Villegas, OJ Fletcher, R Laudencia. 1982. Evaluation of ciliary movement in tracheal ring to assess immunity to infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 26, 805-815.
- Arp LH, NF Cheville. 1981. Interaction of blood-borne *Escherichia coli* with phagocytes of spleen and liver in turkeys. *Am J Vet Res* 42, 650-677.
- Axtell RC, JJ Arends. 1990. Ecology and management of arthropod pests of poultry. *Annu Rev Entomo* 35, 101-126.
- Barnes HJ, WB Gross. 1997. Colibacillosis. En: Calnek BW (eds) Diseases of poultry, 10th edn Pp 131-141. Ames IA, Iowa State University Press. USA.
- Bree A, M Dho, JP Lafont. 1989. Comparative infectivity for axenic and specific-pathogen-free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with or without virulence factors. *Avian Dis* 33, 134-139.
- Bumstead N, MB Huggins, JKA Cook. 1989. Genetic differences in susceptibility to a mixture of avian infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *Br Poult Sci* 30, 39-48.
- Butcher GD, RW Winterfield, DP Shapiro. 1990. Pathogenesis of H13 nephropathogenic infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 34, 916-921.
- Chile. 2002. INN (Instituto Nacional de Normalización) Determinación de microorganismos aerobios mesófilos. (Norma Chilena Oficial 2659).
- Cook JKA. 1989a. Pathogenesis studies on Infectious Bronchitis. *III Seminario Internacional de Patología y Producción aviar 29-30 de marzo de 1989. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, pp 138-145.*

- Cook JKA. 1989b. The significance of novel serotypes of infectious bronchitis virus. *III Seminario Internacional de Patología y Producción aviar 29-30 de marzo de 1989. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile*, pp 146-151.
- Cook JKA, APA Mockett. 1995. Epidemiology of infectious bronchitis virus. En: Siddell SG *The coronaviridae* Pp 317-335. Plenum Publishing Corporation New York, USA.
- Cooper RG. 2005. Bacterial, fungal, and parasitic infections in the ostrich (*Struthio camelus* var. *domesticus*). *Anim Sci* 76, 97-106.
- Dominick MA, AE Jensen. 1984. Colonization and persistence of *Escherichia coli* in axenic y monoxenic turkeys. *Am J Vet Res* 45, 2331-2335.
- Dorrestein GM, MN Buitelaar, MH Van del Hage, P Zwart. 1985. Evaluation of a bacteriological and mycological examination of psittacine bird. *Avian Dis* 29, 951-962.
- Droual R, PR Woolcock. 1994. Swollen head syndrome associated with *E. coli* and infectious bronchitis virus in the central valley of California. *Avian Pathol* 23, 733-742.
- Droual R., RP Chin, M Rezvani. 1996. Synovitis, osteomyelitis, and green liver in turkeys associated with *Escherichia coli*. *Avian Dis* 40, 417-424.
- El-Houadfi MD, RC Jones, JKA Cook, AG Ambali. 1986. The isolations and characterization of six avian infectious bronchitis viruses isolated in Morocco. *Avian Pathol* 15, 93-105.
- Estola T. 1970. *Coronavirus* a new group of animal RNA viruses. *Avian Dis* 14, 330-336.
- Fabricant J, PP Levine. 1962. Experimental production of complicated chronic respiratory disease infection "air sac disease". *Avian Dis* 6, 13-23.
- Ficken MD, JF Edwards, JC Lay, DE Tveter. 1987. Tracheal mucus transport rate and bacterial clearance in turkeys exposed by aerosol to La Sota strain of Newcastle disease virus. *Avian Dis* 31, 241-248.
- Flammer K, LA Drewes. 1988. Species related differences in the incidence of gram negative bacteria isolated from the cloaca of clinically normal psittacine birds. *Avian Dis* 32, 79-83.
- Frazier KS, AJ Herron, ME Hines II, JM Gaskin, NH Altman. 1993. Diagnosis of enteritis and enterotoxaemia due to *Clostridium difficile* in captive ostriches (*Struthio camelus*). *J Vet Diagn Invest* 5, 623-625.
- Freeman BM. 1976. Stress and the domestic fowl: a physiological reappraisal. *World Poultry Sci J* 32, 249-256.

