



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE LA RESPUESTA INMUNE  
DE POLLOS DE ENGORDE EN CONDICIONES DE CAMPO A  
UN PROGRAMA NO CONVENCIONAL DE VACUNACIÓN  
CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA**

**Paulina Alejandra Torres Celpa**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Patología Animal

PROFESOR GUÍA: HECTOR HIDALGO OLATE. M.V., M.Sc.

SANTIAGO, CHILE  
2018



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE LA RESPUESTA INMUNE  
DE POLLOS DE ENGORDE EN CONDICIONES DE CAMPO A  
UN PROGRAMA NO CONVENCIONAL DE VACUNACIÓN  
CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA**

**Paulina Alejandra Torres Celpa**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Patología Animal

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA: HÉCTOR HIDALGO	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: PATRICIO RETAMAL	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: ANA MARÍA RAMIREZ	.....	.....

SANTIAGO, CHILE

2018

## DEDICATORIA

*A mi familia  
A mi hijo  
A Eduardo  
A la Universidad de Chile*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradezco a mis padres, Enrique y Julia, que siempre me han apoyado en todos los caminos que he elegido, entregado su guía y amor. A mi familia por tener una palabra de apoyo en los momentos que la he necesitado. A Eduardo por apoyarme en este proceso y ser mi compañero incondicional. A mi hijo Vicente, por el cual me esfuerzo cada día en ser una mejor mamá y modelo a seguir.

A mi profesor guía, Dr. Héctor Hidalgo, quien me ha guiado por el camino académico y profesional, además del cariño entregado durante estos años. A mis profesores consejeros, Dr. Patricio Retamal y Dra. Ana María Ramírez por su tiempo entregado.

A toda la gente del laboratorio, a quienes puedo llamar amigos, entregándome su apoyo y compañía durante este proceso y gracias a ellos este proceso fue inolvidable. Monchito, Pao, Vale, Feña, Sofi, Macolo, Cony, Rai, Alfredo, Pipe, Dani Marchant, Caro, Maca, Ramón, Dani Miranda, Sole, Miguel y a todos los que fueron parte de este laboratorio.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
1. Virus de la Bronquitis Infecciosa.....	5
1.1. Etiología y clasificación.....	5
1.2. Estructura del virus .....	5
2. Patogénesis.....	6
3. Signos Clínicos .....	6
4. Inmunidad .....	8
5. Epidemiología.....	10
6. Mutabilidad del virus y clasificación de cepas .....	10
7. Situación mundial y nacional.....	12
7.1. Situación mundial .....	12
7.2. Situación nacional.....	14
8. Métodos de Diagnóstico .....	15
8.1. Aislamiento viral.....	15
8.2. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa .....	16
8.3. Técnicas serológicas .....	17
9. Evaluación de la respuesta inmune.....	17
10. Prevención y Control .....	19
OBJETIVOS .....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos .....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
1. Aves en estudio y plan de vacunación .....	22
2. Tipo, número y tratamiento de las muestras de trabajo .....	22
3. Medición de anticuerpos vacunales mediante ELISA .....	25
4. Presentación de resultados .....	27
RESULTADOS .....	28
1. Títulos de anticuerpos de los grupos de campo .....	28
2. Títulos de anticuerpos de los grupos experimentales .....	32

3. Comparación de Grupos vacunados y no vacunados.....	36
DISCUSIÓN .....	38
CONCLUSIONES .....	43
BIBLIOGRAFÍA .....	44
ANEXOS .....	48

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla N° 1:</b> Programa de vacunación contra Bronquitis Infecciosa y obtención de muestras para evaluar respuesta serológica de pollos de engorde comerciales.....	24
<b>Tabla N° 2:</b> Programa de vacunación contra Bronquitis Infecciosa y obtención de muestras para evaluar respuesta serológica de pollos de engorde experimentales.....	25
<b>Tabla N° 3:</b> Medias geométricas y Coeficientes de variación de títulos de anticuerpos a los 14 días de edad con una vacuna Ma5 (1) aplicada al día de edad en seis grupos de pollos de engorde bajo condiciones comerciales.....	29
<b>Tabla N° 4:</b> Medias geométricas y Coeficientes de variación de títulos de anticuerpos a los 28 días de edad con una vacuna Ma5 (1) aplicada al día de edad y una vacuna 4/91 (2) aplicada a los 14 días de edad en seis grupos de pollos de engorde bajo condiciones comerciales.....	30
<b>Tabla N° 5:</b> Medias geométricas y Coeficientes de variación de títulos de anticuerpos a los 35 días de edad con una vacuna Ma5 (1) aplicada al día de edad y una vacuna 4/91 (2) aplicada a los 14 días de edad en seis grupos de pollos de engorde bajo condiciones comerciales. ....	32
<b>Tabla N° 6:</b> Medias geométricas y Coeficientes de variación de títulos de anticuerpos a los 14 días de edad con una vacuna Ma5 aplicada al día de edad en dos grupos de pollos de engorde bajo condiciones experimentales.....	33
<b>Tabla N° 7:</b> Medias geométricas y Coeficientes de variación de títulos de anticuerpos a los 28 días de edad con una vacuna Ma5 aplicada al día de edad y una vacuna 4/91 (2) aplicada a los 14 días de edad en dos grupos de pollos de engorde bajo condiciones experimentales.....	34
<b>Tabla N° 8:</b> Medias geométricas y Coeficientes de variación de títulos de anticuerpos a los 35 días de edad con una vacuna Ma5 aplicada al día de edad y una vacuna 4/91 (2) aplicada a los 14 días de edad en dos grupos de pollos de engorde bajo condiciones experimentales.....	35
<b>Tabla N° 9:</b> Resultados de la prueba de Tukey al comparar las medias aritméticas de los títulos de anticuerpos al día 35 días de edad de seis grupos de campo y un grupo experimental, vacunados al día de edad con la vacuna Ma5 (1) y a los 14 días de edad con la vacuna 4/91 (2), y de un grupo experimental no vacunado.....	37

## RESUMEN

Con el objetivo de realizar una evaluación serológica de la respuesta inmune de pollos de engorde en condiciones de campo frente un programa no convencional de vacunación contra Bronquitis Infecciosa con dos vacunas de serotipos diferentes, se realizaron muestreos para obtener sueros de aves vacunadas con la cepa Ma5 del virus de la Bronquitis infecciosa al día de edad y una vacuna de la cepa 4/91 a los 14 días de edad para detectar anticuerpos a través de la técnica de ELISA.

Para esto se muestrearon seis grupos (de 20 pollos cada uno) de aves comerciales en condiciones de campo a los días 14, 28 y 35 de edad en cada día, además de utilizar dos grupos en condiciones experimentales, uno bajo el mismo protocolo no convencional de vacunación y el segundo grupo como control negativo (sin vacunas) muestreados en los mismos días y la misma cantidad de individuos. Además, se muestrearon 20 pollos al día de edad para determinar el nivel de anticuerpos maternos.

El resultado de los títulos de anticuerpos fue una baja considerable en el día 14 de edad (dos semanas post vacunación) en comparación a los títulos de anticuerpos maternos, con un leve aumento en el día 28 de edad (4 semanas post primera vacunación y dos semanas post segunda vacunación), y con un mayor aumento en el día 35 presentándose todas las medias geométricas positivas, excepto por el grupo Control negativo experimental.

Se determinó la existencia de diferencias significativas entre los grupos en el día 35 de muestreo a través de la prueba de ANOVA para luego identificar a través de la prueba de Tukey entre cuáles grupos había diferencias, observándose que el grupo Control negativo experimental se diferencia del resto y el grupo Experimental vacunado no presenta diferencias significativas con la mayoría de los grupos de campo.

**Palabras claves:** Bronquitis infecciosa, anticuerpos, ELISA.



## **ABSTRACT**

In order to perform a serological evaluation of the immune response of broilers in field conditions using an unconventional program of vaccination against Infectious Bronchitis with two vaccines of different serotypes, samples were taken to obtain sera from birds vaccinated with the Ma5 strain of infectious bronchitis virus at day of age and a vaccine of the strain 4/91 at 14 days old to detect antibodies through the ELISA technique.

For this, six groups (of 20 chickens each) of commercial birds were sampled under field conditions on days 14, 28 and 35 old, for each day, in addition two groups were used under experimental conditions, one under the same protocol of non conventional vaccination and the second group as negative control (without vaccines) sampled in the same days and the same number of individuals per group were used. In addition, 20 chickens were sampled at one day old to determine the level of maternal antibodies.

The result of the antibody titres showed a considerable decrease on 14 day old (two weeks post vaccination) compared to the maternal antibody titers, with a slight increase on 28 day old (4 weeks post first vaccination and two weeks post second vaccination), and with a greater increase on 35 day old showing all groups positive averages, except for the experimental negative control group.

We determined the existence of significant differences between the groups on day 35 of sampling through the ANOVA test and then identify through the Tukey test between which groups there were differences, observing that the experimental negative control group is different from the rest and the Experimental vaccinated group does not present significant differences with most of the field groups.

**Keywords:** Infectious bronchitis, antibodies, ELISA.

## INTRODUCCIÓN

La Bronquitis Infecciosa (BI) es una enfermedad viral altamente contagiosa de la especie *Gallus gallus* (pollos, gallinas ponedoras, reproductoras). Es probablemente la enfermedad respiratoria viral con mayor importancia económica en regiones donde existe producción avícola (Cook *et al.*, 2012).

En pollos de engorda se observan principalmente signos respiratorios, los cuales pueden agravarse con infecciones secundarias (Cavanagh y Gelb, 2008). Si son afectados por cepas nefropatogénicas de BI se puede observar nefritis en diferentes grados (Cavanagh, 2007).

El primer aislamiento del virus causal fue del serotipo Massachusetts (Mass) en 1941 (Cavanagh y Gelb, 2008), aunque a través del tiempo han emergido numerosos serotipos o variantes en un mismo o diferente país o región, debido a la capacidad mutagénica del virus (Jackwood, 2012). En Chile, se reportó el primer aislamiento de BI del serotipo Mass en 1975 (Hidalgo *et al.*, 1976), y en 1985, Hidalgo *et al.* (1986) reportó las primeras variantes del virus. A pesar de la gran diversidad de serotipos y genotipos de VBI, el serotipo Mass sigue siendo el más prevalente a nivel mundial (Rivas, 2010).

En Chile, el 100% de las aves comerciales de la especie *Gallus gallus* son vacunadas, pero aun así se han presentado casos de la enfermedad (Hidalgo, 2000). Asumiendo que las cepas de BI prevalentes en Chile eran del serotipo Mass, las únicas vacunas autorizadas en Chile por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) hasta el año 2011, eran las provenientes de dicho serotipo, tanto de formas atenuadas como inactivadas (programa convencional). El año 2009 se presentaron brotes de la enfermedad, que afectó a la industria chilena en su totalidad. Las cepas aisladas eran similares a la cepa Q1 (descrita en China), y presentaban una distante relación genotípica con otros serotipos comunes como Mass, QX y 4/91 (Rivas, 2010).

La permanente aparición de cepas variantes o nuevos serotipos del VBI, técnicamente no hacen posible elaborar vacunas con cepas homólogas para el control de estos nuevos VBI. Por ello se ha desarrollado el concepto de “protectotipo”, ya que se ha demostrado que combinando algunas cepas vacunales de serotipos diferentes a los nuevos VBI de campo, protegen a las aves de éstos últimos (De Wit *et al.*, 2011).

Debido a las cuantiosas pérdidas producidas por BI a la avicultura chilena, y a que la vacuna serotipo Mass no protegía contra estas cepas variantes chilenas, se decidió realizar un estudio de protección cruzada (en el Instituto GD en Deventer, Holanda), utilizando las vacunas del serotipo Mass y del serotipo 4/91 al día y a los 14 días de edad, respectivamente. Al realizar este programa de vacunación no convencional, se llegó a la conclusión que estas vacunas administradas en el orden indicado otorgaban una mejor protección contra el desafío con cepas variantes chilenas en aves experimentales. La vacuna 4/91 fue aprobada en el año 2011 para su uso en Chile, bajo una resolución especial SAG, para su aplicación restringida en algunos planteles (De Wit *et al.*, 2017).

A pesar de haberse aplicado este programa vacunal en terreno durante casi seis años, no existe una evaluación objetiva, sistemática y pública de la respuesta inmune de las aves comerciales frente a este programa de vacunación no convencional; debido a esto, se realizó un estudio en pollos de engorde en condiciones de campo, el que tuvo como objetivo, evaluar a través de serología la respuesta inmune a este programa de vacunación.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1. Virus de la Bronquitis Infecciosa**

#### **1.1. Etiología y clasificación**

El virus de la Bronquitis Infecciosa (VBI) pertenece al género *Gammacoronavirus* (o grupo 3), subfamilia *Coronavirinae*, familia *Coronaviridae*, orden *Nidovirales* (Gelb, 2013). La familia *Coronaviridae* incluye dos subfamilias, *Coronavirinae* y *Torovirinae*. Dentro de la subfamilia *Coronavirinae* hay tres géneros: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus* y *Gammacoronavirus*. Los *Alfacoronavirus* y *Betacoronavirus* son virus de mamíferos, mientras que los *Gammacoronavirus* incluyen a los coronavirus aviares VBI y coronavirus de los pavos (TCoV) (Jackwood y De Wit, 2013), así como otros coronavirus aislados de otras especies aviares como coronavirus del faisán (PhCoV), coronavirus del ganso (GCoV), coronavirus del pato (DCoV), coronavirus de la paloma (PiCoV) (Cavanagh y Gelb, 2008).

#### **1.2. Estructura del virus**

VBI es un virus RNA, hebra simple, no segmentado, sentido positivo de 27,6 Kb, envuelto, pleomórfico, con un diámetro promedio de 120 nm aproximadamente (Cavanagh, 2007), con glicoproteínas de superficie (proteína S) de 20 nm de longitud, las que le dan la forma parecida a una corona (Jackwood y De Wit, 2013).

Los viriones poseen proteínas estructurales: glicoproteínas de superficie (S, porción S1 con 520 y S2 con 625 aminoácidos, respectivamente), glicoproteínas de membrana (M, con 230 aminoácidos aproximadamente) y nucleoproteína interna (N, con 420 aminoácidos aproximadamente), además de una cuarta proteína, llamada proteína pequeña de membrana (E, con 100 aminoácidos aproximadamente), encontrada en pequeñas cantidades, las cuáles son esenciales para la formación de la partícula viral (Cavanagh y Gelb, 2008; Cavanagh, 2007). La proteína N envuelve el RNA viral para formar la nucleocápside helicoidal dentro del virión e interactúa con las proteínas M y E para el ensamblaje del virus (Jackwood y De Wit, 2013). La glicoproteína S es un dímero compuesto por la porción S1, la cual es responsable de la unión del virus a moléculas receptoras en la célula hospedero, y de la porción S2, responsable de la fusión de membrana del virión con la membrana de la célula hospedero y entrada a la célula (Cavanagh, 2007; Jackwood y De Wit, 2013). La proteína S

es la proteína más importante para la tipificación del virus, debido a que contiene los epítomos para los anticuerpos neutralizantes y serotipo específicos (Jackwood y De Wit, 2013).

