

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIOS ANATOMOPATOLÓGICOS, BACTERIOLÓGICOS, MOLECULARES,
SEROLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS DE
Ornithobacterium rhinotracheale EN CUADROS RESPIRATORIOS
DE AVES PROVENIENTES DE EXPLOTACIONES COMERCIALES**

CARLOS DANIEL GORNATTI CHURRIA

La Plata, 19 de febrero de 2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar por el título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

ESTUDIOS ANATOMOPATOLÓGICOS, BACTERIOLÓGICOS, MOLECULARES, SEROLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS DE *Ornithobacterium rhinotracheale* EN CUADROS RESPIRATORIOS DE AVES PROVENIENTES DE EXPLOTACIONES COMERCIALES

AUTOR: Med. Vet. GORNATTI CHURRIA, Carlos Daniel

DIRECTOR: Prof. Dr. PETRUCCELLI, Miguel Ángel

CO-DIRECTORES: Prof. Dra. MACHUCA, Mariana Alejandra

Dr. VIGO, Germán Blas (*In memoriam*)

LUGAR DE TRABAJO: Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos y
Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades de las Aves y los Pilíferos,
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

MIEMBROS DEL JURADO:

Prof. Dra. CANAL, Ana

Dra. FALZONI, Elvira

Prof. Dra. MONTENEGRO, María

*Cessa il vento, calma la bufera,
torna a casa il fiero partigian,
sventolando la rossa sua bandiera
vittoriosi, alfin liberi siam.
Sventolando la rossa sua bandiera
vittoriosi, alfin liberi siam.*

*Frammento di la canzone partigiana
"Fischia il vento" (Felice Cascione, settembre 1943)*

*Dedico mi Tesis Doctoral a la memoria de mi madre
Pilar N. Churria a quien siempre le agradeceré la
tenacidad y el esfuerzo que logró enseñarme e
inculcarme con su inmenso cariño.*

II
INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	I
INDICE	II
AGRADECIMIENTOS	VI
PUBLICACIONES PARCIALES	X
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	XV
LISTA DE TABLAS Y APÉNDICES	XVII
LISTA DE FIGURAS	XVIII
RESUMEN	1
SUMMARY	3
I) INTRODUCCIÓN GENERAL	5
1. Etiología	6
1.1 Reseña histórica y clasificación taxonómica actual	6
1.2 Aislamiento e identificación bacteriana	8
1.2.1 Morfología, tinción, estructura antigénica y	8
características culturales	
1.2.2 Identificación bioquímica	11
1.2.3 Tipificación serológica	12
2. Patogenia, epidemiología y signos clínicos	14
3. Lesiones anatomopatológicas	17
3.1 Lesiones macroscópicas	17
3.2 Lesiones microscópicas	18

	III
4. Diagnóstico molecular	19
4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	19
4.2 Electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE)	20
5. Estudio inmunohistoquímico	21
6. Diagnóstico serológico	23
6.1 ELISA	23
6.2 Prueba de aglutinación en placa	25
6.3 Prueba de dot-ImmunoBinding	25
II) OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES	27
III) HIPÓTESIS RELEVANTES	28
IV) CAPÍTULO I: ESTUDIO RETROSPECTIVO	29
PARTE 1: ESTUDIOS ANATOMOPATOLÓGICOS, INMUNOHISTOQUÍMICOS Y BACTERIOLÓGICOS	30
1. Introducción	30
2. Objetivos específicos	31
3. Materiales y métodos	32
3.1 Recepción y características de las muestras	32
3.2 Bacteriología	32
3.3 Histopatología	33
3.4 Criterios de evaluación histopatológica	34
3.5 Inmunohistoquímica	34
3.6 Criterios de evaluación inmunohistoquímica	35

3.7 PCR	35
3.8 Análisis estadístico	37
4. Resultados	37
5. Discusión y conclusiones	38
PARTE 2: PERFILES DE SUSCEPTIBILIDADES ANTIBIÓTICAS	45
1. Introducción	45
2. Objetivos específicos	50
2. Materiales y métodos	51
3. Resultados y conclusiones	53
V) CAPÍTULO II: MODELO EXPERIMENTAL	59
1. Introducción	60
2. Objetivos específicos	61
3. Materiales y métodos	61
3.1 Aislamientos bacterianos seleccionados	61
3.2 Preparación del inóculo	62
3.3 Selección y organización en grupos de las aves de experimentación	63
3.4 Manejo y cuidado de las aves de experimentación	64
3.5 Criterios de evaluación histopatológica	66
3.6 Criterios de evaluación inmunohistoquímica	66
3.7 Evaluación bacteriológica	67
3.8 Evaluación serológica	67

3.9 PCR	68
3.10 Análisis estadístico	68
4. Resultados	69
5. Discusión y conclusiones	71
VI) CAPÍTULO III: ESTUDIO PROSPECTIVO EN PLANTA DE FAENA	81
1. Introducción	82
2. Objetivos específicos	83
3. Materiales y métodos	83
3.1 Histopatología	84
3.2 Criterios de evaluación histopatológica	84
3.3 Inmunohistoquímica	85
3.4 Criterios de evaluación inmunohistoquímica	85
3.5 Evaluación bacteriológica	85
3.6 PCR	85
3.7 Análisis estadístico	86
4. Resultados	86
5. Discusión y conclusiones	86
VII) CONCLUSIONES GENERALES	91
VIII) ANEXOS	95
XI) BIBLIOGRAFIA	100

AGRADECIMIENTOS (por orden alfabético)

Al Sr. Roberto Abán por su excelente e incansable colaboración en la preparación técnica de cortes histológicos e inmunohistoquímica de la presente Tesis Doctoral.

Al Dr. Rubén O. Arias (Cátedra de Introducción a la Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina) por proveerme muy gentilmente y en una incontable cantidad de veces, de sangre caprina para la realización de los estudios bacteriológicos.

Al Sr. Miguel Cash (Granja Tres Arroyos, Argentina) por proveer gentilmente los pollos parrilleros utilizados en el modelo experimental.

A los integrantes de la Cátedra de Introducción a la Producción Animal (Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina) por proveerme gentilmente con los conejos que fueron hiperinmunizados y de los que se obtuvo el suero policlonal para los estudios de inmunohistoquímica.

A mis compañeros de la Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos (Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, Argentina) por su colaboración en la realización de la presente Tesis Doctoral.

A la Med. Vet. Marina Ferrante (Nutrisur SRL, Abasto y SENASA, Argentina) por permitirme trabajar en la planta de pollos parrilleros dónde desempeña funciones y así poder realizar el estudio prospectivo.

A la Lic. María Victoria González Eusevi (Inglés Científico, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) por sus enseñanzas y colaboraciones en la redacción de los diversos trabajos científicos en inglés aquí incluidos.

Al Dr. Panayiotis (Panos) Loukopoulos (Graham Centre for Agricultural Innovation and School of Animal and Veterinary Sciences, Charles Sturt University, Wagga Wagga, NSW, Australia) y Stat. Matthew Prescott (Government of Canada) por sus destacadas participaciones en la realización y evaluación del análisis estadístico.

A la Prof. Dra. Mariana A. Machuca (Cátedra de Patología Especial y Laboratorio de Patología Especial Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, Argentina), la memoria del Dr. Germán B. Vigo (Cátedra de Microbiología y Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, Argentina) y Prof. Dr. Miguel A. Petruccelli (Vicedecano, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, Argentina) por sus

destacadas colaboraciones que me posibilitaron la realización y concreción de la presente Tesis Doctoral.

A La Dra. Adriana R. Massone (Cátedra de Patología Especial y Laboratorio de Patología Especial Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, Argentina) por sus valiosas opiniones en las clasificaciones de lesiones microscópicas.

Al Sr. Victorio F. Nieves (Servicio de Diagnóstico Bacteriológico y Antimicrobianos, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, Argentina) por su desinteresada colaboración en la preparación de los inóculos y manejo de las aves del modelo experimental.

Al Prof. Dr. Carlos J. Perfumo (Cátedra de Patología Especial y Laboratorio de Patología Especial Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, Argentina) por su generosa colaboración y opiniones que me posibilitaron realizar los primeros pasos de la presente Tesis Doctoral.

Al Laboratorio PLATALAB SA (La Plata, Argentina) por generosa colaboración en la elaboración de la bacterina utilizada para la hiperinmunización de los conejos y cuyo suero policlonal fue utilizado en los estudios de inmunohistoquímica.

Al Dr. Roberto Rule (Investigador Científico; Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, Argentina y Comisión de Investigaciones Científicas [CIC], La Plata, Argentina) y Alejandro “Tano” Grattoni por sus desinteresadas colaboraciones en la obtención del suero hiperinmune de los conejos inoculados con la bacterina empleada y con el cual se realizaron los estudios inmunohistoquímicos..

Al Mag. Pablo Sansalone (Phibro Animal Health Argentina, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) por proveer una gran parte de las muestras que permitieron la concreción del estudio retrospectivo.

Al Dr. Guillermo Hernán Sguazza (Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, Argentina) por su generosa colaboración en las primeras etapas del estudio molecular de la presente Tesis Doctoral.

Al Dr. Yu Yamamoto (National Institute of Animal Health, Tsukuba, Japón) por sus destacadas opiniones en la elección del sistema revelador y primeros resultados de la prueba de inmunohistoquímica.

A todos ellos y ellas, muchas gracias

PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

1) CAPÍTULOS DE LIBROS

1. **Gornatti Churria CD**, Vigo G, Machuca M, Píscopo M, Herrero Loyola M, Petruccelli M. *In vitro* antibiotic susceptibility profiles, antimicrobial resistance mechanisms and virulence factors of *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. En: Méndez-Vilas A, editor. Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education, vol. 1, Microbiology Book Series # 4. Badajoz (España): Formatex Research Center; 2013. p. 419–29. Disponible en: URL: <http://www.formatex.info/microbiology4/vol1/419-429.pdf>

2) PUBLICACIONES EN REVISTAS

a) Resúmenes

1. **Gornatti Churria CD**, Vigo G, Machuca M, Sansalone P, Arias N, Origlia J, et al. Susceptibilidades antibióticas *in vitro* de aislamientos de *Ornithobacterium rhinotracheale* β -hemolíticos y no hemolíticos obtenidos de pollos parrilleros y aves reproductoras de explotaciones comerciales de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2013; 45:72.

2. **Gornatti Churria CD**, Petruccelli M, Machuca MA. Estudios anatomopatológicos, bacteriológicos, moleculares, serológicos e inmunohistoquímicos de *Ornithobacterium rhinotracheale* en cuadros respiratorios de aves provenientes de explotaciones comerciales. *Analecta Vet.* 2014; 34(1-2):65. Disponible en: URL:
http://www.fcv.unlp.edu.ar/images/stories/analecta/vol_34_n1/Resumenes.pdf

b) Trabajos completos

1. **Gornatti Churria CD**, Sansalone P, Vigo G, Sguazza G, Machuca M, Origlia J, et al. Pneumonia in broiler chicken flocks associated with β -hemolytic *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. *Braz J Vet Pathol.* 2011; 4:243–6. Disponible en: URL:
http://bjvp.org.br/wp-content/uploads/2015/09/DOWNLOAD-FULL-ARTICLE-42-20881_2011_11_13_40_36t-al.pdf
2. **Gornatti Churria CD**, Machuca M, Vigo G, Petruccelli M. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in poultry: an updated review. *Int J Mol Zool.* 2012; 2(3):23–38. DOI: 10.5376/ijmz.2012.02.0003. Disponible en: URL:
<http://biopublisher.ca/index.php/ijmz/article/view/418/520>

3. **Gornatti Churria CD**, Sansalone P, Machuca M, Vigo G, Sguazza G, Origlia J, et al. Tracheitis in a broiler chicken flock caused by dual infection with *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) and non-hemolytic *Ornithobacterium rhinotracheale*. Braz J Vet Pathol. 2012; 5:89–93. Disponible en: URL: http://bjvp.org.br/wp-content/uploads/2015/07/DOWNLOAD-FULL-ARTICLE-20-20881_2012_8_18_25_37.pdf
4. **Gornatti Churria CD**, Vigo G, Machuca M, Nieves F, Nieves W, Píscopo M, et al. Vaccines against *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. J Vet Sci Med Diagn. 2013;2:4. DOI: 10.4172/2325-9590.1000122
5. **Gornatti Churria CD**, Loukopoulos P, Vigo G, Sansalone P, Machuca M, Nieves V, et al. *In vitro* antibiotic susceptibility patterns of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial chickens in Argentina. Int J Poult Sci. 2016; 15:293–296. DOI : 10.3923/ijps.2016.293.296 Disponible en: URL: <http://scialert.net/qredirect.php?doi=ijps.2016.293.296&linkid=pdf>

3) PUBLICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS Y REUNIONES

CIENTÍFICAS

1. **Gornatti Churria CD**, Sansalone P, Sguazza G, Machuca M, Origlia J, Píscopo M, et al. Primeros aislamientos de *Ornithobacterium rhinotracheale* β -hemolíticos en América Latina y su asociación a neumonía en pollos parrilleros. XXII Congreso Latinoamericano de Avicultura. 2011. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. (Póster).

2. **Gornatti Churria CD**, Sansalone P, Vigo G, Sguazza G, Origlia J, Píscopo M, et al. Traqueítis en pollos parrilleros causada por *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) y *Ornithobacterium rhinotracheale* no hemolítico: descripción de un caso. XIII Reunión Argentina de Patología Veterinaria (RAPAVE) y 6to Seminario de la Fundación “Charles Louis Davis” en Argentina. 2012. Córdoba, Argentina. (Comunicación oral).

3. **Gornatti Churria CD**, Machuca M A, Vigo G B, Sansalone P, Píscopo M, Herrero Loyola M, et al. Estudio retrospectivo de *Ornithobacterium rhinotracheale* en pollos parrilleros y aves reproductoras comerciales de las Provincias de Buenos Aires y Entre Ríos, Argentina (2010-2012). IX Reunión Argentina de Patología Veterinaria (RAPAVE) y 8vo Seminario de la Fundación “Charles Louis Davis” en Argentina. 2014. Tandil, Argentina. p. 18. (Comunicación oral).

5) OTRAS PUBLICACIONES

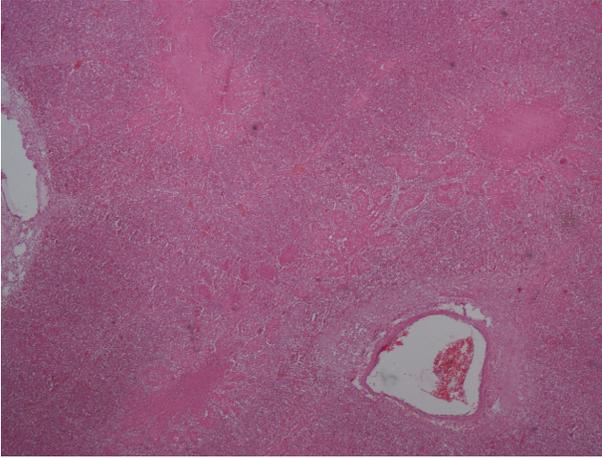
1. **Gornatti Churria CD**, Sansalone P, Vigo B, Sguazza G, Machuca M, Origlia J, et al. Diagnostic Exercises of the Davis Foundation Latin American Division (Latin Comparative Pathology Group [LCPG]). Exercise # 26. Disponible en: URL: http://www.cldavis.org/PDFs/LCPG/LCPG_Diag_Ex_26.pdf. Disponible en: URL: http://www.cldavis.org/PDFs/LCPG/LCPG_Diag_Ex_26_answers.pdf

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS (por orden alfabético)

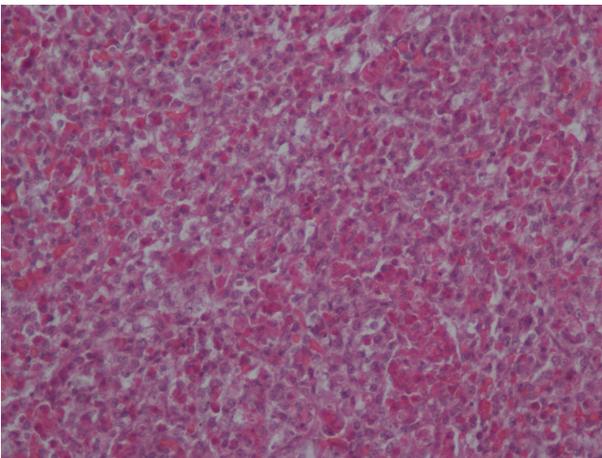
ADN	Ácido desoxirribonucleico
API	Analytical profile index
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATCC	American Type Culture Collection
BH	β -hemolítico/a/os/as
χ^2	Chi cuadrado
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
DAB	Diaminobencidina
ELISA	Enzymed-linked immunosorbent assay
ERIC	Enterobacterial repetitive intergenic concensus
EV	Endovenoso/a
°C	Grados centígrados
h	Horas

H&E	Hematoxilina y eosina
IHQ	Inmunohistoquímica
IT	Intratraqueal
MAA	Muertos al arribo
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NH	No hemolítico/a/os/as
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
PGNR	Pleomorphic Gram negative rod
PDS	Polymer Detection System
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
UFC	Unidades formadoras de colonias
µl	Microlitros
µm	Micrometros

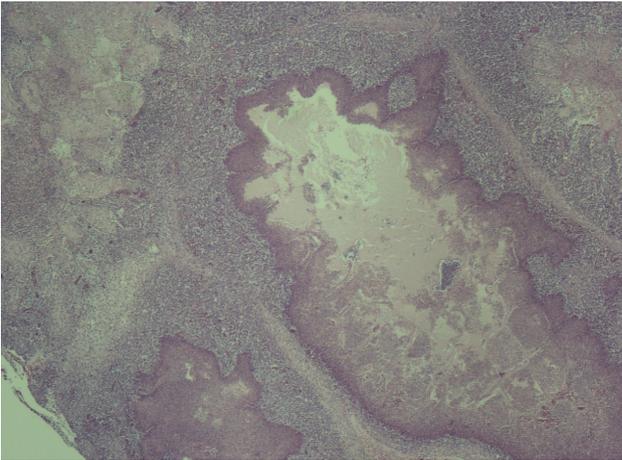
Tabla 1: Lesiones histopatológicas compatibles del estudio retrospectivo	41
Tablas estadísticas del estudio retrospectivo (A–F)	42
Tabla 3: Patrones de susceptibilidades antibióticas <i>in vitro</i>	57
Tabla 4: Resistencia a familias de antibióticos	58
Tabla 5: Lesiones histopatológicas compatibles del modelo experimental	74
Tablas estadísticas del modelo experimental (A–L)	75
Tabla 6: Granjas incluidas en el estudio prospectivo en planta de faena	90
Apéndice I: Plan de inmunización de conejos domésticos para la elaboración de un suero hiperinmune	96
Apéndice II: Técnica de IHQ para <i>O. rhinotracheale</i> en pulmón	97
Apéndice III: Técnica molecular para <i>O. rhinotracheale</i>	99



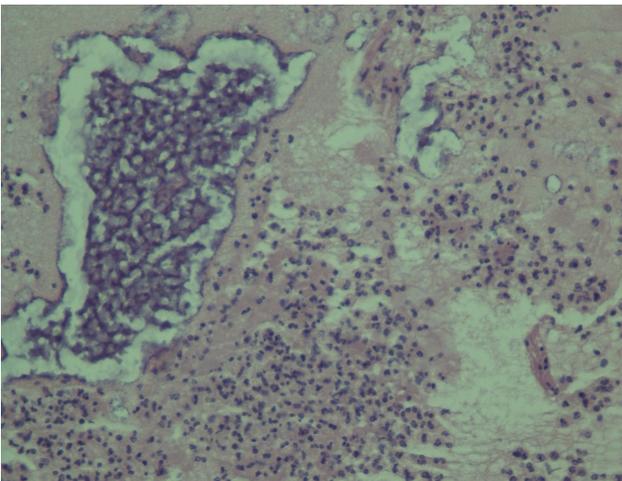
1. Pulmón, ave reproductora. Múltiples parabronquios, pasajes aéreos menores y espacios intersticiales afectados y ocupados por exudado inflamatorio fibrino-heterofílico. H&E. Obj. 10X. (Página 38).



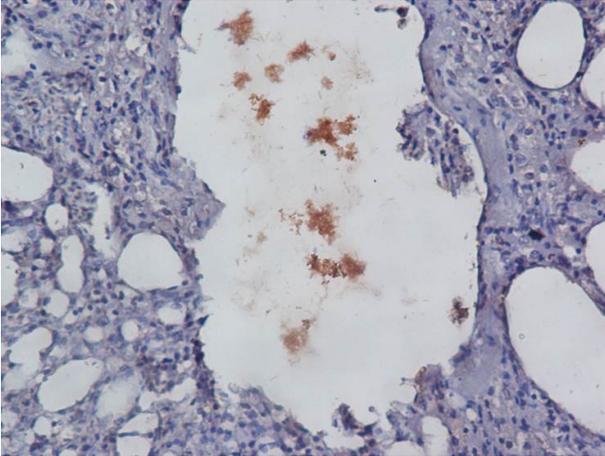
2. Pulmón, ave reproductora. Detalle del pulmón de la figura N° 1. Exudado inflamatorio fibrino-heterofílico en pasajes aéreos pulmonares menores afectados. H&E. Obj. 20X. (Página 38).



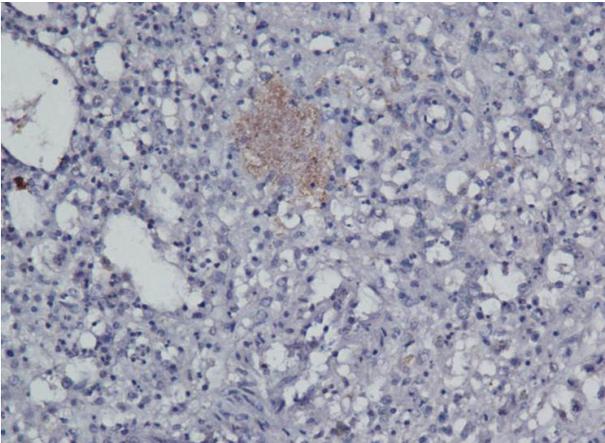
3. Pulmón, pollo parrillero. Abundante exudado inflamatorio fibrino-heterofílico y severa distensión en el lumen de diversos parabronquios y en espacios intersticiales afectados. Nótese la presencia de colonias bacterianas intralesionales. H&E. Obj. 20X. (Página 38).



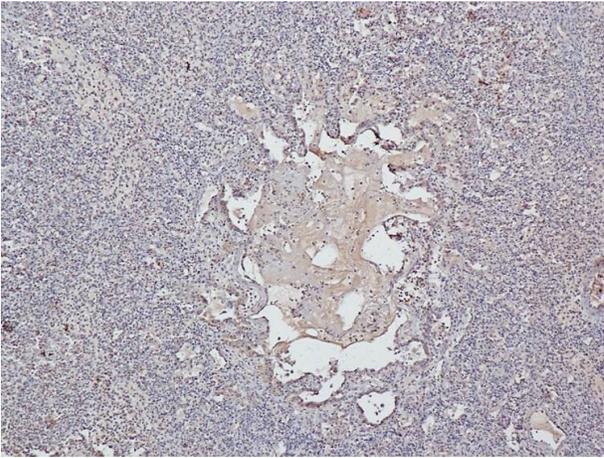
4. Pulmón, pollo parrillero. Detalle del pulmón de la figura N° 3. Colonias bacterianas intralesionales en exudado fibrino-heterofílico en el lumen de uno de los parabronquios afectados. H&E. Obj. 40X. (Página 38).



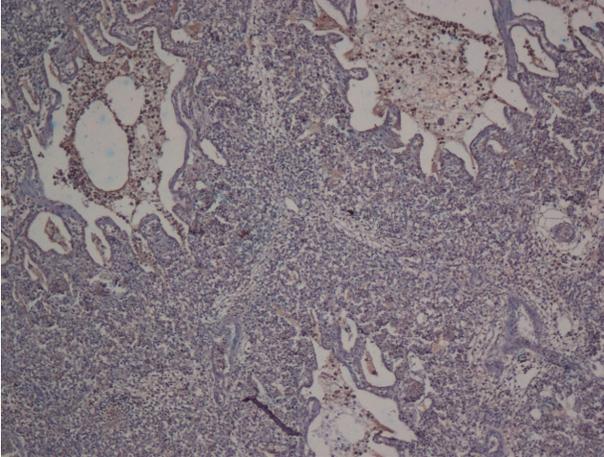
5. Pulmón, ave reproductora. Múltiples colonias bacterianas de diverso tamaño con inmunomarcación positiva, ubicadas en el lumen de un parabronquio. IHQ. DAB, coloración de contraste con hematoxilina. Obj. 40X. (Página 39).