- Geilhausen HE, FB Ligon, PD Lukert. 1973. The pathogenesis of virulent and avirulent avian infectious bronchitis virus. *Arch ges Virus Forsch* 40, 285-290.
- [Glisson JR](#). 1998. Bacterial respiratory diseases of poultry. *Poultry Sci* 77, 1139-1142.
- Gordon RF. 1980. Enfermedades de las aves. Pp 58-61. El Manual Moderno S.A. México.
- Goren E. 1978. Observations of experimental infections of chicks with *Escherichia coli*. *Avian Pathol* 7, 213-224.
- Gouffaux M, H Vindevogel, G Meulemans, A Dewaele, P Halen. 1977. Elements du diagnostic histopathologique differential des principales affections respiratoires de la poule. *Avian Pathol* 6, 61-76.
- Gross WB, 1958. Symposium on chronic respiratory diseases of poultry. II. The role of *Escherichia coli* in the cause of chronic respiratory disease and certain other respiratory diseases. *Am J Vet Res* 19, 448-452.
- Gross WB. 1961. The development of "air sac disease". *Avian Dis* 5, 431-439.
- Gross WB. 1966. Electrocardiographic changes of *Escherichia coli*-infected birds. *Am J Vet Res* 27,1427-1436.
- Gross WB. 1994. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. En: Gyles CL. (ed). *Escherichia coli* in Domestic Animals an Humans. CAB int'l, Wallingford. Reino Unido.
- Gross WB, PB Siegel. 1959. Coliform peritonitis of chickens. *Avian Dis* 3,370-373.
- Harry EG, LA Hemsley. 1965. The relationship between environmental contamination with septicaemia strains of *Escherichia coli* and their incidence in chickens. *Vet Rec* 77, 241-245.
- Hidalgo H, R Gallardo, H Toro. 1986. Características antigénicas y patológicas de 3 aislados del virus de la bronquitis infecciosa obtenidas en aves vacunadas. *J Vet Med* 3, 26-35.
- Hines II ME, EL Syer, CA Baldwin, JR Cole. 1995. Combined Adenovirus and Rotavirus enteritis with *Escherichia coli* septicemia in an emu chick (*Dromaius novahollandiae*). *Avian Dis* 39, 646-651.
- Holt J, N Krieg, P Sneath, J Staley, S Williams. 2000. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9ª edición Pp 179-180. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. USA.
- Kaneene JB, RF Taylor, JG Sikarskie, TJ Meyer. 1985. NA Richter Disease patterns in the Detroit Zoo: a study of avian population from 1973 through 1983. *J Am Vet Med Assoc* 187, 1129-1131.

