

Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria

Diagnóstico histopatológico de la laringotraqueítis infecciosa en aves:
estudio retrospectivo de casos 1999-2004

Modalidad: Proyecto de Graduación

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado académico de
Licenciatura en Medicina Veterinaria

Hellen Segura Chanto

Campus Presbítero Benjamín Núñez

2007

TRIBUNAL EXAMINADOR

Decano

Dr. Alexis Berrocal
Tutor

Dr. Carlos Jiménez Sánchez

Dra. Caterina Guzmán

DEDICATORIA

A quien siempre estuvo conmigo y me dio fuerzas y valor para seguir adelante por encima de los obstáculos: gracias Dios, por hacer realidad el sueño de mi vida.

A mi papá, porque me enseñó a ser una persona honesta, responsable, y con su ejemplo, me demostró que hay que trabajar duro y luchar sin descansar para alcanzar lo que se desea.

A mi mamá, porque ha sido mi refugio, por ayudarme, apoyarme en todo momento y enseñarme a hacer las cosas con amor.

A mi hermano Jose Antonio, porque desde que nació, todos los días me enseña, que no hay nada imposible.

A ellos, que son lo mas importante en mi vida, les dedico esta tesis con todo mi corazón. Gracias a ustedes: lo logré.

AGRADECIMIENTOS

En especial, le agradezco a Minor Cordero, porque siempre estuvo conmigo en todo momento, por su apoyo, sus palabras, y sobre todo su comprensión durante todos estos años.

A Laura Alvarado, por ser una amiga tan especial, por sus oraciones, por ayudarme a ver siempre las cosas de una forma positiva y tenderme su mano en los malos momentos.

Al Dr. Alexis Berrocal por su paciencia, su tiempo y sus consejos, pero sobre todo: gracias Doctor, por creer en mi.

A Jorge Hernández y Jorge Prendas, por su amistad, por transmitirme un poco de sus conocimientos y ayudarme siempre que los necesité. Su amistad es muy valiosa para mi.

Al Dr. Arturo Altamirano: una gran persona, un excelente doctor. Gracias por abrirme las puertas de su clínica. Siempre le agradeceré su confianza y apoyo.

A Ricardo Alfaro, José Montoya y Danilo Fernández, porque mas que compañeros, son grandes amigos. Gracias por estar a mi lado en las buenas y en las malas durante todos estos años. Los quiero mucho.

A la Dra. Caterina Guzmán y al Dr. Carlos Jiménez, porque me guiaron en la realización de este trabajo.

RESUMEN

En este estudio fueron examinados 202 tractos respiratorios de aves obtenidos como parte del trabajo de diagnóstico rutinario del laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional desde el año 1999 hasta el 2004.

Comprendió en su totalidad todos los casos en los que las muestras recibidas eran secciones del sistema respiratorio. En éstas, se realizó el estudio histopatológico con el fin de hallar lesiones compatibles con el virus de la Laringotraqueítis Infecciosa Aviar (LTI).

Este trabajo además, incluye un análisis retrospectivo de las patologías del sistema respiratorio, que afectaron a las aves de Costa Rica durante el período 1999-2004, y que se determinaron mediante la histopatología y en algunos casos con el uso de técnicas adicionales.

Once muestras fueron enviadas a la Universidad de Urburn, Alabama para que se realizara la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el objetivo de comprobar la presencia del virus de LTI, dando como resultado un 100% de efectividad.

Como resultado de este análisis, se encontró, que la enfermedad está presente en el país desde el año 1999, 47 de los 202 casos respiratorios corresponde a LTI, además 62% fueron diagnósticos morfológicos, y 37% diagnósticos etiológicos.

ABSTRACT

In this investigation, 202 samples of respiratory system were examined obtained as part of the routine diagnoses procedures at the Pathology Laboratory of the Veterinary Medicine School (Universidad Nacional, Costa Rica) from 1999 to 2004.

Histopathological studies of different sections of respiratory tissues were done searching for lesions consistent with avian infectious laryngotracheitis (LTI).

This investigation also includes a retrospective analysis of the respiratory system pathologies, affecting Costa Rican birds during the years 1999 to 2004 and that were determined by histopathology and in some cases by the use of additional techniques.

Eleven of these samples, was send to the University of Urburn, Alabama, and a polimerase chain reaction (PCR) was performed, with the objective to determined the existence of the virus. From these tests, 100% of the samples was positive.

As a result of this analysis, it was found, that this illness is in the country since 1999, 23% of the total respiratory cases are related to LTI, 62% was morphological diagnosis, and 37% etiological diagnosis

INDICE DE ABREVIATURAS

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA:	Inmunoensayo asociado a enzimas
EMV	Escuela de Medicina Veterinaria
LTI:	Laringotraqueitis infecciosa aviar
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
UNA:	Universidad Nacional

INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Justificación.....	3
1.2.1. Importancia.....	3
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1. Objetivo general.....	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
2. MARCO TEORICO.....	6
2.1. Laringotraqueítis Infecciosa Aviar.....	6
2.2. Etiología.....	6
2.3. Morfología.....	6
2.4. Signos Clínicos	6
2.5. Patogénesis.....	7
2.7. Transmisión.....	7
2.8. Diagnóstico.....	8
2.9. Diagnóstico Laboratorial.....	8
3. METODOLOGÍA.....	9
3.1. Población: tamaño, origen y selección de la muestra.....	9
3.2. Procesamiento, análisis e interpretación de la muestra.....	9
3.2.1. Análisis histopatológico	9
3.2.2. Técnica de PCR.....	10

3.2.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	11
4. RESULTADOS.....	12
5. DISCUSIÓN.....	18
6. CONCLUSIONES.....	21
7. RECOMENDACIONES.....	22
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
9. ANEXOS.....	24

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1..** Porcentaje de diagnósticos morfológicos reportados desde el año 1999 al 2004 por el servicio de Patología de la UNA..... 12
- Figura 2.** Porcentaje de diagnósticos etiológicos de enfermedad respiratoria reportados desde el año 1999 al 2002 por el servicio de Patología de la UNA..... 13

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Distribución de los casos positivos a LTI según raza, fecha de envío y procedencia de las muestras enviadas al laboratorio.	15
Cuadro 2.	Porcentaje de casos según el diagnóstico etiológico reportado en las 202 muestras de tractos respiratorios de aves.	29
Cuadro 3.	Porcentaje de casos según el diagnóstico morfológico reportado en las 202 muestras de tractos respiratorios de aves.	30
Cuadro 4.	Signos clínicos reportados en los casos enviados al laboratorio de Histopatología por año	31

INTRODUCCION

1.1 Antecedentes

Muchos patógenos, incluyendo virus (influenza, adenovirus, reovirus), bacterias (*Pasteurella multocida*, *Haemophilus paragallinarum*, *Escherichia coli*), hongos (*Aspergillus fumigatus*) y parásitos (*Syngamus trachea*), están involucrados en las enfermedades respiratorias de las aves, y éstos pueden ser factores causales primarios o secundarios (Meulemans, 1993). Por esta razón es importante realizar un buen examen clínico y estudios de laboratorio para elaborar diagnósticos diferenciales, ya que la mayoría de estas enfermedades, tienen consecuencias económicas importantes y pueden acarrear, entre otras cosas, restricciones en el comercio sobre todo internacional, pérdidas por disminución en la producción de huevos y mortalidad como es el caso de la laringotraqueítis infecciosa aviar (LTI), (Hanson y Bagust, 1991).