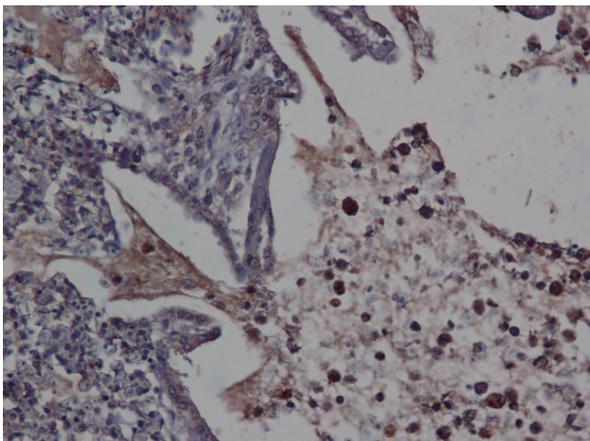
6. Pulmón, pollo parrillero. Colonias bacterianas intralesionales con inmunomarcación positiva en pasaje aéreo pulmonar. IHQ. DAB, coloración de contraste con hematoxilina. Obj. 40X. (Página 39).



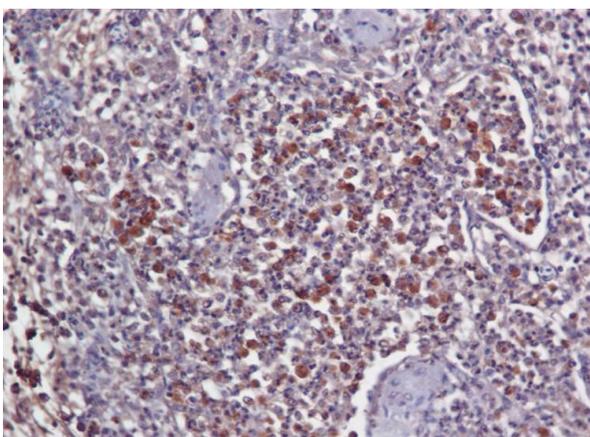
7. Pulmón, pollo parrillero. Exudado fibrinoso con inmunomarcación positiva en el lumen de un parabronquio afectado. IHQ. DAB, coloración de contraste con hematoxilina. Obj. 20X. (Página 39).



8. Pulmón, pollo parrillero. Exudado inflamatorio fibrino-heterofílico con inmunomarcación positiva en el lumen de diversos parabronquios afectados y pasajes aéreos menores. IHQ. DAB, coloración de contraste con hematoxilina. Obj. 10X. (Página 39)



9. Pulmón, pollo parrillero. Detalle de la figura N° 8. Exudado inflamatorio fibrino-heterofílico con inmunomarcación positiva ocupando pasajes aéreos menores afectados. IHQ. DAB, coloración de contraste con hematoxilina. Obj. 40X. (Página 39).



10. Pulmón, pollo parrillero. Severa infiltración celular inflamatoria heterofílica con inmunomarcación positiva citoplásmica ocupando en el lumen de un parabronquio con necrosis de su epitelio. IHQ. DAB, coloración de contraste con hematoxilina. Obj. 40X. (Página 39).



11. Estudio prospectivo en planta de faena. Parte de la totalidad de los pollos parrilleros del tercer muestreo del estudio prospectivo sobre la mesa de la sala de necropsia a pronto de realizarse sus exámenes *postmortem* (Página 84).

RESUMEN

ESTUDIOS ANATOMOPATOLÓGICOS, BACTERIOLÓGICOS, MOLECULARES, SEROLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS DE *Ornithobacterium rhinotracheale* EN CUADROS RESPIRATORIOS DE AVES PROVENIENTES DE EXPLOTACIONES COMERCIALES

Palabras clave: *Ornithobacterium rhinotracheale*; β -hemólisis, susceptibilidad antibiótica, PCR, inmunohistoquímica, aves de producción comercial

RESUMEN

Con el fin de aislar, identificar y describir la posible asociación de *Ornithobacterium rhinotracheale* con hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos compatibles con su infección en tejidos respiratorios de aves de producción comercial, se llevaron a cabo tres estudios independientes. En primer lugar, se realizó un estudio retrospectivo abarcando el un total de 82 casos de campo con sospecha de infección por *O. rhinotracheale* durante el período comprendido entre agosto de 2010 y noviembre de 2012. Un total de 48 casos fueron positivos a la inmunomarcación de la bacteria en pulmón y además se obtuvieron 50 aislamientos β -hemolíticos y no hemolíticos de *O. rhinotracheale*. Así también, se determinó la susceptibilidad antibiótica de una selección de 38 aislamientos β -hemolíticos y no hemolíticos por medio de una técnica de difusión en discos. La mayoría de los aislamientos analizados (34/38) presentó multiresistencia frente a los antibióticos

estudiados. En segundo lugar, se realizó un modelo experimental compuesto por 5 grupos de pollos parrilleros de 4 semanas de vida, a fin de identificar posibles diferencias de patogenicidad entre una cepa β -hemolítica y otra no hemolítica de *O. rhinotracheale* utilizando las vías de inoculación endovenosa e intratraqueal. Se observó que la vía intratraqueal y la cepa no hemolítica tuvieron un mayor grado de lesión microscópica. El grupo inoculado por vía endovenosa tuvo una mayor proporción de positivos con lesiones microscópicas hepáticas. Finalmente, se realizó la tercer parte, que consistió en un estudio prospectivo en planta de faena de pollos parrilleros. Se encontró que hubo relación entre las lesiones con mayor grado microscópico y la inmunomarción del microorganismo estudiado en el pulmón.

SUMMARY

ANATOMOPATHOLOGICAL, BACTERIOLOGICAL, MOLECULAR, SEROLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES OF *Ornithobacterium rhinotracheale* IN COMMERCIAL CHICKENS WITH RESPIRATORY DISORDERS

Keywords: *Ornithobacterium rhinotracheale*, β -hemolysis, antibiotic susceptibility, PCR, immunohistochemistry, commercial chicken

SUMMARY

The aim of this study was to isolate, identify and describe the possible association between *Ornithobacterium rhinotracheale* infection, and the histopathological and immunohistochemical findings possibly caused by this microorganism in respiratory tissues of commercial chickens. To this end, three different studies were carried out. The first study was a retrospective study including 82 field cases with respiratory disorders compatible with *O. rhinotracheale* between August 2010 and November 2012. A total of 48 out of the 82 field cases showed positive immunohistochemical results for the detection of *O. rhinotracheale* in lungs, and 50 β -hemolytic and non-hemolytic *O. rhinotracheale* isolates were obtained. Antibiotic susceptibilities of 38 β -hemolytic and non-hemolytic selected isolates were determined by a disk diffusion method. Most of the isolates analyzed (34/38) were multiresistant to the antibiotics studied. The second study was an experimental model composed of five groups of 4-week-old broiler chickens, carried out to identify possible differences of pathogenicity between the β -hemolytic and non-hemolytic *O. rhinotracheale* isolates by the endovenous and intratracheal inoculation routes. The

intratracheal inoculation route and the non-hemolytic *O. rhinotracheale* isolate showed a higher degree of microscopic lesions. The group endovenously inoculated had a higher proportion of microscopic hepatic lesions. Finally, the third study was a prospective study at a broiler chicken slaughterhouse. The results of this study showed an association between a higher degree of microscopic lesions and positive immunohistochemical results for the detection of the bacterium in lungs.

I) INTRODUCCIÓN GENERAL

1. ETIOLOGÍA

1.1 RESEÑA HISTÓRICA Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL

La primera descripción de *Ornithobacterium rhinotracheale* fue realizada por Charlton *et al.* en 1993, en dónde identificó un bacilo pleomórfico Gram negativo (sigla en inglés: PGNR) que fue obtenido del tracto respiratorio de pavos domésticos, con trastornos respiratorios, en la región de California (Charlton *et al.* 1993). Luego, Vandamme *et al.* en 1994, describieron por primera vez la ubicación filogenética y varias características genotípicas, quimiotaxonómicas, y fenotípicas de 21 aislamientos, a los que les asignó el nombre *O. rhinotracheale*. Sin embargo, varios autores coinciden que el microorganismo pudo haber sido obtenido en aislamientos anteriores a 1993, aunque no hay publicaciones de referencia que lo aseguren (Chin *et al.* 2013). Más precisamente, una nueva enfermedad respiratoria había sido encontrada en pollos parrilleros comerciales de 28 días de vida en Sudáfrica en 1991. Las aves presentaban estornudos, parámetros productivos deteriorados y tasas aumentadas de mortandad. El estudio *postmortem* permitió observar neumonías y aerosaculitis abdominal con exudado blanquecino, espumoso y de consistencia similar a yogur. En el estudio bacteriológico se pudo aislar un bacilo Gram (-), pleomórfico y de crecimiento lento y fastidioso, que era desconocido entre las especies bacterianas estudiadas hasta ese momento (van Empel 1998; van Empel y Hafez 1999; Bisschop 2003). Del mismo modo, en Hungría en 1987, había sido encontrada una especie bacteriana similar a una *Pasteurella* spp. en un cuadro respiratorio severo en patos Pekín de 10 semanas de vida (van Empel 1998; van Empel y Hafez, 1999; Pyzik *et al.* 2007; Chin *et al.* 2013). También habían sido obtenidos

aislamientos similares a *Riemerella anatipestifer* de pavos con enfermedad respiratoria en Alemania en el período comprendido entre 1991 y 1992. Por lo tanto todos estos aislamientos mencionados se relacionan con la bacteria actualmente identificada como *O. rhinotracheale* que fue adoptando diversos nombres tales como *Pasteurella*-like, *Kingella*-like, TAXON 28 y PGNR, cómo fue descrito previamente (Vandamme y Hafez 2015). En 1998, van Empel reportó que *O. rhinotracheale* fue aislada durante los años 80 en Europa, mediante el estudio de colecciones bacteriológicas, aunque no fue identificada hasta 1993. Particularmente, *O. rhinotracheale* había sido obtenida de pavos domésticos de 5 semanas de vida con descarga nasal, edema facial y aerosaculitis fibrinopurulenta en 1981, en córvidos europeos en 1983 en Alemania, y en Francia, Bélgica e Israel antes de 1990. Cabe destacar que *O. rhinotracheale* fue aislada e identificada por primera vez en Argentina en 2009 a partir de muestras de una parvada de pollos parrilleros con trastornos respiratorios (Uriarte *et al.* 2009).

Actualmente, *O. rhinotracheale* pertenece a la familia *Flavobacteriaceae*, que es la más grande dentro del filum *Bacteroidetes*, agrupa a 90 géneros y cientos de especies bacterianas (McBride 2014). Todos los miembros de la familia *Flavobacteriaceae* son bacterias Gram (-), bacilares y no formadoras de esporas. La mayoría de ellos son microorganismos aerobios, aunque también se encuentran incluidos microorganismos anaerobios facultativos y capnofílicos (McBride 2014). Dentro de la familia *Flavobacteriaceae*, se encuentran incluidos patógenos de relevancia para las aves tales como *O. rhinotracheale*, *R. anatipestifer*, *Riemerella columbina* y *Coenonia anatina*. A su vez, *O. rhinotracheale*, *R. anatipestifer* y *R. columbina* también han sido reagrupadas dentro del clado *Chryseobacterium* (McBride 2014).

1.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

1.2.1 MORFOLOGÍA, TINCIÓN, ESTRUCTURA ANTIGÉNICA Y CARACTERÍSTICAS CULTURALES

Ornithobacterium rhinotracheale es una bacteria bacilar a pleomórfica, Gram (-), inmóvil, no esporulada y con un metabolismo quimiorganotrófico y mesofílico (Hafez y Vandamme 2015). Cuando es cultivada en medios sólidos, puede aparecer como bacilos cortos de 0,2-0,9 μm de ancho y 0,6-5 μm de largo (van Empel y Hafez 1999; Shivaprasad 2002; Shivaprasad 2012; Chin *et al.* 2013) y menos frecuentemente a manera de bacilos largos filamentosos (Chin y Charlton 2008). Hasta el momento, no fueron descritas estructuras como pilis, fimbrias, plásmidos u otras posiblemente vinculadas a virulencia bacteriana o con propiedades tóxicas del microorganismo (van Empel y Hafez 1999; Chin y Charlton 2008; Chin *et al.* 2013; Hafez y Vandamme 2015). El aislamiento y crecimiento óptimo de *O. rhinotracheale* puede realizarse en agar sangre ovina al 5-10%, mientras que no desarrolla en agar MacConkey, agar Endo, agar Gassner, agar Drigalski o agar citrato de Simmons (Chin *et al.* 2013). Aunque tiene la capacidad de crecer en condiciones aérobicas, microaeróbicas y anaeróbicas y en un rango de temperatura comprendido entre 30-42°C, el desarrollo de *O. rhinotracheale* ocurre de manera óptima en una atmósfera enriquecida con 7,5-10% de CO₂ y con una temperatura de 37°C (Hafez y Vandamme 2015). Bajo estas condiciones, *O. rhinotracheale* desarrolla a manera de colonias puntiformes no pigmentadas, de menos de 1 mm de diámetro a las 24 h postincubación (Hafez y Vandamme 2015). A las 48 h postincubación, las colonias

adoptan un diámetro de 1 a 2 mm, de color grisáceas a blanco-grisáceas, convexas y con bordes netos. Algunos aislamientos obtenidos de pollos parrilleros se caracterizan por tener un brillo rojizo distintivo (Chin y Charlton 2008; Chin *et al.* 2013). Los cultivos de *O. rhinotracheale* tienen la particularidad de presentar un olor característico similar a ácido butírico (van Empel y Hafez 1999; Chin y Charlton 2008). Debido a la resistencia natural de *O. rhinotracheale* a la gentamicina y a la polimixina B, observado en el 90% de los aislamientos estudiados por Vandamme *et al.* (1994), numerosos investigadores recomiendan el agregado de 5 µl/ml de uno o de ambos antibióticos en el agar sangre para el aislamiento selectivo de esta bacteria (van Empel y Hafez 1999; Chin y Charlton 2008; Chin *et al.* 2013). Así también, se ha sugerido el uso de 10 µg de gentamicina por cada ml de agar sangre para el aislamiento de *O. rhinotracheale* a partir de muestras contaminadas que pudieran presentar microflora potencialmente competidora (Chin *et al.* 2013). van Empel y Hafez (1999) y Chin *et al.* (2013) también propusieron el uso de agar sangre sin el agregado de ningún antibiótico, para evitar la pérdida de aquellos escasos aislamientos de *O. rhinotracheale* susceptibles a la gentamicina y/o a la polimixina B. Destacados autores coincidieron en describir a *O. rhinotracheale* como una especie bacteriana carente de toda actividad hemolítica (van Empel y Hafez 1999; Hafez 2002; Canal *et al.* 2003b; Chin y Charlton 2008; Chin *et al.* 2013) como aquel comportamiento NH de la cepa ATCC 51463 de *O. rhinotracheale* (Tabatabai *et al.* 2010). A pesar de ello, recientemente fue descrita la inusual y extensa actividad BH de aislamientos en pavos domésticos en Estados Unidos de América y pollos parrilleros en Argentina. La hemólisis, en todos los casos, fue observada durante las 48 h postincubación a temperatura ambiente (Walters *et al.* 2009; Tabatabai *et al.* 2010; Gornatti Churria *et al.* 2011a; 2011b). Los aislamientos logrados por Walters *et al.* (2009) y Gornatti Churria *et al.* (2011a;

2011b) tienen en común que pertenecieron a parvadas comerciales que se caracterizaron por la severidad de los trastornos respiratorios presentes (Walters *et al.* 2009; Gornatti Churria *et al.* 2011). Tabatabai *et al.* (2010) demostraron y caracterizaron la actividad BH de diversos aislamientos de campo de *O. rhinotracheale* por medio de diversos estudios tales como análisis cinéticos *in vitro* de hemólisis usando glóbulos rojos de oveja, western blotting con anticuerpos monoclonales específicos con leucotoxina, pruebas isobáricas y análisis cuantitativos de preparaciones de proteínas de membrana externa de *O. rhinotracheale*. Además, Walters *et al.* (2011) recientemente desarrollaron un ensayo de letalidad embrionaria para comparar posibles diferencias de patogenicidad entre aislamientos β -hemolíticos (BH) y no hemolíticos (NH) de *O. rhinotracheale* obtenidos de pavos comerciales del Valle de Shenandoah de Virginia, Estados Unidos de América. En busca de la dilución óptima para poder diferenciar la patogenicidad de los aislamientos nombrados, dichos autores compararon los patrones de mortalidad a los 8 días posinoculación de los aislamientos BH y NH estudiados y encontraron las mayores diferencias en los grupos de dilución 10^3 . El resultado mostró que el aislamiento BH de *O. rhinotracheale* produjo una mayor mortalidad que aquella causada por el aislamiento NH de *O. rhinotracheale* en el modelo embrionario propuesto (Walters *et al.* 2011).

Dentro de los pocos factores de virulencia conocidos y asociados a *O. rhinotracheale*, Kastelic *et al.* (2013) describieron por primera vez la presencia de la actividad enzimática de una neuraminidasa en 47 aislamientos de campo obtenidas de parvadas comerciales de pollos parrilleros y pavos con neumonía, traqueítis, artritis y encefalitis, provenientes de Alemania, Croacia, Dinamarca, Eslovenia, Hungría, Inglaterra, Israel y Sudáfrica.

Ornithobacterium rhinotracheale también es conocida por su actividad hemoaglutinante (Fitzgerald *et al.* 1998; Soriano *et al.* 2003; Tsai y Huang 2006; Vega *et al.* 2008;

Vega–Sanchez *et al.* 2011). Vega *et al.* (2008) estudiaron la actividad hemoaglutinante de aislamientos de referencia de diversos serotipos de *O. rhinotracheale* comparando el uso de 15 diferentes especies de glóbulos rojos, incluyendo aquellos de aves, mamíferos, peces y seres humanos. Los autores concluyeron que los glóbulos rojos de conejo son aquellos que mejor se adecúan al estudio de la actividad hemoaglutinante de *O. rhinotracheale*. En contraposición, Chernyshev *et al.* (2011) describieron la actividad hemoaglutinante de 19 aislamientos Rusos de *O. rhinotracheale* usando glóbulos rojos tanto de ovejas como de pollos. Por su parte, Vega–Sanchez *et al.* (2011) comprobaron la detección de anticuerpos contra *O. rhinotracheale* por la prueba de la inhibición de la hemoaglutinación en pollos libres de patógenos específicos e inoculados con bacterinas realizadas a partir de cepas de referencia de la nombrada especie bacteriana.

1.2.2 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Los resultados de la identificación bioquímica de *O. rhinotracheale* son considerados actualmente inconsistentes (van Empel y Hafez 1999; Chin y Charlton 2008; Chin *et al.* 2013). Tal es así, que Chin y Charlton (2008) propusieron las siguientes pruebas bioquímicas cuyos resultados fueron consistentes para la identificación de *O. rhinotracheale*: oxidasa (+), catalasa (-), β -galactosidasa (+), indol (-) y triple azúcar hierro (sin cambio). No obstante, Ryll *et al.* (2002) y Günther *et al.* (2002) observaron un aislamiento de *O. rhinotracheale* identificado como oxidasa (-) proveniente de pavos de Alemania, que presentaron un cuadro típico de ornitobacteriosis. Por otra parte, la utilización de kit comerciales para la identificación bioquímica de *O. rhinotracheale*, tal

como la tira API-20 NE (bioMérieux S.A., Francia), son considerados una herramienta útil (van Empel y Hafez 1999; Chin y Charlton 2008; Chin *et al.* 2013) a pesar de no encontrarse incluido el microorganismo en la base de datos de API (van Empel y Hafez 1999; Chin *et al.* 2013). En un estudio de 1.150 aislamientos de *O. rhinotracheale*, los biocódigos encontrados en un 99,5% de los aislamientos fueron 0-2-2-0-0-4 (61%) y 0-0-2-0-0-4 (38,5%). También, los aislamientos positivos a la prueba de la arginina dehidrolasa (0,5%) tuvieron los biocódigos 0-3-2-0-0-0-4 y 0-1-2-0-0-0-4 (van Empel y Hafez 1999; Chin y Charlton 2008). *Ornithobacterium rhinotracheale* mostró resultados negativos constantes para cinco pruebas enzimáticas del sistema API-ZYM (bioMérieux S.A., Francia): lipasa, β -glucuronidasa, β -glucosidasa, α -manosidasa y α -fucosidasa (Chin y Charlton 2008; Chin *et al.* 2013). Puede encontrarse otro sistema comercial para identificación de esta bacteria como lo es el Rapid NF Plus (Remel, Atlanta, Estados Unidos de América) que se usó para estudiar 110 aislamientos de *O. rhinotracheale* y permitió obtener 5 biocódigos característicos del microorganismo: 4-7-2-2-6-4 (41,8%), 4-7-6-2-6-4 (31,8%), 6-7-6-2-6-4 (18,2%), 6-7-2-2-6-4 (7,3%) y 4-7-2-0-4-4 (0,9%) (van Empel y Hafez 1999; Chin y Charlton 2008).

1.2.3 TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA

Actualmente son considerados 18 serotipos (A hasta el R) de *O. rhinotracheale* a partir de los resultados observados en pruebas de ELISA y precipitación en gel de agar utilizando extractos antigénicos sometidos a ebullición y sueros monovalentes (van Empel 1998; van Empel y Hafez 1999; Türkyilmaz 2005; Chin y Charlton 2008; Chin *et al.* 2013).

Existen diferencias geográficas entre los distintos serotipos de *O. rhinotracheale* encontrados alrededor del mundo. La mayoría de los aislamientos obtenidos en Estados Unidos de América y Europa pertenecen al serotipo A (Chin y Charlton 2008), mientras que el serotipo C ha sido encontrado únicamente en pollos parrilleros y pavos de Sudáfrica y Estados Unidos de América (Chin *et al.* 2013).

Los serotipos B, D y E también se encuentran presentes en Europa pero en mucha menor proporción que el serotipo A (Chin y Charlton 2008). Así también, el serotipo A también se lo ha encontrado como aquel de mayor prevalencia en aislamientos de *O. rhinotracheale* en pollos parrilleros (97%) y pavos (61%) (van Empel 1998; Chin *et al.* 2013). Hasta el momento, no se ha encontrado relación entre la especificidad y el serotipo de *O. rhinotracheale* obtenido (Chin *et al.* 2013).

En la actualidad, el Institute of Poultry Diseases (Free University of Berlin, Alemania), que se encuentra dirigido por el Prof. Dr. Hafez Mohamed Hafez, es la única referencia mundial que lleva a cabo la serotipificación de los aislamientos de *O. rhinotracheale* (Hafez Mohamed Hafez, 2011, comunicación personal).

