

# Caracterización antigénica de un virus de la bronquitis infecciosa, aislado en pollos de traspatio en Yucatán, México

Edwin José Gutiérrez-Ruiz\*  
Richard Gough\*\*  
Delfina de las M. Zapata-Villalobos\*

## Abstract

Animal production in the backyard is a traditional activity system in Mexico with the aim of solving some of the difficult economic situation of the peasants. Chicken is the most common species in this system in the state of Yucatan; and these animals are fed with by-products which otherwise would be wasted. In previous studies it was found that respiratory disease is the most important one found in these animals. In this study an infectious bronchitis virus isolate was obtained from broiler type chicken introduced to backyards in the Yucatecan community of Sinanche. This virus was called SIN6. The antigenic characterization of this isolate was obtained with the haemagglutination inhibition test using haemagglutinating antigen produced from 11 reference serotypes (Massachusetts 41, Arkansas, Connecticut, Holte, CVL/9, 793/B, Dutch 274, Dutch 1466, Australian "T", Italian 624 and Chilean 368), and antisera against them and against the Iowa 97. No antigen was obtained from the Iowa 97 despite repeated attempts. Isolate SIN6 had a low antigenic relationship with all the reference serotypes; this indicates that it is probably a new serotype, but further genetic sequence studies are needed to confirm this finding. Serotype CVL/9 showed a strong antigenic relationship with all the serotypes, and this makes it a good candidate for the production of a universal vaccine against the infectious bronchitis virus.

**Key words:** INFECTIOUS BRONCHITIS, ANTIGENIC CHARACTERIZATION, HAEMAGGLUTINATION INHIBITION, CHICKEN.

## Resumen

La producción animal de traspatio es una actividad tradicional en México, cuya finalidad es solucionar algunos problemas de la difícil situación económica de los campesinos. Los pollos son la especie más común en dicho sistema en Yucatán y son alimentados con subproductos. En estudios previos se encontró que las enfermedades respiratorias constituyen las más importantes en estos animales. En el presente estudio se obtuvo un aislamiento del virus de la bronquitis infecciosa en pollos de engorda introducidos al traspatio del poblado Sinanché, Yucatán, México; aquél se denominó SIN6. La caracterización antigénica de este aislamiento se realizó mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación, utilizando antígeno hemaglutinante producido a partir de 11 serotipos de referencia del virus de la bronquitis infecciosa (Massachusetts 41, Arkansas, Connecticut, Holte, CVL/9, 793/B, Holandés 274, Holandés 1466, Australiano "T", Italiano 624, y Chileno 368), y antisueros contra estos serotipos y el Iowa 97; de este último no se logró obtener antígeno a pesar de repetidos intentos. El aislamiento SIN6 tuvo una relación antigénica

Recibido el 26 de enero de 1998 y aceptado el 13 de agosto de 1998

\* Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, km 15.5 Carretera Mérida-Xmatkuil, Apartado Postal 4-116, Mérida, Yucatán, México.

\*\* Veterinary Laboratory Agency, Ministry of Agriculture Fisheries and Food, New Haw, Addlestone, Surrey, KT15 3NB, Reino Unido.

baja con todos los serotipos de referencia, lo que indica que probablemente es un serotipo nuevo, aunque estudios de secuencia genética son necesarios para confirmarlo. El serotipo CVL/9 presentó una fuerte relación antigénica con todos los demás, esta circunstancia lo hace un candidato para la producción de una vacuna universal contra la bronquitis infecciosa.

**Palabras clave:** BRONQUITIS INFECCIOSA, CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA, INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN, POLLOS.

## Introducción

El mantener animales en los patios de las casas (situación denominada sistema de traspatio), es una actividad tradicional de la gente maya, así como otros grupos étnicos en México. Este tipo de producción manejado por la familia tiene la finalidad de solucionar algunos de los problemas causados por la difícil situación económica de los campesinos.<sup>1</sup>

Los pollos (*Gallus domesticus*) son la especie más común en este sistema en Yucatán. La principal característica del sistema es el bajo costo de producción ya que los animales se alimentan de lo que encuentran y algunas veces, dependiendo de la disponibilidad, son suplementados con granos o subproductos.<sup>2</sup> Por otro lado, la asistencia técnica es rara y nunca constante, la tasa de mortalidad de esta especie es muy alta, las causas de muerte se determinan con base en suposiciones e información que proporciona el propietario.<sup>3</sup>

