



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

DETERMINACION DE LA PRESENCIA DEL SEROTIPO
ARKANSAS A PARTIR DE AISLAMIENTOS DEL VIRUS
DE BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR EN MEXICO
DE ENERO A OCTUBRE DE 1992

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:
MARCO ANTONIO QUIROZ BARRIOS

Asesores: M.V.Z. Angel Retana Reyes
M.V.Z. Maritza Tamayo Salmorán

México, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA LE ORIGEN





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 está 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.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
HIPOTESIS	25
OBJETIVOS	25
MATERIAL Y METODOS	26
RESULTADOS	30
DISCUSION	32
BIBLIOGRAFIA	35
CUADROS	42

RESUMEN**QUIROZBARRIOSMARCOANTONIO. DETERMINACION DE LA PRESENCIA DEL SEROTIPO ARKANSAS A PARTIR DE AISLAMIENTOS DEL VIRUS DE BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR EN MEXICO DE ENERO A OCTUBRE DE 1992 (BAJO LA DIRECCION DE ANGEL RETANA REYES Y MARITZA TAMAYO SALMORAN)**

De enero a octubre de 1992 se estudiaron 18 casos que presentaban un cuadro clínico sugestivo de Bronquitis Infecciosa (BI), de los cuales 16 provenían de pollo de engorda y 2 de postura de diferentes estados de la República Mexicana.

De las 18 muestras se obtuvieron 10 aislamientos del virus de BI (VBI) y con las pruebas de hemoaglutinación (HA) e inhibición de la hemoaglutinación (HI), se encontró que en 5 de estos aislamientos también existía la presencia de una cepa lentogénica del virus de la enfermedad de Newcastle (ENC), el cual fue neutralizado con un antisuero homólogo.

Mediante la prueba de virus suero neutralizado (VSN) cruzada por el método alfa en embriones de pollo SPF, de todos los aislamientos, frente a los antisueros específicos de los serotipos Arkansas, Massachusetts y Connecticut y la técnica de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales para los mismos serotipos se determinó que uno de los aislamientos correspondía al serotipo Arkansas y los nueve restantes al serotipo Massachusetts.

INTRODUCCION

En la actualidad la Bronquitis Infecciosa (BI) es un problema frecuente en granjas de pollo de engorda, reproductoras y aves de postura, en las cuales se ha diagnosticado el padecimiento aún en aves vacunadas, lo que le confiere una gran importancia económica debido a las pérdidas financieras que sufren los avicultores por la presencia de esta enfermedad. A partir de estos problemas surge la necesidad de aislar y tipificar al virus de BI para determinar si existen serotipos diferentes al Massachusetts y Connecticut que son los comunmente usados para la elaboración de vacunas en nuestro país.

GENERALIDADES DE LA BI:

La BI es una enfermedad viral, de distribución mundial, altamente contagiosa que afecta a pollos y a gallinas domésticas, causando alteraciones en los aparatos respiratorio, reproductor. Algunos serotipos son capaces de producir lesiones renales (nefritis-nefrosis). En aves jóvenes se caracteriza por provocar un cuadro respiratorio agudo con estornudos y disnea. Las aves adultas en postura muestran una menor signología respiratoria que los individuos jóvenes, sin embargo sufren un descenso brusco en la

producción de huevo así como reducción en la calidad externa e interna del mismo (16, 19, 25, 36, 55, 57, 64).

HISTORIA:

El primer reporte de un brote de BI fue hecho por Schalk y Hawan en 1931 en Dakota del Norte (60). A mediados de la década de los 50's se desarrollaron las primeras vacunas y se establecieron calendarios de vacunación para prevenir la enfermedad (53). Winterfield y Hitchner en 1962 reportan una nefrosis asociada a algunos casos de BI (64).

Durante las décadas de los 60's y 70's la BI fue controlada gracias al empleo de vacunas a virus activo elaboradas con cepas de los serotipos Connecticut y Massachusetts.

Algunos países europeos a finales de la década de los 70's, empiezan a informar sobre la aparición de casos sospechosos de BI en aves vacunadas adecuadamente, causados por serotipos diferentes a Massachusetts y Connecticut, contra los cuales los virus vacunales clásicos no conferían protección (53).

Hopkins en 1974 establece una clasificación serológica del virus de BI empleando la técnica de reducción en placa, habiendo

estudiado 19 cepas, logró agruparlas en 7 serotipos: I. Massachusetts, II. Connecticut (Florida, Clarck 333, Arkansas 99), III. Georgia (SE 17), IV. Delaware (JMK, Holte, Gray), V. Iowa 97, VI. Iowa 609, VII. New Hampshire (27).

Lutticken y colaboradores, en 1981 reportaron en los Países Bajos la presencia serológica de las cepas variantes D-207, D-212, D-3896, D-3128 (48). En 1984, Luttiken aisló y desarrolló las cepas vacunales hemoaglutinantes espontáneas D-274, D-1466, para la prevención de las variantes europeas.

Marquardt y Snyder en 1985 realizaron una clasificación de los serotipos norteamericanos del virus de BI, basándose en el uso de anticuerpos monoclonales y los agruparon de la siguiente manera: I. Massachusetts, II. Connecticut, III. JMK, IV. MD-27, V. MD-32, VI. I-97, VII. I-609, VIII. Holte, IX. Clark-33, X. SE-17, XI. Florida, XII. Arkansas-99, XIII. Arkansas-155, XIV. Maine-209, XV. Maine-212 y XVI. Maine-246 (50).

El primer reporte de BI en México, fue hecho por Moreno Chan en 1962 (56). Posteriormente Aranda, Rodriguez y Salgado en 1979 y Rivera en 1983, informan de casos clínicos de bajas de postura en aves inmunizadas o hiperinmunizadas contra BI (54).

Márquez en 1984 demostró la presencia serológica de las variantes europeas D-207 y D-212 del virus de BI en las principales zonas avícolas del país (54). En 1992 Pérez Márquez menciona el hallazgo de anticuerpos contra los serotipos Arkansas y Connecticut en algunas regiones del país*. En el mismo año, Soto reportó que con pruebas serológicas, de HI, se habían detectado niveles de anticuerpos circulantes del VBI altamente sugestivos de pertenecer a los serotipos Arkansas y Gray (61).

ETIOLOGIA

La BI es causada por un virus del género coronavirus de la familia Coronaviridae que posee 12 grupos serológicos (55,16).

Morfología: El virus de la Bronquitis Infecciosa (VBI) es pleomórfico o redondeado, posee una envoltura lipoprotéica que mide de 90 a 200 nm de diámetro con proyecciones (espículas) uniformemente distribuidas que le dan la apariencia de corona, estas miden 20 nm de largo y en su porción distal muestran una dilatación de 10 nm de diámetro (16, 25). Existen diferencias en la morfología de las proyecciones que forman la corona (3, 21). Su genoma esta constituido por RNA que contiene aproximadamente

* *Comunicación Personal*

27,500 nucleotidos en toda su cadena (37).