2. PATOGENIA, EPIDEMIOLOGÍA Y SÍGNOS CLÍNICOS

Ornithobacterium rhinotracheale tiene la capacidad de circular y recircular de granja a granja y de galpón a galpón. Las infecciones causadas por el nombrado microorganismo tienden a ser endémicas, pudiendo afectar a parvadas recién introducidas, particularmente en granjas con aves de múltiples edades y en áreas de intensa actividad avícola comercial (van Empel 2008). La ornitobacteriosis es una enfermedad que puede diseminarse horizontalmente de manera directa e indirecta por medio de aerosoles y agua de bebida (Chin *et al.* 2013). A pesar que *O. rhinotracheale* ha sido aislada de ovarios, oviducto, huevos fértiles, huevos infértiles, embriones muertos y pollitos muertos al nacer (van Empel 1998; Chin *et al.* 2013), sólo se han encontrado evidencias circunstanciales que puedan avalar la ocurrencia de la transmisión vertical de *O. rhinotracheale* en aves afectadas. A partir de los resultados observados en estudios experimentales, los signos clínicos generalmente son observados 24-48 h posinoculación (Chin *et al.* 2013). La infección causada por *O. rhinotracheale* ha sido reportada en la mayoría de las ocasiones en parvadas comerciales de pollos parrilleros y pavos domésticos, y con menor frecuencia en faisanes (*Phasianus colchicus* y *Chrysolophus pictus*), codorniz común (*Coturnix coturnix*), perdiz pardilla (*Perdix perdix*), perdiz chucar (*Alectoris chukar*), perdiz roja (*Alectoris rufa*), gallinas de Guinea (*Acryllium vulturinum* y *Numida meleagridis*), graja (*Corvus frugilegus*), avestruz (*Struthio camelus*), palomas (*Columba livia*), patos, gansos, gaviotas (*Larus spp.*) y aves rapaces (van Empel y Hafez 1999; Chin *et al.* 2013; Moreno *et al.* 2008; Hafez y Lierz 2010; Gornatti Churria *et al.* 2012b; Gavrilović 2013). A pesar de la reproducción experimental exitosa de la infección causada por *O. rhinotracheale* en ausencia de infecciones concurrentes o factores estresantes medioambientales (van Veen

et al. 2000b), el rol como patógeno primario de *O. rhinotracheale* aún se encuentra en discusión (Chin y Charlton 2008). La bibliografía cuenta con numerosos trabajos en donde se describen trastornos infecciosos respiratorios en pollos parrilleros y pavos domésticos causados por la asociación entre *O. rhinotracheale* y una gran variedad de microorganismos patógenos tales como *E. coli*, *B. avium*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Enterococcus faecalis*, *Avibacterium paragallinarum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Chlamydia psittaci*, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la enfermedad de Marek, metapneumovirus aviar, virus de la bronquitis infecciosa, *Cryptosporidium* spp. y virus de influenza aviar de baja patogenicidad (H9N2) (Travers 1996; van Empel *et al.* 1999; Sakai *et al.* 2000; Zorman-Rojs *et al.* 2000; Marien *et al.* 2005; 2008; Chin *et al.* 2008; Thachil *et al.* 2009; Roussan *et al.* 2011; Umali *et al.* 2011; Gornatti Churria *et al.* 2012b; Pan *et al.* 2012a; 2012b; Hablolvarid *et al.* 2014; Sivaseelan *et al.* 2013; Colas *et al.* 2014; Śmietanka *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2015; Morales–Erasto *et al.* 2016). La severidad de los signos clínicos, la duración de la enfermedad y las tasas de mortalidad causadas por los brotes causados por la infección por *O. rhinotracheale* son sumamente variables y están influenciados por una amplia variedad de factores medioambientales (Chin *et al.* 2013). Los signos clínicos de la ornitobacteriosis en pollos parrilleros generalmente ocurren entre las 3 a 6 semanas de vida y comprenden depresión, reducción del consumo alimenticio, reducción de la ganancia de peso, estornudos y edema facial. También se han reportado casos de muerte súbita en pollos parrilleros con trastornos nerviosos asociados a la infección por *O. rhinotracheale* (Goovaerts *et al.* 1998; Chin y Charlton 2008; Chin *et al.* 2013). Aves reproductoras comerciales de 20 a 50 semanas de edad, en el pico de postura de huevos o a poco de comenzar la producción de huevos, puede observarse trastornos respiratorios leves,

reducción del consumo alimenticio, mortalidad baja, reducción de la producción de huevos, reducción del tamaño de los huevos y mala calidad de la cáscara (Chin y Charlton 2008; Chin *et al.* 2013). En aves ponedoras comerciales de 20 a 50 semanas de vida se ha descrito incrementos en la mortalidad, reducción de la producción de huevos y un incremento en el número de huevos deformes (Sprenger *et al.* 2000; Chin y Charlton 2008). En pavos comerciales, las infecciones por *O. rhinotracheale* se han encontrado a la temprana edad de 2 semanas de vida, sin embargo la severidad de los signos clínicos y de la mortalidad se han encontrado incrementadas en parvadas de mayor edad (Chin y Charlton 2008; Chin *et al.* 2013). La mortandades causadas por *O. rhinotracheale* en pavos domésticos generalmente varía entre el 1% y el 15%, pero puede llegar a alcanzar hasta el 50%. La signología clínica asociada a la infección por *O. rhinotracheale* en pavos domésticos se caracteriza por tos, disnea, estornudos, descarga nasal, sinusitis, reducción del consumo del alimento y del agua, postración y muerte (Chin *et al.* 2013). En parvadas comerciales de pavos reproductores, la infección por *O. rhinotracheale* es causante de la reducción de producción de huevos y del incremento del número de huevos inviábiles para la incubación (van Empel y Hafez 1999). *Ornithobacterium rhinotracheale* también ha sido encontrada como causante de signos clínicos locomotores y/o nerviosos tales como parálisis debido a artritis, meningitis, encefalitis, otitis y osteítis craneal en pavos domésticos, pollos parrilleros y perdices rojas (Goovaerts *et al.* 1998; van Empel y Hafez 1999; Chin *et al.* 2008; Moreno *et al.* 2009; Banani *et al.* 2015).

3. LESIONES ANATOMOPATOLÓGICAS

3.1 LESIONES MACROSCÓPICAS

Los hallazgos macroscópicos que se encuentran comúnmente asociados a la infección por *O. rhinotracheale* en pollos parrilleros incluyen neumonías exudativas unilaterales, pleuritis y aerosaculitis abdominal con exudado espumoso y de consistencia similar a yogurt (Shivaprasad 2002; Shivaprasad 2012; Chin *et al.* 2013; Gavrilović 2013). Menos comúnmente, pueden encontrarse otras lesiones en el aparato respiratorio tales como traqueítis catarral y neumonías exudativas bilaterales (Gornatti Churria *et al.* 2012a). *Ornithobacterium rhinotracheale* ha sido encontrado como el agente causal de la elevación de tasas de decomiso que ascendieron al 60% en pollos parrilleros y los hallazgos fueron aerosaculitis en un 84% y neumonías y pericarditis en algunos casos (van Veen *et al.* 2000b). También se han descrito lesiones poco frecuentes asociadas a la infección bacteriana en pollos parrilleros comerciales de 28 días de vida, tales como edema subcutáneo del cráneo, osteítis y osteomielitis junto encefalitis y meningitis (Goovaerts *et al.* 1998; Banani *et al.* 2015).

En pavos domésticos se han encontrado consolidaciones pulmonares unilaterales y bilaterales debido a neumonías y bronconeumonías con exudado fibrinoso en la pleura (Hinz *et al.* 1994; Thachil *et al.* 2009; Tabatabai *et al.* 2010; Chin *et al.* 2013). También han sido descritos en pavos domésticos, la presencia de traqueítis leve a severa, aerosaculitis torácica y/o abdominal de tipo fibrinosuspurativa, pericarditis, peritonitis y, ocasionalmente, tenosinovitis (Hinz *et al.* 1994; Souillard 2002; Chin y Charlton 2008; Thachil *et al.* 2009; Chin *et al.* 2013). En contadas ocasiones se ha encontrado en pavos y pollos domésticos la presencia de hepatomegalia, esplenomegalia, degeneración de

músculo cardíaco e infección de las vértebras y articulaciones intervertebrales como consecuencia de la infección causada por *O. rhinotracheale* (van Empel y Hafez 1999; Chin *et al.* 2013; Gornatti Churria *et al.* 2012a).

3.2 LESIONES MICROSCÓPICAS

A pesar del amplio rango de lesiones microscópicas que pueden presentarse en el aparato respiratorio de aves comerciales en respuesta a la acción de agentes infecciosos y/o medioambientales irritantes (Fletcher 1980), recientemente, se han caracterizado los hallazgos microscópicos asociados a la infección por *O. rhinotracheale* ya que la nombrada especie bacteriana es uno de los agentes etiológicos capaces de producir lesiones severas en el aparato respiratorio inferior en las aves (Glisson 1998; Gavrilović *et al.* 2010; Fletcher *et al.* 2008; Fletcher 2010a; 2010b; 2010c; Gavrilović 2013). Las lesiones microscópicas comúnmente asociadas a la infección por *O. rhinotracheale* se encuentran en pulmones, pleura y sacos aéreos (Chin *et al.* 2013). Las lesiones microscópicas pulmonares causadas por *O. rhinotracheale* son similares a aquellas producidas por *Pasteurella multocida* (Fletcher *et al.* 2008) y se caracteriza por grandes y coalescentes áreas de exudado necrótico localizadas en la luz de los parabronquios afectados junto con infiltración celular inflamatoria heterofílica y fibrina (Fletcher *et al.* 2008). También pueden encontrarse coctas de exudado fibrinoso junto con macrófagos y heterófilos ocupando el lumen de los infundíbulos y atrios y el tejido conectivo intersticial (Fletcher *et al.* 2008; Chin *et al.* 2013). De acuerdo a lo descrito por Fletcher (2010b), las neumonías fibrinoheterofílicas difusas en pavos son consideradas sospechosas de haber sido causadas por *O. rhinotracheale*. La pleura y los sacos aéreos pueden encontrarse

engrosados debido a exudado fibrinoso intersticial, infiltrado celular inflamatorio heterofílico difuso y fibrosis (Chin *et al.* 2013).

4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

4.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (SIGLA EN INGLÉS: PCR)

La técnica de PCR es una herramienta útil no sólo para la identificación de aislamientos sospechosos de *O. rhinotracheale* (van Empel y Hafez 1999; Chansiripornchai *et al.* 2007; Hung y Alvarado 2001; Gornatti Churria *et al.* 2012a; Chin *et al.* 2013) sino también para fines diagnósticos (van Empel y Hafez 1999; Canal *et al.* 2003b; Eroksuz *et al.* 2006; Tsai y Huang 2006; Pyzik *et al.* 2007). Los *primers* OR16S-F1 (5'- GAGAATTAATTTACGGATTAAG-3'), y OR16S-R1 (5'- TTCGCTTGGTCTCCGAAGAT-3') han permitido amplificar un fragmento de 784 pb del gen 16S ARNr de *O. rhinotracheale* (van Empel y Hafez 1999; Hafez 2002; Hung y Alvarado 2001; Canal *et al.* 2003b; Eroksuz *et al.* 2006; Tsai y Huang 2006; Chansiripornchai *et al.* 2007; Pyzik *et al.* 2007; Uriarte *et al.* 2009; Gornatti Churria *et al.* 2011; 2012b). van Empel y Hafez (1999) y Hafez (2002) sostienen que ninguna bacteria relacionada con *O. rhinotracheale* puede ser confundida si los *primers* nombrados son utilizados. Por su parte, Hafez y Beyer (1997), Hung y Alvarado (2001) y Thachil *et al.* (2007) utilizaron la técnica de PCR de consenso intergénico repetitivo de enterobacterias (sigla en inglés: ERIC) y la técnica del ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (sigla

en inglés: RAPD) utilizando el primer Universal M13 de fingerprinting para llevar a cabo la diferenciación de aislamientos de *O. rhinotracheale*. De este modo, Thachil *et al.* (2007) evaluaron 50 aislamientos de campo y 8 aislamientos de referencia de *O. rhinotracheale* utilizando los primers ERIC 1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') y M13 Universal (5'-TTATGTAAAACGACGG CCAGT-3'). La técnica M13 reveló diferentes patrones de fingerprinting en los 6 serotipos de *O. rhinotracheale* que fueron evaluados y fueron denominados como C, D, E, I, J y K. Los aislamientos de referencia de *O. rhinotracheale* identificados como serotipos A y F mostraron patrones indistinguibles por medio de la técnica M13 de fingerprinting. Por su parte, la técnica de ERIC 1R permitió diferenciar sólo 5 de los 8 serotipos de los aislamientos de referencia. De los 58 aislamientos evaluados, que pertenecieron a 8 serotipos de *O. rhinotracheale* que fueron sometidos a la técnica de fingerprinting, se encontraron 10 patrones diferentes de identificación usando la técnica M13 de fingerprinting y 6 patrones diferentes de identificación usando la técnica de ERIC 1R de fingerprinting. Dichos autores concluyeron que la técnica M13 de fingerprinting tuvo mayor poder de diferenciación entre los aislamientos de *O. rhinotracheale* que la técnica de ERIC 1R de fingerprinting (Thachil *et al.* 2007).

4.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPO PULSADO (SIGLA EN INGLÉS: PFGE)

Moreno *et al.* (2008) genotipificaron aislamientos de *O. rhinotracheale* obtenidos de perdices rojas (*Alectoris rufa*) naturales de España con signos neurológicos, otitis y osteomielitis craneal por medio de una técnica modificada de PFGE. Un aislamiento de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Braenderup H9812 sometido a la enzima

*Xba*I se incluyó como control interno de la prueba y el Mid Range PFG Marker II (New England BioLabs Ltd., Canada) fue utilizado como marcador de peso molecular para la determinación del tamaño de las bandas obtenidas. El gel se tiñó con bromuro de etidio y destiñó con agua destilada. Los patrones de PFGE se examinaron y se evaluó la relación genética entre los aislamientos de *O. rhinotracheale* obtenidos de dicho caso. Un aislamiento de *O. rhinotracheale* obtenido de un faisán natural de Francia y no vinculado epidemiológicamente al caso analizado, fue incluido en el estudio. El estudio reveló patrones de macrorestricción indistinguibles entre los aislamientos españoles de *O. rhinotracheale* usando las enzimas de restricción *Apal* y *Sma*I y no fue encontrada relación con los patrones de macrorestricción del aislamiento francés (Moreno *et al.* 2008).

5. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

A pesar de la baja capacidad inmunogénica de *O. rhinotracheale* (Paul C. M. van Empel, 2011, comunicación personal), el estudio de IHQ es un método sensible y valioso para demostrar la presencia del microorganismo en tejidos de pollos parrilleros afectados con trastornos respiratorios y provenientes de casos naturales de infección por *O. rhinotracheale* (Hafez 2002). La técnica de IHQ ha sido descrita para su uso en modelos experimentales utilizando un suero hiperinmune monovalente anti-*O. rhinotracheale* elaborado en conejos para detectar al aislamiento de *O. rhinotracheale* identificado como B3263/91 y perteneciente al serotipo A. Dicho suero hiperinmune fue elaborado a partir de dos aplicaciones de una bacterina en adjuvante oleoso en conejos Neozelandeses con un

intervalo de tres semanas entre las dosis aplicadas. El suero de los conejos inoculados fue cosechado luego de haber transcurrido cuatro semanas de la aplicación de la segunda dosis de la bacterina (van Empel *et al.* 1999). Así también, fue sugerida una segunda opción para la elaboración de suero hiperinmune policlonal anti-*O. rhinotracheale*. Se recomendó la aplicación subcutánea en conejos Neozelandeses de tres dosis de bacterinas oleosas de 0,5 ml cada una siguiendo un intervalo de 5-6 semanas entre las dosis aplicadas (Paul C. M. van Empel, 2011, comunicación personal). La detección de *O. rhinotracheale* por medio de inmunohistoquímica fue obtenida utilizando la técnica de peroxidasa anti-peroxidasa (van Empel *et al.* 1999).

Los resultados de inoculaciones experimentales permitieron encontrar la inmunomarcación de lesiones microscópicas leves, agudas y de corta duración en sacos aéreos como consecuencia de la adhesión bacteriana al epitelio del tracto respiratorio de los pollos parrilleros desafiados con *O. rhinotracheale*, en los que no se realizó la administración de virus capaces de actuar como factores predisponentes (van Empel *et al.* 1999).

6. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Las pruebas serológicas son una herramienta valiosa para el monitoreo y/o diagnóstico de la infección por *O. rhinotracheale* (Chin *et al.* 2013). La principal ventaja de los estudios serológicos sobre los bacteriológicos, es que los primeros pueden detectar anticuerpos que persisten durante semanas luego de la infección causada por el microorganismo y en momentos durante los cuales la bacteria carece de toda viabilidad para ser aislada. Sin embargo, la respuesta inmune por anticuerpos que desencadena *O. rhinotracheale* puede encontrarse afectada por diversos factores tales como tratamientos antibióticos y vacunaciones que pudieran haber recibido las aves estudiadas (Hafez 2002). Las pruebas de ELISA, aglutinación rápida en placa e inmunoensayo sobre membrana fueron descritos para la detección de anticuerpos elaborados contra *O. rhinotracheale* (Back *et al.* 1998; van Empel y Hafez 1999; Sakai *et al.* 2000; Erganiş *et al.* 2002; Hafez 2002; Canal *et al.* 2003a; Allymehr 2006; Eroksuz *et al.* 2006; Chansiripornchai *et al.* 2007; Ghanbarpour y Salehi 2009; Uriarte *et al.* 2010; Walters *et al.* 2010).

6.1 ELISA

La prueba de ELISA permite detectar anticuerpos elaborados contra *O. rhinotracheale* en saco vitelino, aves de un día de vida, y aves con signos clínicos compatibles con la infección por *O. rhinotracheale* (van Empel y Hafez 1999; Refai *et al.* 2005). La prueba de ELISA ha sido desarrollada usando diferentes serotipos y extractos de antígenos de *O. rhinotracheale* (Chin *et al.* 2013) lográndose que tanto pruebas de

ELISA disponibles comercialmente (Biochek, Inc., Estados Unidos de América y IDEXX Laboratories, Inc., Estados Unidos de América) como aquellas obtenidas artesanalmente fueran capaces de detectar anticuerpos contra la mayoría de los serotipos de *O. rhinotracheale* (Hafez 2002). Estudios de seroprevalencia y de evidencia serológica de campo y experimental de *O. rhinotracheale* han sido reportados alrededor del mundo (Sakai *et al.* 2000; Canal *et al.* 2003a; Allymehr 2006; Chansiripornchai *et al.* 2007; Ghanbarpour y Salehi 2009; Uriarte *et al.* 2010; Walters *et al.* 2010). Las infecciones de campo causadas por *O. rhinotracheale* pueden arrojar seropositividad por medio de la prueba de ELISA en las aves evaluadas, reflejando su *status* de aves no vacunadas (Canal *et al.* 2003a; Allymehr 2006; Chansiripornchai *et al.* 2007; Ghanbarpour y Salehi 2009; Uriarte *et al.* 2010).

En el sudeste de Brasil, Canal *et al.* (2003a) describieron la prevalencia verdadera de parvadas positivas de pollos parrilleros (63,83%) y aves reproductoras (100%) y sugirieron la positiva correlación entre la presencia de signos respiratorios y la detección de anticuerpos contra *O. rhinotracheale*.

En Argentina, Uriarte *et al.* (2010) analizaron un total de 739 sueros de parvadas comerciales de pollos parrilleros y aves reproductoras pertenecientes a las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos. Encontraron que 345 sueros fueron positivos a *O. rhinotracheale* (46,7%) y el análisis estadístico demostró mayores posibilidades de seropositividad cuando se analizan aves reproductoras.

La diferenciación de las respuestas serológicas causadas por aislamientos β -hemolíticos (BH) y no hemolíticos (NH) de *O. rhinotracheale* fueron estudiadas por Walters *et al.* (2010). Dichos autores estudiaron un total de 1.200 sueros de ponedoras comerciales de 12 a 14 semanas de edad usando una prueba de ELISA no comercial. A pesar que el

41% de las parvadas analizadas fueron positivas tanto para las infecciones por *O. rhinotracheale* BH y NH, el 49,5% fue únicamente positivo a *O. rhinotracheale* BH y el 64.6% fue únicamente positivo a *O. rhinotracheale* NH. En Tailandia, se encontró positividad en el 68% de los pollos parrilleros estudiados, observándose porcentajes superiores a los previamente observados en Brasil (60%) y Alemania (26%) (Chansiripornchai *et al.* 2007).

En Irán, Allymher (2006) llevó a cabo un estudio serológico y describió que el 44,2% de los sueros de pollos analizados, resultaron positivos a la infección por *O. rhinotracheale* en la provincia de Azerbaijan occidental. Algunos años después, Ghanbarpour y Salehi (2009) encontraron bajos porcentajes de positividad (31,9%) en los sueros de pollos parrilleros analizados en la región sudeste de Irán.

6.2 PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN PLACA

Back *et al.* (1998) desarrollaron y estandarizaron una técnica de aglutinación en placa para la detección rápida de anticuerpos contra *O. rhinotracheale*. Fueron estudiados sueros de pollos parrilleros y pavos domésticos desafiados experimentalmente con *O. rhinotracheale*. Los investigadores pudieron detectar anticuerpos contra esta infección bacteriana en ambas especies aviares usando la técnica de aglutinación en placa, mientras que las aves no desafiadas permanecieron serológicamente negativas (Back *et al.* 1998).

6.3 PRUEBA DE DOT-IMMUNOBINDING

Erganiş *et al.* (2002) desarrollaron la técnica de dot-immunobinding y la compararon con la aglutinación en placa, estudiando sueros de pavos domésticos con trastornos respiratorios para evaluar las posibles respuestas inmunes contra *O. rhinotracheale*. Los autores concluyeron que la técnica desarrollada presentó una menor sensibilidad que las técnicas de aglutinación en placa con las que fue comparada (Erganiş *et al.* 2002).

II) OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de *O. rhinotracheale* en cuadros clínicos respiratorios de aves provenientes de explotaciones avícolas con el fin de determinar su comportamiento en ellas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar e identificar cepas BH y NH de *O. rhinotracheale* a partir de tráqueas y pulmones provenientes de aves de producciones comerciales que tengan cuadros clínicos respiratorios o con historial de seroconversión de ornitobacteriosis.
2. Determinar susceptibilidades antibióticas *in vitro* de *O. rhinotracheale*.
3. Describir hallazgos histopatológicos compatibles con la infección causada por *O. rhinotracheale* en tráqueas y pulmones.
4. Identificar la presencia de *O. rhinotracheale* mediante la técnica de inmunohistoquímica en órganos del tracto respiratorio inferior.
5. Realizar una correlación entre la positividad obtenida mediante la prueba de PCR en tiempo real con los aislamientos de *O. rhinotracheale*.
6. Detectar seropositividad contra *O. rhinotracheale* en aves con enfermedad respiratoria mediante el uso de un test de ELISA disponible comercialmente.
7. Relacionar los hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos con los resultados de aislamientos y pruebas de PCR en tiempo real.
8. Realizar un estudio retrospectivo para determinar la presencia del *O. rhinotracheale* en casos de los archivos de la Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos.
9. Determinar la patogenicidad de cepas BH y NH de *O. rhinotracheale*.

III) HIPÓTESIS RELEVANTES

- *Ornithobacterium rhinotracheale* estuvo y está ampliamente distribuido en las explotaciones de aves comerciales.
- *Ornithobacterium rhinotracheale* está asociado a la manifestación clínica de cuadros respiratorios como patógeno primario en aves criadas con fines comerciales.
- Existen diferencias en cuanto a la patogenicidad entre cepas BH y NH.

IV) CAPÍTULO I
ESTUDIO RETROSPECTIVO

PARTE 1

ESTUDIOS ANATOMOPATOLÓGICOS,

INMUNOHISTOQUÍMICOS Y BACTERIOLÓGICOS

1. INTRODUCCIÓN

Ornithobacterium rhinotracheale ha sido ampliamente estudiado mundialmente. Desde su primera descripción en 1993 por Charlton *et al.* en California, Estados Unidos de América, han sido realizados numerosos trabajos acerca dicho microorganismo. Sin embargo, la mayoría de ellos, se han referido a reportes de casos individuales o a grupos pequeños de aves vinculados a la infección por *O. rhinotracheale*. En todos ellos, no se ha hecho hincapié en la asociación entre los hallazgos anatomopatológicos encontrados y el aislamiento bacteriano obtenido de los órganos afectados (Hauck *et al.* 2015). El presente estudio retrospectivo agrupó todos aquellos casos comprendidos por animales vivos, carcasas y “pooles” de tráqueas y/o pulmones de parvadas de pollos parrilleros y aves reproductoras comerciales que presentaron trastornos clínicos y hallazgos anatomopatológicos a campo compatibles con la infección por *O. rhinotracheale*. El estudio se realizó durante el período comprendido entre septiembre del 2010 y noviembre del 2012, y se realizaron estudios bacteriológicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos para la identificación del agente. El único trabajo retrospectivo previo de *O. rhinotracheale*, es aquel que fue llevado recientemente por Hauck *et al.* (2015), en el que se realizó una revisión de casos de infección por *O. rhinotracheale* en pollos parrilleros y pavos de la región central de California, Estados Unidos de América, durante el período comprendido entre enero del 2000 y diciembre del 2012. Se procesaron muestras provenientes de

animales de diferentes regiones de la Argentina. Se encuentran incluidos los estudios bacteriológicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos de 82 casos. Se realizó el estudio bacteriológico y se obtuvieron 50 aislamientos de *O. rhinotracheale* desde agosto del 2010 hasta noviembre del 2012. Además se pudo establecer la asociación entre estos aislamientos, los hallazgos histopatológicos y la detección de inmutabilidad observada mediante la técnica de IHQ.

