



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

**EVALUACIÓN SEROLÓGICA DEL PLAN DE VACUNACIÓN
CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA EN GALLINAS
PONEDORAS DE DIFERENTES EDADES DE UN PLANTEL
COMERCIAL**

Daniela del Pilar Marchant Cantillana

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

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

SANTIAGO, CHILE
2016



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

**EVALUACIÓN SEROLÓGICA DEL PLAN DE VACUNACIÓN
CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA EN GALLINAS
PONEDORAS DE DIFERENTES EDADES DE UN PLANTEL
COMERCIAL**

Daniela del Pilar Marchant Cantillana

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA : DR. HÉCTOR HIDALGO OLATE
PROFESOR CONSEJERO: DRA. ANA MARÍA RAMÍREZ
PROFESOR CONSEJERO: DR. PATRICIO RETAMAL

SANTIAGO, CHILE
2016

DEDICATORIA

*A Dios.
A mi familia y amigos.
A la Naturaleza, que a diario me sorprende.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mis amados padres, Daniel y Pilar, por haberme dado la vida, por entregarme valores, y por apoyarme durante todo el tiempo que dediqué a la realización de esta memoria. A mi abuelita Margarita, por mostrarme la vida con bondad y cariño. A mi primo Danilo, por hacerme reír y alegrar muchos de mis días.

A Miguel Correa, por ser mi compañero de vida, por apoyarme durante todo el paso por la Universidad, y animarme a no ceder en los momentos de angustia.

A mi profesor guía, el Dr. Héctor Hidalgo, por su constante apoyo y enseñanzas durante todos estos años. También, a mis profesores consejeros, la Dra. Ana María Ramírez y el Dr. Patricio Retamal, por destinar parte de su tiempo a corregir y perfeccionar mi memoria de título. A la Dra. Valeria Rojas, por su paciencia y tiempo. A Miguel Martínez, por su valiosa colaboración en la realización de la parte práctica de esta memoria.

A mis grandes amigos, Raimundo Espejo, Isabel Cayul, Paulina Torres y Carolina Toledo, quienes sacrificaron tiempo valioso de sus vidas para ayudarme en terreno.

A Ramón Molina “Don Moncho”, Paola Rivera, Fernando Navarrete, a la Dra. Sofía Egaña y al Dr. Miguel Guzmán, por sus acertados consejos en la realización del trabajo en laboratorio.

A Daniela Gallardo y Valeria Alcayaga, por su incondicional ayuda en los detalles finales de la presentación.

También, quisiera agradecer a algunas personas que no participaron en la realización de este trabajo, pero que si contribuyen a mi crecimiento personal y espiritual. A mi guía de montaña, Juan Espinoza, por darme confianza para alcanzar y superar no sólo las cumbres de las montañas, sino que todas las “cumbres” que se imponen día a día. También, a todos mis amigos y amigas, de la vida, de la universidad, del laboratorio, de todas partes, por formar parte de mi vida y por estar siempre en todas las circunstancias de ésta. Y, finalmente, agradecer a mis perritos, mis ángeles, quienes me acompañaron durante todos estos años en la Universidad: Toy y Winnie, quienes ya partieron; y a Monín, quien alegra mis días hoy en día.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA	4
2. GENERALIDADES DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA	5
3. VÍAS DE TRANSMISIÓN DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA	6
4. PERIODOS DE INCUBACIÓN Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA	7
5. SITUACIÓN MUNDIAL DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA	8
6. SITUACIÓN EN CHILE DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA	8
7. IMPACTO ECONÓMICO DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA	9
8. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA BRONQUITIS INFECCIOSA	9
8.1 LA SEROLOGÍA COMO HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO PARA BRONQUITIS INFECCIOSA	10
8.2 LA PRUEBA DE ELISA	10
9. ASPECTOS BÁSICOS DE LA RESPUESTA INMUNE A LA BRONQUITIS INFECCIOSA	11
10. MÉTODOS DE CONTROL DE LA INFECCIÓN POR BRONQUITIS INFECCIOSA	12
10.1 CONTROL	12
10.2 BIOSEGURIDAD	13
10.3 VACUNAS	13
10.3.1 VACUNACIÓN A NIVEL MUNDIAL CONTRA LA BRONQUITIS INFECCIOSA	14
10.3.2 VACUNACIÓN EN CHILE CONTRA LA BRONQUITIS INFECCIOSA	15
10.4 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE A LAS VACUNAS CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA	15
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	18

1. MATERIALES	18
1.1.1. AVES.....	18
1.1.2. GRANJAS Y SECTORES.....	19
1.1.3. MUESTRAS	19
1.1.4. PRUEBA DE DIAGNÓSTICO	22
1.1.4.1. EQUIPAMIENTO.....	22
1.1.4.2. REACTIVOS.....	23
2. MÉTODOS.....	23
2.1.1. EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA	23
2.2.2. CUMPLIMIENTO DE LAS NORMAS DE BIOÉTICA.....	24
2.2.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	24
2.2.4. EJECUCIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA	24
2.2.5. ENTREGA DE RESULTADOS SEROLÓGICOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38
ANEXO	45

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°1: Distribución de las aves en el plantel productor de huevos de consumo de múltiples edades, considerando edad y número de vacunas aplicadas.	21
TABLA N°2: Plan de vacunación contra BI aplicado a las gallinas en el plantel de producción de huevos considerando su edad.	22
TABLA N°3: Títulos de anticuerpos contra BI correspondientes a 25 lotes de gallinas de diferentes edades y según vacunas aplicadas, expresadas como MG y sus respectivos CV.	27
TABLA N°4: Títulos de anticuerpos contra BI de lotes de gallinas según número de vacunas aplicadas.	30
TABLA N°5: Títulos de anticuerpos contra BI de sectores con gallinas que presentan siete vacunas aplicadas.	31
TABLA N°6: Títulos de anticuerpos contra BI de sectores con gallinas que presentan ocho vacunas aplicadas.	31

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N°1: Títulos de anticuerpos contra BI de 25 lotes de gallinas de diferentes edades y según el número de vacunas, expresadas por su MG.	28
GRÁFICO N°2: Títulos de anticuerpos contra BI de los 25 lotes de gallinas, agrupados en los 8 sectores productivos de la empresa, expresados como MG del sector.	29

RESUMEN

Se realizó la prueba de ELISA para evaluar la respuesta serológica de gallinas ponedoras comerciales según el plan de vacunación contra la Bronquitis Infecciosa (BI) aplicado en un plantel comercial, consistente en 8 vacunas vivas aplicadas al día de edad, 4, 7, 10, 14, 17, 20 y 70 semanas de edad. Un total de 500 gallinas constituyó la muestra de 25 lotes de gallinas de diferentes edades y número de vacunas aplicadas (20 sueros de cada lote). Estos lotes de gallinas estaban alojados en distintos sectores de esta empresa. Los lotes de gallinas con 6, 7 y 8 vacunas aplicadas, presentaron títulos de anticuerpos contra BI con una Media Geométrica (MG) de 1137 a 6612. El análisis estadístico según el número de vacunas aplicadas, demostró que hubo un incremento significativo de los títulos de anticuerpos después de 6 vacunas, al obtenerse una Media Aritmética (MA) de 2341; y vuelve a haber un incremento significativo a una MA de 4711 con 7 vacunas. Sin embargo, con 8 vacunas se logra una MA de 4434, que es estadísticamente similar a la anterior. El análisis estadístico de los sectores de gallinas con 7 vacunas, demuestra títulos de anticuerpos contra BI con una MA de 2887 a 6193, que estadísticamente se puede diferenciar en dos grupos principales. Los sectores de gallinas con 8 vacunas presentaron títulos de anticuerpos con una MA en un rango de 3799 a 5622, que también se diferencian, en dos grupos estadísticamente diferentes. Se concluyó que los títulos de anticuerpos obtenidos de diferentes lotes de gallinas, son compatibles con la información bibliográfica y manuales técnicos de la prueba de ELISA. Además, la diversidad de títulos de anticuerpos obtenidos entre los distintos lotes o sectores de gallinas, con o sin número de vacunas similares, pueden estar influenciadas por las diferencias temporales de la aplicación de las vacunas, diferencias estructurales de los galpones y los sectores, diferencias de las vacunas, diferencias de manejo y personal de vacunación, entre otros factores.

Palabras clave: Bronquitis Infecciosa, vacunas, títulos de anticuerpos.

ABSTRACT

ELISA test was performed to evaluate serological response of commercial laying hens according to a vaccination plan against Infectious Bronchitis (IB) applied in a commercial farm. Five hundred laying hens were sampled from 25 flocks of different ages and number of vaccines given (20 sera from each flock). Flocks were located in different sectors of the farm. Flocks of hens with 6, 7 and 8 vaccines given, showed antibody titers against IB with a Geometric Mean (GM) from 1137 to 6612. The statistical analysis according to the number of applied vaccines, showed that there was a significant increase in antibody titers after 6 vaccines with an Arithmetic Mean (AM) of 2341; and again there was a significant increase of the AM to 4711 with 7 vaccines. However, with 8 vaccines, the AM of 4434 was statistically similar to the previous group. Statistical analysis of the hen sectors with 7 vaccines showed antibody titers against IB with an AM of 2887 to 6193, which statistically can be differentiated into two main groups. Sectors of hens with 8 vaccines, exhibited antibody titres with an AM in a range of 3799 to 5622, which also differ in two statistical different groups. It was concluded that antibody titers obtained from different flocks of hens are consistent with literature and technical guidelines for ELISA test. In addition, the diversity of antibody titers obtained among flocks or sectors of birds, with or without number of similar vaccines, may be influenced by temporary differences in the application of vaccines, structural differences of the facilities and building sectors, differences associated to vaccines, differences of management and vaccination staff, among others.

Key words: Infectious Bronchitis, vaccines, antibody titers.

INTRODUCCIÓN

La producción avícola en Chile se orienta principalmente hacia dos tipos de producción: la de carne y la de huevos. La industria se caracteriza por tener integración vertical, ser altamente tecnificada y ser de tipo intensiva (Covacevic y Esnaola, 2010).

En nuestro país, existen aproximadamente 47,7 millones de aves destinadas a fines productivos. Del total de aves, 26,7% corresponde a productoras de huevos para consumo (aproximadamente 12,7 millones de aves). En Chile, la industria del huevo está conformada por un gran sector industrial y una producción de traspatio (pequeños productores), cuya producción es menos relevante para la economía, sin embargo, juega un rol socioeconómico de importancia. El sector primario está en manos de aproximadamente 300 productores, dentro de los cuales destacan sólo once grandes productores y comercializadores que se ubican básicamente en la zona central del país (Giacomozzi, 2014).

Hoy en día, la industria avícola está creciendo e intensificándose cada vez más, por lo que se hace necesario ser competitivo para así obtener buenos rendimientos económicos. La bioseguridad es una disciplina que tiene mucho que aportar, ya que otorga directrices para prevenir y controlar enfermedades, que son uno de los principales factores que influyen en el éxito del rendimiento en la industria. Hay manejos prácticos que aportarán significativamente a la bioseguridad, tales como el control ambiental, el establecimiento de zonas seguras, la medicación, limpieza y desinfección, sin embargo, uno de los manejos más importantes es el de la vacunación. La vacunación, si se entrega correctamente a través de un programa establecido según la situación epidemiológica de cada granja en particular, puede prevenir y controlar la enfermedad en ese determinado lugar (Lister, 2008).

Dentro de las enfermedades que afectan las aves, la Bronquitis Infecciosa (BI) es una de las que tienen mayor distribución mundial y es ampliamente transmisible en pollos y gallinas que no están protegidas. Esta enfermedad se caracteriza porque su principal manifestación clínica es respiratoria. No obstante, el virus puede afectar el tracto reproductivo de las gallinas, traduciéndose esto en alteración de la calidad de los huevos, tanto interna como externa, además de una merma en la producción de huevos, lo que finalmente se traduce en pérdidas económicas para el plantel afectado (Cook *et al.*, 2012).

El control de la BI permite evitar las pérdidas económicas asociadas a su presentación en un plantel. Éste se complica aún más en los sistemas de producción de huevos, debido a la crianza de múltiples edades que ahí se realiza. Las medidas de

bioseguridad han resultado ser un gran aporte para controlar la BI, sin embargo la vacunación es esencial para aumentar la protección inmunológica contra el desafío con cepas del virus de la Bronquitis Infecciosa (VBI) (De Wit *et al.*, 2011). Para saber si las vacunas aplicadas están efectivamente funcionando se deben medir los niveles de anticuerpos circulantes en sangre y para esto se requiere el uso de pruebas serológicas. En la literatura se recomiendan varias pruebas, pero debido a que en condiciones de campo se requiere evaluar un gran número de animales y rápidamente, la prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es la alternativa ampliamente recomendada y usada (Eterradosi y Britton, 2013).

