

LA BRONQUITIS INFECCIOSA DE LAS AVES Y METODOS DE GENETICA MOLECULAR USADOS EN SU DIAGNOSTICO

RICARDO MORENO CHAN

*Laboratorio de Microbiología Experimental
Departamento de Virología e Inmunología
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.*

I. Introducción.	20
II. Etiología	21
1. Crecimiento del virus en medios de cultivo	23
a).Embrión de pollo	23
b). Cultivos celulares	23
c). Cultivo de órganos	24
III. Epizootiología	24
IV. Patogenia y período de incubación	25
V. Signos clínicos	25
1.Pollos de engorda	25
2.Aves de postura	26
VI. Patología.....	27
1.Alteraciones posmortem	27
2.Histopatología	28
3.Hematología	29
VII. Diagnóstico	29
1.Clínico de campo	29
2.De laboratorio	30

A. Métodos de rutina	30
a). Aislamiento del virus	30
b). Inoculación de aves susceptibles	31
c). Diagnóstico serológico	31
d). Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación	32
e). Hemoaglutinación indirecta	32
B. Métodos de genética molecular y biotec- nología	33
a). Polimorfismo de fragmentos de restricción (EFLP)	34
b). Reacción en cadena con la polimerasa (PCR)	35
c). Hibridación de ácidos nucleicos	36
d). Anticuerpos monoclonales	38
VIII. Tratamiento.....	39
IX. Inmunidad	39
X. Prevención y control	40
1. Cepas de virus en vacunas comerciales	40
2. Vacunación	41
Referencias	42

I. Introducción

Uno de los problemas de significación económica y sanitaria que sigue afectando a la avicultura de amplias zonas en el mundo, es la Bronquitis Infecciosa de las Aves (BIA), que es una enfermedad infecciosa aguda, de etiología viral, que se caracteriza por inflamación catarral de las mucosas del aparato respiratorio, con estornudo, estertores traqueo-bronquiales húmedos, boqueos y descargas nasales, de rápida difusión en las parvadas, alta morbilidad y baja mortalidad, con descenso en la producción y calidad del huevo en las aves de postura.

Los primeros informes de BIA fueron hechos por Schalk y Hawn en 1931 (39), quienes observaron la enfermedad en el norte de Dakota, E. U. A., en la primavera de 1930. Durante los siguientes años la enfermedad fue reconocida en otras partes de E.U.A., y del mundo. En México, Moreno Chan R. en 1962, confirmó la presencia del virus de BIA en aves con signos clínicos de enfermedad respiratoria crónica (32, 33).

II. Etiología

La Bronquitis Infecciosa de las aves (BIA) es causada por un virus de la familia *Coronaviridae*, genero *Coronavirus*, del cual es el prototipo viral. Desde el punto de vista fisicoquímico, es un virus envuelto, con genoma de RNA en cadena simple y de simetría helical. Morfológicamente es pleomórfico, con diámetro de 80-120 nm (4).

Su envoltura, se estructura con grandes unidades morfológicas de proteínas que sobresalen como masas o pétalos, que hacen ver al virión en las micrografías electrónicas con una forma característica de corona.

El virus se replica en el citoplasma de las células, e inhibidores del DNA como el nucleósido 5-iodo-2-deoxiuridina no inhiben su replicación, confirmando que su genoma es RNA.

La mayoría de las cepas conocidas de VBI se inactivan a la temperatura de 56° C después de 15 min., y también 10 inactivan los solventes de los lípidos como el éter y el cloroformo, lo que significa que contiene lípidos esenciales en su envoltura. Esta sensibilidad a los solventes de los lípidos, puede utilizarse para diferenciar los aislamientos de campo, de otros virus desnudos contaminantes como los Reovirus y los Adenovirus.

La liofilización preserva al virus por períodos teóricamente indefinidos. El fluido alantoideo liofilizado en ampollitas en

refrigeración, fue viable por mas de 30 años. Su estabilidad a diferente pH, varía, habiéndose encontrado cepas que han resistido pH de 1 y de 7.8, siendo por otra parte sensible a los desinfectantes comunes, que inactivan virus que poseen lípidos esenciales en su envoltura (37).

Existe una gran variedad de cepas de virus de BIA, habiéndose reconocido las cepas Massachusetts 41, Connecticut, Arkansas, JMK, Florida, Maine 209, Clarke 33, Iowa 97 y 609, Y la SE17.

Alas cepas anteriores, deben agregarse las cepas variantes Holte, Grey y T, que tienen un gran tropismo renal y producen el síndrome de nefritis-nefrosis.

Las cepas de virus de la BIA son serotipos diferenciados con las técnicas de Neutralización Viral (NV) en embrión de pollo, y de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH), las cuales son bastante consistentes con los resultados obtenidos con las pruebas de protección cruzada de aves.

En Europa, además del tipo Massachusetts, se han identificado nuevos serotipos antigénicos como el D274 y el DI466 en los países bajos.

En Marruecos, se lograron 6 aislamientos de campo designados como D, E, F, H, M y G, de los cuales, los 5 primeros están relacionados serológicamente con el serotipo Massachusetts, y el G, resultó ser un serotipo diferente a cualquier otro reportado previamente para el virus de BIA (18).

Por otra parte, en 1987, se logró un aislamiento de virus de BIA en gallinas ponedoras con urolitiasis. Este virus mostró en pruebas de NV, una relación antigénica estrecha con las cepas Grey y Delaware 2868 y 2897 (12).

El virus de la BIA no causa hemoaglutinación de eritrocitos de pollo en forma directa, sin embargo, algunas cepas del

virus, sí pueden hemoaglutinar después de ser tratadas con fosfolipasa C tipo 1 (2, 3, 6, 27). Así, el virus concentrado por centrifugación se hace reaccionar con 2-3 unidades de fosfolipasa C, durante 2 hs, a 37° C, obteniéndose un antígeno hemoaglutinante que puede luego titularse por el método estándar de microtitulación en placas de 96 pozos. La hemoaglutinación producida por este antígeno puede ser específicamente inhibida por el anticuerpo correspondiente.

1. Crecimiento del virus en medios de cultivo

a). Embrión de pollo

El VBI crece bien en embriones de pollo de 8-10 días de edad, causando enanismo y/o retardo del crecimiento en 4-6 días post-inoculación. Una lesión consistente es la presencia del mesonefros conteniendo uratos. Las mayores concentraciones de virus han sido recuperadas de la membrana corioalantoidea, seguida en orden decreciente por el fluido alantoideo, el fluido amniótico y el hígado a 36 hs post-inoculación (15).