A pesar que numerosos estudios han descrito los perfiles de susceptibilidad antibiótica de aislamientos de campo de *O. rhinotracheale* obtenidos de Europa, Asia, Norteamérica y Centroamérica durante el período comprendido entre 1995 y 2012, hasta el momento no fueron descritos los perfiles de susceptibilidad antibiótica de *O. rhinotracheale* en Sudamérica.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar cepas BH y NH de *O. rhinotracheale* a partir de tráqueas y pulmones de aves de producciones comerciales con cuadros clínicos respiratorios o seroconversión asociada a la infección bacteriana nombrada.
- Describir hallazgos histopatológicos compatibles con la infección causada por *O. rhinotracheale* en tráqueas y pulmones.
- Identificar la presencia de *O. rhinotracheale* mediante la técnica de inmunohistoquímica en órganos del tracto respiratorio inferior.
- Relacionar los hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos con los resultados del aislamiento de *O. rhinotracheale*.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Recepción y características de las muestras. Desde septiembre del 2010 hasta noviembre del 2012 fueron remitidas aves vivas, carcasas refrigeradas y “pooles” de tráqueas, pulmones y sacos aéreos refrigerados pertenecientes a parvadas de pollos parrilleros y aves reproductoras de establecimientos comerciales de diversas localidades de la Provincia de Buenos Aires (Por orden alfabético: Abbott, Brandsen, Carmen de Areco, Cañuelas, La Plata, Lima, Olivera, Pedernales, Roque Pérez, San Andrés de Giles, San Antonio de Areco, San Miguel del Monte, San Vicente, Zárate y 25 de Mayo) y Entre Ríos (Concepción del Uruguay) para el estudio diagnóstico de *O. rhinotracheale*. Se analizaron un total de 82 casos durante el período nombrado. Dentro de los casos analizados, se encontraron incluidos 8 casos de aves reproductoras de 9 a 55 semanas de vida y 74 casos de pollos parrilleros de 15 días de vida a 50 días de vida. Así también, 79 de los casos analizados pertenecieron a explotaciones de la Provincia de Buenos Aires, mientras que los 3 casos restantes provinieron de la Provincia de Entre Ríos. En 81 de los casos analizados, se pudieron estudiar los órganos del aparato respiratorio inferior de las aves afectadas.

3.2 Bacteriología. Se tomaron muestras de la mitad superior de cada una de las tráqueas y un tercio de cada uno de cada de los pulmones estudiados, las mismas fueron obtenidas con tijera y pinza diente de ratón estériles y con hisopos estériles. Los hisopos y las muestras de pulmón flameadas se sembraron en agar sangre caprina al 10% (Agar nutritivo, Britania S.A., CABA, Argentina) con gentamicina (Gentamicina, Laboratorio Interbiol SRL, Victoria, Argentina o Genta G, Laboratorio Vetué, Venado Tuerto,

Argentina) y se incubaron a 37°C en jarra con vela durante 24-48 h.

Se estudiaron aquellas placas de Petri de agar sangre caprina al 10% con gentamicina donde se observaron colonias bacterianas puntiformes y grisáceas compatibles con *O. rhinotracheale*. Se las evaluó durante 48 h a temperatura ambiente para la detección de actividad BH, como previamente había sido sugerido por otros investigadores (Walters *et al.* 2009; Tabatabai *et al.* 2010) a fin de poder diferenciar aislamientos BH y NH. Se realizaron la tinción de Gram (Gram, Britania S.A.) y las pruebas de oxidasa (Discos de oxidasa, Britania S.A.) y catalasa (Hidrógeno peróxido 30% P/V, Biopack, Argentina).

3.3 Histopatología. Para este estudio fue se tomó la mitad inferior de cada una de las tráqueas y un tercio de cada uno de los pulmones, los cuales se fijaron en formol neutro al 10%, pH 7, 2 durante 48 h. Luego se las incluyó, de manera rutinaria, en un procesador automático de tejidos (Leica TP1020 Automatic Tissue Processor, Leica Microsystems, Nussloch, Alemania) llevando a cabo una deshidratación progresiva dada por alcohol 50° (1 pasaje), alcohol 80° (1 pasaje), alcohol 96° (3 pasajes) y alcohol 100° (3 pasajes); paso siguiente, se realizó el aclaramiento de las muestras en xileno (Xileno puro, Biopack) (2 veces) y su infiltración e inclusión en parafina (Parafina PF 56-58°C [Pellets], Biopack). Finalmente, se realizó el corte de los mismos con un micrótopo (Leica RM2235 Rotary Microtome, Leica Microsystems) a un espesor de 4 µm y finalmente, tinción con H&E (Hematoxilina cristal, Biopack; Eosina amarillenta, Biopack) siguiendo técnicas histológicas de rutina.

3.4 Criterios de evaluación histopatológica. Se consideraron como lesiones histopatológicas compatibles con la infección causada por *O. rhinotracheale* a la presencia de los hallazgos microscópicos y grados en tráquea y pulmón de las aves estudiadas, expresadas de 1 a 6, según se describe en la Tabla 1 (Página 41).

3.5 Inmunohistoquímica. Para el estudio de IHQ de *O. rhinotracheale*, se seleccionaron todos aquellos casos del estudio retrospectivo en los se pudo llevar a cabo el análisis de uno o más pulmones en cada uno de ellos. A partir de un total de 81 casos que contaron con tejidos para su análisis, se incluyeron los 68 casos que contaron con pulmones para el estudio de IHQ. Se utilizó un anticuerpo primario a partir de un suero hiperinmune policlonal elaborado artesanalmente a partir de la hiperinmunización de conejos neozelandeses utilizando una bacterina obtenida de la inactivación de la cepa ATCC 51463 de *O. rhinotracheale* siguiendo un protocolo recomendado (Carlos J. Perfumo, 2011, comunicación personal) y descrito en el Apéndice I (Página 96). Se aplicó una dilución de trabajo de 1/50 del anticuerpo primario policlonal para su uso rutinario en los estudios de IHQ. Esta dilución fue evaluada en una prueba piloto realizada antes del comienzo del presente plan de trabajo. El sistema revelador consistió en el polímero comercial (nombre en inglés: polymer detection system [PDS]) Histofine® Simple Stain MAX PO (R) (Nichirei Inc., Tokio, Japón), utilizado con buenos resultados en tejidos de aves según la bibliografía consultada (Yamamoto *et al.* 2007a; 2007b; 2008; 2009; 2013; 2016; Yamamoto 2010) y recomendaciones oportunas (Yu Yamamoto, 2010, comunicación personal). La recuperación antigénica fue llevada a cabo en microondas con buffer citrato (10 mmol, pH 6) durante 10–15 minutos a 500 W (Yamamoto *et al.* 2007a; 2007b; 2013; 2016; Yamamoto 2010) y que fue elaborado oportunamente

siguiendo las especificaciones recomendadas (Instituto de Patología “Dr. B. Epstein” y Servicio Central de Microscopía Electrónica 2001). Se utilizó diaminobencidina (DAB) como cromógeno por medio del producto comercial Histofine® 3S-kit (Nichirei Inc., Tokio, Japón), siguiendo las indicaciones del fabricante. Junto a los casos de campo evaluados durante el presente estudio retrospectivo, se incluyeron casos considerados como controles positivos y negativos obtenidos de un modelo experimental realizado con aislamientos seleccionados del cepario de este estudio y llevado a cabo antes del inicio del estudio retrospectivo. También se incluyó un control negativo de la técnica, donde se realizó la aplicación de PBS en lugar del anticuerpo primario en aquellos tejidos de animales infectados experimentalmente.

Los casos de campo, el control positivo y los controles negativos fueron procesados para IHQ siguiendo las indicaciones especificadas en el Apéndice II (Página 97).

3.6 Criterios de evaluación inmunohistoquímica. Los hallazgos pulmonares de IHQ en el estudio retrospectivo fueron considerados como positivos o negativos.

3.7 PCR. La identificación de *O. rhinotracheale* se llevó a cabo realizando la extracción de ADN de colonias bacterianas pertenecientes a aislamientos sospechosos por medio del uso de dos kits comerciales [Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Co., Madison, Wisconsin, Estados Unidos de América) y DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Hamburgo, Alemania)] siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. La premezcla de la reacción de PCR en tiempo real estuvo compuesta por SYBR Green (IQ™ SYBR Green Supermix, BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, California, Estados Unidos de América), *primer forward* [OR16S-F1

(5'-GAGAATTAATTTACGGATTAAG-3'), *primer reverse* [OR16S-R1 (5'-TTCGCTTGGTCTCCGAAGAT-3')] y agua tridestilada estéril. Se realizó de manera rutinaria en la cámara llamada PCR Chamber (Plas Labs, Lansing, Michigan, Estados Unidos de América) agregando cada ingrediente en los volúmenes adecuados. Luego, se realizó la incorporación del molde de ADN del aislamiento o de aquellos aislamientos a estudiar, en otra cámara con flujo laminar llamada PCR Prep Station (Misonix, Farmingdale, Estados Unidos de América) (Apéndice III, página 99). El par de *primers* nombrados se utilizaron de manera rutinaria con el fin de amplificar un segmento del gen 16S ARNr de *O. rhinotracheale* (Hafez 2002).

Se consideró como control positivo a la cepa ATCC 51463 NH de *O. rhinotracheale*.

El protocolo de ciclado de la reacción de PCR en tiempo real que se utilizó de manera rutinaria se encuentra especificado en el Apéndice III (Página 99). La lectura e interpretación de resultados se llevó a cabo en el equipo de PCR en tiempo real llamado IQTM5 Multicolor Real-time PCR Detection System (BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, California, Estados Unidos de América) y utilizando el software IQTM5 Optical System Version 2.1 (BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, California, Estados Unidos de América). En estudios previos realizados en la Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos, mediante el empleo de la técnica de PCR en tiempo real para el estudio de *O. rhinotracheale*, se estableció que la temperatura de "melting" de la nombrada cepa control se considerara en un rango de $86^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, y que todos aquellos aislamientos estudiados y sospechosos que fueron evaluados por medio de esta técnica y tuvieron una temperatura de "melting" incluida dentro del mismo, fueran considerados positivos además de presentar una amplificación de ADN por encima de la línea de base.

3.8 Análisis estadístico. La información se agrupó en tablas de contingencia y se analizó estadísticamente utilizando la prueba de X^2 y prueba exacta de Fisher para la comparación de proporciones. La significancia estadística se estableció en $p = 0,05$.

4. RESULTADOS

En el análisis estadístico del presente estudio retrospectivo, donde se obtuvo el aislamiento de 50 cepas BH y NH de *O. rhinotracheale* y la positividad por IHQ en 48 muestras de pulmón estudiadas (Gornatti Churria *et al.* 2014), permitió realizar múltiples comparaciones entre los parámetros evaluados, arrojando los siguientes resultados con diferencias significativas:

1. En 34/40 casos con el aislamiento bacteriano se observaron resultados positivos para IHQ en pulmón ($p = 0,002$). Tabla A de análisis estadístico (página 41).
2. En 16/26 casos con resultados positivos para IHQ no se observó la presencia de exudado inflamatorio fibrinoso/heterofílico/fibrinoheterofílico en el intersticio pulmonar ($p = 0,013$). Tabla B de análisis estadístico (página 41).
3. En 21/26 casos dónde se observó exudado inflamatorio fibrinoso/heterofílico/fibrinoheterofílico en los pasajes aéreos pulmonares presentaron exudado inflamatorio fibrinoso/heterofílico/fibrinoheterofílico en el lumen traqueal ($p = 0,026$). Tabla C de análisis estadístico (página 42).
4. En 13/26 casos en dónde se observaron focos necróticos en el lumen de los parabronquios pulmonares presentaron exudado inflamatorio fibrinoso/heterofílico/fibrinoheterofílico en el lumen traqueal ($p = 0,005$). Tabla D de análisis estadístico (página 42).

5. En 20/24 casos en donde se observaron focos necróticos en el lumen de los parabronquios pulmonares presentaron respuesta celular inflamatoria heterofílica/mononuclear/mixta en la lámina propia traqueal ($p = 0,032$). Tabla E de análisis estadístico (página 43).
6. En 7/7 casos en donde se observó exudado inflamatorio fibrinoso/heterofílico/fibrinoheterofílico en los pasajes aéreos pulmonares presentaron colonias bacterianas intralesionales y/o asociadas a las ciliadas del epitelio traqueal ($p = 0,044$). Tabla F de análisis estadístico (página 43).

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Mediante el estudio bacteriológico se pudieron identificar 50 aislamientos de casos autóctonos de la provincia de Buenos Aires y Entre Ríos (Gornatti Churria *et al.* 2014), y mediante la técnica de IHQ, se pudo identificar a *O. rhinotracheale* en 48 casos (Gornatti Churria *et al.* 2014). Estos resultados coinciden con los observados por Hafez (2002), en donde se subrayó también la importancia del empleo de la técnica de IHQ como uno de los principales métodos diagnósticos de la ornitobacteriosis. Así mismo cabe destacar que el presente estudio retrospectivo, es el primer trabajo donde se incluye el estudio de IHQ como una herramienta diagnóstica, la cual permite identificar a *O. rhinotracheale* en el tejido. Aunque se observaron lesiones histopatológicas compatibles con la infección causada por *O. rhinotracheale* en pulmón (Figuras 1, 2, 3 y 4) no fue posible observar diferencias significativas entre los hallazgos histopatológicos traqueales y pulmonares y la positividad en los estudios de IHQ realizados. La IHQ permitió identificar a *O. rhinotracheale* en localizaciones tisulares específicas (Ramos-Vara *et al.*

2008; José A. Ramos–Vara, 2013, comunicación personal), tales como la presencia de colonias bacterianas en el lumen de parabronquios (Figura 5) e intralesionales (Figura 6) en el parénquima pulmonar y exudado fibrinoso/fibrinoheterofílico/heterofílico y mononuclear en la luz traqueal, en el lumen de pasajes aéreos (Figuras 7, 8, 9 y 10) y/o en el tejido conectivo intersticial pulmonar (Gornatti Churria *et al.* 2014).

En este estudio no pudo establecerse una relación entre los aislamientos bacteriológicos o la positividad detectada en IHQ con los hallazgos histopatológicos traqueales y pulmonares. Este resultado es diferente a lo descrito por Hauck *et al.* (2015) quienes observaron infiltración celular inflamatoria mononuclear o heterofílica en lámina propia de la tráquea e infiltración celular inflamatoria fibrinoheterofílica en pasajes aéreos pulmonares como los principales hallazgos microscópicos vinculados a la infección causada por *O. rhinotracheale* en pollos parrilleros y pavos comerciales en California. Algunos autores, tal como Hoerr (2010), proponen que existiría una amplia variedad de factores medioambientales estresantes, infecciones causadas por virus inmunosupresores u otros virus con tropismo respiratorio, los cuales serían posibles factores predisponentes y determinantes para incrementar la susceptibilidad frente a infecciones bacterianas, tales como aquellas producidas por *O. rhinotracheale*. En este sentido la ausencia de lesiones observadas en nuestro estudio podrían estar relacionadas con la presencia de estos factores predisponentes, si bien esto no fue analizado en este trabajo.

La evaluación histopatológica de los 68 pulmones incluidos en el presente estudio retrospectivo, arrojó que 5 secciones pertenecientes a pollos parrilleros presentaron un número inusualmente elevado de nódulos cartilaginosos y/o espículas óseas tanto en el intersticio pulmonar como en los pasajes aéreos, a diferencia del escaso número (3 a 4) de nódulos cartilaginosos y/o espículas óseas que normalmente se observan en pulmones

de pollos parrilleros (Fletcher 1980; Fletcher *et al.* 2008). Debido a que algunos autores (Maxwell *et al.* 1988; Fletcher 2010b) postulan que un mayor número de nódulos cartilagosos y/o espículas óseas están posiblemente asociados a hipertensión pulmonar y la consecuente predisposición a afecciones pulmonares, se propone realizar futuros estudios para identificar su posible participación en trastornos pulmonares de pollos parrilleros tales como los producidos por *O. rhinotracheale*.

A modo de conclusión final, el estudio retrospectivo permite observar que *O. rhinotracheale* está presente en el sector avícola en nuestro medio y que produce lesiones evidentes en la población de aves comerciales susceptibles.

Tabla 1. Lesiones histopatológicas compatibles con la infección causada por *O. rhinotracheale* en tráquea y pulmón y grados de lesiones microscópicas del estudio retrospectivo

Tráquea	1) Exudado inflamatorio fibrinoso/heterofílico/fibrinoheterofílico en el lumen traqueal (TRAQ1). 2) Hiperplasia del epitelio de la mucosa traqueal (TRAQ2). 3) Hipertrofia y/o hiperplasia de glándulas mucosas traqueales (TRAQ3). 4) Infiltrado celular inflamatorio heterofílico y/o mononuclear en la submucosa (TRAQ4). 5) Colonias bacterianas intralesionales y/o asociadas a las cilias del epitelio traqueal (TRAQ5). 6) Sin hallazgos microscópicos (TRAQ6).
	TRAQGRADO 1 a 6
Pulmón	1) Exudado inflamatorio fibrinoso/heterofílico/fibrinoheterofílico en pasajes aéreos pulmonares (PUL1). 2) Focos necróticos en el lumen de los parabronquios (PUL2). 3) Hipertrofia y/o hiperplasia de neumocitos (PUL3). 4) Exudado inflamatorio fibrinoso/heterofílico/fibrinoheterofílico en el intersticio pulmonar (PUL4). 5) Colonias bacterianas intralesionales (PUL5). 6) Sin hallazgos microscópicos (PUL6).
	PULGRADO 1 a 6

Análisis estadístico del estudio retrospectivo: tablas de contingencia y comparación de proporciones con diferencias significativas

Tabla A: Relación entre la IHQ y el aislamiento bacteriano

IHC POS	Aislamiento		Total
	No Aislam	Aislamien	
Negativo	14 70.00	6 30.00	20 100.00
Positivo	14 29.17	34 70.83	48 100.00
Total	28 41.18	40 58.82	68 100.00

$p = 0,002$

Tabla B: Relación entre el hallazgo histopatológico PUL4 y la IHQ

PUL4	IHQ			Total
	Negativo	Positivo	Pos Fuerte	
No	4 15.38	16 61.54	6 23.08	26 100.00
Si	16 38.10	11 26.19	15 35.71	42 100.00
Total	20 29.41	27 39.71	21 30.88	68 100.00

$p = 0,013$

Tabla C: Relación entre los hallazgos histopatológicos TRAQ1 y PUL1

TRAQ1	PUL1		Total
	No	Si	
No	25 44.64	31 55.36	56 100.00
Si	5 19.23	21 80.77	26 100.00
Total	30 36.59	52 63.41	82 100.00

$p = 0,026$

Tabla D: Relación entre los hallazgos histopatológicos TRAQ1 y PUL2

TRAQ1	PUL2		Total
	No	Si	
No	45 80.36	11 19.64	56 100.00
Si	13 50.00	13 50.00	26 100.00
Total	58 70.73	24 29.27	82 100.00

$p = 0,005$

Tabla E: Relación entre los hallazgos histopatológicos TRAQ4 y PUL2

TRAQ4	PUL2		Total
	No	Si	
No	24 85.71	4 14.29	28 100.00
Si	34 62.96	20 37.04	54 100.00
Total	58 70.73	24 29.27	82 100.00

p = 0,032

Tabla F: Relación entre los hallazgos histopatológicos TRAQ5 y PUL1

TRAQ5	PUL1		Total
	No	Si	
No	30 40.00	45 60.00	75 100.00
Si	0 0.00	7 100.00	7 100.00
Total	30 36.59	52 63.41	82 100.00

p = 0,044

PARTE 2

PERFILES DE SUSCEPTIBILIDADES ANTIBIÓTICAS

1. INTRODUCCIÓN

Los perfiles de resistencia a los antimicrobianos de aislamientos de *O. rhinotracheale* obtenidos de pollos parrilleros, pavos y aves ponedoras comerciales han sido estudiados en diversas partes del mundo. Sin embargo, los tratamientos con antibióticos contra las infecciones causadas por *O. rhinotracheale* presentan diversas dificultades debido a que la susceptibilidad es variable en los aislamientos, y además depende del régimen y del tipo de antibióticos administrados en cada caso (Chin *et al.* 2013). Los tratamientos antibióticos utilizados contra las infecciones causadas por *O. rhinotracheale* se han vuelto menos efectivos, posiblemente debido al incremento de la patogenicidad del agente, al incremento de la carga bacteriana infectante y/o el incremento del nivel de resistencia antibiótica adquirida (van Veen *et al.* 2001; Malik *et al.* 2003). El desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos comúnmente utilizados generalmente lleva a un incremento de los costos de producción, ya que deben emplearse antibióticos alternativos (Malik *et al.* 2003). Las susceptibilidades antibióticas de *O. rhinotracheale* estudiadas hasta el momento son inconsistentes, ya que no tienen un patrón común, y parecen depender del origen de cuál fue la cepa bacteriana aislada (van Empel y Hafez 1999; Banani *et al.* 2004). Por medio del uso de las técnicas de difusión de discos de antibióticos en agar y microdilución en caldo, diferentes autores evaluaron numerosos aislamientos de *O. rhinotracheale* usando una amplia variedad de

antimicrobianos tales como amikacina, tiamulina, clindamicina, cloranfenicol, espectinomicina, tilosina, tilmicosina, espiramicina, cefalexina, cloxacilina, ceftiofur, penicilina G, amoxicilina, ampicilina, bacitracina, furazolidona, doxiciclina, oxitetraciclina, polimixina B, novobiocina, flumequina, florfenicol, fosfomicina, enrofloxacin, norfloxacin, danofloxacin, clortetraciclina, oxitetraciclina, estreptomycin, eritromycin, lincomycin, metronidazol, pefloxacin, sulfadimetoxina, sulfacloropiridazina, sulfametazina, triple sulfa, neomicina, colistina, sulfamerazina, sulfaquinoxalina, sulfametoxazol-trimetoprima, cefoperazona y sarafloxacin (Devriese *et al.* 1995; 2001; van Empel y Hafez 1999; van Veen *et al.* 2001; Malik *et al.* 2003; Soriano *et al.* 2003; Banani *et al.* 2004; Tsai y Huang 2006; Murthy *et al.* 2008; Chernyshev *et al.* 2011; Gornatti Churria *et al.* 2012a).

Devriese *et al.* (2001) describieron la dificultad de comparar la información de diferentes fuentes de investigación referidas a los patrones de susceptibilidad antibiótica de *O. rhinotracheale* debido a que los métodos utilizados y los criterios de interpretación de resultados no han sido definidos y los criterios de susceptibilidad y resistencia difieren entre los trabajos publicados. A pesar que no se encuentran estandarizados los métodos de evaluación de las susceptibilidades antibióticas *in vitro* de *O. rhinotracheale*, en diversos trabajos publicados se observa que se siguieron las sugerencias del CLSI, previamente conocido como NCCLS, para microorganismos Gram (-) fastidiosos en su crecimiento (Ak y Turan 2001; Malik *et al.* 2003; Tsai y Huang 2006; Murthy *et al.* 2008; Gornatti Churria *et al.* 2011a; 2011b; 2012b). Cabe resaltar que muchos de los trabajos sobre susceptibilidades antibióticas de *O. rhinotracheale* se han realizado en el continente asiático (Ak y Turan 2001; Banani *et al.* 2004; Tsai y Huang 2006; Murthy *et al.* 2008).

En este sentido, Ak y Turan (2001) evaluaron 8 antibióticos utilizando una microdilución en caldo contra 11 aislamientos de *O. rhinotracheale* obtenidos de pollos parrilleros en

Turquía. Encontraron que la enrofloxacin fue el antibiótico más efectivo, mostrando una concentración inhibitoria mínima (CIM) $\leq 0,125-1 \mu\text{g/ml}$ y que todos los aislamientos fueron resistentes a la gentamicina y neomicina. Todos los aislamientos fueron sensibles a la doxiciclina, y excepto por un aislamiento, todos los restantes fueron encontrados resistentes a la danofloxacin. La tilmicosina (CIM $\leq 0,5-4 \mu\text{g/ml}$), eritromicina (CIM $\leq 0,5-8 \mu\text{g/ml}$), y penicilina G (CIM $\leq 4-16 \mu\text{g/ml}$) causaron una inhibición efectiva de los aislamientos estudiados pero a concentraciones antibióticas mayores (Ak y Turan 2001).

Banani *et al.* (2004) obtuvieron 106 cepas de *O. rhinotracheale* de parvadas de pollos y las evaluaron frente a 19 antibióticos usando el método de difusión en discos de antimicrobianos en agar. Todos los aislamientos fueron susceptibles a tiamulina y la mayoría de ellos resultaron susceptibles a cloranfenicol y a la combinación de lincomicina y espectinomicina. Todos los aislamientos fueron resistentes a sulfametoxazol-trimetoprima, colistina y neomicina. La mayoría fue resistente a gentamicina, lincomicina, eritromicina (Banani *et al.* 2004).

Tsai y Huang (2006) obtuvieron un total de 40 aislamientos de campo de *O. rhinotracheale* en Taiwán, de los cuales, 28 aislamientos pertenecieron a pollos parrilleros y los restantes 12 aislamientos a palomas. Los autores utilizaron el método de difusión de discos de antibióticos en agar. La mayoría de los aislamientos de pollos parrilleros (> 80%) fueron susceptibles a amoxicilina, ampicilina, penicilina y oxitetraciclina y resistentes a clindamicina, eritromicina y sulfametoxazol-trimetoprima. Se encontraron diferencias notables en los valores resistencia a clindamicina, eritromicina, gentamicina y tetraciclina al comparar los aislamientos obtenidos de pollos parrilleros y aquellos de palomas (Tsai y Huang 2006).