## **2. Patogénesis**

La bronquitis infecciosa es una enfermedad primaria de pollos y gallinas. La patogenicidad del virus varía ampliamente entre cepas. El resultado clínico de la infección depende de muchas variables como la cepa viral, sexo y edad del ave, estatus inmune (vacunación, inmunosupresión y anticuerpos maternos), coinfección y factores ambientales como clima, polvo, amonio y estrés por frío (Jackwood y De Wit, 2013).

El virus replica y produce lesiones en diferentes células epiteliales, incluyendo aquellas del tracto respiratorio (cornetes nasales, glándula de Harder, tráquea y pulmones), riñones y órganos reproductivos. El virus además replica en células del tracto gastrointestinal como esófago, proventrículo, duodeno, yeyuno, bursa de Fabricio, tonsilas cecales, recto y cloaca; a menudo con un efecto patológico mínimo (Jackwood y De Wit, 2013).

El tracto respiratorio superior es el principal sitio de replicación de VBI, seguido por una viremia donde el virus se disemina ampliamente a otros tejidos (Raj y Jones, 1997). Los títulos virales llegan a su nivel máximo en este sector dentro de los tres primeros días de infección y permanecen de dos a cinco días posteriores (Cavanagh, 2007). El virus al replicar en las células epiteliales de pulmones y sacos aéreos, se observan los mayores títulos virales en estos tejidos entre los días 4 a 11 post infección (Raj y Jones, 1997).

Además de replicar en el tracto respiratorio, produciendo una enfermedad respiratoria, VBI puede replicar en riñones, lo cual está asociado a nefritis de diferentes grados (Cavanagh, 2007). La replicación viral se ha observado en los túbulos contorneados proximales y distales y los túbulos colectores (Raj y Jones, 1997). La virulencia de las cepas renales depende de la edad de la infección; en pollos jóvenes menores a dos semanas se observan nefritis más severas y mortalidades mayores que en pollos de mayor edad (Jackwood y De Wit, 2013).

## **3. Signos Clínicos**

Según Cavanagh y Gelb (2008), todas las edades son susceptibles a la infección, pero la enfermedad es más severa en pollitos, causando mortalidad. A medida que la edad aumenta,

también lo hace la resistencia a los efectos nefropatogénicos, lesiones del oviducto y mortalidad debido a la infección.

Los signos respiratorios no específicos de BI en pollos susceptibles son: jadeo, tos, estornudos, estertores traqueales y descarga nasal. Se pueden observar ojos húmedos y ocasionalmente se pueden presentar los senos inflamados. Los pollos se observan depresivos y acurrucados bajo una fuente de calor. El consumo de alimento y la ganancia de peso se ven muy reducidos. En pollos mayores de seis semanas de edad, los signos son menos claros, y la enfermedad puede pasar desapercibida a menos que el lote sea examinado cuidadosamente (Jackwood y De Wit, 2013). Los hallazgos a la necropsia incluyen, traqueítis, inflamación de los pulmones, engrosamiento y opacidad de los sacos aéreos (Cook *et al.*, 2012).

La infección con VBI aumenta la susceptibilidad a infecciones respiratorias secundarias o aumenta el daño causado por infecciones con patógenos primarios (Jackwood y De Wit, 2013), lo que puede ser la causa principal de la enfermedad más debilitante (Cavanagh, 2007). El daño causado al epitelio traqueal causado por VBI facilita la invasión y multiplicación de bacterias secundarias (Raj y Jones, 1997), especialmente en pollos de engorde, resultando en un aumento de mortalidad, depresión, aumento de la conversión alimentaria, uso de antibióticos y aumento en las tasas de decomiso. Esto se ha demostrado para agentes como *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma imitans* y *Avibacterium paragallinarum* (Jackwood y De Wit, 2013).

Algunas cepas de VBI pueden tener efectos nefropatogénicos causando nefritis aguda, urolitiasis y mortalidad. Después de una recuperación aparente, una nefritis crónica puede producir la muerte en una fase posterior (Gelb, 2013). Algunos pollos infectados con alguna de estas cepas parecieran recuperarse de la fase respiratoria y luego mostrar signos de depresión, plumaje erizado, excrementos húmedos y aumento en la ingesta de agua y mortalidad. Cuando se presenta urolitiasis asociada a VBI en ponedoras, puede haber un aumento en la mortalidad, o una aparente normalidad en el lote. En las lesiones postmortem se observan riñones inflamados y pálidos, con túbulos y uréteres comúnmente distendidos con uratos (Cavanagh y Gelb, 2008).

En ponedoras, se observa una disminución de la postura y en la calidad de los huevos. La caída en la postura varía ampliamente entre un 2% a 70% en los lotes afectados, y los huevos

podrían presentar una cáscara débil, trizada y deforme (Cook *et al.*, 2012), además de pálida, despigmentada y rugosa. La calidad interna del huevo puede disminuir, observándose la albúmina delgada y acuosa, sin una clara demarcación entre la albúmina gruesa y delgada en comparación a un huevo fresco normal. La magnitud de la baja de postura dependerá del periodo de postura en que se encuentre la gallina y la cepa actuante. Pueden pasar de seis a ocho semanas antes que la postura vuelva a su nivel normal, pero en algunos casos esto nunca se consigue. Otras consecuencias son que el número de huevos no comerciables aumentan y disminuye la incubabilidad, por lo que las pérdidas económicas se deben a estos ítems en el negocio de los huevos comerciales (Cavanagh y Gelb, 2008). En aves que no comenzaron su postura en el periodo esperado se evidenció la presencia de oviductos poco desarrollados y císticos, sin producción de huevos, aunque los ovarios se mantuvieran normales. Estas aves son denominadas falsas o silentes ponedoras (Cook *et al.*, 2012).

#### **4. Inmunidad**

La respuesta humoral y celular son importantes para el control de la infección, y cualquier desafío de campo que cause inmunosupresión predispone a las aves a la BI y a otras enfermedades respiratorias (Caron, 2010).

Tradicionalmente, la inmunidad innata era solo considerada importante en las etapas tempranas de la invasión viral, limitando la propagación del patógeno hasta que la respuesta adaptativa mediada por las células B y T se movilizarán para terminar con la infección. Pero en realidad, las respuestas innatas y adaptativas están altamente integradas. El sistema inmune innato tiene relación con la dirección de las respuestas adaptativas y también puede actuar como un expresor de la inmunidad adaptativa (Jackwood y De Wit, 2013).

La inmunidad innata es crucial para el control de infecciones de BI de campo y su activación temprana se basa principalmente en la acción del interferón-gamma como resultado de la acción de macrófagos, además de otras sustancias durante el proceso temprano de la inflamación (Caron, 2010).

La infección por VBI induce una respuesta innata en el tejido respiratorio a través de un aumento de la expresión de mRNA de TLR3 y TLR7, citoquinas pro inflamatorias e IFN

antivirales, y un aumento en el número de macrófagos infiltrativos tanto en pulmones como en tráquea (Kameka *et al.*, 2014).

Las células T citotóxicas son detectadas tres días luego de la infección y llegan a su máximo a los diez días. Durante ese periodo, la infección se resuelve normalmente y el virus es eliminado. Luego de eso, el número de linfocitos T citotóxicos cae junto al título viral en el sistema respiratorio y en los riñones. Dos semanas luego de la infección, el número de células no es suficiente para la protección del ave. Esto puede ser explicado por el alto costo metabólico de la respuesta, la cual se reduce debido a que ya no es necesaria (Caron, 2010).

Falta mucho por saber en este tema, pero ya se ha demostrado que VBI induce una diversidad de efectores locales innatos e inmunidad adaptativa basada en Th1 durante la etapa temprana de la infección, y que estos efectores inmunes son responsables de la rápida eliminación del virus desde la tráquea. Lectina de unión a la manosa, una molécula de reconocimiento innata de patrones de patógenos, juega un rol en la regulación de la inmunidad adaptativa a VBI (Jackwood y De Wit, 2013).

Ante una estimulación inmune los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas para secretar anticuerpos ya sea en presencia o ausencia de los linfocitos T CD4+. Esta respuesta inmune puede ser medida en el suero por las técnicas de ELISA, Inhibición de la hemoaglutinación y neutralización viral (Chhabra *et al.*, 2015a).

Los primeros anticuerpos pueden ser detectados en el suero y fluidos lacrimales entre la primera y segunda semana post infección. Sin embargo, el nivel de respuesta humoral depende de numerosas variables como edad a la inoculación, presencia de anticuerpos maternos, nivel de inmunidad al momento de la vacunación o infección, vía de inoculación, genética e inmunosupresión (Jackwood y De Wit, 2013).

En el suero se pueden detectar los anticuerpos IgA, IgG (IgY) e IgM, en el fluido lacrimal y en lavados traqueales IgA e IgG son los anticuerpos más detectados. Una parte importante de las IgA se originan en las glándulas de Harder e IgG se transportan mayormente de forma pasiva desde el suero. IgM solo está presente por un par de semanas luego de la infección o vacunación (Jackwood y De Wit, 2013).



## **5. Epidemiología**

El VBI presenta una distribución mundial y se han detectado una gran cantidad de serotipos y genotipos en todos los continentes. Varios serotipos pueden co-circular en una región dada; algunos de ellos pueden ser regionales o mundiales (Jackwood y De Wit, 2013).

El virus es altamente infeccioso (De Wit *et al.*, 2011) y se transmite a través de la inhalación o ingesta de partículas virales por contacto directo entre aves infectadas y susceptibles, por contacto indirecto a través de aerosol, heces u orina; y por exposición a fomites contaminados como vestimenta, calzado, herramientas (Jackwood y De Wit, 2013), utensilios para las aves de corral contaminados o el material de embalaje de huevos, visitas a las granjas etc. (Gelb, 2013). La generación de aerosoles desde el tracto respiratorio es una forma importante de transmisión debido a las altas cargas virales durante la fase aguda, diseminándose rápidamente el virus entre las aves de un lote (Jackwood y De Wit, 2013).

El periodo de incubación de VBI, es dependiente de la dosis infectante y puede ser tan corto como 18 horas para la inoculación intratraqueal y 36 horas para la aplicación ocular en condiciones experimentales. Aves susceptibles en contacto con aves enfermas desarrollan signos clínicos dentro de 24 a 48 horas. El virus se ha aislado consistentemente de tráquea, pulmones, riñones y bursa a las 24 horas y durante siete días luego de la exposición con aerosoles. La frecuencia del aislamiento de VBI declina con el tiempo y varía entre cepas (Cavanagh y Gelb, 2008).

La morbilidad es de un 100% en un lote, pero la mortalidad es variable, dependiendo de la virulencia del serotipo infectante, edad, estatus inmunitario, ya sea materna o activa, y estrés, como frío o una infección bacteriana secundaria. La mortalidad puede llegar a un 25% o más en pollos menores de seis semanas de edad y usualmente es despreciable en pollos mayores de seis semanas (Jackwood y De Wit, 2013). La mortalidad en casos de urolitiasis puede ser de 0,5% a 1% semanal (Cavanagh y Gelb, 2008).

## **6. Mutabilidad del virus y clasificación de cepas**

La gran cantidad de tipos, subtipos y variantes de VBI se deben al alto grado de diversidad genética que ocurre por la alta tasa de eventos de mutación y recombinación. Las mutaciones incluyen sustituciones, las cuales son resultado de una alta tasa de error y una capacidad

limitada de autocorrección del RNA viral por la polimerasa dependiente de RNA, además de inserciones y deleciones causadas por eventos de recombinación. La recombinación en el gen de la glicoproteína S puede resultar en la emergencia de nuevas cepas o serotipos del virus (Jackwood y De Wit, 2013).

El sistema de clasificación de las variantes del virus, según De Wit (2000), se divide en dos grupos: pruebas funcionales, que consideran las funciones biológicas del virus (serotipos y protectotipos); y pruebas no funcionales, con relación al genoma viral (genotipos):

- Inmunotipos o Protectotipos: se mide la respuesta inmune completa del ave contra una cepa de VBI. Agrupar cepas en grupos llamados protectotipos es el sistema de clasificación más importante del punto de vista práctico, porque entrega información directa acerca de la eficacia de una vacuna. Cepas que inducen protección entre ellas pertenecen al mismo protectotipo. Para determinar el protectotipo de una cepa se requiere realizar un estudio de inmunización cruzada, la que conlleva un trabajo intenso, de alto valor, utiliza un gran número de aves e instalaciones aisladas.

- Serotipos: la serotipificación se basa en una reacción entre una cepa y anticuerpos serotipo específico para VBI. Serotipificar resulta menos práctico a medida que más tipos de VBI son detectados en una cierta área, ya que cada serotipo necesita su propia prueba de neutralización, y para nuevas cepas que parecen ser diferentes se debe preparar un antisuero en aves SPF (*Specific Pathogen Free*, Libre de Patógenos Específicos), por lo que la factibilidad de la serotipificación se ve disminuida por la gran cantidad de variantes.

- Genotipos: son grupos de cepas basadas en la caracterización genética del (o una parte del) genoma, resultando en genotipos. La información genómica es objetiva y entrega información esencial para estudios epidemiológicos. Generalmente, se utiliza la porción del genoma que codifica la subunidad S1 de la proteína de superficie para genotipificar, siendo esta porción la mayor inductora de inmunidad protectora y posee la mayor cantidad de epítomos virus neutralizante.

Debido a la extensa cantidad de variantes existentes y que siguen emergiendo, Valastro *et al.* (2016) realizaron un estudio para evaluar las relaciones filogenéticas entre variantes de VBI y desarrollar un sistema armónico para definir y nombrar el linaje viral, por lo que

analizaron todas las secuencias completas del gen S1 disponibles en GenBank. Se estudiaron 1652 secuencias de nucleótidos obtenidos de muestra de campo y de cepas vaccinales recolectadas a nivel mundial entre los años 1937 y 2013. Al construir el árbol filogenético, las muestras fueron clasificadas en seis grandes grupos, llamados genotipos (GI a GVI), donde en el primero de ellos se agrupan la mayoría de las cepas conocidas, y luego este primer genotipo se divide en 27 linajes, donde la cepa Mass corresponde al grupo GI-1 y la cepa 4/91 corresponde al grupo GI-13.