La LTI es una enfermedad causada por un virus de la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae. El virus es identificado como un Gallid Herpesvirus 1 (Saif y Bagust, 2003). La nucleocápside tiene simetría icosaédrica y está compuesta de 162 capsómeros elongados. La partícula viral completa tiene un diámetro de 195-250nm (Saif y Bagust, 2003)

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1925, aunque no se descarta que haya existido anteriormente (Ridell, 1996; Tully, 1999). Posteriormente en 1935 se diagnosticó en el Reino Unido (Bagust et al.,2000) y ahora se ha registrado a lo largo del mundo. El término laringotraqueítis fue usado por primera vez en 1930, y el nombre Laringotraqueítis infecciosa fue aceptado en 1931 por el Comité Especial de Enfermedades de la Aves de la Asociación Americana de Médicos Veterinarios (Hanson y Bagust, 1991).

La LTI es una enfermedad de presentación aguda, de rápida diseminación (Wieliczko et al, 2004; Charlton et al., 1996), los signos clínicos usualmente aparecen entre los 6 y 12 días después de la exposición al agente. Las características de una infección aguda son descarga nasal, tos y dificultad respiratoria (Bagust et al.,2000). En la forma mas severa de la enfermedad hay disnea marcada y expectoración de exudado sanguinolento. Otros signos que se deben tomar en cuenta son la disminución en la producción de

huevos, lagrimeo, conjuntivitis, descarga nasal persistente y conjuntivitis hemorrágica (Hanson y Bagust, 1991). El curso de la enfermedad varía según la severidad de las lesiones (Bagust et al, 2000).

La morbilidad es muy alta (50-70%), pero la mortalidad se encuentra entre un 10-20% (Charlton et al., 1996). Tanto la morbilidad, como la mortalidad aumentan más en la presentación peraguda de la enfermedad (Samour, 2000). Los pollos de todas las edades son susceptibles, sin embargo, la enfermedad es más común entre los 4 y 18 meses (Samour, 2000).

Histopatológicamente se diagnostica examinando la tráquea, párpados y tejidos pulmonares, en busca de lesiones compatibles con LTI, como son la formación sincitial de células con cuerpos de inclusión intranucleares (Humberd et al., 2002). Los cambios microscópicos varían según el estado de la enfermedad (Russell, 1983).

La microscopía electrónica indica, que el primer cambio celular ocurre en el núcleo de la célula durante la formación de la cápside viral, seguido por la migración del virus a través de la membrana nuclear hacia el citoplasma (Godwin et al., 1991). Conforme los cambios celulares progresan, las células aumentan de tamaño, pierden los cilios y se vuelven edematosas. Los linfocitos, histiocitos y células plasmáticas migran hacia la mucosa y submucosa después de 2-3 días y posteriormente la destrucción celular, causa separación de la mucosa y submucosa y se produce la hemorragia (Hanson y Bagust, 1991). Así como la infección avanza, la infiltración celular y la degeneración de la mucosa se dan con mayor severidad, afectando en mayor grado la tráquea y la laringe (Villareal et al., 2004).

Los cuerpos de inclusión intranucleares se pueden observar en las células epiteliales doce horas después de adquirida la infección (Saif y Bagust, 2003).

No se ha identificado ninguna droga efectiva para el tratamiento de la LTI, o para reducir la severidad de las lesiones (Saif y Bagust, 2003). Si el diagnóstico se hace en forma temprana, vacunar a las aves afectadas puede inducir una protección adecuada antes de que las aves sean infectadas (Myung y Joon, 2002).

La aplicación de vacunas atenuadas ha sido un método satisfactorio para el desarrollo de resistencia a la enfermedad en poblaciones de aves susceptibles. Aun así, se

recomienda su uso, solamente en áreas geográficas en donde la enfermedad es endémica (Hilbink et al., 1980).

El diagnóstico no puede basarse solamente en la observación de los signos clínicos y las lesiones, debido a que la mayoría de ellos son similares a los de otras enfermedades de origen respiratorio, por lo tanto, el uso de la clínica, debe respaldarse con el uso de otras técnicas diagnósticas como lo son la histopatología, PCR (Scholz et al, 1994), inmunohistoquímica y detección de antígeno viral (ELISA), entre otros (Noda et al., 1990; Ide, 1977).

1.2. Justificación

1.2.1. Importancia

En Costa Rica la producción de pollos representa una de las principales actividades del sector pecuario. Su importancia se explica por un lado, por el destacado lugar que ocupan las carnes blancas en la dieta de los costarricenses, por otro, al constante avance en las áreas de genética, nutrición y manejo, que implementan las empresas privadas y que se traduce en un muy buen nivel tecnológico de las granjas (Rupley,1997) y por último, a la aplicación de medidas de bioseguridad e inmunoprofilaxis, que garantizan un producto de excelente calidad (Esquivel, 2007).

El significado económico de la LTI no ha sido bien determinado (Bagust et al., 2000), aún así, la industria avícola de los Estados Unidos, por ejemplo, ha tenido pérdidas multimillonarias cada año como consecuencia de la mortalidad y la disminución en la producción de huevos; pérdidas similares ocurren en industrias avícolas de muchos otros lugares como Europa y Australia (Saif y Bagust, 2003). Actualmente, la LTI, es uno de los diagnósticos diferenciales tomados en cuenta para descartar el virus de influenza aviar (Saif y Bagust, 2003), que tanta importancia ha cobrado en los últimos días.

La importancia de realizar este tipo de estudio es, que a pesar de que en Costa Rica la LTI es considerada como una enfermedad exótica, no significa que no exista probabilidad de que ocurra en las granjas avícolas de nuestro país. Además, en el año 1999 se diagnosticaron por primera vez dos casos de LTI, mediante el estudio histopatológico

realizado por el Dr. Berrocal en el Laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria (E.M.V.) de la Universidad Nacional (U.N.A.), y éstos fueron confirmados por el Dr. Hoerr, Patólogo Aviar de la Universidad de Auburn, Alabama, Estados Unidos mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Humberd et al., 2002). Debido a ello, es posible que el país deba complementar la vigilancia epidemiológica con medidas protectoras, identificar factores de riesgo directos de introducción de la infección con el agente de la LTI y establecer normas dirigidas a su prevención, diagnóstico y control (Ritchie et al., 1994; Villegas, 1998).

Los eventos de vigilancia de la LTI están basados en la confirmación del diagnóstico clínico, verificando las alteraciones histopatológicas definidas claramente en el sistema respiratorio (Rupley, 1997), tomando en cuenta que puede haber aves que no muestren las lesiones características pero que estén infectadas (Olsen y Orosz, 2000), por lo que es importante el uso de la clínica y el respaldo de la histopatología tanto diagnóstica como comparativa en todos los casos, además de la PCR u otras técnicas como la inmunohistoquímica (Timurkaan et al., 2003).

La PCR para LTI se desarrolló para la detección de ácido desoxirribonucleico (ADN) viral con el fin de aumentar la sensibilidad de la detección del virus de LTI (Abbas y Andreasen, 1996). La reacción resulta ser específica para la detección de ADN del virus sin amplificar el de otros patógenos aviares. Es por esto, que actualmente es la técnica de primera elección a la hora de la confirmación diagnóstica (Humberd et al., 2002).