El VBI contiene tres principales proteínas estructurales, dos asociadas con la cubierta viral: la S (spike = proyección) y la M (membrana). Y otra asociada al ácido nucleico del virus, la N (nucleocápside), ésta es relativamente estable en comparación a las proteínas externas.

La proteína S vista en el microscopio electrónico tiene forma de cono, consta de dos fracciones: la S1 y la S2, ambas compuestas de oligosacáridos con aproximadamente 520 y 625 aminoácidos respectivamente (3, 6).

Con el uso de anticuerpos monoclonales se han podido distinguir 8 epitopes en la proteína S y se han identificado de la S-A a la S-H, 6 epitopes se localizan en la subunidad S1 (del S-A al S-F) y los otros dos epitopes en la subunidad S2 (S-G y S-H) (40).

Al cambiar la organización de los aminoácidos en los epitopes, originan lo que se conoce como puntos antigénicos de variación que resultan en la aparición de nuevas cepas conocidas como variantes o serotipos diferentes (3).

Los epitopes D y E son inmunodominantes y no causan reacciones cruzadas, estos están localizados en la parte terminal de la subunidad S1 y son sumamente importantes para la inducción de su neutralización por anticuerpos, lo cual contribuye a la protección contra la infección. Los epitopes A, B y C si pueden causar reacciones cruzadas, principalmente en aves hiperinmunizadas o infectadas más de una ocasión (40).

Cavanagh describió cómo algunos serotipos son diferenciados por pruebas de VSN como serotipos diferentes aún cuando la subunidad S1 sea extremadamente similar uno de otro, aunque sólo exista una diferencia del 2 al 3% o tan distintos que difieran hasta el 50% entre los serotipos (6, 41).

Esto tiene una consecuencia práctica muy importante y muestra que la mayor producción de anticuerpos virusneutralizantes producidos en los pollos seguidos de una sola infección son dirigidos contra un pequeñísimo número de epitopes y un ligero cambio en los aminoácidos que forman estos epitopes resulta en la producción de anticuerpos virusneutralizantes que no neutralicen otros serotipos que sean muy similares pero que difieran en estos epitopes críticos (40, 41).

Se deduce de lo anterior que la proteína S es muy importante para la infectividad del virus, ya que la subunidad S1 de la proteína S induce la especificidad en la virus neutralización específica de cada serotipo. Además, se ha demostrado que la fracción S1 purificada induce la producción de anticuerpos neutralizantes en los pollos; en cambio, virus a los que por métodos bioquímicos se les ha removido la fracción S1 no inducen la producción de tales anticuerpos (3).

Resistencia a agentes químicos y físicos: La mayoría de los serotipos del VBI son inactivados después de 15 minutos a 56 °C y después de 90 minutos a 45 °C.

Los virus presentes en líquido alantoideo, almacenados a - 30 °C, son viables aún después de varios años.

Los tejidos infectados mantenidos en glicerol al 50% son bien preservados durante varias horas sin necesidad de refrigeración, lo cual es útil para el transporte de muestras al laboratorio.

Si se mantiene liofilizado y en refrigeración, el líquido alantoideo infectado con VBI puede permanecer viable hasta 30 años, pero almacenado a 37 °C se inactiva al cabo de 6 meses.

El VBI en cultivos es más estable a PH de 6 a 6.5 que de 7 a 8.

El VBI es sensible al éter y al cloroformo, en general es considerado sensible a todos los desinfectantes (26).

CLASIFICACION E IDENTIFICACION DE SEROTIPOS:

La clasificación de los serotipos del VBI se ha basado por mucho tiempo en la prueba de virus suero neutralización (VSN) en varios sistemas. En las décadas de los 60's y 70's varios serotipos distintos al Massachusets (62), fueron descritos en los E.U. (10, 11, 32, 33, 34, 66). A partir de esto, investigaciones exhaustivas realizadas en Holanda (48) y en Inglaterra (28), han revelado la presencia de serotipos diferentes a los de E.U. del VBI en Europa.

La prueba de VSN ha sido desarrollada en explantes de tráquea (6, 18, 24, 31, 34, 43), en cultivo de células de riñón de pollo (27), y en embriones de pollo (17, 23, 47).

La clasificación de serotipos con la prueba de HI ha sido investigada también. La especificidad de una respuesta temprana y las reacciones cruzadas limitadas, fueron la base para proceder a

serotificar aislamientos del VBI por medio de esta prueba (38). Pero otros investigadores han demostrado que existen reacciones cruzadas importantes, principalmente en aves hiperinmunizadas o infectadas por más de una ocasión. Por lo tanto, esto sugiere que la prueba de HI para el VBI puede ser específica para serotipos o para antígenos de grupo, dependiendo del número de infecciones o exposiciones al virus que hayan tenido las aves (2, 5, 37).

Cook hizo una comparación entre las pruebas de VSN en explantes traqueales y HI, y concluyó que con HI se presentan marcadas reacciones cruzadas y que con la VSN es posible hacer una diferenciación precisa de los serotipos del VBI (29).

A partir de la década de los 80's, hasta nuestros días, el uso de anticuerpos monoclonales se ve ampliamente difundido para la identificación de serotipos. Los anticuerpos monoclonales se han empleado en la técnica de inmunofluorescencia (12, 50, 66), inmunoperoxidasa (35) y ELISA (35, 42) obteniendo excelentes resultados.

La diferenciación de los serotipos del VBI se ha logrado también con el estudio de la secuencia de nucleotidos (6, 40).

IMPORTANCIA ECONOMICA:

Las pérdidas económicas debidas a la BI son difícilmente evaluables ya que a menudo suele haber involucrados factores secundarios.

Los productores de pollo de engorda pueden tener mala productividad debido a la baja conversión alimenticia y la reducción en la ganancia de peso. Infecciones secundarias como por E. coli pueden incrementar los porcentajes de decomiso, especialmente si la enfermedad se produce en la últimas semanas antes del sacrificio.

En pollos jóvenes se puede observar mortalidad superior al 25%, en futuras ponedoras y reproductoras, las lesiones pueden radicar en el oviducto. Estas aves pueden crecer normalmente pero no producirán huevos, éstas gallinas llamadas falsas ponedoras, consumen alimento y ocasionan gastos de alojamiento, sin ninguna productividad. Cuando sobreviene un brote de BI en aves en producción o en el pico de postura, las pérdidas económicas serán causadas sobre todo por la caída de la postura y la mala calidad de los huevos. A menudo la producción no volverá al nivel que tenía antes de la infección y las aves tendrán que ser sacrificadas antes de tiempo.

