

Evaluación de tres protocolos de vacunación de explotaciones de pollo de engorda en el altiplano mexicano, mediante detección de anticuerpos y protección ante un desafío controlado con el virus de bronquitis infecciosa*

Felipa Galindo Muñiz**
Magdalena Escorcia**
Víctor M. Petrone**
Tamas Fehervari**
José A. Quintana L.**
Guillermo Téllez Isaías**

Abstract

Seroconversion as the vaccination response and the protection to the challenge against infectious bronchitis virus was determined in thirty Peterson ´ Avian Farm broilers, both sexes which were vaccinated on one-day old chicken and three groups were formed (Groups A, B y C). Animals were revaccinated at 23 days (Group C) with an attenuated vaccine, and antibody titers were obtained by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) indirect technique three weeks after prime vaccination. Chicken thereafter, were exposed to a challenge with the Massachusetts 41 virus strain as a potency test. Thirty broilers served as the non vaccinated control Group. Results of the virus isolation indicated that broilers vaccinated at one-day old, with half a dose, via spray and revaccinate at age 23 days old with the complete dose in the drinking water (Group C) presented an 100% protection. Another Group (B) vaccinated at one-day of age with only a half dose in the drinking water, presented an 82%. This protection can be considered to be satisfactory. A third Group (A) was vaccinated at one-day old with half dose by thin drop spray, and presented only an 8.2%, considered to be as not satisfactory. The geometric mean (TGM) value of ELISA antibodies in groups B and C did not show relation with the protection against the challenge. Results suggest that the vaccination procedure in group A was not effective and did not provide protection against infectious bronchitis virus challenge performed at six weeks old.

Key words: VACCINATION, INFECTIOUS BRONCHITIS, BROILER CHICKENS, ELISA.

Resumen

Se evaluó el procedimiento de vacunación de tres explotaciones avícolas de pollo de engorda, estirpe Peterson ´ Avian Farm, de sexo indistinto, determinándose la seroconversión como respuesta a la vacunación, mediante la obtención del título de anticuerpos circulantes utilizando la técnica del ensayo inmunoenzimático (ELISA) y el porcentaje de protección al desafío con un virus patógeno de bronquitis infecciosa, cepa Massachusetts 41. Treinta aves fueron vacunadas al día de edad (grupos A, B y C) y revacunadas a los 23 días de edad (grupo C) con virus activo atenuado. Otras 30 aves fueron grupos testigos no vacunados. Los resultados del aislamiento viral sugieren que en las aves vacunadas al día de edad, con media dosis de la vacuna vía aspersión y revacunadas a los 23 días de edad, con una dosis completa en agua

Recibido el 3 de diciembre de 1998 y aceptado el 12 de abril del 2000.

* Trabajo como resultado de tesis de licenciatura del primer autor.

** Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F. E-mail: fegam@yahoo.com, magdaescoria@yahoo.com.

de bebida (grupo C), la protección alcanzada fue de 100%. Para otro grupo (B) vacunado al día de edad con media dosis en agua de bebida, se observó 82% de protección, considerándose satisfactorio, y para un tercer grupo vacunado al día de edad con media dosis, por aspersión con gota fina (A), se obtuvo sólo 8.2% de protección, considerándose no satisfactorio. Las medias geométricas (MG) de anticuerpos ELISA obtenidos en los grupos B y C, no mostraron relación con la protección de las aves al desafío. Se concluye que el procedimiento utilizado en el grupo A no fue efectivo ya que no proporcionó protección a las aves ante un desafío con virus de bronquitis infecciosa a las seis semanas de edad.

Palabras clave: VACUNACIÓN, BRONQUITIS INFECCIOSA, POLLOS DE ENGORDA, ELISA.

Introducción

La bronquitis infecciosa (BI) constituye una enfermedad ocasionada por un coronavirus con genoma de ácido ribonucléico (ARN) que produce principalmente un cuadro de tipo respiratorio en aves jóvenes, gallinas de postura y reproductoras, aunque en estas dos últimas es más evidente el daño que provoca en el tracto reproductor debido a que disminuye la producción de huevo, la calidad interna y externa de éste, así como su fertilidad e incubabilidad. Algunas cepas del virus también ocasionan lesiones en aparato urinario, lo que produce diuresis.¹⁻⁶ Anteriormente, la forma efectiva de controlar la BI era por medio de la exposición de virus no atenuados virulentos, posteriormente se utilizó la vacunación con virus atenuados. En la actualidad, el mayor obstáculo para conseguir una protección efectiva es el surgimiento continuo de variantes antigenicas del virus de bronquitis infecciosa (VBI), aunque no se debe descartar la posibilidad de que la falla sea ocasionada por un protocolo inadecuado de vacunación.^{2,3}