## **7. Situación mundial y nacional**

La BI presenta una distribución mundial y a pesar de la gran diversidad de serotipos y genotipos, el serotipo Mass sigue siendo el más prevalente a nivel mundial, incluyendo Chile, siendo ésta la razón de que la única vacuna autorizada hasta el año 2011 haya sido de este serotipo (Rivas, 2010; Bande *et al.*, 2017; Valastro *et al.*, 2016).

### **7.1. Situación mundial**

Las cepas tipo Mass se han aislado en Europa, América y Asia desde los años 40' hasta el presente, sin embargo, en los Estados Unidos se han identificado cepas diferentes a la cepa Mass desde los años 50' (Cavanagh y Gelb, 2008; Bande *et al.*, 2017; Valastro *et al.*, 2016).

En los últimos cuarenta años, una gran cantidad de variantes de BI han aparecido y desaparecido, pero unas pocas se han mantenido en la industria avícola por un largo periodo (Cook *et al.*, 2012).

El serotipo Arkansas fue descrito el año 1972, el cual afectó a pollos de engorde produciendo signos respiratorios (Fields, 1973), y hasta la fecha sigue siendo aislado con mayor frecuencia en Estados Unidos. Otros serotipos comúnmente detectados son Delaware, Connecticut, California, Georgia y Massachussets (Jackwood, 2012; Cook *et al.*, 2012; Toro *et al.*, 2014).

Actualmente en China se han reconocido nueve grupos genéticos: LX4, LDT3, LHLJ, BJ, LDL, N1/62 y LSC, como también virus tipo Mass y 4/91. Los dos serotipos más importantes en China son QX en el grupo LX4 y Q1 en el grupo LDL; su importancia radica en su patogenicidad y amplia distribución (Jackwood, 2012).

El serotipo QX, fue identificado en 1996, el cual se asoció a traqueítis, nefritis severa, disminución de la postura, falsas ponedoras y proventriculitis. Presenta una alta mortalidad debido a su capacidad nefropatogénica. Desde el año 2001 se reporta en Europa (Jackwood, 2012).

El serotipo Q1 fue identificado entre el año 1996 y 1998, el cual se asoció a signos respiratorios y proventriculitis. Desde su caracterización inicial, se han reportado virus similares a Q1 en Taiwán, Italia, Colombia y Chile (Cook *et al.*, 2012; Jackwood, 2012).

En Europa se han reportado cepas del serotipo Mass, como también cepas propias de Inglaterra y Holanda. El serotipo conocido como 793B, 4/91 o CR88 (793B/4/91/91) (Jackwood, 2012) fue identificado por primera vez en el Reino Unido y Francia, con una patología atípica, ya que provocó mortalidad en reproductoras, diarrea en pollos de engorde y una posible miopatía en condiciones de campo. Se encuentra en varias partes del mundo, excepto Estados Unidos (Cook, *et al.*, 2012). En los años 2012 y 2013 este serotipo fue el más detectado en Canadá, representando un 56.7% de los casos clínicos (Martin *et al.*, 2014).

Los últimos reportes de VBI en Centroamérica incluyen Conn, Mass y MX/47/UNAM/01 (Jackwood, 2012).

En Sudamérica uno los trabajos más recientes se han realizado en Chile (Chile/12103b/09, HM446012) y Colombia. Hay reportes no publicados de aislados de Arkansas en esta región (Jackwood, 2012).

En Brasil se han reportado tres tipos únicos: BR1, BR2 y BR3, además de virus similares al tipo Europeo 4/91 y tipo Mass (Jackwood, 2012).

Maradino *et al.*, 2015 realizaron un análisis filogenético basado en la porción S1 de cepas sudamericanas, agrupándolas en tres clados: Sudamérica I (SAI), compuesto por 24 cepas propias de Argentina, Brasil y Uruguay; Asia/Sudamérica II (A/SAII), compuesto por cepas principalmente de Argentina y cepas asiáticas relacionadas a CK/CH/LDL/97I-type y genotipos relacionados a Massachusetts.

## 7.2. Situación nacional

En Chile, el primer diagnóstico clínico de BI se realizó en la década del 60'. El cuadro patológico se presentó como la enfermedad clásica en gallinas no vacunadas, con signos y síntomas respiratorios, caída en la postura y alteración en la calidad de la cáscara (García y Norambuena, 1969).

En 1976 se reporta en el país el primer asilamiento de VBI desde pollos de engorde no vacunados de seis semanas de edad presentando fuertes síntomas respiratorios. La cepa fue denominada 6416 y en pruebas de inmunodifusión en gel de agar, dio reacciones positivas a los serotipos Mass y Conn (Hidalgo *et al.*, 1976).

En 1982, se describe el aislamiento de VBI a partir de un lote de pollos que cursaban con un síndrome nefritis nefrosis. Al realizar pruebas de seroneutralización de diversos serotipos como Mass, Conn, Iowa 97, Iowa 609, Gray y JMK, los resultados demostraron que el aislado correspondía a un serotipo distinto a los descritos hasta ese momento en el país, esta cepa se denomina actualmente G-85 (Hidalgo, 2000).

Hidalgo *et al.* (1986) estudiaron las relaciones antigénicas a través de la prueba de seroneutralización de tres aislados chilenos obtenidos de aves vacunadas con el serotipo Mass. Éstos fueron comparados con serotipos de referencia como Mass, Holte y Gray. Los aislados demostraron marcadas diferencias antigénicas con las cepas de los serotipos estudiados.

En 1989 se comunica la evidencia serológica de algunos lotes de aves positivos al serotipo europeo D 207 (Hidalgo, 2000).

En 1991, Cubillos *et al.* (1991) describen 9 aislados en Chile. A través de la prueba de seroneutralización donde se probaron serotipos de diferentes países, además de los clásicos; se determinó que cuatro de los aislados pertenecían al serotipo Mass y uno a Conn., pero no se pudo determinar el serotipo de los cuatro aislados restantes, denominados Austral 3, 4, 5, 12 y 14.

Waldemar (2008), realizó una secuenciación nucleotídica de dos aislados de campo chilenos, Austral 5 y Austral 14. Se logró establecer un porcentaje de identidad de sólo 63% entre los

aislados de campo y la cepa Mass, mientras que entre Austral 5 y Austral 14 se estableció un porcentaje de identidad de un 94%, indicando que los aislados de campo no corresponden a la cepa tipo Mass, y ubica a los aislados de campo analizados en la categoría de variantes de IBV no relacionadas a cepas de referencia o vacunas. La reconstrucción filogenética de Austral 5 y Austral 14 ubica a estos dos aislados en un grupo nuevo, distanciado por más de 100 pares de bases de las cepas referenciales de IBV.

Durante el año 2009, se presentó en el país un brote de BI afectando la población de pollos de engorda y gallinas ponedoras, a pesar de estar vacunados con la cepa Mass. De estos casos clínicos, Rivas (2010), identificó y caracterizó nueve aislados de casos chilenos de VBI a través de RT-PCR y posterior secuenciación. Basados en el análisis filogenético, estos aislados fueron definidos como “variantes” al serotipo Mass y genotípicamente similares a la cepa de origen chino Q1 (98% aprox.), y una baja relación genotípica con serotipos comunes como Mass (81% aprox.), QX (82% aprox.) y 4/91 (82% aprox.).

Maradino *et al.* (2015) determinó que algunas cepas del clado Asia/Sudamérica II (A/SAI) se han encontrado en Chile y Colombia, no así en Brasil. La cepa asiática descrita en este grupo pertenece al gran grupo chino LDL, perteneciendo a él de igual manera la cepa Q1, siendo estos resultados similares a lo descrito en esta sección por otros autores.

## **8. Métodos de Diagnóstico**

El diagnóstico de VBI se basa en el historial clínico, lesiones, seroconversión o aumento en los títulos de anticuerpos específicos, aislamiento viral y detección de RNA viral. El diagnóstico debería incluir identificación del serotipo o genotipo del virus, debido a la gran variación mostrada por el virus (Cavanagh y Gelb, 2008).

### **8.1. Aislamiento viral**

Las muestras ideales son tórulas traqueales o tejido traqueal fresco, especialmente dentro de la primera semana de infección. Los títulos virales en estos tejidos alcanzan su máximo nivel a los tres a cinco días post infección, luego comienzan a declinar rápidamente. Riñones y tonsilas cecales son muestras de utilidad pasada la semana de infección. (Jackwood y De Wit, 2013)

Las muestras para aislamiento viral son inoculadas comúnmente en huevos embrionados de 9 a 10 días de incubación o en cultivos de órganos traqueales. El líquido alantoideo de los huevos embrionados debe recolectarse luego de 48 a 72 horas y las muestras deben recibir al menos tres a cuatro pasajes ciegos antes de determinarlos como negativos al no observar lesiones características o muerte en los embriones. Al aumentar el número de pasajes, se observan lesiones características, como enanismo y encorvamiento del embrión y sus patas; y el aumento de la mortalidad embrionaria; además se aprecian uratos en los mesonefros de los riñones embrionarios. Estas lesiones no son patognomónicas de VBI, ya que también se observan en embriones infectados con adenovirus aviar (Jackwood y De Wit, 2013).

El cultivo de órganos traqueales resulta muy útil para el aislamiento, titulación y serotipificación de VBI, debido a que no requiere de adaptación de las cepas para su crecimiento e inducción de la ciliostasis, la cual puede observarse desde el pasaje inicial. Luego de la infección con VBI, la ciliostasis se puede observar dentro de 3 a 4 días por microscopía óptica. La ciliostasis puede ser inducida por otros agentes además de VBI (Jackwood y De Wit, 2013).

Estas pruebas no son suficientes por sí solas para confirmar la presencia del virus, el cual debe confirmarse por métodos serológicos, inmunohistoquímica, análisis de ácidos nucleicos o microscopía electrónica (Jackwood y De Wit, 2013).

## **8.2. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.**

La técnica de Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) ha sido utilizada para identificar la presencia viral directamente sobre material de aves infectadas o luego de la amplificación del virus en huevos embrionados. La identificación del tipo de VBI al que corresponde la muestra, debe realizarse a través del análisis de amplicones del gen S1.

La secuenciación de los nucleótidos del gen S1 es la técnica más usada para la diferenciación de VBI. La comparación y análisis entre secuencias de aislados de campo desconocidos y variantes con cepas de referencia para establecer su relación potencial, son ventajas significativas de la secuenciación (Jackwood y De Wit, 2013).

### **8.3. Técnicas serológicas**

La demostración de un aumento de los títulos de anticuerpos contra VBI entre sueros preclínicos y convalecientes, es usada para diagnosticar la infección. Todos los serotipos de VBI tienen epítomos comunes (antígenos grupo específicos), probablemente debido a una moderadamente alta identidad en la secuencia de aminoácidos dentro de las proteínas M y N y las regiones conservadas de la proteína S2 (Jackwood y De Wit, 2013).

Actualmente la prueba serológica de mayor uso es la prueba de ELISA, debido a que es una prueba de bajo costo y puede ser utilizada para analizar un gran número de muestras en un corto periodo. Hay disponibles en el mercado *kits* comerciales, los cuales detectan anticuerpos (IgG generalmente) luego de una semana post infección (Jackwood y De Wit, 2013).

### **9. Evaluación de la respuesta inmune**

La respuesta inmune puede ser evaluada a través de los niveles de anticuerpos producidos luego de una o más inmunizaciones, los cuales pueden ser medidos por la técnica de ELISA (Gelb, 2013).

Se utilizan *kits* comerciales de ELISA, que permiten la medición de anticuerpos circulantes producidos frente a programas vacunales o desafíos de campo con diferentes cepas del VBI (Gelb, 2013; Borne y Comte, 2001). La prueba de ELISA para la detección de IBV no diferencia entre anticuerpos inducidos por cepas de distintos serotipos (Cavanagh y Gelb, 2008).

Diversos autores han estudiado la respuesta inmune humoral en sus trabajos, generalmente realizando pruebas experimentales en pollos para observar el comportamiento de los títulos de anticuerpos en respuesta a la utilización de diferentes programas vacunales, como los siguientes ejemplos:

Chhabra *et al.* (2015b) evaluaron la respuesta inmune mediante un kit comercial de ELISA Indirecto de la marca IDEXX, de tres grupos experimentales de pollos de engorda de 5 pollos cada uno. El grupo 1 fue vacunado al día de edad con una cepa vacunal H120 (serotipo Mass) y a los 14 días de edad con una cepa vacunal 4/91. El grupo 2 fue vacunado al día de edad



con una cepa vacunal H120 y una cepa vacunal 4/91 simultáneamente, y a los 14 días de edad fue vacunado con una cepa vacunal 4/91. El grupo 3 fue el control negativo (sin vacunas). Al día 1 el resultado promedio de los títulos de anticuerpos de los tres grupos fue de 1750. Los títulos de anticuerpos promedio al día 4 de edad fueron los siguientes: grupo 1 (1400), grupo 2 (1450), grupo 3 (1500). Al día 7 de edad los títulos de anticuerpos promedios fueron los siguientes: grupo 1 (550), grupo 2 (500), grupo 3 (450). Al día 14 de edad los títulos de anticuerpos promedios fueron los siguientes: grupo 1 (300), grupo 2 (280), grupo 3 (270). Al día 21 de edad los títulos de anticuerpos promedios fueron los siguientes: grupo 1 (600), grupo 2 (520), grupo 3 (150). Finalmente, al día 28 de edad los títulos de anticuerpos promedios fueron los siguientes: grupo 1 (630), grupo 2 (850), grupo 3 (180). Los autores concluyen que la baja de anticuerpos desde el día 1 al día 14 se podría explicar por la neutralización parcial del virus vacunal por los anticuerpos maternos, con la consecuencia de una baja replicación del virus y lo que llevaría a una baja estimulación de la respuesta humoral. El aumento de anticuerpos desde el día 21 se debería al estímulo humoral producido por la segunda vacunación, y no hubo diferencias significativas entre los grupos 1 y 2 en los días 21 y 28 de edad.

