

48
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACION DE 4 PROGRAMAS DE VACUNACION UTILIZADOS EN CAMPO CONTRA EL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA, POR MEDIO DE LA EVALUACION HISTOLOGICA DE ANILLOS TRAQUEALES Y NIVEL DE PROTECCION ANTE UN DESAFIO CONTROLADO.

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

EDGAR EMILIO PEÑA FLORES

ASESORES: MVZ, EPA MAGDALENA ESCORCIA MARTINEZ
MVZ, DES NORMA CALDERON APODACA
MVZ, MC JOSE ANTONIO QUINTANA LOPEZ
PhD GUILLERMO TELLEZ ISAIAS



MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

263993



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 4 PROGRAMAS DE VACUNACIÓN UTILIZADOS EN CAMPO
CONTRA EL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA, POR MEDIO DE LA
EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE ANILLOS TRAQUEALES Y NIVEL DE
PROTECCIÓN ANTE UN DESAFÍO CONTROLADO.**

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:

EDGAR EMILIO PEÑA FLORES

ASESORES:

MVZ, EPA Magdalena Escorcía Martínez.

MVZ, DES Norma Calderón Apodaca.

MVZ, MC José Antonio Quintana López.

PhD Guillermo Téllez Isaías.

DEDICATORIA.

Como es tradicional dedico este trabajo a:

Mis padres: Emilio Peña Cruz y Martha Flores Mora por la confianza, el cariño y apoyo que me han brindado durante veinticuatro años.

Mis hermanos: Cesar y Zaira. Por que aunque han existido diferencias entre nosotros, me han brindado su apoyo incondicional en todo momento.

Mis mejores amigos: Agustín, Armando, Guillermo, Humberto y Raúl. Por los invaluable años de amistad.

Mis amigos y compañeros del Departamento de Producción Animal. Aves:

Abril, Angélica, Blanca, Carmen, Cecilia, Cosette, Daniel O., Donaji, Eva, Felipa, Francisco, Gerardo, Guillermo, Humberto, Iliana, Jesús, Juan Carlos, Judith, Julio, Lilia, Marco, Mireya, Mónica, Roberto, Rosalba, Rubén, Xóchitl.

Mi compañero de carrera y servicio social: Daniel Marrufo. Por que aunque te cal mal en un principio, me has apoyado en todo momento, y sobre todo, me has brindado tu amistad.

A todos mis amigos y compañeros del Museo UNIVERSUM.

Y por supuesto a todos los nobles animales que para mi formación como médico veterinario y trabajo de tesis tuvieron que morir.

AGRADECIMIENTOS.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

AL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL: AVES.

A LA DRA. MAGDALENA ESCORCIA MARTÍNEZ, DR. JOSÉ ANTONIO QUINTANA LÓPEZ, DRA. NORMA CALDERÓN APODACA Y EL DR. GUILLERMO TÉLLEZ ISAÍAS.

Por su apoyo y consejos para la realización de este trabajo.

AL DR. VÍCTOR MANUEL PETRONE.

Por sus consejos y tiempo dedicados a este trabajo.

A LOS INTEGRANTES DEL JURADO:

DR. ALEJANDRO BANDA CASTRO.

DR. J. ANTONIO MONTAÑO HIROSE.

DR. NESTOR LEDEZMA MARTÍNEZ.

DR. GILBERTO CHÁVEZ GRIS.

DRA. MAGDALENA ESCORCIA MARTÍNEZ.

Por complementar esta tesis con sus valiosos conocimientos.

A todas aquellas personas que de una manera u otra colaboraron en la formación del estudiante y profesionalista. A todos ellos, muchas gracias.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
HIPÓTESIS	5
OBJETIVOS	5
MATERIAL Y MÉTODOS	6
RESULTADOS	8
DISCUSIÓN	10
CONCLUSIONES	12
REFERENCIAS	13
CUADROS Y FIGURAS	16

Peña Flores Edgar. EVALUACIÓN DE 4 PROGRAMAS DE VACUNACIÓN UTILIZADOS EN CAMPO CONTRA EL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA, POR MEDIO DE LA EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE ANILLOS TRAQUEALES Y NIVEL DE PROTECCIÓN ANTE UN DESAFÍO CONTROLADO (bajo la dirección de MVZ, EPA Magdalena Escorcía Martínez; MVZ, DES Norma Calderón Apodaca; MVZ, MC José Antonio Quintana López y MVZ, PhD Guillermo Téllez Isaías).

