



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE DOS BACTERINAS EN GALLINAS DE POSTURA, MEDIANTE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS INHIBIDORES DE LA HEMOAGLUTINACIÓN Y PROTECCIÓN ANTE UN DESAFÍO CON *AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM*, EN TEHUACAN, PUEBLA.

TRABAJO RECEPCIONAL EN LA MODALIDAD DE:

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

Angel Luna Trinidad

ASESORES:

MVZ CESAR LOPEZ SANCHEZ

MVZ JOSE ALFREDO VILLAGOMEZ CORTES

VERACRUZ, VER.

JULIO 2010

INDICE GENERAL

Introducción	1
1. Antecedentes	3
1.1 Historia	3
1.2 Incidencia y distribución	3
1.2.1 Etiología	4
1.2.2 Morfología y tinción	4
1.2.3 Reclasificación de <i>Haemophilus (Avibacterium) paragallinarum</i>	4
1.3 Morbilidad y mortalidad	5
1.3.1 Periodo de incubación	5
1.3.2 Signos clínicos	6
1.3.3 Patogenia y virulencia	6
1.3.4 Inmunidad	8
1.4 Bacterinas	9
1.4.1 Adyuvantes	11
1.4.2 Vías de administración	12
2. Justificación	14
3 Hipótesis	15
4 Objetivos	15
4.1. Objetivo general	15
4.2 Objetivos específicos	15
5 Material y Métodos	16
5.1 Lugar de estudio y ubicación de la granja de gallinas de postura	16
5.2 Características de los sitios de gallinas de postura	16
5.3 Diseño experimental	18

5.4	Monitoreo productivo	18
5.5	Monitoreo serológico	18
5.6	Prueba de desafío	19
5.7	Análisis estadístico	21
6	Resultados y Discusión	22
6.1	Titulo de anticuerpos circulantes mediante inhibición de la hemoaglutinación (HI)	22
6.2	Pruebas de inhibición de la Hemoaglutinación a las 21 semanas de edad.	23
6.3	Titulo de anticuerpos circulantes mediante Inhibición la Hemoaglutinación (HI) a las 26 semanas de edad.	25
6.4	Prueba de desafío de gallinas de postura	29
6.4.1	Titulos de anticuerpos circulantes mediante Inhibición de la Hemoaglutinación (HI) en el periodo pre-desafío	29
6.4.2	Títulos de anticuerpos circulantes mediante Inhibición la Hemoaglutinación (HI) a los 7 días post- desafío	30
6.4.3	Titulo de anticuerpos circulantes mediante Inhibición la Hemoaglutinación (HI), a los 14 días post- desafío	32
6.4.4	Signos clínicos	34
6.5	Aislamiento bacteriológico	37
6.6	Monitoreo productivo	49
7.	Conclusiones	41
	Referencias	42

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Protección comparativa conferida por las bacterina bivalente y trivalente contra <i>A. paragallinarum</i> a las 15 semanas de edad en aves de la Empresa Mr Egg, Tehuacán, Puebla.	22
Cuadro 2.	Protección conferida por las bacterina bivalente contra el serotipo A de <i>A. paragallinarum</i> a las 21 semanas de edad en aves de la Empresa Mr Egg, Tehuacán, Puebla..	22
Cuadro 3.	Títulos de anticuerpos inducidos por las bacterina bivalente contra el serotipo C de <i>A. paragallinarum</i> a las 21 semanas de edad en aves de la Empresa Mr Egg, Tehuacán, Puebla.	23
Cuadro 4.	Títulos de anticuerpos inducidos por las bacterina trivalente contra el serotipo A de <i>A. paragallinarum</i> a las 21 semanas de edad en aves de la Empresa Mr Egg, Tehuacán, Puebla.	23
Cuadro 5.	Títulos de anticuerpos inducidos por las bacterina trivalente contra el serotipo C de <i>A. paragallinarum</i> a las 21 semanas de edad en aves de la Empresa Mr Egg, Tehuacán, Puebla.	24
Cuadro 6.	Títulos de anticuerpos inducidos por las bacterina trivalente contra los serotipos A y C de <i>A. paragallinarum</i> a las 26 semanas de edad en aves de la Empresa Mr Egg, Tehuacán, Puebla.	26
Cuadro 7.	Títulos de anticuerpos inducidos por las bacterina bivalente contra los serotipos A y C de <i>A. paragallinarum</i> a las 26 semanas de edad en aves de la Empresa Mr Egg, Tehuacán, Puebla.	26
Cuadro 8.	Análisis de varianza de los títulos de anticuerpos obtenidos a las 21 y 26 semanas de edad para las variables en estudio con bacterianas bivalente y trivalente contra <i>A. paragallinarum</i>	28
Cuadro 9.	Títulos de anticuerpos antes del desafío contra los tres serotipos de <i>A. paragallinarum</i> , en aves inmunizadas con bacterina trivalente.	29

Cuadro 10. Títulos de anticuerpos antes del desafío contra los tres serotipos de <i>A. paragallinarum</i> , en aves inmunizadas con bacterina bivalente.	30
Cuadro 11. Títulos de anticuerpos 7 días post- desafío contra los tres serotipos de <i>A. paragallinarum</i> , en aves inmunizadas con bacterina trivalente.	31
Cuadro 12. Títulos de anticuerpos 7 días post- desafío contra los tres serotipos de <i>A. paragallinarum</i> , en aves inmunizadas con bacterina bivalente.	31
Cuadro 13. Títulos de anticuerpos contra los tres serotipos <i>A. paragallinarum</i> obtenidos 14 días post-desafío de aves inmunizadas con bacterina bivalente o trivalente.	33
Cuadro 14. Resultados de signos clínicos y aislamiento bacteriológico de aves del grupo tratado con bacterina trivalente, observadas durante 14 días post-desafío.	35
Cuadro 15. Resultados de signos clínicos y aislamiento bacteriológico de aves tratadas con bacterina bivalente, observadas durante 14 días post-desafío	36
Cuadro 16. Parámetros de producción de la semana 20 a la 29, obtenidos de aves vacunadas utilizando una bacterina trivalente contra <i>A. paragallinarum</i> .	39
Cuadro 17. Parámetros de producción de la semana 20 a la 29, obtenidos de aves vacunadas utilizando una bacterina bivalente contra <i>A. paragallinarum</i>	40
Cuadro 18. Prueba de t para grupos tratados con bacterina bivalente y trivalente contra <i>A. paragallinarum</i>	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Títulos de anticuerpos contra serotipos A y C de <i>A. paragallinarum</i> a las 21 semanas de edad en aves inoculadas con bacterina bivalente o trivalente	25
Figura 2.	Títulos de anticuerpos contra serotipos A y C de <i>A. paragallinarum</i> a las 21 y 26 semanas de edad en aves inoculadas con bacterina bivalente o trivalente.	27
Figura 3.	Títulos de anticuerpos contra <i>A. paragallinarum</i> a los 7 días post- desafío en aves tratadas con bacterina bivalente o trivalente,	32
Figura 4.	Títulos de anticuerpos contra <i>A. paragallinarum</i> obtenidos a los 0, 7 y 14 días post- desafío en aves tratadas con bacterina bivalente o trivalente,	33
Figura 5.	Protección comparativa de una bacterina bivalente y otra trivalente contra <i>Avibacterium paragallinarum</i> después de la prueba de desafío y del aislamiento bacteriológico.	37

DEDICATORIA

A mis padres, por darme la vida, y brindarme todo su apoyo durante este largo camino recorrido y que gracias a ellos pude terminar la Licenciatura con algunos contratiempos, pero que me supieron ayudar y estar en todo momento que los necesitaba.

A mis cuatro hermanos por brindarme su apoyo incondicional, y por estar ahí pendiente de lo que necesitará.

A mis amigos por apoyarme cuando los necesitaba y por las veces que me iban a visitar gracias.

Gracias a dios, por concederme el regalo de la vida, y por brindarme la oportunidad de terminar mis estudios y darme unos padres como los que tengo ya que sin ellos no podría estar realizando esta dedicatoria.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana, por haberme dado una formación profesional, la cual le agradezco ya que me da las bases para poder salir adelante.

A la Empresa Mr. Egg. por brindarme la oportunidad de terminar satisfactoriamente mi servicio social y concluir mis estudio de Licenciatura, y gracias por haberme abierto sus puertas donde pude aprovechar las actividades efectuadas dentro de la granja.