Smialek *et al.* (2016) utilizaron un protocolo de vacunación en el cual inmunizaron tres grupos de 23 pollos de engorda cada uno y un cuarto grupo fue utilizado como control negativo (sin vacunas). El grupo 1 fue vacunado al día de edad con una cepa vacunal Ma5 (serotipo Mass), el grupo 2 fue vacunado con una cepa vacunal 4/91 al día de edad y el grupo 3 fue vacunado al día edad con una vacuna Ma5 y una vacuna 4/91 simultáneamente. Al día 14 el grupo 1 obtuvo un título de anticuerpos promedio de 310, el grupo 2 obtuvo un título de anticuerpos de 88 y el grupo 3 obtuvo un título de anticuerpos de 146 y el grupo no vacunado obtuvo un título de anticuerpos de 290. La segunda y última obtención de muestras fue a los 21 días de edad, en el cual el grupo 1 obtuvo un título de anticuerpos de 332, el grupo 2 obtuvo un título de anticuerpos de 353,4 y el grupo 3 obtuvo un título de anticuerpos de 550. Los títulos de anticuerpos de los cuatro grupos al día 14 fueron negativos (bajo el título de corte, 396) y los grupos vacunados no fueron diferentes estadísticamente del grupo control y ya al día 21 se puede observar un aumento de los títulos de anticuerpos en los grupos vacunados, pero solo siendo positivo el grupo 3 (inmunizado con ambas vacunas), por lo que

concluyen que el uso de dos vacunas heterólogas al día de edad produce un mayor títulos de anticuerpos que el uso de solo un tipo de vacuna.

## **10. Prevención y Control**

Aunque la bioseguridad estricta y trabajar con un sistema “todos dentro, todos fuera” son medidas de control esenciales, la vacunación es necesaria para aumentar la resistencia de las aves contra el desafío con cepas de VBI (De Wit *et al.*, 2011).

Las vacunas vivas atenuadas e inactivadas se producen a partir de cepas que son cultivadas en sacos alantoideos de embriones de pollos SPF o en cultivos celulares adecuados. El líquido resultante es purificado y titulado para comprobar la infectividad. Para las vacunas vivas el líquido es liofilizado y envasado; y en el caso de las vacunas inactivadas, éstas son mezcladas con aceite mineral de alto grado, para formar una emulsión a la cual se le agrega un preservante (Gelb, 2013).

Los pollos de engorde son vacunados comúnmente con una vacuna viva de VBI en la nacedora (al día de edad). Una segunda vacuna, del mismo o diferente serotipo, puede aplicarse a los 10 a 18 días de edad (Cavanagh y Gelb, 2008).

Ponedoras y reproductoras son vacunadas con una serie de 3 a 4 vacunas vivas atenuadas, y luego se aplica una vacuna inactivada entre la semana 10 y 18, antes del comienzo de la postura (Cavanagh y Gelb, 2008).

La vacuna viva atenuada puede ser aplicada a través de una gota en el ojo o en la nariz, por aspersión o por agua de bebida (De Wit *et al.*, 2011), también puede ser aplicada de manera intratraqueal. El método de aplicación que se utiliza comercialmente en la masa de aves incluye, “spray” de gota gruesa, aerosol y por agua de bebida (Cavanagh y Gelb, 2008).

La protección de las vacunas vivas es de corta duración, con el comienzo del descenso a las nueve semanas post vacunación aproximadamente (Cavanagh, 2007).

Las vacunas del serotipo Massachusetts (Mass) son usadas ampliamente en la mayoría de los países, en algunos de ellos es la única autorizada (De Wit *et al.*, 2011). Las vacunas del serotipo Mass (M41, H120, Ma5) son usadas ampliamente en la mayoría de los países. En Estados Unidos, las cepas correspondientes a los serotipos de Mass, Connecticut (Conn) y

Arkansas (Ark) son usadas extensamente; mientras que otros serotipos como DE072 son usados regionalmente. En algunos países europeos y asiáticos, utilizan cepas de los serotipos D274, D1466 y 4/91 (también conocida como 793/B y CR88), en conjunto con H120 y otras vacunas del tipo Mass. En algunos países de Asia se vacuna además con cepas locales. En Australia sólo son permitidas vacunas basadas en aislados locales (Jackwood y De Wit, 2013).

La finalidad de un programa de vacunación es cubrir el espectro antigénico de los aislados en un país o región particular. Cuando la vacunación con un solo serotipo no está entregando una protección suficiente contra las cepas de campo prevalentes, se podrían agregar vacunas de otros serotipos al programa. La ampliación de la protección puede ser alcanzada, añadiendo al programa vacunas homólogas a las cepas prevalentes de campo y/o utilizando una combinación de vacunas que permitan inducir una protección más amplia contra numerosas cepas (protectotipos) (Jackwood y De Wit, 2013).

Las vacunas utilizadas en este estudio son una vacuna viva de tipo Mass y 4/91. En Chile la vacuna de tipo 4/91 fue aprobada bajo una resolución SAG, por las razones entregadas anteriormente. La variante 4/91 sigue siendo un problema donde se encuentre presente, pero al parecer no ha cambiado en su estructura ni en su antigenicidad, por lo que las vacunas creadas a partir de esta cepa aún otorgan protección (Cook *et al.*, 2012).

Este protocolo de vacunación (Mass y 4/91, al día y a los 14 días de edad, respectivamente) ha sido probado por diversos autores (Terregino *et al.*, 2008; Cook *et al.*, 1999; Malo *et al.*, 1998), llegando a la conclusión que estas vacunas administradas en el orden indicado anteriormente son las que dan un mejor resultado de protección contra las cepas desafío utilizadas por los autores.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Realizar una evaluación serológica de la respuesta inmune de pollos de engorde en condiciones de campo frente un programa no convencional de vacunación contra BI con dos vacunas de serotipos diferentes.

### **Objetivos específicos**

- 1-. Evaluar los títulos de anticuerpos de pollos de engorde frente al programa de vacunación no convencional.
- 2-. Comparar los títulos de anticuerpos contra Bronquitis Infecciosa de pollos de engorde de diferentes sectores de un plantel de engorda, frente al mismo programa de vacunación.
- 3-. Comparar los títulos de anticuerpos contra Bronquitis Infecciosa de pollos de engorde comerciales y pollos de engorde experimentales frente al mismo programa de vacunación.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Aves en estudio y plan de vacunación**

Las muestras de campo se obtuvieron de una empresa ubicada en la Comuna de María Pinto, Región Metropolitana; dedicada a la engorda de pollos broiler, la cual cuenta con nueve sectores para estas labores. Los pollos son vacunados en la planta de incubación al día de edad con la vacuna del serotipo Mass (Nobilis IB Ma5<sup>®</sup>) mediante aspersión; y a los 14 días son vacunados en el galpón, con la vacuna del serotipo 4/91 (Nobilis IB 4/91<sup>®</sup>), la cual es administrada también por aspersión.

Considerando que este estudio se efectuó en pollos de engorde sometidos a manejos vacunales, sanitarios y ambientales de carácter comercial, se implementó un ensayo experimental, el cual se realizó en salas aisladas, por lo que se evitó el posible desafío de los pollos con virus de campo. Se utilizaron dos grupos de 20 pollos cada uno, del mismo origen que los pollos de engorde comerciales. Al grupo Experimental vacunado se le aplicó el protocolo de vacunación no convencional (vacuna serotipo Mass al día de edad y vacuna serotipo 4/91 a los 14 días de edad) y al grupo Experimental no vacunado no se le aplicó ninguna vacuna. En los grupos de campo y experimentales se obtuvieron las muestras de sangre a los mismos días de edad que los pollos del plantel comercial. Los grupos fueron alojados en salas aisladas del Galpón experimental del Laboratorio de Patología Aviaria de la Universidad de Chile.

### **2. Tipo, número y tratamiento de las muestras de trabajo**

Las muestras de sangre de los pollos comerciales se recolectaron de un lote de pollos (misma fecha de nacimiento), los cuales estaban alojados en un pabellón (en un sector determinado), según el programa de trabajo de la empresa. Las muestras de sangre de los pollos experimentales se recolectaron de los dos grupos de aves, alojados en salas aisladas del Galpón experimental del Laboratorio de Patología Aviaria de la Universidad de Chile.

Las muestras se obtuvieron de 20 pollos elegidos al azar, basados en los trabajos de Borne y Comte (2001), Jove (2004) y Jackwood *et al.*, (2007), para la obtención de sueros los días 14, 28 y 35 de edad. Los anticuerpos IgG anti-IBV pueden ser detectados en el suero luego de 4 días post inoculación, alcanzando su máximo a los 21 días post inoculación,

manteniéndose en esos niveles por varias semanas (Mockett y Darbyshire, 1981), por lo que la mayoría de los trabajos busca anticuerpos desde la semana post inoculación en adelante. Según Jackwood y De Wit (2013) los títulos de anticuerpos se pueden detectar entre la primera y segunda semana post inoculación. Debido a estos antecedentes, los títulos de anticuerpos fueron medidos en los días elegidos, observándose la tendencia de ellos durante la vida productiva de los pollos de engorde (la faena se realiza aproximadamente a los 45 días).

El muestreo de las aves comerciales se efectuó en seis lotes de pollos con nacimientos consecutivos (aproximadamente una semana de intervalo). De esta manera se obtuvieron muestras de seis sectores diferentes (Tabla 1). Además de las muestras obtenidas de los dos grupos de pollos experimentales (Tabla 2).

Se obtuvieron muestras de 20 pollos no vacunados al día 1 de edad para observar la respuesta inmune pasiva, ya que las reproductoras siguen un estricto plan de vacunación contra las enfermedades más comunes en la avicultura, incluyendo a la BI. Solo se obtuvo este número de muestras debido a la incompatibilidad de la manipulación en la nacedora, además de evitar el sufrimiento innecesario de las demás aves.

Las muestras de sangre se recolectaron desde la vena alar; el ave se posiciona en decúbito lateral para dejar el ala expuesta. Se obtuvo 1mL de sangre por ave. Se utilizaron jeringas de 3 mL y agujas de 21G x 1 1/2"; para la desinfección del área de punción se utilizó alcohol al 70% con tintura de yodo. Las muestras se vaciaron en tubos eppendorf y transportadas al laboratorio en un contenedor refrigerado. En el caso de los pollos de un día de edad, se utilizaron jeringas de 1mL y agujas de 25G x 5/8", y se extrajo un volumen de 0,5 mL.

**Tabla 1-. Programa de vacunación contra Bronquitis Infecciosa y obtención de muestras para evaluar la respuesta serológica de pollos de engorde comerciales.**

Edad pollos	Grupos muestreados					
	Grupo 1 de campo	Grupo 2 de campo	Grupo 3 de campo	Grupo 4 de campo	Grupo 5 de campo	Grupo 6 de campo
<b>Día 1</b> (1)	Vacuna Ma5	Vacuna Ma5	Vacuna Ma5	Vacuna Ma5	Vacuna Ma5	Vacuna Ma5
<b>Día 14</b> (2)	Vacuna 4/91 20 sueros	Vacuna 4/91 20 sueros	Vacuna 4/91 20 sueros	Vacuna 4/91 20 sueros	Vacuna 4/91 20 sueros	Vacuna 4/91 20 sueros
<b>Día 28</b> (3)	20 sueros	20 sueros	20 sueros	20 sueros	20 sueros	20 sueros
<b>Día 35</b> (4)	20 sueros	20 sueros	20 sueros	20 sueros	20 sueros	20 sueros

Fuente: elaboración propia. (1) 1° vacuna Ma5 aplicada en Planta de Incubación por aspersión. (2) 2° vacuna aplicada en Pabellón de engorda por aspersión. Segunda semana post 1° vacunación. (3) cuarta semana post 1° vacunación y segunda semana post 2° vacunación. (4) quinta semana post 1° vacunación y tercera semana post 2° vacunación.

**Tabla 2-. Programa de vacunación contra Bronquitis Infecciosa y obtención de muestras para evaluar la respuesta serológica de pollos de engorde experimentales.**

<b>Grupos muestreados</b>		
<b>Edad pollos</b>	<b>Grupo Experimental vacunado</b>	<b>Grupo Experimental no vacunado</b>
<b>Día 1</b> (1)	Vacuna Ma5 20 sueros	–
<b>Día 14</b> (2)	Vacuna 4/91 20 sueros	– 20 sueros
<b>Día 28</b> (3)	20 sueros	20 sueros
<b>Día 35</b> (4)	20 sueros	20 sueros

Fuente: elaboración propia. (1) 1° vacuna aplicada en Galpón experimental por gota en ojo. (2) 2° vacuna aplicada en Galpón experimental por gota en ojo. Segunda semana post 1° vacunación. (3) cuarta semana post 1° vacunación y segunda semana post 2° vacunación. (4) quinta semana post 1° vacunación y tercera semana post 2° vacunación.

De las muestras de sangre obtenidas, el suero liberado se traspasó a tubos eppendorf, los cuales fueron centrifugados a 593 g por 15 minutos (centrífuga Mikro 20, Laboratorio Hettich). Este suero se almacenó bajo congelación a -20° C, hasta la realización de la prueba de ELISA.

### **3. Medición de anticuerpos vacunales mediante ELISA**

La medición de anticuerpos se realizó con un “kit” comercial de ELISA Indirecto (Laboratories, Inc. IDEXX, Maine, USA). Esta prueba se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología Aviar, Universidad de Chile, el cual cuenta con el Sistema de Gestión de calidad y Bioseguridad exigidos por el SAG para la detección mediante la técnica de ELISA de Influenza Aviar, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* y *Mycoplasma meleagridis*; enfermedades que se encuentran dentro del Programa de Vigilancia Epidemiológica del país.



Para que el ensayo fuera válido, la diferencia entre la absorbancia media del control positivo y la absorbancia media del control negativo ( $CP\bar{x} - CN\bar{x}$ ) debió ser mayor que 0,075. La absorbancia media del control negativo debe ser menor o igual que 0,150.

$$(1) \text{ Media del control Negativo } (CN\bar{x}) = \frac{A(650)CN1+A(650)CN2}{2}$$

$$(2) \text{ Media del control Positivo } (CP\bar{x}) = \frac{A(650)CP1+A(650)CP2}{2}$$

La presencia o ausencia de anticuerpos frente al virus IBV se determinó por medio de una relación entre el valor de la absorbancia (a 650 nm.) de la muestra de campo con la media del control positivo. El control positivo está normalizado y representa concentraciones significativas de anticuerpos anti-IBV en el suero de pollo. El nivel relativo de anticuerpos en la muestra se determinó calculando el coeficiente entre la muestra y el control positivo (M/P).

$$(3) \text{ Coeficiente } M/P = \frac{\text{Media de la muestra} - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}}$$

Los títulos finales relacionan el coeficiente M/P en una dilución 1:500 con un título final.

$$(4) \text{ Log}_{10} \text{ del título} = 1,09 (\log_{10} M/P) + 3,36$$

Las muestras de suero que obtuvieron coeficientes M/P inferiores o iguales a 0,20 se consideraron negativas. Las muestras con coeficientes M/P superiores a 0,20 (títulos superiores a 396) se consideraron positivas e indican que ha habido inmunización u otro tipo de exposición al virus IBV.