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue comprobar si 4 diferentes calendarios de vacunación (A, B, C, D) aplicados en pollo de engorda, son capaces de conferir protección ante un virus de desafío. Por cada calendario se formaron 3 grupos de aves (grupo 1: aves vacunadas-desafiadas; grupo 2: aves no vacunadas-desafiadas y grupo 3: aves no vacunadas-no desafiadas). El grupo 1 consistió de 10 pollos vacunados al día de edad por aspersión con gota fina utilizando 70ml/1000 aves, de la cepa Massachusetts (Mass). El título vacunal aplicado en las explotaciones A y B fue $10^{3.2}$ DIEP₅₀/ml, mientras que el de las explotaciones C y D fue $10^{5.45}$ DIEP₅₀/ml. Los grupos 2 y 3 estuvieron formados por 5 aves tratadas al día de edad con el diluyente vacunal vía aspersión con gota fina. Las aves de los grupos 1 de las explotaciones A y B fueron revacunadas en agua de bebida a los 19 y 23 días de edad respectivamente, con una vacuna bivalente (cepa Mass y La Sota) con título de $10^{3.5}$ DIEP₅₀/ml. Los pollos de los grupos 1 y 2 de ambas explotaciones fueron desafiados por vía ocular, con una cepa virulenta Massachusetts 41 con título de 10^4 DIEP₅₀/ml a los 40 y 43 días de edad, respectivamente. Las aves de los grupos 1 y 2 de las explotaciones C y D fueron desafiadas los días 10 y 48, respectivamente. A los 3 grupos se les evaluó la protección con base en las lesiones encontradas en embriones de pollo inoculados a partir de hisopos traqueales y el estudio histológico del epitelio de la tráquea extratorácica tomada a los 5 días posteriores al desafío. El desafío de los grupos 1 de las explotaciones A y B no provocó lesiones en la prueba de potencia, ni lesiones histológicas significativas ($P < 0.05$). El desafío de los grupos 1 de las explotaciones C y D produjo lesiones positivas en la prueba de potencia y lesiones histológicas características de la infección por el VBI ($P < 0.05$). El desafío de los grupos 2 produjo lesiones en la prueba de potencia y lesiones histológicas características de la infección por el VBI ($P < 0.05$), mientras que el de los grupos 3 no causó lesiones. Se concluye que los resultados de la prueba de potencia y la evaluación histológica concuerdan; así mismo, 2 aplicaciones de vacuna son una medida de protección adecuada para las aves.

INTRODUCCIÓN.

El control de las enfermedades involucra varias medidas de manejo tales como la higiene, la sanidad y la bioseguridad.^{1,2} En la actualidad, algunas enfermedades llaman la atención, debido a que se ha incrementado su incidencia, tal es el caso de la coriza y la bronquitis infecciosa (BI).³ Ésta última es de suma importancia, ya que es una enfermedad altamente contagiosa, caracterizada por un cuadro respiratorio, un descenso drástico de la producción de huevo, alteraciones estructurales del mismo y en aves menores de 6 semanas una mortalidad de hasta el 25%.⁴

La bronquitis infecciosa es causada por un coronavirus, cuyo genoma consiste en una cadena sencilla no segmentada de ARN, de sentido positivo. Es un virus envuelto que se destruye fácilmente por la acción del calor y los desinfectantes comunes. Schalk y Hawn,⁵ detectaron por primera vez la BI en los Estados Unidos. El agente etiológico de esta enfermedad fue descrito por Beaudette y Hudson⁶ en 1937. Después de unos cuantos años la enfermedad se describió en muchas otras partes de Estados Unidos y actualmente se sabe que existe en todo el mundo.

En México, el primer aislamiento del virus lo realizó Moreno⁷ en el año de 1962, el mismo año, Garrido⁸ detecta por primera vez la presencia de anticuerpos neutralizantes en parvadas de distintas áreas del país. Lucio,⁹ en 1969, realiza la detección y diferenciación de subtipos del virus de la bronquitis infecciosa (VBI), por medio de la técnica de inmunofluorescencia, conociéndose desde entonces, la presencia del virus tipo Massachusetts (Mass) y del tipo Connecticut (Conn).

Los serotipos del VBI tienen diversos grados de homología entre ellos mismos, lo cual hace confusa la identificación del serotipo responsable; además, los anticuerpos para los diferentes serotipos y variantes no ofrecen protección cruzada.¹⁰

Algunos de los principales serotipos que se conocen en la actualidad incluyen el Mass, que es quizá el más ubicuo, Holland, Arkansas, Florida, JMK, Clark 333, SE 17, Iowa y Conn entre otros, que muestran preferencia por los tejidos respiratorios. Los serotipos T, conocidos también como T Australiana, Gray y Holte tienen un tropismo genito-urinario.¹¹

La naturaleza altamente transmisible de la enfermedad y la existencia de múltiples serotipos del virus, han complicado e incrementado el costo de las técnicas para prevenir la enfermedad mediante la inmunización.¹⁰

La trascendencia económica de esta enfermedad es evidente ya que está determinada por los bajos índices en ganancia de peso, eficiencia alimenticia y disminución de la calidad y cantidad de huevo en parvadas afectadas por la enfermedad; además, el virus puede estar presente en infecciones mixtas en asociación con *E. coli* y *Mycoplasma* sp. entre otros^{12, 13} que producen aerosaculitis, pudiendo ser esto causa de decomiso durante el procesamiento de las aves.¹⁴

Actualmente, en México, la BI es un problema frecuente en granjas de pollo de engorda, reproductoras y aves de postura en todas las zonas del país, aun en aves vacunadas. Lo anterior puede obedecer a muy diversas causas, por lo que al diseñar un programa de vacunación para pollos debe tomarse en cuenta la historia, que incluye epidemiología reciente de la granja o área de cría, los serotipos específicos,¹⁰ la evaluación del nivel de protección en reproductoras y pollos de un día de edad, los niveles de anticuerpos humorales, la sanidad inicial del pollito, las crianzas anteriores y su evaluación serológica,¹⁵ la técnica de aplicación adecuada de la vacuna,¹⁶ la vía de administración más apropiada,^{17, 18} la edad más efectiva de aplicación,¹⁹ el manejo del pollo durante los primeros 10 días de edad, los factores inmunosupresores,^{20, 21} la potencia de la vacuna y la variación de la inmunidad en diferentes estirpes de aves.²²

Ante tales circunstancias, resulta de vital importancia la valoración de la inmunidad en pollos vacunados contra la BI. En la actualidad existen algunos criterios que pueden ser tomados en cuenta para dicho fin, como son los parámetros cuantificables de producción de las parvadas vacunadas y estudios en el laboratorio.