Dado que las vacunas de virus vivo utilizadas en la actualidad con frecuencia no confieren inmunidad adecuada contra las variantes del VBI, en otros países, las vacunas de virus vivo contienen variantes atenuadas. Estas vacunas son más efectivas en la prevención de la BIA producida por la cepa variante homóloga, pero no necesariamente confieren inmunidad contra otras variantes y aumentan las posibilidades de que se generen aún más variantes de VBI, con la introducción de nuevo material genético. Es, por lo tanto, determinante establecer si las llamadas fallas vacunales son verdaderamente ocasionadas por la aparición de cepas variantes o son debidas a otras causas, como errores de vacunación o en los protocolos utilizados, mala calidad de la vacuna e incluso inmunodepresión.⁷⁻⁹

Se ha tratado de controlar la diseminación del coronavirus por medio de la utilización de programas de vacunación adecuados a cada granja; sin embargo, en ocasiones las aves han manifestado la enfermedad aun después de haber sido vacunadas, incrementando la morbilidad y mortalidad debido a que se complica con bacterias y otros virus.^{2,7,8} Una posible causa de

falla vacunal puede ser la presencia de cepas variantes, que evaden la protección conferida por las vacunas existentes, ya que no existe suficiente protección cruzada entre serotipos.⁹⁻¹¹

El diagnóstico y la evaluación de la respuesta inmune se realiza mediante pruebas serológicas, como inmunodifusión en agar, virus seroneutralización, inhibición de la hemaglutinación y el ensayo inmunológico ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés).^{7,12} Estas pruebas son sólo herramientas en la evaluación de programas de vacunación o de diagnóstico de la enfermedad y es necesario complementar los resultados con evaluaciones histopatológicas, aislamiento viral, actividad ciliar de la tráquea y pruebas de potencia o desafío entre otras.^{6,13} Debido a esto y a que la bronquitis infecciosa continúa ocasionando grandes pérdidas económicas a pesar del uso difundido de vacunas de buena calidad, se decidió evaluar los protocolos de vacunación de tres granjas comerciales de pollo de engorda, considerando la vacuna (cepa y título vacunal), métodos y vías de administración utilizados, así como la edad del ave a la vacunación. Los protocolos de vacunación fueron elaborados según las enfermedades presentes en las granjas evaluadas y aunque éstos son los más utilizados en la zona, la prevalencia y los daños provocados por la BI continúan siendo importantes. En este sentido, fue de especial relevancia evaluar la respuesta serológica de las aves, así como la protección ante un desafío controlado con virus altamente patógeno.

Por lo antes expuesto, y suponiendo que las aves vacunadas contra bronquitis infecciosa, deben producir una respuesta inmune suficiente para neutralizar al virus de campo, se procedió a identificar los niveles de anticuerpos séricos, producidos por una vacunación a virus vivo, mediante ELISA y evaluar su capacidad de protección ante un desafío viral con una cepa perteneciente al mismo serotipo utilizado en la vacunación.

Material y métodos

Se utilizó un total de 60 pollos de engorda de sexo indistinto, de la estirpe Peterson ™ Avian Farm, for-

mándose 6 grupos de 10 aves cada uno. Tres grupos testigo no vacunados (a, b y c), permanecieron desde el día de edad en unidades de aislamiento bajo condiciones controladas, suministrándoles alimento comercial y agua a libre acceso. Dos grupos (A y C) fueron primovacunados al día de edad vía aspersión con media dosis de la vacuna contra el VBI; el grupo B por vía agua de bebida, con media dosis de la vacuna, únicamente el grupo (C) se revacunó a los 23 días de edad vía agua de bebida, con dosis completa de la vacuna en la granja de procedencia (Cuadro 1), donde permanecieron hasta la sexta semana de edad, en la cual fueron remitidas al Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para obtener la muestra de suero y desafiarlas junto con las aves testigo, con una cepa virulenta Massachusetts 41* adaptada al embrión de pollo con título de 10^4 DIEP₅₀/mL, a una dosis de 0.2 mL/ave por vía ocular.¹⁴

Se obtuvo una muestra de sangre de las 60 aves, al día de edad para determinar la media geométrica (MG) de anticuerpos maternos y a los grupos A y a, al día 46 de edad; grupos B y b, 42 días de edad; y grupos C y c, a los 42 días de edad (segunda obtención de muestras) para determinar la MG de anticuerpos posvacunales. La prueba serológica de ELISA se realizó utilizando equipo de diagnóstico y la técnica indirecta establecida por KPL. ** El título de anticuerpos se obtuvo mediante el programa de cómputo PROFILE^a ¹⁵ proporcionado por el mismo laboratorio.