Murthy *et al.* (2008) evaluaron 18 aislamientos obtenidos de aves ponedoras de huevos

comerciales en India. Se estudiaron 20 antibióticos y agentes antibacterianos por medio de la técnica de difusión de discos de antibióticos en agar. Estos autores encontraron que todos los aislamientos de *O. rhinotracheale* evaluados fueron resistentes a amikacina, ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, doxiciclina, enrofloxacin, eritromicina, oxitetraciclina y penicilina G. La susceptibilidad frente a cefalexina, norfloxacina, pefloxacina, estreptomycin y furazolidona fue variable entre los aislamientos evaluados (Murthy *et al.* 2008).

Se realizaron escasos estudios de susceptibilidades antibióticas de *O. rhinotracheale* en el continente americano, particularmente se llevaron a cabo sólo dos estudios en Norteamérica (Malik *et al.* 2003; Soriano *et al.* 2003). Malik *et al.* (2003) obtuvieron 125 aislamientos de campo de *O. rhinotracheale* de tejidos pulmonares e hisopados traqueales y de exudados de senos infraorbitarios de pavos comerciales con signos respiratorios, que fueron evaluados durante el período 1996-2002 en Minnesota, Estados Unidos de América. Los aislamientos fueron estudiados usando difusión de discos de antibióticos en agar siguiendo las recomendaciones del CLSI. La mayoría de los aislamientos fueron sensibles a clindamicina, eritromicina, espectinomicina y ampicilina. La resistencia contra sulfacloropiridazina disminuyó de 1996 a 2002 mientras que aumentó la resistencia contra gentamicina, ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprima y tetraciclina durante dicho período. Por su parte, la resistencia contra penicilina permaneció constante. Por lo tanto, basándose en sus resultados, Malik *et al.* (2003) sugirieron la necesidad de continuar con el monitoreo de resistencia a los antibióticos de *O. rhinotracheale* y el posible desarrollo de líneas de base para evaluar los patrones de resistencia antibiótica del nombrado microorganismo.

Soriano *et al.* (2003) estudiaron las CIM de 10 aislamientos Mexicanos de

O. rhinotracheale junto con aislamientos de referencia de *O. rhinotracheale* provenientes de Sudáfrica, Europa y Estados Unidos de América. Se utilizaron 10 antibióticos siguiendo el método de microdilución en caldo. La amoxicilina, enrofloxacin y oxitetraciclina inhibieron a todos los aislamientos de referencia a concentraciones de 2-64mg/ml, 4-64 mg/ml y 4-32 mg/ml, respectivamente. Todos los aislamientos de referencia presentaron valores ≥ 128 mg/ml para gentamicina, fosfomicina, trimetoprima, sulfametazina, sulfaquinoxalina y sulfacloropiridazina. La amoxicilina, enrofloxacin y oxitetraciclina inhibieron a los diez aislamientos Mexicanos a una concentración de 32 mg/ml a 128 mg/ml, 4 a > 128 mg/ml y 8 a > 128 mg/ml, respectivamente. Todos los aislamientos Mexicanos mostraron valores de CIM \geq a 128 mg/ml para gentamicina, fosfomicina, trimetoprima, sulfametazina, sulfamerazina, sulfaquinoxalina y sulfacloropiridazina. Soriano *et al.* (2003) no observaron mejoras en brotes sospechosos de infección por *O. rhinotracheale* en pollos parrilleros cuando se administró gentamicina y fosfomicina, que estuvo en concordancia con la marcada resistencia *in vitro* (≥ 128 mg/ml) para ambos antibióticos.

En el continente Europeo, el trabajo realizado por Devriese *et al.* (1995) fue el primero en ser reconocido mundialmente por la descripción de resistencias a los antibióticos de *O. rhinotracheale*. Catorce aislamientos fueron obtenidos de aves gallináceas (pollos, pavos, gallinas de Guinea y perdices) pertenecientes a granjas de Bélgica y fueron evaluados siguiendo la técnica de microdilución en caldo. Los resultados arrojaron la susceptibilidad de todos los aislamientos frente a enrofloxacin y resistencia frente a lincomicina, tilosina, doxiciclina y flumequina. Algunos años después, dichos autores llevaron a la cabo la CIM de 10 antibióticos frente a 45 aislamientos de *O. rhinotracheale* obtenidos de pollos parrilleros Belgas durante el período de 1995 a 1998. Todos los aislamientos fueron

susceptibles a tiamulina y resistentes frente a lincomicina, ampicilina y ceftiofur. Menos del 10% de los aislamientos fueron susceptibles a tilosina y espiramicina y sólo algunos aislamientos fueron susceptibles a enrofloxacin y doxiciclina (Devriese *et al.* 2001).

van Veen *et al.* (2001) obtuvieron un total de 395 aislamientos de *O. rhinotracheale* Holandeses de pollos parrilleros con trastornos respiratorios durante el período comprendido entre 1996 y 1999. Inicialmente los aislamientos fueron evaluados frente a amoxicilina, tetraciclina, enrofloxacin y sulfametoxazol-trimetoprima por medio de la técnica de difusión de discos en agar. La susceptibilidad a amoxicilina y tetraciclina disminuyó en los años sucesivos desde el 62% al 14% mientras que cuatro aislamientos fueron susceptibles enrofloxacin o sulfametoxazol-trimetoprima. Siete antibióticos alternativos (eritromicina, penicilina, gentamicina, tilmicosina, tilosina, ceftiofur y amoxicilina con ácido clavulánico) fueron utilizados posteriormente, para estudiar los 12 aislamientos de *O. rhinotracheale* multiresistentes encontrados. Excepto por la susceptibilidad frente a amoxicilina con ácido clavulánico observada en todos los aislamientos multiresistentes estudiados, la totalidad de los aislamientos mostraron resistencia a los antibióticos utilizados en este segundo estudio (van Veen *et al.* 2001).

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los perfiles de susceptibilidad antibiótica *in vitro* de aislamientos BH y NH de *O. rhinotracheale* mediante una técnica de difusión con discos en agar.
- Comparar y establecer posibles diferencias entre los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos de aislamientos BH y NH de *O. rhinotracheale*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en dos grupos de animales, 57 casos provenientes de parvadas de pollos parrilleros de 21 a 49 días de vida con trastornos respiratorios severos, retraso en el crecimiento, reducción del consumo alimenticio, aumento en la tasa de mortalidad e incremento en las tasas de decomiso. El segundo grupo incluyó 4 casos de parvadas de aves reproductoras de 50 a 55 semanas de vida con trastornos respiratorios severos e incremento en la tasa de mortalidad. Se seleccionaron 38 aislamientos BH y NH de *O. rhinotracheale*. Todos los casos considerados provinieron de establecimientos comerciales de la Provincia de Buenos Aires, Argentina durante el período comprendido entre septiembre del 2010 y abril de 2012. Todos los animales estudiados fueron sometidos a una necropsia completa. Las muestras provinieron de aves que presentaron contenido traqueal mucoso, neumonías y aerosaculitis fibrinosa y fueron remitidas en condiciones refrigeradas luego de 24-48 h de haberse realizado la necropsia. Los hisopados traqueales y las muestras de pulmones y sacos aéreos fueron sembradas en agar sangre caprina al 10% (Agar nutritivo, Britania S.A.) con 5 µg/ml de gentamicina (Genta G, Laboratorio Vetué) e incubadas durante 24-48 h a 37°C en jarra con vela. La identificación bacteriana se realizó por medio de la tinción de GRAM (Gram, Britania S.A.), las pruebas de oxidasa (Discos de oxidasa, Britania S.A.) y catalasa (Hidrógeno peróxido 30% P/V, Biopack) y la utilización de la técnica de PCR en tiempo real, como fue descripto previamente (Gornatti Churria *et al.* 2011a; 2011b; 2012b). Luego de la incubación, las placas de Petri con crecimiento bacteriano por *O. rhinotracheale*, se colocaron a temperatura ambiente durante 48 h a fin de evaluar la presencia de actividad hemolítica. La susceptibilidad antibiótica *in vitro* fue realizada usando la técnica de difusión de

discos en agar, siguiendo descripciones previas (Gornatti Churria *et al.* 2011a; 2011b; 2012b). Se utilizaron placas de agar Mueller-Hinton (Agar Mueller-Hinton, Britania S.A.) con sangre caprina al 10%. Los aislamientos BH y NH de *O. rhinotracheale* fueron inoculados y se incubaron a 37°C durante 24 h junto con los siguientes monodiscos de antibióticos: ampicilina (10 µg/disco, Britania S.A.), sulfametoxazol-trimetoprima (1/24 µg/disco, Vetanco S.A., Buenos Aires, Argentina), gentamicina (10 µg/disco, Britania S.A.), enrofloxacina (5 µg/disco, Vetanco S.A.), eritromicina (15 µg/disco, Britania S.A.), florfenicol (30 µg/disco, Vetanco S.A.), doxiciclina (30 µg/disco, Vetanco S.A.), fosfomicina (50 µg/disco, Britania S.A.).

Debido a que los criterios de interpretación de resultados del método de la difusión de discos en agar no se encuentran estandarizados para *O. rhinotracheale*, se consideraron aquellos criterios de interpretación para microorganismos Gram (-) recomendados por el CLSI para ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprima, gentamicina, enrofloxacina, eritromicina y florfenicol y el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos G. Malbrán” para fosfomicina y doxiciclina. Se utilizaron las cepas ATCC 25922 de *E. coli* y 25923 de *Staphylococcus aureus* en placas de Mueller-Hinton siguiendo las recomendaciones del CLSI., debido a que la evaluación de monodiscos de antibióticos frente a cepas de referencia permite obtener resultados precisos de halos de inhibición y estimar las concentraciones de los monodiscos.

La información se agrupó en tablas de contingencia y se analizó estadísticamente utilizando la prueba de X^2 para la comparación de proporciones. La significancia estadística se estableció en un valor de $p = 0,05$.

4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

De un total de 61 casos de aves con signos respiratorios que fueron remitidos y provenientes de diferentes establecimientos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, se logró un total de 38 aislamientos de campo de *O. rhinotracheale* (62,3%). De los 38 aislamientos obtenidos, 36 de ellos (94,7%) se obtuvieron de parvadas de pollos parrilleros y los 2 (5,3%) aislamientos restantes se obtuvieron de parvadas de aves reproductoras. Durante las 48 h postincubación a temperatura ambiente, se observó que 15 aislamientos mostraron una extensa actividad BH, mientras que los restantes aislamientos no mostraron actividad hemolítica.

A pesar de la dificultad de comparar los resultados de los patrones de resistencia a los antibióticos de *O. rhinotracheale* debido a que, como ya se mencionó, los criterios metodológicos y de interpretación de susceptibilidades no han sido estandarizados y difieren entre los trabajos realizados previamente, los resultados obtenidos en el presente estudio se compararon con aquellos que guardaban similitudes y que están disponibles en forma limitada en la bibliografía. Las recomendaciones sugeridas por el CLSI para la interpretación de resultados de susceptibilidades antibióticas de *O. rhinotracheale*, fueron seguidas previamente por estudios llevados a cabo en Turquía (Ak y Turan 2001), Estados Unidos de América (Malik *et al.* 2003) y Taiwán (Tsai y Huang 2006). En el presente estudio, todos los aislamientos analizados no fueron susceptibles a gentamicina. La mayoría de los aislamientos BH y NH no fueron susceptibles a enrofloxacin (12/15 y 17/23), eritromicina (12/15 y 16/23), sulfametoxazol-trimetoprima (12/15 y 18/23), doxiciclina (10/15 y 16/23) y fosfomicina (8/15 y 14/23) y susceptibles a ampicilina (9/15 y 18/23) y florfenicol(10/15 y 17/23), respectivamente (Tabla 3, página 57). No se

encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los patrones de susceptibilidad antibiótica de los aislamientos BH y NH del presente estudio. La susceptibilidad a florfenicol y ampicilina fue significativamente mayor comparándola con el resto de los antibióticos utilizados. La susceptibilidad a fosfomicina fue significativamente mayor comparada con la susceptibilidad a sulfametoxazol-trimetoprima. En el presente estudio, la susceptibilidad a ampicilina observada en la mayoría de los aislamientos BH y NH se encuentra en concordancia con los resultados previamente encontrados en estudios llevados a cabo en India (Murthy *et al.* 2008) y Taiwán (Tsai y Huang 2006) y en contraste con la resistencia a ampicilina encontrada en Bélgica (Devriese *et al.* 2001), Estados Unidos de América (Malik *et al.* 2003) y Malasia (Mohd-Zain *et al.* 2008). La ausencia de susceptibilidad frente a sulfametoxazol-trimetoprima observada en la mayoría de los aislamientos BH y NH del presente estudio se encuentra en concordancia con los resultados encontrados en Irán (Banani *et al.* 2004), Estados Unidos de América (Malik *et al.* 2003), Malasia (Mohd-Zain *et al.* 2008), India (Murthy *et al.* 2008), Taiwán (Tsai y Huang 2006) y Holanda (van Veen *et al.* 2001). La ausencia de susceptibilidad a enrofloxacin observada en la mayoría de los aislamientos BH y NH se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos en estudios llevados a cabo en Irán (Banani *et al.* 2004) y Malasia (Mohd-Zain *et al.* 2008) y en contraste con la susceptibilidad frente a enrofloxacin observada en estudios en Bélgica (Devriese *et al.* 1995), India (Murthy *et al.* 2008) y México (Soriano *et al.* 2003). La ausencia de susceptibilidad a eritromicina observada en la mayoría de los aislamientos BH y NH de *O. rhinotracheale* se encontró en concordancia con los resultados observados en los estudios realizados previamente en Irán (Banani *et al.* 2004), Taiwán (Tsai y Huang 2006) y Holanda (van Veen *et al.* 2001) y en contraste con la susceptibilidad frente a eritromicina previamente encontrada en

Turquía (Ak y Turan 2001), Estados Unidos de América (Malik *et al.* 2003) e India (Murthy *et al.* 2008). La ausencia de susceptibilidad a gentamicina observada en todos los aislamientos de *O. rhinotracheale* se encuentra en concordancia con la resistencia natural del microorganismo frente a gentamicina (van Empel y Hafez 1999; Chin y Charlton 2008; Gornatti Churria *et al.* 2012a) y con los resultados previamente observados en Turquía (Ak y Turan 2001), Irán (Banani *et al.* 2004), Estados Unidos de América (Malik *et al.* 2003), México (Soriano *et al.* 2003) y Holanda (van Veen *et al.* 2001). La ausencia de susceptibilidad a doxiciclina en la mayoría de los aislamientos BH y NH de *O. rhinotracheale* se encuentra en concordancia con los resultados observados en aislamientos obtenidos en Bélgica (Devriese *et al.* 1995; 2001) y en contraste con la susceptibilidad previamente reportados en estudios llevados a cabo en Turquía (Ak y Turan 2001) e India (Murthy *et al.* 2008). La ausencia de susceptibilidad a fosfomicina observada en la mayoría de los aislamientos BH y NH de *O. rhinotracheale* se encuentra en concordancia con los resultados observados en México (Soriano *et al.* 2003).

El presente estudio de susceptibilidades antibióticas de aislamientos BH y NH de *O. rhinotracheale* es el primero en llevarse a cabo en Sudamérica y a su vez también puede ser considerado como el primero en comparar los patrones de susceptibilidad antibiótica de aislamientos BH y NH. Los antibióticos son usados para tratar y prevenir enfermedades bacterianas en la industria avícola (Malik *et al.* 2003). Los tratamientos con antibióticos en las enfermedades respiratorias en aves de producción comercial han sido siempre cuestionados debido a que, muchos de ellos, tienen una limitada absorción a nivel intestinal, además de los elevados costos económicos que implican su implementación (Devriese *et al.* 2001). Su uso indiscriminado puede conducir a la

resistencia antibiótica de la microflora residente y/o patógena (Malik *et al.* 2003). En la actualidad, la aparición de aislamientos de *O. rhinotracheale* multiresistentes a los antibióticos representa un serio inconveniente emergente en la industria avícola mundial (Mohd-Zain *et al.* 2008). La multiresistencia a los antibióticos de los aislamientos de *O. rhinotracheale* del presente trabajo se consideró cuando se detectó la ausencia de susceptibilidad frente a tres o más familias de antibióticos. En el presente trabajo, 34 de los 38 aislamientos de campo de *O. rhinotracheale* estudiados (89,5%), compuesto por aislamientos BH (n = 14) y NH (n = 20), fueron enfrentados a ocho antibióticos de diferentes familias y se los consideró multiresistentes (Tabla 4, página 58).

La ausencia de susceptibilidad a diversos antibióticos presente en los aislamientos multiresistentes BH y NH de *O. rhinotracheale* obtenidos, puede ser una probable consecuencia del uso indiscriminado o inadecuado de agentes antimicrobianos (Mohd-Zain *et al.* 2008). Esta situación podría estar asociada a la ausencia de restricciones en su uso en las producciones avícolas locales evaluadas.

Los patrones de susceptibilidades antibióticas observados en el presente estudio pueden llegar a ser útiles para la implementación de posibles estrategias de control en producciones avícolas comerciales en Argentina a través del uso adecuado y consciente de antibióticos seleccionados. La implementación de medidas preventivas, tales como el uso de bacterinas comerciales y/o autógenas en aves reproductoras comerciales pueden llegar a ser útiles para el control de la infección por *O. rhinotracheale* cuando no ocurran mejoras clínicas luego del uso de aquellos antibióticos usados con anterioridad.

Tabla 3. Patrones de susceptibilidades antibióticas *in vitro* de 15 aislamientos β -hemolíticos y 23 aislamientos no hemolíticos de *Ornithobacterium rhinotracheale*

Agente antimicrobiano	<i>O. rhinotracheale</i> β -hemolítico		<i>O. rhinotracheale</i> no hemolítico		Todos los aislamientos	
	No susceptible	Susceptible	No susceptible	Susceptible	No susceptible	Susceptible
Ampicilina*	6	9	5	18	11	27
Enrofloxacina*	12	3	17	6	29	9
Eritromicina*	12	3	16	7	28	10
Gentamicina*	15	0	23	0	38	0
Florfenicol*	5	10	6	17	11	27
Trimetoprima-sulfametoxazole*	12	3	18	5	30	8
Doxiciclina [†]	10	5	16	7	26	12
Fosfomicina [†]	8	7	14	9	22	16

* Siguiendo el criterio del Clinical and Laboratory Standards Institute, Pensilvania, Estados Unidos de América.

[†] Siguiendo el criterio del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires, Argentina.

Tabla 4. Resistencia *in vitro* a familias de antibióticos de 14 aislamientos β -hemolíticos y 20 aislamientos no hemolíticos multiresistentes de *Ornithobacterium rhinotracheale*

Resistencia a Familias de antibióticos	N° de aislamientos	
	<i>O. rhinotracheale</i> β -hemolítico	<i>O. rhinotracheale</i> no hemolítico
Tres	5	4
Cuatro	4	5
Cinco	4	7
Seis	2	0
Siete	0	3
Ocho	1	1

V) CAPÍTULO II
MODELO EXPERIMENTAL

1. INTRODUCCIÓN

Con el fin de investigar el rol y la patogenia de *O. rhinotracheale* en aves de corral, se han llevado a cabo diversos trabajos de reproducción experimental utilizando distintos modelos tales como embriones de pavo, pollos, pavos, aves ponedoras y codornices, destacándose que en algunos casos, *O. rhinotracheale* se estudió junto con otros patógenos respiratorios bacterianos y/o virales. (Goovaerts *et al.* 1998; van Empel *et al.* 1999; van Empel y Hafez 1999; van Veen *et al.* 2000b; Marien *et al.* 2005; Thachil *et al.* 2009; Pan *et al.* 2012a; 2012b). Las vías intratraqueal (IT), intratorácica, intranasal, endovenosa (EV) y oculonasal han sido las más utilizadas para la inoculación experimental de *O. rhinotracheale* en aves de corral. Los resultados obtenidos previamente por diferentes investigadores, permitieron demostrar que el origen y los serotipos de los aislamientos de *O. rhinotracheale* utilizados, no influyeron en los resultados finales de las reproducciones experimentales (van Empel y Hafez 1999). En diversos trabajos fue necesario el uso de infecciones virales previas, tales como aquellas por el virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la bronquitis infecciosa o el metapneumovirus aviar, a manera de factor predisponente para la aparición de lesiones macroscópicas y/o microscópicas causadas por la infección posterior por *O. rhinotracheale* (van Empel *et al.* 1999; van Empel y Hafez 1999; Marien *et al.* 2005). A pesar que algunas especies bacterias tales como *E. coli* y *B. avium* han sido consideradas como factores predisponentes capaces de inducir a la aparición de lesiones por *O. rhinotracheale*, se comprobó que su eficacia en el nombrado rol al compararlas con los virus nombrados anteriormente (van Empel y Hafez 1999; Thachil *et al.* 2009). Pan *et al.* (2012a) describieron que la asociación entre *O. rhinotracheale* y *S. zooepidemicus* pudieron causar mayores mortandades y lesiones bronquiales en pollos que aquellas

causadas por una u otra especie bacteriana cuando fueron administradas individualmente. Sin embargo, ha sido demostrado que *O. rhinotracheale* puede llegar a causar lesiones por sí mismo en pollos y codornices sin la necesidad de infecciones virales, bacterianas previas o factores medioambientales estresantes (Goovaerts *et al.* 1998; van Empel y Hafez 1999; van Veen *et al.* 2000b; Eroksuz *et al.* 2006; Pan *et al.* 2012a; 2012b). Sólo un trabajo previo realizó la comparación de cepas BH y NH de *O. rhinotracheale* en un modelo experimental en pavos (Walters 2014; Walters *et al.* 2014) detectando una mayor patogenicidad en los grupos inoculados por la cepa NH de *O. rhinotracheale* empleada.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir hallazgos histopatológicos compatibles con la infección causada por *O. rhinotracheale* en tráqueas y pulmones.
- Identificar la presencia de *O. rhinotracheale* mediante la técnica de inmunohistoquímica en órganos del tracto respiratorio inferior.
- Relacionar los hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos con los resultados del aislamiento de *O. rhinotracheale*.
- Determinar posibles diferencias de patogenicidad entre cepas BH y NH de *O. rhinotracheale*.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Aislamientos bacterianos seleccionados: fueron seleccionadas dos aislamientos del cepario de *O. rhinotracheale* obtenido durante el estudio retrospectivo de la presente Tesis Doctoral para la realización del modelo experimental. Ambas cepas

habían sido aisladas de casos de parvadas de pollos parrilleros con trastornos respiratorios y mortalidades aumentadas. Una de las cepas no presentó ningún tipo de actividad hemolítica, mientras que la restante presentó una extensa actividad BH durante las 48 h postincubación a temperatura ambiente.

3.2 Preparación del inóculo: Ambas cepas se sembraron placas de Petri con agar sangre caprina al 10% (Agar Nutritivo, Britania S.A.) y se incubaron en microaerofilia a 37°C durante 24 h. Luego, el total de las colonias bacterianas de cada una de las placas, se repicó en 20 ml de caldo cerebro corazón (Caldo cerebro corazón, Britania S.A.) enriquecido con suero equino adulto estéril al 10% (Internegocios S.A., Mercedes, Argentina) para luego incubarlos a baño maría y en agitación continua durante 15 h a 37°C. Paso siguiente, previo a la descarga de los inóculos en los animales de experimentación, se realizó el conteo viable de ambos aislamientos seleccionados. Para ello, se utilizó PBS estéril que fue fraccionado en 11 tubos de ensayos estériles con 9 ml de ella y rotulándolos como 10^1 hasta 10^{11} para cada uno de los dos aislamientos. En el primer tubo de ensayo se descargó 1 ml del inóculo bacteriano, para luego de mezclarlo cinco veces, se descargó 1 ml de dicho tubo en el rotulado como 10^2 . Así sucesivamente, se realizó el mismo procedimiento hasta llegar al tubo 10^{11} , cuyo contenido se mezcló de la misma manera, y se descartó 1 ml de su contenido. Finalmente, 100 μ l de cada una de las diluciones (10^1 a 10^{11}) de ambos aislamientos fueron sembrados en una placa de Petri con agar sangre caprina al 10% y esparcida por medio de una espátula, la cual fue esterilizada con flameo entre sus usos. Todas las placas se incubaron en microaerofilia durante 24 h a 37°C. El conteo viable de la cepas BH y NH de *O. rhinotracheale*

seleccionadas, fue de 50×10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC) y 40×10^{10} UFC, respectivamente.