Al MVZ Cesar López Sánchez, por ofrecerme su apoyo y confianza durante el tiempo que estuve en la granja, y por formar parte de su plan de trabajo, por lo que le agradezco sus enseñanzas para mi persona.

Al Dr. José Alfredo Villagómez Cortés, por darme su apoyo y colaboración en la realización de mi trabajo, así como también por los comentarios realizados.

Al MVZ. Martín Torres Rojo y al MVZ Antonio Ramírez por brindarme la oportunidad de formar parte de su trabajo y sobre todo el apoyo otorgado.

RESUMEN

Luna Trinidad Ángel, 2010: Evaluación de dos bacterinas en gallinas de postura, mediante detección de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y protección ante un desafío con *Avibacterium paragallinarum*, en Tehuacan, Puebla. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Veracruz, México.

El objetivo de este trabajo fue evaluar dos protocolos de bacterinización en gallinas de postura inmunizadas en crianza a la edad de 4, 10 y 16 semanas, de forma bivalente o trivalente, contra Coriza Infecciosa. Se midieron anticuerpos circulantes inhibidores de la hemaglutinación y se determinó la protección conferida ante un desafío controlado con los serotipos A, B y C de *Avibacterium paragallinarum*. Se emplearon dos parvadas: a una parvada con 50,000 mil aves, se le aplicó una bacterina bivalente, y otra parvada de 100,000 aves recibió una bacterina trivalente. De cada grupo se tomaron 20 muestras de sangre para detección de anticuerpos circulantes inhibidores de la hemaglutinación (IH). El monitoreo serológico se realizó a las 21 y 26 semanas de edad para ambos grupos. Los títulos de anticuerpos a las 21 semanas fueron bajos en comparación con los obtenidos a las 26 semanas. Mediante análisis de varianza no se encontró diferencia estadística significativa ($P \geq 0.05$) entre tipo de bacterinas, fecha del muestreo y ubicación de la granja. Para la prueba de desafío, se enviaron 15 aves de 23 semanas de edad por grupo (bivalente y trivalente), usando cinco aves para cada serotipo de Coriza Infecciosa. Las aves se alojaron en unidades de aislamiento junto con cinco aves SPF. Las aves vacunadas se desafiaron junto con las aves SPF utilizando un cultivo fresco de *Avibacterium paragallinarum* con 0.2 ml por vía intranasal por ave, a una concentración de 1×10^6 UFC/ml. Los animales se observaron diariamente durante 14 días. Se midieron los títulos de anticuerpos circulantes en las aves mediante IH antes del desafío, y a los siete y 14 días post-desafío. Antes del desafío, la media geométrica de los títulos fue inferior a 1:5, con un aumento en los títulos de anticuerpos a los siete y un máximo de 1:160 a los 14 días post-desafío. Las aves se sacrificaron para aislar *Avibacterium paragallinarum* mediante siembra en placas con agar sangre, e incubación a 37°C durante 24-48hrs. Todas las aves control (SPF) mostraron signos de Coriza Infecciosa. Las gallinas inmunizadas con la bacterina bivalente exhibieron la más baja protección (40%) contra los signos clínicos de Coriza Infecciosa cuando fueron desafiadas con el serotipo B, el serotipo A mostró 80% de protección y el serotipo C logró un 100% de protección ante el desafío. Las gallinas inmunizadas con la bacterina trivalente tuvieron un 80% de protección contra el serotipo B, y 100% de protección contra los signos clínicos de Coriza Infecciosa para los serotipos A y C. Los resultados indican que títulos elevados de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación conferidos por la bacterina trivalente pueden proteger ante un desafío con los serotipos A, B y C de *Avibacterium paragallinarum*, pero no así la bacterina bivalente.

Palabras clave: *Avibacterium paragallinarum*, Coriza Infecciosa, gallinas de postura anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación, bacterinas, prueba de desafío.

INTRODUCCION

La bacteria *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum* es el agente causal de la Coriza Infecciosa, enfermedad del tracto respiratorio superior de pollos y gallinas (*Gallus gallus*) que se caracteriza por producir descarga nasal, estornudo e inflamación facial. El impacto económico de la infección por esta bacteria radica en las pérdidas que ocasiona a la avicultura, debido a retraso en el crecimiento, pérdida de peso, incremento en el número de aves eliminadas y predisposición a la enfermedad crónica complicada en gallinas de postura. La producción de huevo puede reducirse hasta un 40%; lo mas común es el desencadenamiento de la enfermedad cuando las aves alcanzan el pico de postura (Blackall y Matsumoto, 2003).

Cuando la coriza cursa sin otra enfermedad asociada, se caracteriza por ser una enfermedad aguda de curso corto (dos semanas) y curación espontánea. Sin embargo, es común la asociación con otros agentes bacterianos o virales. En estos casos, la duración del curso de la enfermedad se prolonga (siete semanas) y el cuadro se denomina Coriza Infecciosa Complicada (Terzolo, 2009). Las aves con cuadro complicado no se curan fácilmente y suelen quedar secuelas diversas, siendo común el descarte de un número importante de aves. Como ha sucedido con otros agentes infecciosos, se tiene evidencia de cepas variantes de *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum* y la infección que esta bacteria ocasiona (Blackall, 1999).

En America Latina, la Coriza Infecciosa es una enfermedad de importancia económica en las parvadas de postura comerciales y reproductoras. Los brotes se pueden presentar en forma independiente de la bacterinización, debido a la presencia de agentes infecciosos complicantes y a factores de manejo. La presencia de esta enfermedad puede ser de naturaleza clínica, pudiendo presentarse muchos brotes durante un periodo de uno a dos años, para después desaparecer durante

etapas de varios años. Los problemas son más comunes en época de lluvias, aun cuando pueden presentarse en cualquier época del año (Laboratorios Sanfer, 2005).

En la práctica, la utilización de bacterinas contra Coriza Infecciosa no siempre protege, ya que suelen presentarse brotes de la enfermedad tras su aplicación, inclusive con autovacunas elaboradas *ex profeso* para conseguir una respuesta inmune específica contra cepas aisladas de la enfermedad. La razón de los quiebres de protección vacunal se debe principalmente a factores relacionados con la elaboración de las inmunógenos, pero también a causas que tienen que ver con la expresión inmunológica de las aves, y a la posibilidad de aparición de cepas que contra las que los biológicos usados no protegen. Es conocido que las aves que se han recuperado de una infección natural adquieren inmunidad no solo contra la serovariedad que ocasionó la infección, sino también contra las otras dos serovariedades de Page. En otras palabras, la infección natural produce protección cruzada entre las distintas serovariedades de Page. (Laboratorios Sanfer, 2005)

1. ANTECEDENTES

1.1 HISTORIA

En 1932, De Blicek (citado por Blackall, 1989) propuso el nombre de *Bacillus haemoglobinophilus coryza gallinarum* para el agente causal del “catarro contagioso” de los pollos. Con base en estudios bacteriológicos y en los criterios del sistema de nomenclatura binominal de manera independiente, Según Blackall (1989), Eliot y Lewis y Delaplane *et al.* (1934) propusieron el nombre de *Haemophilus gallinarum* para el agente causal de la Coriza Infecciosa. Varios estudios mostraron el requerimiento de los factores de crecimiento X (hemina) y V (NAD, dinucleótido de adenina nicotinamida) para el cultivo *in vitro* de *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum*. Sin embargo, McGuaghey (1932) y Page (1962) (citados por Blackall, 1989) señalaron la independencia del factor X de crecimiento en un número de aislamientos estudiados. Con base en estos estudios, Biberstein y White (1969) propusieron la especie *Haemophilus paragallinarum* para los microorganismos causantes de Coriza Infecciosa, dependientes del factor V pero independientes del factor X de crecimiento. Hoy se acepta que *Haemophilus (Avibacterium) paragallinarum* nunca existió y que la confusión se debió a la descripción errónea de los aislamientos estudiados a causa de limitaciones en las técnicas de laboratorio. (Blackall, 1989).

1.2 INCIDENCIA Y DISTRIBUCIÓN

Se ha informado la presencia de *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum* en Argentina, Australia; Bulgaria, Canadá, Egipto, Gran Bretaña, Guatemala, India, Indonesia, Iraq y Suiza, principalmente en países con industria avícola intensiva. En Estados Unidos de América se han informado brotes de Coriza Infecciosa en California, Alabama y Oregón. En México, se han registrado brotes en Sonora, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Puebla, Yucatán (Soriano y Terzolo, 2004).