El estudio se inició tomando como base el año 1999, ya que fue la fecha en que se diagnosticó la enfermedad por primera vez en el Laboratorio de Histopatología de la U.N.A. y finaliza con la información obtenida de los archivos hasta el año 2004.

El estudio macro y microscópico de las muestras tiene como propósito establecer las diferencias o cambios patológicos asociados a la LTI (Randall y Reece, 1996), con respecto a la estructura normal del sistema respiratorio y conjuntiva ocular (Ridell, 1996).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. General:

Analizar retrospectivamente los casos sospechosos de LTI en aves, cuyas muestras fueron recibidas y protocolizadas para diagnóstico histopatológico desde el año 1999 al 2004 en el Laboratorio de Histopatología de la E.M.V. de la U.N.A.

1.3.2. Específicos:

1. Determinar cuáles son las lesiones histopatológicas más frecuentemente encontradas en el sistema respiratorio y conjuntiva ocular de las aves (Alexander y Nagy,1997), en los casos de LTI (diagnosticados desde el año 1999 al 2004 en el Laboratorio de Patología de la E.M.V. de la U.N.A.).
2. Realizar PCR en todas las muestras diagnosticadas positivas o negativas histopatológicamente al virus de LTI.
3. Comparar los resultados positivos a LTI utilizando PCR e histopatología determinando la necesidad de la PCR como diagnóstico confirmatorio.

2. Marco Teórico

2.1. Laringotraqueitis Infecciosa Aviar:

La LTI es una enfermedad viral del tracto respiratorio, que afecta a las aves y que puede afectar severamente la producción debido a la mortalidad y a la disminución en la postura (Villegas, 1998).

Las formas epizooticas mas severas de infección, están caracterizadas por signos de depresión respiratoria, tos, expectoración de exudado sanguinolento y alta mortalidad. Formas enzoóticas se caracterizan por presentar traqueítis mucoide, sinusitis, conjuntivitis y baja mortalidad (Saif y Bagust, 2003).

2.2 Etiología

2.2.1 Clasificación

El virus de laringotraqueitis está clasificado en la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae. El virus es taxonómicamente identificado como un Gallid herpesvirus 1 (Olsen y Orosz, 2000).

2.3 Morfología

Utilizando la microscopía electrónica, con células embrionarias de aves infectadas, se puede observar la presencia de una partícula viral similar en morfología al herpesvirus (Ziemann et al., 1998).

Se describe una nucleocápside icosaédrica de 80-100nm de diámetro, compuesta por 162 capsómeros elongados.

La partícula viral completa tiene un diámetro de 195-250nm (Saif y Bagust, 2003).

2.4 Signos Clínicos

La LTI causa una enfermedad respiratoria aguda en las aves. Los signos clínicos característicos incluyen descarga nasal, seguida de tos y lagrimeo (Nishibe y Inoue, 1974). La disnea marcada y expectoración de muco sanguinolento está presente en las formas epizooticas severas de la enfermedad (Williams et al., 1992).

Las formas epizooticas severas, se describieron comúnmente en años anteriores, aun así, recientemente formas enzoóticas medias han sido más comúnmente observadas en la industria intensiva en áreas como: Europa, Australia, Nueva Zelanda y los Estados Unidos (Hanson y Bagust, 1991).

Los signos clínicos asociados con formas enzoóticas incluyen: disminución en la producción de huevos, lagrimeo, conjuntivitis, inflamación de los senos infraorbitales, descarga nasal persistente y conjuntivitis hemorrágica (Jones, 2001).

El curso de la infección varía con la severidad de las lesiones. Generalmente la mayoría de las aves se recuperan a los 10-14 días, pero en casos extremos tardan de 1 a 4 semanas (Rupley, 1997).

2.5 Patogénesis:

La LTI resulta en una replicación viral en el epitelio de la laringe y la tráquea, y potencialmente en otras mucosas como la conjuntiva, senos respiratorios, sacos aéreos y pulmones (Meulemans, 1993). Las partículas virales son altamente citolíticas en estos tejidos, particularmente en la tráquea, produciendo un daño severo del epitelio y hemorragias (Olsen y Orosz, 2000).

Utilizando la microscopía electrónica se puede señalar que el núcleo de las células mucosales es quien se ve inicialmente afectado, posteriormente el virus migra hacia el citoplasma a través de la membrana celular (Saif y Bagust, 2003). En este momento los cambios celulares progresan (Ridell, 1996), las células pierden los cilios y se produce edema (Randall y Reece, 1996) y migración de las células inflamatorias hacia la mucosa y submucosa. (Saif y Bagust, 2003). Doce horas post infección (PI), se pueden observar los cuerpos de inclusión (Hanson y Bagust, 1991).

2.6 Transmisión:

Usualmente las rutas o puertas de entrada que utiliza el virus son la ocular o por tracto respiratorio alto.

La transmisión ocurre en mayor grado cuando hay contacto entre aves infectadas en una forma aguda con aves clínicamente recuperadas. La transmisión mecánica puede ocurrir por el uso de equipo contaminado y las camas (Hanson y Bagust, 1991).

En el caso de los huevos, la transmisión del virus contenido interna o externamente no ha sido comprobado o demostrado (Saif y Bagust, 2003).

2.7 Diagnóstico:

Aunque algunos signos agudos de la enfermedad son característicos (Olsen y Orosz, 2000), muchos de ellos son similares a la mayoría de las enfermedades respiratorias en aves (Jones, 2001).

La enfermedad aguda con la tos característica, expectoración de sangre y alta mortalidad, puede ser identificada como LTI (Ritchie et al., 1994). De todas formas la confirmación laboratorial se recomienda antes de realizar cualquier método o procedimiento de control (Scholz et al., 1994).

2.8 Diagnóstico Laboratorial:

La demostración de cuerpos de inclusión intranucleares en tejidos como tráquea y conjuntiva, es una forma diagnóstica realizada mediante la histopatología (Sellers et al., 2004).

Una identificación rápida del virus utilizando tejido de la tráquea puede realizarse con el uso de anticuerpos fluorescentes, y esto se puede hacer desde el día 2 al día 14 post-infección (Saif y Bagust, 2003).

Otra forma diagnóstica es la microscopía electrónica donde se da el reconocimiento de las partículas del herpesvirus (Hanson y Bagust, 1991).

Recientemente el uso del procedimiento ELISA, utilizando anticuerpos monoclonales se está aplicando con mayor frecuencia utilizando muestras de sueros, y posee la ventaja de ser rápida y adaptable a sistemas de computación que facilitan la interpretación de los resultados (Snyder et al., 1988; y Jacwood et al., 2003).

La Identificación del agente por medio de la detección del genoma viral en tejidos de animales infectados mediante amplificación enzimática (PCR) convencional y en tiempo real, ha demostrado ser la forma mas específica para el reconocimiento del virus (Williams et al., 1992).

3. METODOLOGÍA

3.1 Población: tamaño, origen y selección de los casos.

Las muestras están constituidas por tractos respiratorios de aves recibidas en el Laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria (EMV), de la Universidad Nacional (UNA), desde el año 1999 al 2004.

El total de muestras recibidas (202) corresponde a todos los casos de aves que manifestaron signos de problemas respiratorios además de muestras de tracto respiratorio que se enviaron para su estudio de diagnóstico rutinario y que fueron diagnosticadas positivas o negativas a la enfermedad en los 6 años que comprende este estudio.