King en 1984, encontró que la propagación del virus en embriones de pollo, es el mejor método para la producción de antígenos hemoaglutinantes del virus de la bronquitis infecciosa, mientras que, las pruebas para producir antígeno hemoaglutinante a partir de virus adaptados a cultivos celulares, no fueron satisfactorios (25).

b). Cultivos celulares

El VBI crece bien en cultivos celulares de riñón, pulmón e hígado de embrión de pollo de 15 a 18 días de edad. Las más usadas son las células de riñón. También se ha cultivado en células de riñón de pavo (10), y en pasajes seriados de células de mono verde africano (11). El virus con pocos pases en

embrión de pollo crece pobremente, o simplemente no crece en cultivos celulares. Las cepas de VBI después de 6-10 pasajes en embrión de pollo, producen el efecto citopático (ePE) usual, en cultivos de células renales (24).

c). Cultivo de órganos

El VBI se puede cultivaren tráquea como método alternativo (16, 17,20,21, 22), Y también en oviducto (20).

III. Epizootiología

La BIA es un problema viral presente en todas las zonas avícolas del mundo con producción intensiva.

En condiciones naturales, sólo las aves de granja son susceptibles; sin embargo, afectando a las aves de todas las edades, es mucho más severa en pollos jóvenes de no más de 2 semanas de edad en los que puede causar alguna mortalidad.

La enfermedad se difunde rápidamente entre las aves de una parvada susceptible mediante aerosoles, y así, cuando se tienen aves susceptibles con aves enfermas en un cuarto o una caseta, la infección se transmite rápidamente hasta un 90-100% de las aves en las primeras 48 hs. El virus se difunde por el aire mediante microaerosoles y se considera que durante un brote epizootico, el virus puede viajar por el aire de una caseta a otra y aún a otras granjas vecinas que estén más o menos próximas a aves susceptibles.

El virus ha sido recuperado de la tráquea y de la cloaca hasta 49 días después de un ataque de la enfermedad (15).

Factores que predisponen al desarrollo de la enfermedad son, la incidencia de infecciones intercurrentes como las de la Enfermedad de Gumboro y de la Enfermedad de Marek, que son producidas por agentes inmunosupresores y la presencia

de agentes bacterianos complicantes como *E. coli*, *H. gallinarum* y micoplasmas como *M. gallisepticum* y *M. sinoviae*.

IV. Patogenia y período de incubación

Las aves adquieren la infección por vía respiratoria y el virus experimenta una replicación primaria en las células epiteliales del tracto respiratorio, de donde ha sido recuperado de traquea y pulmón a las 24 hs y hasta por 8 días (20).

Algunas cepas de virus de la BIA se replican también en células distintas a las del aparato respiratorio, como las del riñón y de la bolsa de Fabricio, donde persisten más tiempo que en la traquea o el pulmón.

Las aves expuestas a aerosoles de fluido alantoideo de embriones infectados, manifiestan los primeros signos de infección respiratoria a las 24 hs. Este período de incubación se alarga un poco bajo condiciones naturales, en que la propagación de la enfermedad requiere de más o menos 36 hs.

V. Signos clínicos

1. Pollos de engorda

Los signos clínicos característicos son: estornudos, estertores traqueobronquiales, descarga nasal, sofocación y algunas veces lacrimación. Los pollos se amontonan bajo la fuente de calor y el consumo de alimento y la ganancia de peso se reducen notablemente (35). Los ruidos ocasionados por estornudos pueden ser más fácilmente escuchados en la noche, o en las primeras horas de la mañana cuando todas las aves están tranquilas.

2. *Aves de postura*

Los signos respiratorios son: estertores traqueales húmedos, sofocación y estornudos. Además, hay descenso en la producción de huevo de 25-30% y hasta más, dependiendo de la calidad de manejo. Las parvadas que se afectan en el período final de la postura, usualmente tienen un marcado descenso de la misma, y requieren de períodos relativamente largos para su parcial recuperación; en cambio, se ha observado que las ponedoras en su buen período de postura, pueden experimentar sólo una ligera baja en su producción con rápida recuperación; aunque son pocas las parvadas que logran recuperar el nivel de postura que tenían antes de la enfermedad. En 1954 se estudiaron algunos brotes de Bronquitis Infecciosa (7), encontrándose que la producción de huevo se redujo a 25%, y el número de huevos infértiles se incrementó hasta 92%, reduciéndose además la incubabilidad a 7%.

La calidad externa del huevo se afecta, y algunas veces se producen huevos con cascarones muy delgados, de formes y rugosos. Las irregularidades del cascarón pueden persistir por períodos indefinidos.

La calidad interna del huevo también es afectada. La albúmina, puede ser acuosa y sin una demarcación definida entre la albúmina gruesa y la delgada, en comparación con la albúmina de los huevos frescos normales. El efecto negativo en la calidad interna del huevo, puede hacerse aparente hasta 2 semanas después de que los signos clínicos han desaparecido (30).

En relación a la morbilidad y mortalidad en parvadas susceptibles, la infección puede difundirse rápidamente, afectando a 80-100% de las aves, en 24-48 hs. La mortalidad que afecta principalmente a pollos jóvenes, es variable y depende de la edad de los pollos, de la presencia o ausencia de

anticuerpos, y de las condiciones ambientales. Así, la mortalidad puede alcanzar hasta 25% en pollitos de 3-4 semanas o menores, siendo mucho mas baja en pollos de mas de 6 semanas de edad.

VI. Patología

1. Alteraciones posmortem

A la necropsia, los pollitos afectados revelan exudado catarral o caseoso en los pasajes y senos nasales, y/o catarral o caseoso en la traquea. Puede encontrarse opacidad de las membranas de los sacos aéreos, con exudado caseoso amarillento. En los pollitos que mueren, se puede encontrar en ocasiones un tapón caseoso en la parte inferior de la traquea o en los bronquios. Además, la bronquitis catarral y la bronconeumonía son lesiones frecuentes. En las aves ponedoras puede encontrarse fluído de material de la yema en cavidad abdominal. Esta última lesión no es específica y puede encontrarse en otras enfermedades que causan baja en la producción de huevo.