1.2.1 Etiología

La bacteria *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum* pertenece a la familia Pasteurellaceae, aun cuando se reconoce que es independiente del factor X. Desde 1992, se ha informado el aislamiento *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum* independientes del factor V a partir de aves con Coriza Infecciosa en Sudáfrica y recientemente en México (García *et al.*, 2002). La identificación de estas cepas independientes de ambos factores de crecimiento pone en duda la actual nomenclatura de este microorganismo. Sin embargo, la clasificación taxonómica actual permanece así: superreino, Procaryotae; reino, Eubacteria; división, Gracilicutes; clase, Protobacteria; familia, Pasterelleceae; genero *Haemophilus* y especie, *Haemophilus paragallinarum*. (Kilian y Biberstein, 1984).

1.2.2 Morfología y tinción

Avibacterium paragallinarum es una bacteria gramnegativa no esporulada. En cultivos en agar, es pleomórfica y presenta morfología cocobacilar con tendencia a la formación de cadenas cortas y algunos filamentos. En cultivos en caldo, es frecuente observar formas muy pleomórficas e inclusive bacterias degradadas que aparecen como si fueran anchas de colorantes empleados. (Terzolo, 2009).

1.2.3 Reclasificación de *Haemophilus (Avibacterium) paragallinarum*

Una caracterización fenotípica ampliada se realizó de la cepa tipo de *Haemophilus paragallinarum*, que es el NAD-dependiente, y ocho cepas NAD independientes de *Haemophilus paragallinarum*. Al completar secuencias 16S rARN se obtuvieron una cepa de *Haemophilus paragallinarum* NAD-independiente y cuatro NAD-dependientes. Estas cinco secuencias, así como otros siete taxones de Pasteurellaceae fueron sometidas a análisis filogenético. El análisis estableció que [*Haemophilus paragallinarum*], *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella avium* y *Pasteurella volantium* forman un grupo monofilético con un mínimo del 96,8% de similitud. Este grupo también se pueden separar mediante pruebas fenotípicas de todos los demás reconocidos y nombrados dentro de Pasteurellaceae. Como las

pruebas genotípicas y fenotípicas apoyan la naturaleza propia e independiente de este subgrupo, se propone la transferencia de *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus paragallinarum*], *Pasteurella avium* y *Pasteurella volantium* a un nuevo género *Avibacterium* como *Avibacterium gallinarum* (Blackall *et al.*, 2005).

Las cepas tipo NCTC 1118T (*Avibacterium gallinarum*), NCTC 11296T (*Avibacterium paragallinarum*), NCTC 11297T (*Avibacterium avium*) y NCTC 3438T (*Avibacterium*) *volantium*. Las principales características que separan a estas cuatro especies son la actividad de catalasa (ausente sólo en *Avibacterium paragallinarum*) y la producción de ácido de la galactosa (negativo sólo en *Avibacterium paragallinarum*), maltosa (negativo sólo en *Avibacterium avium*) y manitol (negativo en *Avibacterium gallinarum* y *Avibacterium avium*) (Blackall *et al.*, 2005).

1.3 MORBILIDAD Y MORTALIDAD

La Coriza Infecciosa clásica esta generalmente caracterizada por alta morbilidad (Blackall y Matsumoto, 2003). Sin embargo se ha informado de cuadros clínicos atípicos donde *Av. paragallinarum* ha causado mortalidad. En parvadas de pollos de engorda y gallinas de postura, las pérdidas debidas a mortalidad persistente y eliminación de aves fue de 2%-5% (Bell *et al.*,1995).

1.3.1 Periodo de incubación

La difusión de la enfermedad se realiza predominantemente mediante contacto directo con exudado nasal de aves infectadas. Las aves de todas las edades son susceptibles tanto a la infección como a la enfermedad, aun cuando hay evidencias de que el periodo de incubación es mas corto y el curso de la enfermedad es más prolongado a medida que aumenta la edad de las aves. El periodo de incubación de la Coriza Infecciosa es de 24 a 48 hrs. después de la inoculación de aves con cultivos vivos o exudado infeccioso. De manera experimental, el periodo de incubación puede ser variable de acuerdo con ciertas condiciones de exposición: 24 h, inoculación intrasínusal; 48 h, instilación nasal; 72 h, aves en jaula; cuatro días,

contacto con agua infectada y 6 a 14 días por transmisión aérea (Soriano y Terzolo 2004).

1.3.2 Signos clínicos

Los signos característicos de Coriza Infecciosa incluyen exudado nasal seroso o mucoso, estornudo, inflamación de senos infraorbitarios, edema facial y conjuntivitis (Blackall y Matsumoto, 2003). También se puede escuchar estertor traqueal cuando las aves tienen afectado el aparato respiratorio inferior. Se ha observado un cuadro respiratorio más severo en casos donde se asocia con *Mycoplasma sinoviae*, *M. gallisepticum*, *Escherichia coli* *Salmonella ssp*, *Pasteurella spp.* y virus de la bronquitis infecciosa (Soriano y Terzolo, 2004). Sin embargo parece muy común la asociación con *Pasteurella gallinarum*, bacteria que puede aparecer de la fase aguda de la Coriza Infecciosa y causar masas caseosas en los senos paranasales.

Las aves pueden tener diarrea y el consumo de agua y alimento generalmente se reduce. En aves en crecimiento se registra mal desempeño de la parvada; en gallinas de postura la reducción en la producción de huevo puede llegar a 58.7%. (Bell *et al.*, 1995). La enfermedad se difunde rápidamente a lo largo de las filas de jaulas, o bien, de una sección a otra dentro de una caseta en donde existan contacto directo de ave a ave (Laboratorios Sanfer, 2005).

1.3.3 Patogenia y virulencia

Los antígenos hemoaglutinantes, o hemoaglutininas, son las estructuras principalmente relacionadas con la antigenicidad, patogenicidad e inmunogenicidad de *A. paragallinarum*. Así una cepa variante que no hemoaglutina, aun después de tratamientos o envejecimiento, tampoco produce coriza cuando se inocula en aves susceptibles. (Sandoval y Terzolo, 1997). Takagi *et al.* (1991) purificaron esta hemoaglutinina mediante el uso de cromatografía de afinidad y anticuerpos monoclonales y demostraron su importancia crucial en la inmunogenicidad al inocular con la hemoaglutinina purificada aves susceptibles por vía intramuscular. De este

modo se logró protección frente a desafíos con una cepa patógena. Es más, esta protección activa depende totalmente de la presencia de anticuerpos humorales inhibidores de la hemoaglutinación en el suero sanguíneo. Además, Takagi *et al.*, (1991) demostraron que se puede conferir con la misma cepa, administrando por vía intraperitoneal anticuerpos monoclonales de ratón, específicamente dirigidos contra las hemoaglutininas; esta vez, mediante un mecanismo de inmunidad pasiva.

Se considera que la adherencia bacteriana a las células epiteliales es el primer paso en el proceso de infección de las superficies mucosas. Las adhesinas son las estructuras bacterianas que median la adherencia a estructuras celulares complementarias, los receptores (Jacques y Paradis, 1998.) Con base en lo anterior, se ha mostrado adherencia *in vivo* e *in vitro* de *Avibacterium paragallinarum* a células epiteliales traqueales de pollo. De forma similar, se ha demostrado que células bacterianas de *A. paragallinarum*, adsorbidas de manera homologa o heterologa con antisueros de conejo o pollo y lavados traqueales de aves inmunizadas, perdieron su actividad hemoaglutinante y su capacidad de adherencia a las células epiteliales, (Fernández *at el.*, 2000). Los resultados obtenidos en este estudio indican que los antígenos hemoaglutinantes son las adhesinas de *A. paragallinarum* y que los anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación presentes en los lavados traqueales actúan también como anticuerpos neutralizantes. Este hecho indica que seguramente los receptores específicos para las hemoaglutininas de los eritrocitos y las células epiteliales del tracto respiratorio son los mismos o muy similares, lo cual una vez mas confirma la importancia de las pruebas de hemoaglutinación, las cuales indirectamente, detectan la capacidad de una determinada cepa para adherirse a las células blanco sobre las que *Avibacterium paragallinarum* específicamente dirige su acción patógena (Takagi *et al.*, 1991).