El objetivo del presente estudio es evaluar la respuesta inmune otorgada por el plan de vacunación contra BI en una empresa productora de huevos de consumo con sistema de múltiples edades, para lo cual se utilizó la prueba de ELISA, pues con esta prueba se detecta anticuerpos contra este patógeno en los sueros de las aves pertenecientes a este plantel productivo y su nivel de vacunación.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Características generales del Virus de la Bronquitis Infecciosa

El VBI es un virus que pertenece al orden Nidovirales, Familia Coronaviridae, Subfamilia Coronavirinae, Género Gammacoronavirus (Jackwood y De Wit, 2013). Es un virus envuelto, que tiene forma redondeada a pleomórfica. Tiene un diámetro de aproximadamente 120 nm con proyecciones de superficie en forma de clavo, de aproximadamente 20 nm de longitud, que le dan su característica forma de corona. Contiene una cadena simple de RNA en sentido positivo. El virión contiene tres grandes proteínas estructurales principales denominadas glicoproteína de la espícula (S), glicoproteína de membrana (M) y nucleoproteína interna (N). Además, hay pequeñas cantidades de una cuarta proteína de la envoltura (E), la cual es esencial para el ensamblaje del virus. La glicoproteína S contiene un receptor para la unión del virus a las células, una región de "partición" (unión entre las subunidades S1 y S2), péptidos de fusión y secuencias repetitivas (denominadas "*heptad*", que facilitan la entrada del virus a las células del hospedador), región transmembránica y cola citoplasmática (que ancla la espícula a la membrana del virus). La porción S1 es responsable de la unión del virus a moléculas receptoras en la célula del hospedero y en esta subunidad se encuentran los epitopos neutralizantes de anticuerpos,

mientras que la porción S2 es responsable de la fusión de la membrana del virión con la membrana de la célula huésped, para liberar el genoma viral a la célula. La fosfoproteína N encapsula el genoma viral para formar la nucleocápside helicoidal dentro del virión e interactúa con las proteínas M y E para el ensamblaje del virus (Cavanagh, 2007; Jackwood y De Wit, 2013; Balestrín *et al.*, 2014).

Como ya había sido mencionado previamente, el Coronavirus tiene un RNA de hebra simple, en sentido positivo. Su extremo 5' de aproximadamente 20 a 22 kb contiene el gen de la replicasa, que codifica para las enzimas que participan en la multiplicación del virus. Los productos de la replicasa son codificados dentro de dos grandes fragmentos de lectura, ORF 1a y 1b, los cuales son traducidos en dos grandes polipéptidos, pp1a y pp1ab. Las proteínas estructurales son codificadas desde el primer tercio del segmento 3' del genoma (Jackwood, 2012).

El virus es termolábil, es inactivado después de 15 minutos a 56°C y tras 30 minutos a 60°C. Es capaz de soportar un amplio rango de pH (pH 2 - 12) dependiendo de la cepa, la temperatura y el tiempo de exposición. Al ser un virus envuelto, es sensible a la mayoría de los desinfectantes comunes (Jackwood y De Wit, 2013).

2. Generalidades de la infección por el Virus de la Bronquitis Infecciosa

El VBI está distribuido en todo el mundo, siendo *Gallus gallus* la principal especie afectada. Pollos y gallinas de todas las edades son susceptibles de contraer el virus (Jackwood y De Wit, 2013).

Hay una gran variedad de serotipos que se han reportado en los diferentes países. El serotipo de más alta frecuencia de presentación a nivel mundial es el Massachusetts (Mass), y en menor medida el Connecticut (Conn), siendo el serotipo Mass el que se utiliza en la preparación de vacunas comerciales de mayor uso en la industria avícola (Jackwood, 2012; Villegas-Narváez, 2012). Estos dos serotipos, principalmente el Mass, han servido de modelos de comparación cuando se aíslan nuevas cepas del virus. Todas las aves en un galpón se pueden infectar, pero la gravedad de la enfermedad es variable y depende de algunos factores como la virulencia del serotipo infectante, edad del ave, estado inmunitario o la presencia de infecciones bacterianas secundarias en el ave (Cavanagh y Gelb, 2008).

La patogénesis comienza como una infección del tracto respiratorio alto. El virus

replica y produce lesiones en muchos tipos de células epiteliales, incluyendo aquellas del tracto respiratorio (cornetes nasales, glándula de Harder, tráquea, pulmones y sacos aéreos), riñones y gónadas (Cavanagh y Gelb, 2008). Después de la infección, sigue una desciliación del epitelio ciliado de la tráquea, además de la posibilidad de desarrollar infecciones bacterianas secundarias. El virus puede crecer, además, en otros tejidos como el riñón, en donde se asocia con nefritis de grado variable, y también en oviducto, lo que se cree que contribuiría a disminuir la producción de huevos (Cavanagh, 2007). Este tropismo tisular varía según el serotipo presente (Bezuidenhout *et al.*, 2011).

Dependiendo de la cepa, en el caso de las gallinas ponedoras, el virus puede encontrarse en el epitelio del oviducto entre 6 a 9 días post infección (dpi). Se producen áreas de hipoplasia glandular, la que conduce a una reducción en la síntesis de las proteínas de la albúmina, especialmente ovomucina, lisozima y otras proteínas que constituyen la matriz estructural de la albúmina gruesa. Todo lo anterior genera una albúmina de aspecto líquido, producto de la disminución de la proporción de la albúmina delgada y gruesa. En el caso de pollitas de menos de dos semanas que se infectan con el virus, se puede producir en ellas un daño permanente en su tracto reproductivo. Estas aves infectadas, al alcanzar su madurez sexual, no entran en postura y estas gallinas se conocen como “falsas ponedoras”. El tercio medio del oviducto es el más afectado, produciéndose áreas de hipoplasia localizada, en el área posterior es posible encontrar quistes macroscópicos llenos de líquido seroso. En general, se ven afectadas las células epiteliales del oviducto (Dhinakar y Jones, 1997).

3. Vías de transmisión del Virus de la Bronquitis Infecciosa

La transmisión del patógeno es sólo de tipo horizontal. El virus se disemina rápidamente entre las aves de un lote (Cavanagh y Gelb, 2008), ya que es altamente infeccioso y se transmite por vía respiratoria y a través de las heces (De Wit *et al.*, 2011). Además, se puede transmitir indirectamente por propagación mecánica, mediante los utensilios para las aves de corral contaminados o el material de embalaje de huevos, visitas a las granjas, etc. (Jackwood y De Wit, 2013).

4. Período de incubación y manifestaciones clínicas del Virus de la Bronquitis Infecciosa

La infección por el VBI tiene un corto período de incubación, que va desde las 18 a 36 horas, mientras que la aparición de los signos clínicos ocurre al cabo de 24 a 48 horas post inoculación (Cavanagh y Gelb, 2008)

Los signos clásicos de la BI son principalmente respiratorios y comprenden básicamente: jadeo, tos, estornudos, estertores y descarga nasal. En el caso de las gallinas en postura los signos característicos son una marcada baja en la producción de huevos y un incremento en la postura de huevos de mala calidad, tanto interna como externa. Esto se manifiesta en huevos deformes o sin cáscara. La albúmina puede verse delgada y acuosa sin una demarcación definida entre la albúmina delgada y gruesa del huevo fresco normal. La severidad en la caída de la producción puede variar con el periodo de la puesta y la cepa causante. Pueden pasar de 6 a 8 semanas antes del regreso de la producción al nivel anterior a la infección, pero esto a veces nunca se logra. La infección por VBI en pollas de un día de edad puede producir daño permanente en los oviductos, lo que lleva a reducir la producción de huevos y también en su calidad cuando las pollas entran en etapa de postura. La severidad en las lesiones de oviducto es probable que sea menor en casos de que la infección aqueje a aves más viejas (Cavanagh y Gelb, 2008; Cook *et al.*, 2012).

Dentro de los signos que se pueden encontrar, y que son causados por el virus, son: exudado seroso, catarral o caseoso en tráquea, cornetes nasales y senos; también es posible encontrar lesiones *post mortem* tales como: riñones pálidos e inflamados, con túbulos distendidos y uréteres con cristales de urato en caso de cepas nefropatogénicas (Cook *et al.*, 2012). En la literatura se señala, también, casos de “falsas ponedoras” o ponedoras silentes, que son gallinas que al momento de iniciar su etapa de postura no ponían huevos y que, a la necropsia, se evidenció la presencia de oviductos no desarrollados o císticos, aunque los ovarios permanecieron normales (Cook *et al.*, 2012). En el caso de infecciones secundarias, se incluyen: septicemia bacteriana, aerosaculitis, pericarditis y perihepatitis (De Wit *et al.*, 2011).

5. Situación mundial de la Bronquitis Infecciosa

La BI es de 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. 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).

La variante conocida como 4/91 (también llamada 793B) fue reportada por primera vez en el Reino Unido y Francia, se encuentra en varias partes del mundo, excepto Estados Unidos (Cook, *et al.*, 2012).

Los dos tipos más importantes en China son QX y Q1. El virus tipo Q1 se ha reportado en varias partes del mundo (Jackwood, 2012).

6. Situación en Chile de la Bronquitis Infecciosa

En Chile, el primer reporte de la enfermedad data del año 1967, en donde García y Norambuena lograron el diagnóstico serológico del virus (García y Norambuena, 1969). No fue hasta el año 1976 en que Hidalgo y colaboradores reportaron el primer aislamiento del virus en pollos de engorde, aislándose el serotipo Mass (Hidalgo *et al.*, 1976). Entre los años 1981 y 1983 se reportan aislados de cepas del VBI que afectaron los riñones, produciendo un cuadro de nefritis-nefrosis (Gallardo y Olivares, 1984). Durante la década del 80, se describieron en el país, aislados del VBI obtenidos de pollos broilers o gallinas con problemas respiratorios a pesar de estar vacunadas contra BI con cepas Mass (Hidalgo *et al.*, 1986). En 1989 se comunica la evidencia serológica de algunos lotes de aves positivos al serotipo D 207 (Hidalgo, 2010).

El año 1991, se reporta la tipificación de nueve aislados del VBI mediante la técnica de seroneutralización cruzada, señalando que cinco de esos aislados se relacionaban serológicamente con el tipo Mass y uno con el tipo Conn. Los otros tres aislados no presentaron relación antigénica con una gran cantidad de cepas del virus, procedentes de diferentes países y caracterizadas a través de varios años (Cubillos *et al.*, 1991).

Años más tarde, se logra detectar y caracterizar genéticamente aislados del VBI en Chile y se evidenció la gran similitud de éstos con cepas de Estados Unidos, Europa, Australia y Nueva Zelanda (López *et al.*, 2006).

Durante el año 2009, se presentó en el país un brote de BI afectando la población de broilers y gallinas ponedoras, a pesar de estar vacunados con la cepa Mass. De estos casos clínicos, se identificaron y caracterizaron nueve aislados de casos chilenos de VBI a través de RT-PCR y posterior secuenciación (Rivas, 2010). Basados en el análisis filogenético, estos aislados fueron definidos como variante chilena al serotipo Mass, y genótipicamente similares a la cepa de origen chino Q1, y con una baja relación genotípica con serotipos comunes como Mass (Jackwood, 2012).

7. Impacto económico del Virus de la Bronquitis Infecciosa

Aunque el virus no tiene mayor trascendencia en salud pública, si representa un gran factor de pérdidas económicas a nivel mundial. Esto se ve manifestado, en el caso de pollos de engorde, en un deficiente rendimiento, debido a un deterioro en la conversión alimenticia y reducción en la ganancia de peso. Para el caso de reproductoras y gallinas ponedoras, se registran caídas en la producción de huevos, que pueden oscilar entre un 2% a un 70% en los lotes afectados, y se producen además alteraciones tanto en su calidad externa (los huevos están deformes, tienen cáscara rugosa o blanda) como interna, en donde la albúmina se observa delgada y acuosa, sin una clara demarcación entre la albúmina gruesa y delgada en comparación a un huevo fresco normal (Ulloa *et al.*, 1992; Cavanagh y Gelb, 2008; Cook, *et al.*, 2012).

8. Métodos de Diagnóstico para Bronquitis Infecciosa

Para determinar la presencia o ausencia de BI en los planteles, se hace necesario realizar pruebas de laboratorio. Estos métodos se pueden dividir en dos grupos: los métodos directos (que identifican al agente) y los métodos indirectos (aquellos que demuestran una respuesta serológica contra el agente). Dentro de los métodos directos, se cuenta el aislamiento del virus en huevos embrionados, cultivo en anillos traqueales y métodos moleculares como por ejemplo la técnica de reacción de la polimerasa en cadena con transcriptasa inversa (RT-PCR); mientras que en los métodos indirectos se agrupan las pruebas que detectan anticuerpos, tales como la neutralización viral (NV), la inhibición de la hemoaglutinación (IH), la inmunodifusión en gel de agar (AGPT) y la prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (De Wit, 2000).

8.1. La serología como herramienta de diagnóstico para Bronquitis Infecciosa.

Las pruebas serológicas se pueden utilizar como método de diagnóstico propiamente tal, como monitoreo del estado de salud del plantel y monitoreo vacunal (Aleksejuniene *et al.*, 2006). En el caso específico de la BI, el serodiagnóstico permite la detección de exposición al virus o alguna de sus partes, y esto se refleja en un aumento en los títulos de anticuerpos. Se han realizado muchos estudios para comparar pruebas, y, pese a que las condiciones experimentales en los ensayos realizados varía, así como también el rendimiento de las pruebas, en estas publicaciones se señala que, en general, los anticuerpos se detectan más rápidamente mediante ELISA, en segundo lugar por la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH), luego por la prueba de Precipitación en Gel de Agar (PPGA) y finalmente por la prueba de virus neutralización (De Wit, 2000).

