

Virus de la bronquitis infecciosa: un desafío para la avicultura

Infectious bronchitis virus: a challenge for poultry

Ana María Acevedo-Beiras[✉]

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El virus de bronquitis infecciosa es un coronavirus que causa una enfermedad altamente contagiosa del tracto respiratorio superior y afecta a pollos y gallinas de todas las edades. La enfermedad se caracteriza por síntomas respiratorios, aunque también puede infectar el tracto reproductivo causando una disminución en la producción de huevos, mala calidad de la cáscara y anomalías en la calidad interna del huevo. El virus representa una preocupación desde el punto de vista económico, ya que es una de las principales causas de pérdidas en la producción comercial de aves de corral y predispone a las mismas a infecciones secundarias que pueden resultar en más pérdidas económicas e incluso la muerte. La habilidad que tiene el virus para experimentar en corto plazo mutaciones y eventos de recombinación conduce a la aparición de nuevos genotipos/serotipos y hace que el diagnóstico y el control sean todo un desafío. Esta revisión tiene como objetivo proporcionar información actualizada de diferentes aspectos relacionados con el virus, como son sus características generales, taxonomía y clasificación, organización del genoma viral, proteínas virales, recombinación del ARN, diversidad antigénica, distribución mundial, patogénesis, así como consecuencias de la enfermedad, su historia, manifestaciones clínicas y lesiones, epidemiología, diagnóstico y prevención/control.

Palabras clave: virus de la bronquitis infecciosa, coronavirus, pollos.

ABSTRACT: The infectious bronchitis virus is a coronavirus that causes a highly contagious disease of the upper respiratory tract affecting chickens and hens of all ages. The disease is characterized by respiratory symptoms although it can also infect the reproductive tract causing a decrease in egg production, poor quality of the shell and abnormalities in the internal quality of the egg. The virus represents a concern from the economic point of view since it is one of the main causes of losses in the commercial production of poultry and predisposes them to secondary infections that can result in further economic losses and even death. The ability of the virus to experience short-term mutations and recombination events leads to the emergence of new genotypes/serotypes and makes diagnosis and control a challenge. This review aims to provide updated information on different aspects related to the virus, such as its general characteristics, taxonomy and classification, organization of the viral genome, viral proteins, recombinant RNA, antigenic diversity, global distribution, pathogenesis, as well as consequences caused by the disease, its history, clinical manifestations and lesions, epidemiology, diagnosis, and prevention/control.

Key words: infectious bronchitis virus, coronavirus, chickens.

[✉] Autor para correspondencia: Ana María Acevedo-Beiras. E-mail: acevedo@censa.edu.cu

Recibido: 20/7/2016

Aceptado: 15/2/2017

INTRODUCCIÓN

El virus de la bronquitis infecciosa (VBI) es el agente causal de la bronquitis infecciosa (BI) aviar, una enfermedad respiratoria aguda, altamente contagiosa. Desde su descripción por primera vez en el año 1931 (1) hasta la actualidad mantiene una amplia distribución mundial. Se considera una de las enfermedades virales de mayor impacto para la industria avícola. Este agente es capaz de afectar tanto a las aves ponedoras (líneas ligeras) como a las de engorde (líneas pesadas), lo que genera grandes pérdidas económicas. Las aves infectadas se caracterizan por tener una pobre ganancia de peso con una rápida disminución en la producción y la calidad de los huevos (2).

El control de esta enfermedad se basa fundamentalmente en el empleo de vacunas vivas atenuadas e inactivadas (3). Sin embargo, la emergencia de serotipos nuevos del VBI, dado principalmente por la rápida evolución del virus, por la capacidad de recombinación entre las cepas circulantes y las cepas vacunales (4), unido a la pobre protección cruzada entre los serotipos han complicado los programas de control de la misma (5). La aparición de variantes nuevas de este agente hace necesario disponer de métodos de diagnóstico adecuados para la identificación rápida y la diferenciación entre los serotipos emergentes y las cepas vacunales en uso.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VBI

Taxonomía y clasificación

A partir del año 2009, el Grupo de Estudio de los Coronavirus del Comité Internacional de Taxonomía Viral adoptó una nueva clasificación en la que, dentro de la familia *Coronaviridae*, se define una nueva subfamilia, *Coronavirinae*, y dentro de esta última se crearon tres géneros: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus* y *Gammacoronavirus* que estuvieron relacionados con los antiguos grupos 1, 2 y 3 (6). Así, dentro de los géneros

Alfacoronavirus y *Betacoronavirus* se localizan especies que afectan a mamíferos y al humano. El VBI se ubica en la especie *Coronavirus aviarius* del género *Gammacoronavirus* que incluye solo especies que afectan a las aves.

Recientemente se definió un nuevo género, *Deltacoronavirus*, el cual incluye a virus que afectan a animales (7).

Morfología y estructura del virión

Las partículas del VBI tienen una apariencia típica cuando se observan al microscopio electrónico. La presencia de espículas características de aproximadamente 20 nm de longitud, que emanan de su envoltura, le dan al virus la imagen de corona solar de donde proviene el nombre de la familia. Los viriones con un diámetro de aproximadamente 120 nm tienen una apariencia pleomórfica. La partícula viral consiste en una nucleocápsida o estructura central que está rodeada por una envoltura lipídica. Anclada en esta envoltura se encuentran la proteína de la espícula (S), la proteína de membrana (M) y la proteína de la envoltura (E) (8).