A pesar de la gran importancia del sistema, el interés de los investigadores es relativamente reciente; la mayoría de los trabajos se han realizado con un enfoque económico,<sup>4,5</sup> o de producción en general.<sup>2,6,7,8,9</sup> En un estudio realizado en una comunidad yucateca, las enfermedades respiratorias resultaron entre las más importantes en las aves de traspatio.<sup>3</sup>

Entre las enfermedades respiratorias, la bronquitis infecciosa es un problema frecuente en todos los países con sistemas de producción intensiva.<sup>10</sup> En México dicha enfermedad se ha diagnosticado aun en parvadas vacunadas, demostrando así su gran importancia económica.<sup>11</sup>

En aves de traspatio se detectaron anticuerpos contra bronquitis infecciosa en alrededor del 80% de los sueros probados en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, durante 1995 y 1996 (datos no publicados).

Un aspecto importante del virus de la bronquitis infecciosa (VBI) es su diversidad antigénica, por lo que el control de la enfermedad por medio de la vacunación no siempre es exitoso. En la actualidad se sabe que la recombinación genética, así como mutaciones locali-

zadas ocurren con el VBI, resultando en la emergencia de poblaciones virales antigénicamente diferentes.<sup>12,13,14</sup>

La serotipificación del VBI se puede realizar por medio de pruebas de neutralización del virus con antisueros específicos, en diversos sistemas como en embrión de pollo, cultivo celular y cultivo de órgano de tráquea; sin embargo, todos estos sistemas presentan algunas desventajas como su costo, la necesidad de mantener sistemas vivos y el tiempo que se necesita para obtener resultados.

El VBI, después de ser tratado con la enzima fosfolipasa C, expresa una capacidad aglutinante de los eritrocitos de gallina, lo cual se ha aprovechado para desarrollar una prueba de inhibición de la hemaglutinación.<sup>15,16</sup> La prueba de IH se ha utilizado exitosamente para la tipificación de aislamientos del VBI y tiene la ventaja de usar reactivos en cantidades muy pequeñas, es de bajo costo y rápida, se obtienen resultados en pocas horas.<sup>17,18</sup> La prueba se tiene que realizar utilizando antisueros específicos y antígenos de cada una de las cepas de referencia y de los aislamientos que se quieren caracterizar.<sup>19</sup>

El objetivo de este trabajo fue determinar a qué serotipo pertenece el aislamiento SIN6, especialmente después de comprobar que no pertenece a ninguno de los serotipos que contienen las vacunas contra el VBI utilizadas en México.

## Material y métodos

### Cepas virales de referencia

Se utilizaron doce serotipos del VBI con diferente número de pases en embrión de pollo, los serotipos utilizados fueron: Massachusetts 41 (M41), pasaje > 20; Arkansas (ARK), pasaje 5; Connecticut (CON), pasaje > 100; Holte pasaje 18; Iowa 97 (I97), pasaje 5; CVL/9 pasaje 10; 793/B pasaje 12; D274 pasaje 5; D1466 pasaje 4; "T" Australiano (T), pasaje 8; del banco del CVL, Weybridge y 624 Italiano (I624), pasaje 16;\* y 368 Chileno (CH368), pasaje 3.\*\*

### Virus de campo

Se obtuvo un aislamiento del VBI denominado Sinanche 6 (SIN6), a partir de hisopos de cloaca, tomados

\* Proporcionado por la Dra. Capua, Teramo, Italia.

\*\* Proporcionado por el Dr. Gallardo, Chile.

de un grupo de pollos de engorda de cinco semanas de edad, los animales fueron introducidos en el patio a los tres días de edad. Los pollos presentaron anorexia, depresión, problemas respiratorios y 10% de mortalidad; días previos a la toma de las muestras se dio tratamiento a los animales pero el propietario no pudo indicar el tipo de fármaco que administró. Al momento de la visita, los animales no presentaron signos de enfermedad. Los hisopos se mantuvieron en PBS con antibióticos hasta su traslado al laboratorio donde se inocularon en HEG LPE, hasta el quinto pase en el cual se observó mortalidad de los embriones, así como lesiones características del VBI (enanismo, anormalidades en las plumas, uratos en riñones). Además de la producción de antígeno hemaglutinante y la realización de la prueba de IH con sueros específicos, se confirmó el aislamiento de un coronavirus mediante microscopía electrónica.