La cifra se complementó con 10 muestras que se procesaron en fresco para ser utilizadas para analizar y caracterizar la histología normal.

De las 202 muestras evaluadas, se recopiló información pertinente, tal como la edad, el sexo y la raza de los animales, la fecha de la recolección y la sintomatología presentada.

Todos los casos (muestras), se encuentran almacenados en parafina, y también procesados y montados sobre uno o varios portaobjetos (Ridell, 1996), debidamente identificados con el número de registro que se les asignó al momento de ser recibidas en el laboratorio.

3.2. Procesamiento, análisis e interpretación de la muestra.

3.2.1. Análisis histopatológico

Para el estudio microscópico de los casos, se realizó un abordaje histopatológico, en el que se utilizaron tractos respiratorios, sobre todo la porción anterior de estos (puesto que aquí se encuentran las principales lesiones), y además se analizaron otras mucosas como la conjuntiva ocular y pulmones, las cuales también resultan histopatológicamente afectadas (Poulsen y Keller, 1997; y Randall, 1989).

El tejido debió permanecer almacenado en formalina al 10% por dos semanas. Se tiñeron con hematoxilina y eosina y fueron observadas en un microscopio óptico (OLYMPUS BH2/PM10AD).

Durante el análisis histopatológico se anotaron las lesiones que se consideraron importantes indicadores de inflamación, agentes etiológicos o cuerpos de inclusión intranucleares (Fuchs et al, 2007).

Los resultados de la evaluación microscópica fueron tabulados según los cambios observados con respecto a la histología normal del sistema respiratorio, y clasificados según el agente etiológico y el diagnóstico de enfermedad.

Si en la muestra no se detectaba algún cambio o alteración, se definía como negativa (-). Cuando se encontraron dentro de las evaluaciones histológicas hallazgos tales como edema o hemorragias, fueron anotadas, pero no clasificadas.

Las lesiones microscópicas más importantes fueron fotografiadas para su documentación con un microscopio óptico (OLYMPUS BH2/PM10AD).

3.2.2. Técnica de PCR para la detección de LTI en muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina.

Para este estudio se sometieron muestras de tráqueas, fijadas en formalina y embebidas en parafina, y correspondían a casos diagnosticados positivamente a LTI (Kemp et al., 1990) por medio de histopatología y confirmados por PCR en la Universidad de Auburn, Alabama, Estados Unidos.

Para realizar la PCR, se procedió a hacer la extracción del ADN según el método descrito por la Dra. Maricarmen García, del Centro de Investigación de Enfermedades de las Aves (P.D.R.C), de la Universidad de Georgia (U.G.A) (García, 2006).

Se utilizaron los imprimadores (Primers) de las siguientes secuencias del gen p32 de LTI: F 5' y R 5' descritos y modificados por Vöglin, Bruckner y Ottiger en 1999 (Vöglin et al., 1999):

Primer	Secuencia de los nucleótidos (5' a 3')	Gen	Posición en el genoma
ILTp32	CTACGTGCTGGGCTCTAATCC	p32	302
ILTp32	AAACTCTCGGGTGGCTACTGC	p32	890

Cada muestra fue tratada con 45 o 22 μ l de mezcla de PCR preparada de la siguiente forma y empleando la 2X PCR Master Mix de Fermentas número K 0179:

Componente	Volumen de 50 μ l	Volumen de 25 μ l
2X PCR Master Mix	25 μ l	12.5 μ l
Primer F	1 μ l	0.5 μ l
Primer R	1 μ l	0.5 μ l
Muestra de ADN	5 μ l	2.5 μ l
Agua	18 μ l	9 μ l

La amplificación se realizó en un termociclador bajo el siguiente programa:

95°	5 minutos	
95°	30 segundos	
55°	30 segundos	35 ciclos
72°	1 minuto	
72°	5 minutos	1 ciclo
4°	Hold	

3.2.3. Electroforesis en gel de agarosa

Para el análisis de los productos de PCR se prepararon geles de agarosa al 2% (0.6g en 30ml buffer TBE 1%), mas 1 μ l de Bromuro de Etidio (Et Br) y se colocó 10 μ l de muestra del producto de PCR y 3 μ l de tampón de muestra. La separación se realizó a 80v por 30 a 40 minutos. Las bandas del producto del gen p32 de LTI (Pang et al., 2002), se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con una cámara Polaroid

RESULTADOS

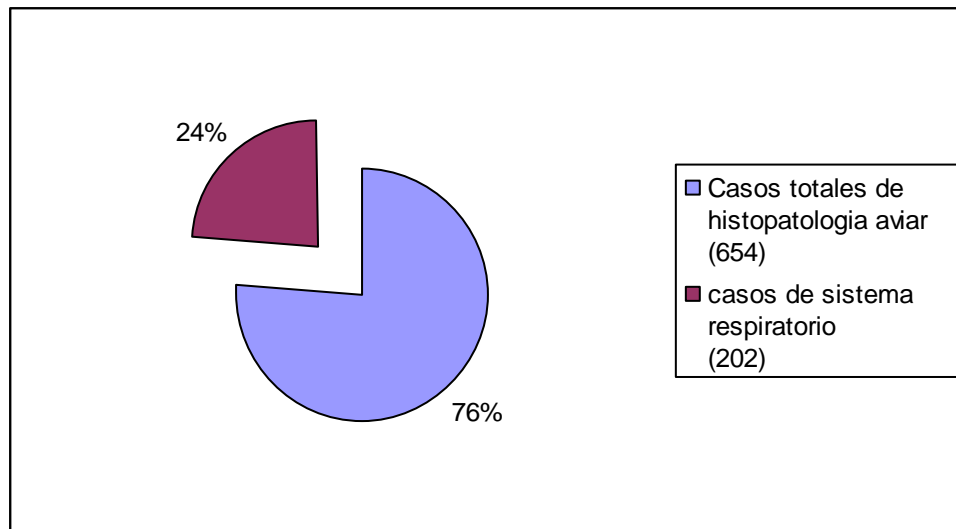
Datos anamnésticos

En el laboratorio de Histopatología, se recibieron en total 654 casos para histopatología de aves, de estos, 202 correspondían a casos de sistema respiratorio.

De los 202 casos de aves evaluadas, 127 correspondieron a casos clínicos que señalaban sintomatología de tipo respiratorio. Solo fue posible evaluar los síntomas en éstos casos, por ser los únicos en los que se detalló la historia y/o clínica exhibida. En los 75 restantes no se reportó la sintomatología respiratoria, o no se mencionaban los signos clínicos mostrados pero las muestras correspondían a tractos respiratorios.

De los 127 casos en que se reportaron síntomas, los trastornos mas frecuentes fueron principalmente la dificultad respiratoria y alta mortalidad. También se reportaron con menor frecuencia signos clínicos como disminución en la producción, pérdida de peso, lesiones en ojo, secreciones en tráquea y hemorragia nasal. En el 37% de los casos no se reportó nada en la hoja de recepción de muestra, o se anotaba sólo como muestra de control o estudio rutinario.

Figura 1. Distribución de los casos totales enviados al Laboratorio de Histopatología.



Hallazgos histopatológicos

Los hallazgos histopatológicos están divididos en dos grupos diferentes: el primer grupo está conformado por los casos en donde el diagnóstico es morfológico y en el segundo se agruparán los diagnósticos etiológicos.