Sevoian y Levine en 1957, estudiaron las lesiones macroscópicas del tracto reproductor de pollitas infectadas con VBI (38); y observaron que las alteraciones de longitud y peso del oviducto, tardan hasta 21 días en recuperarse. Además, se han encontrado evidencias de daño permanente en los oviductos, debido a lo cual, un porcentaje variable de pollitas, no responden a la expectativa de ser buenas ponedoras, después de haber padecido la infección a temprana edad con virus de la BIA (8).

En una infección experimental de pollitas Leghorn blancas de 1 día de edad, las lesiones se encontraron en el tercio medio del oviducto. El istmo y la ampolla fueron las regiones más

seriamente involucradas (13). Por otra parte, Cumming en 1963 describió una nefrosis asociada a la infección de la cepa T de VBI; los riñones estaban aumentados de volumen, pálidos, los tubulos y los uréteres, a menudo se encontraron distendidos y contenían cristales de ácido urico (14). Hay informes similares que han sido descritos por otros investigadores (23, 41).

Se comparó la nefropatogenicidad de 4 cepas del VBIA, que causaron grados variables de lesiones renales. La cepa Holte resultó ser la menos patógena, seguida en orden de patogenicidad por las cepas Grey, Italiana y por ultimo la cepa T Australiana (1).

2. Histopatología

Las lesiones histopatológicas del tracto respiratorio, consisten en infiltración celular y edema de la mucosa y submucosa traqueales, congestión vascular e hiperplasia del epitelio mucoso traqueal, pudiendo además haber hemorragia en la submucosa. Generalmente no hay interrupción en la continuidad del epitelio de la tráquea y el lumen puede contener exudado mucoso, frecuentemente con elementos celulares inflamatorios.

Se ha descrito una reacción clásica al VBI que consiste, en la pérdida de cilios e infiltración mononuclear del epitelio de la mucosa traqueal, con ausencia de hiperplasia epitelial (20, 21), sin embargo, McDonald y McMartin en 1970, describieron que la principal lesión, en la mitad de los casos no severos de infección con VBIA, es hiperplasia epitelial con poca o nula infiltración linfoide o edema (29).

También se han descrito lesiones similares con la infección por la cepa JMK (20). Dutta en 1975, estudio las lesiones traqueales con el microscopio electrónico de barrido. Las

tráqueas de pollitos infectados, mostraron que las células epiteliales perdían sus cilios en 4 días, recuperándose 10 días después, y a los 12 días la regeneración de las células y los cilios era completa (17). Se han comparado también los cambios microscópicos en los oviductos de gallinas infectadas con VBI y de gallinas a las que se privó de agua y alimento.

Microscópicamente, el tamaño de las células del epitelio de los oviductos no sufren una reducción notable, volviéndose cuboidales con alguna pérdida de los cilios. La dilatación de las glándulas ocurrió en la mitad de los oviductos estudiados. En la lámina propia y en el estroma intertubular de los oviductos, se observaron focos de infiltración celular linfocitaria. Pocos cambios significativos se observaron en el grupo de las gallinas que estuvieron bajo el estrés de privación de agua y alimentos (30).

3. Hematología

La cuenta de elementos hemáticos revela una leucopenia en los primeros 2 días del curso de la enfermedad, seguida de una leucocitosis que declina después del séptimo día, alcanzando su normalidad a los 15 (28).

VII. Diagnóstico

1. Clínico de campo

El diagnóstico clínico de campo en la fase inicial de la enfermedad, debe hacerse en forma diferencial con respecto a otras infecciones virales respiratorias como las de Newcastle y la de Laringotraqueitis Hemorrágica, cuyas manifestaciones clínicas son similares a las de BIA. En cambio en fases clínicas avanzadas de la enfermedad, con los signos clínicos más definidos y los aspectos epizootiológicos de la edad de la

parvada, morbilidad, velocidad de difusión, efecto sobre el consumo de alimento y sobre la postura y la calidad de huevo en aves ponedoras, mas la mortalidad y las lesiones detectables en necropsia, proporcionarán una base de antecedentes, que evaluados inteligentemente podrán hacer posible un buen diagnóstico clínico patológico tentativo, que podrá después ser confirmado en la investigación de laboratorio.

2. *De laboratorio*

A. *Métodos de rutina*

La confirmación de la presencia del virus de la BI en los problemas respiratorios de las aves, se basa en el aislamiento e identificación del virus o en la demostración sérica de niveles ascendentes de anticuerpos contra una cepa conocida de BI como las cepas Massachusetts o Beaudette.

a). *Aislamiento del virus*

Se realiza a partir de aves enfermas en la fase aguda de la enfermedad, de las que, de una suspensión del exudado mucoso traqueal, o de tráquea y/o pulmón macerados y libres de bacterias, se inoculara en dosis de 0.2 mL., en el saco corionalantoideo de embriones de pollo -preferentemente libres de patógenos específicos y de anticuerpos contra la enfermedad- de 8-9 días de edad, que incubados a 37° C durante 67 días, son luego investigados para detectar las diferentes alteraciones patológicas que generalmente se producen, en embriones de pollo que padecen la infección con el virus de la BIA. En aislamientos primarios, las cepas de campo muestran muy poco efecto patológico en los embriones inoculados en el primer pase; sin embargo, en los pases ciegos subsiguientes, las manifestaciones de enanismo y/o falta de desarrollo de embriones, el engrosamiento del amnios y la presencia de uratos en el fluido amniótico, sin capacidad hemoaglutinante

directa del fluido alantoideo y con una clara supervivencia embrionaria, indicarán fuertemente la posible infección con el virus de la BI que luego deberá ser identificado específicamente en pruebas de neutralización viral, con sueros tipos conocidos del virus.