El desafío se realizó un día después de la segunda toma de muestra de sangre, y al quinto día posdesafío (dpd) se tomaron muestras de la mucosa traqueal de manera individual con hisopos, los cuales se colocaron en tubos con 10 mL de caldo triptosa fosfato.¹⁷ Una vez tomada la muestra se sacrificaron e incineraron las aves para evitar la diseminación del virus de desafío. Posteriormente cada muestra de hisopo traqueal se filtró con membranas de poro de 0.45 µm de diámetro y se inoculó en la cavidad alantoidea, 0.2 mL del filtrado por embrión de pollo ALPES^a *** de 9-11 días de edad. La viabilidad de los embriones se observó por medio de ovoscopio durante 7 días posinoculación (dpi) consecutivos, al cabo de los cuales los embriones se sacrificaron y se les realizó estudio *post mortem*. Las lesiones que se consideró que eran producidas por el virus de BI fueron: enanismo, hiperflexión falángica,

miembros pélvicos hiperflexionados y rodeando la cabeza del embrión, dando aspecto de un ovillo, falta de desarrollo, persistencia de uratos en el mesonefros, membrana amniótica engrosada y adherida a la cabeza, saco vitelino encogido, membrana corioalantoidea friable y aumento en el volumen de líquido alantoiodeo.^{5,16,17} En la prueba de potencia el aislamiento viral se consideró satisfactorio, cuando se cumplieron 2 requisitos: por lo menos el 90% de las muestras de las aves vacunadas fueron negativas al aislamiento del virus de BI y como mínimo 90% de las muestras de las aves no vacunadas resultaron positivas.¹⁴

Para reaislar el virus de desafío de BI y se manifiesten las lesiones al primer pase, es necesario que esté adaptado al embrión de pollo;^{5,16,17} asimismo, para minimizar el riesgo de reaislar un virus vacunal las muestras de hisopo traqueal deben obtenerse como mínimo tres semanas después de aplicada la última vacuna,¹⁰ estos criterios se tomaron en cuenta para el presente estudio.

Estadística

Se realizó el análisis de proporciones mediante la prueba de Ji cuadrada de los aislamientos virales a los grupos A, B y C. Se aplicó análisis de varianza a los resultados de ELISA, donde la variable de respuesta fue el título de anticuerpos detectados, mientras que la variable explicativa fueron las vacunaciones. A los datos obtenidos se les realizó una transformación mediante el cálculo de raíz cuadrada, sumándoles 0.5 de unidad para evitar las cantidades cero. La diferencia estadística entre grupos se determinó mediante la prueba de Tukey. La significancia estadística se fijó con una $P < 0.05$.

Resultados

Las MG de anticuerpos detectados por ELISA en los grupos B (909) y C (3140) no mostraron diferencia estadística significativa a las 6 semanas de edad, y tampoco hubo relación con la protección de las aves al desafío, considerando que KPL^a para BI maneja un título de 5000 como protector; sin embargo, el grupo A mostró diferencia en relación con los otros grupos (Cuadro 1).

En el estudio virológico, realizado por medio del reaislamiento del virus de desafío o prueba de potencia, se observó en el grupo C 100% de protección, estos grupos corresponden a las aves revacunadas a los 23 días de edad (Cuadro 1). En el grupo B se observó 82% de protección y en el A sólo 8.2%, considerándose no satisfactorio. Hubo diferencia estadística significativa entre los tres grupos. En los grupos testigos no vacunados se aisló el virus de todas las muestras.

* Donado por Laboratorios de Investigación Aplicada, S.A. 7 Norte número 16, Tehuacán, Puebla, México.