En general, las pérdidas dependerán de la virulencia del serotipo implicado, el nivel de inmunidad y la edad del ave en el momento de la infección (49).

PATOGENIA Y EPIZOOTIOLOGIA:

Se considera que los pollos y gallinas son los únicos huéspedes naturales para el VBI. Las aves de cualquier edad son susceptibles pero la enfermedad es más severa en aves jóvenes donde puede causar mortalidad. Seguido a una infección con el VBI por vía aérea, hay una rápida multiplicación del virus en el tracto respiratorio. El virus puede ser aislado de la tráquea y de los pulmones entre 24 horas y 8 días postinfección (25). Posterior a la infección del tracto respiratorio, hay una fase donde el virus pasa al torrente sanguíneo (viremia). El tracto reproductivo puede ser atacado durante esta fase. (36).

Los serotipos T australiana, Holte y Gray, afectan a los riñones siendo el T australiana el más patógeno. El serotipo Massachusetts puede o no producir cierto daño renal pero el virus es aislado con facilidad a partir del riñón.

La bolsa de Fabricio es otro órgano que se ve afectado por

el VBI y de la cual puede ser aislado el virus. (19, 64).

Transmisión: El VBI se difunde rápidamente entre las aves. Los pollos susceptibles mantenidos en casetas con aves infectadas, usualmente desarrollan signos al cabo de 48 horas. El virus es aislado consistentemente de la tráquea, del pulmón, del riñón y de la bolsa de Fabricio de 24 horas a 8 días después de la exposición al virus por aerosol. La frecuencia del aislamiento disminuye con el tiempo y con la variedad de los serotipos, pero el VBI ha sido aislado de tonsilas cecales a las 14 semanas y de las heces a las 20 semanas postinfección. Hay reportes de aislamientos a partir de huevo a los 43 días posteriores a la desaparición de los signos, esto demuestra que las aves aún cuando ya se hayan recuperado de la enfermedad pueden seguir diseminando el virus durante mucho tiempo y que existe el riesgo de transmitir la enfermedad por medio de vectores mecánicos a otras aves u otras granjas (36, 55).

Periodo de incubación: El periodo de incubación de la BI es de 18 a 36 horas, dependiendo de la dosis y de la ruta de inoculación (36).

SIGNOS:

En aves jóvenes, la BI se caracteriza por presentar signos respiratorios que consisten en: boqueo, tos, estornudos, estertores traqueales y descargas nasales. Ocasionalmente las aves pueden tener los senos nasales aumentados de volumen.

Los pollos se observan deprimidos, se mantienen aglomerados bajo las fuentes de calor y en cuanto a la conversión alimenticia y la ganancia de peso, se ven significativamente reducidas.

En las aves adultas, los signos son similares a los descritos para los pollos jóvenes pero las descargas nasales no son tan frecuentes y la enfermedad puede pasar desapercibida, al menos que las aves sean examinadas cuidadosamente y escuchando la manifestación de los signos respiratorios por las noches cuando las aves están normalmente tranquilas.

Los pollos infectados con algún serotipo nefrotropico cursan con un cuadro respiratorio leve y posteriormente se observan deprimidos con las plumas erizadas, deyecciones acuosas e incrementan su consumo de agua. Cuando hay presencia de

urolitiasis en las aves, puede aumentar considerablemente la mortalidad (36, 44, 64).

En las gallinas en postura declina la producción de huevo además de presentar signos respiratorios leves. La severidad en la baja de producción varía dependiendo del serotipo implicado y la etapa de producción en que se encuentren las aves en el momento de la infección, ésta disminución en la producción de huevo llega a durar hasta 8 semanas, posteriormente se va recuperando y en ocasiones puede alcanzar el nivel en que se encontraba antes de la infección. Además de la disminución en la cantidad de huevos producidos, después decae la calidad externa e interna del huevo, apareciendo cascarones mal calcificados, rugosos, arenosos, acinturonados y despigmentados así como claras líquidas y pérdida de chalazas; situación que persiste varias semanas después del brote.

En aves reproductoras, además de todo lo descrito, se reduce la tasa de incubabilidad y de los nacimientos, pudiéndose encontrar lesiones características en los embriones con elevada mortalidad (25, 55).

MORBILIDAD Y MORTALIDAD:

La morbilidad es alta, de un 80 a 100% pero la mortalidad es variable, dependiendo del serotipo implicado, edad de las aves, estado inmunológico, factores estresantes, e infecciones bacterianas secundarias (36). El sexo, raza o especie y nutrición de los pollos son factores secundarios que contribuyen en la severidad de la enfermedad (15, 30). La mortalidad puede ser del 25% o más en aves menores de 6 semanas de edad. En aves mayores la mortalidad es casi nula (36).

LESIONES:

En las aves infectadas, hay presencia de exudado seroso, catarral o caseoso en orificios y en senos nasales. En la tráquea puede observarse congestión y hemorragias petequiales, así como la presencia de exudado que se acumula en la bifurcación formando un tapón. Los sacos aéreos se ven opacos o con exudado caseoso. En pulmón pueden apreciarse pequeñas áreas de neumonía.

Cuando las aves son afectadas por serotipos nefrotropicos, los riñones se ven aumentados de tamaño, pálidos con los túbulos y los ureteres a menudo distendidos con presencia de uratos.

Las aves en producción, en ocasiones presentan yemas en la cavidad abdominal (postura abdominal), Los ovarios y óvulos se pueden observar en proceso de involución o atrofiados.

En oviducto y útero se percibe edema, dilatación y congestión de la mucosa. Lesiones permanentes de hipoplasia en el oviducto pueden ser consecuencia de una infección por el VBI al primer día de edad de las aves y esto puede dar como resultado falsas ponedoras (25, 36, 54).

LESIONES MICROSCOPICAS:

La mucosa de la tráquea en pollos con BI es edematosa y congestionada. Hay pérdida de cilios, desprendimiento de células epiteliales, e infiltración de heterofilos y linfocitos. La regeneración del epitelio principia aproximadamente a las 48 horas. Si los sacos aéreos están involucrados, se observan edematosos con descamación epitelial y algo de exudado fibrinoso, se incrementa la presencia de heterofilos y la proliferación de fibroblastos.

Las lesiones en riñón son principalmente una nefritis intersticial y nefrosis. El virus causa vacuolización y descamación del epitelio tubular e infiltración masiva de heterofilos en el

instersticio. **Áreas focales de necrosis pueden ser detectadas así como presencia de uratos.**

En el oviducto hay reducción en la longitud de las células epiteliales, deciliación, dilatación de las glándulas, acumulo de linfocitos e infiltración de células plasmáticas y de heterofilos en toda la mucosa. Así como fibroplasia y edema sobre todo en útero. Todo esto explica la alteración en la calidad de los huevos (25, 36, 54).