Recientemente, Terry *et al* (2003), informaron de la producción de hemocina, una bacteriocina, por parte de *A. paragallinarum*. Los autores mencionan que la hemocina producida por *A. paragallinarum* puede ser importante en la colonización de los senos respiratorios de los pollos.

Se considera que *A. paragallinarum* es un agente patógeno primario en aves susceptibles (Blackall *et al.*, 2003). Sin embargo, de manera específica han existido discrepancias en cuanto a la patogenicidad de la cepa 0222 (serovariedad B-1). Sawata *et al.* (1980) informaron que esta cepa carecía de antígenos aglutinantes y que no era patógena en pollos desafiados. Sin embargo, Rimler *et al.* (1977) mostraron que las cepas 0222 y Spross (B-1) fueron patógenas en pollos desafiados y que representaban una de las tres inmunovarietades relacionadas con las serovariedades identificadas por pruebas de aglutinación en placa.

Sandoval y Terzolo (1997) estudiaron diferentes cepas regionales de las serovariedades A, B y C de Argentina, mediante el desarrollo de modelos de reproducción de la enfermedad para evaluar su patogenicidad, difusión horizontal e invasividad. Se demostró que las cepas B fueron consistentemente patógenas y causan lesiones de coriza muy aguda, siempre con alto grado de contagio e invasividad. En cambio, las cepas A y C mostraron un comportamiento distinto; algunas fueron muy virulentas, difusoras e invasivas, mientras que otras fueron patógenas, pero se difundían muy lentamente, y otras más fueron poco patógenas; inclusive, se encontraron unas pocas cepas de campo que mostraron ser totalmente apatógenas.

1.3.4 Inmunidad

El desarrollo de la inmunidad contra Coriza Infecciosa Aviar depende de varios factores:

1.- La inmunidad es específica para cada serotipo.

2.- La naturaleza de los antígenos inductores de anticuerpos protectores no está bien definida. Sawata *et al.* (1980), sugiere que la pared del microorganismo contiene dichos antígenos. Según Laboratorios Sanfer (2005), Iritani *et al.*, señalaron que la actividad biológica de extractos puros de polisacáridos induce la formación de aglutininas protectoras específicas del serotipo. Kume *et al.* (1980, 1983) reportan que los antígenos somáticos L y HAL están estrechamente asociados con su

protección. Yamaguchi y Kume proponen que el sistema de hemoaglutininas 1HA y 2HA actúa como antígenos inductores. (Laboratorios Sanfer, 2005).

3.- La inducción de inmunidad mediante el uso de bacterias va a depender del tipo de adyuvante, el cual es un elemento importante a la hora de fabricar una bacterina.

Existen cepas muy virulentas, difusoras e invasivas; otras son patógenas pero de difusión lenta, existiendo también cepas poco patógenas e inclusive se reporta la existencia de cepas de campo totalmente a patógenas (Soriano y Terzolo, 2004).

No obstante que se han descrito varios antígenos somáticos, de capsula y de pared que inducen protección en las aves inmunizadas, son los antígenos hemoaglutinantes o hemoaglutininas los relacionados con antigenicidad, patogenicidad e inmunogenicidad del *A. paragallinarum*. De este modo, las cepas que no hemoaglutinan ya sea por tratamiento o envejecimiento tampoco producen coriza cuando se inoculan en aves susceptibles (Soriano y Terzolo, 2004).

La adherencia bacteriana a las células epiteliales es el primer paso en el proceso de infección de las superficies mucosas. Las adhesinas son las estructuras bacterianas que median la adherencia a estructuras celulares complementarias, los receptores. (Jacques *et al.* 1998.)

1.4 BACTERINAS

Han existido discrepancias en cuanto a la patogenicidad de la serovariedad B. Sawata *et al.* (1980) informaron que esta cepa carecía de antígenos hemoaglutinantes y que no era patógena en pollos desafiados. Sin embargo, otros investigadores como Rimler *et al.* (1977), Thornton y Blackall, (1984) reportan que las cepas Spross y 0222 (prototipos de la serovariedad B) fueron patógenas en pollos desafiados y que la segunda cepa mencionada producían anticuerpos aglutinantes específicos de serovariedad. Yamaguchi *et al.* (1990), investigaron la patogenicidad de cinco cepas serovariedad B, incluyendo las cepas 0222 y Spross y encontraron que la cepa 0222 no produjo signos clínicos de Coriza Infecciosa. Sin embargo,

observaron lesiones (engrosamiento de membranas mucosas y exudado amarillento en senos infraorbitarios y aislamiento del microorganismo de desafío. Estos resultados indican que la cepa 0222 es probablemente una cepa de baja virulencia (Soriano y Terzolo, 2004).

Más recientemente, se ha reportado en Argentina la aparición de cepas “variantes” de la serovariedad B, que son genéticamente muy diferentes a las cepas de otras partes del mundo, y por lo mismo, las aves no son protegidas con las cepas serovariedad B de referencia (0222 y Spross), y menos aún con las otras dos serovariedades de Page. Para la protección contra el desafío de estas cepas B es necesario incluirlas en la formulación de bacterinas locales (Soriano y Terzolo, 2004).

En la actualidad, se emplean en todo el mundo bacterinas comerciales bivalentes utilizando cepas con las serovariedades A- 1 y C- 1, y trivalentes con cepas de las serovariedades A-1, B- 1 y C- 2. Es un punto de discrepancia la necesidad de incluir o no las cepas de la serovariedad B (Soriano y Terzolo 2004).

Los laboratorios transnacionales preparan vacunas con cepas estándar internacionalmente reconocidas para ser usadas en todo el mundo. Ellos aseguran que sus vacunas son siempre efectivas cuando son elaboradas con estas cepas internacionales, y por lo tanto no se preocupan en incluir las cepas regionales (Terzolo, 2009). Algunas de estas cepas son la cepa 0083 (serovariedad A), la cepa Modesto (serovariedad C), la Spross y la 0222 (serovariedad B), la H- 221 (serovariedad A) y la H-18 (serovariedad C). Estas dos últimas también son conocidas como cepas Kitasato, y basan su prestigio en que son capaces de brindar protección contra las siete subvariedades del modelo inicial de Kume. De este modo, la cepa H-221 (serovariedad H-1) confiere protección contra las infecciones causadas por los serotipos HA- 1, HA- 2 y HA-3; y la cepa H-18 (serovariedad H- 4) es efectiva contra los serotipos HA- 4, HA-5, HA- 6 y HA- 7. Se observa que el uso de ambas cepas incrementa la protección contra las otras serovariedades que se ha informado que protegen también contra el serotipo B. Esto es por lo que las vacunas comerciales conteniendo cepas Kitasato son bivalentes, ya que solo contienen los

serotipos A y C de Page a través de las cepas japonesas 221 y H- 18 respectivamente (Corisan bacterina Bivalente). Se ha demostrado que 10^8 unidades formadoras de colonias por dosis de vacuna, es la dosis mínima de antígeno que brinda adecuada protección (Matsumoto y Yamamoto, 1975).

1.4.1 Adyuvantes

Se han evaluado una variedad de adyuvantes para vacuna inactivadas contra la Coriza Infecciosa de las aves entre ellos el gel de hidróxido de aluminio, aceite mineral en emulsión única y en emulsión doble, la combinación hidróxido de aluminio y aceite mineral, la saponina “Quil A” y la amina lipoidal avridina. Se reporta que estos dos últimos tienen muy poca eficacia, de modo que los más ensayados y elegibles para ser seleccionados en la elaboración de vacunas están entre los primeros indicados. La elección del adyuvante idóneo también es un tema polémico ya que la bibliografía reporta resultados divergentes cuando los criterios de evaluación no son precisos. Los adyuvantes deben ser evaluados en términos de eficacia y seguridad (Blackall y Tarzolo, 1995) entendiéndose por eficacia la potenciación de los antígenos de la vacuna así como la duración de la inmunidad y por seguridad la ausencia o presencia mínima de reacciones post vacunales.

