

22
24.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACION DE LA RESPUESTA SEROLOGICA DE CUATRO PROCEDIMIENTOS DE VACUNACION DE EXPLOTACIONES AVICOLAS CONTRA EL VIRUS DE BRONQUITIS INFECCIOSA EN POLLO DE ENGORDA MEDIANTE LA TECNICA DE ELISA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
FELIPA GALINDO MUÑIZ

ASESORES: MVZ, EPA MAGDALENA ESCORCIA MARTINEZ
MVZ, EDPV, MC, VICTOR MANUEL PETRONE GARCIA
MVZ TAMAS FECHERVARI
MVZ, MC, PhD GUILLERMO TELLEZ ISAIAS



MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

264064



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA SEROLÓGICA DE CUATRO PROCEDIMIENTOS
DE VACUNACIÓN DE EXPLOTACIONES AVÍCOLAS CONTRA EL VIRUS DE
BRONQUITIS INFECCIOSA EN POLLO DE ENGORDA, MEDIANTE LA TÉCNICA DE
ELISA**

Tesis presentada ante la División de Estudios Profesionales
de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la
Universidad Nacional Autónoma de México

Para obtener el título de
Médico Veterinario Zootecnista
por:

FELIPA GALINDO MUÑIZ

ASESORES

MVZ, EPA Magdalena Escorcía Martínez
MVZ, EDPV, MC, Víctor Manuel Petrone García
MVZ Tamas Fehervari
MVZ, MC, PhD Guillermo Téllez Isafas

México D.F.

1998

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESÚMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS	8
MATERIAL Y MÉTODOS	9
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN	14
CONCLUSIONES	21
REFERENCIAS	23
CUADROS Y FIGURAS	29

DEDICATORIAS

A mis padres

Pedro Galindo Rodríguez

Natividad Muñiz García

Por brindarme siempre su apoyo, comprensión y confianza

A mis hermanos, amigos y en especial a Rosa Martínez por su incomparable e incondicional amistad

A todas las personas que de alguna manera me han brindado su ayuda

A la Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Por mi formación profesional

Al Departamento de Producción Animal: Aves

A todos y cada uno de sus integrantes porque de alguna manera han contribuido en mi superación profesional y personal.

A mis asesores:

MVZ, MC, PhD Guillermo Téllez Isaías por su confianza, apoyo y por permitirme formar parte de este gran equipo de trabajo.

MVZ, EPA Magdalena Escorcía Martínez por brindarme siempre su ayuda, compartir sus conocimientos y experiencia profesional, por su asesoría y preocupación en mi formación.

MVZ, EDPV, MC Victor Manuel Petrone García por sus valiosas observaciones y crítica oportuna.

MVZ Tamas Fehervari Bone por su gran disposición como profesionista y persona.

A todos los que contribuyeron para lograr este trabajo.

A los integrantes de mi jurado:

MVZ, MC José Antonio Quintana López por su apoyo incondicional.

MVZ Angel Retana Reyes

MVZ Francisco Basurto Alcántara

MVZ Odette Urquiza Bravo

Por sus observaciones pertinentes.

Al programa de Fundación UNAM a través de la beca tesis por el apoyo económico sin el cual no hubiera sido posible llevar a cabo este trabajo.

GRACIAS...

RESUMEN

GALINDO MUÑOZ FELIPA. Evaluación de la respuesta serológica de cuatro procedimientos de vacunación de explotaciones avícolas contra el virus de bronquitis infecciosa en pollo de engorda, mediante la técnica de ELISA (bajo la dirección de: MVZ, EPA Magdalena Escorcía Martínez; MVZ, EDPV, MC, Víctor Manuel Petrone García; MVZ Tamas Fehervari Bone y MVZ, MC, PhD Guillermo Téllez Isaías).

Debido a que la bronquitis infecciosa (BI) continúa siendo causa de grandes pérdidas económicas en las granjas avícolas, a pesar del uso de vacunas de buena calidad; se evaluó el procedimiento de vacunación de cuatro explotaciones avícolas de pollo de engorda, de la estirpe Peterson-Avian Farm que presentaban diferentes niveles de anticuerpos maternos contra (BI), en el Departamento de Producción Animal: Aves. Se determinó la seroconversión como respuesta a la vacunación y el porcentaje de protección al desafío con un virus patógeno de BI cepa Massachusetts, en pollos vacunados al día de edad y revacunados a los 19 y 23 días de edad con vacunas a virus vivo atenuado, mediante la obtención del título de anticuerpos circulantes utilizando la técnica de ELISA y sometiendo a las aves a un desafío con virus del mismo serotipo de la vacuna. Las aves fueron vacunadas al día de edad en su respectiva granja de procedencia, con la vacuna y el procedimiento de vacunación elegido por el propietario de cada explotación (grupos A, B, C y D). Los cuatro grupos testigos (a, b, c y d) no fueron vacunados y se mantuvieron aislados bajo condiciones controladas. Los resultados del aislamiento viral indican que en las aves vacunadas al día de edad, con media dosis vía aspersión y revacunadas a los 19 y 23 días de edad, con una dosis completa en agua de bebida la protección alcanzada fue de un 100%. Para otro grupo (B) vacunado al día de edad con media dosis en agua de bebida, se observó un 82 % de protección, considerándose satisfactorio y para un cuarto grupo vacunado al día de edad con media dosis, por aspersión con gota fina, se obtuvo sólo un 8.2 % de protección, considerándose como no satisfactorio. Las medias geométricas (MG) de anticuerpos obtenidos en los grupos B, C y D mediante ELISA, no mostraron correlación con la protección de las aves al desafío. En el caso del grupo A sólo una ave presentó títulos contra el VBI existiendo correlación con la protección de las aves al desafío, las que alcanzaron un porcentaje del 8.2 %. La influencia de anticuerpos maternos sobre la vacunación de las aves al día de edad en este caso puede no ser significativa, ya que, la MG obtenida a partir de todos los grupos fue baja; aunque no se puede descartar su efecto sobre la adecuada generación de inmunidad a nivel sérico, así como la inmadurez inmunológica presente

en aves de un día de edad. El título de la vacuna, en este caso muy influido por la dosis utilizada, debe tomarse en cuenta si se quiere obtener una respuesta inmune satisfactoria. Con base en los resultados obtenidos y de acuerdo con lo mencionado por diversos investigadores se concluye que de los calendarios de vacunación utilizados en esta evaluación, en uno de los casos, no fue efectivo ya que no proporcionó protección a las aves ante un desafío controlado con virus de bronquitis infecciosa, sugiriendo que el procedimiento utilizado no fue el adecuado, lo cual es discutido.

INTRODUCCIÓN

Durante los 67 años que han transcurrido desde que fue descrita por primera vez la bronquitis infecciosa, ha sido posible controlar e incluso erradicar muchas otras enfermedades aviares, mientras que la BI continúa siendo motivo de investigación entre los médicos veterinarios especialistas en aves en todo el mundo. Anualmente se invierten grandes cantidades de dinero en vacunas, equipo y administración de productos, pero debido a que existen muchos subtipos distintos del virus de BI (VBI) y siguen surgiendo nuevos, esta enfermedad continúa causando pérdidas económicas, ya que las vacunas no son específicas para los nuevos subtipos.^{1,2,3}

En nuestro país la BI se ha diagnosticado principalmente mediante aislamientos del virus, a partir de muestras procedentes de diversas partes del país y por medio de monitoreos con pruebas serológicas como inhibición de la hemoaglutinación (HI) y virus seroneutralización (VSN), en parvadas antes y después de la vacunación o posvacunación para evaluar su comportamiento inmunológico y determinar si su respuesta es la esperada o tuvieron contacto con el virus de campo o con un nuevo subtipo.⁴ De esta manera se ha logrado identificar su presencia en los estados de Sonora, Coahuila, Durango, Nayarit, Jalisco, Aguascalientes, San Luis Potosí, Querétaro, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Morelos, Puebla, Veracruz, Chiapas y Yucatán,^{1,4} reconociéndose oficialmente la presencia del virus de BI tipo Massachusetts y el tipo Connecticut,¹ pero existen informes de la presencia de otros tipos como el Arkansas.⁵