DIAGNOSTICO:

El diagnóstico se basa en la historia clínica, pruebas serológicas para demostrar títulos de anticuerpos, detección del antígeno por inmunofluorescencia y el aislamiento viral.

Para el diagnóstico clínico deben contemplarse los signos, las lesiones, el periodo de incubación, la morbilidad y la mortalidad pero esto no es suficiente, ya que se puede confundir con otras enfermedades como Enfermedad de Newcastle, Laringotraqueitis Infecciosa, Coriza Infecciosa y Enfermedad Respiratoria Crónica Complicada, entre otras, las nefritis observadas con cepas nefropatógenas del VBI son semejantes a las encontradas en aves

intoxicadas con micotoxinas o con algunas drogas antimicrobianas. Así que se debe confirmar el diagnóstico con pruebas de laboratorio (36, 55, 57).

Aislamiento viral: la toma de muestras para realizar el aislamiento viral se debe hacer en cuanto aparezcan los signos y los órganos de elección son: la tráquea, el pulmón, el riñón, las tonsilas cecales y el oviducto. Los hisopos cecales y cloacales son de gran utilidad cuando se pretende realizar el aislamiento una o dos semanas después de que aparecieron los signos ya que el virus tiende a permanecer mayor tiempo en el tracto intestinal (36).

El aislamiento viral se puede hacer en embriones de pollo (13, 14, 47), en explantes traqueales (17, 43) y en cultivos celulares (27, 47). En embriones de pollo se deben realizar al menos 5 pases antes de afirmar que la muestra es negativa (36).

Inmunofluorescencia: es una prueba confiable. Los anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína se unen a los virus cuando están presentes en los frotis traqueales, de esta forma el virus (fijado al conjugado con isotiocianato de fluoresceína) se hace visible bajo el microscopio ultravioleta. Este método puede ser específico para cada serotipo. (44, 46, 55, 66).

Virus suero neutralización (VSN): ésta prueba puede ser realizada en embriones de pollo, explantes traqueales o en cultivos celulares y existen dos métodos; a) suero constante - virus diluido (método alfa) y b) suero diluido - virus constante (método beta). Esta técnica es específica para cada serotipo (11, 25, 47).

Inhibición de la hemoaglutinación (HI): aunque generalmente el VBI no aglutina espontáneamente los glóbulos rojos de pollo, puede adquirir ésta propiedad si se les trata con la enzima fosfolipasa - C tipo 1.

Se ha podido demostrar que algunas de las cepas aisladas en Europa (36) hemoaglutinan espontáneamente. Esta prueba puede ser específica para serotipos o solo para antígenos de grupo (2, 5, 37, 38).

Prueba de ELISA: éste sistema mide los niveles de anticuerpos en el suero. La prueba se basa en un inmuno ensayo enzimático en donde los anticuerpos se fijan a un sustrato (55, 51).

Precipitación en agar: es un método simple que se usa para identificar al antígeno viral. Es una prueba cualitativa y no es

específica para cada serotipo (45, 59).

Fijación de complemento: es una prueba serológica indirecta muy sensible pero no es específica para cada serotipo (52).

PREVENCION Y CONTROL

Las prácticas de manejo son una parte fundamental en la prevención de la BI. Lo ideal es mantener un estricto aislamiento de las casetas, adoptar el método de crianza todo dentro - todo fuera, tener una sola edad en la granja, lavar y desinfectar las casetas después de cada parvada, implantar un riguroso control en la bioseguridad de la granja, evitar el contacto de las aves con fauna silvestre y fauna nociva.

En general, si no se tiene cuidado con las prácticas de manejo adecuadas, se hace más difícil el control de la enfermedad (36).

INMUNIZACION

La inmunización se debe contemplar para la prevención de la BI, siempre y cuando sea necesario por estar inmersos en una zona de alto riesgo.

Para obtener una respuesta inmune adecuada a la vacunación, es necesario contemplar varios factores antes de formular un calendario de vacunación: la edad de las aves al momento de la inmunización, el nivel de anticuerpos maternos, el método de administración de la vacuna, estado de salud de la parvada, el título del virus en la vacuna, y el serotipo prevalente en la región (26).

Existen 2 tipos de vacunas; las que contienen virus activo y las de virus inactivado. Las primeras son utilizadas generalmente para pollo de engorda y como vacunación inicial en reproductoras y en aves de postura. Las vacunas inactivadas emulsionadas, generalmente se emplean en aves de postura y en reproductoras después de al menos una vacunación con virus activo y poco antes de iniciar la producción de huevo.

Las cepas del VBI usadas para las vacunas a virus activo, son atenuadas con pases seriados en embrión de pollo. Existe evidencia de que algunas vacunas pueden revertir su virulencia después de varios pases regresivos en aves.

Método de aplicación: las vacunas a virus activo pueden ser aplicadas individualmente por vía ocular o intranasalmente y en

forma extensiva por el agua de bebida y por aspersión con gota gruesa.

Las vacunas inactivadas en emulsión requieren de su aplicación por vía intramuscular o subcutánea (25, 26, 36).

En México, aparte de vacunas monovalentes es posible encontrar vacunas bivalentes (que contienen dos serotipos diferentes) y combinaciones de virus de diferentes enfermedades.

Hoy en día se sigue investigando sobre el control de la BI y se está probando experimentalmente el uso de vacunaciones en los embriones de pollo (63).

HIPOTESIS

- La Bronquitis Infecciosa en México es causada por los serotipos Massachusetts, Connecticut y Arkansas.

- El serotipo Arkansas esta presente en algunas regiones del país.

OBJETIVOS

- Realizar el aislamiento y la serotipificación del virus de BI con los antisueros de los serotipos Arkansas, Massachusetts y Connecticut, a partir de aves provenientes de distintas granjas y regiones del país que presenten un cuadro clínico y lesiones sugestivas de BI.

- Determinar la presencia del serotipo Arkansas en México a partir de los virus aislados.

MATERIAL Y METODOS

1. Muestras.

De enero a octubre de 1992 se muestrearon 18 casos de aves recibidas en el Departamento de Producción Animal: Aves, de la FMVZ, UNAM y que provenían de granjas de pollo de engorda y aves de postura con rangos de edad de 8 días a 53 semanas y que presentaban signos y lesiones sugestivos a BI. Para minimizar el riesgo de reaislar virus vacunales, en los casos de las aves vacunadas contra BI, las muestras se tomaron al menos 3 semanas después de la aplicación de la vacuna (ver cuadro 1).

2. Aislamiento Viral.

Muestras de tráquea, pulmón y riñón fueron removidas asepticamente y homogenizadas para realizar la técnica de aislamiento viral según Gelb (20) en embriones de pollo comerciales de 9 a 11 días de incubación.