### Producción de antígeno

Se inocularon veinte huevos de gallina con embrión (HEG), libres de patógenos específicos (LPE), de nueve a once días de incubación, para cada serotipo de referencia con 0.1 ml de la semilla del virus diluida  $10^{-2}$  en solución amortiguadora de fosfatos salinos (PBS), con antibióticos [50 mg gentamicina, 10 millones de unidades internacionales (UI), de benzilpenicilina, 10 g de estreptomina y cinco millones de UI de micostatina en 1000 ml de PBS], vía cavidad alantoica. Los HEG se incubaron a 37°C durante 36-48 horas y se enfriaron a 4°C por lo menos durante seis horas. Los fluidos amnióticos y alantoicos se cosecharon y centrifugaron a 1500 g durante diez minutos con el fin de descartar el depósito de material indeseado y nuevamente a 30000 g durante 60 minutos para concentrar el virus, se descartó el sobrenadante y se reconstituyó el sedimento con fosfolipasa C (toxina tipo E de *Clostridium perfringens*), producida en el CVL, Weybridge, a una centésima parte del volumen original. La solución se incubó a 37°C durante dos horas. En el caso de la cepa Iowa 97, se hicieron modificaciones para tratar de obtener antígeno hemaglutinante, mismas que consistieron en utilizar tiempos de incubación de los HEG inoculados de 16 y 24 horas. Para esta cepa también se intentó inocular pollos LPE y recuperar el virus de éstos siguiendo los procedimientos ya descritos para la preparación del antígeno.

Los antígenos se titularon mediante la técnica de hemoaglutinación (HA), en microplacas con fondo V (Greiner), descrita por Alexander y Chettle.<sup>20</sup> Como punto de corte se consideró el último pocillo con aglutinación del 100%, que representa una unidad hemoaglutinante (UHA).

Los antígenos se colocaron en alícuotas de 0.5 ml y se liofilizaron. Una ampulla liofilizada de cada lote fue reconstituida con 0.5 ml de PBS (0.1 molar, pH 7.2), para comprobar el título después de la liofilización.

### Producción de antisueros

El siguiente procedimiento se realizó para cada uno de las cepas de referencia y el aislamiento de campo. Entre seis y diez pollos Leghorn LPE, de tres a seis semanas de edad, se inocularon por vía óculo-nasal con 0.2 ml de fluido corio-alantoideo infectivo puro y reciente, proveniente de tres a cinco HEG libres de patógenos específicos.

Dos semanas después los pollos se reinocularon usando el mismo método. A las dos semanas de esta segunda inoculación las aves se sangraron y sus niveles de anticuerpos contra el VBI se probaron con antígeno específico mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH), en microplacas, expresando los resultados a la máxima dilución del suero, con resultado de 100% de inhibición y expresado como un índice de la raíz base 2 del recíproco de la dilución ( $1/8 = 2^3$ ), según el método descrito por Alexander *et al.*,<sup>21</sup> excepto para el serotipo I97, el cual se tituló con la prueba de seroneutralización en embrión de pollo, siguiendo el método descrito por Reed y Muench.<sup>22</sup> Los animales se sangraron en blanco para la obtención del suero.

Se obtuvo una mezcla de los sueros específicos para cada serotipo y se inactivó durante 30 minutos a 56°C en baño María.

El antisuero se colocó en alícuotas en volúmenes de 0.5 ml en ampulas de vidrio de 2 ml de capacidad y se liofilizó. Una ampulla liofilizada fue reconstituida con 0.5 ml de agua desionizada estéril con el propósito de confirmar su título.

### Estimación de la relación antigénica

Se realizó la prueba de IH, utilizando antígenos y antisueros de cada uno de los doce serotipos de referencia y del aislamiento de campo, excepto el antígeno de la cepa I97.