La prueba de ELISA indirecto se realizó: (a) en una placa tapizada con el VBI como antígeno; (b) se agregó el suero en estudio, y los anticuerpos presentes se unieron a los antígenos; (c) luego se agregó un conjugado (inmunoglobulina anti-Ig G pollo asociada a una enzima) y éste se unió a los anticuerpos contra BI unidos previamente a los antígenos; (d) para detectar visualmente esta reacción antígeno (Ig G pollo) – anticuerpo (inmunoglobulina anti-Ig G pollo), se agregó un substrato/cromóforo el cual tuvo una reacción colorimétrica con la enzima del conjugado; (e) y esta reacción fue leída por un espectrofotómetro.

Los materiales y métodos para realizar la prueba de ELISA indirecto corresponden a los descritos en el *kit* comercial IDEXX<sup>®1</sup>.

#### **4. Presentación de resultados**

El producto de la reacción antígeno-anticuerpo fue evaluado por la absorbancia de luz con una longitud de onda determinada (650 nm) a través de los pocillos de la placa. El espectrofotómetro leyó el resultado de la absorbancia de luz, el cual fue expresado como Densidad Óptica (OD) y estos valores fueron transformados a títulos de anticuerpos a través de operaciones aritméticas realizadas por el software xChekPlus<sup>®</sup>, recordando que títulos mayores a 396 son considerados positivos.

Los resultados de este trabajo se presentaron como títulos de anticuerpos. Para poder comparar descriptivamente lo que sucedió entre los grupos se utilizaron dos medidas de tendencia central, la media geométrica y la media aritmética. La media geométrica se define como la raíz *n*-ésima del producto de "*n*" términos, la cual es utilizada por el programa xChekPlus<sup>®</sup> para entregar los informes de los resultados. Se utilizó en este caso por ser la medida indicada para promediar datos que están en función de sus logaritmos (fórmula 4, página 26) (Ollevent *et al.*, 1999). La media aritmética se utilizó, debido a que la prueba de Tukey se realiza comparando las medias aritméticas de los grupos estudiados (Gutiérrez, 2012).

Se analizó la variabilidad de los datos dentro de cada grupo, utilizando la prueba estadística de ANOVA. Se determinó si hubo diferencias estadísticas entre los grupos, al comparar los títulos de anticuerpos a través de la prueba de Tukey.

---

<sup>1</sup> Manual Técnico para el Virus de la Bronquitis Infecciosa IDEXX<sup>®</sup>

## RESULTADOS

### 1. Títulos de anticuerpos de los grupos de campo

Los resultados se presentaron como títulos de anticuerpos para los 20 pollos para cada medición y grupo. Los valores son expresados como media geométrica, además de la desviación estándar (Tablas y Anexos correspondientes).

**-Día 14:** En la tabla 3 se pueden observar los valores de las medias geométricas y coeficientes de variación (CV) de los títulos de anticuerpos de los grupos de campo a los 14 días de edad.

Ninguno de los seis grupos de pollos de campo presenta medias geométricas de títulos de anticuerpos que puedan considerarse positivas.

Las medias geométricas de los títulos de anticuerpos fluctúan entre 10,8 y 65,3. El Grupo 5 de campo presentó la media geométrica más baja de títulos de anticuerpos (10,8) y el Grupo 2 de campo presentó la media geométrica más alta (65,3).

En relación con los Coeficientes de variación, el Grupo 1 de campo presentó la menor variación de los títulos de anticuerpos con un CV de 113,4% y el Grupo 3 de campo mostró la mayor variación de ellos, con un CV de 181%, mostrando una diferencia de 67,6% entre los dos grupos.

En el anexo 1, se presentan los títulos de anticuerpos individuales de los grupos estudiados a los 14 días de edad, estos títulos reflejan lo sucedido 14 días post vacunación de la primera vacuna (Ma5) aplicada al día de edad. Los grupos de campo obtuvieron títulos de anticuerpos que varían desde 1 como valor mínimo para los seis grupos de campo, hasta 1104 como valor máximo para el Grupo 2 de campo. En los seis grupos, solo nueve pollos obtuvieron valores positivos, lo que se relaciona a los promedios negativos de los grupos.

**Tabla 3-. Medias geométricas y Coeficientes de variación de títulos de anticuerpos a los 14 días de edad con una vacuna Ma5 (1) aplicada al día de edad en seis grupos de pollos de engorde bajo condiciones comerciales.**

<b>Grupos</b>	<b>Medias geométricas</b>	<b>CV (%)</b>
<b>1 de campo</b>	14,3	113,4
<b>2 de campo</b>	65,3	131,8
<b>3 de campo</b>	30,1	181
<b>4 de campo</b>	61,6	132,6
<b>5 de campo</b>	10,8	123,6
<b>6 de campo</b>	30	163,0

Fuente: Elaboración propia. (1) 1° vacuna Ma5 aplicada en Planta de Incubación por aspersion. Títulos de anticuerpos 14 días post 1° vacunación.

- **Día 28:** Los títulos de anticuerpos de los grupos estudiados a los 28 días de edad reflejan lo sucedido 28 días post vacunación de la primera vacuna (Ma5) aplicada al día de edad y 14 días post vacunación de la segunda vacuna (4/91) aplicada a los 14 días de edad.

En la tabla 4 se pueden observar los valores de las medias geométricas y coeficientes de variación (CV) de los títulos de anticuerpos de los grupos de campo a los 28 días de edad.

Las medias geométricas de los títulos de anticuerpos de todos los grupos de campo fueron negativas.

Las medias geométricas de los títulos de anticuerpos fluctúan entre 7,6 y 231,8. El Grupo 4 de campo presentó la media geométrica más bajas de títulos de anticuerpos (7,6) y el Grupo 2 de campo presentó la media geométrica más alta (231,8).

En relación con los Coeficientes de variación de los grupos de campo, el Grupo 1 de campo presentó la menor variación de los títulos de anticuerpos con un CV de 67,7% y el Grupo 4

de campo mostró la mayor variación de ellos, con un CV de 166,6%, mostrando una diferencia de 98,9% entre los dos grupos.

Los títulos de anticuerpos individuales variaron de 1 como valor mínimo para los grupos 1,3,4,5 y 6 de campo, hasta 2084 como valor máximo para el Grupo 3 de campo (anexo 2). En los grupos 2 y 5, cinco pollos en cada grupo presentaron títulos de anticuerpos positivos, mientras que en los grupos 4 y 6 no hubo ninguna muestra positiva, lo que explica las medias geométricas negativas de todos los grupos.

**Tabla 4-. Medias geométricas y Coeficientes de variación de títulos de anticuerpos a los 28 días de edad con una vacuna Ma5 (1) aplicada al día de edad y una vacuna 4/91 (2) aplicada a los 14 días de edad en seis grupos de pollos de engorde bajo condiciones comerciales.**

<b>Grupo</b>	<b>Medias geométricas</b>	<b>CV (%)</b>
<b>1 de campo</b>	100,4	67,7
<b>2 de campo</b>	231,8	103,9
<b>3 de campo</b>	82,1	150,3
<b>4 de campo</b>	7,6	166,6
<b>5 de campo</b>	124,9	131,6
<b>6 de campo</b>	17,6	110,4

Fuente: Elaboración propia. (1) 1° vacuna Ma5 aplicada en Planta de Incubación por aspersión. Títulos de anticuerpos 28 días post vacunación con la 1° vacuna. (2) 2° vacuna aplicada en Pabellón de engorda por aspersión. Títulos de anticuerpos 14 días post vacunación con la 2° vacuna.

- **Día 35:** Los títulos de anticuerpos de los grupos estudiados a los 35 días de edad reflejan lo sucedido 35 días post vacunación de la primera vacuna (Ma5) aplicada al día de edad y 28 días post vacunación de la segunda vacuna (4/91) aplicada a los 14 días de edad.

En la tabla 5 se pueden observar los valores de las medias geométricas y coeficientes de variación (CV) de los títulos de anticuerpos de los grupos de campo a los 35 días de edad.

Las medias geométricas de los títulos de anticuerpos de la mayoría de los grupos de campo fueron positivas.

Las medias geométricas de los títulos de anticuerpos fluctúan entre 254,7 y 1896,6. El Grupo 6 de campo presentó la media geométrica más baja (254,7) y el Grupo 3 de campo presentó la media geométrica más alta (1896,6).

En relación con los Coeficientes de variación, el Grupo 5 de campo presentó la menor variación de los títulos de anticuerpos con un CV de 61,8% y el Grupo 1 de campo mostró la mayor variación en los grupos, con un CV de 106,8%, mostrando una diferencia de un 45% entre los dos grupos.

Los grupos de campo al día 35, obtuvieron títulos de anticuerpos individuales que varían desde 1 como valor mínimo para el Grupo 6 de campo, hasta 9710 como valor máximo para el Grupo 3 de campo (anexo 3). A diferencia de los días 14 y 28, la mayoría de los títulos de anticuerpos en el día 35 de muestreo fueron positivos, lo que se condice con las medias positivas de títulos de anticuerpos de todos los grupos de campo.

**Tabla 5-. Medias geométricas y Coeficientes de variación de títulos de anticuerpos a los 35 días de edad con una vacuna Ma5 (1) aplicada al día de edad y una vacuna 4/91 (2) aplicada a los 14 días de edad en seis grupos de pollos de engorde bajo condiciones comerciales.**

<b>Grupo</b>	<b>Medias geométricas</b>	<b>CV (%)</b>
<b>1 de campo</b>	1143,7	106,8
<b>2 de campo</b>	454,2	75,2
<b>3 de campo</b>	1896,6	85,6
<b>4 de campo</b>	395,8	101,8
<b>5 de campo</b>	1786,2	61,8
<b>6 de campo</b>	254,7	100,5

Fuente: Elaboración propia. (1) 1° vacuna Ma5 aplicada en Planta de Incubación por aspersión. Títulos de anticuerpos 35 días post vacunación con la 1° vacuna, Ma5. (2) 2° vacuna aplicada en Pabellón de engorda por aspersión. Títulos de anticuerpos 21 días post vacunación con la 2° vacuna, 4/91.

## **2. Títulos de anticuerpos de los grupos experimentales**

- **Día 1:** de la muestra de 20 sueros obtenidos al día de edad, la media geométrica de los títulos de anticuerpos fue de 2076,7 y el coeficiente de variación fue 43,1%.

Se obtuvieron títulos de anticuerpos individuales que fluctuaron entre 1020 y 5103 (anexo 4), siendo todas las muestras positivas. Estos títulos reflejan los anticuerpos maternos (inmunidad pasiva) con los que nacieron los pollos, ya que las gallinas reproductoras son vacunadas durante su época reproductiva.

- **Día 14:** los títulos de anticuerpos obtenidos reflejan lo sucedido 14 días post vacunación de la primera vacuna (Ma5) aplicada al día de edad para los grupos Experimental vacunado y Experimental no vacunado.

En la tabla 6 se pueden observar los valores de las medias geométricas y coeficientes de variación de los títulos de anticuerpos de los grupos experimentales a los 14 días de edad.

El grupo Experimental vacunado obtuvo una media geométrica de los títulos de anticuerpos de 259,6 y el grupo Experimental no vacunado obtuvo una media geométrica de títulos de anticuerpos de 420,9.

Los grupos Experimental vacunado y Experimental no vacunado presentaron Coeficientes de variación de 85,2%, y 63,5%, respectivamente.

Los títulos de anticuerpos individuales para el grupo Experimental vacunado fluctuaron entre 34 a 1170 y los títulos de anticuerpos individuales para el grupo Experimental no vacunado fluctuaron entre 130 a 1284 (anexo 1). En el grupo Experimental vacunado la mayoría de las muestras fueron negativas, lo que se relaciona con la media geométrica negativa de los títulos de anticuerpos presentada por este grupo. Diferente situación a lo ocurrido con el grupo Experimental no vacunado, el cual presenta la mayoría de las muestras positivas, reflejado en la media geométrica positiva de los títulos de anticuerpos de este grupo.

**Tabla 6-. Medias geométricas y Coeficientes de variación de títulos de anticuerpos a los 14 días de edad con una vacuna Ma5 (1) aplicada al día de edad en dos grupos de pollos de engorde bajo condiciones experimentales.**

<b>Grupo</b>	<b>Medias geométricas</b>	<b>CV (%)</b>
<b>Grupo Experimental vacunado</b>	259,6	85,2
<b>Grupo Experimental no vacunado</b>	420,9	63,5

Fuente: Elaboración propia. (1) 1° vacuna Ma5 aplicada en Galpón experimental por vía ocular. Títulos de anticuerpos 14 días post vacunación con la 1° vacuna, Ma5.

- **Día 28:** los títulos de anticuerpos obtenidos a los 28 días de edad reflejan lo sucedido 28 días post vacunación de la primera vacuna (Ma5) aplicada al día de edad y 14 días post vacunación de la segunda vacuna (4/91) aplicada a los 14 días de edad.

En la tabla 7 se pueden observar los valores de las medias geométricas y coeficientes de variación de los títulos de anticuerpos de los grupos experimentales a los 28 días de edad.



El grupo Experimental vacunado obtuvo una media geométrica de los títulos de anticuerpos de 613,2 y el grupo Experimental no vacunado obtuvo una media geométrica de los títulos de anticuerpos de 24.

Los grupos Experimental vacunado y Experimental no vacunado presentaron coeficientes de variación de 114,1% y 123,6%, respectivamente.

Los títulos de anticuerpos individuales para el grupo Experimental vacunado fluctuaron entre 91 a 4755 y los títulos de anticuerpos individuales para el grupo Experimental no vacunado fluctuaron entre 1 a 341 (anexo 2). En el caso del grupo Experimental vacunado, la mayoría de las muestras individuales fueron positivas, lo que se vio reflejado en la media geométrica positiva de los títulos de anticuerpos de este grupo. En el caso del grupo Experimental no vacunado, todas las muestras individuales fueron negativas, así como la media geométrica de este grupo.