3. Hemoaglutinación e Inhibición de la Hemoaglutinación para determinar la presencia del virus de ENC como contaminante.

La metodología usada para la prueba de HA fue la descrita

por Beard (4) y la metodología para la HI fue la que describió Alexander (1).

4. Neutralización del virus contaminante de ENC.

Los aislamientos que resultaron positivos a la prueba de HA y HI se les practicó una VSN por el método alfa con un antisuero contra ENC como lo describe Beard (4).

5. Serotipificación de los virus aislados

5.1 Virus suero neutralización cruzada, método alfa.

Para determinar a qué serotipo correspondían los virus aislados, se realizó la prueba de VSN de todos los aislamientos frente a los antisueros específicos de los serotipos Arkansas 99, Massachusetts y Connecticut* por el método alfa en embriones de pollo SPF de 9 a 11 días de incubación como lo describe Beard(4).

Como controles positivos se emplearon vacunas comerciales de los serotipos Massachusetts y Connecticut, como control negativo se utilizaron embriones SPF sin inocular.

El índice de neutralización (IN) fue calculado de acuerdo al

*Antisueros comerciales (SPAFAS), donados por INTERVET

método de Reed and Muench (58).

5.2 Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales.

Para confirmar la identificación de los serotipos se procedió a realizar la prueba de inmunofluorescencia indirecta en membranas corion alantoideas de embriones de pollo SPF usando anticuerpos monoclonales específicos para los serotipos Arkansas 99, Massachusetts, Connecticut y uno para antígenos de grupo que comparten todos los serotipos*. Para dicha prueba se siguió la metodología descrita por Kisary (18) y Charles (7).

Como controles positivos se utilizaron vacunas comerciales de los serotipos Massachusetts y Connecticut, como control negativo se emplearon membranas corion alantoideas de embriones SPF sin inocular.

* *Anticuerpos monoclonales donados por Dr. Syed A. Naqi de Avian and Aquatic Animal Medicine, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University*

Como conjugado se utilizaron antiglobulinas comerciales de ratón preparadas en cabra y conjugadas con isotiocianato de fluoresceína*.

* *Antiglobulinas de ratón. Baltimore Biological Laboratory*

RESULTADOS

1. Aislamiento Viral

El cuadro 2 muestra que después de al menos 3 pases en embriones de pollo, 10 de los casos causaron mortalidad embrionaria y lesiones características del VBI, por lo que se consideraron positivos.

2. Hemoaglutinación e Inhibición de la Hemoaglutinación

El cuadro 3 muestra que de los 10 casos positivos al aislamiento viral, 5 presentaron HA y posteriormente por medio de la prueba de HI, se determinó que la hemoaglutinación fue debida a una cepa lentogénica del virus de ENC presente en los aislamientos como contaminante.

3. Neutralización del Virus Contaminante de ENC

Se observó que después de la VSN, los 5 aislamientos contaminados con el virus de ENC fueron neutralizados puesto que en pases siguientes dejaron de hemoaglutinar pero no de causar las lesiones características de BI.

4. Serotificación de los Virus Aislados

4.1 Virus suero neutralización cruzada, método alfa.

Los resultados son presentados en el cuadro 4 donde observamos que uno de los virus aislados correspondió al serotipo Arkansas, nueve aislamientos correspondieron al serotipo Massachusetts y ninguno de los aislamientos resultó positivo al serotipo Connecticut.

El IN fue obtenido de acuerdo al método de Reed and Muench (19). Los IN mayores e iguales a 2 son considerados como positivos (10).

4.2 Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales.

Los resultados son presentados en el cuadro 5, el cual muestra que uno de los aislamientos correspondió al serotipo Arkansas, nueve aislamientos correspondieron al serotipo Massachusetts y ninguno de los aislamientos resultó positivo al serotipo Connecticut.

DISCUSION

De los 18 casos sospechosos, 10 resultaron positivos al aislamiento del virus de BI y los otros 8 fueron negativos a BI pero positivos a otras enfermedades respiratorias como a la enfermedad de Newcastle y a la Enfermedad Respiratoria Crónica Complicada.

De los 10 casos positivos a BI, 8 manifestaban signos respiratorios y los otros 2 manifestaban una baja en la producción de huevo con problemas respiratorios. A la necropsia de éstas muestras se observó que en las tráqueas de las aves del caso B, de donde se aisló el serotipo Arkansas, se presentaron hemorragias de tipo equimosis, lesión que no fue detectada en ninguno de los demás casos.

Es importante hacer incapié en estas lesiones hemorrágicas observadas en el presente trabajo, debido a que en la enfermedad de Laringotraqueitis Infecciosa, en la enfermedad de Newcastle y en la Enfermedad Respiratoria Crónica complicada pueden detectarse lesiones similares y prestarse a confusión a la hora de emitir un diagnóstico clínico, por lo que se recomienda que si se observa una enfermedad respiratoria con lesiones hemorrágicas en tráquea, no se descarte la posibilidad de que las hemorragias sean

causadas por el el VBI del serotipo Arkansas.

Las lesiones observadas en los embriones de pollo de los aislamientos realizados en esta investigación, corresponden con las descritas por Hofstad (25), King (36), Gelb (9) y Winterfield (65), quienes mencionan que las cepas de campo deben ser adaptadas al embrión para detectar el efecto de enanismo, enroscamiento, uratos en ríñón, mal implante de plumas y engrosamiento de la membrana corion alantoidea, tal como fue observado en el presente estudio.

Durante el desarrollo de la investigación, se aislaron juntos virus de BI y de ENC en 5 de los casos debido a que poco antes de la toma de las muestras las aves habían sido vacunadas contra ENC.

Como podemos observar en los resultados de las pruebas de VSN con antisueros específicos e inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales se logró identificar una cepa del VBI perteneciente al serotipo Arkansas lo que confirma la existencia de dicho serotipo en nuestro país. Asimismo se observó que el serotipo más frecuente en brotes de BI es el serotipo Massachusetts.

En la investigación no se aisló ningún VBI correspondiente al serotipo Connecticut, esto no quiere decir que no exista en el campo puesto que algunas explotaciones avícolas utilizan con frecuencia vacunas de virus activo que contienen al serotipo Connecticut. Con esta práctica se puede provocar la diseminación de dicho serotipo ya que si llega a sufrir pases en aves vivas tiene la posibilidad de revertirse a patógeno y causar la enfermedad (10, 25).