Por otra parte, la infección por Adenovirus de algunas parvadas comerciales, es frecuente y puede producir enanismo en embriones de pollo, difícil de distinguir del enanismo producido en los embriones por el virus de BI; por consiguiente, las membranas corioalantoideas deben colectarse, homogeneizarse e investigarse por la presencia de Adenovirus aviar tipo 1, mediante la técnica de inmunodifusión.

b). Inoculación de aves susceptibles

Otro recurso valioso de diagnóstico, 10 constituye la inoculación intratraqueal de pollitos susceptibles, con fluido alantoideo de embriones de pollo, infectado y colectado a 4876 hs de incubación. En los casos positivos, los pollitos inoculados iniciarán la presentación de signos respiratorios a 24-36 hs post-inoculación (20).

c). Diagnóstico serológico

El examen de los niveles séricos de anticuerpos contra el virus de BI es otra alternativa de diagnóstico de la enfermedad. Para conocer la dinámica de los niveles de anticuerpos, se deben obtener 2 muestras de suero, de las cuales, una debe corresponder a la fase inicial y la otra a la fase de convalecencia, a 2 o 3 semanas de la fecha de la primera muestra. En los casos positivos, las pruebas de suero-neutralización mostrarán $IN_{50}EP$ bajos o negativos para el suero de la fase inicial y altos en el suero de la fase convalescente. En virtud de las diferencias entre cepas de VBI, en algunos casos será conveniente utilizar en las pruebas de serología, otras cepas distintas a la Massachusetts 41 que es la más frecuentemente usada.

Para obtener resultados uniformes y reproducibles en las pruebas de neutralización con suero, todos los sueros en las pruebas deberán inactivarse a 56° C durante 30 minutos (5).

Las pruebas serológicas utilizadas en la identificación y serotipificación de las cepas de campo del VBI, son las de Neutralización Viral (NV) y la de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH). La prueba de ELISA, que parece no detectar los diferentes serotipos del virus de la BI (26), fue sin embargo considerada por Mockett y cols. en 1981, como mas específica y sensible que las pruebas de NV y de IH (31).

Otras pruebas como la de Anticuerpos Fluorescentes y la de precipitación en gel de Agar, pueden usarse para la identificación de un virus de campo, pero no son útiles para diferenciar los serotipos específicos (36).

d). Hemoaglutinación e Inhibición de la hemoaglutinación

El virus de la BI cuando es obtenido en el fluido alantoideo del embrión de pollo, no hemoaglutina los glóbulos rojos de las aves en forma directa; sin embargo, Bingham en 1975 (6), encontró que el virus es capaz de hemoaglutinar cuando es tratado enzimáticamente, y que el proceso, podía ser inhibido específicamente por el anticuerpo específico en una prueba de inhibición de la HA (2, 3, 27). El procedimiento se realiza haciendo crecer el virus en embriones de pollo de 9-11 días de edad durante 30 hs; el fluido alantoideo cosechado se concentra a 30,000 xgy luego es tratado con 3 unidades de fosfolipasa C tipo 1 por ml, durante 2 hs a 37° C. La prueba de IH se efectúa con 8 unidades hemoaglutinantes.

e). Hemoaglutinación indirecta (HAI)

En 1962, Brown y cols., describieron una prueba de HA indirecta para el virus de BI (9). El virus es adsorbido en glóbulos rojos de caballo, los cuales luego son tratados con ácido tánico, y después lavados para mezclarse con el suero

sospechoso. Si el suero contiene anticuerpos, éstos reaccionarán con el antígeno (virus) causando la aglomeración de los glóbulos rojos. Otros investigadores han realizado esta prueba, adsorbiendo el virus a glóbulos rojos de camero tratados con acroleína y tanino, encontrándola muy sensible y específica (20).

B. Métodos de genética molecular y biotecnología

Además de los procedimientos convencionales de diagnóstico virológico descritos, muchos laboratorios de diagnóstico e investigación, empiezan a incorporar algunas técnicas de genética molecular y de biotecnología, considerando las ventajas de su rapidez, sensibilidad, especificidad y versatilidad en sus usos y aplicaciones.

En la identificación de agentes virales con fines diagnósticos y/o de investigación científica, las técnicas de genética molecular tienen la capacidad de distinguir cepas de virus entre sí, con sus tipos y subtipos serológicos, patotipos y por supuesto diferenciar las cepas virulentas de campo de las de vacunas, en relativamente corto tiempo, con gran sensibilidad y especificidad. Además, pueden aplicarse a especímenes clínicos que pueden consistir en tejidos, suspensiones líquidas y aún a heces, que por su alto nivel de contaminación con diversos microorganismos ubicuitarios, son difíciles de investigar mediante las técnicas de laboratorio usadas tradicionalmente.

Para el caso particular de la Bronquitis Infecciosa (BI), recientemente se han desarrollado procedimientos de genética molecular como el Polimorfismo Genético de Fragmentos de Restricción (EFLP), la Reacción en Cadena con la Polimerasa (PCR), la hibridación de ácidos nucleicos en diferentes alternativas (44,54) así como la técnica biotecnológica de los anticuerpos monoclonales (55) aplicables solas o combinadas.

al diagnóstico e investigación de las enfermedades infecciosas como la Bronquitis Infecciosa, y de las cuales en este trabajo, sólo se pretende mostrar un bosquejo introductorio.

a). Polimorfismo de fragmentos de Restricción (EFLP)

El descubrimiento de las enzimas de restricción que poseen muchos microorganismos, su obtención y uso experimental, fue esencial en el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética. Estas enzimas que degradan el DNA de organismos extraños, cortan esta macromolécula en sitios muy específicos, diferentes para cada enzima, y los fragmentos resultantes pueden ser después separados e identificados, por su tamaño o longitud, mediante la técnica de electroforesis en gel de Agarosa y visualizados por tinción (36, 42). Los fragmentos que se obtienen, son característicos tanto para la molécula de DNA seccionada como para la enzima de restricción utilizada. Así, cuando el DNA o RNA de diferentes cepas de virus son tratados con alguna enzima de restricción, se obtendrán varios fragmentos de diferente medida, cuyo patrón electroforético particular, podrá ser usado para distinguir a una cepa viral de otra. Esta metodología es la base de las técnicas conocidas como EFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms).