**Tabla 7-. Medias geométricas y Coeficientes de variación de títulos de anticuerpos a los 28 días de edad con una vacuna Ma5 (1) aplicada al día de edad y una vacuna 4/91 (2) aplicada a los 14 días de edad en dos grupos de pollos de engorde bajo condiciones experimentales.**

<b>Grupos</b>	<b>Medias geométricas</b>	<b>CV (%)</b>
<b>Grupo Experimental vacunado</b>	613,2	114,1
<b>Grupo Experimental no vacunado</b>	24	123,6

Fuente: Elaboración propia. (1) 1° vacuna Ma5 aplicada en Galpón experimental por vía ocular. Títulos de anticuerpos 28 días post vacunación con la 1° vacuna, Ma5. (2) 2° vacuna aplicada en Galpón experimental por vía ocular. Títulos de anticuerpos 14 días post vacunación con la 2° vacuna, 4/91.

- **Día 35:** los títulos de anticuerpos de los grupos estudiados a los 35 días de edad reflejan lo sucedido 35 días post vacunación de la primera vacuna (Ma5) aplicada al día de edad y 28 días post vacunación de la segunda vacuna (4/91) aplicada a los 14 días de edad.

En la tabla 8 se pueden observar los valores e las medias geométricas y coeficientes de variación de los títulos de anticuerpos de los grupos experimentales a los 35 días de edad.

El grupo Experimental vacunado obtuvo una media geométrica de títulos de anticuerpos de 667,3 y el grupo Experimental no vacunado obtuvo una media geométrica de títulos de anticuerpos de 4.

Los grupos Experimental vacunado y Experimental no vacunado presentaron coeficientes de variación de 76,1% y 255,8%, respectivamente.

Los títulos de anticuerpos individuales para el grupo Experimental vacunado fluctuaron entre 178 a 2439 Experimental vacunado y los títulos de anticuerpos individuales para el grupo Experimental no vacunado fluctuaron entre 1 a 275 (anexo 3). En el caso del grupo Experimental vacunado, la mayoría de las muestras individuales fueron positivas, lo que se vio reflejado en la media geométrica positiva de los títulos de anticuerpos de este grupo. En el caso del grupo Experimental no vacunado, todas las muestras individuales fueron negativas, así como la media geométrica de este grupo.

**Tabla 8-. Medias geométricas y coeficientes de variación de títulos de anticuerpos a los 35 días de edad con una vacuna Ma5 (1) aplicada al día de edad y una vacuna 4/91 (2) aplicada a los 14 días de edad en dos grupos de pollos de engorde bajo condiciones experimentales.**

<b>Grupo</b>	<b>Medias geométricas</b>	<b>CV (%)</b>
<b>Grupo Experimental vacunado</b>	667,3	76,1
<b>Grupo Experimental no vacunado</b>	4	255,8

Fuente: Elaboración propia. (1) 1° vacuna Ma5 aplicada en Galpón experimental por vía ocular. Títulos de anticuerpos 35 días post vacunación con la 1° vacuna, Ma5. (2) 2° vacuna aplicada en Galpón experimental por vía ocular. Títulos de anticuerpos 21 días post vacunación con la 2° vacuna, 4/91.

### **3. Comparación de Grupos vacunados y no vacunados**

En el día 14 de muestreo, los resultados de las medias geométricas de títulos de anticuerpos de los seis grupos de campo fueron negativas. En el día 28 de muestreo, la situación es similar. Debido a estos resultados, se determinó que solo se realizaría la prueba de ANOVA y Tukey para determinar si existen diferencias entre los grupos al día 35 de edad, ya que todos los grupos vacunados presentaron medias geométricas positivas (mayores a 396).

Al realizar la comparación de los títulos de anticuerpos en el día 35 para cada grupo utilizando la prueba de ANOVA, se determinó que existen diferencias significativas entre los grupos (valor  $p < 0,0000$  ANOVA). Para determinar entre cuáles grupos existían diferencias, se utilizó la prueba de Tukey, la cual utiliza las medias aritméticas para realizar la comparación entre grupos, y los resultados se encuentran en la tabla 9.

**Tabla 9-. Resultados de la prueba de Tukey al comparar las medias aritméticas de los títulos de anticuerpos al día 35 días de edad de seis grupos de campo y un grupo experimental, vacunados al día de edad con la vacuna Ma5 (1) y a los 14 días de edad con la vacuna 4/91 (2), y de un grupo experimental no vacunado.**

<b>Grupos</b>	<b>Medias aritméticas</b>
<b>Grupo Experimental no vacunado</b>	23,85 (61)
<b>Grupo Experimental vacunado</b>	860,5 <sup>ac</sup> (654,6)
<b>Grupo 1 de campo</b>	1985,05 <sup>bc</sup> (2119,5)
<b>Grupo 2 de campo</b>	600,85 <sup>a</sup> (451,8)
<b>Grupo 3 de campo</b>	2535,6 <sup>b</sup> (2171,7)
<b>Grupo 4 de campo</b>	823,7 <sup>a</sup> (838,8)
<b>Grupo 5 de campo</b>	2115,9 <sup>b</sup> (1307,5)
<b>Grupo 6 de campo</b>	605,85 <sup>a</sup> (609,1)

Fuente: elaboración propia. Medias aritméticas compartiendo una letra en cada día no son significativamente diferentes al nivel 5% ( $p < 0.05$ ). ( ): desviación estándar. (1) 1° vacuna Ma5 aplicada en Planta de Incubación por aspersión. (2) 2° vacuna aplicada en Pabellón de engorda por aspersión.

## DISCUSIÓN

La Bronquitis infecciosa es una de las enfermedades que ocasiona mayores pérdidas económicas en la producción avícola (Cook *et al.*, 2012), por lo que la vacunación es uno de los puntos fundamentales para controlar la enfermedad y resulta muy importante poder monitorear de una forma rápida y de bajo costo la eficacia de ésta. Este estudio tuvo como objetivo realizar una evaluación serológica de la respuesta inmune de pollos de engorde en condiciones de campo frente a un programa no convencional de vacunación contra BI en Chile con dos vacunas de serotipos diferentes.

Para realizar la evaluación serológica de la vacunación es importante saber los criterios para diferenciar los resultados de una seroconversión después de una infección de campo. Van leerdman y Kuhne, (2010) entregan como guía tres puntos esenciales en el caso de pollos de engorde, el primero: es evaluar la intensidad de la respuesta, indicado por el promedio de los títulos de anticuerpos, donde el título promedio post infección debe aumentar significativamente. Una buena regla es que el promedio post infección debe ser al menos dos veces lo esperado post vacunación. Segundo: la uniformidad de la respuesta evaluada por el coeficiente de variación (CV), determinando si la vacuna está siendo aplicada a todas las aves. Cabe destacar que las vacunas vivas contra enfermedades respiratorias generan títulos de anticuerpos variables, por lo que el CV se espera que varíe entre un 50% a un 80% para considerarse una buena vacunación. Si este CV es menor a un 35% se podría sospechar de una infección de campo. Tercero: si se observa un aumento del promedio de títulos de anticuerpos y una disminución del CV, esto debe relacionarse con la existencia de signos clínicos previo a este cambio en los títulos de anticuerpos, para poder tomar medidas ante una infección de campo en el plantel y revisar los protocolos de vacunación.

Al analizar los resultados, al día 1 de edad los pollos experimentales obtuvieron una media geométrica de títulos de anticuerpos de 2076,7, con el 100% de las muestras positivas y un 43,1% de CV (anexo 5), los que corresponden a anticuerpos maternos (inmunidad pasiva), los cuales son transmitidos desde las gallinas a los polluelos a través del saco vitelino (Hamal *et al.*, 2006). Este resultado es concordante con otros estudios realizados sobre anticuerpos maternos (Hamal *et al.*, 2006; Shirzad *et al.*, 2012). En las reproductoras de pollos de engorde, se aplica un plan de vacunación que implica la utilización de vacunas vivas y

vacunas inactivadas durante su vida productiva, lo que produce un nivel de títulos de anticuerpos mucho mayor que en los pollos de engorde debido a la repetida estimulación del sistema inmune (Gelb, 2013). Estos títulos de anticuerpos altos, dependiendo de la edad y el número de vacunas, pueden alcanzar valores de medias geométricas de 4000 a 15000 aproximadamente (Anón, 2017; Roberts *et al.*, 2004). La transmisión pasiva de anticuerpos contra VBI a los polluelos de parte de reproductoras con altos niveles de anticuerpos, explicaría los mayores títulos de anticuerpos alcanzados al día 1 de edad en comparación a los títulos de anticuerpos de los siguientes días y un CV que demostró una mayor homogeneidad de los títulos de anticuerpos al primer día.

A los 14 días se observa una fuerte disminución de los títulos de anticuerpos en los grupos de pollos de campo y en el grupo Experimental vacunado, donde todas las medias geométricas de los títulos de anticuerpos fueron negativas (menor al título de corte, 396), no así en el grupo Experimental no vacunado siendo este el único grupo en presentar una media geométrica positiva. Esta disminución rápida de los títulos de anticuerpos de los grupos vacunados, tanto de campo como experimental, en comparación al grupo Experimental no vacunado, puede tener una explicación similar a la de Mondal y Naqi (2001). Su estudio sobre inmunidad pasiva utilizó aves con anticuerpos maternos y vacunadas (al día de edad contra VBI), y con anticuerpos maternos y no vacunadas. Al medir los títulos de anticuerpos contra VBI a los 14 y 21 días hubo una disminución de ellos en ambos grupos, pero la disminución de los títulos de anticuerpos fue más lenta en las aves no vacunadas. Esto se explicaría porque los anticuerpos maternos interfieren con la vacunación debido a su actividad neutralizante al menos parcialmente, del virus vacunal; previniendo de esta forma una exposición óptima de los antígenos al sistema inmune (Said *et al.*, 2017; Kapczynski *et al.*, 2013).

Al día 28 (tabla 4) se observa un aumento en las medias geométricas de los grupos de campo en comparación al día 14, excepto en los grupos 4 y 6 de campo, sin alcanzar la positividad de la mayoría de los títulos de anticuerpos individuales (anexo 5). El grupo Experimental no vacunado en este día ya presenta el 100% de sus títulos de anticuerpos individuales negativos. Lo sucedido en el caso del grupo Experimental no vacunado fue lo esperado, ya que al no

existir un estímulo inmune ya sea vacunal o de infección, los anticuerpos maternos deberían disminuir hasta un nivel mínimo.

En el día 28 se puede observar que el grupo Experimental vacunado presenta su media geométrica (613,2) positiva, a diferencia de los grupos de campo. Esto podría deberse a la diferencia en la ruta de aplicación de las vacunas, ya que el grupo Experimental vacunado fue inoculado por vía ocular y los grupos de campo fueron inoculados por aspersión. El método de aspersión presenta grandes ventajas como permitir vacunaciones masivas, pero con el riesgo de no lograr una vacunación homogénea de toda la población de pollos, además de depender en gran medida de la manipulación de los operarios, tanto de las máquinas vacunadoras como de las vacunas (Jordan, 2017). En cambio, la inoculación ocular es impracticable en lotes de aves numerosos, por lo que solo se utiliza para inocular un pequeño número de aves, asegurando la aplicación de la dosis vacunal completa al 100% del grupo. Esto fue comprobado por Talebi *et al.* (2005) al aplicar una vacuna por diferentes vías de inoculación, donde la aplicación por vía ocular evidenció los mayores niveles de títulos de anticuerpos séricos en comparación a otras vías de aplicación, observándose algo similar en los pollos del grupo Experimental vacunado.

En el día 35 de edad ya se observa un aumento de los títulos de anticuerpos en todos los grupos de pollos, exceptuando a los pollos del grupo Experimental no vacunado, los cuáles presentaron el 100% de los títulos de anticuerpos negativos al igual que lo observado en el día 28 de edad. Este aumento de los títulos de anticuerpos tuvo relación con la estimulación del sistema inmune debido a la aplicación de la segunda vacuna (4/91) al día 14 de edad y a la disminución natural de los anticuerpos maternos, los que ya no neutralizarían al virus vacunal.

Los resultados de la prueba de Tukey al día 35 de edad (edad en que todos los grupos son serológicamente positivos, sobre 396), demuestran que las medias aritméticas de los títulos de anticuerpos de la mayoría de los grupos de campo (1, 2, 4 y 6) son similares estadísticamente al grupo Experimental vacunado, y los grupos 3 y 5 de campo que no son similares estadísticamente, no sobrepasan el título de 2535,6. De lo anterior se puede deducir que en este estudio los títulos de anticuerpos en términos generales son similares en condiciones comerciales como experimentales.

Los CV observados en la mayoría de los grupos de pollos de campo fueron mayores al 100% en los días 14 y 28 de edad, disminuyendo en el día 35 de edad, pero nunca alcanzando valores menores al 60% de CV (tabla 3, tabla 4 y tabla 5). Analizando los valores de los coeficientes de variación junto a las medias geométricas de los títulos de anticuerpos de los grupos de pollos estudiados, se podría determinar que no hubo infección de campo, ya que los CV nunca disminuyeron bajo el 35%, y las medias geométricas nunca superaron los 2000 de títulos de anticuerpos. Los títulos resultantes de anticuerpos podrían considerarse en rangos normales, ya que según Vásquez (2009), con títulos de anticuerpos mayores a 3500 en pollos de engorde (con dos vacunas vivas aplicadas) se podría sospechar de una infección de campo. Entre los años 2015 y 2017 las muestras de suero provenientes de lotes de pollos de engorde del estado de Georgia, Estados Unidos, para los rangos de 14 a 20 días, 21 a 27 días, 28 a 34 días y 35 a 41 días de edad dieron como resultado las siguientes medias geométricas de títulos de anticuerpos: 398, 179, 513 y 921, para cada uno de los rangos indicados respectivamente (Anón, 2017), lo que reafirma lo dicho anteriormente sobre los valores de anticuerpos resultantes de este estudio, los cuales se encontrarían dentro de rangos esperados para pollos de engorde.

Debido a los altos valores de CV alcanzados, se podría inferir que la vacunación no alcanza la uniformidad deseada. Aunque hubo una mejora en el día 35 de edad, 4 de los 6 grupos de campo no lograron CV bajo el 80%. En el grupo Experimental vacunado, el CV fue menor a un 80% en todos los días, excepto en el día 28, donde superó el 100% al igual que la mayoría de los grupos de campo, por lo que estos resultados podrían indicar que las vacunas aplicadas recién a las tres semanas post inoculación de la segunda vacuna (4/91) producen una respuesta inmune humoral más uniforme. Sería recomendable revisar los métodos de vacunación, la forma de administración y la mantención de las vacunas en el plantel, ya que como se dijo anteriormente, no hubo la homogeneidad esperada en los pollos de campo.