La bronquitis infecciosa (BI), es una enfermedad principalmente de tipo respiratorio, que afecta a pollos de engorda, gallinas de postura y gallinas reproductoras. Es ocasionada por un Coronavirus con genoma de ARN su tamaño va de 80-100 nm, posee cubierta lipoproteica en forma de corona y contiene tres proteínas estructurales: la S (espícula, formada por 2 glicoproteínas S1 y S2) y M (membrana) asociadas a la cubierta viral y la N (nucleocápside) asociada con el ácido nucleico del virus. Esta última proteína es relativamente estable a diferencia de las proteínas externas que pueden cambiar su organización de aminoácidos y originar lo que se conoce como puntos antígenicos de variación, dando como resultado la aparición de nuevos subtipos del virus que evaden la protección conferida por las vacunas existentes. La proteína S ha sido objeto de numerosas investigaciones debido a que la mayoría de las propiedades del virus están asociadas con ella.³

Para el control de la BI en nuestro país sólo se comercializan vacunas con las cepas activas Mass 41, Mass 48, H-52 y H-120, así como la cepa Connecticut, con un título mínimo de 10^4 DIE 50/ml.¹ El hecho de que sólo se utilicen vacunas contra estos tipos de VBI sugiere que el porcentaje de protección en aves vacunadas puede ser bajo ya que se necesitan vacunas contra cada subtipo que aparece.^{6,7,8}

La BI infecta a las aves junto con otros agentes complicantes como *Mycoplasma* spp, *Escherichia coli*, *Haemophilus* sp, *Pasteurella* sp, *Ornithobacterium rhinotracheale* y posiblemente neumovirus, provocando mortalidades de hasta 25% en pollos de engorda menores de 6 semanas.^{5,9} Se presentan signos respiratorios clínicos característicos como boqueo, tos, estornudo, estertores traqueobronquiales, descarga nasal, sofocación, lacrimación y algunas veces hay inflamación de senos. Las aves se observan deprimidas, agrupadas bajo la fuente de calor y la ingestión de agua y alimento disminuyen.^{9,10,11}

Cuando el VBI infecta a pollitas de reemplazo menores de 2 semanas ocasiona improductividad a la madurez sexual hasta en un 20%, esto debido al daño irreversible en el oviducto. Al infectar a gallinas de postura ocasiona descenso de más de 25% en la producción de huevo durante 6-8 semanas, después de este tiempo vuelve a incrementarse, pero no logran recuperar el nivel que tenían. La calidad del huevo (interna y externa), proveniente de aves infectadas con el VBI, disminuye presentándose huevos con albúmina poco densa, cascarón delgado, rugoso, deforme y en huevos de color se pierde la pigmentación. Estas alteraciones pueden persistir hasta 2 semanas después de desaparecer los signos clínicos. En el caso de gallinas reproductoras se ha encontrado que además de la disminución en la producción de huevo, la cantidad de huevos infértiles puede incrementarse hasta un 92% y la incubabilidad reducirse al 7%.^{9,10,11}

Debido a la magnitud del problema, se han tratado de instrumentar programas de vacunación capaces de prevenir la infección en granjas donde se manejan grandes cantidades de aves. La literatura sugiere la edad en que las aves deben ser vacunadas dependiendo de su fin zootécnico pero no siempre se obtienen los resultados esperados, ya que, cualquier vacuna puede fallar si existen condiciones sanitarias deplorables en las granjas avícolas y una inadecuada aplicación o manejo de ésta.^{12,13,14}

La vacunación debe cumplir con ciertos objetivos incluyendo la prevención de morbilidad, mortalidad, inmunodepresión y efectos asociados a infecciones, como disminución en la producción de huevo. En el caso de enfermedades que afectan a las aves jóvenes, asegurar el desarrollo de altos niveles protectores de anticuerpos maternos, mediante la adecuada vacunación de las reproductoras.^{15,16} Hay estudios que sugieren que la inmunidad pasiva interfiere muy poco con la vacunación al día de edad contra la BI, pero aves con altos niveles de anticuerpos maternos pueden tener reacciones posvacunales menos severas.^{18,19,20,21} El éxito de ésta depende también de su calidad y de la respuesta inmune del ave hacia éstas. Entre los factores que afectan la respuesta del animal se incluyen la edad, la vía de aplicación, su estado de salud en general y la naturaleza del antígeno.^{2,9,17}

Un programa de vacunación razonable debe comprender los siguientes principios: llevarse a cabo cuando el ave es inmunológicamente competente, utilizar vacunas altamente inmunogénicas, evitar factores que impidan una adecuada respuesta inmune, como presencia de la enfermedad en la zona, medidas de bioseguridad, instalaciones y sistemas de explotación, aplicación de una dosis inadecuada del virus vacunal, infecciones concomitantes, inmunodepresión y la posible interferencia con anticuerpos maternos.^{2,11,15}

La respuesta inmune al VBI depende en gran parte de la vía y forma de administración de las vacunas.⁷ Hofstad en 1984 advierte que la exposición de las aves a la vía de aerosol induce una respuesta mejor de inmunidad que la administración por el agua, debido a que, la vacuna produce una respuesta inmune local de tipo humoral y celular en el aparato respiratorio superior.²²

En estudios recientes mencionan que en la inmunidad desarrollada a nivel de mucosas, la cual se logra mediante la aplicación de antígenos por vía oral, nasal y ocular; las células epiteliales actúan como células procesadoras y presentadoras de antígeno, captando polipéptidos y activando a células T CD8+; con la existencia de linfocitos intraepiteliales de memoria, regulados por receptores y contrareceptores localizados en los linfocitos y en el endotelio de las grandes vénulas,

que circulan y extienden la generación de inmunidad en mucosas del tracto digestivo activando la respuesta en placas de Peyer, tonsilas cecales y probablemente en las mucosas del aparato reproductor. Considerando este punto de vista, la vacunación por aspersion o en agua de bebida es posible que promueva una respuesta inmune de tipo celular en mucosas tanto del aparato respiratorio, digestivo y reproductor.^{23,24}

Debido a que aún no se tiene información suficiente, así como pruebas de laboratorio aplicables para evaluar la inmunidad de tipo celular, conferida por la administración de vacunas por aspersion y en agua de bebida, el muestreo de anticuerpos circulantes en parvadas comerciales, continua siendo una de las herramientas de gran utilidad para detectar la presencia del virus y también para diseñar, evaluar o modificar un determinado calendario de vacunación.^{2,7}

Todas las cepas del VBI inducen la formación de anticuerpos que pueden ser medidos de manera secuencial por medio de pruebas serológicas, las cuales son utilizadas con diferentes objetivos: determinar los niveles de anticuerpos resultantes de la vacunación para establecer programas de control de la enfermedad, confirmar la presencia de virus de campo y diferenciar cepas virales. Existen diferentes pruebas serológicas para detectar y cuantificar anticuerpos contra bronquitis y las de uso común son:

Pruebas de inmunodifusión en agar (IDA): es útil para detectar anticuerpos contra virus de campo o vacunales, el método es sencillo y fácil de realizar, proporciona información sobre el estado inmunológico de una parvada y permite hacer una evaluación serológica de aves no vacunadas. Sin embargo, esta prueba no es muy usada en avicultura debido a que la detección de anticuerpos precipitantes es transitoria, ya que tienden a desaparecer al cabo de pocas semanas. En el caso de infecciones pueden encontrarse anticuerpos durante 3-4 meses posinfeccion. La prueba es cualitativa y no cuantitativa. Su sensibilidad es poca, requiriéndose una alta concentración de anticuerpos para obtener una respuesta positiva.^{9,11,25,26,27}

Prueba de virus seroneutralización (VSN): es utilizada para clasificar cepas del virus de BI ya que tiene la capacidad de detectar anticuerpos contra el antígeno S1 del virus donde radican las diferencias principales entre las cepas representantes de los distintos subtipos. Para la realización

de la prueba se necesita trabajar con embriones libres de patógenos específicos (SPF) o con cultivos celulares que requieren de equipo y reactivos especiales. El tiempo de realización, en ocasiones, es mayor a una semana.^{9,11,25,26,27}

Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH): Se usa para clasificar cepas del virus ya que detecta anticuerpos contra el antígeno S1. Cuando las muestras proceden de aves jóvenes que no han tenido contacto con varias cepas del virus, la prueba es altamente específica y en algunos casos se puede establecer el tipo de cepa que afecta las aves analizando los resultados serológicos. Sin embargo, cuando los sueros proceden de aves adultas o que han sido vacunadas o expuestas a cepas del virus de BI varias veces, la prueba presenta numerosas reacciones cruzadas, es decir, pierde especificidad no diferenciando entre tipos comunes como Massachusetts y Connecticut y nuevos subtipos variantes. Esto se debe tener en cuenta pues la detección de anticuerpos contra una cepa determinada no necesariamente implica que las aves han sido expuestas a esta cepa.^{9,11,25,26,27}

Prueba de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbentassay): la prueba de ELISA tiene baja especificidad, debido a que no identifica anticuerpos producidos como respuesta a un subtipo específico, esto debe ser contrarrestado con una evaluación serológica frecuente y buena historia clínica de las parvadas. ELISA da más reacciones cruzadas que otras pruebas debido a que las placas comerciales se preparan con cepa Massachusetts y contienen todos los antígenos del virus de BI, las proteínas N, M, S1 y S2. Las ventajas principales de esta prueba radican en su rapidez pues se pueden obtener resultados en 3-4 horas, la capacidad de examinar un buen número de muestras individuales, la automatización del procedimiento, la posibilidad de almacenar los resultados en un computador, usando programas disponibles comercialmente además de detectar la presencia de anticuerpos por un período prolongado de tiempo, dada su mayor sensibilidad.^{9,11,25,26,27,28,29,30,31}

Los valores obtenidos mediante ELISA tienen poca variación mientras se utilice el mismo sistema comercial. La edad, el tipo de ave, los programas de vacunación y el estado inmunológico del ave son algunos de los muchos factores que influyen sobre los niveles de anticuerpos. Estos factores deben tenerse en cuenta para interpretar las cifras que establecen que los niveles de anticuerpos sean altos, medianos o bajos.¹³ La serología con la prueba de ELISA es únicamente una

herramienta al evaluar programas de vacunación o diagnosticar la enfermedad y los resultados obtenidos con ésta aunados a otras evaluaciones como la histopatología, el aislamiento del virus y otros tipos de pruebas serológicas a menudo completan el resultado final.³²

Pruebas de potencia: muy comúnmente utilizada en la evaluación de la respuesta inmune, consiste en la observación de signos en aves vacunadas después de desafíos controlados, para interpretar resultados de protección conferida a las aves después de la aplicación de vacunas. Estos signos no son fáciles de detectar en aves parcialmente inmunizadas y es el aislamiento del virus a partir de hisopos traqueales y/o cloacales, el método preferido para la evaluación inmunológica posdesafío. La realización de esta prueba lleva más tiempo pero se obtienen resultados satisfactorios.³³

En este trabajo se decidió utilizar la prueba de ELISA, debido a que es una de las pruebas más solicitadas a los laboratorios de diagnóstico por los propietarios de explotaciones avícolas, para evaluar la respuesta serológica de las aves posterior a la introducción de algún programa de vacunación o uno ya establecido y poder determinar el grado de protección conferida por la vacuna y el método empleados.

Debido a lo anterior y a que la BI continúa causando grandes pérdidas económicas se determinó evaluar los procedimientos de vacunación de cuatro granjas comerciales de pollo de engorda, considerando la vacuna (cepa y título vacunal), métodos y vías de administración utilizados, así como, la edad del ave a la vacunación.

HIPÓTESIS

Las aves que han sido vacunadas contra la bronquitis infecciosa aviar, deben producir respuesta inmune suficiente para neutralizar desafíos de campo.

OBJETIVOS

- 1) Identificar los niveles de anticuerpos séricos, producidos por una vacunación a virus vivo, mediante la técnica de ELISA.
- 2) Evaluar su capacidad de protección ante un desafío viral con una cepa del mismo serotipo.

MATERIAL Y MÉTODOS

AVES DE EXPERIMENTACIÓN. Se utilizaron 80 pollos de ambos sexos de la estirpe Peterson x Avian Farm, originarias de la misma incubadora comercial y procedentes de 4 granjas diferentes. Se formaron cuatro grupos con 10 aves testigo cada uno y se alojaron desde el día de edad hasta la sexta semana en unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves (DPA:Aves) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., en corrales de madera con cama de viruta, consumiendo alimento comercial y agua a libre acceso. Otros cuatro grupos de 10 aves cada uno se vacunaron (A, B, C y D) y revacunaron (C y D) en su respectiva granja de procedencia, permaneciendo ahí hasta la sexta semana de edad en que fueron remitidas al DPA. Aves, para obtener las muestras de suero y desafiarlas.

VIRUS VACUNAL. Para el grupo A se utilizó un virus activo modificado cepa Mass 48 con título de $10^{5.45}$ DIEP₅₀ por ml, para el grupo B virus activo modificado cepa Mass con título de $10^{4.5}$ DIEP₅₀ por ml, para los grupos C y D virus activo modificado cepa Mass con título de $10^{3.2}$ DIEP₅₀ por ml en la vacunación y virus activo modificado cepa Mass con título de $10^{3.5}$ DIEP₅₀ por ml en la revacunación. Las vacunas procedían de distintos laboratorios.

VIRUS DE DESAFÍO. Cepa virulenta, Massachusetts M41 con título de 10^4 DIEP₅₀ por ml.*

INOCULACIÓN VIRAL.

Virus vacunal: Grupo A se aplicó por aspersión con gota fina media dosis de 7 ml/100 aves (recomendada por el productor), al día de edad. Grupo B se aplicó en agua de bebida a media dosis de 7 ml/100 aves (recomendada por el productor), al día de edad. Grupos C y D en la primovacunación se aplicó por aspersión a media dosis de 7 ml/100 aves (recomendada por el productor), al día de edad y en la revacunación se suministró en agua de bebida a dosis completa de 14 ml/100 aves (recomendada por el productor), a los 23 y 19 días de edad respectivamente (cuadro 1).

Virus de desafío: Las aves de los 8 grupos se inocularon con el virus de desafío por vía ocular con dosis de 0.2 ml por ave, como lo establece el Code of Federal Regulations.³⁴

* Donado por Laboratorios de Investigación Aplicada, S.A. Tehuacán, Puebla.

TOMA DE MUESTRAS.

Serología: Se tomaron muestras de sangre a las 40 aves no vacunadas y a las 40 aves vacunadas, al día de edad para determinar la tasa de anticuerpos maternos y a los 46 (grupo A), 42 (grupo B), 42 (grupo C) y 39 (grupo D) días de edad para determinar la tasa de anticuerpos posvacunales, obteniendo como mínimo 1 ml de suero por ave.

Prueba de Potencia (aislamiento viral): Al quinto día posdesafío se sacrificó a las aves y se tomaron muestras de la mucosa traqueal con hisopo, los hisopos se colocaron en tubos con 10 ml de caldo triptosa fosfato, según lo establecido por el Code of Federal Regulations.³⁴

PRUEBA SEROLÓGICA DE ELISA. Se realizó la prueba utilizando equipo de diagnóstico y la técnica indirecta establecida por KPL.³⁵

AISLAMIENTO VIRAL PARA BRONQUITIS INFECCIOSA. Cada muestra de hisopo traqueal se filtró con membranas de poro de 0.45 μ m de diámetro y se inoculó en cavidad alantoidea, 0.2 ml del filtrado por embrión de 9-11 días de edad.^{11,34}

DISEÑO EXPERIMENTAL. Se formaron 8 grupos de 10 aves cada uno, 4 vacunados en la granja de procedencia (A, B, C y D) y 4 grupos testigos sin vacunación (a, b, c y d). Los grupos fueron muestreados y desafiados de la siguiente manera:

Grupo	No. de sueros	Edad a la toma de suero (días)	Edad al desafío (días)	Edad a la toma de hisopo traqueal (días)
A	10	1 y 46	47	52
a	10	1 y 46	47	52
B	10	1 y 42	43	48
b	10	1 y 42	43	48
C	10	1 y 42	43	48
c	10	1 y 42	43	48
D	10	1 y 39	40	45
d	10	1 y 39	40	45

³⁵ Kirkegaard and Perry Laboratories, 2 Cessna Court. Gaithersburg, Maryland 20879.

EVALUACIÓN DE LA PRUEBA.