Los resultados demuestran que es posible realizar la diferenciación de los serotipos de VBI con la prueba de VSN cuando se utilizan los antisueros específicos para cada serotipo como ya había sido demostrado por Cubillos (13,14), Cowen (9), Herrera (22) y Winterfield (64). De la misma manera se puede obtener éxito en la identificación de los serotipos con el uso de inmunofluorescencia empleando anticuerpos monoclonales para dicha técnica como lo reportó Marquardt (50). Esta prueba es una excelente alternativa en el diagnóstico y serotipificación del VBI por ser más rápida y sencilla.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALEXANDER D.J. Newcastle Disease, in GRAHAM H., LAWRENCE H., CHARLES H. AND JAMES E.P. (Eds) Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3th Edition pp. 114-120 (American Association of Avian Pathologists) (1989).
- 2.- ALEXANDER D.J., BRACEWELL C.D. AND GOUCH R.E.: Preliminary evaluation of the haemagglutination and haemagglutination inhibition test for avian infectious bronchitis virus. *Avian Path.* 5: 125 - 134 (1976).
- 3.- AVELLANEDA G. E.: Estructura del virus de bronquitis infecciosa. *Avicultura Prof.* 10: 38 - 40 (1992).
- 4.- BEARD C.W. Serologic Procedures, in: GRAHAM H., LAWRENCE H., CHARLES H. AND JAMES E.P. (Eds) Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3th Edition pp 192-200 (American Association of Avian Pathologists) (1989).
- 5.- BROWN A.J. AND BRACEWELL C.D.: Effect of repeated infections of chickens with infectious bronchitis viruses on the specificity of their antibody responses. *Veterinary Rec.* 122: 207 - 208 (1988).
- 6.- CAVANAGH D.: Sequencing approach to IBV antigenic variation and epizootiology. II International symposium on infectious bronchitis. p. 147 - 153 (1991).
- 7.- CHARLES H. CUNNINGHAM.: *Virología Práctica*. 3er ed, Edit. Acribia, Zaragoza España, 1971.
- 8.- COLWELL W. AND LUKERT P.D.: Effects of avian infectious bronchitis virus (IBV) on tracheal organ cultures. *Avian Dis.* 13: 888 - 894 (1969).
- 9.- COWEN B. S. AND HITCHNER S. B.: Serotyping of avian infectious bronchitis virus by the virus - neutralization test. *Avian Dis.* 19: 583 - 595 (1975).

10.- COWEN B.S., HITCHNER S.B. AND LUCIO B.: Characterization of a new infectious bronchitis virus isolate. I. Serological and pathogenicity studies of Clark 333. Avian Dis. 15: 518 - 526 (1971).

11.- COWEN B.S., HITCHNER S.B. AND UBERTINI TITO.: Characterization of a new infectious bronchitis virus isolate. II. Some chemical and physical properties of Clark 333.: Avian Dis. 15: 527 - 532 (1971).

12.- CSERMELYI M., THUSSEN R., ORTHEL F., BRUGER A., KOUWENHOVEN B. AND LUTTICKEN D.: Serological classification of recent infectious bronchitis virus isolates by the neutralization of immunofluorescent foci. Avian Path. 17: 139 - 148 (1988).

13.- CUBILLOS A., ULLOA J., COOK J., CUBILLOS V., DIAZ V., SAEZ M., y ORDENES J.: Bronquitis infecciosa aviar en Chile. Memorias del XII congreso latinoamericano de avicultura. Quito, Ecuador. P. 14 - 21 (1991).

14.- CUBILLOS A., ULLOA J., CUBILLOS V., and COOK J.: Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. Avian pathology 20: 85 - 99 (1991).

15.- CUMMING R.B.: The importance of environmental factors in IB research and disease expression. II International symposium on infectious bronchitis. p. 59 - 65 (1991).

16.- CUNNINGHAM C. H.: Avian infectious bronchitis: characteristics of the virus and antigenic types. Am. J. Vet. Res. 36: 522 - 523 (1975).

17.- DARBYSHIER J.H., JANE K.A., COOK AND PITERS R.W.: Comparative growth kinetic studies on avian infectious bronchitis virus in different systems. J. Comp. Path. 2: 623 - 630 (1975).

18.- DARBYSHIRE J.H., ROWELL J.G., JANE K.A., COOK AND PITERS R.W.: Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralization tests in tracheal organ cultures. Archives of virology 61: 227 - 238 (1979).

- 19.- DUNCAN A. y McMARTIN.: Variantes y tipos del virus de la bronquitis infecciosa. Memorias de la IX convención nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Gualajuato, Gto. México 1984.
- 20.- GELB J. Infectious Bronchitis, in: GRAHAM H., LAWRENCEH., CHARLES H. AND JAMES E.P. (Eds) Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3th Edition pp 124-127 (American Association of Avian Pathologists) (1989).
- 21.- HARKNESS J. W. AND BRACEWELL C. D.: Morphological variation among avian infectious bronchitis virus strain. Res. Ver. Sci. 16: 128 - 131 (1974).
- 22.- HERRERA C. M., VIAMONTES O., QUINTERO D. Y CANOVAS.: Multiplicación de un aislamiento de campo (autóctono) del virus de la bronquitis infecciosa en embriones de pollo y su identificación con los anticuerpos Massachusetts y Connecticut. Rev. Cubana de Cienc. Avic. 13: 137 - 143 (1986).
- 23.- HESSELILK W.: Serotyping infectious bronchitis virus; selection of a unified method. II International symposium on infectious bronchitis. p. 87 - 97 (1991).
- 24.- HINZE V., LOHR J.E. AND KALETA E.F.: IVB strain differentiation attempts by cross immunity studies in tracheal organ cultures derived from immunized chickens. II International symposium on infectious bronchitis. p. 73 - 85 (1991).
- 25.- HOFSTAD M. S.: Disease of Poultry. 8 th ed. Iowa State. University Press, Ames, Iowa 1984.
- 26.- HOFSTAD M. S.: Immune response to infectious bronchitis virus. Am. J. Vet. Res. 36: 520 - 521 (1975).
- 27.- HOPKINS S. R.: Serological comparison of strains of infectious bronchitis virus using plaque purified isolants. Avian Dis. 18: 231 - 239 (1974).
- 28.- JANE K.A., COOK AND HUGGINS M.B.: Newly isolate serotypes of infectious bronchitis virus: their role in disease. Avian Pathology. 15: 129 - 138 (1986).