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

*** Aves Libres de Patógenos Específicos, S.A., 7 Norte número 16, Tehuacán, Puebla, 75700, México.

Cuadro 1

TÍTULOS DE ELISA⁺ EN SUERO Y AISLAMIENTOS DE BRONQUITIS INFECCIOSA EN EMBRIÓN DE POLLO A PARTIR DE HISOPOS TRAQUEALES, OBTENIDOS AL QUINTO DÍA POSDESAFÍO, DE LOS SEIS GRUPOS DE AVES UTILIZADAS EN EL EXPERIMENTO, CON SU CORRESPONDIENTE PROTECCIÓN AL DESAFÍO

Grupo	Edad a la revacunación/ Cepa (días)	Vacunal vacunal	Título Vía de (DIEP ₅₀ /mL)	aplicación	Tratamiento	Evaluados Títulos ELISA ^{††}	Embriones al desafío Positivos/Total	Protección (%)
A	1/NRV	Mass 48	10 ^{5.4}	Aspersión	V/D	75 ^{ab} ± 236	41/50 ^a	8.2
a	—	—	—	—	NV/D	0 ^a ± 0	50/50	0
B	1/NRV	Mass	10 ^{4.5}	Aqua de bebida	V/D	909 ^{bc} ± 734	9/50 ^b	82
b	—	—	—	—	NV/D	0 ^a ± 0	50/50	0
C	1/23	Mass	10 ^{3.2}	Aspersión*	V/RV/D			
			10 ^{3.5}	Aqua de bebida**		3140 ^c ± 3076	0/50 ^c	100
c	—	—	—	—	NV/D	0 ^a ± 0	50/50	0

⁺KPL[®] títulos posvacunales, un día antes del desafío (realizado a las seis semanas de edad de las aves). NRV: No revacunado. *En la vacunación (media dosis). **En la revacunación (dosis completa). V= Vacunación. D= Desafío. NV: No vacunación (grupos testigos). RV= Revacunación. ^{††}Media ± desviación estándar. ^{a,b,c} Literales distintas dentro de las columnas demuestran diferencia estadística significativa para títulos de ELISA ($P < 0.05$) y aislamientos ($P < 0.01$).

Discusión

Se ha descrito que aves con índices de neutralización de 0 han resistido el desafío,¹⁸⁻²⁰ sugiriendo que en el caso de la BI la respuesta inmune y resistencia del ave hacia la infección se da principalmente a nivel local por la presencia de IgA y células de defensa como los linfocitos T, siendo la glándula de Harder el órgano encargado de ésta. Este tipo de inmunidad no se ve significativamente afectada por la presencia de un elevado título de anticuerpos maternos;²¹ asimismo, se discute que la protección contra la enfermedad se puede presentar en ausencia de una respuesta inmune de tipo humorar.²²

La influencia de inmunidad materna sobre la vacunación de las aves al día de edad puede no ser significativa; por el contrario, aves que poseen un título alto de anticuerpos maternos, presentan reacciones posvacunales más leves que aves con bajo título.^{9,23} La MG obtenida a partir de todos los grupos al día de edad fue baja; sin embargo, no se puede descartar su efecto sobre la adecuada generación de inmunidad a nivel sérico, así como la inmadurez inmunológica presente en aves de un día de edad y procedentes de reproductoras inmunizadas en repetidas ocasiones.²⁴

Las MG de los grupos no vacunados (a, b y c) a la sexta semana de edad fueron 0 en todas las aves, lo cual indica que los anticuerpos maternos contra BI ya habían declinado y no fueron detectados por el siste-

ma de ELISA. Se señala que la mejor edad para primovacunar a las aves utilizando vacunas con virus vivo es entre la primera y la segunda semanas de edad, para evitar una posible neutralización del virus vacunal por los anticuerpos maternos circulantes. Sin embargo, en aves no vacunadas se ha observado que dichos anticuerpos declinan linealmente, proporcionando protección contra desafíos hasta la cuarta semana, pero se prefiere vacunar a las aves al día de edad para disminuir el riesgo de una infección temprana.^{2,11,25-27}

Por otro lado, la media dosis de la vacuna utilizada en la primovacunación al día de edad de los grupos A y B, pudo haber influido en el desarrollo de una adecuada respuesta inmune, ya que al disminuir la dosis se reduce la carga viral que recibe cada ave considerando que el título óptimo establecido oficialmente es de 10⁴DIEP₅₀/mL, lo que permitió que los anticuerpos maternos presentes en las aves neutralizaran el virus.² Al aplicar la mitad de la dosis de la vacuna se redujeron las reacciones posvacunales severas en aves jóvenes y la posibilidad de complicaciones con bacterias u otros virus, pero lo más indicado es elegir una cepa de alto pasaje que minimiza este riesgo sin dejar desprotegidas a las aves.^{3,28}