La información generada por el estudio en el laboratorio puede ayudar a evaluar el comportamiento de una parvada, así como a predecir la protección alcanzada, o la severidad de las lesiones producidas. Para ello se pueden realizar seguimientos serológicos, virológicos e histopatológicos.^{23, 15}

El propósito de toda vacunación en aves es la estimulación de la producción de anticuerpos, los cuales ayudan a controlar la enfermedad.²⁴ En el caso de la serología existen algunas pruebas que ayudan a evaluar este tipo de respuesta. Entre ellas se encuentran la inhibición de la hemoaglutinación (HI), la virus-seroneutralización (VSN) y la técnica de ELISA.²³

La prueba de potencia es considerada quizá, como el criterio más importante en este tipo de estudios. Se basa en la habilidad de una cepa vacunal para inducir

inmunidad suficiente para inhibir la replicación de una cepa de desafío en el tracto respiratorio superior. Con este criterio se determina el grado de protección proporcionado por la vacuna. Estudios más recientes incluyen otros criterios, tales como la evaluación de la actividad ciliar de muestras traqueales en medios de mantenimiento, obtenidas de pollos, 3 días posteriores al desafío.^{25, 26, 27} La BI en cultivos de órganos (tráquea y otros tejidos), ha sido documentada. Los anillos traqueales pueden ser preparados a partir de embriones de 20 días de edad y mantenidos en forma aislada. Después de la infección con el VBI, la ciliostasis es fácilmente observada con ayuda del microscopio fotónico, a los 3 ó 4 días de ocurrida la infección.²⁸

La evaluación histológica se basa en el grado de daño que provoca el agente en los tejidos u órganos específicos. Existe correlación de los hallazgos histopatológicos en tráqueas con la presencia o ausencia de movimiento ciliar, así mismo con la presencia del virus.^{29, 30} Las lesiones ocasionadas por el VBI pueden ser observadas dentro de 18 horas posteriores a la infección, encontrándose pérdida de cilios, desprendimiento de células epiteliales y una infiltración de heterófilos y linfocitos.³¹ Nakamura *et al*¹³ observaron lesiones a partir del segundo día hasta los 15 días postinfección, y encontraron mayor severidad de las mismas al día 6 postinfección. Darbyshire y Peters³² también encontraron correlación de la actividad ciliar con la presencia del antígeno viral y lesiones en el epitelio respiratorio, observaron pérdida de cilios y descamación de células superficiales así como intensa infiltración inflamatoria de la mucosa epitelial en tráqueas de pollos susceptibles. En pollos protegidos, el epitelio ciliar se mantuvo intacto.

HIPÓTESIS.

Las aves vacunadas bajo diferentes programas de vacunación presentan una adecuada protección y son capaces de neutralizar a un virus de desafío.

OBJETIVO.

Comprobar si 4 diferentes calendarios de vacunación aplicados en pollo de engorda son capaces de conferir protección ante un virus de desafío, mediante la evaluación histológica del epitelio traqueal y la prueba de potencia.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Virus. Se utilizó como virus de desafío una cepa virulenta Massachusetts M41 con título de 10^4 DIEP₅₀/ml del VBI, donada por Laboratorios IASA.

Aves de experimentación. Fueron empleados 80 pollos de engorda de la estirpe Peterson X Avian Farm. Se mantuvieron en unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (DPA: AVES), bajo condiciones de ventilación y temperatura controladas; así mismo durante su estancia se proporcionó alimento comercial para pollo de engorda y agua, ambos a libre acceso.

Diseño experimental. Se evaluaron 4 diferentes calendarios de vacunación aplicados en 4 explotaciones comerciales (A, B, C, D). Se formaron 3 grupos de aves por programa vacunal ó explotación avícola (grupo 1: aves vacunadas-desafiadas; grupo 2: aves no vacunadas-desafiadas y grupo 3: aves no vacunadas-no desafiadas). El grupo 1 consistió de 10 pollos vacunados al día de edad por aspersión con gota fina utilizando 70 ml/1000 aves, de la cepa Mass. El título vacunal en las explotaciones A y B fue $10^{3.2}$ DIEP₅₀/ml; y el título en las explotaciones C y D fue $10^{5.45}$ DIEP₅₀/ml. Los grupos 2 y 3, de 5 aves c/u, fueron tratados al día de edad con el diluyente vacunal via aspersión por gota fina. Las aves del grupo 1 de las explotaciones A y B fueron revacunadas en agua de bebida a los 19 y 23 días de edad respectivamente, con una vacuna bivalente (cepa Mass y La Sota) con título de $10^{3.5}$ DIEP₅₀/ml, a dosis completa. Los pollos de los grupos 1 y 2 de ambas explotaciones fueron desafiadas ocularmente con una cepa virulenta Massachusetts M41 con título de 10^4 DIEP₅₀/ml, a los 40 y 43 días de edad, respectivamente. Las aves de los grupos 1 y 2 de las explotaciones C y D fueron desafiadas el día 10 y 48, respectivamente (cuadro 1).