Prueba de ELISA. Se obtuvo la media geométrica (MG) de los títulos de anticuerpos calculados con el programa de cómputo PROFILE^{®35} proporcionado por KPL. [®]

Aislamiento viral. La viabilidad de los embriones se observó mediante ovoscopio durante 7 días consecutivos posinoculación, después se sacrificaron y se les realizó estudio posmortem. Las lesiones que se consideraron producidas por el virus de la BI fueron: enanismo, falange distal hiperflexionada, patas comprimidas sobre la cabeza, embrión en forma de ovillo, falta de desarrollo y persistencia de uratos en el mesonefros; las membranas embrionarias mostraban amnios engrosado y adherido a la cabeza, saco vitelino encogido y membrana corioalantoidea friable, con aumento en el volumen de líquido alantoideo, según lo establecido por Winterfield *et al* en 1971, Gelb 1989 y King en 1995.^{11,36,37}

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En la prueba de potencia para que el aislamiento viral se considerara satisfactorio, se cumplieron dos requisitos:

- 1) Por lo menos el 90% de las muestras de las aves vacunadas fueron negativas al aislamiento del virus de BI de desafío y mínimo el 90% de las muestras de las aves no vacunadas fueron positivas.³⁴
- 2) Al realizar el análisis de proporciones mediante la prueba de Ji cuadrada resultaron estadísticamente diferentes los aislamientos virales entre los grupos A, B, C y D.

Para saber si existía diferencia estadísticamente significativa, de los resultados de la prueba de ELISA, se les aplicó análisis de varianza, donde la variable de respuesta fue el título de anticuerpos detectados, mientras que la variable explicativa fueron las vacunaciones. A los datos obtenidos, se les realizó una transformación mediante el cálculo de raíz cuadrada, sumándoles 0.5 de unidad para evitar las cantidades cero. La diferencia estadística de medias entre grupos se determinó mediante la prueba de Tukey, utilizando el paquete estadístico SAS.³⁸ La significancia estadística se fijó con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

ESTUDIO SEROLÓGICO

Se obtuvo la media de anticuerpos maternos de los cuatro grupos la cual fue de 661, con una desviación estándar de 983.

En la respuesta serológica de los sueros-muestra obtenidos a los 46 (grupo A), 42 (grupo B), 42 (grupo C) y 39 (grupo D) días de edad de las aves, a la inmunización con vacunas activas atenuadas contra BI, aplicadas al día de edad a diferente dosis, por diferente vía y procedentes de laboratorios distintos, se encontró que entre los grupos B, C y D no hubo diferencia estadística significativa ($P>0.05$), sólo el grupo A mostró diferencia estadística significativa ($P>0.05$) en relación con los otros grupos (cuadro 2, figura 1).

Las medias geométricas (MG) de anticuerpos obtenidos en los grupos B, C y D mediante ELISA, no mostraron correlación con la protección de las aves al desafío, considerando que KPL[®] para BI maneja un título de anticuerpos de 5000 como protector. En el caso del grupo A un ave presentó títulos contra BI existiendo correlación con la protección de las aves al desafío, las que alcanzaron un porcentaje del 8.2 %. La influencia de anticuerpos maternos sobre la vacunación de las aves al día de edad puede no ser significativa, ya que, la MG obtenida a partir de todos los grupos fue baja; aunque no se puede descartar su efecto sobre la adecuada generación de inmunidad a nivel sérico, así como la inmadurez inmunológica presente en aves de un día de edad.

Las MG de los grupos no vacunados (a, b, c y d) a la sexta semana de edad fueron de 0 en todos, lo cual indica que los anticuerpos maternos contra BI ya habían declinado y no fueron detectados por ELISA.

ESTUDIO VIROLÓGICO

En los grupos C y D se obtuvo un 100% de protección al desafío, estos grupos corresponden a las aves revacunadas alrededor de las tres semanas de edad. Se encontró diferencia estadística significativa entre el grupo A y los demás, así como el B con el C y el D (cuadro 3, figura 2).

Los resultados del aislamiento viral indican que en las aves vacunadas al día de edad, con media dosis vía aspersión y revacunadas a los 19 y 23 días de edad, con una dosis completa en agua de bebida la protección alcanzada fue de un 100%. Para otro grupo vacunado al día de edad, con media dosis, por aspersión, se observó un 82 % de protección y para un cuarto grupo vacunado al día de edad, con media dosis por aspersión con gota fina, se obtuvo sólo un 8.2 % de protección. En los grupos testigos no vacunados se aisló el virus de todas las muestras como se esperaba.

DISCUSION

Existen tantos calendarios de vacunación contra la BI, como granjas avícolas, pero no con todos se obtienen los resultados esperados como lo es el desarrollo de un adecuado nivel de anticuerpos, capaz de proteger a las aves contra posibles exposiciones al VBI.²

La respuesta contra una infección por el VBI, es el resultado de diversos mecanismos inmunes inatos y adquiridos. Dentro de los adquiridos se encuentra el representado por la inmunidad humoral, dada por anticuerpos contra el VBI, como IgG, IgA e IgM, tanto a nivel sérico como a nivel local. La cual puede ser determinada mediante pruebas de laboratorio como IH, VSN, AGP y ELISA entre otras. Pero, aunque estas han resultado ser muy útiles en la evaluación de la respuesta de anticuerpos de las aves hacia determinada vacuna y método de vacunación, no han sido lo suficientemente seguras para evaluar la protección real conferida por estas, ya que aves con bajos títulos de anticuerpos han resistido desafíos controlados demostrando estar protegidas contra el VBI. Las pruebas de potencia, siguen constituyendo un método muy utilizado en la actualidad, para determinar con mayor certeza el índice protectorio a nivel de tráquea, uno de los principales sitios de replicación viral, conferido por la vacunación.³³

La protección a nivel de tráquea en aves jóvenes involucra a la IgG, debido a que durante la infección existe una disminución significativa de la permeabilidad vascular que facilita el paso de esta inmunoglobulina de la circulación hacia la tráquea ocurriendo esto en vez de una secreción local activa, ya que el ave es inmunológicamente incompetente. Mientras que los anticuerpos maternos proveen al ave con IgG, la síntesis local de IgA posiblemente ocurre en la primera semana de vida⁴². El papel de la defensa inmune local en el tracto respiratorio del ave ha sido estudiada por Hawkes *et al* (1983)⁴⁸ mencionando que en aves adultas, el anticuerpo local principalmente es la IgG. Aunque este aspecto de protección, está aún bajo consideración.

Soto (1996)³ menciona que en el caso de BI las aves nacen con niveles de anticuerpos promedio de ELISA* entre 1000-3000, al finalizar la primera semana sin vacunación, los niveles de anticuerpos naturalmente descienden a niveles promedio menores de 1200. A partir de la segunda semana y sin vacunas, el nivel promedio de anticuerpos es menor de 350, lo cual puede mantenerse así el resto de

* IDEXX Laboratories Inc. Westbrook, Maine 04092.

su vida. La aplicación de dos vacunas puede arrojar niveles promedio de entre 700 y 1500 en ELISA^{*} hasta la salida de las aves al mercado (pollo de engorda), o de las pollitas que van a producción de huevo.

Pero es necesario tomar en cuenta el equipo de diagnóstico utilizado en el muestreo y evaluación de esta respuesta debido a que los resultados pueden variar de una marca a otra (IDEXX^{*}, KPL[®], etc). En el caso de KPL[®] es considerado un título de anticuerpos ELISA de 5000 como protectivo en aves vacunadas contra BI.

En este trabajo se encontró que en la primera granja representada por el grupo A, del total de aves evaluadas sólo un ave presentó título bajo de anticuerpos (75 ± 236), con base en lo establecido por KPL[®], mientras que el resto mostró un título de 0 a los 46 días de edad. En este caso los resultados serológicos mostraron correlación con los obtenidos mediante la prueba de potencia, ya que, el porcentaje de protección determinado fue del 8.2%. Esto nos sugiere que las aves no se encontraban protegidas contra un posible desafío con el VBI y eran susceptibles a la infección desde la sexta semana de edad.

La probable falla vacunal observada en las aves pertenecientes a este grupo, pudo deberse a un inadecuado manejo y/o administración de la vacuna por aspersión, dando como resultado aves no protegidas. Hofstad (1984)²² obtuvo mejores resultados al vacunar aves por aspersión que en agua de bebida. La conclusión anterior se basa en que probablemente las aves no desarrollaron una adecuada inmunidad a nivel local tanto humoral como celular en tracto respiratorio, que según lo mencionado por diversos autores es la que confiere mayor protección al ave aún después de que el nivel de anticuerpos séricos ha disminuido después de una vacunación. Lo que indica que el virus de desafío no fue neutralizado a este nivel, aislándose al primer pase en embrión de pollo a partir de los hisopos traqueales de estas aves.