Blackall (1995) evaluó bacterinas preparadas con hidróxido de aluminio, aceite mineral en doble emulsión y la inclusión en estas formulaciones de la auridina, adyuvante recién desarrollado cuya naturaleza corresponde a una amina lipoidal y que induce la protección de interferón (Corisan Laboratorios Sanfer, 2005)

Reid y Blackall (1987) compararon bacterinas elaboradas con hidróxido de aluminio, aceite mineral y saponina Quil A; y reportaron que las vacunas con hidróxido de aluminio son más efectivas en términos de protección (80%) y no producen reacciones granulomatosas de tipo local; las elaboradas en aceite mineral solo protegieron el 35% y ocasionaron reacciones granulomatosas en los sitios de aplicación. (Corisan Laboratorios Sanfer 2005).

La combinación de hidróxido de aluminio y aceite mineral fue efectiva con un 90% de protección e indujo mayores niveles de anticuerpos aglutinantes. Su desventaja fue la formación de granulomas en el sitio de inoculación. Como se indicó, el uso de saponinas no fue exitoso (Blackall y Terzolo, 1995).

Blackall (1987), evaluó bacterinas preparadas con hidróxido de aluminio, aceite mineral en doble emulsión y la acridina y concluyó que las bacterinas en hidróxido de aluminio alcanzaron mayor efectividad y altos niveles de protección.

1.4.2 Vías de administración

En la práctica se administran las bacterinas contra Coriza Infecciosa tanto por vía subcutánea detrás del cuello como por la vía intramuscular en la pechuga, sobre todo aquellas hechas con aceites minerales. La ruta de administración es importante Kume y Sawata (1990) reportan resultados mas efectivos cuando la bacterina hecha en hidróxido de aluminio se aplica por vía intramuscular en el muslo, alcanzando un 87% de protección; en la pechuga un 50% de protección y aplicada al cuello vía subcutánea solo un 32% de protección.

Blackall y Terzolo (1995)) informaron que una vacuna que contiene gel de hidróxido de aluminio fue eficaz al ser aplicada tanto por vía subcutánea (en la parte posterior del cuello) como intramuscular (en el músculo de la pechuga). El autor de la presente revisión utilizando bacterina con cepas Kitasato (hidróxido de aluminio) encontró mejor respuesta serológica cuando el producto se aplicó en el muslo de la pata que por la vía intramuscular de la pechuga. Considerando títulos de HI iguales o mayores a 5 como respuesta protectora se encontró 100% de protección tanto para el serotipo A como para el C en aquellas aves que fueron vacunadas en el muslo de la pierna en comparación con respuestas de 80% (serotipo A) y 60% (serotipo C) de protección en las aves que se vacunaron por la vía intramuscular de la pechuga (E. Dávila, datos no reportados).

El número de dosis de la bacterina aplicadas a las aves está relacionada directamente con la duración de la inmunidad. Según Matsumoto y Yamamoto (1975)

dosis única en hidróxido de aluminio caso de CORISAN, confiere protección contra la aparición de signos clínicos hasta diez semanas después de la aplicación. Cuando se aplican dos dosis la duración de la inmunidad y los niveles de protección aumentan, se alcanza una protección de hasta 60 semanas después de aplicada la segunda dosis de refuerzo, de acuerdo con las características de ubicación y tipo de producción, ya sea de una sola edad o de edades múltiples (Corisan Bacterina bivalente, Sanfer).

Blackall y Terzolo (1995) señalan que las bacterinas de este tipo deberían inyectarse en dos dosis separadas entre si por un intervalo mínimo de tres semanas. En el esquema de diez semanas de separación, la primera dosis de 0.5 ml/ave se recomienda colocarla en la pierna por vía intramuscular entre la 5ª y 6ª semana de edad, y la revacunación se hace entre 15 y 16 semanas de edad, con dosis de 1 ml/ave por la misma vía. Tras la segunda dosificación, los niveles de protección aumentan hasta las 56 semanas de edad (Blackall y Terzol., 1995). Se reporta la necesidad de colocar algunas veces una tercera dosis de refuerzo, de acuerdo con la ubicación y el sistema de producción.

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la avicultura asentada en el territorio mexicano ha alcanzado un nivel tecnológico, de eficiencia y productividad comparable con el de países desarrollados (Alonso y Acevedo 2009). Además, la actividad juega un papel estratégico en la nutrición de la población, ya que los productos avícolas son fuente de proteína completa, de alta calidad y bajo precio, lo que determina una alta demanda en el ámbito nacional; México ocupa el primer lugar mundial en el consumo de huevo por persona (Unión Nacional de Avicultores, 2009).

La Coriza Infecciosa prevalece especialmente en granjas dedicadas a la producción de huevos comerciales, especialmente si existen aves de edades múltiples, donde la enfermedad se torna enzootica y se complica a menudo con infecciones producidas por otros patógenos respiratorios.

La importancia económica de la Coriza Infecciosa deriva del aumento en la cantidad de aves de desecho, falta de uniformidad de la parvada y baja de postura en las gallinas productoras de huevo, por lo que los brotes se pueden presentar a un cuando se halla usado una bacterina para proteger a los animales.

En marzo y abril de 2009, se presentó un brote severo de coriza en dos parvadas de ochenta mil aves cada una de la Empresa Mr Egg, en Tehuacán, Puebla, lo que ocasionó una gran cantidad de aves de desecho, retraso en el crecimiento y una caída en la postura. Estas parvadas se encontraban en producción, iniciando el pico de postura, lo que impactó negativamente en la misma, así como en la ganancia de peso. El brote fue tan severo que un 60% de las aves afectadas presentaron un fuerte cuadro de inflamación en los senos infraorbitarios; e incluso debido al dolor, las aves se echaban en las jaulas. En ese tiempo, se utilizaba una bacterina trivalente. Se mandaron algunas aves enfermas al laboratorio para hacer el aislamiento bacteriano, y se determinó que la presencia del brote se debía al serovar C1, contra el que se supone que la bacterina utilizada debía haber protegido.

3. HIPOTESIS

La utilización de una bacterina trivalente para la protección de la Coriza Infecciosa en gallinas de postura confiere una protección más efectiva contra los serotipos A, B y C de *Avibacterium paragallinarum* que una bacterina bivalente.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la protección conferida contra Coriza Infecciosa, en un ensayo de campo utilizando una bacterina bivalente y una trivalente para los serotipos A, B y C de *Avibacterium paragallinarum*.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Evaluar la protección conferida contra Coriza Infecciosa, utilizando bacterina bivalente y una trivalente para el serotipo A de *Avibacterium paragallinarum*.
- 2.- Evaluar la protección conferida contra Coriza Infecciosa, utilizando bacterina bivalente y una trivalente para el serotipo B de *Avibacterium paragallinarum*.
- 3.- Evaluar la protección conferida contra Coriza Infecciosa, utilizando bacterina bivalente y una trivalente para el serotipo C de *Avibacterium paragallinarum*.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 LUGAR DE ESTUDIO Y UBICACIÓN DE LA GRANJA DE GALLINAS DE POSTURA

La investigación se realizó en los sitios “Arcos 1” y “San Antonio 3” pertenecientes a la empresa productora de huevo para plato Mr. Egg ubicada en el municipio de Tehuacán, Puebla. Dicho municipio se encuentra localizado en la parte suroeste del estado de Puebla, su altitud promedio es de 1640 msnm y presenta una temperatura media anual que oscila entre los 18ª y 22ª C. Sus coordenadas geográficas son los paralelos 18° 22' 6 y 18° 36' 12 de longitud norte, y los meridianos 97° 15' 24 y 97° 37' 24 de latitud occidental. Al norte, colinda con los Municipios de Tepanco de López, Santiago Miahuatlán, Vicente Guerrero y Nicolás Bravo; al este con Vicente Guerrero, San Antonio Cañada y Ajalpan; al sur con San Gabriel Chilac, Zapotitlán, San Antonio Texcala y Altepexi; y al oeste con Zapotitlán, San Martín Atexcal, Juan N. Méndez y Tepanco de López. (Instituto Nacional para el Federalismo y Desarrollo Municipal, 2005).

5.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS SITIOS DE GALLINAS DE POSTURA

La empresa Mr. Egg, se dedica a la producción de huevo para plato y utiliza gallina de postura de la estirpe Hy line W 36. Las aves se encuentran en dos áreas: el área de crianza y el área de producción. La etapa de crianza de pollitas tiene lugar en casetas con un sistema todo dentro-todo fuera. Se manejan aves de múltiples edades. Las pollitas se mantienen desde un día de edad hasta las 17 semanas cuando se realiza el traspaso al área de postura.