Toma de muestras. La toma de muestras y el sacrificio de las aves se realizaron a los 5 días posteriores al desafío. Las aves fueron sacrificadas empleando el método de émbolo gaseoso intracardiaco. Para la evaluación histológica se colectaron 3 secciones transversales de tráquea extratorácica, de 5 mm de longitud cada una, a intervalos de 1 cm. La primera sección comprendió larínge y el primer anillo traqueal. Las secciones fueron fijadas durante 2 días en formalina al 10%, amortiguada a pH 7.4. Para el aislamiento viral se realizó arrastre con hisopo de la mucosa de los fragmentos de tráquea restantes de cada ave. Los hisopos se colocaron por separado en tubos con 10 ml de caldo triptosa-fosfato estéril.

Procesamiento de muestras. Se realizó en el DPA: Aves. Las secciones de tráquea se incluyeron en parafina y fueron cortadas a 4 μ m de espesor. Se procesaron y tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina (HE).³³ Para la prueba de potencia, por cada muestra se inocularon 5 embriones de 9 a 11 días de edad vía cavidad alantoidea, observándose la mortalidad durante 7 días consecutivos con ayuda de un ovoscopio.³⁴ Al día 7 postinoculación fueron sacrificados los embriones sobrevivientes para su estudio macroscópico.

Evaluación del estudio: Se observaron los cortes de tráquea al microscopio fotónico y se evaluó el

porcentaje de pérdida de cilios y metaplasia escamosa en 5 campos con el objetivo de inmersión resultando un aumento total de 1000X; se contó el total de linfocitos de 5 campos con el objetivo de inmersión resultando un aumento total de 1000X y se obtuvo el promedio; se observaron 5 campos con el objetivo seco fuerte resultando un aumento total de 400X, se contaron las células con necrosis y los heterófilos y se obtuvo el promedio. Fueron establecidas calificaciones para cada una de ellas (cuadro 2).

Para confirmar la presencia del virus, los embriones que mostraron cualquier efecto patológico del VBI tales como enanismo, depósitos de uratos en el mesonefros, engrosamiento de la membrana amniótica y sobre-extensión de la tercera falange, fueron considerados positivos.

Análisis estadístico. Los resultados obtenidos fueron analizados con la prueba de ji-cuadrada, con un grado de significancia para α de $p < 0.05$.

RESULTADOS.

Evaluación histológica. Se observaron lesiones de grado variable tales como pérdida de cilios, necrosis epitelial, infiltrado linfocitario y de heterófilos, y metaplasia escamosa en los cortes de tráquea de las aves vacunadas de todas las explotaciones. No se encontraron lesiones significativas ($P < 0.05$) en las muestras de los grupos 1 de las explotaciones A y B, y en los grupos 3 de todas las explotaciones. En los cortes de las aves de los grupos 1 de las explotaciones C y D, y de los grupos 2 de todas las explotaciones, se encontraron lesiones histológicas significativas ($P < 0.05$) caracterizadas por necrosis epitelial de grado moderado a severo con zonas de metaplasia escamosa, así mismo se encontró infiltrado, principalmente linfocitario de grado leve a moderado, semejante al producido por el VBI (gráfica 1 y 2). A continuación se describen los porcentajes de lesiones encontradas en las 4 explotaciones evaluadas.

Explotación A. Grupo 1.

Infiltrado linfocitario. El 30% de los cortes no mostraron cambios significativos, el 60% se afectaron de manera leve y 10% de forma moderada.

Infiltrado de heterófilos. El 100% de los cortes no mostraron cambios significativos.

Necrosis. El 40% de los cortes no mostraron cambios significativos, el 50% se afectaron de manera leve y 10% de forma moderada.

Pérdida de cilios. El 30% de los cortes se afectaron de manera leve, el 40% de forma moderada y 30% de forma severa.

Metaplasia escamosa. El 20% de los cortes no mostraron cambios significativos, 50% se afectaron de manera leve, 20% de forma moderada y 10% de forma severa.

Explotación B. Grupo 1.

Infiltrado linfocitario. El 50% de los cortes no mostraron cambios significativos, el 30% se afectaron de manera leve y 20% de forma moderada.

Infiltrado de heterófilos. El 90% de los cortes no mostraron cambios significativos y 10% se afectaron de manera leve.

Necrosis. El 40% de los cortes no mostraron cambios significativos, el 50% se afectaron de manera leve y 10% de forma moderada.

Pérdida de cilios. El 10% de los cortes no mostraron cambios significativos, el 50% se afectaron de manera leve y 40% de forma moderada.

Metaplasia escamosa. El 40% de los cortes no mostraron cambios significativos y 60% se afectaron de manera leve.

Explotación C. Grupo 1.

Infiltrado linfocitario. El 70% de los cortes se afectaron de manera leve y 30% de forma moderada.

Infiltrado de heterófilos. El 70% de los cortes no mostraron cambios significativos y 30% se afectó de manera leve.

Necrosis. El 40% de los cortes se afectó de manera leve, el 50% de forma moderada y 10% de forma severa.

Pérdida de cilios. El 10% de los cortes se afectó de manera leve, el 90% de forma severa.

Metaplasia escamosa. El 20% de los cortes se afectó de manera leve, el 10% de forma moderada y 70% de forma severa.