8.2. La prueba de ELISA

La técnica ELISA es un método serológico sensible. Detecta y mide los niveles (títulos) de anticuerpos contra BI circulantes en sangre. Esta prueba presenta una serie de ventajas: detecta reacciones más rápidas y títulos de anticuerpos más altos que otras pruebas (Mockett y Darbyshire, 1981). Carece de especificidad de cepa o de tipo, pero es valioso para analizar respuestas a la vacunación en condiciones de campo, o para dar una indicación de posible infección de campo (Álvarez *et al.*, 2009; Cook *et al.*, 2012; Eterradosi y Britton, 2013). Es una herramienta muy valiosa, de bajo costo y fácil de usar para el serodiagnóstico del VBI y, por ende, para descartar de manera rápida y fácil otras causas comunes de enfermedad respiratoria y que, debido a su presentación clínica, podría confundirse con la BI (Gelb y Jackwood, 2008). Por todas las razones anteriormente expuestas, la prueba de ELISA es la más ampliamente utilizada en condiciones de campo (Aleksejuniene *et al.*, 2006). Hay dos formatos de ELISA: directo e indirecto, siendo el formato de tipo indirecto el que se usó en el presente estudio. Hay que considerar que el análisis de muestras de sueros a intervalos de tiempo, vale decir, realizar un muestreo al momento de manifestarse la sintomatología en caso de presentarse la enfermedad y dos a tres semanas después, proporciona la mejor base para un diagnóstico serológico. Lo recientemente señalado también es aplicable para el chequeo de la respuesta serológica a las vacunaciones (Anón, 2013).

9. Aspectos básicos de la respuesta inmune a la Bronquitis Infecciosa

Todos los animales, independiente de su complejidad, deben ser capaces de excluir a los patógenos que pudieran causar enfermedad o muerte. Los mecanismos de defensa involucrados en la defensa de cualquier enfermedad, incluida la BI, son de dos tipos: innato y adquirido. La inmunidad innata incluye barreras anatómicas (piel, cilios traqueales, membranas mucosas), barreras fisiológicas (fiebre, enzimas, fluidos corporales, pH), células de respuesta inflamatoria y el sistema de complemento. La inmunidad adquirida incluye los mecanismos de respuesta celular y humoral dependiente de los órganos linfoides del sistema inmune (Tizard, 2012a). Ambos sistemas están ampliamente integrados en la respuesta inmune contra VBI (Jackwood y De Wit, 2013).

Uno de los primeros componentes reactivos de la inmunidad innata contra la infección del VBI es la hiperplasia de células caliciformes y las glándulas mucosas alveolares, lo que conduce a la descarga nasal seromucosa y exudado catarral en la tráquea. Aproximadamente, cinco días después, se activan otros componentes inmunes del sistema inmune innato como heterófilos, macrófagos, células asesinas naturales, mastocitos, basófilos y eosinófilos (Chhabra *et al.*, 2015).

La inmunidad activa permite la activación de los mecanismos efectores de antígenos específicos, incluidas las células B, células T, macrófagos y la producción de células de memoria leucocitarias, que desempeñan un papel importante en la inmunidad antiviral contra VBI (Tizard, 2012b).

Inmunidad mediada por células: los Linfocitos T (LT) son células del sistema inmune que ya han pasado su periodo de transformación en el timo, y se encargan de regular inmunorreacciones mediadas por células (Tizard, 2012b). Se reconoce el rol de los LTCD8 en la eliminación del virus desde pulmones o riñones (para cepas nefropatogénicas) en la fase aguda de la infección (Jackwood y De Wit, 2013). La actividad de los linfocitos T citotóxicos depende del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y la lisis del virus depende de la actividad de los LTCD4 y LTCD8. Las células TCD8 (linfocitos T citotóxicos) desempeñan un papel dominante en las primeras etapas de la infección por VBI. Sin embargo, las células T CD4 (linfocitos T colaboradores) y las células B podrían ser más críticas para el control de virus a largo plazo (Chhabra *et al.*, 2015).

Inmunidad humoral: una vez producida la inmunoestimulación, los linfocitos B se diferencian a células plasmáticas y secretan anticuerpos, ya sea en presencia o en ausencia de

LThelper. De esta manera, se desarrolla una respuesta humoral que puede ser medida en suero, ya sea por las pruebas de ELISA, IH o VN. Cabe mencionar que los LB son células del sistema inmune que pasaron su proceso de diferenciación en la Bolsa de Fabricio (Tizard, 2012c; Ratcliffe y Härtle., 2014; Chhabra *et al.*, 2015). Los anticuerpos son formas solubles secretadas por los linfocitos B en los líquidos del organismo y todos pertenecen a una clase de proteínas denominadas inmunoglobulinas (Ig) (Tizard, 2012d). En el caso de la BI, los anticuerpos se producen ya sea por vacunación o infección (Jackwood y De Wit, 2013).

Las Ig son un tipo de glicoproteínas (Härtle *et al.*, 2014): En las aves, se reconocen tres tipos de Ig:

Ig Y: En los mamíferos se conoce como Ig G. Son las principales inmunoglobulinas efectoras de la inmunidad humoral. Presente en la fase tardía de la infección o de la respuesta serológica, es la inmunoglobulina determinada en las pruebas serológicas (HI/ELISA). Las IgG anti VBI se pueden detectar en suero dentro de los 4 dpi, alcanzando un máximo de concentración alrededor de los 21 dpi, Manteniendo un alto título restante por varias semanas (Tizard, 2012e).

Ig M: Primera inmunoglobulina en aparecer luego de un primer estímulo antigénico. Son consideradas como la primera línea de defensa en caso de infección con el VBI. Los títulos de anticuerpos se mantienen por menos tiempo que los de la IgG (Tizard, 2012e).

Ig A: Primer mediador de la inmunidad local. (Tizard, 2012e). Las IgA anti VBI pueden ser detectadas en la lámina propia, lavados traqueales y entre las células epiteliales de la traquea de aves infectadas, también en fluidos lacrimales. Los títulos detectables en este último fluido se pueden detectar a partir de las 48 horas post infección, detectándose hasta los siete dpi (Chhabra *et al.*, 2015).

10. Métodos de control de la infección por Bronquitis Infecciosa

10.1. Control

El control de la enfermedad es extremadamente difícil, debido a la ausencia de protección cruzada entre los diversos serotipos y virus variantes, lo que confirma la habilidad del virus para cambiar rápidamente y adaptarse al hospedero (Jackwood, 2012). Los métodos actuales de producción, que incluyen limitados tiempos de limpieza y desinfección

entre lotes de pollos de engorde, y la mantención de lotes de múltiples edades en el caso de gallinas ponedoras, hacen que el control sea más difícil de alcanzar. Pese a lo anterior, si se sigue un planteamiento bien coordinado entre medidas de bioseguridad e higiene, el sistema *all in- all out* y un adecuado plan de vacunación, son medidas que permiten prevenir y controlar la enfermedad (Pena *et al.*, 2005; Cavanagh y Gelb, 2008; De Wit *et al.*, 2011).

10.2. Bioseguridad

Dentro de las medidas de bioseguridad, los investigadores coinciden que controlar y limitar el acceso a las granjas, usar calzado y equipo separado por granja y el uso de pediluvios a la entrada de granjas o galpones, además de medidas básicas de higiene, y permitir un tiempo de descanso entre lotes sucesivos (sistema *all in- all out*), disminuyen considerablemente el riesgo de introducir el virus. Estas medidas deben extremarse cuando se habla de granjas de múltiples edades (Di Fábio y Rossini, 2000; Cavanagh y Gelb 2008).

10.3. Vacunas

Las vacunas son el método más eficiente y rentable para controlar enfermedades infecciosas en los animales. Tienen como fin proteger al individuo de la enfermedad, actuando contra los microorganismos. En el caso de un plantel de aves, es muy difícil considerar la inmunidad de cada individuo en particular, es por ese motivo que se habla de inmunidad de lote, que corresponde a la resistencia de todo un grupo de animales a una enfermedad, a causa de la presencia en ese grupo de una proporción de animales inmunes (Tizard, 2012f). Las vacunas otorgan inmunidad adquirida, ya que como antígeno se administra el VBI o alguna de sus partes. Hay varios tipos de vacunas, pero las que se utilizan en las aves son las vacunas vivas modificadas y las vacunas inactivadas. Las vacunas vivas modificadas se caracterizan por utilizar un agente infeccioso (vacunas monovalentes) o varios (vacunas polivalentes) vivo/s y homólogo/s al que produce la enfermedad, pero cuya virulencia ha sido atenuada, de manera que sin producir ninguna lesión secundaria al animal, induzca inmunidad duradera frente al agente homólogo virulento. Su mecanismo de acción radica en infectar células del hospedero y experimentar multiplicación viral. Las células infectadas procesan antígeno endógeno, induciendo una reacción dominada por linfocitos T citotóxicos. Una vacuna muerta o inactivada, en cambio,

está formada por el o los microorganismos completos pero inactivados por algún método físico o químico, más un coadyuvante. El mecanismo de acción de este tipo de vacunas radica principalmente en que los virus muertos actúan como antígenos exógenos, que procesan y estimulan reacciones en que predominan linfocitos T de ayuda CD4. Un coadyuvante corresponde a una sustancia que, al administrarse combinada con el antígeno, intensifica la respuesta inmune frente a ese antígeno. Estos coadyuvantes pueden ser sales minerales, como el hidróxido de aluminio o el fosfato de aluminio; emulsiones en agua/aceite más surfactante; derivados de patógenos, tanto naturales y sintéticos y sistemas de liberación, como liposomas o polímeros en micropartículas, por ejemplo. En el caso de las aves, se usan coadyuvantes del tipo emulsión en aceite, y su mecanismo de acción radica en modular la señal proveniente de moléculas coestimuladoras como la CD40, CD86 y CD80, que están presentes en las membranas de las células presentadoras de antígenos (Tizard, 2012f; Siel *et al.*, 2014).

Para que los planes de vacunación aplicados funcionen, se requiere la acción conjunta de la inmunidad innata y la adaptativa. Esta protección se logra si es que el hospedero ha generado elementos efectores inmunes fácilmente disponibles, tales como los anticuerpos, que son capaces de reconocer y neutralizar el agente patógeno pertinente inmediatamente. Si los anticuerpos no son capaces de neutralizar el virus, porque tiene un ciclo de vida con reacciones intracelulares, deben programarse para eliminar la célula diana infectada antes de que la infección por el patógeno pueda extenderse. Lo anteriormente dicho ocurre mediante el aumento de células T de memoria específicas de antígeno, que se expanden rápidamente en el reconocimiento secundario de antígeno (s) del microorganismo invasor. La memoria inmunológica forma la base para vacunas protectoras (Schijns *et al.*, 2014).

10.3.1 Vacunación a nivel mundial contra la Bronquitis Infecciosa

El serotipo más usado a nivel mundial es el Mass, ya que las vacunas basadas en este serotipo, otorgan un amplio grado de protección contra otros serotipos (Jackwood y De Wit, 2013). Los pollos broilers son vacunados comúnmente con cepas vivas de VBI, habitualmente una primera vacuna se aplica al primer día de edad en la planta de incubación. Una segunda vacuna, que puede ser del mismo serotipo o de otro distinto, puede aplicarse entre los 10 a 18 días de edad (Cavanagh y Gelb, 2008).

Para el caso de ponedoras y reproductoras se aplica vacunas vivas cuando están en etapa de crecimiento para lograr protección temprana frente al desafío, el que será potenciado con vacunas vivas o inactivadas después (De Wit *et al.*, 2011). Antes del inicio de la producción de huevos, en un periodo que oscila entre el día 1 de edad hasta las 20 semanas de vida, se administran tres a cuatro dosis de vacunas vivas. Durante el periodo productivo, las aves reciben una o dos vacunas más hasta el final del periodo productivo. Estas vacunas se aplican por instilación ocular o por aspersión. Estas vacunas inducen la producción de anticuerpos circulantes en suero (Cavanagh y Gelb, 2008). Al administrar más número de vacunas contra BI, hay un incremento en los títulos de anticuerpos (Van Leerdman, 2008a).

10.3.2 Vacunación en Chile contra la Bronquitis Infecciosa

En Chile, alrededor del 100% de las pollas y gallinas comerciales se vacunan contra BI en diversos programas. Salvo excepciones, se emplean vacunas vivas con cepas atenuadas y vacunas inactivadas, ambas del serotipo Mass (Hidalgo, 2010).

Hay que considerar que el periodo productivo de pollos broiler es de solo 45 días y con la aplicación de una o dos vacunas se alcanzan protección inmunológica contra el VBI. En contraste, las gallinas ponedoras tienen un primer periodo de crecimiento, hasta las 20 semanas, después del cual se inicia un periodo de producción de huevos que oscila desde las 20 hasta las 90 semanas. Durante las distintas etapas productivas en la producción de huevos, se aplican diferentes planes de vacunación, vale decir, durante el periodo de crecimiento se aplican entre 4 a 6 vacunas contra BI, y durante el segundo periodo se pueden aplicar varias vacunas más contra BI. Cada empresa productora establecerá sus propios programas de vacunación y esto estará determinado principalmente por las condiciones epidemiológicas locales de la BI. Por lo tanto, en una empresa de múltiples edades, hay lotes de gallinas con diferentes números de vacunas aplicadas (Hidalgo, 2010).