Dentro de la nucleocápsida, una copia del ácido ribonucleico (ARN) genómico viral se encuentra asociada a múltiples copias de la proteína de la nucleocápsida (N) y forma una estructura helicoidal, larga y flexible de 7-16 nm de diámetro y hasta 0.32 mm de longitud.

Organización del genoma viral

El genoma de los coronavirus es el ARN viral de mayor talla identificado hasta la fecha. Investigaciones realizadas sobre el genoma del VBI revelaron que el mismo está compuesto por una molécula de ARN, de 27.6 kilobases (kb), de simple cadena y polaridad positiva, con caperuza en el extremo 5' y poliadenilado en el extremo 3'. Estas características posibilitan que funcione por sí solo como un ARN mensajero (ARNm) infeccioso (6).

El genoma viral comprende diez marcos abiertos de lectura (ORFs, siglas del inglés, open reading frame) flanqueados por dos regiones no codificantes conservadas (UTRs,

siglas del inglés, untranslated regions) de aproximadamente 500 nucleótidos (nt). La organización total del genoma del VBI, como el resto de los coronavirus, se define de la siguiente forma: 5'UTR-gen de la replicasa-genes de las proteínas estructurales-3'UTR; con una organización típica en la región codificante, caracterizada por un orden fijo de varios genes que son esenciales para la viabilidad del virus (5'-replicasa-S-E-M-N-3') (9).

Los primeros 20 kb del genoma comprenden el ORF 1, el cual es el gen de la replicasa. La replicasa tiene dos ORFs (ORF1a y ORF1b), que son traducidos en una poliproteína. El ORF 1 codifica para proteínas no estructurales (nsp, siglas del inglés, non structural protein) (nsp2-16) asociadas con la replicación del ARN y la transcripción. El resto del genoma del VBI codifica para cuatro proteínas estructurales: la glicoproteína S, la proteína M, la proteína E y la proteína N. Adicionalmente, el VBI tiene otros genes que codifican para proteínas accesorias no estructurales que están diseminadas en varios sitios entre los genes estructurales llamadas 3a, 3b, 3c, 5a y 5b, las cuales no son requeridas para la replicación *in vitro* pero pueden jugar un papel en la patogénesis. El genoma del VBI tiene la siguiente organización general: 5'UTR - gen de la replicasa -S-3a, b, c -(E)-M- 5a, b-N - UTR 3' (9).

Recombinación del ARN

La recombinación del ARN es un fenómeno que sucede de manera análoga a la replicación del ARN viral y le proporciona a los virus resultantes un mecanismo de intercambio genético que aumenta su diversidad. La ARN polimerasa viral, a partir de una cadena naciente de ARN unida, se disocia de su molde y reanuda la síntesis una vez que se ha unido en otra parte del mismo, o en otro molde, lo que proporciona una progenie viral con secuencias de dos genomas parentales diferentes (10).

La tasa de recombinación homóloga del ARN entre los coronavirus es elevada. El gran

tamaño de su genoma y el modo particular de su replicación, por medio de una transcripción discontinua, favorece el cambio de molde por la polimerasa. Si una célula se infecta con dos coronavirus relacionados, la ARN polimerasa puede, a través del mecanismo de elección de copia, cambiar entre los dos moldes de ARN, lo que genera como resultado los ARN quiméricos, con genomas modificados que le permitan infectar células diferentes y en algunos casos genera salto entre especies de hospederos.

Algunas secuencias dentro de la glicoproteína S se consideran "puntos calientes" para la recombinación debido, en primer lugar, a la presencia de estructuras secundarias del ARN que pueden promover la disociación y la reasociación del ARN (11). En segundo lugar, un nuevo molde debe estar en la proximidad física; en tercer lugar, algunas propiedades del nuevo molde deben permitir la transferencia de la cadena naciente del ARN y la reanudación de la síntesis. Por otra parte, la transferencia de la cadena podría resultar de un mecanismo procesativo que no requiere la disociación de la polimerasa (12).

En el caso de los *Gammacoronavirus*, se notificó recientemente la emergencia de un coronavirus de pavo (TCoV, siglas del inglés Turkey Coronavirus) atribuida solamente a recombinación. Además, se evidenció recombinación entre cepas de VBI, tanto experimentalmente como en el campo. Aunque se detectaron "puntos calientes" de recombinación en el genoma del VBI, este fenómeno no se corroboró hasta el año 2011 (13). Se mostró, además, que las áreas que tienen la más alta probabilidad de recombinación están localizadas en las regiones del genoma que codifican para las proteínas no estructurales 2, 3 y 16 y la glicoproteína estructural de la espícula (13).

En términos más generales, se cree que la recombinación del ARN ha sido fundamental en el surgimiento de los tres géneros de los coronavirus. Se ha propuesto que la recombinación que ocurre a través del

mecanismo de elección de copia es también el mecanismo por el cual muchos coronavirus adquirieron sus genes accesorios, y se demostró experimentalmente por la supresión o inserción de secuencias específicas en el genoma para evaluar su papel en la replicación del virus y la patogenia (14).