Explotación D. Grupo 1.

Infiltrado linfocitario. El 10% de los cortes se afectó de manera leve y el 90% de forma moderada.

Infiltrado de heterófilos. El 70% de los cortes se afectó de manera leve y 30% de forma moderada.

Necrosis. El 10% de los cortes se afectó de manera leve, 40% de forma moderada y 50% de forma severa.

Pérdida de cilios. El 10% de los cortes se afectó de manera leve, 90% de forma severa.

Metaplasia escamosa. El 10% de los cortes se afectó de manera leve, 40% de forma moderada y 50% de forma severa.

Prueba de potencia. Al estudio macroscópico, se observaron las diferentes lesiones ocasionadas por el VBI tales como enanismo, anomalías del emplume, sobre-extensión de la tercera falange y depósitos de uratos en el mesonefros. El desafío de los grupos 1 de las explotaciones A y B no causó lesiones en la prueba de potencia ($P < 0.05$). El desafío de los grupos 1 de las explotaciones C y D produjo lesiones positivas en la prueba de potencia ($P < 0.05$). El desafío de los grupos 2 de todas las explotaciones produjo lesiones positivas en la prueba de potencia ($P < 0.05$), mientras que el de los grupos 3 no las causó. El nivel de protección fue proporcional al porcentaje de muestras negativas al aislamiento (cuadro 3).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

DISCUSIÓN.

En la actualidad, la avicultura moderna ha establecido sistemas de vacunación eficientes, rápidos, seguros y fáciles de aplicar, que cumplen con el objetivo de proteger al ave. Sin embargo se ha observado un aumento en la incidencia de la BI, lo que hace necesaria la evaluación de los métodos de vacunación contra el VBI en las aves. En el presente trabajo se evaluaron 4 diferentes programas de vacunación aplicados en explotaciones comerciales de pollo de engorda para medir la protección conferida por estas vacunas. En dos de las explotaciones se encontró que el nivel de protección conferido por las vacunaciones era bajo; o bien, el programa de vacunación establecido fue inadecuado ya que en el estudio histológico que se les realizó se observaron lesiones características de la BI. Por otro lado, en la prueba de potencia realizada a esas mismas aves se confirmó la evaluación histológica. Estos resultados contrastan con lo descrito por Andrade *et al*^{29, 35} quienes sólo encontraron infiltrado linfocitario leve en aves vacunadas al día de edad con una cepa Mass 41. Nakamura *et al*¹³ no observaron lesión alguna para ambas pruebas en aves protegidas. Estudios previos han demostrado la completa correlación de la recuperación viral, lesiones histológicas y movimiento ciliar en la evaluación de protección contra el VBI.^{19, 26, 29, 30}

En los cortes de las aves de la explotación D, se observó un aumento en la población de linfocitos y heterófilos. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con los cortes histológicos de las aves de la explotación C, probablemente debido a la inmadurez inmunológica de esos animales, ya que las aves no poseen un sistema inmune maduro sino hasta las 3 semanas de edad.³⁶ McMartin³⁷ menciona que en aves progresivamente mayores, el infiltrado linfocitario en la submucosa comienza a manifestarse como rasgo común de las infecciones por VBI virulentos.

Los animales de las 4 explotaciones recibieron la primera vacunación al día de edad, dando lugar a una posible neutralización del antígeno vacunal por la inmunidad materna, que pudo ser responsable del bajo nivel de protección observado en los animales de las explotaciones C y D. En los animales de las explotaciones A y B muy posiblemente se observaría un nivel de protección similar, de no haber sido revacunadas dichas aves. La inmunidad y la respuesta serológica generadas mediante la infección con un virus vacunal vivo, dependen de su multiplicación en los tejidos del huésped.³⁸ La existencia de inmunidad humoral al VBI, tanto activa como pasiva puede prevenir dicha replicación, con el consecuente bloqueo de la respuesta primaria en el caso de anticuerpos maternos y la prevención de una respuesta secundaria en el caso de inmunidad activa. Raggi y Lee,³⁹ Hofstad,⁴⁰ Davelaar y Kouwenhoven,⁴¹ MacDonald *et al*,^{38, 42} han estudiado tales efectos y han encontrado que la inmunidad materna interfiere en la producción de inmunidad humoral ante una vacunación a diferentes edades. La aplicación de únicamente media dosis de la primera vacuna en todas las aves pudo facilitar dicho efecto neutralizante, pudiendo ser también

responsable del bajo nivel de protección observado en los animales de las explotaciones C y D. De manera oficial⁴³ se recomienda como dosis mínima un título de 10^4 DIEP₅₀/ml, observándose un título menor al recomendado, en la primer vacunación de las explotaciones A y B. Sin embargo las aves de las explotaciones A y B, aun cuando fueron también vacunadas al día de edad y recibieron únicamente media dosis de dicha vacuna, fueron revacunadas a los 19 y 23 días de edad respectivamente. *Debe recordarse que en la respuesta inmunológica secundaria se incrementa la producción y afinidad de los anticuerpos, se mejora la uniformidad de los títulos y se incrementa la duración de la inmunidad.*³⁶ Además, a esta edad, las aves ya poseen un sistema inmune maduro y se ha reducido la posibilidad de una neutralización del antígeno vacunal por anticuerpos maternos, siendo estos factores, posiblemente, responsables de la protección observada en dichas explotaciones.