10.4 Evaluación de la Respuesta Inmune a las vacunas contra Bronquitis Infecciosa

La eficacia de la administración de la vacuna y el nivel de respuesta inmunológica en aves vacunadas pueden ser monitoreados serológicamente, así se hace un control de calidad de la vacunación en el campo (Marangon y Busani, 2007; Van Leerdman, 2008a).

Esta respuesta inmune puede ser medida a través de los niveles de anticuerpos producidos luego de una o más inmunizaciones, los cuales pueden ser detectados por la técnica de ELISA (Gelb, 2013). Para esto, 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 (Borne y Comte, 2001; Gelb, 2013).

Hay tres componentes claves relacionados a la evaluación de la respuesta inmune vacunal: la intensidad de la respuesta inmunológica, la uniformidad en la respuesta inmunológica y la persistencia de la respuesta inmune en el tiempo (Van Leerdman, 2008b). La intensidad de la respuesta inmune se expresa mediante la Media Geométrica (MG) de anticuerpos séricos. Para evaluar si estos valores se ajustan a las MG esperadas, se deben recurrir a puntos de referencia, que corresponden a una gama de valores de títulos de anticuerpos que se establecieron con base en experiencias previas, que son entregados por los fabricantes del kit usado y que también son documentados en la literatura. Los títulos de anticuerpos varían con la edad de la gallina y el número de vacunas aplicadas. Éstos van en alza entre las 6 a 16 semanas, siendo los títulos medios desde 46,5 a 3000, con 1 a 3 vacunas vivas aplicadas vía aspersion. Este estudio se realizó usando el kit diagnóstico Idexx® (Roberts *et al.*, 2004). Otro estudio efectuado en gallinas de postura criadas en condiciones experimentales, se midieron los títulos de anticuerpos contra BI por medio de la prueba de ELISA, a diferentes edades y número de vacunas aplicadas (2 vacunas vivas aplicadas en etapa de crianza, y una vacuna inactivada aplicada a las 22 semanas de edad). Al medir los anticuerpos de las aves a las 17, 26, 44, 53 y 65 semanas, los títulos medios fueron de 5008, 8180, 4636, 2168, 3926 y 4511, respectivamente (Astudillo, 2013). El Laboratorio de Diagnóstico de enfermedades avícolas del Ministerio de Agricultura de Georgia (EE.UU), en una recopilación de casos de gallinas ponedoras comerciales que fueron criadas en condiciones de campo, concluyó que los títulos de anticuerpos expresados como medias geométricas correspondían a 8793, en gallinas con un rango de edad de 15 a 19 semanas; 8464 en gallinas de 20 a 45 semanas y de 8551 en gallinas de 46 a 70 semanas, lo que probablemente incluye la respuesta a programas vacunales y, en algunos casos, a exposición del VBI de campo (Anón, 2014).

La uniformidad de la respuesta inmune a la vacunación se puede estimar mediante los Coeficientes de Variación (CV). Como regla general, se señala que aves que presenten un CV menor al 40% tienen una excelente uniformidad en su respuesta a la vacunación; si tienen desde un 40 a un 60% la uniformidad en su respuesta vacunal es buena y si

presentan más de un 60% se necesita mejorar la uniformidad en la respuesta vacunal. Se debe tener presente que lo anterior, pese a ser una pauta general, para el caso de la aplicación de vacunas vivas, pueden obtenerse respuestas de título variable, debido al método de aplicación por el que las aves reciben la vacuna, que es entregada de manera masiva. Este tipo de vacunas, al aplicarse por aspersion, ingresan por las vías respiratorias de las aves, generando una respuesta inmune local que no es medida por las pruebas de ELISA (Van Leerdman, 2008b).

La persistencia de la respuesta inmunológica en el tiempo se evalúa mediante la medición de la respuesta de títulos de anticuerpos medios en el tiempo. Al aplicarse vacunas vivas, se podían alcanzar títulos de 1000 a 4000, 3 a 5 semanas después de ser vacunadas, y que paulatinamente empiezan a disminuir (Roza *et al.*, 2013).

Es necesario tener en consideración que los títulos de anticuerpos y el grado de protección de las vacunas depende de ciertas variables, como el tipo de ave, tipo de vacuna (vacuna viva atenuada o vacuna inactivada), programa de vacunación aplicado, la vía de aplicación de la vacuna y también la procedencia del kit (Sulaiman *et al.*, 2003; Di Fábio y Villarreal, 2009; Van Leerdman, 2008a; Jackwood y De Wit, 2013).

Es necesario aclarar, además, que aun cuando en un lote de aves los títulos de anticuerpos individuales pueden ser muy diferentes, por factores inherentes al individuo, a la dosis y aplicación de la vacuna, etc., se han establecido rangos de títulos de anticuerpos y de CV aceptables (Roza *et al.*, 2013).

En Chile, el año 2009 se produjo un brote generalizado de BI. Una de las empresas productoras de huevos afectada solicitó un estudio de aislamiento viral desde aves enfermas y también se estudió la seroconversión de títulos de anticuerpos por la prueba de ELISA antes y después de presentar los síntomas respiratorios. Para esto, se realizaron dos muestreos de sangre, separadas por un lapso de tiempo de 21 días, en dos grupos: uno de gallinas livianas Lohman White, y otro de gallinas semipesadas Lohman Brown. La seroconversión reveló que las medias geométricas de títulos de anticuerpos pasaron de 2585 a 11345 en el caso de las gallinas livianas; mientras que en las gallinas semipesadas la seroconversión fue de un título inicial de 7464 a un título final de 15197. Este estudio demostró que los títulos de anticuerpos asociados a infecciones de campo se duplicaron, e incluso, cuadruplicaron sobre los niveles de anticuerpos asociados al plan de vacunación del plantel (Hidalgo y Rivas, 2010).

Por medio del presente estudio, se pretende evaluar la respuesta serológica vacunal de gallinas ponedoras de diferentes edades en un plantel comercial mediante la prueba de ELISA.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta serológica otorgada por un plan de vacunación contra bronquitis infecciosa en lotes de gallinas de diferentes edades en un plantel comercial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar los títulos de anticuerpos contra bronquitis infecciosa de lotes de gallinas ponedoras en diferentes edades según el plan de vacunación recibido.
- 2) Establecer las posibles diferencias de títulos de anticuerpo contra bronquitis infecciosa de gallinas según su número de vacunas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1.1. Aves

Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron gallinas ponedoras de diferentes edades provenientes de una empresa productora de huevos de consumo, ubicadas en la provincia del Marga-Marga, región de Valparaíso, Chile.

El total de aves en producción que conforman el plantel completo, eran alrededor de 700.000. Las aves estaban distribuidas en cinco predios denominados granjas, y, dentro de ellas, existían diferentes áreas productivas denominadas sectores. Cada sector alojaba entre 45.000 y 160.000 aves, distribuidas en galpones que albergaban lotes de gallinas de la misma edad, las que entran y salen de cada galpón al mismo tiempo.

1.1.2. Granjas y sectores

Como ya se había señalado anteriormente, las aves estaban distribuidas en cinco granjas, ubicadas separadamente una de la otra.

En la granja 1, se alojaban a pollas que estaban en etapa de cría y recria. En esta granja, la crianza se realiza en piso hasta las 18 semanas de edad. Una vez cumplido este periodo, las gallinas que están entrando en producción son trasladadas a las granjas de producción y se mantienen en jaulas.

En las granjas 2, 3 y 4 se albergaban gallinas que estaban en pleno periodo de producción. En la granja 5 se alojaban exclusivamente a las reproductoras, que son las que generan las pollitas de reemplazo para el plantel. Las granjas, en general, están separadas unas de otras por distancias que oscilan entre 1 a 10 kilómetros.

Bioseguridad del plantel avícola: la empresa cuenta con medidas de bioseguridad generales. En todas las granjas, el ingreso está restringido para personas y vehículos. Los camiones y otros vehículos que ingresan, deben ser desinfectados mediante un arco sanitario (rodiluvio) o mediante aspersion con motobomba de una solución desinfectante. El personal que ingresa a una granja debe vestir ropa de trabajo (*overall* y botas) que son entregadas por la empresa, y pasar por un pediluvio con solución desinfectante. Además, antes de entrar a cualquier pabellón, se debe pasar nuevamente por un pediluvio. En el caso de la granja N°1, adicionalmente, las personas que ingresan deben tomar una ducha sanitaria antes de ingresar al recinto. Por otro lado, el personal que trabaja en un sector productivo tiene prohibición de visitar otros sectores. Además, están implementadas otras medidas, tales como existencia de cerco perimetral, registro de visitas, prohibición a trabajadores de tener aves, mallas laterales en los galpones, desinfección de galpones, control de plagas, manejo del agua de bebida, manejo de aves muertas y manejo del guano de acuerdo a un acuerdo de producción limpia (APL) suscrito con el Consejo de Producción Limpia (Asohuevo, 2006a; Asohuevo 2006b).

1.1.3. Muestras

Las muestras que se tomaron para llevar a cabo este estudio, correspondieron a muestras de sangre de las gallinas, desde las cuales se obtuvo el suero para la realización de la prueba serológica de ELISA. Fueron recolectadas en todos los sectores que conforman

la empresa, y siguiendo el esquema de trabajo establecido para el muestreo, que se detalla en la tabla N°1, y considerando el esquema de vacunación aplicado en el plantel, que se representa en la tabla N°2. Se seleccionaron las gallinas al azar desde cada uno de los lotes, que pertenecen a cada sector productivo. Para la toma de muestra de sangre, se usó jeringas de 3 ml, agujas de 21G y alcohol al 70% con tintura de yodo como antiséptico en el área de extracción.

La población de aves del estudio correspondió a pollitas y gallinas ponedoras de huevos de consumo cuyas edades oscilan entre las 4 a 98 semanas, pertenecientes a la raza White Leghorn.

TABLA N°1: Distribución de las aves en el plantel productor de huevos de consumo de múltiples edades, considerando edad y número de vacunas aplicadas.

GRANJA	SECTORES	LOTES	EDAD	N° VACUNAS APLICADAS (B.I)	N° AVES/LOTE
1	Los Copihues	C2	4 semanas	1	20
		D2	11 semanas	4	20
		C3	18 semanas	6	20
2	Los Boldos	1	44 semanas	7	20
		2	46 semanas	7	20
	Los Quillayes	1	91 semanas	8	20
		2	98 semanas	8	20
	Los Espinos	1	55 semanas	7	20
		2	59 semanas	7	20
		3	60 semanas	7	20
		4	61 semanas	7	20
		5	67 semanas	7	20
		6	69 semanas	7	20
3	Los Ceibos	1	42 semanas	7	20
		2	40 semanas	7	20
		3	36 semanas	7	20
	Los Peumos	1	80 semanas	8	20
		2	80 semanas	8	20
		3	77 semanas	8	20
4	Los Molles	1	22 semanas	7	20
		2	19 semanas	6	20
		3	21 semanas	7	20
		7	90 semanas	8	20
		8	90 semanas	8	20
5	Reproductoras	1	25 semanas	7	20

TABLA N°2: Plan de vacunación contra BI aplicado a las gallinas en el plantel de producción de huevos considerando su edad.

EDAD	N° vacuna	VACUNA-MANEJO	VÍA APLICACIÓN
1 día	1	BI cepa viva Mass Ma5	Ocular
4 semanas	2	BI cepa viva Mass M48	Ocular
7 semanas	3 (*)	BI cepa viva Mass + ENC (mixta)	Ocular
10 semanas	4	BI cepa viva Mass M48	Ocular
14 semanas	5	BI 4/91	Ocular
17 semanas	6	BI cepa viva Mass Ma5	Ocular
20 semanas	7	BI cepa viva Mass + ENC (mixta)	Aspersión
> 70 semanas	8	BI cepa viva Mass + ENC (mixta)	Aspersión

(*): Al momento del estudio, no habían aves con tres vacunas aplicadas.

1.1.4. Prueba de diagnóstico

Para evaluar la presencia de anticuerpos vacunales contra BI se utilizó la prueba de ELISA empleando un *kit* comercial (Laboratorio Idexx®, Westbrook, Maine, USA). Los materiales empleados en la prueba de ELISA, corresponden a los especificados por el fabricante del *kit*.

1.1.4.1 Equipamiento

- Gradillas para tubos de 12x75mm.
- Micropipeta monocanal ajustable 1-10 µl.
- Micropipeta multicanal de 12 canales. (50 a 300 µl).
- Puntas amarillas desechables (200 µl).

- Puntas blancas (350 µl).
- Puntas cristal (hasta 10 µl).
- Reloj control.
- Refrigerador (4-8°C).
- Sistema de calefacción o enfriamiento para mantener la temperatura ambiental entre 18-25°C.
- Termómetro para medir temperatura ambiental contrastado con termómetro patrón.
- Espectrofotómetro (650 nanómetros) TECAN® Modelo Sunrise.
- Equipo de lavado de placas TECAN® modelo hydroflex.