Diagnósticos morfológicos:

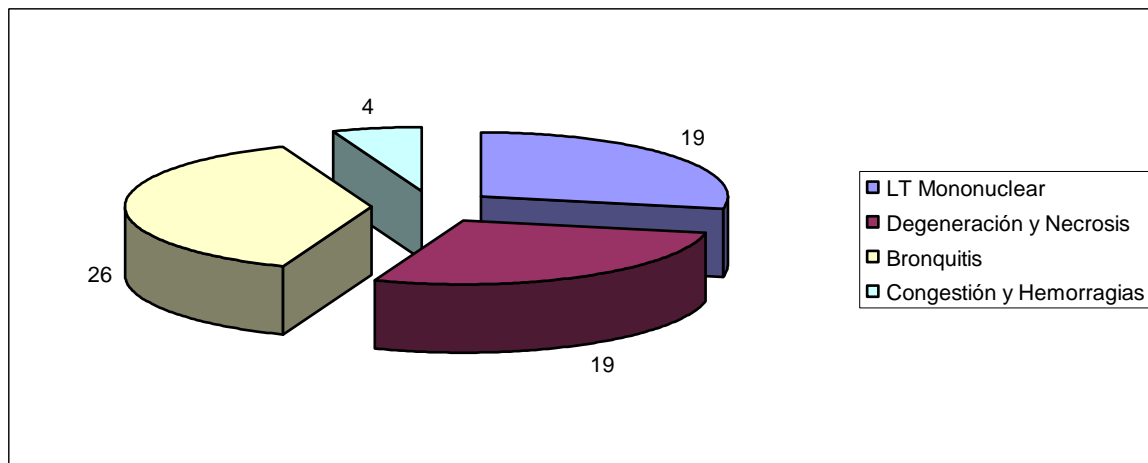
Del total de casos, 168 (83.2%), presentaban alteraciones asociadas a un proceso inflamatorio en el sistema respiratorio. La región mas severamente afectada con inflamación fue la tráquea.

En 19 casos (8.9 %) se observó una laringotraqueítis mononuclear, sin presencia de inclusiones virales.

Se identificaron 19 casos (8.9%) en los que la lesión histopatológica existente era la degeneración y necrosis de las células mucosales (Charlton et al., 1996) sin presencia de inclusiones virales; en estos casos se recomendó al remitente de las muestras tener en cuenta la LTI como diagnóstico diferencial de enfermedad respiratoria sobre todo en los casos en los que además se observaba un infiltrado mononuclear (linfo-histiocítico), donde era evidente la presencia de células inflamatorias de tipo agudo y crónico (Sellers et al., 2004).

Se encontraron 26 casos de bronquitis, 3 (1.48%) de tipo granulomatoso, 13 de tipo obliterante (6.43), y 10 casos de bronquitis crónica (4.95%).

En 4 casos, el único hallazgo fue congestión y hemorragias, sin presencia de un agente etiológico específico (Randall y Reece, 1996), por lo tanto, no se pudo atribuir a alguna patología en especial.



Diagnósticos etiológicos:

Entre todos los hallazgos histopatológicos, la lesión mas frecuente fue la presencia de inclusiones virales intranucleares (Ridell, 1996), que se presentaron en 47 (23.26%) de los 202 casos evaluados. Este porcentaje abarca todos los casos en que el hallazgo fue claramente identificado y localizado.

En 16 (7.9%) de los casos en los que se encontraron lesiones inflamatorias, éstos se atribuyeron a agentes bacterianos o micóticos (Villegas, 1998).

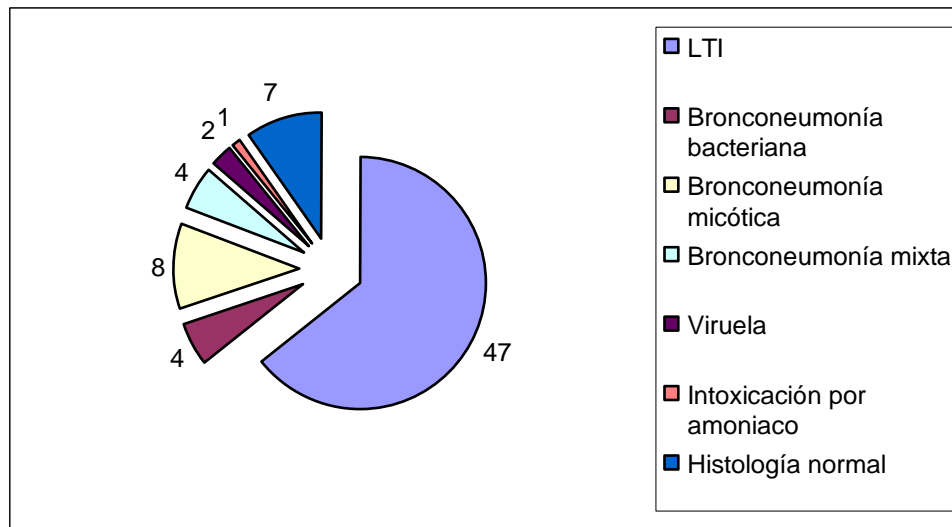
Dos casos (1%), presentaron lesiones histopatológicas que correspondían a Viruela Aviar (Wieliczko et al., 2004).

La bronconeumonía fue clara en 16 casos, 8 de ellos de origen micótico, 4 de origen bacteriano, y 4 que se describieron como bronconeumonía mixta (de origen micótico y bacteriano).

En un caso, la degeneración y necrosis se sugirió que podría atribuirse a una probable intoxicación con amoníaco.

Solamente 7 (3.46%) de los 202 casos, presentaban una histología normal, sin ninguna lesión histológica evidente (Rupley, 1997).

Figura 3. Diagnósticos etiológicos



Lesiones compatibles con LTI

Con el fin de detectar la presencia del virus de LTI, se procedió a la búsqueda de lesiones en la mucosa epitelial, básicamente inflamación y presencia de inclusiones virales intranucleares asociadas a la formación de células sincitiales (multinucleadas), éstas alteraciones se consideran el criterio histopatológico (Saif y Bagust, 2003) utilizado para el diagnóstico positivo de la LTI (Humberd et al., 2002).

Tomando en cuenta que los cambios microscópicos varían según el estado de la enfermedad (Tully, 1999), solamente en los casos en los que se encontraron las inclusiones virales, se pudo asegurar la presencia de LTI, debido a que estos se encuentran en las células epiteliales en los primeros días de infección (1-8 días), cuando la enfermedad inicia (Timurkaan et al., 2003), y desaparecen conforme la infección progresa, como resultado de la necrosis y la descamación de las células epiteliales (en estos casos, es que se sugiere tener en cuenta la LTI como diagnóstico diferencial) (Ridell, 1996).

En 47 (23.26%) casos, se pudo diagnosticar claramente la presencia de LTI, y corresponde a 7 casos diagnosticados en 1999, 1 caso en el año 2000, 1 caso en el 2001, 29 en el 2003 y 9 casos en el año 2004.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Del total de muestras evaluadas mediante histopatología, 11 fueron enviadas al Dr. Hoerr, patólogo aviar, de la Universidad de Auburn, Alabama, Estados Unidos, para confirmar el diagnóstico histopatológico por medio de PCR.

Se tomaron 2 casos del año 1999, y 9 del año 2003 (en estos años se diagnosticaron histopatológicamente el mayor número de casos de LTI).