King,²² Winterfield,³⁶ y Gelb³⁷ mencionan que las cepas de campo deben ser adaptadas al embrión para detectar el efecto de enanismo, enroscamiento, uratos en riñón, mal implante de emplume y engrosamiento de la membrana corion alantoidea, lo cual se manifiesta mínimo al tercer pase. En este trabajo no fue necesario realizar numerosos pases debido a que el virus de desafío ya estaba adaptado al embrión y las lesiones se manifestaron al primer pase.

Quiroz et al (1993)⁵, menciona que para minimizar el riesgo de reaislar virus vacunales, en el caso de aves vacunadas contra BI, las muestras deben tomarse al menos 3 semanas después de la aplicación de la vacuna. Asegurando así que el sistema inmunológico neutralizó y proceso todo el virus vacunal. En nuestro caso para los grupos A y B el tiempo transcurrido entre la vacunación y el desafío fue de 6 semanas y en los grupos C y D de 3 semanas, concordando con lo mencionado por este autor.

Al vacunar aves por aspersión, la inmunidad se logra tanto a nivel local como sérico,³⁹ por lo tanto, aunque las aves no mostraran un título de anticuerpos séricos protectivos deberían haber resistido el desafío, considerando lo mencionado por Toro y Fernández (1994, 1996)^{20,40} y por Da Silva *et al* (1991),⁴¹ quienes encontraron que en el caso de la BI la inmunidad y resistencia del ave hacia la infección, está dada principalmente a nivel local siendo la glándula de Harder el órgano encargado de ésta, y sugiriendo que en infecciones por el VBI la protección puede estar llevándose a cabo en ausencia de anticuerpos humorales. Estos mismos autores concluyen que la determinación de los niveles de IgA en lágrima puede utilizarse para establecer con mayor precisión el perfil inmunológico en parvadas comerciales, sin embargo, la obtención de fluido lagrimal de manera rutinaria no es práctico.

Davelaar y Kouwenhoven (1980),⁴² encontraron que aves vacunadas a la tercera semana de edad por aspersión, desarrollaron inmunidad protectora a las seis semanas de edad la cual fue completa a la octava semana de edad, sugiriendo que el éxito de la vacunación por aspersión depende de la edad del ave al ser inmunizada. Aunque esto no corresponde totalmente con lo realizado en este trabajo, puede indicarnos que la edad a la cual se vacunó no fue la adecuada, tal vez por la presencia de anticuerpos maternos o debido a la inmadurez inmunológica de las aves. Cabe mencionar que las aves al día de edad no poseen un sistema inmune lo suficientemente maduro para responder al estímulo vacunal, tan satisfactoriamente como en el caso de aves vacunadas a una edad mayor, por lo que también este factor pudo haber influido en el resultado. Se menciona que las aves son inmunológicamente maduras hasta la tercera semana de edad.²⁷

Tomando en cuenta la edad a la vacunación, se ha encontrado que la presencia de anticuerpos maternos en aves vacunadas al día de edad, puede interferir con el desarrollo adecuado del título de

anticuerpos, Raggi y Lee (1965)⁴⁴ y por lo tanto en la protección ante desafíos a una edad posterior a la vacunación. En el caso de las aves utilizadas en este trabajo, sólo se obtuvo la MG de anticuerpos maternos para los cuatro grupos vacunados y la de los cuatro grupos de aves no vacunadas, debido a que procedían de la misma incubadora comercial.

La MG del título de anticuerpos ELISA para los grupos a, b, c y d al día de edad fue de 661 ± 983 , considerándose baja, indicando que tal vez la presencia de inmunidad pasiva no fue tan significativa como en el caso de aves que nacen con altos títulos de anticuerpos maternos, en las cuales el efecto neutralizador del virus vacunal por parte de estos es más notorio, provocando un retardo en el desarrollo de la respuesta inmune (título máximo de anticuerpos) después de la vacunación o que las aves no posean un adecuado título protector de anticuerpos, permaneciendo susceptibles a la infección por el VBI, aunque por otro lado, las reacciones posvacunales son más leves que aves con bajos títulos de anticuerpos maternos circulantes, según lo mencionado por Dufour (1992)¹⁹ y Butcher *et al*(1993).¹⁷

Darbyshire y Peters (1985),⁴⁵ encontraron que la vacunación de aves a la primera o segunda semana de edad les proporcionó protección contra desafíos a la quinta o sexta semana de edad y en el caso de aves vacunadas al día de edad, no mostraron protección al desafiarlas a la novena semana. Al igual que Andrade *et al* (1982),⁴⁶ quienes mencionan que aves vacunadas al día de edad con cepas tipo Mass permanecieron protegidas contra desafíos, con virus homólogos, hasta la cuarta semana de vida.

Al llevar a cabo la vacunación de las aves a la semana de edad o después, se evita el posible efecto neutralizante del virus vacunal por parte de los anticuerpos maternos, ya que, estos tienden a disminuir después de la primera semana de vida.^{2,3} Davelaar y Kouwenhoven (1977),¹⁸ encontraron índices neutralizantes de anticuerpos maternos de 0 en aves a los 30 días de edad y Darbyshire y Peters (1985)⁴⁴ mencionan que en aves no vacunadas los anticuerpos maternos declinan linealmente, presentando una vida media de 5-6 días, proporcionando protección contra desafíos hasta la cuarta semana de edad.

Por otro lado, la media dosis utilizada pudo influir en gran medida en el desarrollo de una inadecuada respuesta inmune, ya que, al disminuir la dosis de la vacuna, se disminuye la carga viral o

el título de ésta provocando a su vez que no cumpla con el título establecido oficialmente de $10^{4.5}$ DIEP₅₀/ml para lograr una verdadera inmunización.¹ Aunque el utilizar media dosis puede evitar que se presenten reacciones posvacunales severas, esto debido a que la carga viral que reciben las aves es menor y por lo tanto el daño a nivel tisular provocado por el virus también, considerando la edad de las aves al recibir la vacuna; lo mejor no es disminuir la dosis sino elegir una cepa de alto pasaje (como la H52 y H120) procurando que sea lo suficientemente inmunogénica y estimule una respuesta adecuada y protectora.^{7,9} En cuanto a la cepa vacunal, ésta se tomó en cuenta para realizar el desafío de las aves y evitar utilizar un virus de diferente subtipo, ya que, no existe suficiente protección cruzada entre los subtipos existentes, como lo menciona Butcher *et al* (1993)¹⁷ y Perrota *et al* (1988).⁴³

Sin embargo, no hay que olvidar la importancia de la protección a nivel local, tanto celular como humoral, que le permite al ave incrementar su resistencia contra la infección y que según lo encontrado por Toro y Fernández (1996),⁴⁰ no se ve significativamente afectada por la presencia de anticuerpos maternos en las aves. No obstante, la influencia de los anticuerpos maternos sobre la vacunación de las aves al día de edad utilizadas en este trabajo no puede descartarse, debido a que en la mayoría de los experimentos realizados al respecto se han utilizado aves SPF cuyo comportamiento inmunológico puede ser diferente al de aves comerciales provenientes de aves reproductoras inmunizadas constantemente,³¹ como en nuestro caso.

En el caso de la segunda, tercera y cuarta granja, representadas por los grupos B, C y D, los títulos de anticuerpos ELISA no mostraron correlación con la protección de las aves al desafío, concordando con lo mencionado por Darbyshire y Peters (1985),⁴⁵ McDonald *et al* (1982)²¹ y por Toro y Fernández (1994),²⁰ quienes encontraron que aves vacunadas que presentaban bajos índices de neutralización, resistieron el desafío con VBI, durante cuatro días posteriores a este. Las MG obtenidas de los sueros-muestra en los tres grupos no mostraron diferencia significativa entre ellas, pero los resultados del aislamiento viral indican que las aves se encontraban protegidas, determinándose porcentajes de protección del 82%, 100% y 100% respectivamente.