Como se demostró, la recombinación puede resultar en la generación de especies de los coronavirus o de diferentes genotipos dentro de una misma especie. En este sentido, Woo *et al.* (6) exponen que la posibilidad de recombinación homóloga del ARN y la posible parte del genoma donde ha tenido lugar la recombinación se pueden detectar con elevada confiabilidad a través de un análisis de *bootscan* o por análisis filogenético con diferentes partes del genoma. Otros métodos para análisis de recombinación, como los que contiene el paquete de programas bioinformáticos *RDP3*, están disponibles y permiten revelar el sitio exacto de recombinación homóloga por los alineamientos múltiples de secuencias (6).

Diversidad antigénica y distribución mundial

Una de las causas fundamentales en el fallo de los programas de control del VBI está relacionada con la continua emergencia de nuevos serotipo/genotipos del virus (para el caso del VBI los términos genotipos y serotipos se usan indistintamente, ya que existe una relación unívoca entre ellos) (2,4). Estudios moleculares demostraron que un nuevo serotipo o variante del VBI puede emerger como resultado de solo pequeños cambios en la composición de aminoácidos en el gen S1. Diferencias tan pequeñas como de 2 a 3 % en los residuos de aminoácidos (10 a 15 residuos) pueden resultar en un cambio inmunogénico importante en este agente (5).

A partir de la observación de Jungherr en 1956 de que un aislado del VBI en Connecticut, E.U.A., no ofreció protección cruzada a los pollos contra el desafío con el aislado original Mass. sugirió que existía más de un serotipo o

variante del VBI. Por muchos años se pensó que representaba la primera emergencia de un virus diferente del tipo Mass. Sin embargo, hoy se conoce que en los E.U.A había circulado VBI diferentes del tipo Mass., desde la década de 1940 (4).

Durante los años 1960 y 1970 varios serotipos diferentes a Mass. se describieron sobre la base de análisis serológicos (4). Con el empleo de los ensayos moleculares se identificaron variantes nuevas, ejemplo: Arkansas (Ark), California 99 (Cal99), Georgia (GA98), Delaware (DE072) y otras. De hecho, en la actualidad cientos de serotipos o variantes del VBI se han descrito en el mundo (2).

En América Latina, el primer aislado del VBI descrito fue el serotipo Mass. en Brasil (15), diez años más tarde se detectó la variante Ark y recientemente Villarreal *et al.* (16) demostraron la presencia de un *cluster* en el cual se agrupan solo cepas de Brasil. Hidalgo *et al.* (17) describieron el primer aislamiento del VBI en Chile (serotipo Mass.) y diez años más tarde se identificaron variantes virales (17). En México se han identificado variantes únicas después del aislamiento del serotipo Ark y con el uso de métodos moleculares (18).

En Europa, se notificó la detección de variantes del VBI en el Reino Unido (19) y en Holanda (20) se aislaron al menos cuatro serotipos diferentes, el serotipo D207 o D274, D212 o D1466, D3896 y D3128. Muchas variantes nuevas se han aislado en otros países europeos como Francia, Bélgica (B1648) (21), Italia (Italy 02) (22), Polonia (23) y España (22). De importancia internacional fue la variante llamada 4/91, también conocida por 793B y CR88 (24), la cual emergió en la década de los 90 y ha alcanzado una distribución global.

En Nigeria y Níger, África, se detectó un virus nuevo que era antigénica y genéticamente diferente de los VBI conocidos. También en Egipto (25) y en Marruecos se identificaron variantes nuevas del VBI; especialmente en Marruecos se detectó una variante enterotrópica, no común, conocida como

variante “G” (26). En el Medio Oriente, se detectaron variantes virales en Israel, Jordania e Irán (27).

En Asia, específicamente en Malasia, las variantes han estado presentes desde 1979 (28). Otros países como Corea (29), Japón (30), Taiwán (31) y China (32) también identificaron variantes virales. De este último, posiblemente la variante de mayor significación a nivel mundial que ha emergido es la QX descrita por YuDong *et al.* (32).

Esta variante, al igual que el genotipo Q1, se asoció con proventriculitis. Estudios realizados por Liu *et al.* (33) identificaron al tipo Mass. y a otros cinco genotipos, aparentemente encontrados solo en China. Uno de estos es el genotipo A2. Recientemente Zou *et al.* (34) describieron que un genotipo diferente, nombrado LX4, es ahora el dominante. Otros mostraron estrecha relación con variantes de Taiwán y Corea y uno fue estrechamente relacionado con un aislado australiano (33). Cuiping *et al.* (35) identificaron la variante 4/91 junto con la cepa T australiana, así como una variante única en China.