1.1.4.2 Reactivos

- Agua destilada o desionizada.
- Kit Elisa Idexx® para detección de anticuerpos frente a Bronquitis Infecciosa:
 - Placas tapizadas con antígeno Bronquitis Infecciosa
 - 1 frasco de control positivo-suero pollo anti- virus de la Bronquitis Infecciosa diluído, conservado con azida de sodio.
 - 1 frasco de control de control negativo – suero de pollo diluido no reactivo al virus de la Bronquitis Infecciosa, conservado con azida de sodio.
 - 1 frasco de conjugado (de cabra) anti-pollo/anti-pavo: peroxidasa de rábano, conservado en gentamicina y kathan.
 - 1 frasco de diluyente de la muestra, solución tampón, con azida de sodio.
 - frasco de sustrato TMB (tetrametilbencidina).
 - frasco de solución de frenado.

2. Métodos

2.1.1 Extracción de las muestras

Las muestras se obtuvieron de 20 aves elegidas al azar desde cada uno de los lotes que conforman el plantel, según la recomendación entregada en la literatura (Borne y Comte, 2001; Jackwood *et al.*, 2007; Thayer y Beard, 2008). De este modo, se obtuvo un total de 500 muestras de sangre. Se extrajo la muestra de sangre por medio de punción en la vena alar. Luego de la obtención de la muestra de sangre, ésta fue vaciada en tubos tipo eppendorf que fueron mantenidos a temperatura ambiente, a fin de promover una mayor retracción de los coágulos, y así obtener mayor liberación de suero. Los tubos que contenían

los sueros se trasladaron al laboratorio donde se realizó la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos vacunales contra BI.

2.2.2 Cumplimiento de normas de Bioética

El protocolo experimental, en cuanto a manipulación de las aves que participaron en este estudio y la toma de muestras, fue aprobado por el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Anexo N°1).

2.2.3. Procesamiento de las muestras

El análisis de las muestras se llevó a cabo en el laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. El laboratorio cuenta con una sala en donde se realizan pruebas de ELISA, donde se trabaja bajo normas de gestión de calidad auditadas por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Llegadas las muestras de sangre, el contenido de cada tubo Eppendorf fue sometido a centrifugación a 2.500 r.p.m. (centrífuga Mirko 20, Laboratorio Hettich) durante 15 minutos para obtener el suero. Los sueros fueron guardados y congelados hasta efectuar la prueba de ELISA.

2.2.4. Ejecución de la prueba de ELISA

La prueba de ELISA que se empleó en este estudio fue de tipo indirecto. Ésta se hizo en una placa sensibilizada con antígenos, siendo en este caso antígenos del VBI; se agregó luego el suero y, en cuando hubo anticuerpos presentes, éstos se unieron a los antígenos que están contenidos en la placa. Luego, se procedió a lavar la placa para aplicar, después, el anticuerpo antiespecie conjugado con una enzima. La inmunoglobulina conjugada se unió a los anticuerpos unidos previamente a los antígenos. Después de este paso, se realizó un segundo lavado, y luego se adicionó un substrato/cromóforo que tuvo una reacción colorimétrica con la enzima del anticuerpo conjugado. Finalmente, se adicionó una solución de frenado para detener la reacción (Anón, 2013).

2.2.5. Entrega de resultados serológicos y análisis Estadístico

La reacción antígeno-anticuerpo fue leída por un espectrofotómetro, que hizo la lectura de absorbancia de luz a través de los pocillos de las placas y lo expresó como Densidad Óptica (DO). Esta DO fue tomada por el programa computacional xChekPlus® de laboratorio Idexx®. Este software realizó operaciones aritméticas y transformó estos

resultados a títulos de anticuerpos. Al usar este software, se pudo obtener datos estadísticos por lote de gallinas.

Los resultados de la prueba de ELISA fueron entregados en planillas elaboradas por el programa computacional xChekPlus® de laboratorio Idexx®. Para que el ensayo sea válido, la absorbancia media del control negativo debe ser menor o igual que 0,150 y la diferencia entre la absorbancia media del control positivo y la absorbancia media del control negativo debe ser menor o igual 0,075. El nivel relativo de anticuerpos en la muestra se determina calculando el coeficiente muestra a positivo (M/P). Las muestras de suero que tengan cocientes M/P menores o iguales a 0,20 deben considerarse negativas. Las muestras con cocientes M/P superiores a 0,20 (títulos superiores a 396) deben considerarse positivas e indican que ha habido inmunización u otro tipo de exposición a BI (Idexx laboratories, 2012).

Para llevar a cabo el análisis estadístico, se usó el programa computacional Infostat® (Di Rienzo *et al.*, 2015). Se realizaron las pruebas de Análisis de la Varianza (ANOVA) para establecer si hay posibles diferencias en los títulos de anticuerpos contra BI según el número de vacunas aplicadas. Para esto se agruparon los datos según aves que presentaban 1, 4, 6, 7 y 8 vacunas. Y para establecer con cuántas vacunas se producían estas diferencias en los títulos de anticuerpos, se realizó la prueba de Tukey.

RESULTADOS

La prueba de ELISA realizada a los 500 sueros estudiados, arrojó los resultados que se presentan a continuación.

En la tabla N°3 se muestran los títulos de anticuerpos presentados por los 25 diferentes lotes de gallinas estudiados, según edad y según número de vacunas que estas aves recibieron contra BI. La MG representa la respuesta serológica de 20 individuos que representan a cada lote estudiado.

Se observa que los lotes Los Copihues C2 y Los Copihues D2, con 4 y 11 semanas de edad y 1 y 4 vacunas respectivamente, presentaron los menores títulos de anticuerpos contra BI de todo el estudio, mientras que los lotes que presentaban desde 6 hasta 8 vacunas obtuvieron los títulos de anticuerpos contra BI más altos. El lote Los Copihues C2, con 4 semanas de edad y con 1 vacuna, presentó una MG de títulos de 74. El lote Los Copihues D2, con 11 semanas y con 4 vacunas, presentó la MG de títulos de anticuerpos más baja y fue de 48. Paralelamente, el Coeficiente de Variación (CV) en ambos casos fue de 142 y 171,6 %, respectivamente. Los lotes de gallinas que tenían 6, 7 y 8 vacunas contra BI, presentaron una MG superior a 1000, a excepción del lote Los Molles 3 que arrojó una MG de 877. A su vez, los CV fueron menores al 100% en todas las aves evaluadas y que contaban con 6 a 8 vacunas, con la salvedad del lote Los Molles 3, cuyo CV fue de 105,4%. El lote Los Espinos 3 presentó las MG de títulos de anticuerpos más altos y fue de 6612.

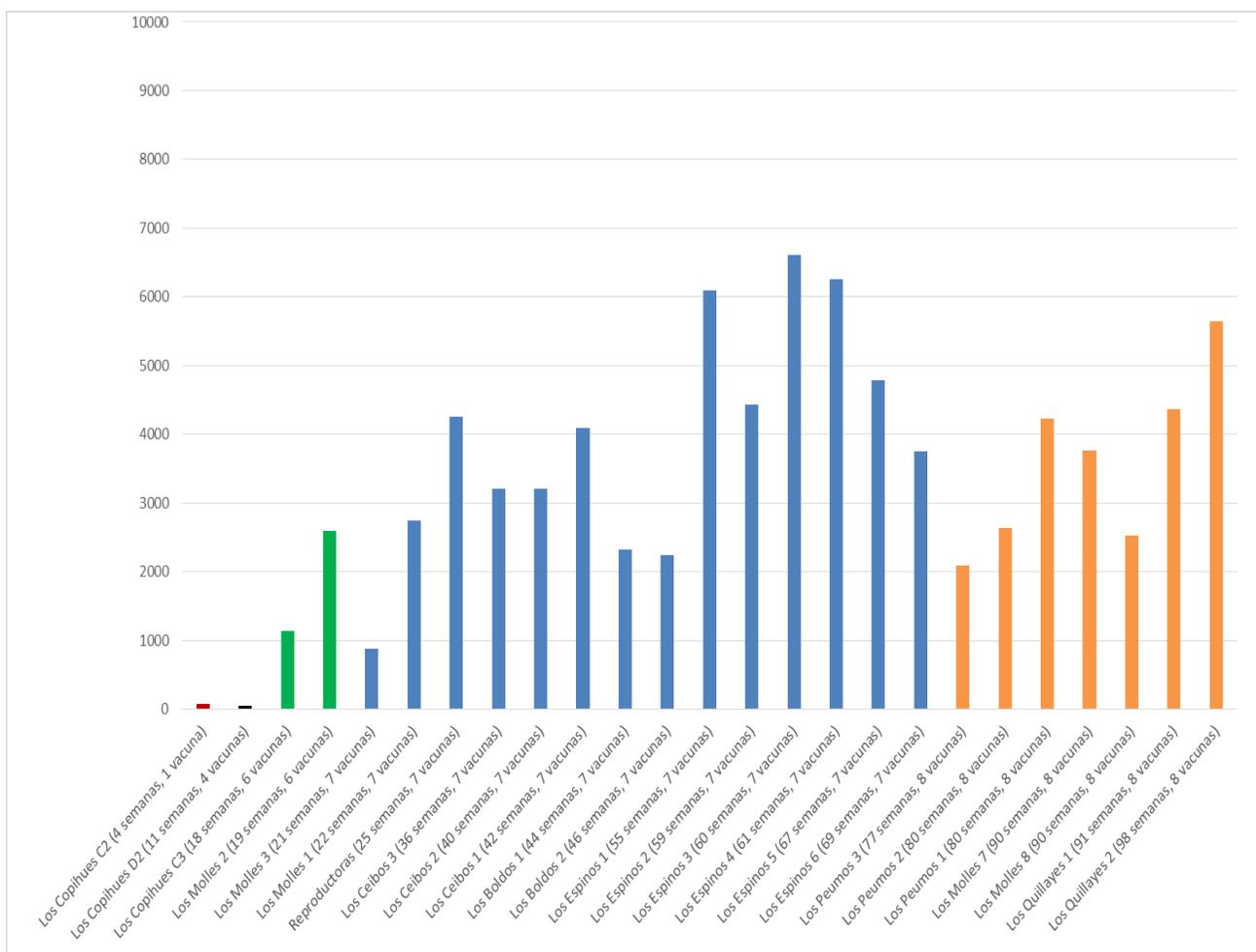
TABLA N°3: Títulos de anticuerpos contra BI correspondientes a 25 lotes de gallinas de diferentes edades y según vacunas aplicadas, expresadas como MG y sus respectivos CV.

GRANJA	SECTORES	LOTES	EDAD (semanas)	N° VACUNAS APLICADAS (B.I)	MG	CV (%)
1	Los Copihues	C2	4	1	74	142,0
		D2	11	4	48	171,6
		C3	18	6	1137	74,5
2	Los Boldos	1	44	7	2316	82,9
		2	46	7	2239	72,3
	Los Quillayes	1	91	8	4358	45,4
		2	98	8	5641	49,4
	Los Espinos	1	55	7	6090	44,7
		2	59	7	4430	62,4
		3	60	7	6612	50,7
		4	61	7	6253	47,7
		5	67	7	4782	57,0
6	69	7	3756	69,3		
3	Los Ceibos	1	42	7	4096	45,7
		2	40	7	3211	56,7
		3	36	7	3205	49,6
	Los Peumos	1	80	8	4232	58,2
		2	80	8	2639	73,1
		3	77	8	2095	46,2
4	Los Molles	1	22	7	2738	94,1
		2	19	6	2594	60,4
		3	21	7	877	105,4
		7	90	8	3764	68,7
		8	90	8	2520	72,9
5	Reproductoras	1	25	7	4256	49,2

Del análisis de la tabla N°3 y del gráfico N°1, se desprende que los dos lotes con 6 vacunas, el lote Los Molles 2 presenta una MG de títulos de anticuerpos de 2594, mientras que el lote Los Copihues C3, una semana después de aplicada la sexta vacuna, presenta una MG de 1137, un valor menor de la mitad que el del lote Los Molles 2. De los lotes con 7 vacunas contra BI, se vislumbra la presencia de dos grupos. Uno, cuyas edades oscilan entre 20 y 46 semanas, con una MG entre 2095 (Los Ceibos 3) y 2738 (Los Molles 1). En este grupo, se exceptúa el lote Los Molles 3 (MG: 877), cuya medición se hace una semana

después de aplicada la séptima vacuna, y el lote de las Reproductoras (MG: 4256), que tiene un manejo vacunal distinto. El segundo grupo de lotes de gallinas con 7 vacunas agrupa gallinas de entre 55 y 69 semanas de edad y presentan MG de entre 3756 (Los Espinos 6) y 6612 (Los Espinos 3). Finalmente, los lotes de gallinas con 8 vacunas presentan títulos de anticuerpos vacunales dispares, con un rango de MG de títulos de anticuerpos de entre 2520 y 5641, que pueden ser similares a los valores presentados por los grupos 1 o 2 con 7 vacunas.