3.3 Selección y organización en grupos de las aves de experimentación: fueron seleccionados 25 pollos parrilleros de 3 semanas de vida provenientes de una explotación comercial localizada en la Provincia de Buenos Aires, Argentina, cuyos progenitores habían sido sometidos a estrictas normas de bioseguridad durante su crianza. Luego, las aves seleccionadas fueron alojadas en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, distribuyéndose en grupos de 5 aves por jaula. Cada una de estas jaulas, se caracterizó por estar fabricadas de acero inoxidable y por presentar 1 m de largo x 60 cm de ancho con una sobreelevación del piso de 80 cm. Los animales fueron alojados durante una semana previa al inicio del modelo experimental para su aclimatación al nuevo alojamiento, para realizar el retiro de todo tratamiento antibiótico al que pudieran estar sometidos durante su crianza comercial y para la posible observación de trastornos que pudieran presentar las aves. La alimentación, compuesto por alimento balanceado para pollos parrilleros, y el agua de red de bebida fueron administrados *ad-libitum* durante la nombrada semana como durante toda la duración del modelo experimental. Debajo de las jaulas fue colocada una gruesa capa de viruta con la finalidad de posibilitar la absorción y contención de las deyecciones eliminadas y cuyo cambio se realizó según se consideró necesario. Los animales fueron alojados en salas con luz natural y artificial. Finalmente, la ventilación fue provista por la apertura de las ventanas de cada una de las salas utilizadas durante la experiencia.

Las aves fueron agrupadas en cinco grupos de cinco aves cada uno, considerándose de la siguiente manera:

Grupo 1: inoculación IT con un aislamiento BH de *O. rhinotracheale*.

Grupo 2: inoculación EV con un aislamiento BH de *O. rhinotracheale*.

Grupo 3: inoculación IT con un aislamiento NH de *O. rhinotracheale*.

Grupo 4: inoculación EV con un aislamiento NH de *O. rhinotracheale*.

Grupo 5: sin descarga bacteriana. Fue considerado como grupo control negativo.

3.4 Manejo y cuidado de las aves de experimentación. Las aves fueron alojadas, alimentadas y manejadas en la etapa previa del modelo experimental y durante el mismo siguiendo las regulaciones sugeridas oportunamente por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

La descarga de los inóculos por las vías IT y EV fue realizada por medio del uso de una jeringa de tuberculina y una jeringa y aguja de tuberculina, respectivamente. En ambos casos, el volumen del inóculo consistió en 0,2 ml. Fue considerado como el día 0 del modelo experimental. La realización de los hisopados del tercio superior de las tráqueas de los animales de la experiencia se llevó a cabo con hisopos de mango de madera de 20 cm de largo que previamente se embebieron en caldo cerebro corazón y luego se sembraron en placas de agar sangre caprina al 10% con gentamicina e incubaron a 37°C durante 24-48 h en microaerofilia. Las muestras fueron Las extracciones de sangre se realizaron por medio de la utilización de jeringas de 5 cm y agujas de cono verde. Los 1 a 2 cm³ de sangre extraídos fueron colocados en tubos de hemólisis ubicados horizontalmente hasta la formación del coágulo. Una vez formado este, los tubos fueron dispuestos verticalmente en una gradilla a 37°C para favorecer el exudado del suero en cada uno de los tubos.

Día 1: fue llevado a cabo el primer muestreo de hisopados traqueales de cada uno de los cinco animales de los cinco grupos. Los cinco hisopos de cada uno de los cinco grupos se colocaron en un tubo de ensayo estéril rotulado con tapón para su posterior siembra en agar sangre caprina con gentamicina. Se realizó la primera extracción de sangre, obteniendo 1 a 2 ml de cada ave y se colocó en un tubo de hemólisis en posición horizontal. Luego de formado el coágulo de sangre, cada uno de los tubos fueron ubicados en posición vertical en una estufa por 30-40' para favorecer el desuerado y finalmente el suero obtenido de cada una de las muestras fue almacenada a -20°C.

Día 2: se llevó a cabo el segundo muestreo de hisopados traqueales de cada uno de los animales de los cinco grupos. Los cinco hisopos de cada uno de los cinco grupos se colocaron en un tubo de ensayo estéril rotulado, para su posterior siembra en agar sangre caprina con gentamicina.

Día 3: fue llevado a cabo el tercer muestreo de hisopados traqueales de cada uno de los animales de los cinco grupos. Los cinco hisopos de cada uno de los cinco grupos se colocaron en un tubo de ensayo estéril rotulado, para su posterior siembra en agar sangre caprina con gentamicina

Día 7: se realizó la segunda extracción de sangre. Se siguió el mismo procedimiento que en el día 1. Se realizó la necropsia de 2 aves de cada uno de los grupos del modelo experimental. Se realizó el primer muestreo de órganos incluyendo tráqueas, pulmones e hígados que fueron fijados en formol neutro al 10%, pH 7,2 durante 48 h y procesados para su inclusión en parafina y tinción con hematoxilina y eosina siguiendo procedimientos de rutina. El procesamiento de las muestras para IHQ se llevó a cabo según lo descrito en el Apéndice II (Página 97)

Día 14: se realizó la tercera extracción de sangre. Se siguió el mismo procedimiento que en los días 1 y 7. Se realizó la necropsia de las tres aves restantes de cada uno de los cinco grupos del modelo experimental. Se realizó el segundo muestreo de órganos siguiendo el mismo procedimiento que en el día 7.

3.5 Criterios de evaluación histopatológica. Se consideraron como lesiones histopatológicas compatibles con la infección causada por *O. rhinotracheale* a la presencia de los hallazgos microscópicos y grados en tráquea, pulmón e hígado de las aves estudiadas, según lo descrito en la Tabla 5 (Página 74).

3.6 Criterios de evaluación inmunohistoquímica. Para el estudio de IHQ de *O. rhinotracheale*, se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito que en el Capítulo I (Página 35).

3.7 Evaluación bacteriológica. Los hisopados traqueales de los días 1, 2 y 3 de cada uno de las cinco aves de los cinco grupos se sembraron en agar sangre caprina al 10% (Agar nutritivo, Britania S.A.) con gentamicina (Gentamicina, Laboratorio Interbiol SRL o Genta G, Laboratorio Vetué) y se incubaron a 37°C en jarra con vela durante 24-48 h. Las placas de Petri de agar, dónde se observaron colonias bacterianas puntiformes y grisáceas compatibles con *O. rhinotracheale*, fueron evaluadas durante 48 h a temperatura ambiente para la detección de actividad BH. Se realizó la tinción de Gram (Gram, Britania S.A.) y las pruebas de oxidasa (Discos de oxidasa, Britania S.A.) y catalasa (Hidrógeno peróxido 30% P/V, Biopack). Se siguieron los procedimientos para la

realización de los estudios bacteriológicos según lo descrito previamente en el Capítulo I (Página 32).

3.8 Evaluación serológica. Un μl de suero de cada uno de las aves de los cinco grupos obtenidas durante los días 1, 7 y 14 del modelo experimental fue analizado por medio del uso del kit de ELISA comercial llamado *Ornithobacterium rhinotracheale* Antibody Test Kit (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Estados Unidos de América) siguiendo las recomendaciones del fabricante, considerando los siguientes pasos:

- 1) Diluir 1 μl de cada uno de los sueros problema en 500 μl de diluyente para muestras [*Sample diluent*]*.
- 2) Colocar 100 μl de los controles negativos [*Negative control ORT*]* en los pocillos 1 y 2. Colocar 100 μl de los controles positivos en los pocillos 3 y 4 [*Positive control ORT*]*. A partir del pocillo 5, colocar 100 μl de cada una las mezclas del diluyente y los sueros a analizar.
- 3) Dejar incubar a 37°C a temperatura ambiente durante 30'.
- 4) Lavar los pocillos de la placa utilizada con agua de destilada durante 2 a 3 veces.
- 5) Colocar 100 μl del conjugado [*Conjugate*]* en cada uno de los pocillos utilizados.
- 6) Dejar incubar a 37°C a temperatura ambiente durante 30'.
- 7) Lavar los pocillos de la placa utilizada con agua de destilada durante 2 a 3 veces.
- 8) Colocar 100 μl del sustrato [*TMB substrate*]* en cada uno de los pocillos utilizados
- 9) Dejar incubar a 37°C a temperatura ambiente durante 15'.
- 10) Colocar 100 μl de la solución de frenado [*Stop solution*]* en cada uno de los pocillos utilizados.
- 11) Llevar a cabo la lectura de la placa utilizada por medio del lector de ELISA ELx800™

(BioTek™, Winooski, Vermont, Estados Unidos de América) utilizando un filtro de 650 nm y del software IDEXX xChek® (IDEXX Laboratories, Inc.).

* Entre corchetes y en cursiva figuran los nombres en inglés de cada uno de los componentes del kit comercial utilizado.

Se consideraron los hallazgos serológicos en los grupos evaluados como ausencia o presencia de seropositividad.

3.9 PCR. La identificación de *O. rhinotracheale* se llevó a cabo realizando la extracción de ADN de colonias bacterianas pertenecientes a aislamientos sospechosos por medio del uso de Papel Nucleico ADN (Biodynamics, CABA, Argentina) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La premezcla de la reacción de PCR en tiempo real estuvo compuesta por SYBR Green (SYBR Select Master Mix, Applied Biosystems by Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos de América), *primer forward* y *primer reverse* similares a los Capítulo I y agua tridestilada estéril. La mezcla de los ingredientes, agregado del molde ADN de los aislamientos a estudiar y la lectura e interpretación de resultados se llevó a cabo según lo descrito en el Capítulo I (Página 35). El protocolo de ciclado de la reacción de PCR en tiempo real utilizado de manera rutinaria para *O. rhinotracheale* fue el incluido en el Apéndice III (Página 99).

3.10 Análisis estadístico. La información se agrupó en tablas de contingencia y se analizó estadísticamente utilizando la prueba de X^2 y prueba exacta de Fisher para la comparación de proporciones. La significancia estadística se estableció en un valor de $p = 0,05$.

4. RESULTADOS

El grupo control negativo (grupo 5) presentó grado 0 para las lesiones microscópicas traqueales, pulmonares y hepáticas. Del mismo modo, el grupo control negativo no presentó seropositividad. A pesar de no haber podido llevar a cabo el re-aislamiento de las cepas inoculadas de *O. rhinotracheale* en los grupos desafiados, el análisis del estudio estadístico del presente modelo experimental permitió realizar múltiples comparaciones entre los grupos inoculados por vía IT y EV con un aislamiento BH de *O. rhinotracheale* (grupos 1 y 3, respectivamente) y aquellos inoculados por las mismas vías con un aislamiento NH de *O. rhinotracheale* (grupos 2 y 4, respectivamente), arrojando los siguientes resultados con diferencias significativas entre los grupos creados para su análisis estadístico:

1. El grupo BH e IT tuvo un mayor grado de lesión microscópica traqueal que el grupo BH y EV (8/8, $p = 0,001$). Tabla A del análisis estadístico (Página 75).
2. El grupo NH e IT tuvo un mayor grado de lesión microscópica traqueal que el grupo NH y EV (8/8, $p = 0,001$). Tabla B del análisis estadístico (Página 75).
3. El grupo IT tuvo un mayor grado de lesión microscópica traqueal que el grupo EV (16/16, $p = 0,001$). Tabla C del análisis estadístico (Página 76).
4. El grupo EV tuvo una mayor proporción de aves con lesiones microscópicas hepáticas que el grupo IT (6/6, $p = 0,018$). Tabla D del análisis estadístico (Página 76).
5. El grupo de 14 días tuvo una mayor proporción de aves con un mayor grado de lesión microscópica pulmonar que el grupo de 7 días (12/12, $p = 0,001$). Tabla E del análisis estadístico (Página 77).

6. El grupo de 14 días tuvo una mayor proporción de aves positivas con lesiones microscópicas hepáticas que el grupo de 7 días (6/6, $p = 0,001$). Tabla F de análisis estadístico (Página 77).
7. El grupo de 14 días tuvo un mayor grado de lesiones microscópicas traqueales, pulmonares y hepáticas que el grupo de 7 días (12/12, $p = 0,000$). Tabla G de análisis estadístico (Página 78).
8. El grupo de 7 días y NH tuvo un mayor grado de lesión microscópica pulmonar que el grupo de 7 días y BH (10/15, $p = 0,033$). Tabla H del análisis estadístico (Página 78).
9. El grupo de 7 días e IT tuvo un mayor grado de lesión microscópica traqueal que el grupo de 7 días y EV (10/10, $p = 0,001$). Tabla I del análisis estadístico (Página 79).
10. El grupo de 7 días e IT tuvo un mayor grado de lesiones microscópicas traqueales, pulmonares y hepáticas que el grupo de 7 días y EV (10/10, $p = 0,001$). Tabla J del análisis estadístico (Página 79).
11. El grupo de 14 días e IT tuvo un mayor grado de lesión microscópica traqueal que el grupo de 14 días y EV (6/6, $p = 0,002$). Tabla K del análisis estadístico (Página 80).
12. Todas las aves del grupo de 14 días y EV fueron positivas para las lesiones microscópicas hepáticas mientras que todas las aves del grupo de 14 días e IT fueron negativas a ellas (6/6, $p = 0,002$). Tabla L del análisis estadístico (Página 80).

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo experimental no se observaron diferencias significativas entre los grupos inoculados en cuanto a la detección de seropositividad contra *O. rhinotracheale*. Al igual que en modelos experimentales realizados con anterioridad (Sprenger *et al.* 1998; van Veen *et al.* 2000b; Walters 2014; Walters *et al.* 2014), tanto la vía IT como la vía EV, permitieron estudiar exitosamente la acción de *O. rhinotracheale* en el presente modelo experimental. La vía de inoculación IT empleada permitió obtener un mayor grado de lesión microscópica traqueal que la vía de inoculación EV, tanto a los 7 días como a los 14 días en los grupos inoculados con los aislamientos BH o NH de *O. rhinotracheale*, observándose una relación directa entre la vía de inoculación IT y los hallazgos microscópicos traqueales.

La vía de inoculación EV empleada permitió obtener lesiones microscópicas hepáticas tanto a los 7 días como a los 14 días en los grupos inoculados con los aislamientos BH o NH de *O. rhinotracheale*, afirmando una relación directa entre la vía inoculación EV y los hallazgos microscópicos hepáticos.

Los grupos de 14 días inoculados con los aislamientos BH o NH por las vías IT o EV presentaron un mayor grado de lesiones microscópicas pulmonares y hepáticas, y un mayor grado en la sumatoria de lesiones microscópicas que los grupos de 7 días, permitiendo vincular el mayor tiempo de exposición al agente etiológico estudiado con una mayor severidad de las lesiones microscópicas encontradas.

Los grupos de 7 días inoculados con el aislamiento NH de *O. rhinotracheale* por vía IT o EV permitieron obtener un mayor grado lesión microscópica pulmonar que los grupos de 7 días inoculados con el aislamiento BH de la bacteria estudiada, pudiendo especular que

el aislamiento NH presenta una mayor patogenicidad que el aislamiento BH, al igual que lo propuesto por Walters (2014) y Walters *et al.* (2014) en su modelo experimental realizado en pavos comerciales en donde se comprobó una mayor patogenicidad en pulmón causada por el aislamiento NH de *O. rhinotracheale* utilizado.

El presente modelo experimental, en contraposición a lo expuesto por Back *et al.* (1998b), comprobó satisfactoriamente la acción de *O. rhinotracheale* como inductor de lesiones al igual que lo propuesto por investigaciones anteriores (van Empel *et al.* 1996; Sprenger *et al.* 1998; van Veen *et al.* 2000b; Eroksuz *et al.* 2006; Kiliç *et al.* 2009; Walters 2014; Walters *et al.* 2014). A pesar que van Veen *et al.* (2000b) describieron una disminución progresiva de la severidad de las lesiones encontradas luego del desafío experimental y que van Empel *et al.* (1999) y Kiliç *et al.* (2009) resaltaron el rol de *O. rhinotracheale* asociado a un efecto patógeno transitorio y sobre todo como causante de lesiones en sacos aéreos de las aves desafiadas experimentalmente, los resultados del presente modelo experimental, por el contrario, sostienen un mayor grado de lesiones microscópicas en pulmón e hígado junto con un mayor grado en la sumatoria de lesiones microscópicas a medida que aumentó de exposición al agente etiológico a los 14 días posinoculación. Los resultados obtenidos de comparar los hallazgos microscópicos ocasionados por los aislamientos BH y NH de *O. rhinotracheale* empleados a los 7 y 14 días de experimentación, permitieron reconocer una mayor patogenicidad pulmonar del aislamiento NH de *O. rhinotracheale* empleado luego de la primer semana de experimentación tal como lo afirma Walters (2014) y Walters *et al.* (2014) en el modelo experimental llevado a cabo en pavos comerciales. Recientemente se postuló una posible mayor patogenicidad de las cepas BH de *O. rhinotracheale* en base a la presencia de una proteína similar a hemolisina en ellas

(Tabatabai *et al.* 2010). La nombrada proteína en otras especies bacterianas es considerada como un factor de virulencia (Walters 2014; Walters *et al.* 2014), asimismo, existe información provista por algunos autores referida a que las elevadas mortandades en pollos parrilleros comerciales que estarían causadas por aislamientos BH de *O.*

rhinotracheale (Walters *et al.* 2014). Sin embargo, los resultados obtenidos por Walters *et al.* (2011) en estudios de letalidad en huevos embrionados, también aquellos encontrados por Walters *et al.* (2014) en su modelo experimental en pavos comerciales y los resultados del presente modelo experimental en pollos parrilleros, quizás permitirían sostener que las cepas NH tendrían potencialmente mayor patogenicidad en aves comerciales. Debido a ello puede proponerse que las elevadas mortandades encontradas en parvadas comerciales de pollos parrilleros y supuestamente producidas por aislamientos BH de *O. rhinotracheale*, podrían en realidad estar asociadas a trastornos infecciosos concomitantes y/o factores medioambientales estresantes predisponentes y/o concurrentes (Walters *et al.* 2014).

Aunque no se propuso realizar la detección de la posible presencia de signología clínica en los grupos desafiados por la inoculación de cepas BH y NH de *O. rhinotracheale* en el presente modelo experimental, no se detectaron cuadros clínicos respiratorios en los mismos, así como describió previamente Walters *et al.* (2014) en su modelo experimental en pavos comerciales.

La vía de inoculación EV empleada en el presente modelo experimental logró causar lesiones microscópicas hepáticas al igual que los hallazgos histopatológicos en hígado demostrados por van Veen *et al.* (2000a; 2000b) en pollos parrilleros libres de patógenos específicos e inoculados por la misma vía con aislamientos de *O. rhinotracheale* de diverso origen geográfico.

Tabla 5. Lesiones histopatológicas compatibles con la infección causada por *O. rhinotracheale* en tráquea, pulmón e hígado y grados de lesiones microscópicas del modelo experimental

Tráquea	1) Exudado inflamatorio fibrinoso/heterofílico/fibrinoheterofílico en el lumen traqueal (TRAQ1). 2) Hiperplasia del epitelio de la mucosa traqueal (TRAQ2). 3) Hipertrofia y/o hiperplasia de glándulas mucosas traqueales (TRAQ3). 4) Infiltrado celular inflamatorio heterofílico y/o mononuclear en la submucosa (TRAQ4). 5) Colonias bacterianas intralesionales y/o asociadas a las cilias del epitelio traqueal (TRAQ5). 6) Sin hallazgos microscópicos (TRAQ6).
	TRAQGRADO 1 a 6
Pulmón	1) Exudado inflamatorio fibrinoso/heterofílico/fibrinoheterofílico en pasajes aéreos pulmonares (PUL1). 2) Focos necróticos en el lumen de los parabronquios (PUL2). 3) Hipertrofia y/o hiperplasia de neumocitos (PUL3). 4) Exudado inflamatorio fibrinoso/heterofílico/fibrinoheterofílico en el intersticio pulmonar (PUL4). 5) Colonias bacterianas intralesionales (PUL5). 6) Sin hallazgos microscópicos (PUL6).
	PULGRADO 1 a 6
Hígado	0) Ausencia de lesiones microscópicas hepáticas 1) Presencia de lesiones microscópicas hepáticas (focos de necrosis coagulativa, focales/multifocales/multifocales a coalescentes; colonias bacterianas intralesionales asociadas a focos necróticos hepáticos; y respuesta celular inflamatoria heterofílica y/o mononuclear focal/multifocal/focalmente extendida/difusa).
	HIGADO 0 a 1

Análisis estadístico del modelo experimental: tablas de contingencia y comparación de proporciones con diferencias significativas

1. Tabla A: Relación entre el hallazgo histopatológico TRAQGRADO y las vías de inoculación IT y EV con aislamiento BH

TRAQGRADO	Grupo		Total
	BH-IT	BH-EV	
0	0 0.00	3 100.00	3 100.00
1	0 0.00	5 100.00	5 100.00
3	8 100.00	0 0.00	8 100.00
Total	8 50.00	8 50.00	16 100.00

p = 0,001

2. Tabla B: Relación entre el hallazgo histopatológico TRAQGRADO y las vías de inoculación IT y EV con aislamiento NH

TRAQGRADO	Grupo		Total
	NH-IT	NH-EV	
0	0 0.00	8 100.00	8 100.00
3	8 100.00	0 0.00	8 100.00
Total	8 50.00	8 50.00	16 100.00

p = 0,001

3. Tabla C: Relación entre el hallazgo histopatológico TRAQGRADO y las vías de inoculación IT y EV con aislamientos BH y NH

TRAQGRADO	Grupo		Total
	IT (BH&NH)	EV (BH&NH)	
0	0 0.00	11 100.00	11 100.00
1	0 0.00	5 100.00	5 100.00
3	16 100.00	0 0.00	16 100.00
Total	16 50.00	16 50.00	32 100.00

p = 0,001

4. Tabla D. Relación entre el hallazgo histopatológico HÍGADO y las vías de inoculación IT y EV con aislamientos BH y NH

HIGADO	Grupo		Total
	IT (BH&NH)	EV (BH&NH)	
NO	16 61.54	10 38.46	26 100.00
SI	0 0.00	6 100.00	6 100.00
Total	16 50.00	16 50.00	32 100.00

p = 0,018

5. Tabla E: Relación entre el hallazgo histopatológico PULGRADO y los grupos inoculados a los 7 y 14 días

PULGRADO	Grupo		Total
	7d	14d	
2	5	0	5
	100.00	0.00	100.00
3	15	0	15
	100.00	0.00	100.00
4	0	12	12
	0.00	100.00	100.00
Total	20	12	32
	62.50	37.50	100.00

p = 0,001

6. Tabla F: Relación entre el hallazgo histopatológico HIGADO y los grupos inoculados a los 7 y 14 días

HIGADO	Grupo		Total
	7d	14d	
NO	20	6	26
	76.92	23.08	100.00
SI	0	6	6
	0.00	100.00	100.00
Total	20	12	32
	62.50	37.50	100.00

p = 0,001

7. Tabla G: Relación entre el hallazgo histopatológico HISTOGRADO y los grupos inoculados a los 7 y 14 días

HISTOGRADO	Grupo		Total
	7d	14d	
4	5	0	5
	100.00	0.00	100.00
5	5	0	5
	100.00	0.00	100.00
6	10	0	10
	100.00	0.00	100.00
7	0	12	12
	0.00	100.00	100.00
Total	20	12	32
	62.50	37.50	100.00

p = 0,001

8. Tabla H: Relación entre el hallazgo histopatológico PULGRADO y los grupos inoculados a los 7 días con aislamientos BH y NH

PULGRADO	Grupo		Total
	BH 7d	NH 7d	
2	5	0	5
	100.00	0.00	100.00
3	5	10	15
	33.33	66.67	100.00
Total	10	10	20
	50.00	50.00	100.00

p = 0,033

9. Tabla I: Relación entre el hallazgo histopatológico TRAQGRADO y los grupos inoculados a los 7 días por las vías IT y EV

TRAQGRADO	Grupo		Total
	IT 7d	EV 7d	
0	0 0.00	5 100.00	5 100.00
1	0 0.00	5 100.00	5 100.00
3	10 100.00	0 0.00	10 100.00
Total	10 50.00	10 50.00	20 100.00

p = 0,001

10. Tabla J: Relación entre el hallazgo histopatológico TRAQGRADO y los grupos inoculados a los 7 días por las vías IT y EV

HISTOGRADO	Grupo		Total
	IT 7d	EV 7d	
4	0 0.00	5 100.00	5 100.00
5	0 0.00	5 100.00	5 100.00
6	10 100.00	0 0.00	10 100.00
Total	10 50.00	10 50.00	20 100.00

p = 0,001

11. Tabla K: Relación entre el hallazgo histopatológico TRAQGRADO y los grupos inoculados a los 14 días por las vías IT y EV

TRAQGRADO	Grupo		Total
	IT 14d	EV 14d	
0	0	6	6
	0.00	100.00	100.00
3	6	0	6
	100.00	0.00	100.00
Total	6	6	12
	50.00	50.00	100.00

p = 0,002

12. Tabla L: Relación entre el hallazgo histopatológico HIGADO y los grupos inoculados a los 14 días por las vías IT y EV

HIGADO	Grupo		Total
	IT 14d	EV 14d	
NO	6	0	6
	100.00	0.00	100.00
SI	0	6	6
	0.00	100.00	100.00
Total	6	6	12
	50.00	50.00	100.00

p = 0,002

VI) CAPÍTULO III
ESTUDIO PROSPECTIVO EN
PLANTA DE FAENA

1. INTRODUCCIÓN

La infección causada por *O. rhinotracheale* no sólo es ampliamente reconocida como causante de trastornos respiratorios severos, retraso del crecimiento, aumento en la tasa de mortandad y aumento en los costos de tratamiento antibióticos en granjas comerciales de pollos parrilleros y pavos (De Herdt *et al.* 2001), sino que también ha sido estudiada, aunque ocasionalmente, en su vinculación con aumentos en tasas de decomiso en planta de faena de pollos parrilleros (van Veen *et al.* 2000a; De Herdt *et al.* 2001; van Veen *et al.* 2005). De Herdt *et al.* (2001) destacaron a la infección producida por *O. rhinotracheale* como causante primario de sinusitis, traqueítis, pericarditis, neumonía y aerosaculitis en pollos parrilleros decomisados en los Países Bajos (De Herdt *et al.* 2001). En el primer estudio llevado a cabo por van Veen *et al.* (2000a), se destacó la asociación entre el incremento del 60% de la tasa de decomiso en una planta de faena Holandesa de pollos parrilleros durante los meses invernales y el aislamiento de *O. rhinotracheale* a partir de pulmones, sacos aéreos y médulas óseas de las 24 aves pertenecientes al decomiso nombrado. Así mismo, la bacteria estudiada fue detectada por medio de IHQ en un 80% de los pollos evaluados pertenecientes al decomiso (van Veen *et al.* 2000a). Luego, en un segundo relevamiento llevado por van Veen *et al.* (2005), se destacó que diversos agentes infecciosos se encontraron asociados a aumentos en las tasas de decomiso de parvadas comerciales de pollos parrilleros provenientes de diez países Europeos, observándose que un tercio del total de las aves decomisadas fueron consideradas positivas a *O. rhinotracheale*, ya que las lesiones presentes en el tracto respiratorio inferior permitieron detectar a la nombrada bacteria por medio de una técnica

de peroxidasa-antiperoxidasa (van Veen *et al.* 2005).