En Australia, donde el VBI evolucionó independiente del resto del mundo debido a su aislamiento geográfico (36), muchas variantes diferentes de la cepa T Australiana nefropatogénica se aislaron y se caracterizaron. Los aislados del VBI forman tres subgrupos que se basan en los análisis genéticos del gen S1: el subgrupo 1 (cepas clásicas) y los subgrupos 2 y 3 (nuevas cepas). Los virus del subgrupo 1 incluyen, entre otros, la cepa nefropatogénica Australia/N1/62, el primer aislado del VBI en Australia y la cepa vacunal Australia/VicS62. Los virus del subgrupo 2 se identificaron en 1988 e incluyen Australia/N1/88, Australia/subgroup 2/Q3/88, y Australia/subgroup 2/V18/91 (37). Las cepas del subgrupo 3 se detectaron alrededor del año 2002 y parecen ser quimeras resultantes de la recombinación entre los virus del subgrupo 1 y 2. En Nueva Zelanda, los problemas asociados con la BI no eran comunes antes de la década de 1970. Se identificaron cuatro variantes

diferentes; sin embargo, la secuenciación del gen S1 reveló relaciones genéticas entre los primeros aislados y los identificados en los primeros años del siglo XXI. Además, los análisis filogenéticos mostraron que están más estrechamente relacionados con los australianos que con los europeos o los de Norteamérica (38).

Patogénesis

Las células dianas principales para el VBI son las células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio superior, las células epiteliales en el tracto reproductivo femenino y las células epiteliales tubulares en el riñón. El virus inicialmente infecta y se replica en el tracto respiratorio superior, con destrucción de las células protectoras que cubren la tráquea (39). El título viral alcanza su valor máximo en la cavidad nasal y en la tráquea tres días después de la infección (d.p.i.) y se mantienen en estos valores de dos a cinco d.p.i. Se encuentran títulos de virus similares en los pulmones y los sacos aéreos. Además de replicarse en muchos tejidos respiratorios, el VBI también se multiplica en muchas otras superficies epiteliales, que incluyen: riñones, oviducto, testículos y varias partes del tracto digestivo como esófago, proventrículos, duodeno, yeyuno, bolsa de Fabricio, tonsilas cecales, recto y cloaca (3). La replicación en la glándula Harderiana, un pequeño órgano linfoide, afecta la producción de anticuerpos locales encargados de proteger la mucosa óculo-nasal (39). El curso de la infección en los pollos jóvenes es entre siete a 21 días, aunque el VBI puede establecer infecciones persistentes que facilitan una diseminación del virus, el cual se excreta en las heces durante varios meses después de la exposición inicial.

BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR

Reseña histórica de la enfermedad

La BI se describió por primera vez en 1931 (1) como una enfermedad respiratoria de los pollos y la causa viral fue establecida en 1936

por Beach y Schalm. Este estudio se realizó en una población de pollos jóvenes en Dakota del Norte, E.U.A. Desde entonces, la enfermedad se identificó en pollos de ceba, ponedoras y reproductoras de todo el mundo (4). Los primeros estudios histopatológicos se realizaron en las décadas de 1940 y 1950 por Hofstad en Iowa (40) y por Jungherr y sus colegas en Connecticut (41).

En esta última década se definieron varios serotipos del VBI y se describieron algunos de ellos como nefropatogénicos. Los primeros trabajos en esta área se desarrollaron en los E.U.A. en 1966 por Hitchner (Universidad de Cornell) y Winterfield (University de Perdue), quienes describieron las cepas Holte y Gray y las usaron para reproducir la enfermedad en pollos susceptibles. Paralelamente en Australia, Cumming *et al.* (42) realizaron estudios importantes con la cepa T que demostraron que el daño renal era la principal manifestación clínica de los VBI australianos que circularon en la década de 1960.

Manifestaciones clínicas y lesiones

Los signos clínicos más evidentes y reconocidos primeramente son los respiratorios. No obstante, la patogenicidad del virus para el oviducto en aves muy jóvenes o en producción es a menudo más importante. Los riñones también pueden estar afectados, especialmente por cepas con potencial nefropatogénico (2). Los signos clínicos característicos son tos, coriza, estornudos, estertores traqueales, ojos acuosos, letargo, así como descarga nasal y ocular. Las aves jóvenes se muestran deprimidas y se agrupan bajo la fuente de calor. En los pollos mayores de seis semanas de edad y en aves adultas los signos clínicos son similares a los señalados, pero las descargas nasales no ocurren tan frecuentemente y puede que no se advierta la enfermedad, a menos que las aves sean examinadas cuidadosamente (2,39).

Los pollos jóvenes pueden morir a causa de la infección primaria por el virus, pero un gran

número muere debido a infecciones bacterianas secundarias (2).

Las aves jóvenes y maduras sufren menos de la infección viral. La infección en las aves de engorde resulta en retardo del crecimiento y cuando se infectan con virus nefropatogénicos hay una recuperación de la fase respiratoria, pero comienzan a mostrar signos de depresión, plumas erizadas y aumenta el consumo de agua. En las gallinas ponedoras disminuye la producción con cambios en la forma, la pigmentación y la calidad de los huevos en presencia o no de signos respiratorios.

Las lesiones asociadas con la BI incluyen una moderada inflamación del tracto respiratorio superior. Las aves afectadas muestran una inflamación de cornetes, senos nasales y tráquea. Generalmente, esta inflamación es relativamente suave (mucoide) comparada con otras enfermedades como la laringotraqueitis o la coriza infecciosa. Los sacos aéreos pueden estar húmedos, espumosos u opacos, pueden contener material caseoso amarillento y se puede encontrar un tapón caseoso en la tráquea (40).