La respuesta humoral sistémica se ha relacionado con el impedimento de la replicación del virus en diferentes órganos, como riñones y gónadas, no así en el sistema respiratorio alto (Naqi *et al.*, 2003), ya que se ha demostrado que la respuesta humoral no se correlaciona del todo con la protección inicial otorgada por las vacunas, esto significa que los pollos vacunados pueden estar protegidos contra el virus respiratorio independiente del título de



anticuerpos, ya que en este caso la protección se atribuye a la inmunidad local de las mucosas (Mondal y Naqi, 2001). Diferentes trabajos (Chhabra *et al.*, 2015b; Toro y Fernandez, 1994) han demostrado en pruebas de protección vacunal la existencia de protección contra un VBI de desafío y al mismo tiempo presentando niveles positivos, pero bajos de anticuerpos sistémicos luego de una segunda vacunación. Aunque en este estudio los lotes de pollos en que se obtuvo las mediciones no presentaron signos respiratorios durante el muestreo ni en el resto de su vida productiva y los títulos de anticuerpos se condicen con los resultados de otros estudios, no se puede afirmar que este plan de vacunación otorgue protección contra los virus de BI circulantes hasta realizar un ensayo completo de protección vacunal.

Aunque los títulos de anticuerpos no siempre puedan relacionarse directamente a la protección vacunal, el monitoreo serológico sigue siendo de importancia, ya que al construir líneas bases de respuestas humoral ante los programas de vacunación utilizados, se puede establecer un historial del comportamiento de los títulos de anticuerpos. Así, con los futuros muestreos serológicos se puede determinar si los resultados son concordantes con las líneas bases del plantel o requiere una revisión de los resultados para reevaluar las vacunaciones o determinar si ocurrió una infección con un virus de campo.

Los mayores beneficios de mantener un monitoreo serológico a través de la prueba de ELISA en los planteles es evaluar la aplicación de vacunas y su desempeño, además de poder realizar un diagnóstico presuntivo inmediato de la infección para identificar la causa de las pérdidas en la producción. El punto clave de utilizar un programa de monitoreo es actuar con los resultados, tomando medidas inmediatas para limitar y evitar futuros perjuicios económicos en la producción. Si los resultados de la vacunación no son los esperados, permiten reevaluar los procedimientos de vacunación y tomar medidas correctivas. Por lo que el monitoreo serológico resulta ser una herramienta económicamente efectiva (Van Leerdman y Kuhne, 2010).

## CONCLUSIONES

En concordancia con la literatura, los títulos de anticuerpos séricos en los grupos de pollos de campo disminuyeron después de la primera vacunación contra BI, y aumentaron paulatinamente después de la segunda vacunación, reflejando la interferencia de la inmunidad pasiva y el efecto de refuerzo de la segunda vacuna.

Los grupos de pollos de campo y el grupo el grupo Experimental vacunado presentaron valores de títulos de anticuerpos similares, lo que puede significar que los bajos títulos de anticuerpos presentados por estos grupos no se deben al manejo masivo en la aplicación de la vacuna, si no a la respuesta humoral propia de las aves. Sin embargo, el método de aplicación de las vacunas en los grupos de campo afectó la uniformidad de los resultados de los títulos de anticuerpos en comparación a los pollos del grupo Experimental vacunado, a los cuales se les aplicó las vacunas por vía ocular, presentando una mayor homogeneidad de los resultados.

## BIBLIOGRAFÍA

- ANÓN. 2017. ELISA Titers in Georgia Poultry 2015-2017. Georgia Poultry Laboratory Network. [en línea] <<https://www.gapoultrylab.org/wp-content/uploads/2012/05/Idexx-Elisa-titers-in-Georgia.pdf>> [consulta: 20-09-2017]
- BANDE, F.; ARSHAD, S.; OMAR, A.; HAIR-BEJO, M.; MAHMUDA, A.; NAIR, V. 2017. Global distributions and strain diversity of avian infectious bronchitis virus: a review. *Anim Health Res Rev.* 18(1):70-83.
- BORNE, P; COMTE, S. 2001. Vaccines and Vaccination in poultry. Laboratory analyses and their uses. CEVA sante animal. [en línea]. <<http://www.sapoultry.co.za/pdf-training/Vaccines-lab-analysis.pdf>> [Consulta: 10-10-2017]
- CARON, L. 2010. Etiology and Immunology of Infectious Bronchitis Virus. *Rev Bras Cienc Avic.* 12(2): 115-119.
- CAVANAGH, D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res.* 38: 281-297.
- CAVANAGH, D.; GELB, J. 2008. Infectious Bronchitis. **In:** Saif, Y.; Fadly A.; Glisson, J.; McDougald, Nolan, L.; Swayne, D. (Eds.). *Diseases of Poultry.* 12th ed. Blackwell Publishing. Ames, USA. pp. 117-135.
- CHHABRA, R.; CHANTREY, J.; GANAPATHY, K. 2015a. Immune Responses to Virulent and Vaccine Strains of Infectious Bronchitis Viruses in Chickens. *Viral Immunol.* 28(9): 478-488.
- CHHABRA R.; FORRESTER, A.; LEMIERE, S.; AWAD, F.; CHANTREY, J.; GANAPATHY, K. 2015b. Mucosal, cellular, and humoral immune responses induced by different live infectious bronchitis virus vaccination regimes and protection conferred against infectious bronchitis virus Q1 strain. *Clin Vaccine Immunol.* 22: 1050–1059.
- COOK, J.; ORBELL, S.; WOODS, M.; HUGGINS, M. 1999. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Path.* 28(5): 477-485.
- COOK, J.; JACKWOOD, M.; JONES, R.C. 2012. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Path.* 41(3): 239-250.
- CUBILLOS, A.; ULLOA, J.; CUBILLOS, V.; COOK, J. 1991. Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. *Avian Path.* 20(1): 85-99.
- DE WIT, J. 2000. Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Path.* 29(2): 71-93.
- DE WIT, J.; COOK, J.; VAN DER HEIJDEN, H. 2011. Infectious Bronchitis virus: a review of history, current situation and control measures. *Avian Path.* 40(3): 223-235.

- DE WIT, J.; DIJKMAN, R.; GUERRERO, P.; CALVO, J.; GONZALEZ, A.; HIDALGO, H.** 2017. Variability in biological behaviour, pathogenicity, protectotype and induction of virus neutralizing antibodies by different vaccination programmes to infectious bronchitis virus genotype Q1 strains from Chile. *Avian Pathol.* 46(6): 666-675
- FIELDS, D.** 1973. Arkansas 99, a New Infectious Bronchitis Serotype. *Avian Dis.* 17(3): 659-661.
- GARCIA, A.; NORAMBUENA, M.** 1969. Diagnostico preliminar de la bronquitis infecciosa en Chile. *Revista de la Sociedad de Medicina Veterinaria de Chile.* 19: 27-33.
- GELB, J.** 2013. Avian infectious bronchitis. [en línea] cap. 2.3.2. **In:** *Terrestrial animal healthcode.*  
<[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.02\\_AIB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf)>  
[consulta: 20-09-2017]
- GUTIÉRREZ, J.** 2012. La correcta utilización de los promedios. *Revista Universidad EAFIT.* 31(98): 77-86.
- HAMAL, K.; BURGESS, S.; PEVZNER, I.; ERF, G.** 2006. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poult Sci.* 85: 1364-1372.
- HIDALGO, H.; GALLARDO, R.; ROSENDE, S.** 1976. Isolation of Infectious Bronchitis virus from Broiler Chickens in Chile. *Avian Dis.* 20(3): 601-603.
- HIDALGO, H.; GALLARDO, R.; TORO, H.** 1986. Antigenic and pathogenic properties of three isolated of Infectious Bronchitis Virus obtained from vaccinated chickens. *J Vet Med B.* 33: 26-35.
- HIDALGO, H.** 2000. Bronquitis Infecciosa: Situación en Chile y Latinoamérica. [en línea]. *Tecnovet* 6(1). s.p  
<<http://www.tecnovet.uchile.cl/index.php/RT/article/viewArticle/5247/5127>>. [Consulta: 10-12-2017]
- JACKWOOD, M.; HILT, D.; WILLIAMS, S.; WOOLCOCK, P.; CARDONA, C.; O'CONNOR, R.** 2007. Molecular and serologic characterization, pathogenicity, and protection studies with Infectious Bronchitis virus field isolates from California. *Avian Dis.* 51(2): 527-533.
- JACKWOOD, M.** 2012. Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis.* 56(4): 634-641.
- JACKWOOD, M.; DE WIT, J.** 2013. Infectious Bronchitis. **In:** Suarez, D.; Nair, V.; Glisson, J.; McDougald, L.; Nolan, L.; Swayne, D. (Eds.). *Diseases of Poultry.* 13th ed. Wiley-Blackwell Publishing. Ames, USA. pp. 117-135.
- JORDAN, B.** 2017. Vaccination against Infectious Bronchitis Virus: A Continuous Challenge. 2017. *Vet Microbiol.* 206: 137-143.

- JOVE, A.** 2004. Evaluación de las cepas H120 y M48 en programas de vacunación contra bronquitis infecciosa aviar en pollos de carne. Tesis Título Médico Veterinario. Lima, Perú. U. Nacional Mayor de San Marcos. Fac. Med. Veterinaria. 23 p.
- KAMEKA, A.; HADDADI, S.; KIM, D.; CORK, S.; ABDUL-CAREEM, M.** 2014. Induction of innate immune response following infectious bronchitis coronavirus infection in the respiratory tract of chickens. *Virology* 450-45: 114–121.
- KAPCZYNSKI, D.; AFONSO, C.; MILLER, P.** 2013. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Dev Comp Immunol.* 41(3): 447-453.
- MALO, A.; ORBELL, S.; HUGGINS, M.; WOODS, M.; COOK, J.** 1998. Cross protection studies after the use of live-attenuated IBV vaccines Nobilis® IB 4-91 and Nobilis® IB Ma5 (Massachusetts type). [en línea]. *Intervet VSD Newsletter* 17: 1-6. <[http://www.protekt.com.tr/dokumanlar/IB\\_capraz\\_okuma.pdf](http://www.protekt.com.tr/dokumanlar/IB_capraz_okuma.pdf)> [Consulta: 04-09-2017].
- MARANDINO, A.; PEREDA, A.; TOMÁS, G.; HERNÁNDEZ, M.; IRAOLA, G.; CRAIG, M.; HERNÁNDEZ, D.; BANDA, A.; VILLEGAS, P.; PANZERA, Y.; PÉREZ, R.** 2015. Phylodynamic analysis of avian infectious bronchitis virus in South America. *J Gen Virol.* 96(6): 1340-1346.
- MARTIN, E.; BRASH, M.; HOYLAND, S.; COVENTRY, J.; SANDROCK, C.; GUERIN, M.; OJKIC, D.** 2014. Genotyping of infectious bronchitis viruses identified in Canada between 2000 and 2013. *Avian Pathol.* 43(3): 264–268.
- MOCKETT, A.; DARBYSHIRE, J.** 1981 Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Path.* 10(1): 1-10.
- MONDAL, S.; NAQI, S.** 2001. Maternal antibody to infectious bronchitis virus: its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. *Vet Immunol Immunopathol.* 79(1-2): 31-40.
- NAQI, S.; GAY, K.; PATALLA, P.; MONDAL, S.; LIU, R.** 2003. Establishment of Persistent Avian Infectious Bronchitis Virus Infection in Antibody-Free and Antibody-Positive Chickens. *Avian Dis.* 47(3):594-601.
- OLLEVEANT, N.; HUMPHRIS, G.; ROE, B.** 1999. How big is a drop? A volumetric assay of essential oils. *J Clin Nurs.* 8: 299-302.
- RAJ, G.; JONES, R.** 1997. Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Path.* 26(4): 677-706.
- RIVAS, N.** 2010. Caracterización molecular de aislados de campo del virus de bronquitis infecciosa aviar obtenidos en Chile. Tesis Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias, Mención Ciencias Avícolas. Santiago, Chile. U. Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 77 p.
- ROBERTS, J.R; BALL, W.; CHUBB, R.; SULAIMAN, A.; JOLLY, M.** 2004. Serological methods for infectious bronchitis in laying hens. *Proceedings of the 16th*

Australian Poultry Science Symposium, Sydney, New South Wales, Australia, 9-11 February 2004. Poultry Research Foundation. 157-160 p.

**-SAID, M.; ARAFA, A.; ROHAIM, M.; HUSSEIN, H.** 2017. Interference of maternal derived immunity against vaccination with baculovirus H5 and Nd inactivated vaccine in broilers. *Hosts and Viruses*. 4(3): 40-45.

**-SHIRZAD, M.; ASASI, K.; MOHAMMADI, A.** 2012. Efficacy of vaccination programmes using two commercial live infectious bronchitis vaccines against a field IRFIB 32 strain. *Bulg. J Vet Med*. 15(4): 260–272.

**-SMIALEK, M.; TYKALOWSKI, B.; DZIEWULSKA, D.; STENZEL, T.; KONCICKI, A.** 2016. Immunological aspects of the efficiency of protectotype vaccination strategy against chicken infectious bronchitis. *BMC Vet Res*. 13: 44.

**-TALEBI, A.; POURBAKHS, S.; DOROSTKAR, K.** 2005. Effects of vaccination routes against IB on performance and immune responses of broiler chickens. *Int J Poultry Sci*. 4(10): 795-798.

**-TERREGINO, C.; TOFFAN, A.; BEATO, M.; DE NARDI, R.; VASCELLARI, M.; MEINI, A.; ORTALI, G.; MANCINI, M.; CAPUA, I.** 2008. Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Path*. 37(5): 487-493.

**-TORO, H.; FERNANDEZ, I.** 1994. Avian Infectious Bronchitis: Specific Lachrymal IgA Level and Resistance against Challenge. *J. Vet. Med. B*. 41: 467-472.

**-TORO, H.; ZHAO, W.; BREEDLOVE, C.; ZHANG, Z.; YU, Q.; VAN SANTEN, V.** 2014. Infectious Bronchitis Virus S2 Expressed from Recombinant Virus Confers Broad Protection Against Challenge. *Avian Dis.*,58(1):83-89.

**-VALASTRO, V.; HOLMES, E.; BRITTON, P.; FUSARO, A.; JACKWOOD, M.; CATTOLI, G.; MONNE, I.** 2016. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infect Genet Evol*. 39: 349-364.