La relación antigénica del aislamiento SIN6 con los doce serotipos de referencia, se realizó analizando los resultados cruzados de la prueba de IH siguiendo el método de Archetti y Horsfall,<sup>23</sup> se presentan como tasas  $r_1$  y  $r_2$  para cada par de virus. Los valores  $r_1$  y  $r_2$  se calcularon con la fórmula:

Actividad del suero contra el serotipo heterólogo  
Actividad del suero contra el serotipo homólogo

La relación antigénica total del aislamiento SIN6 con cada serotipo de referencia, se calculó como porcentaje con la fórmula de Archetti y Horsfall.<sup>23</sup>

$$R = 100 \sqrt{r_1 r_2}$$

El concepto de dominancia o poder inmunogénico del aislamiento del VBI probado en este experimento se expresa como índice de relación promedio (IRP). El IRP es el promedio de los valores  $r^*$  ( $r^* = 100 \sqrt{r_1 r_2}$ ), de un suero dado contra un número de serotipos del

**Cuadro 1**  
TÍTULOS DE HEMOAGLUTINACIÓN (HA), DE ANTÍGENOS OBTENIDOS A PARTIR DE DOCE SEROTIPOS DE REFERENCIA DEL VIRUS DE BRONQUITIS INFECCIOSA Y UN AISLAMIENTO (SIN6), OBTENIDO EN POLLOS DE TRASPATIO EN SINANCHÉ, YUCATÁN, MÉXICO

Serotipo	Título HA*
Masachussets 41	2 <sup>9</sup>
Arkansas	2 <sup>12</sup>
Connecticut	2 <sup>8</sup>
Holte	2 <sup>9</sup>
Iowa 97	<2
793/B	2 <sup>8</sup>
CVL/9	2 <sup>8</sup>
D274	2 <sup>10</sup>
D1466	2 <sup>9</sup>
Italia 624	2 <sup>8</sup>
Australia "T"	2 <sup>8</sup>
Chile 368	2 <sup>8</sup>
SIN6	2 <sup>11</sup>

\*Título expresado como índice de la raíz base 2 del recíproco de la dilución (1/8 = 2<sup>3</sup>).

**Cuadro 2**  
TÍTULOS HOMÓLOGOS EN LA PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (IH), DE LOS ANTISUEROS OBTENIDOS PARA LOS DOCE SEROTIPOS DE REFERENCIA DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA Y UN AISLAMIENTO (SIN6), OBTENIDO DE POLLOS DE TRASPATIO EN SINANCHÉ, YUCATÁN, MÉXICO

Serotipo	Título de IH
Masachussets 41	2 <sup>10</sup>
Arkansas	2 <sup>9</sup>
Connecticut	2 <sup>6</sup>
Holte	2 <sup>11</sup>
Iowa 97	NH* (>2 <sup>9</sup> )**
793/B	2 <sup>9</sup>
CVL/9	2 <sup>11</sup>
D274	2 <sup>9</sup>
D1466	2 <sup>5</sup>
Italia 624	2 <sup>10</sup>
Chile 368	2 <sup>9</sup>
Australia "T"	2 <sup>7</sup>
SIN6	2 <sup>9</sup>

\*No se hizo por no tener antígeno HA de IOWA 97.

\*\*Se obtuvo el título del antisuero con la prueba de seroneutralización en embrión de pollo.

**Cuadro 3**  
RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN EN DOS DIRECCIONES CON DOCE SEROTIPOS DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR Y EL AISLAMIENTO SIN6 DE POLLOS DE TRASPATIO DE YUCATÁN, MÉXICO

Ag → AS ↓	SIN6	M41	CON	Holte	I97	CVL9	793B	D 274	D1466	I 624	CH 368	ARK	T
TIT	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	NH*	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>
T-	2 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	NH	<2	2 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	2	2 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	2
SIN6	2 <sup>9</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	NH	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>
M41	2 <sup>6</sup>	2 <sup>10</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>5</sup>	NH	2 <sup>5</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>
CON	2	2 <sup>2</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>2</sup>	NH	2	2	2	2	2 <sup>2</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>
Holte	2 <sup>2</sup>	2 <sup>6</sup>	<2	2 <sup>11</sup>	NH	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>
I97	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>6</sup>	NH	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>
CVL9	2 <sup>10</sup>	2 <sup>10</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>11</sup>	NH	2 <sup>11</sup>	2 <sup>10</sup>	2 <sup>10</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>11</sup>	2 <sup>11</sup>	2 <sup>10</sup>	2 <sup>9</sup>
793B	2 <sup>2</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>7</sup>	NH	2 <sup>3</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>5</sup>
D 274	2 <sup>5</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	NH	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>
D1466	2 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>3</sup>	NH	<2	2 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>3</sup>	2	2 <sup>3</sup>	2 <sup>2</sup>
I 624	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>7</sup>	NH	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>10</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>5</sup>
CH 368	2 <sup>4</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>5</sup>	NH	2	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>9</sup>	<2	2 <sup>4</sup>
ARK	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	NH	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>3</sup>
"T"	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>6</sup>	NH	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>7</sup>