El área de postura comprende diferentes sitios; Santa Rita, Arcos 1, 2, 3 y 4; San Antonio 1 y 3. Los sitios Arcos 1 y San Antonio 3 usados en este estudio llevan el mismo manejo, ya que ambas áreas cuentan con casetas rústicas.

El sitio Arcos 1 cuenta con ocho casetas para alojar 50,000. Estas casetas son rústicas y la alimentación es manual; la parvada se pesa cada vez que cumple una semana, y se calcula la uniformidad de la parvada, la cual se expresa como el porcentaje de los pesos individuales con un 10% de tolerancia del promedio del lote actual, y se determina el consumo promedio de alimento/día. Se llevan registros de mortalidad diaria. El sitio San Antonio 3 cuenta con cinco casetas rústicas y dos automáticas. Aquí se alojaron 100,000 aves.

Ambos sitios cuentan con medidas de bioseguridad que incluyen cercas perimetrales, arcos sanitarios, control de roedores y de fauna nociva. Los principales desinfectantes utilizados son compuestos de amonio cuaternario y aldehídos. Las aves muertas son recolectadas en cada caseta y posteriormente se incineran.

Las casetas se encuentran orientadas norte-sur, cada caseta tiene tres niveles donde se alojan cuatro gallinas por jaula. Cada jaula tiene dos bebederos de copa, en ambas áreas de postura el traspaso se realiza a las 17 semanas, el cual se maneja en uno o dos ciclos de producción.

La muda o pelecha es un proceso natural de las aves para renovar sus plumas. Las pollas domésticas se han criado para alta producción de huevo y bajo condiciones ordinarias no presentarán pelecha completa sino hasta el final de un largo e intenso periodo de postura. Es posible acelerar el proceso mediante un programa de luz para forzarlas a mudar rápidamente y desarrollar una nueva serie de plumas; seguidas de un estímulo para reiniciar la producción de huevo. El programa de luz artificial no debe durar más de seis a ocho semanas. (North y Bell, 1993)

La muda forzada solo es practicada para proporcionar a la gallina un descanso al final de una larga etapa de producción de huevo. La capacidad de la gallina para producir huevos después de una pelecha, solo puede atribuirse a la fase de descanso recibida, por lo tanto la muda es un procedimiento de descanso para que el ave pueda continuar su etapa de producción durante otro ciclo. (North y Bell, 1993).

5.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 150000 aves de postura comercial estirpe Hy line W 36, las cuales se dividieron en dos grupos. El grupo A (15 semanas de edad) con 100000 aves y el grupo B (, 14 semanas de edad) con 50000 aves; el grupo A se alojó en el sitio San Antonio 3 y el grupo B se envió al sitio Arcos 1. A cada uno de ellos se le aplicó un programa de bacterinización (bivalente y trivalente), diferente contra la Coriza Infecciosa. El grupo A se le aplicó una bacterina trivalente (serotipos A, B y C), que se utiliza actualmente en la granja y al grupo B se le inyectó una bacterina bivalente, de prueba (serotipos A y C).

El grupo A fue inmunizado en crianza a la 4^{ta}, 10^o y 16^{ava} semana de edad con la bacterina trivalente a la dosis recomendada por el laboratorio. El grupo B se inmunizó en crianza a la 4^{ta}, 10^o y 16^{ava} semana de edad con la bacterina bivalente según las recomendaciones del laboratorio.

5.4 MONITOREO PRODUCTIVO

Se realizó una comparación entre los grupos, tomando datos de rutina como ganancia de peso promedio por grupo cada semana, mortalidad y porcentaje de postura hasta las 31 semanas,

5.5 MONITOREO SEROLÓGICO

Se llevó a cabo obteniendo 20 sueros a las 21 semanas después de la aplicación de la última dosis de bacterina en ambos grupos y así sucesivamente cada cinco semanas hasta tener un seguimiento concluyente del grupo en evaluación.

1^{er} monitoreo: 21 semanas de edad

2^o monitoreo: 26 semanas de edad

3^{er} monitoreo: 31 semanas de edad

Los sueros se remitieron al Laboratorio de Investigación Aplicada, S.A. de C.V. (IASA) en Tehuacán, Púe, para su análisis serológico a través de la prueba de hemoaglutinación indirecta (HI), con el sistema japonés del Instituto Kitasato, el cual tiene la particularidad de ser específico para *Avibacterium paragallinarum* y muestra resultados de manera individual por serotipo. (A y C). El serotipo B se evaluó con base en la clasificación de Blackall *et al.*1990.

5.6 PRUEBA DE DESAFIO

Con la finalidad de verificar el grado de protección alcanzado, se hizo una prueba de desafío a la edad de 23 semanas con aves de ambos sitios, para ello se enviaron tres grupos de cinco aves, procedentes de la caseta de prueba con bacterina bivalente (grupos 4,5,6) y de las casetas control con bacterina trivalente (grupos 1,2,3). Cada grupo incluyó cinco aves SPF (*specific pathogen free*) como control, con la siguiente distribución:

Grupo 1: 5 aves para desafiar contra el serotipo A + 5 aves SPF

Grupo 2: 5 aves para desafiar contra el serotipo B + 5 aves SPF

Grupo 3: 5 aves para desafiar contra el serotipo C + 5 aves SPF

Grupo 4: 5 aves control para desafiar contra el serotipo A + 5 aves SPF

Grupo 5: 5 aves control para desafiar contra el serotipo B + 5 aves SPF

Grupo 6: 5 aves control para desafiar contra el serotipo C + 5 aves SPF

Para la obtención de los tres grupos de cinco aves se utilizó un muestreo aleatorio de las aves dentro de las casetas monitoreadas.

Todas las gallinas fueron remitidas a IASA en Tehuacán, Pué; donde se mantuvieron durante 5 días para su observación y su adaptación; posteriormente, se obtuvo una muestra de sangre de las 30 gallinas para determinar títulos de anticuerpos circulantes mediante pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (HI).

Las aves se desafiaron con un cultivo fresco de *Avibacterium paragallinarum*, con los serotipos A (W), B (022) y C (Modesto), de manera individual, mediante la inoculación en los senos infra-orbitales de una dosis de 0.2 ml /ave a una concentración de 1×10^6 UFC/ml. Se espera que las cepas de desafío produzcan preferentemente un título de $10^{8.0}$ UFC/ml. (Terzolo, 2009). Las aves permanecieron en observación durante un periodo de 14 días, examinándose diariamente en busca de posibles signos de enfermedad. Antes de la prueba de desafío, y a los 7 y 14 días se tomó una muestra de sangre para determinar el nivel de anticuerpos contra *Avibacterium paragallinarum*.

Toda las aves se sacrificaron después del último muestreo serológico. En la necropsia se tomaron hisopos de senos infra-orbitales de cada ave para realizar el re-aislamiento de *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum* de desafío. Se consideraron como aves protegidas aquellas que no presentaron signos clínicos, ni presencia de *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum*, en el cultivo hecho a partir de los senos Infra-orbitales. El índice de protección de cada bacterina, se calculó considerando el número de aves protegidas, expresado como porcentaje del total de aves probadas.

Para el aislamiento bacteriológico, se tomó la muestra con estricta esterilidad. Se sacaron las aves de las unidades de aislamiento en bolsas, una vez sacrificada cada ave, se cauterizó la piel de la región infraorbital y se practicó una incisión sobre el seno infraorbitario, se separó la piel en la incisión y se introdujo una asa estéril. Para la siembra se utilizaron placas con agar sangre. Posteriormente, las cajas se incubaron a 37°C durante 24- 48 hrs. antes de examinar los frotis.

5.7 ANALISIS ESTADISTICO

Se calculó la media geométrica y el coeficiente de variación de los títulos de anticuerpos en cada grupo vacunado. Para determinar el efecto del tipo de bacterina se aplicó el análisis de varianza, usando como variable de respuesta el título de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación, y como variables explicativas el tipo de bacterina utilizada y las fechas de muestreo.

Los datos productivos se compararon mediante pruebas de t, para las variables: consumo de alimento, ganancia de peso, mortalidad y porcentaje de postura durante las diferentes semanas que duro el estudio.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SPSS versión 15.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 TITULOS DE ANTICUERPOS CIRCULANTES MEDIANTE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (HI)

La protección conferida por la bacterina trivalente a las 15 semanas de edad, resultó superior que la bacterina bivalente en los tres serotipos probados, aunque los valores no superaron el 35 %. (Cuadro 1). Cabe destacar que este muestreo basal se hizo antes de lo establecido en el protocolo de muestreo, que son 21 semanas.