Las infecciones nefropáticas producen riñones hinchados y sin brillo con los túbulos distendidos y uréteres con cristales de uratos (42). El material fluido de la yema puede aparecer en la cavidad abdominal (43). Lesiones permanentes en el oviducto pueden ser una consecuencia de la infección con el VBI en pollitos de un día de edad.

Epidemiología

El periodo de incubación de la enfermedad es entre 18 y 36 horas posinfección en dependencia de la dosis y la vía de inoculación. Los pollos de todas las edades son susceptibles, pero la enfermedad es más severa en los pollitos debido a que causa mortalidad. Con el incremento de la edad, los pollos se hacen más resistentes a los efectos nefropatogénicos, las lesiones en el oviducto y a la mortalidad (44).

La BI es una enfermedad de amplia distribución mundial. El virus es altamente infeccioso, se disemina horizontalmente a

través de aerosoles, material orgánico, agua de bebida y equipos contaminados. Hasta el momento no se ha demostrado que exista transmisión vertical. No obstante, la contaminación de la superficie de los huevos con el VBI puede ser una posible vía por la cual el virus se disemine en las plantas de incubación o centros de empaque de huevos (9).

La investigación epidemiológica de las infecciones provocadas por el VBI muestra que varios serotipos pueden cocircular en la misma área al mismo tiempo.

Algunos están ampliamente diseminados en el mundo y otros se encuentran más restringidos geográficamente. La diseminación de una cepa de un área o país a otro puede ser, en parte, debido a la introducción por el comercio de aves, la migración de aves silvestres o por el uso de vacunas atenuadas (9).

Un aspecto interesante de la epidemiología del VBI es que un número importante de serotipos emergentes en norteamérica no se ha diseminado a otros continentes y, de manera similar, serotipos europeos, australianos y asiáticos no se han diseminado a otras partes (33). Sin embargo, existen evidencias que los VBI detectados en otros países, tales como China, derivan de cambios genéticos tanto en las poblaciones del VBI que existieron antes de comenzar la vacunación como de los virus introducidos a través de las vacunas vivas usando cepas atenuadas de China y otros continentes. Esto conduce a la emergencia y cocirculación de cepas con diferencias genéticas y fenotípicas (33).

Diagnóstico

Los signos clínicos y las lesiones para el caso de la BI no son patognomónicos. Otras enfermedades respiratorias, como la infección por influenza aviar (IA), la enfermedad de Newcastle (EN), la infección por metapneumovirus aviar, la laringotraqueitis infecciosa, micoplasmosis y coriza infecciosa aviar en algunas etapas cursan con un cuadro clínico lesional similar (45). Lesiones muy similares en el riñón pueden ser causadas por

diferentes etiologías, incluyendo otros virus como el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa, toxinas y deshidratación. En las gallinas ponedoras también se observa una disminución en la producción de huevos con el Síndrome de Caída de la Puesta y en infecciones por metapneumovirus aviar. De ahí que el diagnóstico de laboratorio sea esencial para la confirmación de la enfermedad, según lo establecido en el Manual de la Organización mundial de la sanidad animal (46).

Identificación del VBI

El VBI se puede aislar en embriones de pollo libre de patógenos específicos (SPF, siglas del inglés, specific-pathogen-free) de nueve a 11 días de desarrollo. Sin embargo, se requieren varios pases sucesivos para el aislamiento del mismo, el cual no siempre es exitoso. El virus produce hemorragias en el embrión, enrrollamiento y depósitos de uratos en el mesonefro, con mortalidad variable. No obstante, estas lesiones son indistinguibles a las causadas por adenovirus aviarios del grupo 1. Es importante destacar que las infecciones por adenovirus aviarios en el tracto respiratorio de los pollos comerciales son comunes y la adaptación al cultivo en embriones de pollo es más rápida que para el caso de VBI. Por lo tanto, un desplazamiento del VBI por el adenovirus en cultivo es un fenómeno que ocurre comúnmente. Por otra parte, los líquidos alantoideos cosechados no hemaglutinan células rojas de la sangre de pollos, por lo que se emplean los ensayos de reverso transcripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, siglas del inglés, reverse transcription-polymerase chain reaction) o en combinación con el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RT-PCR/RFLP, siglas del inglés, reverse transcriptionpolymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism), la microscopía electrónica directa y la inmunofluorescencia para la identificación del agente (47).

Esta última técnica se emplea, además, en la identificación del virus en el cultivo de anillos traqueales (TOCs, siglas del inglés, tracheal organ cultures).

Ensayos serológicos

Los ensayos serológicos más utilizados en el diagnóstico de la BI son la virus neutralización (VN) (19), la inmunodifusión en gel de agarosa (AGID, siglas del inglés agar gel immunodiffusion) (48) y los ELISA (49). Cada uno de estos ensayos tiene sus ventajas y desventajas en términos de especificidad, sensibilidad y costo. En general, para los ensayos de rutina la VN es demasiado cara e impracticable y los ensayos de AGID tienen baja sensibilidad. Los ELISA son los más empleados para la serología de rutina al posibilitar el monitoreo general del VBI, pues permiten detectar respuesta de anticuerpos a todos los serotipos.