\*NH no se hizo por falta de antígeno del virus I97

Ag: Antígeno

AS: Antisuero

TIT: Título

T-: Testigo negativo

virus. A mayor IRP, mayor la dominancia o similitud de antigénica del virus que induce el suero.<sup>18</sup>

## Resultados

Se obtuvieron antígenos de once serotipos de referencia y del aislamiento de campo. No se obtuvo antígeno de la cepa I97 a pesar de repetidos intentos. Los títulos obtenidos se observan en el Cuadro 1.

Se produjo antisuero contra doce serotipos de referencia y el aislamiento SIN6. Todos los serotipos produjeron antisueros con títulos de 2<sup>8</sup> o mayores en la prueba de IH con antígeno homólogo, excepto los serotipos D1466 (título de 2<sup>5</sup>), CONN (título de 2<sup>6</sup>), y "T" (título de 2<sup>7</sup>). En el Cuadro 2 se presentan los títulos obtenidos en la prueba de IH para los antisueros probados.

No se determinó el título de IH del antisuero I97 porque se carecía de antígeno pero se obtuvo un título de >2<sup>9</sup> en la prueba de seroneutralización en embrión de pollo.

Se corrieron las pruebas de IH en ambas direcciones usando todos los antígenos y antisueros, excepto antígeno I97. Pruebas de IH en una sola vía se corrieron usando antisuero I97. Los títulos de IH se presentan en el Cuadro 3. En el Cuadro 4 se muestran las relaciones antigénicas entre los serotipos de referencia y SIN6. Valores desiguales de r1 y r2 para cada par de virus fueron comunes. El antisuero producido por el serotipo CVL/9 presentó valores de r1 muy altos en relación con todos los antígenos probados. La dominancia o poder inmunogénico para los doce serotipos de referencia y el aislamiento SIN6, expresados como IRP, se presentan en el Cuadro 5. El IRP más alto fue del serotipo CVL/9 (10.2%), mientras que SIN6 tuvo un IRP de 4.4%.

## Discusión

Se produjo con éxito antígeno hemaglutinante (HA), para once de los doce serotipos de referencia y para el aislamiento SIN6 del virus de la bronquitis infecciosa aviar. Con el serotipo I97 no se tuvo éxito en la producción de antígeno a pesar de varios intentos. Se ha sugerido que probablemente los títulos hemaglutinantes son, al menos en parte, influenciados por la cantidad de partículas virales presentes.<sup>15</sup> Sin embargo, esto último no explica por qué el serotipo I97, a pesar de grandes cantidades de virus presente, demostrado por microscopía electrónica, no produjo hemaglutinación.

Lashgari y Newman<sup>24</sup> notificaron títulos HA de 2<sup>11</sup> para I97 usando un método de producción de antígeno similar y el quinto pase embrionario del virus, concluyeron que el número de pases era importante. A pesar de que en el presente estudio el virus se usó a los pases embrionarios quinto a octavo y primero a tercero después del reaislamiento a partir de pollos libres de patógenos específicos inoculados, no se tuvo éxito.

Se ha demostrado que la proteína de las proyecciones del virus es la responsable por la inducción de anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación.<sup>25</sup> Por lo anterior, se pensó que el virus I97 había perdido sus proyecciones por lo que no se produjo actividad HA después de tratarlo con fosfolipasa C, pero tampoco fue el caso ya que las proyecciones se observaron en el examen de microscopía electrónica.

Los títulos hemaglutinantes obtenidos de los once serotipos de referencia y el aislamiento SIN6 variaron, a pesar de usar el mismo método; aparentemente esta situación se debe a la habilidad de cada serotipo para replicarse.

Valores desiguales de r1 y r2 entre cada par de virus se observaron siempre, son indicativos de relaciones asimétricas entre virus, observándose frecuentemente en pruebas de subtipificación.<sup>26</sup> Relaciones antigénicas asimétricas pueden ser resultado de variación en la composición antigénica, aidez o especificidad de anticuerpos y por respuestas inmunes heterólogas de animales individuales. Es importante resaltar que los serotipos Conn, D1466, "T" y CVL/9 mostraron la mayor reactividad cruzada de una vía. En el caso de los tres primeros, esto probablemente se debió al bajo título del suero homólogo.<sup>27</sup> Por otro lado, el serotipo CVL/9 mostró una buena relación antigénica con todos los serotipos estudiados ya que su antisuero en todos los casos presentó títulos iguales o mayores a los antisueros homólogos en las pruebas de IH.