- Kohlert R. 1968. Untersuchungen zur Atiologie der Eileiterentzündung beim Huhn. *Monatsh Veterinärmed* 23, 392-395.
- Larsen CT, CH Domermuth. 1985. Field outbreaks of colibacillosis of turkeys associated with hemorrhagic enteritis virus *Avian Dis* 29, 838-842.
- Leitner G, ED Heller. 1992. Colonization of *Escherichia coli* in young turkeys and chickens. *Avian Dis* 36, 211-220.
- Lucio B, J Fabricant. 1990. Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 34,865-870
- Mac Donald JW, DA Mc Martin. 1970. Histopathology of infectious bronchitis-A diagnostic problem. *Vet Rec* 87,729-730.
- Matthijs MGR, JHH van Eck, WJM Landman, JA Stegeman. 2003. Ability of Massachusetts-type infectious bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial broilers: a comparison between vaccine and virulent field virus. *Avian Pathol* 32, 473-481.
- Morley AQJ, DK Thomson. 1984. Swollen-head syndrome in broilers chickens. *Avian Dis* 28,238-243.
- Nagaraja KV, BL Patel, DA Emery, BS Pomeroy, JA Newman. 1982a. In vitro depression of the mitogenic response of lymphocytes from turkeys infected with Hemorrhagic enteritis virus. *Am J Vet Res* 43, 134-136.
- Nagaraja KV, DA Emery, BL Patel, BS Pomeroy. 1982b. In vitro evaluation of B lymphocyte function in turkeys infected with hemorrhagic enteritis virus. *Am J Vet Res* 43, 502-504.
- Nagaraja KV, SY Kang, SJ Newman. 1985. Immunosuppressing effects of virulent strain of hemorrhagic enteritis virus in turkeys vaccinated against Newcastle disease. *Poult Sci* 64, 588-590
- Nakamura K, Y Imada, F Abe. 1987. Effect of cyclophosphamide on infections produced by *Escherichia coli* of high and low virulence in chickens. *Avian Pathol* 16, 237-252.
- Nakamura K, N Yuasa H Abe, N Narita. 1990. Effect of infectious bursal disease virus on infections produced by *Escherichia coli* of high and low virulence in chickens. *Avian Pathol* 19, 713-721.
- Nakamura K, JKA Cook, JA Frazier, M Narita. 1992. *Escherichia coli* multiplication and lesions in the respiratory tract of chickens inoculated with Infectious Bronchitis Virus and/or *E. Coli*. *Avian Dis* 36, 881-890.

- Peighambari SM, RJ Julian, CL Gyles. 2000. Experimental *Escherichia coli* respiratory infection in broilers. *Avian Dis* 44, 759-769.
- Pennycott TW, HM Ross, IM McLaren, A Park, GF Hopkins, G Foster. 1998. Causes of death of wild birds in the family *Fringillidae* in Britain. *Vet Rec* 143, 155-158.
- Pierson FW, VD Barta, D Boyd, WS Thompson. 1996a. Exposure to multiple infectious agents and the development of colibacillosis in turkeys. *J Appl Poultry Res* 5, 347-357.
- Pierson FW, CT Larsen, CH Domermuth. 1996b. The production of colibacillosis in turkeys following sequential exposure to Newcastle disease virus or *Bordetella avium*, avirulent hemorrhagic enteritis virus, and *Escherichia coli*. *Avian Dis* 40:837-840.
- Pohl R. 1974. The histopathogenesis of nephrosis nephritis syndrome. *Avian Pathol* 3, 1-13.
- Purcell DA, VL Tham, PG Surman. 1976. The histopathology of infectious bronchitis in fowls infected with a nephrotropic T strains of virus. *Austr Vet Journal* 52, 112-125.
- Reed LJ, H Muench. 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am J Hig* 27, 493-497.
- Riddell C. 1997. Developmental, metabolic, and other non-infectious disorders. En: Calnek BW (ed) *Diseases of Poultry* 10th edn Pp 913-950 Ames Iowa State University Press. USA.
- Sadler R, SA Edgar. 1969. Importance of the bursa of Fabricius in resistance to disease. 2. resistance to two bacterial diseases. *Poult Sci* 48, 1090-1096.
- Saunders GK, FW Pierson, JV Van den Hurk. 1993. Hemorrhagic enteritis virus infection in turkeys a comparison of virulent and avirulent virus infections and a proposed pathogenesis. *Avian Pathol* 22, 47-48.
- Schrier C, D Cornelissen. 1988. Possibilities and limitations of combined vaccines. En: I International symposium on infectious bronchitis. Huyesen. West Germany. pp. 310-317.
- Smith HW, Williams H, Cook JKA, Parsell ZE. 1985. The experimental infection of chickens with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *J Gen Virol* 66, 777-786.
- Steiner CV, RV Davis. 1985. Patología de las aves enjauladas/Temas seleccionados. Acribia Zaragoza. España
- Stordeur, PJ Mainil . 2002. La colibacillose aviaire. *Ann Méd Vét* 146, 11-18.