El 100% de los casos enviados, fueron positivos a LTI por medio del método de PCR. Posteriormente, se tomaron 4 muestras de años diferentes, para realizar en el Laboratorio de Virología de la EMV de la UNA la PCR. De estas, 3 eran casos ya confirmados por PCR, que se utilizaron para verificar el funcionamiento de la técnica. Al mismo tiempo, se procesaron 2 muestras en fresco, que formaban parte del diagnóstico rutinario del Laboratorio de Virología.

Inicialmente, como las muestras se encuentran almacenadas en parafina, se procedió a desparafinarlas y realizar la extracción de ADN según el método descrito por la Dra. Maricarmen García, del Centro de Investigación de Enfermedades de la Aves (P.D.R.C.) de la Universidad de Georgia (U.G.A), y posteriormente, se aplicó la técnica de PCR a cada una de las muestras y se corrieron en un gel de agarosa al 2% (Helferich et al., 2007).

Los primeros resultados fueron negativos para cada una de las muestras procesadas, incluso para las que se conocían positivas al virus, por lo tanto, se procedió a repetir el procedimiento, con las mismas muestras pero incluyendo una muestra en fresco que ya había sido procesada en el Laboratorio de Virología, y había sido diagnosticada como positiva al virus, para tomarla como muestra control. En este caso, el resultado fue positivo a LTI, solamente para la muestra en fresco incluida, y para las otras, nuevamente fue negativo.

En ambos casos, la dificultad que siempre se presentó, fue lograr extraer de una forma completa la parafina, ya que en todos los casos, al empezar a realizar la extracción, se observaban restos de ella, por lo tanto, se decidió, procesar nuevamente las muestras, pero esta vez, duplicando los pasos para desparafinar (Garcia, 2006), y aumentando el numero de ciclos en el termociclador (10 ciclos adicionales), para asegurarnos mayor probabilidad de un cambio en los resultados, pero no fue así.

En el último caso, se trató de comprobar si al terminar el método de extracción, efectivamente se estaba logrando obtener el ADN, para esto, al finalizar la extracción, se corrieron los productos (Veits et al., 2003) en un gel de agarosa al 1%, y al observarlos en el transiluminador de luz ultravioleta, se comprobó que efectivamente, no se estaba logrando realizar la extracción de una forma correcta, muy probablemente, porque la parafina, estaba bloqueando las reacciones y el reactivo utilizado para desparafinar (CitriSolv), no lograba hacerlo de una forma completa. Por estas razones, se imposibilitó realizar el PCR a las otras muestras.

DISCUSIÓN

El monitoreo de la situación del virus de LTI, a nivel de las granjas, proporciona información que puede usarse para perfeccionar y adoptar los programas de control (Chung Chang, 1997) y prevención, con el fin de minimizar el impacto económico de la enfermedad (Esquivel, 2007).

Como consecuencia del surgimiento de la LTI, y al reconocerse a nivel mundial (Hughes et al., 1991) y nacional, se dió un auge en los estudios acerca de las enfermedades del sistema respiratorio de las aves y en el desarrollo de técnicas diagnósticas (Keller et al., 1991). Esto sumado a que actualmente, la LTI, es uno de los diagnósticos diferenciales tomados en cuenta para descartar el virus de influenza aviar que tanta importancia ha cobrado en los últimos días (Bagust et al., 1985), es por esta razón que se consideró importante la realización de este estudio.

Se evaluaron los signos clínicos reportados para cada caso, y de su análisis se pudo concluir que en el 62% de los casos, la sintomatología reportada fue específica (Samour, 2000), y en el 37% inespecífica o no reportada. Sin embargo, hay que tomar en cuenta, que la LTI puede iniciar su manifestación con una disminución en la producción de huevos o permanecer latente (Rupley, 1997).

Además, no es del todo adecuado basarse solamente en los síntomas para dar un diagnóstico (Meulemans, 1993), como se hace en regiones o países, en donde hay alta incidencia de la enfermedad, principalmente por la existencia comprobada de otro tipo de agentes etiológicos que resultan en la misma presentación clínica (Villareal et al., 2004). por lo que es poco prudente hacerlo de igual forma en Costa Rica.

Los métodos de diagnóstico utilizados en la actualidad y revisados en esta investigación para descartar la LTI son la histopatología, PCR y inmunoensayo con enzimas asociadas (ELISA), entre otros (Godwin et al., 1991).

Como resultado del análisis se puede señalar que: los cuerpos de inclusión intranucleares asociados a la formación de células sincitiales, fueron detectados en todos los casos en los que el diagnóstico histopatológico fue LTI. En efecto, dichas inclusiones siempre fueron la condición que debía obligatoriamente estar presente a la hora de afirmar el diagnóstico (Jones, 2001). Todas las lesiones correspondían con la literatura,

en donde se indican cambios celulares que van desde la pérdida de cilios, edema, presencia de linfocitos, histiocitos y células plasmáticas en la mucosa y submucosa, hasta la separación de estas últimas, hemorragia, infiltración celular mas marcada y cuerpos de inclusión intranucleares (Hanson y Bagust, 1991).

La localización de las lesiones en las 47 muestras diagnosticadas con LTI, se presentaron con mayor frecuencia en los pulmones, laringe y tráquea. Así mismo, en los 16 casos en los que se enviaron conjuntamente párpados para su evaluación, coincidió que en todos se presentaron úlceras, necrosis, hiperplasia de tejido linfoide y conjuntivitis, esto concuerda con Timurkaan et al, (2003), donde se indican las mismas características.

Es importante tomar en cuenta que las lesiones inflamatorias pueden ser causadas por otros agentes, estos incluyen por ejemplo, la forma diftérica del poxvirus aviar, la influenza aviar, bronquitis infecciosa viral, adenovirus y *Aspergillus spp* (Saif y Bagust, 2003).

En el caso de viruela, las lesiones macroscópicas en el ojo, se indican en la literatura, mas perioculares y también en la barbilla (Scholz et al., 1994). Histopatológicamente se observa una reacción inflamatoria y se pueden observar cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (conocidos como cuerpos de Bollinger), lo mismo se pudo constatar en los 2 casos de viruela estudiados (Scholz et al., 1994).

La presencia de 19 casos diagnosticados como laringotraqueítis mononuclear (Abbas y Andreasen, 1996), no descarta que alguno de estos pueda ser un caso de LTI, en donde no se observó la presencia de las inclusiones, sin embargo, la reacción inflamatoria celular, es similar en ambos casos (Randall y Reece, 1996), y la sugerencia de considerar la LTI como diagnóstico diferencial (Jackwood et al., 2003), fue hecha en la mayoría de los casos.

En algunos casos en que se reportaron aves con síntomas respiratorios, fue posible el hallazgo de enfermedades producidas por bacterias y hongos, como fue el caso de los diagnósticos de bronconeumonía bacteriana y micótica (Russell, 1983), lo que indica que en la mayoría de los casos la sintomatología es muy inespecífica con respecto al agente etiológico.

Las neoplasias en sistema respiratorio constituyen una posibilidad diagnóstica que debe ser descartada en el examen tanto macroscópico como histopatológico (Randall, 1989). Los tumores primarios de sistema respiratorio en aves son raros (Olsen y Orosz, 2000). Sin embargo, se identificaron 4 casos, estos correspondían a 2 linfosarcomas, 1 linfoma y 1 sarcoma.