Otra posible causa de la pobre protección en las aves de las explotaciones C y D pudo ser la técnica de aplicación de la primera vacuna en todas las aves, por aspersión con gota fina. Davelaar y Kouwenhoven⁴⁴ encontraron una protección adecuada a las 3 semanas post-vacunación en aves vacunadas al día de edad por vía conjuntival. Sin embargo, en aves de la misma edad y vacunadas por la misma ruta pero en una forma más práctica, como aspersión con gota gruesa, encontraron una inmunidad menor a las 3 semanas de edad. Así mismo, observaron que aves vacunadas a las 3 semanas de edad con bajos niveles de anticuerpos maternos, también mediante aspersión, no mostraron completa inmunidad protectora hasta las 5 semanas posteriores a la vacunación. Esto indica que la protección conferida mediante la vacunación por aspersión se desarrolla más lentamente que la generada por aplicación mediante gota en ojo. Este retardo de la protección coincide con el retardo de la formación del infiltrado linfocitario y los folículos en la glándula de Harder, cuando es comparado con el grupo vacunado mediante gota en ojo.⁴⁴

Davelaar *et al*⁴⁵ estudiaron el papel de la glándula de Harder en la síntesis o secreción de IgG, IgA e IgM en aves vacunadas al día de edad mediante gota en ojo contra el VBI; observaron la síntesis de IgA hasta las 2 y 3 semanas de edad, manifestándose de nuevo la poca edad del animal como posible factor negativo en la estimulación de protección en el animal. Darbyshire y Peters¹⁹ concluyeron que la edad óptima para la vacunación es la segunda semana de vida del ave. López *et al*⁴⁶ encontraron un buen nivel de anticuerpos en aves vacunadas al día de edad; sin embargo, observaron respuestas significativamente superiores en grupos vacunados a los 7 y 14 días de edad. Futuras investigaciones serán necesarias para evaluar el papel de este órgano en la inmunidad de las aves; incluyendo además, la medición de anticuerpos maternos y la presencia de *Mycoplasma* sp. en los animales evaluados.

CONCLUSIONES.

Se evaluaron 4 diferentes calendarios de vacunación aplicados en pollo de engordda. Con base en los resultados observados en esta investigación se concluye:

Los resultados de la prueba de potencia y la evaluación histológica concuerdan.

La aplicación de 2 vacunas en este tipo de programas de inmunización es una medida de protección adecuada para las aves.

La aplicación de media dosis de vacuna en el primer día de edad no confiere una protección adecuada a las aves.

LITERATURA CITADA.

1. Mosqueda TA. Protección integral de la salud aviar. Memorias de la IV jornada médico avícola; 1993 agosto 4-6; (DF) México. México (DF): DPA:Aves-UNAM, 1993: 161-163.
2. Valenzuela PA. La importancia de la bioseguridad en la industria avícola. Tecnología avipecuaria 1996; 9: 29-30.
3. Schleifer J. Infectious bronchitis, coryza said to be increasing problems. Poul. Dig 1995; 54: 15-20.
4. King, D. J. and Cavanagh, D. Bronquitis Infecciosa En: Calnek BW, Barnes JH, Beard CW, Reid WM, Yoder HW, editores. Enfermedades de las Aves. Ciudad de México: El Manual Moderno, SA de CV, 1995: 575-591.
5. Schalk AF, Hawn MC. An apparently new respiratory disease of baby chicks. J. Am. Vet. Med. Ass 1931; 78: 413-422.
6. Beaudette FR, Hudson CB. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. J. Am. Vet. Med. Assoc 1937; 90: 51-60.
7. Moreno ChR. Presencia del virus (Terpeia pulli) de la bronquitis infecciosa en las aves de México. Trabajo presentado y publicado como documento N° 135, en noviembre, 1962, dentro del IV Congreso Panamericano de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México. Ciencia Veterinaria 1991; 5: 143-147.
8. Garrido MC. Presencia de anticuerpos neutralizantes del VBI en aves de distintas áreas de la República Mexicana (tesis de licenciatura). (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1962.
9. Lucio MB. Diferenciación y detección de subtipos del virus de la bronquitis infecciosa por inmunofluorescencia (tesis de licenciatura). (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1969.
10. Sander JE. An infectious bronchitis update. Poul. Dig 1996; 55: 42-44.
11. Cumming RB. Control of avian infectious bronchitis-nephrosis in Australia. Aust. Vet. J 1992; 45: 200-203.
12. Jones RC. Interacciones entre el virus de la bronquitis infecciosa y otros agentes respiratorios. Memorias del 8o. curso de actualización Avi-Mex. Bronquitis Infecciosa y Problemas Respiratorios Emergentes; 1996 julio 26; (DF) México. México, (DF): AVIMEX, SA de CV, 1996: 22-32.
13. Nakamura K, Imai K, Tanimura N. Comparison of the effects of infectious bronchitis and infectious laryngotracheitis on the chicken respiratory tract. J. Comp. Path 1996; 114: 11-21.
14. Ansong DJ. Decomiso de canales en el rastro. Correo avícola 1993; 6: 21-23.
15. Lucio DE. Calendario de vacunación y monitoreo en el pollo de engorda y gallina de postura. Memorias del curso de actualización sobre técnicas de vacunación y reacciones postvacunales; 1996 noviembre 29; (DF) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias

Avícolas, 1996: 47-52.