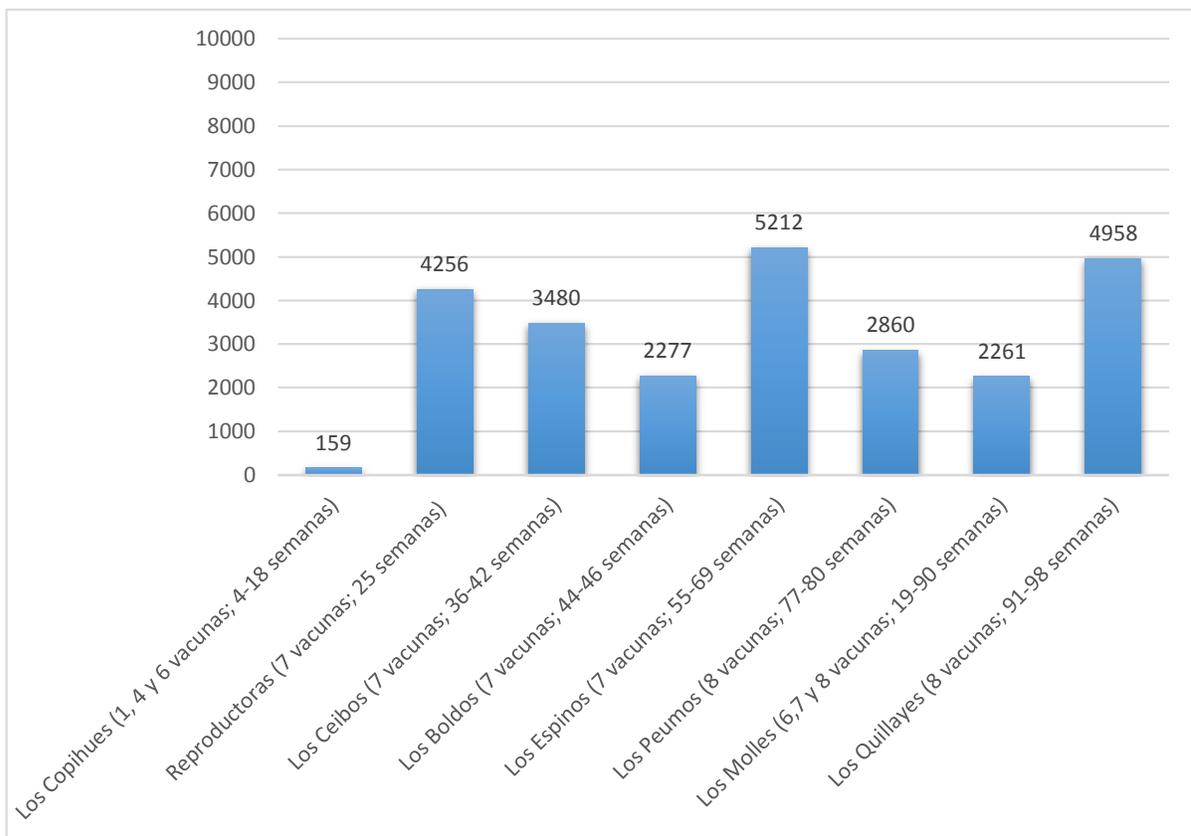
GRÁFICO N°1: Títulos de anticuerpos contra BI de 25 lotes de gallinas de diferentes edades y según el número de vacunas, expresadas por su MG.



En el gráfico N°2, se presenta los títulos de anticuerpos que representa los 25 lotes de gallinas, agrupados según el sector al que éstas pertenece, siendo 8 los sectores del

plantel. Los títulos se expresaron como las MG de cada sector. El sector de las Reproductoras sólo hay un lote, por lo que sus títulos de anticuerpos se representó por la MG de los 20 individuos que formaban parte de la muestra de ese lote. El sector Los Copihues, representado por tres lotes, demuestra un valor de MG de títulos de anticuerpos contra BI muy bajo (159), que no representa la realidad de la situación porque uno de los tres lotes tenía 6 vacunas aplicadas y su MG es de 1137. Mientras que los otros dos lotes, con 1 y 4 vacunas, presentan una MG de 74 y 48, respectivamente (Tabla N°3). Los sectores de Reproductoras, Los Ceibos, Los Boldos, Los Espinos, Los Peumos, Los Molles y Los Quillayes, con 6, 7 u 8 vacunas, presentaron títulos de anticuerpos con una MG entre 2261 y 5212. Estos 7 sectores están representados por 22 de los 25 lotes de gallinas de este estudio.

Gráfico N° 2: Títulos de anticuerpos contra BI de los 25 lotes de gallinas, agrupados en los 8 sectores productivos de la empresa, expresados como MG del sector.



En la tabla N°4, se presentan los resultados de los análisis estadísticos realizados para establecer si hay diferencias en cuanto a los niveles de anticuerpos séricos de gallinas según las vacunas aplicadas (1, 4, 6, 7 y 8).

TABLA N° 4: Títulos de anticuerpos contra BI de lotes de gallinas según número de vacunas aplicadas.

N° de vacunas	N	Media +/- DE	p<0,0001
1	20	301 +/- 440 _a	
4	20	260 +/-458 _a	
6	40	2341 +/-1784 _b	
7	280	4711 +/-3337 _c	
8	140	4434 +/-2957 _c	

p ≤ 0,05 indica que hay diferencias estadísticamente significativas.

Medias con una letra común indica que no son significativamente diferentes (p > 0,05).

De la tabla N°4 se desprende que, a medida que las gallinas presentaban más vacunas, los promedios de títulos de anticuerpos mostraban diferencias significativas estadísticamente. Las gallinas con 6 vacunas presentaron valores de títulos de anticuerpos (2341) estadísticamente más altos que los lotes que tenían 1 y 4 vacunas (301 y 260, respectivamente). A su vez, los lotes de gallinas que tenían 7 y 8 vacunas tuvieron títulos de anticuerpos (4711 y 4434, respectivamente), estadísticamente más altos que las que estaban con 6 vacunas. Las gallinas que tenían aplicadas 1 y 4 vacunas no presentaron diferencias estadísticas entre ellas, así como tampoco las aves que presentaban 7 y 8 vacunas.

En la tabla N°5 y N°6, se presentan los resultados de los análisis estadísticos realizados para establecer si hay diferencias en cuanto a los títulos de anticuerpos séricos de gallinas, según sectores que presentaban 7 y 8 vacunas.

TABLA N°5: Títulos de anticuerpos contra BI de sectores con gallinas que presentan siete vacunas aplicadas.

Sector	N	Media +/- D.E.	p= <0,0001
Los Boldos	40	3052 +/- 2420 a	
Los Ceibos	60	3997 +/- 2079 ab	
Los Espinos	120	6193 +/- 3560 c	
Los Molles	40	2887 +/- 3433 a	
Reproductoras	20	4924 +/- 2487 bc	

p ≤ 0,05 indica que hay diferencias estadísticamente significativas.

Medias con una letra común indica que no son significativamente diferentes (p > 0,05).

Del análisis realizado de la tabla N°5, se observa que los sectores con 7 vacunas aplicadas contra BI, los sectores de Los Boldos, Los Ceibos y Los Molles presentaron Media Aritmética (MA) de títulos de anticuerpos estadísticamente similares (3052, 3997 y 2887, respectivamente). Por otra parte, los títulos de anticuerpos de los sectores de Los Espinos y Reproductoras son semejantes entre sí (6193 y 4924), pero estadísticamente diferentes a los sectores anteriormente mencionados.

TABLA N°6: Títulos de anticuerpos contra BI de sectores con gallinas que presentan ocho vacunas aplicadas.

Sector	N	Media +/- D.E.	p= 0,0079
Los Molles	40	4198 +/- 3038 a	
Los Peumos	60	3799 +/- 2760 a	
Los Quillayes	40	5622 +/- 2877 b	

p ≤ 0,05 indica que hay diferencias estadísticamente significativas.

Medias con una letra común indica que no son significativamente diferentes (p > 0,05).

La tabla N°6 muestra que de los sectores de gallinas con 8 vacunas aplicadas contra BI, Los Molles y Los Peumos obtuvieron títulos de anticuerpos con MA similares, de 4198 y 3799, pero ambos sectores son estadísticamente diferentes a los títulos de anticuerpos presentados por el sector de Los Quillayes (5622).

DISCUSIÓN

En este estudio, se evaluó la respuesta serológica otorgada por un plan de vacunación contra bronquitis infecciosa en lotes de gallinas de diferentes edades en un plantel comercial. Esto se realizó midiendo los títulos de anticuerpos séricos contra BI de gallinas ponedoras de huevo de consumo, mediante la prueba serológica de ELISA. En nuestro país, no se contaba con antecedentes bibliográficos relativos a un estudio descriptivo y de conocimiento público relacionado con la medición de la respuesta inmune vacunal contra BI y que, además, integrara a toda la población de un plantel avícola con diversidad de edades y número de vacunas que éstas aves tengan, ya que las empresas avícolas que hacen estos controles, mantienen estos datos de forma privada.

Analizando los resultados que arrojó la prueba de ELISA (Tabla N°3), los títulos expresados como MG en los lotes Los Copihues C2, 4 semanas edad y 1 vacuna; y D2, 11 semanas y 4 vacunas, fueron bajos e inespecíficos (74 y 48, respectivamente) ya que el manual de especificaciones de Idexx® señala que sólo títulos superiores a 396 se consideran positivos e indican que ha habido inmunización u otro tipo de exposición al virus de BI (Idexx laboratories, 2012). La MG de 74 del lote Los Copihues C2 no es extraño en términos de anticuerpos humorales, ya que la primera vacuna, al ser aplicada al día de edad en las pollitas, es neutralizada parcialmente por los anticuerpos maternos circulantes en estas aves. Estas vacunas, pese a que los anticuerpos maternos influyen en la respuesta inmune sistémica, son beneficiosas debido a que estimulan, en primera instancia, la respuesta inmune local en el tracto respiratorio alto del pollito. Lo anteriormente dicho ya ha sido demostrado, los anticuerpos maternos influyen en la neutralización de los antígenos vacunales (Mondal y Naqi, 2001). Villegas-Narváez (2011) señala la importancia de los anticuerpos maternos y que un virus vacunal tiene la capacidad de infectar al ave, a pesar de la presencia de anticuerpos maternos, todo esto a fin de establecer una inmunidad local. Davelaar y Kouwenhoven (1981), confirman lo beneficioso de la vacunación al día de edad, debido a que generan protección contra BI de manera local, específicamente en la mucosa oculo – nasal. Dhinakar y Jones (1997) hallaron la inmunoglobulina Ig A específica de BI en los fluidos lacrimales y en los órganos del tracto respiratorio superior en pollos vacunados al primer día de edad. Resultados similares en cuanto a nivel de respuesta de títulos medios de anticuerpos, fueron obtenidos por Roberts *et al.*, (2004), quienes vacunaron lotes de pollitas de un día de edad con una vacuna viva por vía ocular y obtuvieron MG de anticuerpos anti BI del orden de 46, 57,9 y 76,4 medidos a la 4° semana de vida. De la

misma manera, Torres (2016) obtuvo semejantes resultados de MG de títulos de anticuerpos medidos a los 14 días en dos lotes de pollos broilers vacunados al día de edad con vacuna viva, con 34,7 y 66,75. En cuanto a los CV, el lote C2 presentó 142%, lo que refleja una amplia dispersión de los títulos de anticuerpos producidos por las pollitas después de ser vacunadas al día de edad. Al revisar los títulos individuales de este lote, se evidencia el amplio rango existente en cuanto a los títulos de anticuerpos (1 a 1725, dato no documentado). Esta situación estaría explicada, también en parte, por la influencia de los anticuerpos pasivos en la respuesta inmune humoral (Mondal y Naqi, 2001).

El lote Los Copihues D2, de 11 semanas, mostró una MG de títulos de anticuerpos de 48, extremadamente baja, todo esto considerando que estas aves ya tenían 4 vacunas aplicadas contra BI. Una posible explicación, no demostrada en el presente estudio, podría ser que los sueros fueron recolectados 7 días después de aplicada la última vacuna, que pudo determinar una baja temporal en la detección de los anticuerpos. Chhabra *et al.*, (2015) señalan que la producción de anticuerpos sistémicos alcanza su máxima concentración a las 4 semanas después de aplicarse la vacuna. El CV de este lote, al igual que el analizado anteriormente, también fue alto (171,6%) y al observar los resultados individuales de los 20 individuos del lote se evidencia el amplio rango de títulos de anticuerpos (1 a 1936, dato no documentado). Esto podría explicarse por factores propios de la variabilidad en la respuesta inmune individual, también factores asociados al manejo de la vacunación o características de la vacuna que se aplicó a los lotes, según lo mencionado por diversos autores (Sulaiman *et al.*, 2003; Di Fábio y Villarreal, 2009; Van Leerdman, 2008a; Jackwood y De Wit, 2013). En este estudio la respuesta serológica a un programa de 4 vacunas está representada solo por una medición (un lote), en las circunstancias que han sido anteriormente mencionadas. Otra evaluación futura de este programa con más lotes con 4 vacunas permitiría sacar conclusiones más realistas.