**-VAN LEERDAM, B.; KUHNE, P.** 2010. Diagnosis of IBV field challenge. [en línea]. <<http://www.poultryworld.net/Home/General/2010/7/Diagnosis-of-IBV-field-challenge-WP007714W/>> [consulta: 08-11-2017]

**-VÁSQUEZ, C.** 2009. Algunas consideraciones para la interpretación serológica en Elisa. [en línea]. <<https://www.engormix.com/avicultura/articulos/algunas-consideraciones-interpretacion-serologica-t28037.htm>> [consulta: 08-03-2018]

**-WALDEMAR, J.** 2008. Caracterización molecular de vacunas contra el virus de la Bronquitis infecciosa (IBV) presentes en el mercado chileno y de 3 aislados de campo históricos. Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Ciencias biológicas. Valdivia, Chile. U. Austral de Chile. Fac. de Ciencias. 71 p.

## ANEXOS

### Anexo 1-. Títulos de anticuerpos a los 14 días de edad con una vacuna Ma5 (1) aplicada al día de edad en seis grupos de pollos de engorde bajo condiciones comerciales.

Control negativo experimental	Grupo experimental vacunado	Grupo 1 campo	Grupo 2 campo	Grupo 3 campo	Grupo 4 campo	Grupo 5 campo	Grupo 6 campo
345 (-)	992 (+)	1 (-)	1 (-)	111 (-)	150 (-)	12 (-)	57 (-)
130 (-)	113 (-)	180 (-)	455 (+)	43 (-)	1 (-)	25 (-)	57 (-)
182 (-)	144 (-)	25 (-)	254 (-)	43 (-)	56 (-)	12 (-)	205 (-)
277 (-)	34 (-)	1 (-)	530 (+)	111 (-)	150 (-)	1 (-)	87 (-)
545 (+)	714 (+)	12 (-)	39 (-)	91 (-)	150 (-)	118 (-)	87 (-)
691 (+)	113 (-)	1 (-)	186 (-)	101 (-)	12 (-)	1 (-)	401 (+)
1284 (+)	34 (-)	84 (-)	128 (-)	82 (-)	1 (-)	86 (-)	72 (-)
142 (-)	170 (-)	107 (-)	74 (-)	1 (-)	1 (-)	1 (-)	1 (-)
223 (-)	113 (-)	99 (-)	56 (-)	15 (-)	223 (-)	41 (-)	105 (-)
375 (-)	229 (-)	237 (-)	375 (-)	43 (-)	1048 (+)	25 (-)	41 (-)
431 (+)	628 (+)	1 (-)	22 (-)	101 (-)	67 (-)	1 (-)	832 (+)
590 (+)	371 (-)	1 (-)	148 (-)	1 (-)	1 (-)	25 (-)	170 (-)
431 (+)	336 (-)	116 (-)	39 (-)	7 (-)	223 (-)	1 (-)	57 (-)
648 (+)	462 (+)	1 (-)	1 (-)	1 (-)	144 (-)	25 (-)	1 (-)
812 (+)	345 (-)	1 (-)	30 (-)	205 (-)	113 (-)	1 (-)	138 (-)
1144 (+)	390 (-)	1 (-)	1 (-)	235 (-)	223 (-)	1 (-)	1 (-)
736 (+)	407 (+)	116 (-)	1104 (+)	950 (+)	174 (-)	150 (-)	1 (-)
223 (-)	136 (-)	39 (-)	128 (-)	152 (-)	290 (-)	86 (-)	1 (-)
262 (-)	1170 (+)	116 (-)	186 (-)	1 (-)	994 (+)	41 (-)	12 (-)
825 (+)	925 (+)	196 (-)	223 (-)	7 (-)	425 (+)	41 (-)	41 (-)

Fuente: Elaboración propia. Títulos de anticuerpos. (-): valores positivos o negativos de títulos de anticuerpos, valor de corte: 396. (1) 1° vacuna Ma5 aplicada en Planta de Incubación por aspersion en los pollos de los grupos de campo y aplicada vía ocular en los pollos de los grupos experimentales. Títulos de anticuerpos 14 días post 1° vacunación.

**Anexo 2-. Títulos de anticuerpos a los 28 días de edad con una vacuna Ma5 (1) aplicada al día de edad y una vacuna 4/91 (2) aplicada a los 14 días de edad en seis grupos de pollos de engorde bajo condiciones comerciales.**

<b>Control negativo experimental</b>	<b>Grupo experimental vacunado</b>	<b>Grupo 1 campo</b>	<b>Grupo 2 campo</b>	<b>Grupo 3 campo</b>	<b>Grupo 4 campo</b>	<b>Grupo 5 campo</b>	<b>Grupo 6 campo</b>
9 (-)	736 (+)	1 (-)	82 (-)	985 (+)	25 (-)	86 (-)	41 (-)
111 (-)	603 (+)	188 (-)	324 (-)	172 (-)	25 (-)	56 (-)	72 (-)
341 (-)	530 (+)	91 (-)	1239 (+)	182 (-)	1 (-)	101 (-)	72 (-)
63 (-)	1114 (+)	164 (-)	148 (-)	1 (-)	25 (-)	1 (-)	1 (-)
18 (-)	2194 (+)	221 (-)	364 (-)	7 (-)	12 (-)	138 (-)	1 (-)
1 (-)	182 (-)	124 (-)	111 (-)	1 (-)	217 (-)	736 (+)	1 (-)
1 (-)	4755 (+)	172 (-)	156 (-)	1 (-)	1 (-)	205 (-)	57 (-)
52 (-)	1053 (+)	262 (-)	215 (-)	82 (-)	41 (-)	223 (-)	1 (-)
52 (-)	416 (+)	116 (-)	7 (-)	111 (-)	1 (-)	2062 (+)	205 (-)
9 (-)	1536 (+)	488 (+)	166 (-)	25 (-)	41 (-)	1 (-)	57 (-)
223 (-)	750 (+)	172 (-)	508 (+)	962 (+)	1 (-)	345 (-)	105 (-)
184 (-)	182 (-)	196 (-)	176 (-)	379 (-)	70 (-)	72 (-)	12 (-)
87 (-)	91 (-)	61 (-)	1488 (+)	225 (-)	134 (-)	292 (-)	12 (-)
1 (-)	1175 (+)	61 (-)	364 (-)	1057 (+)	1 (-)	948 (+)	12 (-)
1 (-)	130 (-)	196 (-)	148 (-)	82 (-)	25 (-)	345 (-)	138 (-)
122 (-)	277 (-)	188 (-)	343 (-)	368 (-)	1 (-)	345 (-)	120 (-)
9 (-)	662 (+)	188 (-)	883 (+)	162 (-)	1 (-)	105 (-)	1 (-)
41 (-)	488 (+)	76 (-)	581 (+)	132 (-)	1 (-)	1244 (+)	30 (-)
30 (-)	317 (-)	6 (-)	186 (-)	34 (-)	1 (-)	1711 (+)	9 (-)
87 (-)	3134 (+)	140 (-)	111 (-)	2084 (+)	25 (-)	1 (-)	67 (-)

Fuente: Elaboración propia. Títulos de anticuerpos. (-): valores positivos o negativos de títulos de anticuerpos, valor de corte: 396. (1) 1° vacuna Ma5 aplicada en Planta de Incubación por aspersión en los pollos de los grupos de campo y aplicada vía ocular en los pollos de los grupos experimentales. Títulos de anticuerpos 28 días post vacunación con la 1° vacuna. (2) 2° vacuna aplicada en Planta de Incubación por aspersión en los pollos de los grupos de campo y aplicada vía ocular en los pollos de los grupos experimentales. Títulos de anticuerpos 14 días post vacunación con la 2° vacuna.



**Anexo 3-. Títulos de anticuerpos a los 35 días de edad con una vacuna Ma5 (1) aplicada al día de edad y una vacuna 4/91 (2) aplicada a los 14 días de edad en seis grupos de pollos de engorde bajo condiciones comerciales.**

<b>Control negativo experimental</b>	<b>Grupo experimental vacunado</b>	<b>Grupo 1 campo</b>	<b>Grupo 2 campo</b>	<b>Grupo 3 campo</b>	<b>Grupo 4 campo</b>	<b>Grupo 5 campo</b>	<b>Grupo 6 campo</b>
1 (-)	1640 (+)	3047 (+)	812 (+)	479 (+)	1447 (+)	832 (+)	844 (+)
1 (-)	732 (+)	1718 (+)	174 (-)	2800 (+)	2932 (+)	623 (+)	1 (-)
1 (-)	248 (-)	1248 (+)	240 (-)	1057 (+)	134 (-)	4077 (+)	594 (+)
30 (-)	240 (-)	1845 (+)	174 (-)	936 (+)	734 (+)	2186 (+)	1623 (+)
52 (-)	353 (-)	2174 (+)	321 (-)	4821 (+)	2229 (+)	2166 (+)	154 (-)
1 (-)	1308 (+)	1384 (+)	650 (+)	842 (+)	56 (-)	1978 (+)	755 (+)
1 (-)	639 (+)	7888 (+)	1346 (+)	2084 (+)	70 (-)	1406 (+)	383 (-)
1 (-)	178 (-)	741 (+)	994 (+)	2124 (+)	70 (-)	3510 (+)	495 (+)
1 (-)	2439 (+)	4150 (+)	338 (-)	1728 (+)	1447 (+)	1166 (+)	725 (+)
1 (-)	675 (+)	488 (+)	597 (+)	2537 (+)	698 (+)	1406 (+)	874 (+)
1 (-)	666 (+)	603 (+)	321 (-)	9710 (+)	662 (+)	1609 (+)	103 (-)
1 (-)	1270 (+)	1248 (+)	407 (+)	819 (+)	1565 (+)	5100 (+)	2549 (+)
1 (-)	885 (+)	530 (+)	144 (-)	4192 (+)	166 (-)	718 (+)	396 (-)
30 (-)	2386 (+)	592 (+)	174 (-)	4342 (+)	1018 (+)	1344 (+)	20 (-)
275 (-)	399 (+)	1036 (+)	1423 (+)	1083 (+)	514 (+)	1444 (+)	510 (+)
9 (-)	628 (+)	82 (-)	793 (+)	759 (+)	166 (-)	1425 (+)	934 (+)
1 (-)	983 (+)	3047 (+)	223 (-)	1401 (+)	1885 (+)	2713 (+)	610 (+)
9 (-)	292 (-)	1004 (+)	1517 (+)	4248 (+)	86 (-)	1225 (+)	43 (-)
30 (-)	563 (+)	6794 (+)	1048 (+)	1514 (+)	25 (-)	2670 (+)	9 (-)
30 (-)	686 (+)	82 (-)	321 (-)	3236 (+)	570 (+)	4720 (+)	495 (+)

Fuente: Elaboración propia. Títulos de anticuerpos. (-): valores positivos o negativos de títulos de anticuerpos, valor de corte: 396(1) 1° vacuna Ma5 aplicada en Planta de Incubación por aspersion en los pollos de los grupos de campo y aplicada vía ocular en los pollos de los grupos experimentales. Títulos de anticuerpos 35 días post vacunación con la 1° vacuna, Ma5. (2) 2° vacuna aplicada en Planta de Incubación por aspersion en los pollos de los grupos de campo y aplicada vía ocular en los pollos de los grupos experimentales. Títulos de anticuerpos 21 días post vacunación con la 2° vacuna, 4/91.

**Anexo 4-. Media geométrica, Coeficiente de variación y títulos de anticuerpos individuales maternos de pollos de engorde al día 1 de edad.**

	2321 (+)
	2524 (+)
	1645 (+)
	3564 (+)
	1488 (+)
	1353 (+)
	3024 (+)
	1020 (+)
	5103 (+)
	2726 (+)
<b>Títulos de anticuerpos</b>	2141 (+)
	1459 (+)
	2625 (+)
	1353 (+)
	1558 (+)
	2932 (+)
	1392 (+)
	1674 (+)
	2635 (+)
	2411 (+)
<b>Media Geométrica</b>	2076,7
<b>CV</b>	43,1

Fuente: Elaboración propia. Títulos de anticuerpos. (+): valores positivos o negativos de títulos de anticuerpos, valor de corte: 396.

**Anexo 5-. Porcentajes de títulos de anticuerpos positivos y negativos para cada grupo y día de muestreo de pollos de engorde, determinados por el título de corte (396).**

Grupos	Día 1		Día 14		Día 28		Día 35	
	% (+)	% (-)	% (+)	% (-)	% (+)	% (-)	% (+)	% (-)
<b>Grupo experimental no vacunado</b>	100%	0%	55%	45%	0%	100%	0%	100%
<b>Grupo experimental vacunado</b>	-	-	35%	65%	70%	30%	75%	25%
<b>Grupo 1 campo</b>	-	-	0%	100%	5%	95%	90%	10%
<b>Grupo 2 campo</b>	-	-	15%	85%	25%	75%	50%	50%
<b>Grupo 3 campo</b>	-	-	5%	95%	20%	80%	100%	0%
<b>Grupo 4 campo</b>	-	-	15%	85%	0%	100%	60%	40%
<b>Grupo 5 campo</b>	-	-	0%	100%	25%	75%	100%	0%
<b>Grupo 6 campo</b>	-	-	10%	90%	0%	100%	60%	40%

Fuente: Elaboración propia.

**Anexo 6-. Certificado de aprobación del comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile**



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias**  
Comité de Bioética Animal

*Santiago, 19 de junio de 2015*

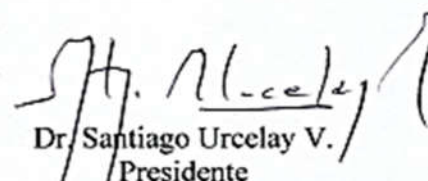
**CERTIFICADO N° 17-2015**

En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, tenida a la vista la metodología del Proyecto: **“Evaluación serológica de la respuesta inmune de pollos en condiciones de campo a un programa no convencional de vacuna contra bronquitis infecciosa”**. Dicho proyecto corresponde a la Memoria de Título de la estudiante Paulina Torres C., donde el Investigador Responsable será el **Dr. Héctor Hidalgo O.**, y sus detalles contenidos en el Formulario para obtención de certificado de Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, este Comité certifica que el Proyecto satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité, y se ajusta a la legislación chilena vigente sobre la materia, incluida la Norma NCh 324-2011.

A este respecto este Comité entiende que el Investigador Responsable trabajará con un máximo de 480 pollos broiler (*Gallus gallus*). El grupo control será mantenido en el recinto comercial mientras que los individuos tratados serán mantenidos en el Galpón Experimental del Laboratorio de Patología Aviar de FAVET. Los 36 pollos experimentales serán sacrificados al término del experimento de acuerdo a los detalles contenidos en el formulario.

  
Dra. Tamara Tadic G.  
Director  
Comité de Bioética Animal



  
Dr. Santiago Urcelay V.  
Presidente  
Comité de Bioética Animal