RT-PCR en tiempo real

En la actualidad las técnicas de amplificación por rRT-PCR para la detección y cuantificación del VBI constituyen los de elección para su empleo como diagnóstico de primera línea. Estos ensayos ofrecen varias ventajas respecto a los ensayos de RT-PCR convencionales. Además del relativamente corto tiempo de corrida de la reacción de amplificación, al final de la cual los resultados se obtienen directamente sin necesidad de una electroforesis adicional o visualización de la reacción de amplificación, es un ensayo altamente sensible, específico y reproducible. Se pueden usar para la cuantificación relativa o absoluta del ARN viral y reduce el riesgo de contaminaciones cruzadas, estas últimas generadas fundamentalmente por la manipulación de productos amplificados (50).

Identificación de serotipos

Debido a que el VBI exhibe una gran variedad antigénica, en ocasiones no es suficiente con la detección del agente, por lo que es necesario la serotipificación de la cepa

detectada, especialmente ante la posibilidad de obtener aislamientos de cepas vacunales (46). La serotipificación de aislados y cepas puede realizarse con ensayos de VN en embriones de pollo (19), TOCs (51) y cultivos celulares como riñón de embrión de pollo, riñón de pollo, línea celular VERO, BHK-21 y HELA (52). La neutralización de focos fluorescentes ha sido también aplicada a la diferenciación de cepas. Los anticuerpos monoclonales, usualmente empleados en los ELISA, son útiles para agrupar y diferenciar cepas del VBI. Todos estos métodos, al igual que el aislamiento viral (AV), son laboriosos, costosos, consumen tiempo y requieren el aislamiento de los virus (53).

Los ensayos, como la RT-PCR en combinación con la RFLP o con la secuenciación nucleotídica, se describieron para la discriminación de diferentes cepas o para los análisis filogenéticos (54). Estos métodos han reemplazado la inhibición de la hemaglutinación y la VN para determinar la identidad de una cepa de campo. Finalmente, la secuenciación de nucleótidos, seguida por el análisis filogenético de secuencias del gen de la proteína S1, ofrece un método rápido y seguro para identificar genotipos del VBI, así como para caracterizar serotipos, lo que permite, además, evaluar la evolución epidemiológica y filogenética de las cepas del VBI. La secuenciación de nucleótidos de una secuencia parcial para la caracterización del gen S1 es la técnica más útil para la diferenciación de las cepas del VBI y se ha convertido en el método de elección para el genotipaje en muchos laboratorios (55).

Prevención y Control

El control de la BI se ha intentado desde la década de los años 50 con el empleo de vacunas vivas atenuadas e inactivadas. La primera vacuna se desarrolló en los Estados Unidos de América (EUA) con la cepa van Roekel M41 (serotipo Mass.) (56). En 1960 la enfermedad se reportó en Holanda y esto condujo al desarrollo de una vacuna basada en un aislado

del VBI de ese país conocido como la cepa H, también del serotipo Mass. (57). Aun cuando la enfermedad se reportó por primera vez hace más de 60 años, el control de la misma permanece sin éxito (4).

La selección de la vacuna para el establecimiento de un programa eficiente de inmunización depende de la identificación de los serotipos presentes en la región y de la protección cruzada que exista entre las vacunas disponibles y los virus de campo.

Es importante la identificación de los serotipos involucrados en los brotes de campo en la región para el control de la BI. Lo primero que hay que hacer es enviar las muestras apropiadas al laboratorio de diagnóstico para el AV y posteriormente realizar la serotipificación de los aislamientos (46). Si algún serotipo en particular se identifica, como por ejemplo Mass., y si está disponible la vacuna contra ese serotipo, se debe incluir en el programa de vacunación.

Por otra parte, si con frecuencia se aísla un serotipo diferente a los que contienen las vacunas disponibles en el mercado, se recomienda hacer las pruebas de protección cruzada contra el serotipo en cuestión y las vacunas con los serotipos disponibles en busca del mejor porcentaje de protección. La protección cruzada entre los diferentes serotipos es mínima, por lo que se recomienda usar diferentes cepas del mismo serotipo o emplear vacunas bivalentes que contengan diferentes serotipos y hacer revacunaciones para aumentar el espectro de protección (54).

La prevención y el control de la BI depende de otros factores además de la vacunación, dentro de los que se destacan: las buenas prácticas de manejo de las aves, el control de factores inmunodepresores y de una eficiente bioseguridad. En este sentido, Antonio Pérez Noa. Instituto de Medicina Veterinaria (IMV) señaló (Comunicación personal, 2010) que la bioseguridad es parte indispensable de los procedimientos de las buenas prácticas de producción, por ser la mejor defensa contra las enfermedades; si estas no se cumplen de nada

valdrían las técnicas de diagnóstico de avanzada y la producción de vacunas por ingeniería genética. No solo la prevención permite lograr que el ave manifieste su potencial biológico productivo, por lo tanto, el desarrollo y el cumplimiento de un extenso programa de bioseguridad constituyen unos de los factores más importantes para reducir las pérdidas económicas por la BI.

El manejo ideal incluye el estricto aislamiento y la repoblación con pollitos de un día de edad, seguido de la limpieza y la desinfección de las naves y se deben ventilar con aire filtrado bajo presión positiva. En la práctica, lo planteado previamente resulta muy difícil de lograr, ya que los métodos comunes de producción incluyen múltiples edades en una nave o múltiples edades en un campo, en un área avícola de alta densidad; unido esto a las disciplinas en el cumplimiento de las buenas prácticas de producción hace más difícil el control del VBI (Aramís Fernández. Instituto de Investigaciones Avícola. Comunicación personal, 2013).