Respecto al análisis de las regiones del sistema respiratorio más afectadas, en casos de LTI, se encontró que la que manifestó más severamente lesiones fue la tráquea: esto coincide con los hallazgos de Russell (1983), que indica que los cambios patológicos más severos ocurren en este segmento.

En Costa Rica, la LTI, no es considerada endémica en aves. En este estudio, el año 2003 presentó el mayor número de casos de LTI reportado desde 1999.

CONCLUSIONES

1. La histopatología de diferentes secciones del sistema respiratorio es una herramienta útil para el diagnóstico de la LTI, en aves que presentan sintomatología respiratoria evidente de la enfermedad.
2. La histopatología tiene la ventaja que permite la determinación de los diagnósticos diferenciales de la LTI y aporta conocimientos significativos al seguimiento activo de cuadros respiratorios de aves en el país.
3. Aun considerando lo anterior, la histopatología no es un método adecuado para animales con LTI en el período de latencia de enfermedad, ni cuando los cambios microscópicos son mínimos o están ausentes.
4. En situaciones como estas últimas, surge la necesidad de utilizar herramientas de diagnóstico precisas para que el sistema de vigilancia epidemiológica sea realmente efectiva
5. El presente trabajo resume la técnica de PCR como recurso diagnóstico para la LTI, sin embargo es solo el inicio, ya que para implementarla se debe desarrollar un poco mas la capacidad técnica para utilizarla con diferentes tipos de muestras como las que están embebidas en parafina.
6. Con las dos herramientas utilizadas (la histopatología y la PCR), es posible descartar la presencia de LTI en los tejidos examinados, aportando mejores bases técnicas a un diagnóstico de gran interés comercial .
7. Se pudo demostrar que la LTI sigue siendo una de las principales patologías por descartar en aves con síntomas respiratorios.
8. Se constataron las dificultades para atribuir, en algunas ocasiones, las lesiones histológicas a un agente específico. Esto porque la calidad de la muestra es inadecuada o por la dificultad de utilizar técnicas que permitan llegar a un diagnóstico etiológico específico.

RECOMENDACIONES

La LTI en el país, es un peligro potencial para la salud de las aves en las granjas, cuya presencia trae grandes consecuencias económicas principalmente. Por esta razón, se sugiere que el examen histopatológico debe ser complementado con alguna otra herramienta de detección de la infección, como la PCR. Esto debido a varios factores, tales como: la necesidad obligatoria de detectar los cuerpos de inclusión intranucleares para realizar el diagnóstico confirmatorio, las diferencias en la presentación clínica y de las lesiones histológicas de la LTI.

Se debe mejorar el sistema de recolección de datos para que, en lo sucesivo, se incluya una historia clínica detallada, con los signos y resultados de un examen clínico completo, que aporten mas información a estudios retrospectivos ulteriores.

Se recomienda realizar una vigilancia activa de las enfermedades del sistema respiratorio que abarquen incluso aves de pequeños productores o domésticas.

Para evitar que en el futuro, se presenten mas casos de LTI, es necesario investigar, con mayor profundidad, la epidemiología de esta enfermedad en las aves, de esta manera, se podrían aplicar medidas preventivas mas efectivas, que abarquen mayor número de animales muestreados.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas, F., & J. R. Andreasen. 1996. Comparison of diagnostic tests for infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.* 40: 290-295.
- Alexander, H., & E. Nagy. 1997. Polymerase chain reaction to detect infectious laryngotracheitis virus in conjunctival swabs from experimentally infected chickens. *Avian Dis.* 41: 646-653.
- Bagust, T. J., B. Calnek, & K. J. Fahey. 1985. Gallid-1 Herpesvirus infection in the chicken. 3. Reinvestigation of the patogénesis of infectious laryngotracheitis in acute and early post-acute respiratory disease. *Avian Dis.* 30: 179-190.
- Bagust, T.J., R.C. Jones, & J.S. Guy. 2000. Avian infectious laryngotracheitis [en línea]. *Rev. Sci. Tech.* 19:483. www.pubmed.gov (Consulta: 13 mar.2006).
- Charlton, B.R., A.J.Bermúdez, M.Boulianne, R.J.Eckroade, J.S.Jeffrey, L.J.Newman, J.E.Sander, & P.S.Wakenell. 1996. *Avian disease manual*. 4th.ed. Am. Assoc. Avian Pathol., U.S.
- Chun, P., Y. Ling, J. Hung, & H. Shieh. 1997. Rapid differentiation of vaccine strains and field isolates of infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment lenght polymorphism of PCR products. *J. Virol. Meth.* 66: 179-186.
- Esquivel, K. E. 2007. Estudio serológico y molecular de la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio (IBDV) en dos lotes de una progenie de reproductoras pesadas. Tesis de grado. Universidad Nacional, Costa Rica.
- Fuchs, W., J. Veits, D. Helferich, H. Granzow, J. Teifke, & T. Mettenleiter. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. 2007. *Vet. Research.* 38: 261-279.

- García, Maricarmen. 2006. Protocol specimen preparation for paraffin embedded tissues [en línea]. Mensaje para: Dr. Carlos Jiménez. (Consulta : 17 jul,2006). Comunicación personal.
- Goodwin, M., M. Smeltzer, J. Brown, R. Resurrección, & G. Dickson. 1991. Comparison of histopathology to the direct immunofluorescent antibody test for the diagnosis of infectious laryngotracheitis in chickens. *Avian Dis.* 35: 389-391.
- Hanson, L., & T.J.Bagust. 1991. Laryngotracheitis. pp. 485-492. B.W., Calnek, J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid, & H.W. Yoder (eds.). *Diseases of poultry*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Helferich, D., J. Veits, J. Teifke, T. Mettenleiter, & W. Fuchs. 2007. The UL 47 gene of avian infectious laryngotracheitis virus is not essential for in vitro replication but is relevant for virulence in chickens [en línea] *J. Gen. Virol.* 73: 2415-2420. www.pubmed.gov (Consulta: 14 mar, 2007).
- Hilbink, F., T. Smith, & H. Yadin. 1980. Drinking water vaccination against infectious laryngotracheitis. *Can. J. Comp. Med.* 45: 120-123.
- Hughes, C. S., R. M. Gaskell, J. M. Bradbury, F. T. Jordan, & R.C. Jones. 1991. Survey of field outbreaks of avian infectious laryngotracheitis in England and Wales. *Vet. Record.* 12: 258-260.
- Humberd, J., M. García, S. Riblet, R.S. Resurrección, & T.P. Brown. 2002. Detection of infectious laryngotracheitis virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested polymerase chain reaction [en línea]. *Avian. Dis.* 46:64. www.pubmed.gov (Consulta 13 mar.2006).
- Ide, P.R. 1977. Sensitivity and specificity of the fluorescent antibody technique for detection of infectious laryngotracheitis virus. *Can. J. Comp. Med.* 42: 54-62.