Cuadro 1. Protección comparativa conferida por las bacterina bivalente y trivalente contra *A. paragallinarum* a las 15 semanas de edad en aves de la Empresa Mr Egg, Tehuacán, Puebla.

Bacterina	Protección %		
	Serotipo A	Serotipo B	Serotipo C
trivalente	28	35	28
bivalente	26	26	26

Cuadro 2. Protección conferida por las bacterina bivalente contra el serotipo A de *A. paragallinarum* a las 21 semanas de edad en aves de la Empresa Mr Egg, Tehuacán, Puebla.

Número de muestras	Títulos	Protección (%)
3	10	15
8	5	40
9	<5	0
Total	Media Geométrica	Total
20	4	55

6.2 PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN A LAS 21 SEMANAS DE EDAD

Los resultados obtenidos muestran que aves inmunizadas en forma bivalente tuvieron una protección de 55% para el serotipo A y de 80 % para el serotipo C (Cuadros 2 y 3).

Cuadro 3. Títulos de anticuerpos inducidos por las bacterina bivalente contra el serotipo C de *A. paragallinarum* a las 21 semanas de edad en aves de la Empresa Mr Egg, Tehuacán, Puebla.

Número de muestras	Títulos	Protección (%)
1	20	5
6	10	30
9	5	45
4	<5.	0
Total	Media Geométrica	Total
20	6	80

Cuadro 4. Títulos de anticuerpos inducidos por las bacterina trivalente contra el serotipo A de *A. paragallinarum* a las 21 semanas de edad en aves de la Empresa Mr Egg, Tehuacán, Puebla.

Número de muestras	Títulos	Protección (%)
1	40	5
4	20	21
4	10	21
4	5	21
6	<5	0
Total	Media Geométrica	Total
20	7	68

Con la bacterina trivalente, la protección alcanzada fue de 68% para el serotipo A y de 84% para el serotipo C (Cuadros 4 y 5).

Cuadro 5. Títulos de anticuerpos inducidos por las bacterina trivalente contra el serotipo C de *A. paragallinarum* a las 21 semanas de edad en aves de la Empresa Mr Egg, Tehuacán, Puebla.

Número de muestras	Títulos	Protección (%)
2	40	10
2	20	10
4	10	21
8	5	42
3	<5	0
Total	Media Geométrica	Total
19	8	84

En aves bacterinizadas, el Dr. Kume del Instituto Kitasato, considera que una muestra serológica con un título igual o mayor a 5 es resistente a un desafío con *Avibacterium paragallinarum*. (Kume y Sawata, 1990).

Para la identificación de *Avibacterium paragallinarum* mediante pruebas de inhibición de la hemoaglutinación y ELISA, se han producido varios paneles de anticuerpos monoclonales. Para la serovariedad A75, cuatro de diez aislamientos en Argentina y seis de 14 aislamientos de esa misma serovariedad en Brasil, no reaccionaron con anticuerpos monoclonales específicos, los cuales reconocieron 49 aislamientos japoneses de la serovariedad A77 y más de 20 aislamientos de la serovariedad A de varias partes del mundo. A partir de este hallazgo, Blackall *et al.* (1994) señalan que estas cepas latinoamericanas muestran observaron ciertas diferencias antigénicas respecto a las de otras partes del mundo.

El muestreo realizado a las 21 semanas muestra que las aves que recibieron la bacterina trivalente presentaron un mayor título de anticuerpos circulantes que las aves que recibieron la bacterina bivalente (Figura 1).

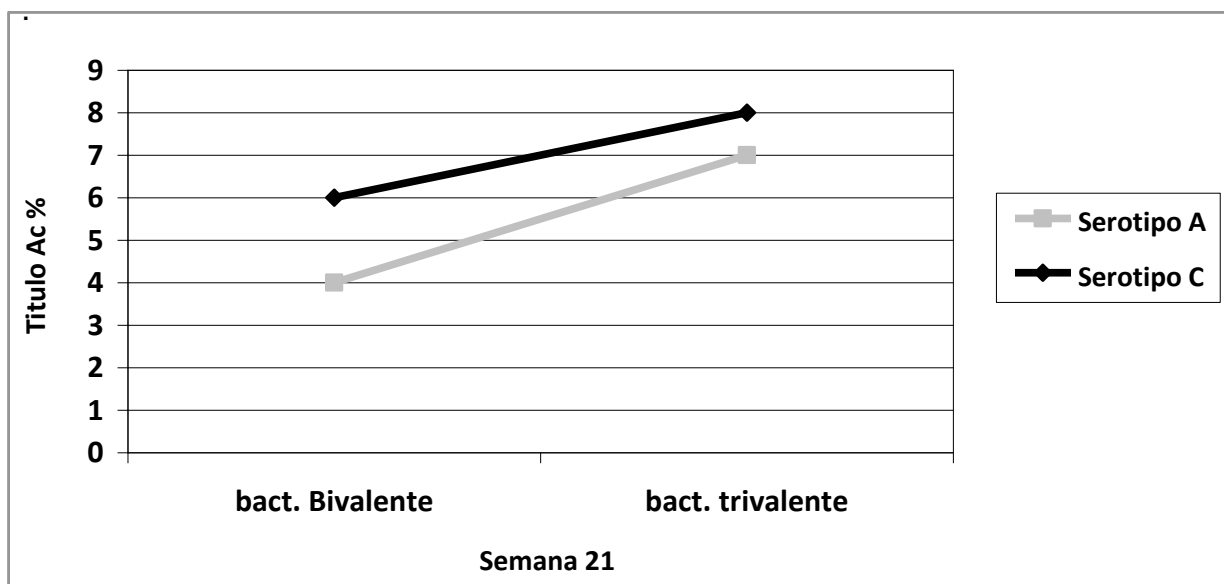


Figura 1. Títulos de anticuerpos contra serotipos A y C de *A. paragallinarum* a las 21 semanas de edad en aves inoculadas con bacterina bivalente o trivalente.

6.3 TITULO DE ANTICUERPOS CIRCULANTES MEDIANTE INHIBICIÓN LA HEMOAGLUTINACIÓN (HI) A LAS 26 SEMANAS DE EDAD

Para la bacterina trivalente se obtuvo una protección de 100 % para ambos serotipos, A y C, con una media geométrica de nueve para ambos (Cuadro 6). Para la bacterina bivalente se alcanzó una protección de 85% con una media geométrica de ocho para el serotipo A y un 70% para el serotipo C con una media geométrica de siete (Cuadro 7).

Cuadro 6. Títulos de anticuerpos inducidos por las bacterina trivalente contra los serotipos A y C de *A. paragallinarum* a las 26 semanas de edad en aves de la Empresa Mr Egg, Tehuacán, Puebla.

Serotipo	Número de muestras	Títulos	Protección
A	3	20	15
	7	10	35
	10	5	50
	Media Geométrica	9	
	1	40	5
C	2	20	10
	10	10	50
	7	5	35
	Media Geométrica	9	
	1	40	5

Cuadro 7. Títulos de anticuerpos inducidos por las bacterina bivalente contra los serotipos A y C de *A. paragallinarum* a las 26 semanas de edad en aves de la Empresa Mr Egg, Tehuacán, Puebla.

Serotipo	Número de muestras	Títulos	Protección
A	3	20	15
	9	10	45
	5	5	25
	3	<5	0
	Media Geométrica	8	
C	1	40	5
	4	20	20
	5	10	25
	4	5	20
	6	<5	0
	Media Geométrica	7	

El muestreo realizado a las 26 semanas muestra que las aves que recibieron la bacterina trivalente presentaron un mayor título de anticuerpos circulantes que las aves que recibieron la bacterina bivalente. Si bien la media geométrica de los títulos en general no fue muy alta, si rebasa en casi todos los casos el título de 1:5 que se considera como valor de corte indicativo de protección contra Coriza Infecciosa.