En un estudio experimental de Kwon, H.M. y de Jackwood y Gelb Jr., (49) usando complementariamente las técnicas de PCR y del análisis del EFLP, lograron la diferenciación de varios tipos serológicos del virus de la Bronquitis Infecciosa. Después de amplificar la secuencia de bases del gen de la glicoproteína 81 del virus, mediante la técnica PCR., y de digerirlas con enzimas de restricción, se pudieron agrupar once cepas de referencia del virus de la BI de acuerdo a los patrones electroforéticos de los fragmentos resultantes; así, las cepas Arkansas DP1, 8E 17, Md 27, Iowa 97 y Holte, se diferenciaron de otras cepas del virus, cuando se usa la enzima HaeIII con la cual otras cepas como la Beaudette,

Massachusetts 41, Connecticut y Florida 88, tuvieron el mismo patrón electroforético, pero pudieron diferenciarse cuando se usaron las enzimas XcmI y la BstYI. Dos cepas, la Grey y la JMK, no pudieron ser diferenciadas con el patrón del EFLP después de la digestión con 23 diferentes enzimas de restricción (49). Los resultados mencionados concuerdan con los obtenidos mediante las técnicas de neutralización viral en el embrión de polio.

b). Reacción en Cadena con la Polimerasa (PCR)

La PCR descrita en 1983, es una prueba que se utiliza cada año con mayor frecuencia y a la fecha, ha sido utilizada en por lo menos 2,150 publicaciones científicas (36). La prueba está diseñada para amplificar o producir en relativamente grandes cantidades, secuencias de DNA que sean de interés para el investigador. Un ciclo de la PCR consta de tres eventos sucesivos: a) desnaturalización, b) hibridación y c) síntesis de DNA, eventos que se realizan a diferente temperatura. Además del DNA sujeto de amplificación, participan en la prueba 2 *Primers* (Oligonucleótidos de 10-30 pb), nucleótidos adecuados para la extensión y una polimerasa termorresistente. Los *Primers* colocados por separado a una distancia conveniente uno del otro en las dos cadenas simples del DNA denaturalizado, delimitan la región de la molécula de DNA que deberá ser amplificada por la Polimerasa. Después de cada ciclo, se obtiene una doble cantidad del DNA inicial, de manera que después de 30-40 ciclos que se realizan con un ciclador automático de temperatura, se pueden lograr hasta más de 1×10^6 veces, las secuencias del DNA original, en un tiempo de 4 a 8 hs (36, 50, 56).

El producto amplificado podrá después ser analizado por tinción con la técnica de electroforesis en Gel de Agarosa. Con la prueba se pueden amplificar también secuencias de RNA, utilizando en el procedimiento una transcriptasa inversa.

La prueba de la PCR ha sido un gran auxiliar, en el diagnóstico e investigación de virosis como la Bronquitis Infecciosa de las aves y en la diferenciación serológica de los diferentes tipos de virus que se conocen de la Bronquitis Infecciosa Aviar (43, 46, 47, 48, 49).

c). Hibridación de Acidos Nucleicos

Las técnicas de hibridación son un ensayo muy eficaz, para la identificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos, con Sondas de DNA o RNA en medios sólidos o líquidos. Cuando se realiza en un substrato sólido, en una prueba positiva, las Sondas del ácido nucleico hibridado con una secuencia del DNA o RNA investigado en la muestra, quedan pegadas -por decirlo así- al medio de soporte y las que no hibridaron son eliminadas por lavado. Si las Sondas usadas fueron marcadas radiactivamente, podrán detectarse por autorradiografía en placa de rayos X, en cambio, cuando se usan Sondas no radiactivas, marcadas por ejemplo con Digoxigenina incorporada a las bases de las mismas, el sitio de hibridación se detecta con un conjugado de anticuerpos antidigitonina con una enzima como la fosfatasa alcalina, o Rodamina. Si la fosfatasa alcalina lleva un substrato luminiscente, el sitio de la hibridación emitirá una señal luminosa, que podrá ser registrada exponiendo la preparación a una placa de rayos X, donde se produce una imagen muy parecida a la de una autorradiografía (54). El uso de Sondas no radiactivas tiene la ventaja de que en menos de una hora de exposición, se pueden detectar hasta 0.1 pg de DNA, evitando además, la necesidad posterior de eliminar el material radiactivo, cuando se utilizan Sondas radiactivadas.

Entre las técnicas de hibridación de DNA, debemos considerar la técnica de Southern, publicada en 1975 y que hoy se le conoce como el método de transferencia de Southern (*Southern transfer*) (54). Este método consiste en digerir el DNA investigado, con endonucleasas de restricción, separar

los fragmentos resultantes con la técnica de electroforesis en Gel de Agarosa y luego desnaturalizarlos para obtener los fragmentos en cadena simple, los que luego transferidos a un substrato sólido como una membrana de nitrocelulosa, son expuestos a las Sondas de DNA o RNA marcadas con ^{32}P durante un corto tiempo de incubación. Finalmente, las Sondas no hibridadas son eliminadas por lavado, para luego exponer la membrana a una placa de rayos X. En las placas reveladas, las bandas oscuras indicarán las secuencias de DNA que resultaron ser complementarias a las Sondas utilizadas (54). Este método es muy sensible ya que es capaz de detectar copias simples de genes en tan sólo 10 μg de DNA genómico (54).

Otra metodología para RNA es la denominada *Northern transfer* (Transferencia de Northern) descrita por Alwine y cols. en 1977, nombrada así, por su similitud con el método de Southern para DNA (53). En una forma simplista, después de someter al RNA a la fuerte acción denaturalizante de químicos como el glioxal, el formaldehído, para romper la estructura secundaria del ácido nucleico, el procedimiento separa electroforéticamente al RNA, transfiriéndolo luego a un substrato sólido para la hibridación a una Sonda complementaria de DNA (54).

Por otra parte, la prueba denominada Hibridación *in situ* (ISH), permite la exploración directa de los ácidos nucleicos, en las áreas específicas donde se encuentran dentro de las células de los tejidos en preparaciones citológicas, de manera que las Sondas marcadas de DNA o RNA, se agregan directamente al portaobjetos que contiene la sección del tejido en estudio. Después de un período de incubación, las Sondas no hibridadas se eliminan por lavado, cubriendo luego con una capa fina de emulsión fotográfica y, después de unos días de incubación en la oscuridad, es revelada. La observación al microscopio de luz, detectará granos de plata oscuros, que

serán los sitios de hibridación de la Sonda. La prueba es tan sensible, que puede detectar a células infectadas con virus, en una población donde sólo el 5% de las células esta infectada (54,57).