Para la evaluación de la respuesta presentada por las aves del grupo B, debe tomarse en cuenta que las vacunas administradas en agua de bebida son susceptibles a la inactivación por sustancias utilizadas para controlar contaminación bacteriana y micótica del sistema hidráulico. Se ha visto que la

eliminación de éstas sustancias antes de la vacunación y la incorporación de leche descremada en polvo a concentración de 1:400 estabiliza el título de virus durante la administración de la vacuna.¹¹ Sin embargo, no puede descartarse el hecho de que en la vacunación de las aves pertenecientes a este grupo la vacuna haya disminuído su título debido a que no se eliminaron totalmente las sustancias inactivantes. Lo cual también pudo haber influído en el desarrollo adecuado de inmunidad en las aves y por lo tanto del porcentaje de protección presentado por este grupo (82%), que aunque es considerado como satisfactorio pudo haber sido mayor.

En lo que respecta al título que presentaba la vacuna aplicada al grupo B, este se encontraba dentro de lo establecido ($10^{4.5}$ DIEP₅₀/ml), por lo que, considerando la edad a la cual fueron vacunadas las aves se puede establecer que posiblemente la vacuna no tuvo un buen manejo o no se controlaron totalmente los factores que pueden ocasionar una disminución del título o inactivación de la vacuna. Tomando en cuenta que la vacuna, en este grupo, se administró a media dosis.

Los grupos C y D vacunados por aspersión a media dosis, probablemente tuvieron un comportamiento serológico similar al del grupo A después de la primovacunaión debido a que el título de la vacuna que se les aplicó fue de $10^{3.2}$ DIEP₅₀/ml, encontrándose inferior a lo requerido oficialmente, pero el hecho de que las aves de estos grupos hayan sido revacunadas en agua de bebida con una dosis completa a los 23 y 19 respectivamente, probablemente incrementó y prolongó la activación de su respuesta inmune protegiéndolas contra el virus de desafío utilizado, lo cual se confirma con los resultados obtenidos en la prueba de potencia y específicamente en el aislamiento viral (100% de protección en ambos grupos). Darbyshire y Peters (1984),⁴⁷ encontraron resultados similares, pero utilizando aves Rhode Island Red, primovacunadas a la segunda semana de edad (vacuna HI20) y revacunadas a las 15 semanas de edad (vacuna H52), concluyendo que la mejor edad para vacunar a las aves fue a la segunda semana de vida.

Al comparar los resultados obtenidos en cada uno de los grupos vacunados, con sus respectivos grupos testigos no vacunados, se encontró que en el caso de los grupos A y a, las diferencias tanto en el estudio serológico y virológico, no fueron significativas, ya que en el grupo testigo se obtuvo una MG de títulos ELISA de 0 a las 6 semanas de edad, aislándose el virus de todas las muestras (0% de protección al desafío), lo cual estadísticamente no demostró diferencia con la MG de títulos ELISA^{*} de 75 obtenida en el grupo A, también a las 6 semanas de edad, así como con el porcentaje de

protección al desafío (8.2 %). Esto nos confirma aún más que el grupo vacunado realmente no estaba protegido ya que se comportó de manera similar al grupo de aves que no recibieron la vacuna. Debido a esto se llegó a la conclusión de que en este grupo la falla vacunal pudo haber sido consecuencia de un mal manejo de la vacuna y/o a la utilización de un procedimiento de vacunación no adecuado, sin descartar los factores propios de las aves que pueden interferir con la respuesta inmune como la edad.

En el caso de los grupos B, C y D, si se observaron diferencias significativas en relación a su grupo testigo tanto en los resultados serológicos como en la prueba de potencia. Las aves de los grupos vacunados y revacunados aunque no alcanzaron títulos ELISA^{*} protectivos si demostraron estar protegidas ante un desafío, mientras que en los grupos testigos a las 6 semanas se obtuvo una MG de 0, concordando con el porcentaje de protección al desafío obtenido al realizar el aislamiento viral (0%). Toro y Fernández (1994),²⁰ obtuvieron resultados similares evaluando la respuesta serológica de aves vacunadas al día de edad, mediante VSN y sometiénolas a un desafío cuatro semanas después.

Aunque la inmunidad celular representa un mecanismo de defensa considerable en la protección contra infecciones por el VBI y tiene importancia significativa, aún no existe un método práctico y útil a nivel de laboratorio para medirla de manera rutinaria, todos los trabajos al respecto han sido realizados de manera experimental y sería conveniente la evaluación de esta en investigaciones posteriores.*

A pesar de los numerosos estudios realizados, todavía quedan aspectos por investigar en lo que respecta a la enfermedad de BI. Desde la influencia exacta que tiene la presencia de anticuerpos maternos en aves vacunadas al día de edad sobre la carga viral de la vacuna, la susceptibilidad del ave a la infección dependiendo de su respuesta inmune y línea comercial, sin olvidarnos de la aparición de nuevos subtipos del virus que limitan la protección conferida por las vacunas existentes. El campo de investigación sobre BI todavía es muy amplio sobre todo en nuestro país en donde la mayoría de los resultados están basados en trabajos realizados en otros países, bajo diferentes condiciones.

* Fehervari T, comunicación personal.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos y de acuerdo con lo mencionado por diversos investigadores se concluye que los calendarios de vacunación utilizados en esta evaluación, en uno de los casos, no fue efectivo ya que no proporcionó protección a las aves ante un desafío controlado, sugiriendo que el procedimiento utilizado probablemente no es el adecuado.

Un programa de vacunación contra BI que incluya una revacunación ofrece a las aves una mejor protección contra posibles desafíos. La respuesta inmune de aves vacunadas al día de edad, por aspersión a media dosis contra BI, se vió incrementada con la aplicación de una segunda vacuna a los 19 y 23 días de edad, prolongando la protección contra infecciones por VBI cepa Massachusetts, al menos hasta la sexta semana de edad en la cual se evaluó en este trabajo.

Debido a que los niveles de anticuerpos séricos, en el caso de BI, generalmente no se encuentran correlacionados con la susceptibilidad de las aves a desafíos con cepas similares a las vacunales, la prueba de potencia sigue constituyendo un método de los más empleados para evaluar la protección de aves vacunadas y revacunadas a cualquier edad, con vacunas que poseen diferente título y administradas por cualquier vía y método de vacunación.

Al llevar a cabo una vacunación mediante un método masivo, como lo son la aspersión y el agua de bebida, deben tomarse muy en cuenta los factores que pueden influir sobre la calidad de la vacuna, disminuyendo su eficacia para estimular la respuesta inmune y el porcentaje de aves protegidas después de su administración.

Otro aspecto importante a considerar en investigaciones posteriores es el del efecto que tienen los anticuerpos maternos en aves vacunadas al día de edad, ya que, no se tiene un conocimiento exacto de su efecto neutralizante sobre el virus vacunal y en qué proporción disminuye la generación de anticuerpos protectores posvacunales.

Lo recomendable es seguir evaluando los calendarios de vacunación contra BI existentes, ya sea mediante la prueba de potencia, actividad ciliar de la tráquea e histopatología. Así como, la medición de inmunidad a nivel local (celular y/o humoral) que involucre el estudio de la glándula de Harder y

su importancia en la determinación de la protección de las aves contra desafíos y el desarrollo de técnicas que faciliten la evaluación de este tipo de inmunidad, tanto a nivel de campo como en un laboratorio de diagnóstico. Lo anterior enfocado a brindar más apoyo a los productores en la elaboración de calendarios de vacunación contra BI más adecuados para su explotación.

REFERENCIAS

- (1) Lucio DE. Calendarios de Vacunación y Monitoreo en el pollo de engorda y gallina de postura. Memorias del Curso de Actualización Sobre Técnicas de Vacunación y Reacciones Posvacunales; 1996 noviembre 29; Ciudad de México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1996: 47-52.
- (2) Cook JKA. Actualidades sobre la bronquitis infecciosa: problemas respiratorios en las aves. Intervet. 1:1-10 (1996).
- (3) Soto PE. Situación Actual de la Bronquitis Infecciosa en México. Memorias del VIII Curso de Actualización Avi-Mex Bronquitis Infecciosa y Problemas Respiratorios Emergentes; 1996 julio 26; Ciudad de México. México (DF): Laboratorio Avi-mex, SA de CV, 1996: 6-13.
- (4) Merino GR. Estudio descriptivo de los casos recibidos en el Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, para diagnóstico de bronquitis infecciosa aviar en el periodo 1990-1993 (tesis de licenciatura). México, DF. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, 1994.
- (5) Quiroz MA, Retana A, Tamayo M. Determinación de la presencia del serotipo Arkansas a partir de aislamientos del virus de bronquitis infecciosa aviar en México. Memorias de la IV Jornada Médico Avícola; 1993 agosto 4-6; Ciudad de México. México (DF): Departamento de Producción Animal: Aves-División de Educación Continua de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1993: 191-198.
- (6) Avellaneda G. Estructura del virus de bronquitis infecciosa. Avicult Prof 1992; 10: 38-40.
- (7) Lucio MB. Respuesta inmune al virus de la bronquitis infecciosa: protección y serología. Memorias de la XVIII Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas; 1993 mayo 55-9; Cancún (Quintana Roo) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1993: 132-137.