CONCLUSIONES

La BI sigue planteando un gran desafío para la industria avícola en todo el mundo. Debido a que el virus está constantemente mutando y un gran número de variantes regionales y globales se han identificado, se hace imprescindible conocer los diferentes aspectos de este virus y de la enfermedad para poder abordar la misma con resultados satisfactorios. El presente material pudiera servir como fuente de estudio para comprender mejor esta enfermedad tan importante en la medicina veterinaria.

REFERENCIAS

1. Schalk AF, Hawn MC. An apparently new respiratory disease of baby chicks. J Am Vet Med Assoc. 1931;78:413-416.
2. Cavanagh D, Naqi S. Infectious Bronchitis. En Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW. Diseases of poultry. 11th ed. Ames: Iowa State University Press; 2003. p.101-119.

3. Cavanagh D. Severe acute respiratory síndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol* 2003;32:567-582.
4. Cook JK, Jackwood M, Jones C. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* 2012;41(3):239-250.
5. Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Veterinary Research.* 2007;38:281-297.
6. Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen K. Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis. *Viruses* 2010;2:1804-1820.
7. ICTV Virus Taxonomy: 2012 Release. Disponible en: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012/>. Acceso el 04.04.13.
8. King B, Potts BJ, Brian DA. Bovine coronavirus hemagglutinin protein. *Virus Res.* 1985;2:53-59.
9. Cavanagh D, Picault JP, Gough R, Hess M, Mawditt K, Britton P. Variation in the spike protein of the 793/B type of infectious bronchitis virus in the field and during alternate passage in chickens and embryonated eggs. *Avian Pathol.* 2005;34:20-25.
10. Nagy PD, Simon A. New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology.* 1997;235:1-9.
11. Baker SC. Coronaviruses: Molecular Biology. En: Mahy BWJ, Van Regenmortel, MHV.(eds.). *Desk encyclopedia of General Virology.* Elsevier, San Diego, USA; 2008. p. 445-453.
12. Jarvis TC, Kirkegaard K. The polymerase in its labyrinth: Mechanisms and implications of RNA recombination. *Trends Genet.* 1991;7:186-191.
13. Sharmi W, Hilt DA, Kissinger JC, Paterson AH, Jackwood MW. Recombination in Avian Gamma-Coronavirus Infectious Bronchitis Virus. *Viruses.* 2011;3:1777-1799.
14. Masters PS. The Molecular Biology of coronaviruses. *Adv Virus Res.* 2006;66:193-292.
15. Hipólito O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. *Arquivo Escuela Veterinaria Universidade de Minas Gerais.* 1957;10:131-151.
16. Villarreal L, Sandri TL, Souza SP, Richtzenhain LJ, de Wit JJ, Brandao PE. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. *Avian Dis.* 2010;54:894-898.
17. Hidalgo H, Gallardo R, Rosende S. Isolation of infectious bronchitis virus from broiler chickens in Chile. *Avian Dis.* 1976;20:601-603.
18. Gelb J, Ladman BS, Tamayo M, Gonzalez M, Sivanandan V. Novel infectious bronchitis virus S1 genotypes in Mexico 1998_1999. *Avian Dis.* 2001; 45:1060-1063.
19. Dawson P, Gough R. Antigenic variation in strains of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1971;34:32-39.
20. Davelaar FG, Kouwenhoven B, Burger AG. Occurrence and significance of infectious bronchitis virus variant strains in egg and broiler production in the Netherlands. *Veterinary Quarterly.* 1984; 6:114-120.
21. Meulemans G, Carlier MC, Gonze M, Petit P, Vandebroek M. Incidence, characterisation and prophylaxis of nephropathogenic avian infectious bronchitis viruses. *The Veterinary Record.* 1987;120:205-206.
22. Dolz R, Pujols J, Ordóñez G, Porta R, Majo N. Antigenic and molecular characterization of isolates of the Italy 02 infectious bronchitis virus genotype. *Avian Pathol.* 2006;35(2):77-85.
23. Minta Z, Bugajek P, Karpinska E, Gough R, Cavanagh D, Mawdit K, et al. Isolation of new strains of VBI from broiler chickens