Al comparar los resultados de los grupos vacunados con su respectivo grupo testigo, se encontró que entre el grupo A y a, las diferencias tanto en el estudio serológico y virológico no fueron significativas. Lo

anterior indica que la vacunación por aspersión al día 1 de edad no funcionó, lo que pudo deberse a un mal manejo de la vacuna o a la utilización de un procedimiento de vacunación inadecuado. Es necesario considerar que las vacunas administradas por aspersión o en agua de bebida son susceptibles a la inactivación por sustancias higiénicas como cloruros. Estas sustancias deben ser eliminadas antes de la vacunación o disminuir su efecto adicionando algún producto, que estabilice el título vacunal.^{5,28}

Por otro lado, la vacunación contra BI que incluyó una revacunación (grupo C) protegió 100% a las aves contra posibles desafíos de campo. Se menciona que los niveles de anticuerpos séricos, generalmente no están correlacionados con la resistencia o susceptibilidad de las aves a desafíos y que la prueba de potencia o de desafío controlado es uno de los métodos más seguros para evaluar la protección de aves vacunadas y revacunadas a cualquier edad, con vacunas que poseen diferente título y administradas por cualquier vía y método de vacunación.^{6,26}

Dada la situación actual de la BI en México, es importante mencionar que no debe descartarse la presencia de cepas variantes del VBI que evaden la protección de los anticuerpos generados por la cepa vacunal y, por lo tanto, ocasionan falla en la respuesta inmune de las aves hacia la vacunación.²⁹ Al respecto, Kusters, en 1987, señala que el uso de vacunas atenuadas, aunque reducen las pérdidas económicas ocasionadas por la infección con VBI, también pueden ser responsables del surgimiento de variantes antigenéticas, al darse una recombinación entre las cepas vacunales y las cepas de campo.³⁰

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el programa de becas para tesis de licenciatura, apoyado por la Fundación UNAM, por medio de la beca otorgada al primer autor.