- 29.- JANE K.A., COOK, BROWN A.J. AND BRACEWELL C.D.: Comparison of the haemoagglutination inhibition test and the serum neutralization test in tracheal organ cultures for typing infectious bronchitis virus strains. *Avian Path.* 16: 505 - 511 (198).
- 30.- JANE K.A., COOK, NAKARUMA K., OTSUKI AND DAVISON T.F.: studies on aspects of the pathogenesis of infectious bronchitis virus in two inbred chicken lines of different susceptibilities to infection. II International symposium on infectious bronchitis. p 106 - 113 (1991).
- 31.- JOHNSON R.B. AND SEWMAN J.A.: Measurement of antigenic and pathogenic variability of infectious bronchitis strains by tracheal culture. *Avian Dis.* 15: 233 -241 (1971).
- 32.- JOHNSON R.B., MOULTHROPI M. AND NEWMAN J.A.: Outbreaks of infectious bronchitis in vaccinated broilers on the Delmarva peninsula. *Avian Dis.* 16: 828 - 832 (1972).
- 33.- JOHNSON R.B., MARQUARDT W.W. AND NEWMAN J.A.: A new serotype of infectious bronchitis virus responsible for respiratory disease in Arkansas broiler flocks. *Avian Dis.* 17: 518 - 523 (1973).
- 34.- JOHNSON R.B., MARQUARDT W.W.: Neutralizing characteristics of strains of infectious bronchitis virus as measure by the constant - virus, variable serum method in chicken tracheal cultures. *Avian Dis.* 19: 82 - 90 (1974).
- 35.- KARACA K., NAQI S. AND LUCIO B.: Applications of monoclonal antibodies in the diagnosis of IBV infection. 41st Western poultry disease conference. Sacramento Cal. p. 52 - 53 (1992).
- 36.- KING D.J. and CAVANAGH D.: Infectious Bronchitis, in *Disease of Poultry*. 9th ed. Iowa State University, Press. Iowa: 471 - 484, 1991
- 37.- KING D.J. AND HOPKINS S.R.: Evaluation of the hemoagglutination test for measuring the response of chickens to avian infectious bronchitis. *Avian Dis.* 27: 100 - 112 (1982).

- 38.- KING D.J. AND HOPKINS S.R.: Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the hemoagglutination - inhibition test. *Avian Dis.* 28: 727 - 733 (1984).
- 39.- KISARY J.: Indirect immunofluorescence as a diagnostic tool for parvovirus infection of chickens. *Avian Pathology.* 14: 269 - 273 (1985).
- 40.- KOCH C., KANT A., JANE K.A., COOK AND CAVANAGH.: Epitopes of neutralizing antibodies are localized with three regions of the S1 spike protein of infectious bronchitis virus. II International symposium on infectious bronchitis. p. 154 - 160 (1991).
- 41.- KOCH G. AND CAVANAGH D.: Commentary on session two: IB virus. II International symposium on infectious bronchitis. p. 191 - 194 (1991).
- 42.- KOCH G., HARTOG L., KANT A., VAN ROOZELAAR D. AND DE BOER G.F.: Antigenic differentiation of avian bronchitis virus variant strains employing monoclonal antibodies. *Isr. j. Vet. Med.* 42: 89 - 97 (1986).
- 43.- KOOK J.K., DARBYSIRE J. H. AND PITERS R.W.: Growth kinetic studies of avian infectious bronchitis virus in trachea organ cultures. *Res. Vet. Sci.* 20: 348 -349 (1976).
- 44.- LAMAS DA SILVA.: Bronquitis infecciosa de las gallinas. VII Seminario internacional de patología aviar. Athens, Georgia, E.U.A. p. 356 - 363 (1990).
- 45.- LOHR J. E.: Infectious bronchitis agar - gel precipitin test use of infected allantoic fluid as antigen. *Avian Dis.* 24: 463 - 467 (1979).
- 46.- LUCIO B. AND STEPHEN B. HITCHNER.: Differentiation and detection of infectious bronchitis virus subtypes by immunofluorescence. *Avian Dis.* 14: 9 - 24 (1970).
- 47.- LUKERT P. D.: Comparative sensitivities of embryonating chicken's eggs and primary chicken embryo kidney and liver cell cultures to infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 9: 308 - 316 (1965).

48.- LUTTICKEN D. F., DAVELAAR B., KOUWENHOVEN and BRUGER L.: Significance of variant IB serotypes in the Netherlands. 32th Western Poultry Disease Conference. Davis, Cal. p. 18 - 20. 1983.

49.- MALO A.: La bronquitis infecciosa aviar: Problemática, diagnóstico y posibilidades de prevención. Intervet Internacional B.V Netherlands (1989).

50.- MARQUARDT W. and SNYDER D.: An overview of avian coronaviruses (Infectious Bronchitis) and their antigenic assessment with monoclonal antibodies. 34th Western Poultry Disease Conference. p. 8 - 9 (1985).

51.- MARQUARDT W. W., SNYDER D. B. AND SCHOLOTTHOBER B.A.: Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme - linked immunosorbent assay. Avian Dis. 25: 713 - 722 (1981).

52.- MARQUARDT W. W.: Infectious Bronchitis: Detection of viral antigen in eggs and antibodies in chicken serum by complement fixation. Avian Dis. 18: 105 - 110 (1973).

53.- MARQUEZ M. A.: Encuesta serologica a nivel de campo en busca de serotipos variantes del virus de la bronquitis infecciosa aviar. Memorias de la IX convencion nacional de la Asociaciion Nacional de Especialistas en Ciencias Avicolas. Guanajuato, Gto. México, 1984.

54.- MARQUEZ M.A.: El diagnóstico de las cepas variantes del virus de la bronquitis infecciosa aviar. Memorias de la XIII convención nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avicolas (A.N.E.C.A.). Guanajuato Gto. México p. 27 - 37 (1988).

55.- MEDINA S.: La bronquitis de las aves. Sistema de Universidad Abierta. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México, 1991.

56.- MORENO CHAN R.: Presencia del virus (*Terpeia pulli*) de la bronquitis infecciosa en las aves de México. Memorias del VI Congreso Panamericano de Medicina Veterinaria y Zootecnia, documento No 135. México, D.F. 1962.

57.- MOSQUEDA A. T. y LUCIO B.: Enfermedades Comunes de las Aves Domésticas. Departamento de Producción Animal: Aves. División del sistema de universidad abierta, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México, D.F. p. 452 1985.

58.- REED L. J. AND MUENCH H.: A simple method of estimating fifty per cent end point. Amer. J. Hyg. 27: 493 - 497 (1938).

59.- RICHERD L.: The diagnosis of infectious bronchitis of chickens by the agar gel precipitin test. Avian Dis. 11: 478 - 492 (1962).

60.- SCHALK A. F. and HAWAN.: An apparently new respiratory disease of baby chicks. J. Am. Vet. Med. Assoc. 78: 413 - 422 (1931).

61.- SOTO E.: Las principales enfermedades respiratorias de las aves en México. 4 to curso de actualización Avimex; Complejos respiratorios de las aves. p. 20 - 31 (1992).

62.- VANROEKEL H., CLARK M.K., BULLIS K.L., OLESIUK M. AND SPERLING F.G.: Infectious bronchitis. Am. j. Vet. Res. 12: 140 - 146 (1951).