Entre los múltiples usos de la técnica de Hibridación *in situ* (ISH), se encuentran el del diagnóstico de enfermedades virales y la tipificación de cepas de virus. En la actualidad, se han desarrollado Sondas específicas para la investigación y diagnóstico rutinario de enfermedades aviarias, con la metodologías de Southern, Northern e hibridación por transferencia en puntos o gotas (*Dot Blot hybridization*) para el virus de la Bronquitis Infecciosa, de la Enfermedad de Newcastle, de la Influenza aviar, de Enfermedad de Gumboro y la de Marek (43,44).

d). Anticuerpos Monoclonales

Una aportación muy valiosa de la biotecnología, es el método para la obtención de Anticuerpos Monoclonales. Con este método, Syed y Kemal desarrollaron recientemente anticuerpos monoclonales específicos de algunos serotipos del virus de la BI como el Massachusetts, Connecticut y Arkansas, considerando que son los tipos mas prevalentes en extensas zonas avícolas del mundo y también, que los subtipos dentro de estas cepas de virus, son los mas frecuentemente incluidos en las vacunas vivas atenuadas para la inmunización de las aves de granja, contra la Bronquitis Infecciosa (55). Con los anticuerpos monoclonales desarrollados y usando la prueba de Inmunoperoxidasa, detectaron exitosamente el virus de la BI en tejidos de animales y de embriones de pollo infectados experimentalmente, en unas cuantas horas (55).

Por otra parte, los estudios aun no concluídos, indican que los anticuerpos monoclonales específicos de serotipo, reaccionan con la proteína S1 de los peplómeros del virus de la BI, neutralizando específicamente alas cepas homólogas (55).

VIII. Tratamiento

Una vez que la BIA se ha manifestado, no existe tratamiento específico. Prácticas de manejo como disminuir la densidad de población por metro cuadrado, y evitar las corrientes violentas de aire y los cambios bruscos de temperatura, pueden crear condiciones favorables de recuperación. Puede ser también una buena práctica para la mas rápida recuperación de una parvada enferma, la suplementación del alimento con vitamina "A", que suministrada durante 4-5 días al doble de la cantidad recomendada por el N .R.C. de los E.U. para una dieta balanceada, determinó un efecto favorable en la recuperación del epitelio mucoso traqueal y bronquial, en pollitos que padecieron la infección pura con el virus de la BI (34).

Otra vitamina que se ha encontrado útil, es la vitamina C o ácido ascórbico, que administrada en el alimento en la proporción de 300-330 g por kg, fue capaz de proteger en grado significativo a pollos de engorda, de los efectos patológicos negativos, de la infección con BI (58).

En los brotes de BIA, debe evitarse la posibilidad de que la infección pura se complique con *M. gallisepticum*, *M. sinoviae* y *E. coli*, utilizando en su caso, antibióticos apropiados de amplio espectro, que ya existen en el mercado, para evitar o en su caso tratar, la enfermedad respiratoria crónica complicada, cuya presentación es muy frecuente en el estadio final de la infección, en el pollo de engorda con el VBIA.

IX. Inmunidad

Las aves recuperadas de la infección natural son resistentes al desafío intratraqueal con cepas homólogas, y requieren después de la exposición de por 10 menos tres semanas para alcanzar los mas altos niveles de anticuerpos. Los huevos de gallinas que padecieron la infección contienen anticuerpos

pasivos, que generalmente declinan hasta la cuarta semana de edad. Los anticuerpos en una parvada son muy útiles para proteger o reducir la severidad de la enfermedad, aunque no evitan necesariamente la infección por un virus de campo.

X. Prevención y control

La mejor medida preventiva, es mantener a las aves en un espacio estrictamente aislado. Aún así, la enfermedad puede presentarse en la parvada, y en estos casos, será la parte medica responsable la que decidirá si la inmunización de la parvada se hace o no indispensable, y las condiciones y requisitos bajo los cuales deberá efectuarse.

Las cepas de virus activo atenuado que contienen las vacunas comerciales contra la BI, han sido obtenidas por un número variable de pases sucesivos en serie en embrión de pollo, con lo que estas cepas han reducido su patogenicidad y su habilidad de propagarse en las aves de la parvada; pero como aún pueden hacerlo en alguna medida, en pollitas sin anticuerpos pasivos y en gallinas en su mas alta producción, pueden dar algún resultado indeseable.

1. Cepas de virus en vacunas comerciales

En la producción de vacunas contra BIA, se han utilizado las cepas Massachusetts 41, Connecticut, Holland, Arkansas, JMK y Florida. Las 3 últimas fueron autorizadas en los E.U .A. con la restricción de que podrían usarse, sólo a juicio de los veterinarios responsables de una zona avícola. No hay entre estas cepas, una con un espectro de inmunogenicidad, que proteja alas parvadas contra serotipos heterólogos en grado significativo. Así, en una experiencia de Hofstad en 1981, encontró que en un desafío de aves con cepas homólogas de campo, protegieron un 90-100%, mientras que el desafío con

6 aislamientos heterólogos, sólo protegió a un promedio de 38%, teniendo como criterio el aislamiento del virus de traqueas de animales desafiados 4-5 días después de la exposición (20). Considerando los resultados del estudio anterior, se puede concluir con las reservas de cada instancia, que la cepa que contiene una vacuna, no confiere una alta protección contra serotipos distintos del virus; sin embargo, la que logra conferir, es de todas maneras útiles para disminuir en grado variable la severidad de una infección de campo, producida por un serotipo heterólogo después de una vacunación.

Darbyshire en 1985, estudiando la protección de pollos vacunados contra la BI, encontró que la cepa D41 fue en general efectiva para la protección de las cepas de desafío que utilizó, 10 cual, hace de esta cepa, una buena semilla vacunal (16) de aparente buen espectro de protección que valdría la pena experimentar.

Por otra parte, existen vacunas bivalentes con virus de BI y de NC. Winterfield en 1968, encontró alguna interferencia entre estos virus, y una respuesta vacunal más tardada (40). Aunque este hecho debe experimentarse mas, si se puede, es mejor aplicar los antígenos por separado.

2. Vacunación

Hay zonas epizootiológicas en que el pollo de engorda necesita vacunación en los primeros días de edad, y aunque posean anticuerpos maternos en la yema, pueden ser vacunados con virus activo atenuado de la BI. En la práctica, como la mayor parte de los pollitos comerciales poseen ciertos niveles de anticuerpos pasivos, un procedimiento común consiste en vacunar a los 4-5 días de edad, para repetir nuevamente a la cuarta semana. Si se considera necesario lograr una óptima respuesta de inmunidad, se aconseja aplicar otra vacuna a la sexta semana de edad, en que los pollitos son inmu-

nológicamente más maduros. Las parvadas de pollitas de reemplazo deben vacunarse entre 8 y 16 semanas.