- Swarbrick O. 1985. Associated husbandry and disease problems. *Vet Rec* 116, 616-617.
- Toro H, EF Kaleta, W Herbst, P Peixoto, K Frese. 1988. Diferencias de patogenicidad en aislados de campo del virus de la bronquitis infecciosa aviar para pollos jóvenes. *Arch Med Vet* 20, 44-90.
- Urrutia JL. 1993. Evaluación de la patogenicidad de cepas de virus bronquitis infecciosa nacionales en aves libres de patógenos específicos. *Tesis de grado*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Van den Hurk JV. 1990. Propagation of group II avian Adenoviruses in turkey and chicken leukocytes. *Avian Dis.* 34, 12-25
- Wallace JS, T Cheasty, K Jones. 1997. Isolation of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *Journal of Appl microbiol* 82, 399-404.
- Whiteman CE, AA Bickford. 1979. Avian Disease manual Pp 27-30. Colorado State University. USA.
- Wyeth PJ. 1975. Effect of infectious bursal disease on the response of chickens to *S. typhimurium* and *E. coli* infections. *Vet Rec* 96, 238-243.
- Yoder HW, CW Beard, BW Mitchell. 1989. Pathogenicity of *Escherichia coli* in aerosols for young chickens. *Avian Dis* 33, 676-683.
- Yogarathnam V. 1995. Analysis of the causes of high rates of carcasses rejection at a poultry processing plant. *Vet Rec* 137, 215-217.
- Zander DV, AJ Bermudez, ET Mallinson. 1997. Principles of disease prevention: diagnosis and control. En: Calnek WB (ed) Diseases of Poultry, 10th edn Pp 3-45. Ames: Iowa state University press USA.
- Zuñiga J. 1992. Estudio de patogenicidad de cepas de virus bronquitis infecciosa aisladas en Chile. *Tesis de grado*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

8. ANEXOS

Anexo 1. Registro de la actividad ciliar en tráquea observada durante el ensayo en las aves.

Grupo	n	Muestreo (día)											
		4			9			15			21		
		s	m	i	s	m	i	s	m	i	s	m	i
1	1	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333
	1	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333
	1										333	333	333
	1										333	333	333
Prom		3			3			3			3		
2	1	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333
	1	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333
	1										333	333	333
	1										333	333	333
Prom		3			3			3			3		
3	1	000	000	000	223	333	233	333	332	333	333	333	333
	1	000	100	000	323	333	222	333	333	233	333	333	333
	1										333	333	333
	1										333	333	333
Prom		0,05			2,6			2,88			3		
4	1	000	001	011	332	222	222	223	333	233	333	333	333
	1	000	000	001	332	222	222	323	333	222	333	333	333
	1										333	333	333
	1										333	333	333
Prom		0,22			2,22			2,6			3		
5	1	000	010	010	222	222	222	223	333	233	333	333	333
	1	000	001	100	222	222	223	222	333	222	333	333	333
	1										333	333	333
	1										333	333	333
Prom		0,22			2,05			2,49			3		

n = número de aves

s 123= anillos revisados de tercio superior de tráquea.

m 123= anillos revisados de tercio medio de tráquea.

i 123 = anillos revisados tercio inferior de la tráquea.

Prom = promedio grupal

0 = sin actividad ciliar.

1 = menos del 50 % del anillo con actividad ciliar.

2 = más del 50 % del anillo con actividad ciliar.

3 = 100 % de actividad ciliar.

Anexo 2. Registro de lesiones histopatológicas en tráquea de aves LPE del grupo 1 y 2 durante el estudio.