En los lotes Los Copihues C3 (con 6 vacunas) y Los Molles 3 (con 7 vacunas) también la medición del título de anticuerpos fue efectuada una semana después de aplicada la última vacuna y muestran valores menores que lotes de gallinas homólogos. En estos casos también parece haber una influencia de la proximidad de la vacunación al momento de la cuantificación de anticuerpos (Chhabra *et al.*, 2015)

En la tabla N°3 se observa que el resto de los 21 lotes de gallinas con 6, 7 u 8 vacunas presentaron títulos medios de anticuerpos contra BI superiores a 2000 (de 2095 a 6612). La línea base del Manual Idexx® señala que, en un plan de vacunas vivas contra BI,

se espera una MG de 1000 a 4000; y de 5000 a 16000 si se incorpora una vacuna inactivada (Roza *et al.*, 2013). Estos rangos tan amplios están influidos por el número de vacunas aplicadas, la edad de las aves, entre otros factores.

Los CV de todos los lotes de 18 semanas y más (Tabla N°3), fueron menores de 100% (de 44,7 a 94,1), a excepción del lote Los Molles 3, que por las razones dadas anteriormente alcanzó un 105,4%. Ristow (2010) señala que es aconsejable evaluar la respuesta inmune a la vacunación 2 o 3 semanas después de aplicada una vacuna, en caso de que se desee validar un programa de vacunación y, según los datos de este autor, este CV obtenido refleja una mala uniformidad en la respuesta vacunal. En efecto, esto queda en evidencia al ver la respuesta individual de cada uno de los 20 individuos del lote, y cuyo rango de respuesta de títulos de anticuerpos fue amplio (130-6060, dato no documentado). El resto de los lotes, alcanzó niveles de CV que indican que la uniformidad del programa de vacunación es razonable. Van Leerdman (2008b) establece que un CV esperado para una buena vacunación en el caso de ocuparse vacunas vivas oscila en el rango de un 40-70% y que una cantidad menor a 30%, refleja el resultado de un excelente programa de vacunación o un desafío viral de campo.

Con respecto a los demás lotes (Tabla N°3 y Gráfico N°1), se puede observar que hay una tendencia a más altos títulos de anticuerpos mientras más edad tienen las aves. Astudillo (2013) midió anticuerpos vacunales en gallinas de postura de campo criadas en condiciones de laboratorio a las 17, 26, 35, 44, 53 y 65 semanas, y sus MG fueron de 5008, 8180, 4636, 2168, 3926 y 4511, respectivamente, valores semejantes a nuestro estudio, cuyo máximo título de anticuerpos (MG) fue de 6612 y se detectó a las 60 semanas. Colas *et al.*, (2010) señalan que es esperable tener un alza sostenida de MG de títulos de anticuerpos a partir de la 3ª vacunación. En su experimento esto ocurre a partir de las 16 semanas de vida del ave.

El Gráfico N°2 permite analizar las MG de títulos de anticuerpos obtenidos por las gallinas según los 8 sectores a que pertenecen. El rango de títulos de anticuerpos obtenidos fue de 159 a 5212. Aunque la MG de 159 del sector Los Copihues está distorsionada porque agrupa a lotes de aves que tienen entre 4 a 18 semanas, y 1, 4 y 6 vacunas, el resto de los sectores, que tenían 6, 7 u 8 vacunas y que estaban en plena etapa de producción de huevos, obtuvieron un rango de MG de títulos del orden de 2261 a 5212. Valores esperables, dado que Roza *et al.*, (2013) señalan que, después de que un lote de gallinas haya recibido

tres estímulos vacunales previos y, al aplicarle una nueva vacuna viva, los títulos medios de anticuerpos pueden ascender desde 1000 a 4000, 3 a 5 semanas después de aplicada la vacuna. Las diferencias de valores de MG entre los distintos sectores productivos de gallinas puede estar influenciadas por una serie de factores, tales como la edad, el número de vacunas que un ave reciba, los diferentes tiempos en que estas aves han recibido sus vacunas, las diferentes series de vacunas que se han utilizado en la vacunación, la diversidad de vacunadores, etc. (Sulaiman *et al.*, 2003; Van Leerdman, 2008a; Di Fábio y Villarreal, 2009; Jackwood y De Wit, 2013). Litke (1975) señala que aspectos relativos a la crianza común de las aves, tales como el clima en los galpones, la higiene, calidad en el agua de bebida, radiación solar, presencia de contaminación, además de las condiciones generales de cada gallina y de la población en general, puede influir en la respuesta de anticuerpos después de la vacunación. Auerbach *et al.*, (2014) señalan que el tipo de alojamiento también puede influir en el aumento de títulos medios de anticuerpos después de la vacunación contra BI.

La tabla N°4 entrega información sobre el análisis estadístico de los títulos de anticuerpos contra BI de las gallinas, según el N° de vacunas, y demuestra que hay un aumento paulatino de los títulos de anticuerpos después de 6 vacunas aplicadas. El inesperado bajo título promedio del lote con 4 vacunas (260), que en esta tabla se expresa como MA fue discutido anteriormente y es estadísticamente similar al lote con 1 vacuna, con una MA de 301 (Tabla N°4). La revacunación marca un incremento significativo a una MA de 2341 con 6 vacunas; y vuelve a haber un incremento significativo a una MA de 4711 con 7 vacunas; sin embargo con 8 vacunas se logra una MA de 4434, que es estadísticamente similar a la anterior. Lo que se podría interpretar que con 8 vacunas o más solo se logra mantener un adecuado nivel de anticuerpos séricos contra BI. Pinochet y Ábalos (1989) mencionan el efecto *booster*, y lo define como un sistema de repetición de un estímulo vacunal en un periodo definido, a fin de lograr una mayor respuesta inmunitaria. En el caso de las vacunas vivas atenuadas, éstas son administradas varias veces a lo largo de la vida del ave, para lograr el efecto *booster*, vale decir, gracias a la aplicación continua de vacunas, se puede elevar los niveles de anticuerpos, haciéndose además más duraderos (Martínez-Aleson, 2002). Colas *et al.*, (2010) señalan que, mientras más vacunas reciba un ave, hay un incremento en los títulos de anticuerpos. Cavanagh (2003) señala que la protección de las vías respiratorias, después de aplicar una única vacunación a virus vivo atenuado, es de corta duración y comienza a declinar a partir de las 9 semanas post-vacunación, lo que hace

imprescindible la revacunación en la prevención de la BI en aves de larga vida productiva, como las gallinas ponedoras.

En este estudio, debe tomarse en cuenta que la 8ª vacuna se aplica masivamente por el método de aspersión, que no asegura una dosis homogénea de vacuna para las miles de gallinas confinadas, de 4 a 10 individuos por jaula. Por otra parte, el incremento de anticuerpos no es infinito y se estabiliza después de cierto número de vacunas. Siegrist (2008), señala que, después de la exposición a un antígeno vacunal por revacunación, hay una fase de incremento de títulos de anticuerpos, se alcanza un *peak* que se mantiene, aproximadamente, unas seis semanas, tras las cuales estos títulos de anticuerpos descienden lentamente.

En las tablas N° 5 y 6, se entrega información sobre el análisis estadístico de los sectores con 7 y con 8 vacunas, respectivamente. Los sectores con 7 vacunas, representados en la tabla N°5, con un rango de títulos de anticuerpos de 2887 a 6193, se diferencian en 2 grupos principales según títulos promedios estadísticamente diferentes. La tabla N°6, que representa a los sectores con 8 vacunas, con un rango de MA de 3799 a 5622 también se diferencian en 2 grupos con títulos promedios estadísticamente diferentes. Estas diferencias, probablemente, estén influidas por las diferencias temporales de la aplicación de las vacunas, diferencias estructurales de los sectores, diferencias de las vacunas, diferencias de manejos y personal de vacunación, entre otros.

En resumen, en las gallinas con 6, 7 y 8 vacunas hay similitud entre los títulos de anticuerpos, tanto se analicen como lotes o como sectores. Por otra parte, estos títulos serológicos, aunque diversos en cada grupo vacunal, se consideran los esperados y protectivos según la bibliografía (Astudillo, 2013; Roza *et al.*, 2013).

El corto período protector que confiere una vacuna viva atenuada contra BI, obliga a la vacunación periódica y el programa bajo estudio incluía 8 vacunas. De allí que en EE.UU, en muchos planteles de gallinas ponedoras, éstas se revacunán cada 8 a 10 meses. Este procedimiento también se está comenzando a aplicar en Chile.

Aunque no está en los objetivos de este estudio, se puede comentar que, estando la población de gallinas bajo condiciones de campo, los títulos de anticuerpos obtenidos no parecen influidos por infecciones de campo del virus de BI, ya que el equipo técnico de la empresa no reportó antecedentes clínicos relacionados con la BI, ni problemas productivos asociados a esta enfermedad durante los doce meses previos al muestreo efectuado.

CONCLUSIONES

El plan de vacunación contra BI de las gallinas ponedoras de esta empresa es el adecuado, particularmente después de las 6 vacunas, ya que otorga niveles de anticuerpos aceptados y recomendados en la literatura científica internacional.

Los títulos de anticuerpos contra BI obtenidos con este plan de vacunación con vacunas vivas sugieren que no hay evidencias de una infección de campo, en ninguno de los lotes de gallinas analizados.

La diversidad de títulos de anticuerpos obtenidos y la amplitud de los CV entre los distintos lotes o sectores de gallinas, con o sin número de vacunas similares, podría estar relacionadas con factores naturales e incontrolables, o parcialmente influida por la calidad del manejo vacunal. Esto último justifica recomendar una revisión del manejo de la vacunación.

BIBLIOGRAFÍA

- **ALEKSEJUNIENE, I.; ALEKSEJUNAS, A.; SILKUNAITE, J.** 2006. Antibody response in chicks vaccinated against infectious bronchitis virus. Veterinarmedicinas raksti. Starptautiskās zinātniskās konferences raksti. Jelgaba, Letonia; pp: 12-15.
- **ÁLVAREZ, D.C.; USMA, J.A.; JAIME, J.; VERA, V.J.** 2009. Dinámica serológica del virus de la Bronquitis Infecciosa en una granja de pollos de engorde del departamento de Cundinamarca. Rev. Med. Vet. Zoot. 56:105-112.
- **ANÓN** 2013. ELISA technical guide. Idexx® Westbrook, Maine, USA.
- **ANÓN** 2014. ELISA Titers in Georgia Poultry. Georgia Poultry Laboratory Network [en línea] <<http://www.gapoultrylab.org/wp-content/uploads/2015/07/GA%20titers%202012-2014%20updated%2011-21-2014.pptx>> [consulta: 17-12-2015]
- **ASOHUEVO. ASOCIACIÓN DE PRODUCTORES DE HUEVO;** 2006a. Bioseguridad en plantales de ponedoras comerciales de huevos. [en línea].<http://www.asohuevo.cl/asociados/MP_3_BIOSEGURIDAD_AVES_PONEDORAS.pdf> [consulta: 12-06-2014].
- **ASOHUEVO. ASOCIACIÓN DE PRODUCTORES DE HUEVO;** 2006b. Bioseguridad en plantas de incubación para aves de carne y ponedoras de huevos comerciales. [en línea].<http://www.asohuevo.cl/asociados/MP_4_BIOSEGURIDAD_AVES_INCUBAC_CA_RNE_PONEDORAS.pdf> [consulta: 12-06-2014].
- **ASTUDILLO K.** 2013. Cinética de anticuerpos postvacunales contra Bronquitis Infecciosa mediante la microtécnica de Elisa en aves de postura. [Tesis para optar al título de Ingeniero Agropecuario]. Sangolquí, Ecuador. Escuela Politécnica del Ejército. Ingeniería de Ciencias Agropecuarias. 87 p.
- **AUERBACH, M. I.; GLÜNDER, G.; WEBER, R. M.** 2014. Varying antibody responses of laying hens housed in an aviary system and in furnished cages. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 127(7/8), 227-273.
- **BALESTRIN, E.; FRAGA, A.; IKUTA, N.; CANAL, C.; FONSECA, A.; LUNGE, V.** 2014. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems— A field study in Brazilian poultry flocks. Poultry Science 93 :1–8.
- **BEZUIDENHOUT, A.; MONDAL, A.; BUCKLES, E.** 2011. Histopathological and Immunohistochemical Study of Air Sac Lesions Induced by Two Strains of Infectious Bronchitis Virus. J. Comp. Path. Vol.? 1-8.