La técnica de vacunación debe seguir las recomendaciones del fabricante, y cuando la vacuna deba administrarse en el agua de bebida, deberá recordarse que el virus de BI no es muy resistente a los agentes físicos y químicos, y que la calidad del agua deberá ser apropiada para obtener los mejores resultados.

Referencias

1. **Albassam, M.A., R.W. Winterfield, and H.L. Thacker.:** Comparison of the nephropathogenicity of four strains of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 30: 468-476, 1986.
2. **Alexander, D.J., and N.J. Chette.:** Procedures for the haemagglutination and the haemagglutination-inhibition tests for avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 6: 9-17, 1977.
3. **Alexander, D.J., C.D. Bracewell, and R.E. Gough.:** Preliminary evaluation of the haemagglutination and haemagglutination-inhibition tests for avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 5: 125-134, 1976.
4. **Berry, D.J., J.G. Cruickshank, H.P. Chu, and R.J.H. Wells.:** The structure of infectious bronchitis virus. *Virology* 23: 403-407, 1964.
5. **Berry, D.M., and J.D. Almeida.:** The morphological and biological effects of various antisera on avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Viral.* 3: 97-102, 1968.
6. **Bingham, R.W., M.H. Madge, and D.A.J. Tyrrel.:** Haemagglutination by avian infectious bronchitis virus-a Coronavirus. *J. Gen. Viral.* 28: 381-390, 1975.
7. **Broadfoot, D.I., and W.H. Smith Jr.:** Effects of infectious bronchitis in laying hens on egg production percent unsetting eggs and hatchability. *Poult. Sci.* 653-654, 1954.

8. **Broadfoot, D.L., B.S. Pomeroy, and W.M. Smith Jr.:** Effects of infectious bronchitis in baby chicks. *Poult Sci.* 35: 757-762, 1956.
9. **Brown, W.E., S.C. Schmittle, and J.W., Foster.:** A tannic acid modified haemagglutination test for infectious bronchitis of chickens. *Avian Dis.* 6: 99-106, 1962.
10. **Coria, M.F., and J.K. Peterson.:** Adaptation and propagation of avian infectious bronchitis virus in embryonic turkey kidney cell cultures. *Avian Dis.* 15: 22-27, 1971.
11. **Coria, M.F., and A.E. Ritchie.:** Serial passage of 3 strains of avian infectious bronchitis virus in African green monkey kidney cells (VERO). *Avian Dis.* 17: 697-704, 1973.
12. **Cowen, B.S., R.F. Wideman Jr., M.O. Braune and R.L. Owen.:** An infectious bronchitis virus isolated from chickens experiencing a Urolithiasis outbreak. 1. In vitro characterization studies. *Avian Dis.* 31: 878-883, 1987.
13. **Crinion, R.A.P., and M.S. Hofstad.:** Abnormalities in laying chickens following exposure to infectious bronchitis virus at one day old. *Avian Dis.* 15: 32-48, 1971.
14. **Cuming, R.B.:** Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. *Aust. Vet. J.* 39: 147-147, 1963.
15. **Cunningham, C.H.:** Infectious bronchitis. *Adv. Vet. Sci. Camp. Med.* 14: 105-148, 1970.
16. **Darbyshire, J.H.:** Assessment of cross-immunity in chickens to strains of avian infectious bronchitis virus using tracheal organ cultures. *Avian Pathol.* 9: 179-184, 1980.
17. **Dutta, S.K.:** Morphological changes of chicken tracheas and tracheal organ cultures infected with avian infectious bronchitis virus studied in scanning electron microscope. *Avian Dis.* 19: 429-436, 1975.
18. **EI-Houadfi Md., R.C. Jones, Jane K.A.Cook; and A.G. Ambali.:** The isolation and characterization of six avian infectious bronchitis viruses isolated in Morocco. *Avian Pathol.* 15: 93-105, 1986.
19. **Garside, J.S.:** The histopathological diagnosis of avian respiratory infections. *Vet. Rec.* 77: 354-366, 1965.

20. **Hofstad, M.S.:** Avian infectious bronchitis. In: *Diseases of Poultry*. Chap. 17, 8th ed. 2th print. M.S. Hofstad, H.J. Barnes, B.W. Calnek, W.M. Reid, and H.W. Yodre, Jr., (eds). The Iowa State University Press. Ames, Iowa, p.p. 429-443, 1988.
21. **Jonhson, R.B., J.A. Newman, and F.K. Wills.:** Titration of infectious bronchitis virus in tracheas of susceptible and immune chickens. *Avian Dis.* 13: 632-635, 1969.
22. **Johnson, R.B., and W.W. Marquardt.:** The neutralizing characteristics of strain of infectious bronchitis virus as measured by the constant virus variable serum method in chicken tracheal cultures. *Avian Dis.* 19: 82-90, 1975.
23. **Julian, R.J., and N.G. Willis.:** The nephrosis nephritis syndrome in chickens caused by a Holte strain of infectious bronchitis virus. *Can. Vet. 10:* 18-19, 1969.
24. **Kawamura, H., S. Isogai, and H. Tsubahara.:** Propagation of infectious bronchitis virus in chicken kidney tissue culture. *Natl. Inst. Anim. Health Q (Tokyo)* 1: 190-198, 1969.
25. **King, Daniel J.:** Observations on the preparation and stability of infectious bronchitis virus haemagglutination antigen from virus propagated in chicken embryos and chicken kidney cell cultures. *Avian Dis.* 28: 504-513, 1984.
26. **King, D.J. and Cavanaugh, D.:** Infectious bronchitis. In: *Diseases of Poultry*. Chap. 17. Calnek, B.W. *etal.* eds. The Iowa State University Press. Ames, Iowa. 9th ed. pp. 471-485, 1991.
27. **Lashgari, M.S., and J.A. Newman.:** Preparing haemagglutinating antigen from isolates of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 26: 508-519, 1982.
28. **Machado, A.V.:** The effect of infectious bronchitis and NDV on the blood cells of the chicken. *Thesis*, Cornell Univ., Ithaca, N.Y., 1951.
29. **McDonald, J.W., and D.A. McMartin.:** Histopathology of infectious bronchitis. A diagnostic problem. *Vet. Rec.* 87: 729-730, 1970.
30. **McDougall, J.S.:** Infectious bronchitis in laying fowls- its effects upon egg production and subsequent egg quality. *Vet. Res.* 83: 84-86, 1968.