- in Poland. En E.F. Kaleta & U. Heffels-Redmann (Eds.). International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry Rauschholzhausen, Germany; 1998. p. 180-188.
24. Le Gros FX. Serotyping studies on recent VBI isolates from France and various regions of the world. En E.F. Kaleta & U. Heffels-Redmann (Eds.). Proceedings of the International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry. Rauschholzhausen, Germany; 1998. p. 205- 209.
25. Eid AAM. Infectious bronchitis virus infection in Egypt. In E.F. Kaleta & U. Heffels-Redmann (Eds.). Proceedings of the International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry. Rauschholzhausen, Germany; 1998. p. 145-156.
26. El-Houadfi M, Jones RC, Cook JKA, Ambali AG. The isolation and characterisation of six avian infectious bronchitis viruses isolated in Morocco. *Avian Pathol.* 1986;15:93- 105.
27. Roussan DA, Totanji WS, Khawaldeh GY. Molecular subtype of infectious bronchitis virus in broiler flocks in Jordan. *Poultry Science.* 2008;87:661-664.
28. Lohr JE. Infectious bronchitis in New Zealand, Asia, East Europe. En E.F. Kaleta & U. Heffels-Redmann (Eds.). Proceedings of the 1st International Symposium on Infectious Bronchitis. Rauschholzhausen, Germany; 1988. p. 70-75.
29. Lee EK, Jeon WJ, Lee YJ, Jeong OM, Choi JG, Kwon JH, Choi KS. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolates in Korea between 2003 and 2006. *Avian Dis.* 2008;52:332-337.
30. Shimazaki Y, Horiuchi T, Harada M, Tanimura C, Seki Y, Kuroda Y, et al. Isolation of 4/91 type of infectious bronchitis virus as a new variant in Japan and efficacy of vaccination against 4/91 type field isolate. *Avian Dis.* 2008; 52:618-622.
31. Huang YP, Lee HC, Cheng MC, Wang CH. S1 and N gene analysis of avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. *Avian Dis.* 2004;48:581-589.
32. YuDong W, YongLin W, ZiChun Z, GenChe F, YiHai J, Xiang EL. Isolation and identification of glandular stomach type VBI (QX VBI) in chickens. *Chinese Journal of Animal Quarantine.* 1998;15:1-3.
33. Liu SW, Zhang QX, Chen JD, Han ZX, Liu X, Feng L, et al. Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. *Archives of Virology.* 2006;151:1133-1148.
34. Zou NL, Zhao FF, Wang YP, Liu P, Cao SJ, Wen XT, Huang Y. Genetic analysis revealed LX4 genotype strains of avian infectious bronchitis virus became predominant in recent years in Sichuan area, China. *Virus Genes.* 2010;41:202-209.
35. Cuiping X, Jixun Z, Xudong Z. Isolation and identification of four isolates of infectious bronchitis strains in China and analysis of their SI protein gene. *Veterinary Microbiology.* 2007;122:61-71
36. Ignjatovic J, Gould G, Sapats S. Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. *Archives of Virology.* 2006;151:1567-1585.
37. Ignjatovic J, Ashton DF, Reece R, Scott P, Hooper P. Pathogenicity of Australian strains of avian infectious bronchitis virus. *Journal of Comparative Pathol.* 2002;126:115-123.
38. McFarlane R, Verma R. Sequence analysis of the gene coding for the S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus (VBI) strains from New Zealand. *Virus Genes.* 2008;37:351-357.
39. Dhinaker RG, Jones RC. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of

- infection in the chicken. *Avian Pathol.* 1997;26:677-706.
40. Hofstad MS, Yoder HW. Avian infectious bronchitis virus distribution in tissues of chicks. *Avian Dis.* 1966;10:230-239.
41. Jungherr EL, Chomiak TW. Immunologic differences in strains of infectious bronchitis. Proc 60 th Annu Meet US Livestock Sanit Assoc; 1956. p. 203-209.
42. Cumming RB. Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. *Aust Vet J.* 1963;39:145-147.
43. Matthijs MG, Van Eck JH, de Wit JJ, Bouma A, Stegeman J. Effect of VBI-H120 vaccination in broilers on colibacillosis susceptibility after infection with a virulent Massachusetts-type IBD strain. *Avian Dis.* 2005; 49:540-545.
44. Cavanagh D, Ellis MM, Cook JKA. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathol.* 1997;26:63-74.
45. Allymehr M. Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in broiler y broiler breeder chickens in West Azerbaijan Province, Iran. *Journal of veterinary medicine. A. Physiol Pathol Clin Med.* 2006;53:40-42.
46. OIE (World Organisation for Animal Health). Terrestrial animal health code [chapter 2.3.2 avian infectious bronchitis]. OIE (World Organisation for Animal Health). http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.10.4.pdf; 2008.
47. Naqi SA. A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. *Avian Dis.* 1990;34:893-898.
48. Witter RL. The diagnosis of infectious bronchitis of chickens by the agar gel precipitin test. *Avian Dis.* 1962;6:478-492.
49. Mockett APA, Darbyshire JH. Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 1981;10:1-10.
50. Niesters HGM. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(1):5-11.
51. Darbyshire JH, Rowell RG, Cook JK, Peters RW. Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralisation tests in tracheal organ cultures. *Arch Virol.* 1974;61:227-238.
52. Hopkins SR. Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque purified isolates. *Avian Dis.* 1974;18:231-239.
53. Kwon HM, Jackwood MW, Gelb JJr. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.* 1993;37:194-202.
54. Gelb J, Weisman Jr, Ladman Y, Meir R. S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). *Avian Pathol.* 2005;34:194-203.
55. Kulkarni AB, Resurreccion RS. Genotyping of newly isolated infectious bronchitis virus isolates from Northeastern Georgia. *Avian Dis.* 2010;54:1144-1151.
56. Van Roekel H; Clarke MK, Bullis KL, Olesiuk OM, Sperling FG. Infectious bronchitis. *Am J Vet Res.* 1951;12:140-146.
57. Bijlenga G, Cook JKA, Gelb J, de Wit JJ. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. *Avian Pathol.* 2004;33:550-557.