- (8) Hofstad MS. Immune response to infectious bronchitis virus. *Am J Vet Res* 1975; 36: 520-521.
- (9) Lucio MB. El virus de la bronquitis infecciosa y sus variantes. *Memorias de la XXII Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas*; 1997 mayo 7-11; Ixtapa-Zihuatanejo (Guerrero) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1997: 316-322.
- (10) Moreno ChR. Bronquitis infecciosa de las aves. *Inf Cient y Tecnol* 1994;1:9-16.
- (11) King DJA, Cavanagh D. Bronquitis infecciosa. En: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW. *Enfermedades de las aves*. México (DF): Manual Moderno, 1995: 575-591.
- (12) Fechner J. *Vacunas y vacunación de los animales domésticos*. Zaragoza España: Acribia, 1986.
- (13) López S, Canovas A, Viamontes O, Nuñez L. Valoración de los esquemas más adecuados de la vacunación contra el Newcastle y la bronquitis infecciosa en pollos de engorde. *Rev Cubana Cienc Avic* 1991; 18: 62-70.
- (14) Daroch FMG. Respuesta de anticuerpos sistémicos de pollos Leghorn frente a dos programas de vacunación contra la bronquitis infecciosa aviar. *Av Cienc Vet* 1992;7: 95-96.
- (15) Aini Y. Control of poultry diseases en Asia by vaccination. *Wld's Poult Sci J* 1990; 46: 125-132
- (16) Sander JE. Principles of vaccination programs for poultry health. *Poult Dig* 1991; 50: 14-24.
- (17) Butcher DG, Miles DR. Vaccination failure: factors to consider. *Poult Dig* 1993; 52: 22-26.
- (18) Davelaar FG, Kouwenhoven B. Influence of maternal antibodies on vaccination of chicks of different ages against infectious bronchitis. *Avian Pathol* 1977; 6: 41-50.

- (19) Dufour L. Influencia de las reproductoras sobre las reacciones vacunales de la progenie. *Avicult Prof* 1992, 10: 44-45.
- (20) Toro H, Hidalgo H, Collingwood-Selby AN. Lachrymal antibody response of specific pathogen free chickens and chickens with maternal immunity after infectious bronchitis virus vaccination. *Prev Vet Med* 1994; 18: 267-274.
- (21) McDonald JW, Dagless MD, Martin DA, Randall CJ, Patisson M, Early JL, et al. Field observations on serological responses to vaccine strains of infectious bronchitis virus administered by coarse spray and via the drinking water. *Avian Pathol* 1982; 11: 537-546.
- (22) Hofstad MS. *Avian infectious bronchitis. Diseases of poultry*. 8th edition. United States of América: Iowa State University Press, 1984.
- (23) Kagnoff MF. Mucosal immunology: new frontiers. *Immun Today* 1996; 17: 57-59.
- (24) Husband AJ. Mucosal immune interactions in intestine, respiratory tract and mammary gland. In: Pandey RH, editor. *Infection and immunity in farm animals*. New York: Karger, 1985: 25-57.
- (25) Villegas P, Avellaneda G. Interpretación de resultados serológicos en bronquitis infecciosa. *Avicult Prof* 1992; 10: 8-12.
- (26) Fenner F. *Virología veterinaria*. Zaragoza España: Acribia, 1987.
- (27) Tizard Y. *Inmunología Veterinaria*. 4a edición. México DF: Mc Graw-Hill, 1995.
- (28) Rubio GME. ELISA en el diagnóstico de las enfermedades aviares. *Memorias de la II Jornada Médico Avícola*; 1991 agosto 19-23; México. México (DF): Departamento de Producción Animal Aves-División de Educación Continua de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1991: 248-257.

(29) Zellen GK, Thorsen J. Standardization and application of the enzyme-linked immunosorbent assay for infectious bronchitis. *Avian Dis* 1986; 30: 695-698.

(30) Canovas A, Acosta Y, Viamontes O, Guilarte O, Trujillo A. Estudio serológico de las enfermedades de Newcastle y bronquitis infecciosa según las pruebas de HI, AGP y ELISA. *Rev Cubana Cienc Avic* 1990; 17: 7-11.

(31) De Wit JJ, Mekkes DR, Kouwenhoven B, Verheijden JHM. Sensitivity and specificity of serological test for infectious bronchitis virus antibodies in broilers. *Avian Pathol* 1997;26: 105-118.

(32) Dufour L, McCarty J. Uso correcto de la serología en pollos de engorde para el control y diagnóstico de enfermedades. *Avicult Prof* 1993; 11: 30-32.

(33) McMartin DA. Infectious bronchitis. In: McFerran JB, McNulty MS. *Virus infections of birds*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993: 249-275.

(34) The Office of the Federal Register National. Archives and Records Service General Services Administration. Code of federal regulations. Animals and animal products. Federal Register National Archives 1975; 9: 284-286.

(35) Kirkegaard and Perry Laboratories. Profile (computer program) versión 2.1. The KPL diagnostic system manual. Bangkok (Thailand): KPL, 1993.

(36) Winterfield RW, Fadly AM, Hanley JE. Characteristic of an isolate of infectious bronchitis virus from chickens in Florida. *Avian Dis* 1971; 15: 305-311.

(37) Gelb J. Infectious bronchitis, in: Graham H, Lawrence H, Charles H, James EP (Eds). *Isolation and identification of avian pathogens*. New York: American Association of Avian Pathologist, 1989: 124-127.

- (38) Lugin Duke RC, Schlotzhauer SD. SAS/STAT guide for personal computers. 6th ed. Cary NC: SAS Institute. 1987.
- (39) Salado CR. Memorias del Curso de Actualización Sobre Técnicas de Vacunación y Reacciones Posvacunales; 1996 noviembre 29; Ciudad de México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1996: 23-28.
- (40) Toro H, Reyes E, Redmann T, Kaleta EF. Local and systemic specific antibody response of different chicken lines after ocular vaccination against infectious bronchitis. *J Vet Med B* 1996; 43: 449-454.
- (41) Da Silva MNR, Mockett APA, Barret ADT, Cook KAJ. IgM responses in chicken serum to live and inactivated infectious bronchitis virus vaccines. *Avian Dis* 1991; 35: 470-475.
- (42) Davelaar FG, Kouwenhoven B. Vaccination of 1-day-old broilers against infectious bronchitis by eye drop application or coarse droplet spray and the effect of revaccination by spray. *Avian Pathol* 1980; 9: 499-510.
- (43) Perrota Ch, Furtek Ch, Wilson AR, Cowen SB, Eckroade JR. A standardized enzyme-linked immunosorbent assay for infectious bronchitis virus: comparison with hemagglutination-inhibition and virus-neutralization assays for measuring protective antibody levels in chickens. *Avian Dis* 1988; 32: 451-460.
- (44) Raggi LG, Lee GG. Lack of correlation between infectivity serologic response and challenge results in immunisation with an avian infectious bronchitis vaccine. *J Immunol* 1965; 94: 538-543.
- (45) Darbyshire JH, Peters RW. Humoral antibody response and assessment of protection following primary vaccination of chicks with maternally derived antibody against avian infectious bronchitis virus. *Res Vet Sci* 1985; 38: 14-21.

(46) Andrade LF, Villegas P, Fletcher OJ. Vaccination of day-old broilers against infectious bronchitis: effect of vaccine strain and route of administration. *Avian Dis* 1982; 27: 178-187.

(47) Darbyshire HJ, Peters WR. Sequential development of humoral immunity and assessment of protection in chickens following vaccination and challenge with avian infectious bronchitis virus. *Res Vet Sci* 1984; 37: 77-86.