La categoría de decomiso de pollos parrilleros en planta de faena denominada como “muertos al arribo” (MAA) (Marina Ferrante, 2011, comunicación personal) y reconocida mundialmente por su nombre en inglés “dead on arrival”, representa un punto clave para la identificación de factores predisponentes de manejo y/o infecciosos vinculados a la mortandad sufrida por estas aves en el período comprendido entre su traslado desde la granja hasta su llegada a la planta de faena, ya que se encuentran implicadas pérdidas económicas severas en la industria avícola mundial (Nijdam *et al.* 2006; Lund *et al.* 2013; Kittelsen *et al.* 2015; Jacobs *et al.* 2017)

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar cepas BH y NH de *O. rhinotracheale* a partir de tráqueas y pulmones provenientes de aves de producciones comerciales que fueron decomisados en planta de faena.
- Relacionar la presencia de *O. rhinotracheale* en parvadas de producciones comerciales mediante estudios en planta de faena.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio prospectivo incluyó el estudio de pollos parrilleros provenientes de una planta de faena ubicada en la noreste de la Provincia de Buenos Aires durante el período comprendido entre octubre del 2014 y mayo del 2015. Se realizó un total de cinco visitas a

la planta de faena en cuestión, consignando las características de las aves muestreadas en la Tabla 6 (Página 90).

En cada una de las cinco visitas, se eligieron únicamente aquellas aves categorizadas como “muertos al arribo” que estimativamente presentaron 5 a 10 horas desde su deceso. Se considera que tanto factores ambientales como infecciosos pueden actuar separada o conjuntamente como posibles causas de los decesos de las aves incluidas en la categoría nombrada (Marina Ferrante, 2014, comunicación personal). Cabe destacar que no se incluyeron aquellos otros pollos parrilleros cuyo decomiso estuvo asociado a fallas mecánicas durante el proceso de faena. Se utilizaron bolsas de polietileno negro para trasladar las aves desde la planta de faena al laboratorio de la Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos (Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, Argentina). Allí se realizaron las necropsias completas de cada una de las aves y se llevó a cabo el muestreo sistemático de tráqueas y pulmones. El examen *postmortem* de todas las aves evaluadas, se llevó a cabo de manera inmediata luego de su llegada al laboratorio nombrado y se realizó durante el transcurso de las 3 a 4 h subsiguientes (Figura 11).

3.1 Histopatología. La mitad inferior de cada una de las tráqueas y un tercio de uno de los pulmones de cada una de las 120 aves fueron procesadas para histopatología siguiendo técnicas convencionales y según lo descrito previamente en el Capítulo I (Página 33).

3.2 Criterios de evaluación histopatológica. Se consideraron aquellos criterios de evaluación histopatológica similares a los que se implementaron previamente en los Capítulos I y II (páginas 34 y 66, respectivamente).

3.3 Inmunohistoquímica. Un tercio de cada uno de uno de los pulmones de las 120 aves fueron procesados para IHQ según lo descrito previamente en el Capítulo I (Página 34).

3.4 Criterios de evaluación inmunohistoquímica. Se consideraron aquellos criterios de evaluación inmunohistoquímica similares a los que se implementaron previamente en los Capítulos I y II (Páginas 35 y 66, respectivamente).

3.5 Evaluación bacteriológica. Se utilizaron hisopos estériles similares a los previamente descriptos en los capítulos I y II para llevar a cabo el hisopado del tercio superior de cada una de las tráqueas refrigeradas. Luego cada uno de los hisopados se sembraron en agar sangre caprina al 10% (Agar nutritivo, Britania S.A., CABA, Argentina) con gentamicina (Gentamicina, Laboratorio Interbiol SRL, Provincia de Buenos Aires, Argentina o Genta G, Laboratorio Vetué, Venado Tuerto, Provincia de Santa Fe, Argentina) y se incubaron y evaluaron siguiendo los mismos procedimientos llevados a cabo en los Capítulos I y II (páginas 32 y 67, respectivamente).

3.6 PCR. La identificación de *O. rhinotracheale* se llevó a cabo realizando la extracción de ADN de colonias bacterianas pertenecientes a aislamientos sospechosos por medio del uso de un kit comercial de extracción de ADN llamado Quick-gDNA™ MiniPrep (Zymo Research, Irvine, California, Estados Unidos de América) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La premezcla de la reacción de PCR en tiempo real estuvo compuesta por SYBR Green (SYBR Select Master Mix, Applied Biosystems by Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos de América). La metodología

luego aplicada fue aquella similar a la descrita previamente en los estudios moleculares de los Capítulos I y II (Páginas 35 y 68, respectivamente).

3.7 Análisis estadístico. La información se agrupó en tablas de contingencia y se analizó estadísticamente utilizando la prueba de χ^2 y prueba exacta de Fisher para la comparación de proporciones. La significancia estadística se estableció en un valor de $p = 0,05$.

4. RESULTADOS

El análisis pormenorizado del estudio estadístico del presente estudio prospectivo en planta de faena, que arrojó como dato relevante la positividad frente a la prueba de IH en 81 de los 120 pulmones analizados, permitió realizar múltiples comparaciones entre los parámetros evaluados, arrojando los siguientes resultados con diferencias significativas:

1. La mayoría de las aves que tuvieron un grado de lesión microscópica traqueal y pulmonar con valor de 3, presentaron resultados positivos para IHQ.
2. La mayoría de las aves que tuvieron un grado de lesión microscópica pulmonar mayor a 0, presentaron resultados positivos para IHQ.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

A pesar que *O. rhinotracheale* no pudo ser aislado en ninguno de los 120 pollos parrilleros muertos al arribo (MAA) incluidos en el presente estudio prospectivo y que en ninguno de ellos se

observó ningún tipo de lesión macroscópica posiblemente asociada con la infección causada por la nombrada bacteria, se detectó la positividad frente a *O. rhinotracheale* en 81 de los 120 pulmones estudiados (67,5%) por medio de IHQ junto con su significativa asociación a diversas lesiones microscópicas pulmonares compatibles con la nombrada infección bacteriana (Gornatti Churria *et al.* 2014). Por ello, se infiere que la infección causada por *O. rhinotracheale* se encontró ampliamente distribuida en los tejidos pulmonares de los pollos parrilleros estudiados y a manera de enfermedad subclínica como previamente fue descrita por De Herdt *et al.* (2001). Aunque la totalidad de los pollos parrilleros estudiados perteneció a parvadas comerciales en dónde se respetó el período recomendado de retirada de antibióticos (Marina Ferrante, 2015, comunicación personal), se conjetura que ante la presencia de factores inmunosupresores tales como la carga de los animales en la granja y el transporte hasta la planta de faena junto con la ausencia de crecimiento bacteriano observado en los tejidos respiratorios analizados, sería prudente reconsiderar si el período de retirada antibiótica se llevó a cabo efectivamente según las normativas vigentes.

La categoría de decomiso de pollos parrilleros conocida como MAA comenzó a ser estudiada en detalle desde hace más de una década ya que no sólo es considerada como un indicador de bienestar animal del sector avícola, sino que también puede implicar severas pérdidas económicas para la industria en cuestión ya que la mayoría de las aves así clasificadas y decomisadas, son consideradas, en su gran mayoría, aptas para consumo humano (Lund *et al.* 2013). A pesar que la congestión pulmonar es reconocida como un artefacto *postmortem* ya que se encuentra principalmente asociada al decúbito dorsal de aquellas aves que presentan varias horas luego de su deceso y que su aparición no ha sido comprobada en aves evaluadas de manera inmediata a su sacrificio

(Crespo y Shivaprasad 2013), algunos autores consideran a la congestión pulmonar como uno de los hallazgos de necropsia a evaluar en aves decomisadas en planta de faena y categorizadas como MAA a fin de poder determinar posibles causas vinculadas al deceso de las mismas (Lund *et al.* 2013; Kittelsen *et al.* 2015). Crespo y Shivaprasad (2013) y Lund *et al.* (2013) proponen una estrecha relación entre la congestión pulmonar y la asfixia y sofocación que pudieron sufrir las aves durante su manejo previo a la faena, mientras que Julian (2005) y Kittelsen *et al.* (2015) describen la aparición de dicho hallazgo como consecuencia de su estrecho vínculo con el síndrome de muerte súbita. En contraposición a todos ellos, en el trabajo llevado a cabo por Nijdam *et al.* (2006) se desestimó la inclusión de la congestión pulmonar como parámetro a evaluar en aves decomisadas e identificadas como MAA y a la vez se incluyeron aquellos otros hallazgos macroscópicos que afectaron a la laringe y a la tráquea, denominándolos de manera genérica como laringitis y traqueítis, respectivamente (Nijdam *et al.* 2006). Aún sin haberse llevado a cabo pruebas diagnósticas complementarias tales como histopatología, bacteriología y estudios moleculares que pudieran llegar a fundamentar la posible vinculación de la congestión pulmonar, laringitis y traqueítis con agentes etiológicos infecciosos y/o medioambientales (Nijdam *et al.* 2006; Lund *et al.* 2013; Kittelsen *et al.* 2015), se encontró que la congestión pulmonar fue el hallazgo más prevalente en aves decomisadas como MAA en plantas de faena de países Europeos tales como Dinamarca (Lund *et al.* 2013) y Noruega (Kittelsen *et al.* 2015) al igual que la laringitis y traqueítis en la misma categoría de aves en plantas de faena de Bélgica (Nijdam *et al.* 2006). Al igual que los estudios llevados a cabo por van Veen *et al.* (2000a; 2005) que determinaron la detección de *O. rhinotracheale* a través de IHQ en pollos decomisados, el

presente estudio prospectivo en planta de faena demostró la inmunoreactividad frente a la nombrada bacteria en tejidos pulmonares y a su vez, también detectó por primera vez su vinculación con lesiones microscópicas pulmonares presentes en pollos parrilleros categorizados como MAA.

Tabla 6. Granjas incluidas en el estudio prospectivo en planta de faena

Nº de visita	1	2	3	4	5
Pollos parrilleros muestreados (<i>n</i>)	20	20	20	20	40
Total de pollos parrilleros faenados	16.100	18.500	13.300	14.050	15.850
Edad de los pollos parrilleros	49 días	52 días	49 días	50 días	56 días
Administración antibiótica en la semana previa a la faena	No	No	No	No	No

VII) CONCLUSIONES GENERALES

1. Se obtuvo el aislamiento de 50 de cepas BH y NH de *O. rhinotracheale* de un total de 82 casos de aves comerciales incluidos en el estudio retrospectivo.
2. Se obtuvo la positividad por IHQ para *O. rhinotracheale* en 48 de las 68 muestras de pulmón incluidas en el estudio retrospectivo.
3. La mayoría de los aislamientos BH y NH de *O. rhinotracheale* analizados (34/38) presentó multiresistencia frente a los antibióticos estudiados.
4. Todos los aislamientos BH y NH de *O. rhinotracheale* analizados no presentaron susceptibilidad a gentamicina (0/38).
5. La mayoría de los aislamientos BH y NH de *O. rhinotracheale* analizados no fueron susceptibles a enrofloxacin (12/15 y 17/23), eritromicina (12/15 y 16/23), sulfametoxazol-trimetoprima (12/15 y 18/23), doxiciclina (10/15 y 16/23) y fosfomicina (8/15 y 14/23) y susceptibles a ampicilina (9/15 y 18/23) y florfenicol (10/15 y 17/23), respectivamente.
6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los patrones de susceptibilidad antibiótica de los aislamientos BH y NH de *O. rhinotracheale* analizados.
7. El presente estudio de susceptibilidades antibióticas de aislamientos BH y NH de *O. rhinotracheale* es el primero en llevarse a cabo en Sudamérica y a su vez también puede ser considerado como el primero en comparar los patrones de susceptibilidad antibiótica de aislamientos de cepas BH y NH.
8. Tanto la vía de inoculación IT como la vía EV, permitieron estudiar exitosamente la acción de *O. rhinotracheale* en el modelo experimental.
9. La vía de inoculación IT empleada permitió obtener un mayor grado de lesión microscópica traqueal que la vía de inoculación EV, tanto a los 7 días como a los 14

días en los grupos inoculados con los aislamientos BH o NH de *O. rhinotracheale*, observándose una relación directa entre la vía de inoculación IT y los hallazgos microscópicos traqueales detectados.

10. La vía de inoculación EV empleada permitió obtener lesiones microscópicas hepáticas tanto a los 7 días como a los 14 días en los grupos inoculados con los aislamientos BH o NH de *O. rhinotracheale*, afirmando una relación directa entre la vía inoculación EV y los hallazgos microscópicos hepáticos observados.
11. Los grupos de 14 días inoculados con los aislamientos BH o NH de *O. rhinotracheale* por las vías IT o EV presentaron un mayor grado de lesiones microscópicas pulmonares y hepáticas y un mayor grado en la sumatoria de lesiones microscópicas que los grupos de 7 días, permitiendo vincular el mayor tiempo de exposición al agente etiológico estudiado con una mayor severidad de las lesiones microscópicas encontradas.
12. Los grupos de 7 días inoculados con el aislamiento NH de *O. rhinotracheale* por vía IT o EV permitieron obtener un mayor grado de lesión microscópica pulmonar que los grupos de 7 días inoculados con el aislamiento BH de la bacteria estudiada.
13. A diferencia del efecto patógeno transitorio de *O. rhinotracheale* en sacos aéreos de aves desafiadas experimentalmente en estudios previos, los resultados del presente modelo experimental sostienen un mayor grado de lesiones microscópicas en pulmón e hígado junto con un mayor grado en la sumatoria de lesiones microscópicas a medida que aumentó la exposición al agente etiológico a los 14 días posinoculación.
14. Los resultados obtenidos de comparar los hallazgos microscópicos ocasionados por los aislamientos BH y NH de *O. rhinotracheale* empleados a los 7 y 14 días de experimentación, permitieron reconocer una mayor patogenicidad pulmonar del

aislamiento NH de *O. rhinotracheale* empleado luego de la primer semana de experimentación.

15. No se detectaron cuadros clínicos respiratorios en los grupos desafiados por la inoculación de cepas BH y NH de *O. rhinotracheale* en el modelo experimental.
16. *Ornithobacterium rhinotracheale* no pudo ser aislado en ninguno de los 120 pollos parrilleros MAA incluidos en el estudio prospectivo en la planta de faena.
17. Se detectó la positividad por medio de IHQ frente a *O. rhinotracheale* en 81/120 de los pulmones estudiados (67,5%) junto con su significativa asociación a diversas microscópicas pulmonares compatibles con la infección bacteriana estudiada.

VIII) ANEXOS

Apéndice I

Plan de inmunización de conejos domésticos para la elaboración de un suero hiperinmune (Carlos J. Perfumo, 2011, comunicación personal)

- Especie: Conejos.
- Cepa: albino y californiano. Peso entre 2 y 2,5 Kg.
- Vía de inoculación: subcutánea, 2 ml en el lomo.
- Concentración de antígeno: tubo 6 de escala de MacFarland.
- Inóculo: mezclando partes iguales (3,5 ml antígeno + 3,5 ml de adyuvante) de la suspensión bacteriana con coadyuvante de Freund incompleto (FIA) (emulsión de agua en aceite, preparado con aceites no metabolizables), se agitan vigorosamente para generar la emulsión. Observar el lugar de la inoculación. Controlar siempre el peso de los animales, al comienzo de la experiencia y cada vez que se inoculan.
- No cambiar la alimentación en el transcurso de la experiencia, solo si existiera algún problema. Agua siempre a disposición. Ambiente controlado

PERIODICIDAD	INÓCULO
Día 1	2 ml vía subcutánea en el lomo, fraccionado en 2 dosis de 1 ml
Día 8	Ídem día 1
Día 28	Ídem día 1
Día 40	Sangría de prueba, se decide dar refuerzo según título obtenido
Día 45	Ídem día 1
Día 60	Sangría a blanco

Apéndice II

Técnica de IHQ para la detección de *Ornithobacterium rhinotracheale* en pulmón (modificado de Mariana A. Machuca, 2007 [tesis doctoral])

1. Desparafinar en xileno: 1 pasaje a temperatura ambiente durante 15 minutos.
2. Desparafinar en xileno: 1 pasaje a temperatura ambiente durante 15 minutos.
3. Deshidratar en alcohol 100°: 1 pasaje durante 3 minutos y en metanol al 3% con peróxido de hidrógeno durante 30 minutos
4. Deshidratar en alcohol 100°, 96° y 70°: 1 pasaje de 6 minutos en cada uno.
5. Lavar en agua destilada: 5 minutos.
6. Lavar en PBS Tween 20 (500 µl de Tween 20 en 1 litro se PBS 1X): 5 minutos.
7. Recuperación antigénica: en microondas con buffer citrato (10 mmol, pH 6) durante 10-15 minutos a 500 W. Se recomienda el precalentamiento de la solución de buffer citrato durante 30–40 min a 37°C antes de su uso.
8. Dejar enfriar durante 20–30 minutos.
9. Lavar en agua destilada: 10 minutos.
10. Lavar en PBS Tween 20: 5 minutos.
11. Realizar el bloqueo de unión específica: 30 minutos con una solución de leche La Serenísima descremada en polvo (0,5 g en 20 ml de PBS 1X).
12. No realizar ningún lavado.
13. Incubar con el anticuerpo primario policlonal anti-*Ornithobacterium rhinotracheale* en cámara húmeda a 4°C durante la noche.
14. Lavar con PBS Tween 20: dos pasajes de 5 minutos cada uno.
15. Aplicar el anticuerpo secundario comercial (Histofine Simple Stain MAX PO [R]): incubar durante 1 hora.
16. Lavar con PBS Tween 20: dos pasajes de 5 minutos cada uno.

17. Aplicar la solución del sustrato-cromógeno (Diaminobenzidina [DAB]). Seguir las recomendaciones del fabricante en la utilización de Histofine DAB-3S kit.
18. Lavar con agua corriente.
19. Lavar con agua destilada.
20. Realizar la coloración de contraste con hematoxilina
21. Lavar con agua destilada: 5 minutos.
22. Hidratar con alcohol 96° y alcohol 100° y dos pasajes en xilol.
23. Realizar el montaje para la observación.

Apéndice III

Técnica molecular para *Ornithobacterium rhinotracheale*

1) Parte 1: Ingredientes de la premezcla junto el molde de ADN para cada reacción de 25 μ l a ser utilizada en PCR en tiempo real

- SYBR Green = 12,5 μ l

- Primer Fw = 1 μ l + Molde de ADN = 3 μ l

- Primer Rv = 1 μ l

- Agua molecular = 7,5 μ l

2) Parte 2: Protocolo de ciclado de PCR en tiempo real

Ciclo 1 (1X)	Ciclo 2 (45X)			Ciclo 3 (1X)	Ciclo 4 (66X)
Paso 1	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 1	Paso 1
94°C - 5'	94°C - 30''	52°C - 1'	72°C - 1' 30''	72°C - .7'	0,2°C cada 30'' hasta 96°C

IX) BIBLIOGRAFÍA

1. Ak S, Turan N. Antimicrobial susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from broiler chickens in Turkey. *Vet Arhiv.* 2001; 71:121–7.
2. Allymehr M. Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in broiler and broiler breeder chickens in west Azerbaijan province, Iran. *J Vet Med A.* 2006; 53:40–2.
3. Back A, Halvorson D, Rajashekara G, Nagaraja K. Development of a serum plate agglutination test to detect antibodies to *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J Vet Diagn Invest.* 1998; 10:84–6.
4. Back A, Rajashekara J, Jeremiah RB, Halvorson DA, Nagaraja KV. Tissue distribution of *Ornithobacterium rhinotracheale* in experimentally infected turkeys. *Vet Rec.* 1998; 143:52–3.
5. Banani M, Pourbakhsh SA, Deihim AH. Antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates associated with respiratory diseases. *Arch Razi Ins.* 2004; 58:111–7.
6. Banani M, Hablolvarid MH, Momayez R, Nouri A, Ghodsian N, Ashtari A, et al. Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from the brains of commercial broiler breeder chickens with meningitis and encephalitis. *Arch Razi Ins.* 2015; 70:203–9.

7. Bisschop SPR. The use of a bacterin vaccine in broiler breeders in the control of *Ornithobacterium rhinotracheale* in commercial broilers [disertación de master]. Onderstepoort: Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria; 2003.
8. Canal CW, Leão JA, Ferreira DJ, Macagnan M, Salle CTP, Back A. Prevalence of antibodies against *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler and breeders in southern Brazil. Avian Dis. 2003a; 47:731–7.
9. Canal CW, Rocha SLS, Leão JA, Fallavena LCB, Oliveira SD, Beltrão N. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). Cien Rural. 2003b; 33:377–9.
10. Chansiripornchai N, Wanasawaeng W, Sasipreeyajan J. Seroprevalence and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from broiler and broiler breeder flocks in Thailand. Avian Dis. 2007; 51:777–80.
11. Charlton B, Channing–Santiago S, Bickford A, Cardona C, Chin R, Cooper G, et al. Preliminary characterization of a pleomorphic Gram–negative rod associated with avian respiratory disease. J Vet Diagn Invest. 1993; 5:47–51.
12. Chin RP, Charlton BR. Ornithobacteriosis. En: Dufour–Zavala L, Swayne DE, Glisson JR, Pearson JE, Reed WM, Jackwood MW, et al, editores. A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens. 5 ed. Madison: American Association of Avian Pathologists; 2008. p. 75–6.

13. Chin RP, van Empel PC, Hafez HM. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. En: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V, editores. Diseases of poultry. 13 ed. Ames: Wiley–Blackwell; 2013. p. 828–34.
14. Chernyshev AV, Sprygin AV, Ruchnova OI, Mudrak NS, Pruntova OV, Drygin VV. Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial chicken and turkey flocks in Russia. En: American Association of Avian Pathologists, editor. Proceedings of the 2011 Annual Meeting of the American Association of Avian Pathologists; 2011 Jul 16–19; St. Louis, Estados Unidos de América. Disponible en: URL: <http://www.aaap.info/assets/2011Program/aaap%202011%20abstracts.pdf>
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Disk diffusion: performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th Informational Supplement; M100–S. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
16. Colas M, Espinosa I, Merino N, Vichi J, López R, García M, et al. Hallazgos clínicos y anatomopatológicos en aves White Leghorn ocasionados por *Ornithobacterium rhinotracheale* y *Escherichia coli*. Rev Invest Vet Peru. 2014; 25:523–37.
17. Crespo R, Shivaprasad HL. Developmental, metabolic, and others noninfectious disorders. En: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V, editores. Diseases of poultry. 13 ed. Ames: Wiley–Blackwell; 2013. p. 1233–70.
18. De Herdt P, Cauwerts K, Vervloesem J, Ducatelle R. The relevance and efficacy of *Ornithobacterium rhinotracheale* control in chickens. World Poult. 2001; 17:32–3.