Grupo	m	n	Lesión			Puntaje de lesión
			Hiperplasia epitelial	Perdida ciliar	Infiltración linfocitaria	
1	1	1	0*	0	0	0**
		1	0	0	0	
	2	1	0	0	0	
		1	0	0	0	
	3	1	0	0	0	
		1	0	0	0	
	4	1	0	0	0	
		1	0	0	0	
		1	0	0	0	
		1	0	0	0	
Prom			0	0	0	
2	1	1	0	0	0	0
		1	0	0	0	
	2	1	0	0	0	
		1	0	0	0	
	3	1	0	0	0	
		1	0	0	0	
	4	1	0	0	0	
		1	0	0	0	
		1	0	0	0	
		1	0	0	0	
Prom			0	0	0	

m = muestreo

n = número de aves

Prom = promedio

* Grado de lesión 0 = ausencia; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = severo.

** Puntaje de lesión acumulado por grupo considerando un máximo de 9 puntos

Anexo 3. Registro de lesiones histopatológicas en tráquea de aves LPE del grupo 3 y 4 durante el estudio.

Grupo	m	n	Lesión			Puntaje de lesión
			Hiperplasia epitelial	Perdida ciliar	Infiltración linfocitaria	
3	1	1	1*	3	1	3,4**
		1	1	1	2	
	2	1	3	2	3	
		1	2	2	1	
	3	1	2	2	1	
		1	1	2	1	
	4	1	1	0	1	
		1	0	1	0	
		1	0	0	1	
		1	1	0	0	
Prom		1,2	1,1	1,1		
4	1	1	1	3	2	3,5
		1	1	2	2	
	2	1	3	3	3	
		1	2	2	1	
	3	1	2	1	1	
		1	2	0	1	
	4	1	2	0	0	
		1	1	0	0	
		1	0	0	0	
		1	0	0	0	
Prom		1,4	1,1	1		

m = muestreo

n = número de aves

* Grado de lesión 0 = ausencia; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = severo.

** Puntaje de lesión acumulado por grupo considerando un máximo de 9 puntos

Anexo 4. Registro de lesiones histopatológicas en tráquea de aves LPE del grupo 5 durante el estudio.

Grupo	m	n	Lesión			Puntaje de lesión
			Hiperplasia epitelial	Perdida ciliar	Infiltración linfocitaria	
5	1	1	1*	3	2	3,5**
		1	1	2	2	
	2	1	3	3	1	
		1	2	1	1	
	3	1	1	0	1	
		1	2	1	1	
	4	1	2	0	1	
		1	1	1	0	
		1	0	0	1	
		1	1	0	0	
Prom			1,4	1.1	1	

m = muestreo

n = número de aves

Prom = promedio

* Grado de lesión 0 = ausencia; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = severo.

** Puntaje de lesión acumulado por grupo considerando un máximo de 9 puntos

Anexo 5. Registro de lesiones histopatológicas en pulmones de aves LPE del grupo 1, 2 y 3 durante el estudio.

Grupo			Lesión		Puntaje de lesión
	m	n	Congestión	Hiperemia	
1	1	1	0*	0	0**
		1	0	0	
	2	1	0	0	
		1	0	0	
	3	1	0	0	
		2	0	0	
	4	1	0	0	
		1	0	0	
		1	0	0	
	Prom			0	
2	1	1	0	0	0
		1	0	0	
	2	1	0	0	
		1	0	0	
	3	1	0	0	
		1	0	0	
	4	1	0	0	
		1	0	0	
		1	0	0	
	Prom			0	
3	1	1	0	0	0,2
		1	0	0	
	2	1	0	0	
		1	0	0	
	3	1	0	0	
		1	1	1	
	4	1	0	0	
		1	0	0	
		1	0	0	
	Prom			0,1	

m = muestreo

n = número de aves

* Grado de lesión 0 = ausencia; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = severo.

** Puntaje de lesión acumulado por grupo considerando un máximo de 6 puntos

Anexo 6. Registro de lesiones histopatológicas en pulmones de aves LPE del grupo 4 y 5 durante el estudio.