16. Wigle WL. Proper water vaccination requires certain techniques. *Poult. Dig* 1990; 49: 30-32.
17. Mutalib A, Boyle RC. Influence of site of inoculation of inactivated vaccines on the immune response in chickens. *Avian Dis* 1994; 38: 857-860.
18. Sander JE. *Principles of vaccination programs for poultry health*. *Poult. Dig* 1991; 50: 14-22.
19. Darbyshire JH, Peters RW. Humoral antibody response and assesment of protection following primary vaccination of chickens with maternally derived antibody against avian infectious bronchitis virus. *Res. Vet. Sci* 1985; 38: 14-21.
20. González CM. Causas de inmunosupresión. Memorias de la III Jornada Médico-Avícola; 1992 agosto 12-14; (DF) México. México (DF): DPA: Aves-UNAM, 1992: 86-88.
21. Hargis BM, Téllez G. La influencia del estrés sobre la inmunidad de las aves y su resistencia a las enfermedades. Memorias de Avances en inmunología aviar; 1996 marzo 15; (DF) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 1996: 1-7.
22. Nakamura K, Cook JK, Otsuki K, Huggins MB, Frazier AJ. Comparative study of respiratory lesions in two chicken lines of different susceptibility infected with infectious bronquitis virus: histology, ultrastrucutre and immunohistochemistry. *Avian Path* 1991; 20: 241-257.
23. Gómez DCA. Teoría de la vacunación. Memorias de la III Jornada Médico-Avícola; 1992 agosto 12-14; (DF) México. México (DF): DPA: Aves-UNAM, 1992: 78-80.
24. Peterson EH. Los propósitos de la vacunación. *Avirama* 1990; 7: 36-43.
25. Darbyshire JH. Assesment of cross immunity in chickens to strains of avian infectious bronchitis virus using tracheal organ cultures. *Avian Path* 1980; 9: 179-184.
26. Marquardt WW, Kadavill SK, Snyder DB. Comparison of ciliar activity and virus recovery from tracheas of chickens and humoral immunity after inoculation with serotypes of avian infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 1982; 26: 828-834.
27. Snyder DB, Marquardt WW, Kadavill SK. Ciliar activity. A criterion for assesing resistance to infectious bronchitis virus with ELISA antibody titre. *Avian Dis* 1983; 27: 485-490.
28. Darbyshire JH. Organ culture in avian virology: A Review. *Avian Path*. 1978; 7: 321-335.
29. Andrade LF, Villegas P, Fletcher OJ. Evaluation of ciliar movement in tracheal rings to asses immunity against infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 1982; 26: 805-815.
30. Winterfield RW, Fady AM. Some characteristics of isolations of bronchitis infectious virus from commercial vaccines. *Avian Dis* 1972; 16: 746-755.
31. Ridel C. *Avian Histopathology*. 1st. ed. USA: American Association of Avian Pathologist, 1997.
32. Darbyshire JH, Peters RW. Sequential development of humoral immunity and assesment of protection in chickens following vaccination and challenge with avian infectious bronquitis virus. *Res. Vet. Sci* 1984; 37: 77-86.
33. Luna LG. *Manual of histologic stainings methodos of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1968.

34. Lukert PD. Infectious bronchitis. In: Hitchner BS, Domermuth CH, Purchase GH, Williams JE, editors. *Isolation and identification of avian pathogens*. New York: Creative printing company, 1980 70-72.
 35. Andrade LF, Villegas P, Fletcher OJ. Vaccination of Day-Old broilers against infectious bronchitis: Effect of vaccine strain and route of administration. *Avian Dis* 1983; 27: 178-187..
 36. Gómez DC. Medición de la inmunidad. IV Jornada Médico Avícola; 1993 Agosto 4-6; (DF) México. México (DF): DPA: Aves-UNAM, 1993: 79-88.
 37. McMartin DA. Infectious bronchitis. In: McFerran JB; McNulty MS, editors. *Virus infections of birds*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V, 1993:247-275.
 38. MacDonald JW, Dagless MD, McMartin DA, Randall CJ, Pattison M, Early JL, Aubrey S. Field observations on serological responses to vaccine strains of infectious bronchitis virus administered by coarse spray and via the drinking water. *Avian Path* 1982; 11: 537-546.
 39. Raggi LG, Lee GG. Influence of age and congenital immunity upon immunisation with an avian infectious bronchitis vaccine. *J. of immunology* 1958; 81: 155-160.
 40. Hofstad MS. Immune response to infectious bronchitis virus. *Am. J. Vet. Res* 1975; 36: 520-521.
 41. Davelaar FG, Kouwenhoven B. Influence of maternal antibodies on vaccinations of chicks of different ages against infectious bronchitis. *Avian Path* 1977; 6: 41-50.
 42. MacDonald JW, Randall CJ, McMartin DA, Dagless MD, Gazdzinski D. Active and passive immunisation against nephritis induced by an avian infectious bronchitis virus. *Avian Path* 1981; 10: 121-129.
 43. *Requisitos mínimos para la realización de las pruebas de control de calidad de los productos biológicos destinados su uso en aves*. Revisión y aprobación Patricia Noé y comité. SARH, 1977.
 44. 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 Path* 1980; 9: 499-510.
 45. Davelaar FG, Noordzij A, Van der Donk JA. A study on synthesis and secretion of immunoglobulins by the Harderian gland of the fowl after eyedrop vaccination against infectious bronchitis virus at 1 day old. *Avian Path* 1982; 11: 63-79.
- 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. *Revista Cubana de Ciencia Avícola* 1991; 18: 62-70.