- **BORNE, P; COMTE, S.** 2001. Vaccines and Vaccination in poultry. CEVA sante animal. [en línea] <[http://www.sapoultry.co.za/pdf%20training/useful_documents/Vaccines-Ch4\).pdf](http://www.sapoultry.co.za/pdf%20training/useful_documents/Vaccines-Ch4).pdf)> [Consulta: 09-10-2014].
- **CAVANAGH, D.** 2003. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus, *Avian Pathology*, 32:6, 567-582
- **CAVANAGH, D.** 2007. Review article Coronavirus avian infectious bronchitis virus; *Vet. Res.* 38 281-297.
- **CAVANAGH, D.; GELB, J.** 2008 Chapter 4: Infectious Bronchitis. **In:** Saif Y.M, Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E (Eds). *Disease of Poultry*, 12th ed. Blackwell Publishing Profesional, Ames, Iowa; pp.117-135.
- **CHHABRA, R.; CHANTREY, J.; GANAPATHY, K.** 2015. Immune Responses to Virulent and Vaccine Strains of Infectious Bronchitis Viruses in Chickens. *Viral Immunology.* 28(9): 478-488.
- **COLAS, M.; MERINO, A.; SANTANA, M.; MIRANDA, Y.; BACALLAO, N.; LOBO, E.; VEGA, A.** 2010. Serological study of agents associated to chronic respiratory syndrome in laying hens. *Biotechnol Apl*, v. 27, n. 3.
- **COOK, J.; JACKWOOD, M.; JONES, R.** 2012. The long view: 40 years of infectious bronchitis research, *Avian Path.* 41:3, 239-250.
- **COVACEVIC, G.; ESNAOLA, V.** 2010. Mercados Agropecuarios: producción de huevos. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Ministerio de Agricultura de Chile [en línea]. <http://www.odepa.cl/odepaweb/servicios-informacion/Mercados/oct-10.pdf> [consulta: 12-07-2014]
- **CUBILLOS, A.; ULLOA, J.; CUBILLOS, V.; COOK, J.**1991. Characterisation of strain of infectious bronchitis virus isolated in Chile. *Avian Path.* 20: 85-99.
- **DAVELAAR, F. G.; KOUWENHOVEN, B.** (1981). Study on the local effect of eye-drop vaccination against infectious bronchitis in 1-day-old chicks with maternal antibodies. *Avian Pathology*, 10(1), 83-90.
- **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.
- **DI FABIO, J.; ROSSINI, L.I.** 2000. Bronquite infecciosa das galinhas. **In:** Berchieri Júnior, A.; Macari, M. *Doenças das aves.* Campinas: Facta, 2000. p.293-300.

- **DI FÁBIO, J.; VILLARREAL, LYB.** 2009. Bronquite infecciosa das galinhas. **In:** Doenças das aves. Campinas: FACTA; 2009. p. 631-648.
- **DI RIENZO J.; CASANOVES F.; BALZARINI M.; GONZALEZ L.; TABLADA M.; ROBLEDO C.** 2015. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- **DHINAKAR RAJ, G.; JONES, R.C.** 1997. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chickens, *Avian Pathology*, 26:4, 677-706.
- **ETERRADOSI, N.; BRITTON, P.** 2013. Capítulo 2.3.2 Bronquitis infecciosa aviar. **In:** Manual de la OIE sobre animales terrestres. Organización Mundial de Sanidad Animal. 1-16.
- **GALLARDO, R.; P. OLIVARES.** 1984. Aislamiento de un virus bronquitis infecciosa de un problema de uricosis en aves en producción. V Congreso Nacional de Medicina Veterinaria, Valdivia, Chile. pp: 17.
- **GARCÍA, A.; NORAMBUENA, M.** 1969. Diagnóstico preliminar de la bronquitis infecciosa en Chile. *Rev Soc Med Vet Chile* (19), 27-33.
- **GELB, J.** 2013. Avian infectious bronchitis. Cap.2.3.2. **In:** Terrestrial animal healthcode [en línea]. <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf>[consulta: 03-03-2016]
- **GELB, J.J.; JACKWOOD, M.** 2008. Infectious Bronchitis. **In:** A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens, 5th ed. L. Dufour-Zavala, D.E. Swayne, J.R. Glisson, J.E. Pearson, W.M. Reed, M.W. Jackwood and P. Woolcock, eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. pp 146-149.
- **GIACOMOZZI, J.** 2014. “Situación actual de la industria del huevo”. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias <http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1403205233Huevos201406.pdf> [consulta: 12-07-2014].
- **HÄRTLE, S.; MAGOR, K.; GÖBEL, T.; DAVISON, F.; KASPERS, B.** 2014. Chapter 6: Structure and evolution of avian immunoglobulins. **In:** Avian Immunology, 2nd ed. Schat, K.; Kaspers, B. y Kaiser, P. eds. Elsevier. pp 103-120.
- **HIDALGO, H.** 2010. Bronquitis infecciosa: Situación en Chile y Latinoamérica. *TecnoVet*, [S.l.], v. 6, n. 1, sep. 2010.
- **HIDALGO, H.; GALLARDO, R.; ROSENDE, S.** 1976. Isolation of infectious bronchitis virus from broiler chickens in Chile. *Avian Dis* (20), 601-603.

- **HIDALGO, H.; GALLARDO, R.; TORO, H.** 1986. Características antigénicas y patológicas de tres aislados del virus de la Bronquitis Infecciosa obtenidos de aves vacunadas. *J. Vet. Med.* 33: 26-35.
- **HIDALGO, H.; RIVAS, D.** 2010. Bronquitis Infecciosa de las gallinas: Situación en Latinoamérica. In: XIII Seminario Internacional de Avicultura AMEVEA. Quito, Ecuador. 17-19 marzo 2010.
- **IDEXX LABORATORIES.** 2012. Kit para la detección de anticuerpos frente al virus de la Bronquitis Infecciosa. Versión Española. Westbrook, Maine. USA.
- **JACKWOOD, M.** 2012. Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis.* 56: 634-641.
- **JACKWOOD, M.; DE WIT, J.J.** 2013. Chapter 4: Infectious Bronchitis. In: Swayne, D., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez, D y Nair, V (Eds). *Disease of Poultry*, 13th ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa; pp.139-160.
- **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 form California. *Avian Dis.* 51:527-533.
- **LISTER, S.** 2008. Chapter 4: Biosecurity in poultry management. In: Pattison, M.; McMullin, PF.; Bradbury, JM; Alexander, DJ. *Poultry diseases*, 6° ed. Filadelfia, Pensilvania, EE.UU. Saunders Elsevier. pp: 48-65.
- **LITKE, OM.** 1975. Newcastle Disease: Faktoren, die eine Impfung über das Trinkwasser mit lentogenen Stämmen Hitchner B1 und La Sota beeinflussen können; Kontrolle des Impferfolges. Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- **LOPEZ, J.; MCFARLANE, R.; ULLOA, J.** 2006. Detección y caracterización del virus de bronquitis infecciosa aviaria en Chile mediante RT-PCR y análisis secuencial. *Arch. med. vet.*, vol.38, no.2, p.175-178. ISSN 0301-732X.
- **MARANGON, S.; BUSANI, L.** 2007. The use of vaccination in poultry production. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 26(1), 265.
- **MARTINEZ-ALESON, R.** 2002. Estudio experimental de las alteraciones producidas por la variedad h-52 del virus de la bronquitis infecciosa aviar. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones. 113p.

- **MOCKETT, A.; DARBYSHIRE, J.** 1981. Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for antibodies to avian infectious bronchitis virus, *Avian Pathology*, 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. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 79: 31-40
- **PENA, L.J.; DOS SANTOS, B.M.; ROBERTI, R.P.; MARIN, S.Y.** 2005. “Artigo de Revisão: Bronquite Infecciosa das Galinhas”. *Arquivos do Instituto Biológico* 72: 397-404
- **PINOCHET, L.; ABALOS, P.** 1989. Vacunas y vacunación. *Monografías de Medicina Veterinaria*, 11(2).
- **RATCLIFFE, M.; HÄRTLE, S.** 2014. Chapter 4: B Cells, the Bursa of Fabricius and the generation of antibody repertoires. *In: Avian Immunology*, 2nd ed. Schat, K.; Kaspers, B. y Kaiser, P. eds. Elsevier pp 65-89.
- **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. (pp. 157-160). Poultry Research Foundation.
- **RISTOW, E.** 2010. Consideraciones para la interpretación de resultados serológicos a través de la metodología ELISA en avicultura. [en línea]. Disponible en: <http://www.microclin.com/archivos/interpretacion_de_examenes_serologicos_ELISA_D_L_E_Ristow.pdf> [consulta: 13-03-2016].
- **RIVAS, D.** 2010. Caracterización molecular de aislados de campo del virus de la bronquitis infecciosa aviar obtenidos en Chile. Tesis Magíster en Ciencias Veterinarias. Santiago, Chile. Universidad de Chile 77 p.
- **ROZA, K.; LÓPEZ, P.; HANSEN, C.** 2013. Use of Serology to Solve Clinical Case Studies & Interpreting Poultry Baselines. Washington Animal Disease Diagnostic Lab [en línea] <https://waddl.vetmed.wsu.edu/docs/librariesprovider10/avian-lab_puyallup/poultry-institute/2013/05_wa-state-serologyv4.pdf?sfvrsn=2> [consulta: 12-12-2015].
- **SCHIJS, V.; VAN DE ZANDE, S.; LUPIANI, B.; REDDY, S.** 2014. Chapter 20: Practical aspects of poultry vaccination. *In: Avian Immunology*, 2nd ed. Schat, K.; Kaspers, B. y Kaiser, P. eds. Elsevier. pp 345-362.

- **SIEL, D.; VIDAL, S.; SÁENZ, L.** 2014. Principales Sistemas de Entrega de Antígenos en Medicina Veterinaria y Humana. Revista Avances en Ciencias Veterinarias. Vol. 29. N°1. Pp 50-69.
- **SIEGRIST, C. A.** 2008. Vaccine immunology. Vaccines, 5, 1725.
- **SULAIMAN, A.; ROBERTS, J.; BALL, W.** 2003. Proceedings of the Queensland Poultry Science Symposium. 11: 17.1-17.7.
- **THAYER, S.; BEARD, C.** 2008. Serologic Procedures. In: A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens, 5th ed. L. Dufour-Zavala, D.E. Swayne, J.R. Glisson, J.E. Pearson, W.M. Reed, M.W. Jackwood and P. Woolcock, eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. pp 146-149.
- **TIZARD, I.** 2012a. Chapter 1: The defense of the body. In: Veterinary Immunology. 9th ed. Elsevier. Pp: 1-10.
- **TIZARD, I.** 2012b. Chapter 13: Lymphocytes. In: Veterinary Immunology. 9th ed. Elsevier. Pp: 127-136.
- **TIZARD, I.** 2012c. Chapter 14: Helper T Cells and their response to antigen. In: Veterinary Immunology. 9th ed. Elsevier. Pp: 137-139.
- **TIZARD, I.** 2012d. Chapter 15: B Cells and their response to antigen. In: Veterinary Immunology. 9th ed. Elsevier. Pp: 160-154.
- **TIZARD, I.** 2012e. Chapter 16: Antibodies: soluble antigen receptors. In: Veterinary Immunology. 9th ed. Elsevier. Pp: 165-174.
- **TIZARD, I.** 2012f. Chapter 23: Vaccines and their production. In: Veterinary Immunology. 9th ed. Elsevier. Pp: 258-271.
- **TORRES, P.** 2016. Evaluación serológica de la respuesta inmune de pollos de engorde en condiciones de campo a un programa no convencional de vacunación contra bronquitis infecciosa. Tesis para optar al título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile.
- **ULLOA, J.; GÁRATE, O.; CUBILLOS, V.; MANZUR, P.** 1992. Bronquitis infecciosa aviar: respuesta a programas de vacunación en Broilers. Arch. Med.Vet, XXIV N° 2.
- **VAN LEERDMAN, B.** 2008a. How can ELISA monitoring for titers improve your vaccination results? International Hatchery Practice— Vol. 23 N° 2.
- **VAN LEERDMAN, B.** 2008b. Understanding ELISA results. World Poultry— Vol. 24 N° 12.

- **VILLEGAS-NARVÁEZ, P.** 2011. Bronquitis Infecciosa Aviar. In: XXII Congreso Latinoamericano de Avicultura. La Rural Predio Ferial de Palermo, Buenos Aires, Argentina. 6-9 septiembre 2011.
- **VILLEGAS-NARVÁEZ, P.** 2012. Control de la bronquitis infecciosa aviar. Albéitar: publicación veterinaria independiente, (159), 18-20. [en línea] <<http://albeitar.portalveterinaria.com/revistasonline/159.html>> [consulta: 20-01-2016].

ANEXO 1: Certificado de aprobación del comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.



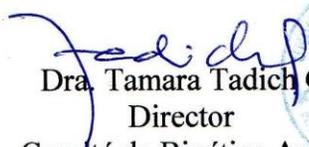
UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Comité de Bioética Animal

Santiago, 16 de junio de 2015

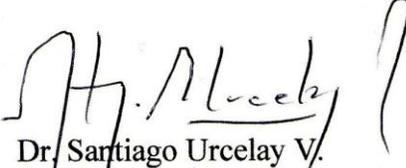
CERTIFICADO Nº 15-2015

En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, tenida a la vista la metodología del Proyecto: **“Evaluación serológica del plan de vacunación contra Bronquitis Infecciosa en gallinas ponedoras de diferentes edades de un plantel comercial”**. Dicho proyecto corresponde a la Memoria de Título de la estudiante Daniela Marchant 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 500 gallinas ponedoras (*Gallus gallus*). Todos los individuos serán mantenidos en una granja comercial y solo se les realizará una toma de muestra de sangre, para luego continuar su ciclo productivo normal.


Dra. Tamara Tadich G.
Director
Comité de Bioética Animal




Dr. Santiago Urcelay V.
Presidente
Comité de Bioética Animal