31. **Mockett, A.P.A., and J.H. Darbyshire.:** Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 10: 1-10, 1981.
32. **Moreno-Chan, R.:** Presencia del virus *Tarpeia pulli* de la bronquitis infecciosa en las aves de México. *Ciencia Veterinaria.* 5: 143-149, 1991.
33. **Moreno-Chan, R.:** Presencia del virus *Tarpeia pulli* de la bronquitis infecciosa en las aves de México. (Doc. 135). En: *Memorias IV Congreso Panamericano de Medicina Veterinaria y Zootecnia.* Unidad de Congresos del Centro Medico Nacional del IMSS. México, D. F. Nov. 1962.
34. **Moreno-Chan, R.:** Efectos de diferentes niveles de vitamina "A" en la patología de la bronquitis infecciosa de las aves. *Memorias del IV Congreso Panamericano de Medicina Veterinaria y Zootecnia.* Sección IV de Ciencias Aviarias. Unidad de Congresos del Centro Medico Nacional. IMSS., México, D.F., Vol. IV pp. 1-14, Nov. 11-17, 1962.
35. **Prince, R.P., L.M. Potter, R.E. Luginhbul, and T. Choamiak.:** Effect of ventilation rate on the performance of chicks inoculated with IBV. *Poult Sci.* 41: 268-272, 1962.
36. **Purchase, H.G., and Wu Ching.:** Molecular genetic techniques in diagnostic avian medicine. *Proceeding of the 40th Western Poultry Disease Conference and 16~ Convención Nacional de ANECA de México, A.C.* Acapulco, Guerrero, México. pp. 221226, Abril 24-27, 1991.
37. **Quiroz, CA., and R.P. Hanson.:** Physical-chemical treatment of inocula. as a means of separating and identifying avian viruses. *Avian Dis.* 2: 94-98, 1958.
38. **Sevoian, M., and P.P. Levine.:** Effects of infectious bronchitis on the reproductive tracts, egg production and egg quality of laying chickens. *Avian Dis.* 1: 136-164, 1957.
39. **Schalk,A.F., and M.C. Hawn.:** An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 78: 413-422, 1931.
40. **Winterfield, R.W.:** Respiratory signs, immunity response and interference from vaccination with monovalent and

multivalent infectious bronchitis vaccines. *Avian Dis.* 12: 577-584, 1968.

41. **Winterfield, R.W., and S.B. Hitchner.:** Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am. J. Vet. Res.* 23: 1273-1279, 1962.
42. **Purchase, H.G.:** Future applications of biotechnology in poultry. *Avian Dis.* 30(1): 47-59, 1986.
43. **Purchase, H.G.:** Practical applications of nucleic acid techniques to avian disease. *Avian Dis.* 33: 609-614, 1989.
44. **Heras, H.:** *In situ* hybridization of nucleic acids: technology and future perspectives. *Proceedings of the 40th Western Poultry Disease Conference.* Acapulco, Guerrero, Mexico, pp. 221-226, Abril 24-27, 1991.
45. **Jackwood, D.J.:** Contributions of molecular biology to the diagnosis of avian diseases: An overview. *Improved diagnosis of avian diseases using molecular biology.* 129th American Veterinary Medical Association meeting, Boston, MA, pp. 1, August 2, 1992.
46. **Jackwood, M.W., H.M. Know, and D.A. Hilt.:** Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the Polymerase Chain Reaction and a DNA probe. *Avian Dis.* 36: 403-409, 1992.
47. **Jackwood, M.W.:** Diagnosis of infectious bronchitis virus using the polymerase chain reaction. *Symposium on improved diagnosis of avian diseases using molecular biology.* The Am. Assoc. Avian Pathol. 129th Am. Vet. Med. Ass. Meeting. Boston, MA, pp. 33-34, 1992.
48. **Kwon, H.M., M.W. Jackwood, T.P. Brown, and D.A. Hilt.:** Polymerase chain reaction and a biotin-labeled DNA probe for detection of Infectious Bronchitis virus in chickens. *Avian Dis.* 37: 149-156, 1993.
49. **Kwon, H.M., M. W. Jackwood, and J. Gelb, Jr.:** Differentiation of Infectious Bronchitis virus serotypes using Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Avian Dis.* 37: 194-202, 1993.
50. **Kwoh, D.Y. and T.J. Kwoh.:** Target amplification systems in

nucleic acid based diagnostic approaches. *Am. Biotech. Lab.* 8: 14-25, 1990.

51. **Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J., Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and B.A. Erlich.:** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491, 1988.
52. **Crewley, J.P., Morser, J., Avery, R.J. and Lomniczi, B.:** Oligonucleotide Fingerprinting of Ribonucleic acids of Infectious Bronchitis virus strains. *Infection and immunity.* 32 (3): 1227-1233, 1981.
53. **Alwine, J.C., Kemp, D.J. and G.R. Stark.:** Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzoyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5350-5354, 1977.
54. **Silva, R.F.:** Introduction to nucleic acid probes and hybridization techniques. *Symposium on improved diagnosis of avian diseases using molecular biology.* The Am. Assoc. Avian Pathol. 129th Am. Vet. Med. Ass. Meeting. Boston, MA, pp. 2-5, 1992.
55. **Syed, Naqi, and Kemal, Karaca.:** Applications of monoclonal antibodies in the diagnosis of infectious bronchitis of chickens. *Proc. of the 40th Western Poultry Disease Conference.* Acapulco, Guerrero, México, abril 24-27, pp. 193, 1991.
56. **Tweed, G.P., J. Whitney and P.L. Bloch.:** Temperature cycler evaluation: What do you need to know? *Biotechniques.* 10: 526-531, 1991.
57. **Spadaro, J.O., B. Rayne, Y. Lee, and J. Rosentraus.:** Single copies of HIV proviral DNA detected by fluorescent *in situ* hybridization. *Biotech.* 9: 186-195, 1990.
58. **Davelaar, F.G., and Van Den Bos.:** Ascorbic acid and bronchitis infections in broilers. *Avian Pathology.* 21: 581-589, 1992.

El autor agradece a la MVZ. Liliana M. Valdés Vázquez, la eficiente transcripción y captura del presente trabajo.