Cuadro 1. Programas vacunales.

Explotación	Grupo	No. de aves	Vacunación	Revacunación	Desafío*
A	1 ¹	10	1 día, aspersion	19 días, agua de bebida	40 días, ocular
	2	5	1 día, diluyente vacunal	No	40 días, ocular
	3	5	1 día, diluyente vacunal	No	No
B	1 ¹	10	1 día, aspersion	23 días, agua de bebida	43 días, ocular
	2	5	1 día, diluyente vacunal	No	43 días, ocular
	3	5	1 día, diluyente vacunal	No	No
C	1 ²	10	1 día, aspersion	No	10 días, ocular
	2	5	1 día, diluyente vacunal	No	10 días, ocular
	3	5	1 día, diluyente vacunal	No	No
D	1 ²	10	1 día, aspersion	No	48 días, ocular
	2	5	1 día, diluyente vacunal	No	48 días, ocular
	3	5	1 día, diluyente vacunal	No	No

¹ Aves vacunadas a media dosis, con una vacuna de la cepa Mass, con título $10^{3.2}$, revacunadas a dosis completa con una vacuna bivalente (cepa Mass y la Sota) con título $10^{3.5}$.

² Aves vacunadas a media dosis, con una vacuna de la cepa Mass, con título $10^{5.45}$.

* Cepa virulenta Massachusetts 41 con título de $10^{4.0}$ DIEP₅₀/ml.

Sacrificio y toma de muestras 5 días posteriores al desafío. Las aves de los grupos testigos sin desafiar fueron sacrificadas a la misma edad que el grupo testigo desafiado de la misma explotación.

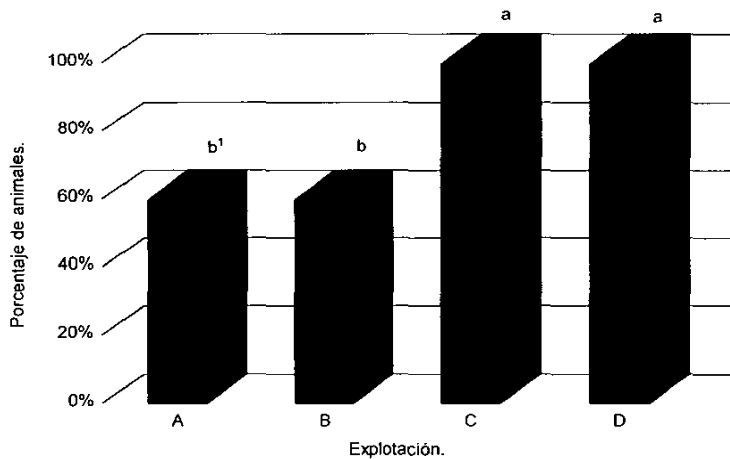
Cuadro 2. Criterios de evaluación histológica de las aves con 4 programas vacunales diferentes.

Calificación	Pérdida de cilios	Metaplasia escamosa	Linfocitos	Necrosis	Heterófilos
1. SCS*	0-10 ¹	0-10 ¹	0-1 ²	0-5 ²	0-2 ²
2. Leve	11-40	11-40	2-5	6-37	3-8
3. Moderado	41-70	41-70	6-9	38-69	9-14
4. Severo	71 ó más	71 ó más	10 ó más	70 ó más	15 ó más

¹ Porcentaje de mucosa y submucosa con lesión. ² Promedio de células.

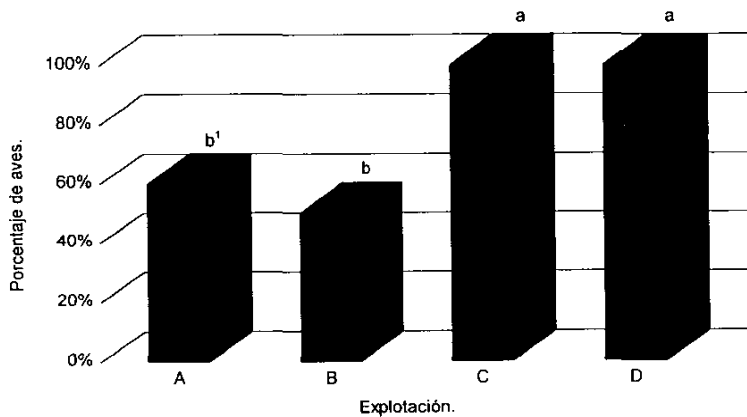
*SCS = sin cambios significativos.

Gráfica 1. Porcentaje de tráqueas con necrosis de los grupos 1 de las diferentes explotaciones.



¹Literales distintas demuestran diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Gráfica 2. Porcentaje de tráqueas con infiltrado linfocitario de los grupos 1 de las diferentes explotaciones.



¹Literales distintas demuestran diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Cuadro 3. Prueba de potencia de 4 explotaciones de aves con diferentes programas de vacunación.

Explotación	Aislamientos positivos / total de aves	Protección
A ^a	0/10	100%
B ^a	0/10	100%
C ^b	9/10	10%
D ^b	9/10	10%

Literales distintas demuestran diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).