- Jackwood, M., D. Hilt, & S. Callison. 2003. Detection of infectious bronchitis virus by real time reverse transcriptase- polymerase chain reaction and identification of a quasispecies in the Beaudette strain. *Avian Dis.* 47: 718-724.
- Jones, R.C. 2001. Infectious Laryngotracheitis. pp. 230-235. *In* Jordan, F., M. Pattison, D. Alexander, & T. Faragher, (eds.). *Poultry diseases*. W.B. Saunders, London.
- Keller, C., D. Kingsley, & C. Burton. 1991. Identification of thymidine Kinase gene of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Dis.* 35: 920-929.
- Kemp, M., M. Sheppard, & K. Fahey. 1990. Detection of DNA from infectious laryngotracheitis virus by colorimetric analyses of polymerase chain reactions. *J. Virol. Methods.* 30: 251-259.
- Meulemans, G. 1993. Aetiology and diagnosis of respiratory disease in fowl. pp. 537-546. *In* Mc Ferran, J.B., & M.S., Mc Nulty, (eds.). *Virus infections of vertebrates*. Elsevier, Amsterdam.
- Myung, G., & K. Joon. 2002. Efficacy of live virus vaccines against infectious laryngotracheitis assessed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Avian Dis.* 47: 261-271.
- Nishibe, Y., & K. Inoue. 1974. Relationship between SMON virus and avian infectious laryngotracheitis virus. *Archives of Virol.* 45: 278-284.
- Noda, M., K. Miura, K. Yamanaka, & Y. Inaba. 1990. Hemagglutination with avian infectious laryngotracheitis virus [en línea]. *Archives of Virol.* 114: 137-142. www.springerlink.com (Consulta 13 mar, 2007).
- Olsen, G.H., & S.E., Orosz. 2000. *Manual of avian medicine*. 1st. ed. Mosby, U.S.

- Pang, Y., M. Wang, T. Girshick, Z. Xie, & K. M. 2002. Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents. *Avian Dis.* 46: 691-699.
- Poulsen, D.J., & C.L. Keller, 1997. Characterization of the assembly and processing of infectious laryngotracheitis virus glycoprotein B. *J. Gen. Virol.* 78: 2945-2951.
- Randall, C. 1989. Atlas en color de las enfermedades de las aves domésticas y de corral. Interamericana-Mc Graw Hill, Madrid.
- Randall, C., & R. Reece. 1996. Color atlas of avian histopathology. Mosby-Wolfe, London.
- Ridell, C. 1996. Avian histopathology. 2nd.ed. American Association of Avian Pathologists, Florida.
- Ritchie, B.W., G.J. Harrison, & L.R. Harrison. 1994. Avian Medicine: Principles and Application. 1st.ed. Wingers Publishing Inc., Florida.
- Rupley, A.E. 1997. Manual of Avian Practice. 1st.ed. W.B. Saunders, London.
- Russell, G. 1983. Respiratory tract lesions from infectious laryngotracheitis virus of low virulence. *Vet. Pathol.* 20: 360-369.
- Saif, Y.M., & T. Bagust. 2003. Laryngotracheitis. pp.121-130. *In* H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald, & D.E. Swayne. (eds). Diseases of poultry. 11th.ed. Iowa State Press, Iowa.
- Samour, J. 2000. Avian Medicine. 1st. ed. Mosby, London.

- Scholz, E., R. Porter, & P. Guo. 1994. Differential diagnosis of infectious laryngotracheitis from other avian respiratory diseases by a simplified PCR procedure. *J. Virol. Methods.* 50: 313-321.
- Sellers, H., M. Garcia, J. Glisson, T. Brown, J. Sander, & J. Guy. 2004. Mild infectious laryngotracheitis in broilers in the southeast. *Avian Dis.* 48: 430-436.
- Snyder, D. B., D. B. Lana, P. K. Savage, F. S. Yancey, S. A. Mengel, & W. W. Marquard. 1988. Differentiation of bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies. Evidence of major antigenic shift in recent field isolates. *Avian Dis.* 32: 535-539.
- Timurkaan, N., F. Yilmaz, H. Bulut, H. Ozer, & Y. Bolat. 2003. Pathological and Immunohistochemical findings in broilers inoculated with a low virulent strain of infectious laryngotracheitis virus. *J. Vet. Sci.* 4: 175-180.
- Tully, T.N. 1999. Dyspnea and other respiratory signs. pp.47-61. *In* F.A. Murphy, E.P. Gibbs, M. Horzineck, & M. Studdert (eds.). *Vet. Virol.* 3th.ed. Academic Press, San Diego.
- Veits, J., C. Thomas, & W. Fuchs. 2003. Five unique open reading frames of infectious laryngotracheitis virus are expressed during infection but are dispensable for virus replication in cell culture. *J. Gen. Virol.* 84: 1415-1425.
- Villareal, L., P. Brandao, J. Chacon, D. Junior, N. Ito, N. Gama, M. Ishizuka, A. Luchese, F. Buchala, C. Ferreira, & A. Ferreira. 2004. Detection and molecular characterization of infectious laryngotracheitis virus in laying hens in Brazil. *Rev. Bras. Cien. Av.* 6: 1516-1535.
- Villegas, P. 1998. Viral diseases of respiratory system [en línea]. *Poultry Science.* 77:1143 www.pubmed.gov (Consulta 13 mar.2006).

Vögtlin, A., L. Bruckner, & H.P. Ottiger. 1999. Use of polymerase chain reaction for the detection of vaccine contamination by infectious laryngotracheitis virus. *Vaccine*. 17: 2501-2506.

Wieliczko, A., M. Mazurkiewicz, T. Piasecki, & T. Kuszczynski. 2004. The clinical course of the infectious laryngotracheitis field in hens and estimation of immunoprophylaxis efficiency [en línea]. *J. Vet. Sci.* 4:175. www.vetsci.org (Consulta: 13 mar 2006).

ANEXOS

Cuadro 1. Número y porcentaje de casos según el tipo de lesión histopatológica reportada en las 202 muestras de tractos respiratorios de aves.

Hallazgos histopatológicos	Cantidad de casos	Porcentaje (%)
Infiltrado inflamatorio crónico	20	9.90%
Degeneración y necrosis	19	9.40%
Bronconeumonía bacteriana	8	3.96%
Bronconeumonía micótica	8	3.96%
Tumores	4	1.98%
Infiltrado mononuclear	10	4.95%
Inclusiones virales intranucleares	47	23.26%
Bronquitis granulomatosa	3	1.48%
Bronquitis obliterante	13	6.43%
Bronquitis crónica	10	4.95%
Congestión y hemorragias	4	1.98%
Inclusiones intracitoplasmáticas	2	1%
Hiperplasia de tejido linfoide	12	5.94%
Laringotraqueítis mononuclear	19	9.40%
Conjuntivitis	16	7.92%
Tejidos normales	7	3.46%
Total	202	100%

Cuadro 2. Signos clínicos reportados en los casos enviados al laboratorio de Histopatología por año.

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	Total
Bronquitis	0	0	1	3	0	0	4
Examen Rutinario	0	0	7	6	7	9	29
Problemas respiratorios	13	11	12	3	14	27	80
Hemorragias nasales	0	2	1	2	0	0	5
Lesiones en ojo	2	3	3	0	0	0	8
Pérdida de peso	3		0	0	0	0	3
Alta mortalidad	4	3	5	6	6	7	31
No respuesta a antibióticos	0	0	1	1	0	0	2
Diarrea	0	0	0	1	0	0	1
Secreción en tráquea	5	2	5	0	6	2	20
Baja producción	0	4	4	0	3	2	13
Total de signos clínicos reportados en los casos en que sospechaba de enfermedad respiratoria	27	25	39	22	36	47	196