63.- WAKENELL P.: Vaccination of chicken embryos against infectious bronchitis virus. II International Symposium on Infectious Bronchitis. p. 147 - 153 (1991).

64.- WINTERFIELD R. W. and HITCHNER S. B.: Etiology of an infectious nephritis - nephrosis syndrome of chickens. Am. J. Vet. Res. 23: 1273 - 1279 (1962).

65.- WINTERFIELD R. W., FADLY A.M. AND HANLEY J.E.: Characteristics of an isolate of infectious bronchitis virus from chickens in Florida. Avian Dis. 15: 305 - 311 (1971).

66.- YAGYU K., KIYOTAKE M. AND OHTA S.: Detection of infectious bronchitis virus antigen for experimental infected chicken by indirect immunofluorescent assay with monoclonal antibody. II International symposium on infectious bronchitis. p 98 - 105 (1991).

CUADRO 1

**CASOS MUESTREADOS DE ENERO A OCTUBRE DE 1992
RECIBIDOS EN EL DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL AVES
DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA, UNAM.**

NUMERO	IDENTIFICACION	FIN ZOOTECNICO	PROCEDENCIA	EDAD A LA VACUNACION CONTRA ELI. (DIAS)	TIPO DE VACUNA	EDAD A LA TOMA DE MUESTRA (DIAS)
1	A	ENGORDA	EDO. MEX.	6	ACTIVA	44
2	B	ENGORDA	EDO. MEX.	S/VAC *	-	32
3	C	POSTURA	SAN JUAN DE LOS LAGOS, JAL.	126	INACTIVADA	336
4	D	ENGORDA	HIDALGO	10	ACTIVA	49
5	E	ENGORDA	YACAPOXTLA, MOR.	S/VAC	-	12
6	F	ENGORDA	TELOLOAPAN, GRO.	9	ACTIVA	32
7	G	ENGORDA	TELOLOAPAN, GRO.	9	ACTIVA	42
8	H	POSTURA	PUEBLA, PUE.	140	INACTIVADA	196
9	I	ENGORDA	DOMQUILPAN, HOO.	S/VAC	-	11
10	J	ENGORDA	HIDALGO	S/VAC	-	35
11	K	ENGORDA	HIDALGO	S/VAC	-	49
12	L	ENGORDA	EDO. MEX.	S/VAC	-	39
13	M	ENGORDA	EDO. MEX.	S/VAC	-	14
14	N	ENGORDA	ACAPULCO, GRO.	S/VAC	-	35
15	O	ENGORDA	SAN JUAN DE LOS LAGOS, JAL.	8	ACTIVA	42
16	P	ENGORDA	DISTRITO FEDERAL	S/VAC	-	25
17	Q	ENGORDA	DOMQUILPAN, HOO.	S/VAC	-	49
18	R	ENGORDA	TAXCO, GRO.	S/VAC	-	42

* SIN VACUNAR

CUADRO 2**AISLAMIENTO DEL VIRUS DE BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR EN EMBRION DE POLLO**

NUMERO	IDENTIFICACION	MORTALIDAD EMBRIONARIA	LESIONES EMBRIONARIAS	RESULTADO	NUMERO DE PASES
1	A	-	-	NEGATIVO	60
2	B	+	+	POSITIVO	40
3	C	+	+	POSITIVO	40
4	D	-	-	NEGATIVO	60
5	E	-	-	NEGATIVO	60
6	F	-	-	NEGATIVO	60
7	G	-	-	NEGATIVO	60
8	H	+	+	POSITIVO	30
9	I	+	+	POSITIVO	40
10	J	+	+	POSITIVO	40
11	K	+	+	POSITIVO	40
12	L	+	+	POSITIVO	40
13	M	-	-	NEGATIVO	60
14	N	+	+	POSITIVO	60
15	O	+	+	POSITIVO	50
16	P	+	+	POSITIVO	60
17	Q	-	-	NEGATIVO	60
18	R	-	-	NEGATIVO	60

CUADRO 3

PRUEBAS DE HEMOAGLUTINACION EN PLACA
E INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACION

NÚMERO	IDENTIFICACION	HEMOAGLUTINACION	INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACION
1	B	-	-
2	C	+	+
3	H	+	+
4	I	-	-
5	J	+	+
6	K	+	+
7	L	-	-
8	N	-	-
9	O	-	-
10	P	+	+

CUADRO 4

**VIRUS SUERO NEUTRALIZACION CRUZADA ENTRE LOS AISLAMIENTOS DEL
VIRUS DE BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR Y LOS ANTISUEROS ARKANSAS, MASSACHUSETTS
Y CONNECTICUT USANDO EL METODO ALFA EN EMBRIONES DE POLLO**

IDENTIFICACION DE LOS AISLAMIENTOS DE CAMPO	INDICES DE NEUTRALIZACION		
	ANTISUERO ARKANSAS	ANTISUERO MASSACHUSETTS	ANTISUERO CONNECTICUT
B	4.9	1.1	0.0
C	1.2	2.7	0.5
H	1.2	3.1	0.5
I	0.8	3.0	0.6
J	0.4	2.8	0.4
K	0.2	4.8	1.0
L	0.0	3.5	0.8
N	0.6	3.1	0.0
O	0.4	4.1	0.9
P	0.3	3.6	0.1
Control (+) Massachusetts*	0.1	4.3	0.1
Control (+) connecticut**	0.2	0.3	4.6
Control (-)***	-	-	-

Nota: Indices de neutralización mayores o iguales a 2.0 son considerados positivos

* Vacuna del serotipo Massachusetts

** Vacuna del serotipo Connecticut

*** Embriones sin inocular

CUADRO 5

**INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES
DE LOS AISLAMIENTOS DEL VIRUS DE BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR EN
MEMBRANAS CORION ALANTOIDEAS**

NUMERO	IDENTIFICACION	ANTICUERPOS MONOCLONALES			
		ANTI-SEROTIPO	ANTI-ARKANSAS	ANTI-MASSACHUSETTS	ANTI-CONNECTICUT
1	B	+	+	-	-
2	C	+	-	+	-
3	H	+	-	+	-
4	I	+	-	+	-
5	J	+	-	+	-
6	K	+	-	+	-
7	L	+	-	+	-
8	N	+	-	+	-
9	O	+	-	+	-
10	P	+	-	+	-
11	CONTROL MASSACHUSETTS*	+	-	+	-
12	CONTROL CONNECTICUT**	+	-	-	+
13	CONTROL NEGATIVO***	-	-	-	-

*VACUNA DEL SEROTIPO MASSACHUSETTS

**VACUNA DEL SEROTIPO CONNECTICUT

***MEMBRANAS CORION ALANTOIDEAS SIN INFECTAR