19. De Rosa M, Droual R, Chin RP, Shivaprasad HL, Walker RL. *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkey breeders. Avian Dis. 1996; 40:865–74.
20. Devriese LA, Hommez J, Vandamme P, Kersters K, Haesebrouck F. *In vitro* antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from poultry and wild birds. Vet Rec 1995;137:435–6.
21. Devriese LA, De Herdt P, Haesebrouck F. Antibiotic sensitivity and resistance in *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from Belgian broiler chickens. Avian Pathol. 2001; 30:197–200.
22. Erganiş O, Hadimli HH, Kav K, Çorlu M, Östürk D. A comparative study on detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* antibodies in meat-type turkeys by dot immunobinding assay, rapid agglutination test and serum agglutination test. Avian Pathol. 2002; 31:201–4.
23. Eroksuz H, Ozbey G, Cevik A, Gencer Taracki B, Balik DT. Immuno-histochemical, pathological, enzyme linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction analysis of experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in quails (*Coturnix coturnix japonica*). Rev Med Vet–Toulouse. 2006; 157:197–202.
24. Fitzgerald SL, Greyling JM, Bragg RR. Correlation between ability of *Ornithobacterium rhinotracheale* to agglutinate red blood cells and susceptibility to fosfomycin. Onderstepoort J Vet Res. 1998; 65:317–20.

25. Fletcher OJ. Pathology of the respiratory system. Poult Sci. 1980; 59:2666–79.
26. Fletcher OJ, Abdul–Aziz T, Barnes HJ. Respiratory system. En: Fletcher OJ, Abdul–Aziz T, editores. Avian histopathology, 3 ed. Madison: American Association of Avian Pathologists; 2008. p. 128–63.
27. Fletcher OJ. Avian Histopathology in the Digital Age, update on virtual slides. Respiratory system. 4.2 Trachea. 2010a. Disponible en: URL: <http://www.ncsu.edu/project/poultryhealth/fletcher/cbs595/learning-module-04/LM4LC2Master/LM4LC2/LM4-LC2-all.html>.
28. Fletcher OJ. Avian Histopathology in the Digital Age, update on virtual slides. Respiratory system. 4.3 Lung. 2010b. Disponible en: URL: <http://www.ncsu.edu/project/poultryhealth/fletcher/cbs595/learning-module-04/LM4LC3Master/LM4LC3/LM4-LC3-all.html>.
29. Fletcher OJ. Avian Histopathology in the Digital Age, update on virtual slides. Respiratory system. 4.4 Air sacs. 2010c. Disponible en: URL: <http://www.ncsu.edu/project/poultryhealth/fletcher/cbs595/learning-module-04/LM4LC4Master/LM4LC4/LM4-LC4-all.html>.
30. Ghanbarpour R, Salehi M. Sero-prevalence and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler flocks in south-eastern Iran. Trop Anim Health Prod. 2009; 41:1679–83.

31. Gavrilović P, Jovanović M, Parunović J, Živulj A. Pathomorphological changes in broilers infected with *Ornithobacterium rhinotracheale*. En: Jovanović M, editor. Proceedings of the 28th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and European College of Veterinary Pathologists; 2010 Sep 8–11; Belgrado, Serbia. p.131. Disponible en: URL: <http://www.esvp.eu/images/downloads/pdf/ProceedingsBelgrade2010.pdf>
32. Gavrilović P. Examination of the influence of *Ornithobacterium rhinotracheale* on the appearance of pathomorphological lesions in respiratory organs of broiler breeders and pheasants after experimental infection [tesis doctoral]. Belgrado: Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade; 2013.
33. Glisson JR. Bacterial respiratory diseases of poultry. Poult Sci. 1998; 77:1139–42.
34. Gooverts D, Vrijenhoek M, van Empel P. Immuno–histochemical and bacteriological investigation of the pathogenesis of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in South Africa in chickens with osteitis and encephalitis syndrome. Proceedings of the 16th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology; 1998; Lillehammer, Noruega. p. 81.
35. Gornatti Churria CD, Sansalone P, Sguazza G, Machuca MA, Origlia J, Herrero Loyola M, et al. Primeros aislamientos β –hemolíticos de *Ornithobacterium rhinotracheale* en América Latina y su asociación a neumonía en pollos parrilleros. Memorias del XXII Congreso Latinoamericano de Avicultura 2011; 2011a Sep 6–9; Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

36. Gornatti Churria CD, Sansalone PL, Vigo GB, Sguazza GH, Machuca MA, Origlia JA, et al. Pneumonia in broiler chicken flocks associated with β -hemolytic *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. Braz J Vet Pathol. 2011b; 4:243–6.
37. Gornatti Churria CD, Machuca MA, Vigo GB, Petruccelli M. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in poultry: an updated review. Int J Mol Zool. 2012a; 2:23–38.
38. Gornatti Churria CD, Sansalone PL, Machuca MA, Vigo GB, Sguazza GH, Origlia JA, et al. Tracheitis in a broiler chicken flock caused by dual infection with *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) and non-hemolytic *Ornithobacterium rhinotracheale*. Braz J Vet Pathol. 2012b; 5:89–93.
39. Gornatti Churria CD, Machuca MA, Vigo GB, Sansalone P, Píscopo M, Herrero Loyola M, et al. Estudio retrospectivo de *Ornithobacterium rhinotracheale* en pollos parrilleros y aves reproductoras comerciales de las Provincias de Buenos Aires y Entre Ríos, Argentina (2010–2012). Memorias de la IX Reunión Argentina de Patología Veterinaria (RAPAVE) 2014 y 8vo Seminario de la Fundación “Charles Louis Davis” en Argentina; 2014 Oct 29–31; Tandil, Argentina. p. 18.
40. Günther R, Ryll M, Hinz K–H, Hafez MH. New variety of *Ornithobacterium rhinotracheale*. En: Hafez MH, editor. Proceedings of the 4th International Symposium

on Turkey Diseases; 2002 May 15–18; Berlín, Alemania. Berlín: German Veterinary Medical Society; 2002. p. 238–44.

41. Hablolvarid MH, Goudarzi H, Azizpour A, Eslampanah M. Histopathological study of the lesions induced by subtype H9N2 avian influenza virus and *Ornithobacterium rhinotracheale* in specific pathogen free chickens. Proceedings of the 2nd Joint European Congress of the European Society of Veterinary Pathology, European Society of Toxicologic Pathology and European College of Veterinary Pathology; 2014; Berlín, Alemania. p. 167.
42. Hafez HM. Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale*. Int J Poult Sci. 2002; 1:114–8.
43. Hafez HM, Beyer W. Preliminary investigation on *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) isolates using PCR-fingerprints. Proceedings of the XI International Congress of the World Veterinary Poultry Association; 1997; Budapest, Hungría. p. 51.
44. Hafez MH, Lierz M. *Ornithobacterium rhinotracheale* in nestlings falcons. Avian Dis. 2010; 54:161–3.
45. Hafez HM, Vandamme P. *Ornithobacterium*. En: Whitman WB, DeVos P, Chun J, Dedysh S, Hedlund B, Kämpfer P, et al, editores. Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. Ames: Wiley–Bergey's Manual Trust; 2015. p. 1-11.

46. Hauck R, Chin R, Shivaprasad HL. Retrospective study on the isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens and turkeys in Central California (2000–2012). *Avian Dis.* 2015; 59:130–7.
47. Hinz K-H, Blome C, Ryll M. Acute exudative pneumonia and airsacculitis associated with *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. *Vet Rec.* 1994; 135:233–4.
48. Hoerr FJ. Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian Dis.* 2010; 54:2–15.
49. Hung AL, Alvarado A. Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Peru. *Avian Dis.* 2001; 45:999–1005.
50. Instituto de Patología “Dr. B. Epstein” y Servicio Central de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. XIII Curso Internacional de Posgrado en Técnicas de Inmunohistoquímica, Lectín histoquímica y Microscopía Electrónica. La Plata: Instituto de Patología “Dr. B. Epstein” y Servicio Central de Microscopía Electrónica; 2001.
51. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Administrador Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”. XVII Curso Intensivo de Actualización en Antimicrobianos “Dra. Alicia Rossi” y XII Curso Latinoamericano de Actualización en Antimicrobianos. Buenos Aires: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas; 2003.

52. Jacobs L, Delezie E, Duchateau L, Goethals K, Tuytens FAM. Broiler chickens dead on arrival: associated risk factors and welfare indicators. *Poult Sci.* 2017; 96:259–65.
53. Julian RJ. Production and growth related disorders and other metabolic diseases of poultry - A review. *Vet J.* 2005; 169:350–69.
54. Kastelic S, Berčič RL, Cizelj I, Benčina M, Makrai L, Zorman-Rojs O, et al. *Ornithobacterium rhinotracheale* has neuraminidase activity causing desialylation of chicken and turkey serum and tracheal mucus glycoproteins. *Vet Microbiol.* 2013; 162:707–12.
55. Kiliç A, Timurkaan N, Ertaş HB, Yilmaz F. Pathological examination and bacterial re-isolation by culture and PCR of experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in broiler chickens. *Rev Med Vet–Toulouse.* 2009; 160:140–4.
56. Kittelsen KE, Granquist EG, Kiolbjørnsen Ø, Nafstad O, Moe RO. A comparison of post-mortem findings in broilers dead-on-farms and broilers dead-on-arrival at the abattoir. *Poult Sci.* 2015; 94:2622–9.
57. Lund VP, Kyvsgaard NC, Christensen JP, Bisgaard M. Pathological manifestations observed in dead-on-arrival broilers at a Danish abattoir. *Br Poult Sci.* 2013; 54:430–40.

58. Machuca MA. Enteropatía proliferativa porcina: determinación de anticuerpos para *Lawsonia intracellularis* y estudios anatomopatológicos [tesis doctoral]. La Plata: Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; 2007.
59. Malik YS, Olsen K, Kumar K, Goyal SM. *In vitro* antibiotic resistance profiles of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from Minnesota turkeys during 1996–2002. *Avian Dis.* 2003; 47:588–93.
60. Marien M, Decostere A, Martel A, Chiers K, Froyman R, Nauwynck H. Synergy between avian pneumovirus and *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. *Avian Pathol.* 2005; 34:204–11.
61. Maxwell MH, Anderson IA, Dick LA. The incidence of ectopic cartilaginous and osseous lung nodules in young broiler fowls with ascites and various other diseases. *Avian Pathol.* 1988; 17:487–93.
62. McBride MJ. The family *Flavobacteriaceae*. En: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editores. *The prokaryotes*. 4 ed. Berlín: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2014. p. 643–76.
63. Mohd-Zain Z, Jee TL, Jusoff K. Phenotypic characteristics, antibiotic susceptibility, and pathogenicity of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *WSEAS Trans Biol Biomed.* 2008; 7:133–42.

64. Morales–Erasto V, Falconi–Agapito F, Luna–Galaz GA, Saravia LE, Montalvan–Avalos A, Soriano–Vargas E, et al. Coinfection of *Avibacterium paragallinarum* and *Ornithobacterium rhinotracheale* in chickens from Peru. *Avian Dis.* 2016; 60:75–8.
65. Moreno B, Chacón G, Villa A, Fernández A, Vela AI, Fernández–Garayzábal JF, et al. Nervous signs associated with otitis and cranial osteomyelitis and with *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in red legged-partridges. *Avian Pathol.* 2009; 38:341–7.
66. Murthy TRGK, Dorairajan N, Balasubramaniam GA, Dinakaran AM, Saravanabava K. *In vitro* antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from laying hens in India. *Vet Arhiv.* 2008; 78:49–56.
67. Nijdam E, Zailan ARM, van Eck JHH, Decuypere E, Stegeman JA. Pathological features in dead on arrival broilers with special reference to heart disorders. *Poult Sci.* 2006; 85:1303–8.
68. Pan Q, Liu A, He C. Co–infection of *Ornithobacterium rhinotracheale* with *Streptococcus zooepidemicus* in chickens. *Avian Dis.* 2012a; 56:680–4.
69. Pan Q, Liu A, Zhang F, Ling Y, Ou C, Hou N, et al. Co–infection of broilers with *Ornithobacterium rhinotracheale* and H9N2 avian influenza virus. *BMC Vet Res.* 2012b; 8:104.

70. Pyzik E, Rzedzicki J, Kolasa A. Etiopathogenesis and diagnostics of avian ornithobacteriosis. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska*. 2007; 62:32–9.
71. Ramos–Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*. 2005; 42:405–22.
72. Ramos–Vara J, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, et al. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest*. 2008; 20:393–413.
73. Refai M, El–Gohary A, Attia SA, Khalifa RA. Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in chickens by ELISA. *Egypt J Immunol*. 2005; 12:87–93.
74. Roussan DA, Al–Rifai RH, Khawaldeh GY, Totanji WS, Shasheen I. *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Mycoplasma synoviae* in broiler chickens in Jordan. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot*. 2011; 30:931–7.
75. Ryll M, Günther R, Hafez HM, Hinz KH. Isolation and differentiation of a cytochrome oxidase-negative strain of *Ornithobacterium rhinotracheale* from turkeys. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2002; 115:274–7.

76. Sakai E, Tokuyama Y, Nonaka F, Ohishi S, Ishikawa Y, Tanaka M, et al. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in Japan: preliminary investigations. Vet Rec. 2000; 146:502–3.
77. Shivaprasad HL. Pathology of birds—an overview. Proceedings of the “Charles Louis Davis Foundation” Conference on Gross Morbid Anatomy of Animals; 2002 Apr 8–12; Washington DC, Estados Unidos de América. Disponible en: URL: www.cldavis.org/cgi-bin/download.cgi?pid=165
78. Shivaprasad HL. Histopathologic diagnosis of the diseases of the respiratory system in poultry. Proceedings of the Avian Pathology Seminar (The Royal College of Pathologists and the European College of Veterinary Pathologists); 2012 Jun 11–12. Londres, Reino Unido. p. 60–3. Disponible en: URL: https://www.rcpath.org/Resources/RCPPath/Migrated%20Resources/Documents/A/AP_Delegatepack1112Jun2012.pdf?site=%7B849015ee-417e-4b6d-b984-5546ad74e5ec%7D
79. Sivaseelan S, Malmarugan S, Balachandran P, Balasubramaniam GA. Synergistic pathological effect of *Mycoplasma gallisepticum* with other infectious organisms in layer chickens. Braz J Vet Pathol. 2013; 6:44–7.
80. Soriano VE, Vera NA, Salado CR, Fernández RP, Blackall PJ. *In vitro* susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* to several antimicrobial drugs. Avian Dis. 2003; 47:476–80.

81. Souillard RA. Observations of *Ornithobacterium rhinotracheale* tenosynovitis in turkey flocks in Brittany [tesis doctoral]. Toulouse: École Nationale Vétérinaire de Toulouse; 2002.
82. Sprenger SJ, Back A, Shaw DP, Nagaraja KB, Roepke DC, Halvorson DA. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkeys: experimental reproduction of the disease. Avian Dis. 1998; 42:154–61.
83. Sprenger SJ, Halvorson DA, Nagaraja KB, Spasojevic R, Dutton RS, Shaw DP. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in commercial laying-type chickens. Avian Dis. 2000; 44:725–9.
84. Śmietanka K, Minta Z, Świętoń E, Olszewska M, Józwiak M, Domańska-Blicharz K, et al. Avian influenza H9N2 subtype in Poland—characterization of the isolates and evidence of concomitant infections. Avian Pathol. 2014; 43:427–36.
85. Tabatabai LB, Zimmerli MK, Zehr ES, Briggs RE, Tatum FM. *Ornithobacterium rhinotracheale* North American field isolates express an hemolysin-like protein. Avian Dis. 2010; 54:994–1001.
86. Thachil AJ, Velayudhan VT, Lopes-Berkas V, Halvorson DA, Nagaraja KV. Application of polymerase chain reaction fingerprinting to differentiate *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates. J Vet Diagn Invest. 2007; 19:417–20.

87. Thachil AJ, Velayudhan VT, Shaw DP, Halvorson DA, Nagaraja KV. Pathogenesis of *Ornithobacterium rhinotracheale* in egg-laying hens with coexisting infectious bronchitis virus and *Escherichia coli* infections. J Appl Poult Res. 2009; 18:780–8.
88. Timurkaan N, Yilmaz F, Kiliç A, Özbey G. Pathological and microbiological investigations on lung lesions of slaughtered broilers in the slaughterhouse. J Anim Vet Adv. 2008; 7:1358–63.
89. Travers AF. Concomitant *Ornithobacterium rhinotracheale* and Newcastle disease infection in broilers in South Africa. Avian Dis. 1996; 40:488–90.
90. Tsai HJ, Huang CW. Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens and pigeons in Taiwan. Avian Dis. 2006; 50:502–7.
91. Türkyilmaz S. Isolation and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale* from poultry. Turk J Vet Anim Sci. 2005; 29:1299–304.
92. Umali DV, Lapuz PPSP, Suzuki T, Shirota K, Murase T, Ito T, et al. Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from a commercial layer flock with concurrent Marek's disease. Proceedings of the 16th Federation of Asian Veterinary Associations (FAVA) Congress; 2011 Feb 16–18; Cebu, Filipinas. p.118–9.

93. Uriarte J, Píscopo M, Origlia J, Gornatti D, Cerdá R, Herrero M, et al. Primer aislamiento de *Ornithobacterium rhinotracheale* en Argentina. *Analecta Vet.* 2009; 29:53–5.
94. Uriarte J, Corva S, Gornatti D, Origlia J, Píscopo M, Cerdá R, et al. Evidencia serológica de infección en aves comerciales por *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos (Argentina). *Analecta Vet.* 2010; 30:34–6.
95. van Empel P, van den Bosch H, Goovaerts D, Storm P. Experimental infection in turkeys and chickens with *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Avian Dis.* 1996; 40:858–64.
96. van Empel PCM. *Ornithobacterium rhinotracheale* [tesis doctoral]. Utrecht: Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University; 1998.
97. van Empel PCM, Hafez HM. *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. *Avian Pathol.* 1999; 28:217–27.
98. van Empel P, Vrijenhoek M, Goovaerts D, van den Bosch H. Immunohistochemical and serological investigation of experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in chickens. *Avian Pathol.* 1999; 28:187–93.

99. van Empel P. *Ornithobacterium rhinotracheale*. En: Pattison M, McMullin P, Bradbury JM, Alexander D, editores. Poultry diseases. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2008. p. 164–71.
100. Vandamme P, Segers P, Vancanneyt M, van Hove K, Muters R, Hommez J, et al. *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov., isolated from avian respiratory tract. Int J Syst Bacteriol. 1994; 44:24–37.
101. van Veen L, Gruys E, Frik K, van Empel P. Increased condemnation of broilers associated with *Ornithobacterium rhinotracheale*. Vet Rec. 2000a; 147:422–3.
102. van Veen L, van Empel P, Fabri T. *Ornithobacterium rhinotracheale*, a primary pathogen in broilers. Avian Dis. 2000b; 44:896–900.
103. van Veen L, Hartman E, Fabri T. *In vitro* antibiotic susceptibility of strains of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated in the Netherlands between 1996 and 1999. Vet Rec. 2001; 49:611–3.
104. van Veen L, Nieuwenhuizen J, Mekkes D, Vrijenhoek M, van Empel P. Diagnosis and incidence of *Ornithobacterium rhinotracheale* infections in commercial broiler chickens at slaughter. Vet Rec. 2005; 156:315–7.

- 105.** Vega V, Zepeda A, Ramírez S, Morales V, Fernández P, Montes de Oca R, et al. Hemagglutinating activity of serovar reference strains of *Ornithobacterium rhinotracheale*. J Vet Diagn Invest. 2008; 20:353–5.
- 106.** Vega–Sánchez V, Salgado–Miranda C, Lagunas–Bernabe S, Calderón–Apodaca NL, Soriano–Vargas E. Reference strains of *Ornithobacterium rhinotracheale* raise detectable hemagglutination–inhibition in immunized specific–pathogen–free chickens. J Anim Vet Adv. 2011; 10:1623–6.
- 107.** Walters J, Mainous M, Craig L, Evans R, Pierson FW. Unusual phenotypic characteristics of *Ornithobacterium rhinotracheale* in Virginia. En: Pierson FW, Pierson ME, editores. Proceedings of the 81st Northeastern Conference on Avian Diseases; 2009 Sep 17–18; Granville, Estados Unidos de América. Disponible en: URL: <http://www.ivis.org/proceedings/necad/2009/4.pdf>
- 108.** Walters J, Evans RD, Leroith T, Sriranganathan N, McElroy AP, Pierson FW. Seroprevalence of two *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates and selected turkey respiratory disease agents in Virginia. En: Pierson FW, Pierson ME, editores. Proceedings of the 82nd Northeastern Conference on Avian Diseases; 2010 Sep 22–23; Lancaster, Estados Unidos de América. Disponible en: URL: <http://www.ivis.org/proceedings/necad/2010/7.pdf>

- 109.** Walters J, Evans RD, Leroith T, Sriranganathan N, McElroy AP, Pierson FW. Development of a reliable method to pathotype hemolytic and non-hemolytic *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates. En: Pierson FW, Pierson ME, editores. Proceedings of the 83rd Northeastern Conference on Avian Diseases; 2011 Sep 21–22; Lancaster, Estados Unidos de América.
- 110.** Walters JN. Characterization of atypical hemolytic *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates and comparison with the normal non-hemolytic phenotype [tesis doctoral]. Blacksburg: Virginia–Maryland College of Veterinary Medicine, Virginia Polytechnic Institute and State University; 2014.
- 111.** Walters J, Evans R, LeRoith T, Sriranganathan N, McElroy A, Pierson FW. Experimental comparison of hemolytic and nonhemolytic *Ornithobacterium rhinotracheale* field isolates *in vivo*. Avian Dis. 2014; 58:78–82.
- 112.** Warner K, Clark MI, Perez S, Jennison R. Control of *Ornithobacterium rhinotracheale* in poultry. Vet Rec. 2009; 165:668.
- 113.** Yamamoto Y, Nakamura K, Kitagawa K, Ikenaga N, Yamada M, Mase A, et al. Severe nonpurulent encephalitis with mortality and feather lesions in Call ducks (*Anas platyrhynchos* var *domestica*) inoculated intravenously with H5N1 highly pathogenic avian influenza virus. Avian Dis. 2007a; 51:52–7.

- 114.** Yamamoto Y, Nakamura K, Kitagawa K, Ikenaga N, Yamada M, Mase M, et al. Pathogenesis in Call ducks inoculated intranasally with H5N1 highly pathogenic avian influenza virus and transmission by oral inoculation of infective feathers from an infected Call duck. *Avian Dis.* 2007b; 51:744–9.
- 115.** Yamamoto Y, Nakamura K, Okamatsu M, Yamada M, Mase M. Avian influenza virus (H5N1) replication in feathers of domestic waterfowl. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14:149–151.
- 116.** Yamamoto Y, Nakamura K, Yamada M, Ito T. Zoonotic risk of influenza A (H5N1) infection in wild swan feathers. *J Vet Med Sci.* 2009; 71:1549–1551.
- 117.** Yamamoto Y. Asian lineage H5N1 highly pathogenic avian influenza virus replication in feathers of waterfowl [tesis doctoral]. Sapporo: Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University; 2010.
- 118.** Yamamoto Y, Nakamura K, Yamada M, Mase M. Pathogenesis in Eurasian tree sparrows inoculated with H5N1 highly pathogenic avian influenza virus and experimental virus transmission from tree sparrows to chickens. *Avian Dis.* 2013; 57:205–13.
- 119.** Yamamoto Y, Nakamura K, Yamada M, Mase M. Corneal opacity in domestic ducks experimentally infected with H5N1 highly pathogenic avian influenza virus. *Vet Pathol.* 2016; 53:65–76.

120. Zhao P, Wu G, Zhang Q, Chu J, Xie C, Wang Y, et al. Experimental investigation on *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Enterococcus faecalis* co-infection in chickens. Pak Vet J. 2015; 32:173–7.
121. Zorman–Rojs O, Zdovc I, Benčina D, Mrzel I. Infection of turkeys with *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Mycoplasma synoviae*. Avian Dis. 2000; 44:1017–22.