Cuadro 1. Vacunación y revacunación de los 4 grupos de pollo de engorda experimentales y testigos utilizados en este estudio.

Grupo	No. de aves	Edad a la vacunación	Edad a la revacunación	Cepa vacunal	Título vacunal (DIEP ₅₀ /MI)	Vía de aplicación
A	10	1 día	no revacunadas	Mass 48	10 ^{5.4}	Aspersión
a*	10	no vacunadas	no revacunadas	--	--	--
B	10	1 día	no revacunadas	Mass	10 ^{4.5}	Agua de bebida
b*	10	no vacunadas	no revacunadas	--	--	--
C	10	1 día	23 días	Mass	10 ^{3.2} 10 ^{3.5}	Aspersión ¹ Agua de bebida ²
c*	10	no vacunadas	no revacunadas	-----	-----	-----
D	10	1 día	19 días	Mass	10 ^{3.2} 10 ^{3.5}	Aspersión ¹ Agua de bebida ²
d*	10	no vacunadas	no revacunadas	-----	-----	-----

¹ En la vacunación.

² En la revacunación.

*Grupos testigo-no vacunados

Cuadro 2. Títulos de ELISA* posvacunales, un día antes del desafío, de los pollos de engorda a las 6 semanas de edad.

Grupo	Tratamiento	No. de aves	Títulos ELISA ⁴
A	V ¹	10	75 ^{ab} ± 236 ^a
a*	N/V ²	10	0 ^a ± 0 ^a
B	V	10	909 ^{bc} ± 734 ^b
b*	N/V	10	0 ^a ± 0 ^a
C	V/RV ³	10	3140 ^c ± 3076 ^b
c*	N/V	10	0 ^a ± 0 ^a
D	V/RV	10	3249 ^c ± 5063 ^b
d*	N/V	10	0 ^a ± 0 ^a

* Grupos testigo-no vacunados.

¹V: vacunación.

²N/V: no vacunado

³RV: revacunación.

⁴Media ± Desviación estándar.

Literales distintas dentro de la columna demuestran diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

* KPL.

Cuadro 3. Aislamientos de bronquitis infecciosa en embrión de pollo a partir de hisopos traqueales, obtenidos al quinto día posdesafío, de los 8 grupos de aves utilizadas en el experimento y desafiadas a las 6 semanas de edad.

ÑPP

Grupo	Tratamiento	Embriones evaluados Positivos/Total	Protección al desafío %
A	V ¹ /D ²	41/50 ³	8.2
a*	D	50/50	0
B	V/D	9/50 ³	82
b*	D	50/50	0
C	V/RV ³ /D	0/50 ³	100
c*	D	50/50	0
D	V/RV/D	0/50 ³	100
d*	D	50/50	0

* Grupos testigo-no vacunados.

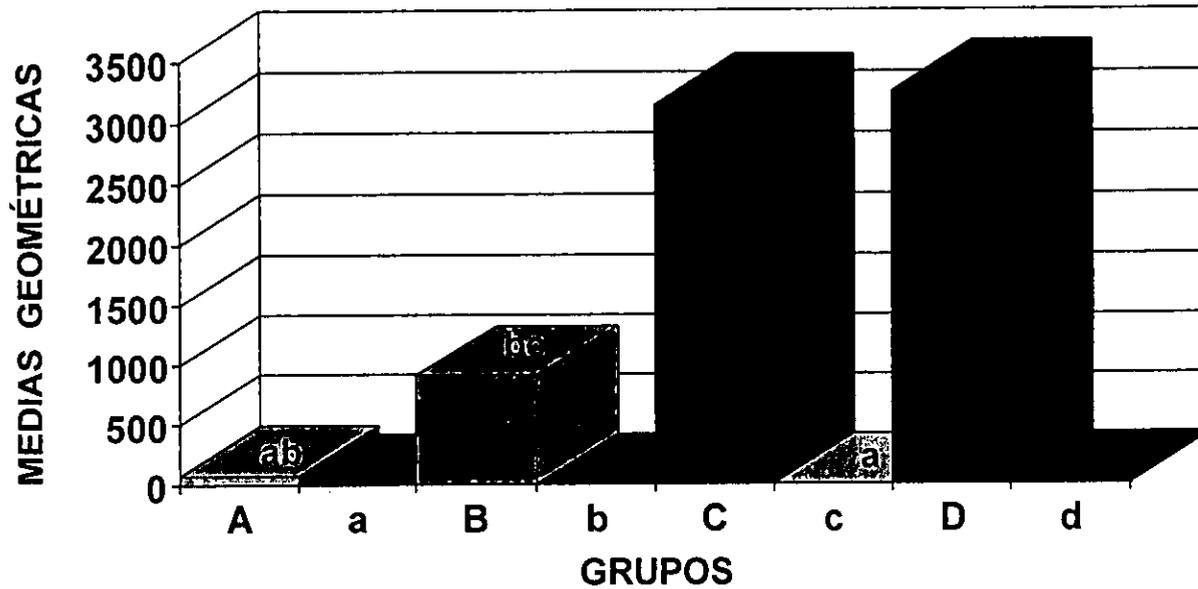
¹ V= vacunación.

² D=desafío.

³ RV= revacunación.

Literales distintas dentro de la columna demuestran diferencias estadísticas significativas (P<0.01).

Figura 1. Títulos de ELISA* posvacunales, un día antes del desafío, de los pollos de engorda a las 6 semanas de edad.



A y B: grupos vacunados (al día de edad)

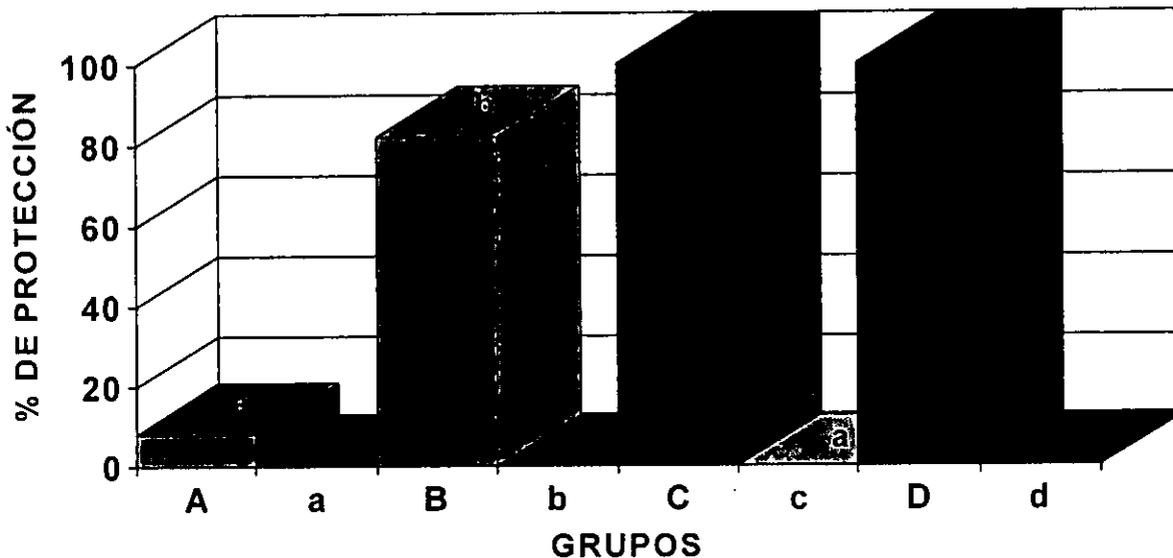
C y D: grupos vacunados (al día de edad) y revacunados (a los 23 y 19 días de edad)

a, b, c y d: grupos testigos no vacunados

Literales distintas sobre las barras demuestran diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$)

* KPL

Figura 2. Porcentaje de protección de los pollos de engorda desafiados con VBI Mass 41, a las 6 semanas de edad. Considerando el aislamiento del virus a partir de hisopos traqueales obtenidos al quinto día posdesafío



A y B: grupos vacunados (al día de edad) y desafiados.

C y D: grupos vacunados (al día de edad) y revacunados (a los 23 y 19 días de edad) y desafiados

a, b, c y d: grupos testigos no vacunados y desafiados

Literales distintas sobre las barras demuestran diferencias estadísticas significativas ($P < 0.01$)