Grupo			Lesión		Puntaje de lesión
	m	n	Congestión	Hiperemia	
4	1	1	2*	2	3,6**
		1	2	1	
	2	1	1	3	
		1	2	2	
	3	1	2	3	
		1	2	2	
	4	1	2	2	
		1	1	1	
		1	3	0	
		1	0	2	
Prom		1,8	1,8		
5	1	1	3	3	3,9
		1	3	2	
	2	1	2	2	
		1	1	2	
	3	1	2	3	
		1	1	1	
	4	1	3	2	
		1	2	2	
		1	1	0	
		1	2	2	
Prom		2	1,9		

m = muestreo

n = número de aves

* Grado de lesión 0 = ausencia; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = severo.

** Puntaje de lesión acumulado por grupo considerando un máximo de 6 puntos

Anexo 7. Registro de lesiones histopatológicas en riñones de aves LPE del grupo control y 5 durante el estudio.

Grupo	Lesión						Puntaje de lesión
	m	n	Congestión	Hemorragia	Hiperemia	Degeneración tubular	
1	1	1	0*	0	0	0	0**
	2				N / R		
	3				N / R		
	4	1	0	0	0	0	
Prom			0	0	0	0	
2	1				N / R		
	2				N / R		
	3				N / R		
	4				N / R		
Prom							
3	1				N / R		
	2				N / R		
	3				N / R		
	4				N / R		
Prom							
4	1				N / R		
	2				N / R		
	3				N / R		
	4				N / R		
Prom							
5	1	1	0	1	1	1	4
	2				N / R		
	3				N / R		
	4	1	1	1	1	2	
Prom			0.5	1	1	1.5	

m = muestreo

n = número de aves

* Grado de lesión 0 = ausencia; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = severo.

** Puntaje de lesión acumulado por grupo considerando un máximo de 12 puntos

N / R = no realizado

Anexo 8. Registro de lesiones histopatológicas en bazo de aves LPE del grupo 1, 4 y 5 durante el estudio.

Grupo			Lesión			Puntaje de lesión
	m	n	Congestión	Hiperemia	Hiperplasia	
1	1			N / R		0**
	2			N / R		
	3	1	0*	0	0	
		1	0	0	0	
	4	1	0	0	0	
Prom			0	0	0	
2	1			N / R		
	2			N / R		
	3			N / R		
	4			N / R		
	Prom					
3	1			N / R		
	2			N / R		
	3			N / R		
	4			N / R		
	Prom					
4	1			N / R		2
	2			N / R		
	3			N / R		
	4	1	1	0	1	
	Prom			1	0	
5	1					1,5
	2					
	3	1	1	0	1	
		1	0	0	1	
	4					
Prom			0,5	0	1	

m = muestreo

n = número de aves

* Grado de lesión 0 = ausencia; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = severo.

** Puntaje de lesión acumulado por grupo considerando un máximo de 9 puntos

N / R = no realizado

9. AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, si bien éste es un logro importante, no sería nada si no los tuviera a ellos, debo reconocer que son lo más hermoso que tengo, gracias por su cariño y apoyo en estos años.

Al Dr. Ulloa, Dr. Paredes y TM Carlos Hernández por su valiosa guía y paciencia durante la realización de este trabajo.

A mis amigos Héctor Huequeman y Mario Ferrada, por su amistad, apoyo y ayuda desinteresada, directa e indirectamente en el trabajo y durante mi estadía en Valdivia, su amistad es una de las buenas cosas que me llevo de Valdivia.

A mis amigos de siempre, Héctor Cárcamo, Julio Barría, Carlos Riquelme y Álvaro González, por alegrarme la vida y estar conmigo siempre y para todo.

A mis amigas Débora Mera, Lorena Balanzario y Silvia Salazar, por su apoyo y cariño, gracias por haberme permitido conocerlas.

A Alejandro Hermostilla y Edgardo Bruggink, gracias por todo.

A Gabriela Gueregatt por su cariño y compañía.

Y a todas las personas que pueda haber omitido pero no por eso menos importantes, gracias.