Los valores R representan el porcentaje de relación antigénica entre cada par de virus. Un valor R del 100% corresponde al virus homólogo. En el presente estudio la relación antigénica más pequeña correspondió a los virus Conn y Holte (0.6%). También hubo varios pares de virus con relaciones antigénicas cerca o arriba de nueve; de acuerdo con Lashgari y Newman,<sup>18</sup> serotipos con valores superiores a cinco pueden considerarse como subtipos; por otra parte, los valores de R igual a 100% serían el mismo tipo.

Es importante mencionar que la prueba de IH, en común con otras pruebas serológicas para bronquitis infecciosa, es mejor para demostrar diferencias entre cepas, que probar similitudes.<sup>19</sup>

El serotipo CVL/9 mostró valores de R por arriba de cinco con todos los serotipos incluidos en este estudio, pero esto es un reflejo de su alta relación antigénica asimétrica. También fue este serotipo el que mostró el más amplio espectro antigénico con todos los otros serotipos trabajados, con un índice de relación promedio (IRP) de 10.2.

Los resultados indican que el serotipo CVL/9 es un candidato apropiado para la producción de una vacuna universal contra el virus de la bronquitis infecciosa aviar. Sin embargo, esto último necesita apoyarse y confirmarse con pruebas de protección cruzada *in vivo*.

El aislamiento SIN6 mostró relación antigénica de una vía con los serotipos Conn, D1466, "T" y CVL/9. Con los tres primeros esto se relaciona con los bajos

**Cuadro 4**  
ESTIMACIÓN DE LA RELACIÓN ANTIGÉNICA DE DOCE SEROTIPOS DE REFERENCIA Y UN AISLAMIENTO (SIN6), DE YUCATÁN, MÉXICO, DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR POR MEDIO DEL ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN EN DOS VÍAS, EXPRESADO COMO TASAS (r1 Y r2),

Ag→ AS↓	M41	ARK	CONN	Holte	I97	CVL9	793B	D274	D1466	I624	CH368	"T"	SIN6
M41	<b>1**</b>	0.016	0.500	0.016	NH*	0.016	0.016	0.031	0.250	0.016	0.125	0.125	0.125
ARK	0.016	<b>1**</b>	0.125	0.008	NH*	0.004	0.016	0.016	0.125	0.016	0.016	0.063	0.016
CONN	0.004	0.008	<b>1**</b>	0.002	NH*	0.001	0.004	0.004	0.063	0.004	0.016	0.031	0.004
Holte	0.063	0.016	0.016	<b>1**</b>	NH*	0.004	0.016	0.125	0.500	0.250	0.250	0.125	0.008
I97	0.016	0.031	0.125	0.031	NH*	0.004	0.016	0.031	0.250	0.031	0.031	0.063	0.031
CVL9	1	2	8	1	NH*	<b>1**</b>	2	2	4	2	4	4	2
793B	0.063	0.016	0.125	0.063	NH*	0.004	<b>1**</b>	0.125	1	0.063	0.125	0.250	0.008
D274	0.016	0.031	0.500	0.031	NH*	0.004	0.031	<b>1**</b>	0.500	0.063	0.016	0.125	0.063
D1466	0.004	0.016	0.063	0.004	NH*	0.001	0.008	0.008	<b>1**</b>	0.008	0.004	0.031	0.008
I624	0.063	0.063	0.500	0.063	NH*	0.031	0.063	0.125	1	<b>1**</b>	0.125	0.250	0.063
CH 368	0.063	0.004	0.500	0.016	NH*	0.001	0.031	0.031	0.250	0.031	<b>1**</b>	0.125	0.031
"T"	0.008	0.016	0.125	0.031	NH*	0.008	0.016	0.031	0.500	0.031	0.031	<b>1**</b>	0.031
SIN6	0.016	0.031	0.500	0.031	NH*	0.008	0.031	0.031	0.500	0.063	0.031	0.125	<b>1**</b>

\* No se hizo por falta de antígeno del virus I97.

\*\* Reacción entre antígeno y antisuero homólogos.