Referencias

1. Avellaneda G. Estructura del virus de bronquitis infecciosa. *Avic Prof* 1992;10:38-40.
2. Soto PE. Situación actual de la bronquitis infecciosa en México. Memorias del VIII Curso de Actualización Avi-Mex Bronquitis Infecciosa y Problemas Respiratorios Emergentes; 1996 julio 26; México (DF). México (DF): Laboratorio Avi-Mex, S.A. de C.V., 1996:6-13.
3. Lucio MB. El virus de la bronquitis infecciosa y sus variantes. Memorias de la XXII Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas; 1997 mayo 7-11; Ixtapa-Zihuatanejo (Guerrero) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, A.C., 1997:316-322.
4. Moreno ChR. Bronquitis infecciosa de las aves. *Inf Cient Tecnol* 1994;1:9-16.
5. King DJA, Cavanagh D. Bronquitis infecciosa. En: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW, editores. *Enfermedades de las aves*. México (DF): El Manual Moderno, 1995:575-591.
6. McMartin DA. Infectious bronchitis In: McFerran JB, McNulty MS, editors. *Virus infections of birds*. Amsterdam, The Netherland: Elsevier Science Publishers, 1993:249-275.
7. López S, Canovas A, Viamontes O, Núñez L. Valoración de los esquemas más adecuados de la vacunación contra el Newcastle y la bronquitis infecciosa en pollos de engorde. *Rev Cub Cienc Avíc* 1991;8:62-70.
8. Lucio DE. Calendarios de vacunación y monitoreo en el pollo de engorda y gallina de postura. *Memorias del Curso de Actualización Sobre Técnicas de Vacunación y Reacciones Posvacunales*; 1996 noviembre 29; México (DF). México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, A.C., 1996:47-52.
9. Butcher DG, Miles DR. Vaccination failure: factors to consider. *Poultry Dig* 1993;52:22-26.
10. Quiroz MA, Retana A, Tamayo M. Determinación de la presencia del serotipo Arkansas a partir de aislamientos del virus de bronquitis infecciosa aviar en México. *Memorias de la IV Jornada Médico Avícola*; 1993 agosto 4-6; México (DF). México (DF): Departamento de Producción Animal: Aves-División de Educación Continua de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 1993:191-198.
11. Cook JKA. Actualidades sobre la bronquitis infecciosa: problemas respiratorios en las aves. *Intervet* 1996;1:1-10.
12. Villegas P, Avellaneda G. Interpretación de resultados serológicos en bronquitis infecciosa. *Avic Prof* 1992;10:8-12.
13. Dufour L, McCarty J. Uso correcto de la serología en pollos de engorde para el control y diagnóstico de enfermedades. *Avic Prof* 1993;11:30-32.
14. The Office of the Federal Register. National Archives and Records Service, General Services Administration. Code of federal regulations. Animals and animal products. Washington (DC): Federal Register National Archives, 1975;9:284-286.
15. Kirkegaard and Perry Laboratories. Profile (computer program) version 2.1. The KPL diagnostic system manual. Bangkok (Thailand): Kirkegaard and Perry Laboratories, 1993.
16. Winterfield RW, Fadly AM, Hanley JE. Characteristic of an isolate of infectious bronchitis virus from chickens in Florida. *Avian Dis* 1971;15:305-311.
17. Gelb J. Infectious bronchitis. In: Graham H, Lawrence H, Charles H, James EP, editors. *Isolation and identification of avian pathogens*. Mississippi (MS): American Association of Avian Pathologists, 1989:124-127.
18. Darbyshire JH, Peters RW. Humoral antibody response and assessment of protection following primary vaccination of chicks with maternally derived antibody against avian infectious bronchitis virus. *Res Vet Sci* 1985;38:14-21.
19. McDonald JW, Dagless MD, Martin DA, Randall CJ, Patisson M, Early JL, et al. Field observations on serological responses to vaccine strains of infectious bronchitis virus administered by coarse spray and via the drinking water. *Avian Pathol* 1982;11:537-546.
20. Toro H, Hidalgo H, Collingwood-Selby AN. Lachrymal antibody response of specific pathogen free chickens and chickens with maternal immunity after infectious bronchitis virus vaccination. *Prev Vet Med* 1994;18:267-274.
21. Toro H, Reyes E, Redmann T, Kaleta EF. Local and systemic specific antibody response of different chicken

- lines after ocular vaccination against infectious bronchitis. *J Vet Med B* 1996;43:449-454.
22. Da Silva MNR, Mockett APA, Barret ADT, Cook KAJ. IgM responses in chicken serum to live and inactivated infectious bronchitis virus vaccines. *Avian Dis* 1991;35:470-475.
23. Dufour L. Influencia de las reproductoras sobre las reacciones vacunales de la progenie. *Avic Prof* 1992;10:44-45.
24. Gómez DCA. Medición de la inmunidad. Memorias de la IV Jornada Médico Avícola; 1993 agosto 4-6; México (DF). México (DF): Departamento de Producción Animal: Aves-División de Educación Continua de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 1993:79-88.
25. Davelaar FG, Kouwenhoven B. Vaccination of 1-day-old broilers against infectious bronchitis by eye drop application or coarse droplet spray and the effect of revaccination by spray. *Avian Pathol* 1980;9:499-510.
26. Derbyshire HJ, Peters WR. Sequential development of humoral immunity and assessment of protection in chickens following vaccination and challenge with avian infectious bronchitis virus. *Res Vet Sci* 1984;37:77-86.
27. Andrade LF, Villegas P, Fletcher OJ. Vaccination of day-old broilers against infectious bronchitis: effect of vaccine strain and route of administration. *Avian Dis* 1982;27:178-187.
28. Salado CR. Manejo y aplicación de vacunas por aspiración y por punción en el ala y sus reacciones posvacunales. Memorias del Curso de Actualización Sobre Técnicas de Vacunación y Reacciones Posvacunales; 1996 noviembre 29; México (DF). México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, A.C., 1996:23-28.
29. Lucio MB. Respuesta inmune al virus de la bronquitis infecciosa: protección y serología. Memorias de la XVIII Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas; 1993 mayo 55-59; Cancún (Quintana Roo) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, A.C., 1993:132-137.
30. Kusters JG, Niesters HGM, Bleumink-Pluym NMC, Davelaar FG Horzinek MC, Van der Zeijst BAM. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in the Netherlands. *J Virol* 1987;68:343-352.