**Cuadro 5**  
RELACIÓN EN PORCENTAJE DE ONCE CEPAS DE REFERENCIA DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR Y EL AISLAMIENTO SIN6 Y DOMINANCIA DE CEPA, EXPRESADO COMO ÍNDICE DE RELACIÓN PROMEDIO (IRP)

IBV	M41	ARK	CON	Holte	CVL9	793B	D274	D1466	I624	CH368	"T"	SIN6
M41	<u>100*</u>	1.6	4.4	3.1	12.5	3.1	2.2	3.1	3.1	8.8	3.1	4.4
ARK	1.6	<u>100*</u>	3.1	1.1	8.8	1.6	2.2	4.4	3.1	0.8	3.1	2.2
CON	4.4	3.1	<u>100*</u>	0.6	8.8	2.2	4.4	6.3	4.4	8.8	6.3	4.4
Holte	3.1	1.1	0.6	<u>100*</u>	6.3	3.1	6.3	4.4	12.5	6.3	6.3	1.6
CVL9	12.5	8.8	8.8	6.3	<u>100*</u>	8.8	8.8	6.3	25	6.3	17.7	12.5
793B	3.1	1.6	2.2	3.1	8.8	<u>100*</u>	6.3	8.8	6.3	6.3	6.3	1.6
D274	2.2	2.2	4.4	6.3	8.8	6.3	<u>100*</u>	6.3	8.8	2.2	6.3	4.4
D1466	3.1	4.4	6.3	4.4	6.3	8.8	6.3	<u>100*</u>	8.8	3.1	12.5	6.3
I624	3.1	3.1	4.4	12.5	25	6.3	8.8	8.8	<u>100*</u>	6.3	8.8	6.3
CH368	8.8	0.8	8.8	6.3	6.3	6.3	2.2	3.1	6.3	<u>100*</u>	6.3	3.1
"T"	3.1	3.1	6.3	6.3	17.7	6.3	6.3	12.5	8.8	6.3	<u>100*</u>	6.3
SIN6	4.4	2.2	4.4	1.6	12.5	1.6	4.4	6.3	6.3	3.1	6.3	<u>100*</u>
IRP %	4.1	2.7	4.5	4.3	10.2	4.5	4.9	5.9	7.8	4.9	6.9	4.4

\*Reacciones homólogas antígeno/antisuero.

títulos del suero homólogo de esos virus. Con el serotipo CVL/9 la relación antigénica se debe a la elevada reacción cruzada mostrada por el antisuero de ese serotipo contra todos los serotipos estudiados. Valores de R de SIN6 con todos los serotipos de referencia excepto CVL/9 son menores o muy cerca de cinco, indicando que SIN6 podría ser un serotipo nuevo

Es necesario usar metodologías más avanzadas, como secuenciación genética de la proteína del peplómero (S1),<sup>13</sup> del virus SIN6 para confirmar lo anterior.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Organización para el Desarrollo de Ultramar (ODA), el financiamiento para el desarrollo de este trabajo, así como a la Agencia de Laboratorios Veterinarios (VLA), del Reino Unido, las facilidades para llevar a cabo el trabajo de laboratorio y a los técnicos S. Drury, W. Cox y S. Ashman, de la VLA, su invaluable ayuda técnica.

## Referencias

1. Acosta ME, Flores JS, Gómez-Pompa A. Uso y manejo de plantas forrajeras para cría de animales de solar en Xocén, México. *Biótica* 1993;1:63-68.
2. Barredo-Pool LH, Berdugo-Rejón JG, Velázquez-Madrazo PA. Estudio de la ganadería de traspatio en el municipio de Mococho, Yucatán. *Vet Méx* 1991;22:29-33.
3. Honhold N, Ferraez N, Allaway C, Wassink G, Rivera T, Carter W, Gutierrez M. Health and productivity of *traspatio* animals in Sinanche, Yucatan. Reporte interno. Mérida, Yucatán: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, 1993.
4. Rejón-Ávila M, Dajer-Abimerhi AFJ, Honhold N, Lara-y Lara J. Diagnóstico comparativo de los aspectos socio-económicos, de manejo y salud animal de la ganadería de traspatio en dos localidades del estado de Yucatán: San Pedro Chimay y Tekik de Regil de los municipios de Mérida y Timucuy. Reporte interno. Mérida, Yucatán: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, 1991.
5. Richards EM, Leyva-Morales C, Rejón-Ávila M. Un análisis económico de la producción pecuaria en la zona henequenera de Yucatán, México como una aportación para la identificación de las prioridades de investigación y desarrollo. Reporte interno. Mérida, Yucatán: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, 1984.
6. Berdugo-Rejón JG. Estudio de la ganadería familiar en el municipio de Sucila, Yucatán (tesis de maestría). Montecillos, (Edo. México) México: Colegio de Postgraduados, Centro de Estudios para el Desarrollo Rural, 1987.
7. Duarte-Solís LJ. Evaluación del programa nacional de paquetes familiares en una comunidad rural (tesis de maestría). Montecillos, (Edo. México) México: Colegio de Postgraduados, Centro de Estudios para el Desarrollo Rural, 1986.
8. Lozano-Romo L. Análisis de la explotación avícola a nivel tradicional en el poblado C-28 del plan Chontalpa, Tabasco (tesis de maestría), Cárdenas, Tabasco, México: Colegio Superior de Agricultura Tropical, 1982.
9. Rivera-Rivera TJC. Evaluación del programa nacional de

- paquetes familiares de aves en el ejido Guerrero, delegación Delta Mexicali, Baja California Norte (tesis de licenciatura). México (DF) México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1983.
10. Cook JKA. Infectious bronchitis: history, serotypes and its molecular biology in relation to field problems. *Proceedings of the Infectious Bronchitis Workshop*; 1995 March 4; Davis (CA). Davis (CA): American College of Poultry Veterinarians, California Veterinary Diagnostic Laboratory System, Western Poultry Disease Conference and School of Veterinary Medicine, University of California, 1995:1-8.
  11. 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): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 1993:191-198.
  12. Kusters JG, Jager EJ, Niesters HGM, Van der Zeijst BAM. Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Vaccine*, 1990;8:605-608.
  13. Kusters JG, Niesters HGM, Lenstra JA, Horzinek JC, Van der Zeijst BAM. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. *Virology* 1989;169:217-221.
  14. Moore KM, Jackwood MW, Hilt DA. Avian infectious bronchitis virus: RNA recombination *in vitro*. *Proceedings of the 45th Western Poultry Disease Conference*. 1996 May 1-5; Cancun, Mexico. California USA: Western Poultry Disease Conference, 1996:63.
  15. Alexander DJ, Bracewell CD, Gough RE. Preliminary evaluation of the haemagglutination and haemagglutination inhibition tests for avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 1976;5:125-134.
  16. Bingham RW, Madge MH, Tyrrel DAJ. Haemagglutination by avian infectious bronchitis virus a coronavirus. *J Gen Virol* 1975;28:381-390.
  17. King DJ, Hopkins SR. Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the haemagglutination inhibition test. *Avian Dis* 1984;28:727-733.
  18. Lashgari MS, Newman JA. Serological comparison and antigenic relationships of seven serotypes of infectious bronchitis virus using the haemagglutination-inhibition test. *Avian Dis* 1984;28:435-443.
  19. Brown AJ, Bracewell CD. Application of the haemagglutination inhibition test to typing of infectious bronchitis virus. *Vet Rec* 1985;116:47-48.
  20. Alexander DJ, Chettle NJ. Procedures for the haemagglutination and the haemagglutination inhibition tests for avian infectious bronchitis. *Avian Pathol* 1977;6:9-17.
  21. Alexander DJ, Allan WH, Biggs PM, Bracewell CD, Darbyshire JH, Dawson PS, *et al.* A standard technique for haemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Vet Rec* 1983;113:64.
  22. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hygiene* 1938;27:493-497.
  23. Archetti I, Horsfall FL. Persistent antigenic variation of influenza viruses after incomplete neutralization *in vivo* with heterologous immune serum. *J Exp Med* 1950;92:441-462.
  24. Lashgari MS, Newman JA. Preparing haemagglutinating antigen from isolates of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 1982;26:508-519.
  25. Cavanagh D, Darbyshire JH, Davis P, Peters RW. Induction of humoral neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibody by the spike protein of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 1984;13:573-583.
  26. Stellmann C, Moreau Y, Roumiantzeff M. Biomathemati-

cal system of relationship and dominance for the classification of foot-and-mouth disease strains. Arch Gesamte Virusforsch 1972;37:357-364.

27. Lohr JE. Serologic differences between strains of infectious bronchitis virus from New Zealand, Australia, and the United States. Avian Dis 1976;20:478-482.