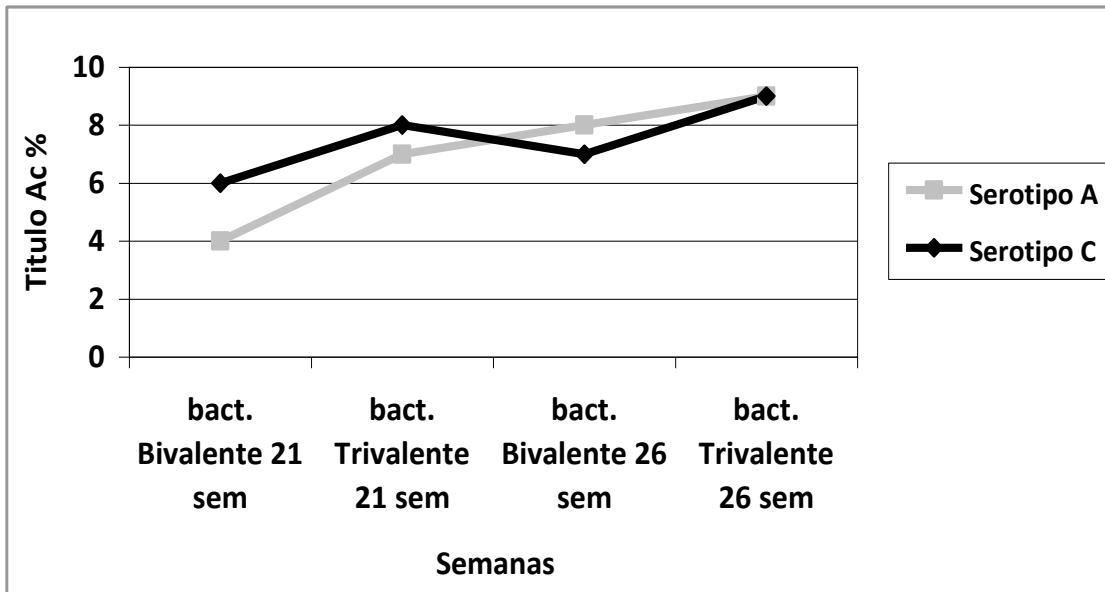


Figura 2. Títulos de anticuerpos contra serotipos A y C de *A. paragallinarum* a las 21 y 26 semanas de edad en aves inoculadas con bacterina bivalente o trivalente.

El muestreo realizado a las 21 semanas muestra que las aves que recibieron la bacterina trivalente presentaron un mayor título de anticuerpos circulantes que las aves que recibieron la bacterina bivalente. Al respecto, Soriano *et al.* (2001), en un estudio hecho con aves de Tepatitlan, Jalisco, encontraron que las aves inmunizadas con un producto trivalente mostraron títulos de anticuerpos circulantes y protección al desafío contra los tres serovares *A. paragallinarum*.

El análisis estadístico realizado para comparar el efecto del tipo de bacterina utilizada, la fecha de muestreo y la ubicación de la granja sobre los títulos de los anticuerpos circulantes en las aves inmunizadas no encontró diferencia estadística significativa ($P \geq 0.05$) para ninguna variable a las 21 y 26 semanas de edad (Cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis de varianza de los títulos de anticuerpos obtenidos a las 21 y 26 semanas de edad para las variables en estudio con bacterianas bivalente y trivalente contra *A. paragallinarum*.

Variable	Fuente de variación	de	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Cuadrado medio	F	Sig.
bacterina	Entre grupos		.807	6	.135	.504	.803
	Dentro de grupos		14.693	55	.267		
	Total		15.500	61			
sitio	Entre grupos		.945	6	.157	.596	.732
	Dentro de grupos		14.539	55	.264		
	Total		15.484	61			
fecha de muestreo	Entre grupos		218.718	6	36.453	1.852	.106
	Dentro de grupos		1082.766	55	19.687		
	Total		1301.484	61			

La duración de la inmunidad inducida por los inmunógenos contra Coriza Infecciosa ha sido examinada en varios estudios que demostraron que una dosis única de bacterina conteniendo gel de hidróxido de aluminio brinda protección significativa hasta por nueve meses después de la inyección (Matsumoto y Yamamoto, 1975). Kume *et al.* (1980) pudieron lograr protección significativa hasta 30 semanas después de la inmunización usando dos dosis de una vacuna inactivada conteniendo gel de hidróxido de aluminio. Las bacterinas elaboradas con gel de hidróxido de aluminio también pueden brindar algún grado de protección hasta 56 semanas después de la aplicación (Blackall *et al.*, 1987).

6.4 PRUEBA DE DESAFÍO EN GALLINAS DE POSTURA

6.4.1 TÍTULOS DE ANTICUERPOS CIRCULANTES MEDIANTE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (HI) EN EL PERIODO PRE-DESAFÍO

Antes de realizar el desafío contra *A. paragallinarum*, las gallinas que recibieron la bacterina trivalente exhibieron títulos de anticuerpos circulantes con niveles de protección muy bajos: 13%, 6% y 6% para los serotipos A, B y C respectivamente, con una media geométrica de cinco para los tres serotipos. (Cuadro 9).

Cuadro 9. Títulos de anticuerpos antes del desafío contra los tres serotipos de *A. paragallinarum*, en aves inmunizadas con bacterina trivalente.

Serotipo	Número de muestras	Títulos	Protección (%)
A	2	10	13
	13	<5	0
	Media Geométrica	5	
B	1	5	6
	14	<5	0
	Media Geométrica	5	
C	1	5	0
	14	<5	6
	Media Geométrica	5	

En el muestreo serológico previo al desafío contra *A. paragallinarum*, las gallinas que recibieron la bacterina bivalente no tuvieron anticuerpos detectables contra ninguno de los tres serotipos probados (Cuadro 10)

Cuadro 10. Títulos de anticuerpos antes del desafío contra los tres serotipos de *A. paragallinarum*, en aves inmunizadas con bacterina bivalente.

Serotipo	Número de muestras	Títulos	Protección (%)
A	15	<5	0
B	15	<5	0
C	15	<5	0

Los títulos obtenidos se pueden relacionar con niveles de protección. Aves cuyos sueros presentan niveles de anticuerpos mayores a 5 se consideran protegidas cuando se exponen al desafío ante cepas homólogas (Terzolo 2009).

6.4.2 Títulos de anticuerpos circulantes mediante Inhibición la Hemoaglutinación (HI) a los 7 días post- desafío

Por lo datos obtenidos en el muestreo pre-desafío, se decidió realizar un segundo muestreo a la mitad de la prueba para verificar si se tenía una mejor titulación por parte de los dos grupos de aves.

Para el grupo que recibió la bacterina trivalente, se obtuvo una protección de 100% para el serotipo A con una media geométrica de 33, un 75% de protección para el serotipo B con una media geométrica de 35, y un 100% de protección para el serotipo C con una media geométrica de 61 (Cuadro 11.).

Para el grupo al que se le aplicó la bacterina bivalente, se observó una media geométrica de 15 para el serotipo A, para el serotipo B una media geométrica de 16 y para el serotipo C una media geométrica de 25, con un nivel de protección de 100% para los tres serotipos (Cuadro 12).

Cuadro 11. Títulos de anticuerpos 7 días post- desafío contra los tres serotipos de *A. paragallinarum* , en aves inmunizadas con bacterina trivalente.

Serotipo	Número de muestras	Títulos	Protección (%)
A	1	80	7
	10	40	66
	3	20	20
	1	10	7
	Media Geométrica	33	
B	12	40	60
	3	20	15
	Media Geométrica	35	
C	10	80	66
	4	40	27
	1	20	6
	Media Geométrica	61	

Cuadro 12. Títulos de anticuerpos 7 días post- desafío contra los tres serotipos de *A. paragallinarum* , en aves inmunizadas con bacterina bivalente.

Serotipo	Número de muestras	Títulos	Protección (%)
A	3	40	23
	3	20	23
	6	10	46
	1	5	8
	Media Geométrica	15	
B	9	20	69
	4	10	31
	Media Geométrica	16	
C	1	80	8
	2	40	15
	10	20	77
	Media Geométrica	25	

Al comparar los títulos de anticuerpos encontrados antes de la prueba de desafío, con los del muestreo realizado siete días post- desafío, se aprecia que se incrementan con el tiempo. También se puede observar que el grupo que recibió la bacterina trivalente presentó mayores títulos de anticuerpos circulantes en sangre contra *A. paragallinarum* en los dos muestreos que los animales que se inocularon con la bacterina bivalente (Figura 3).

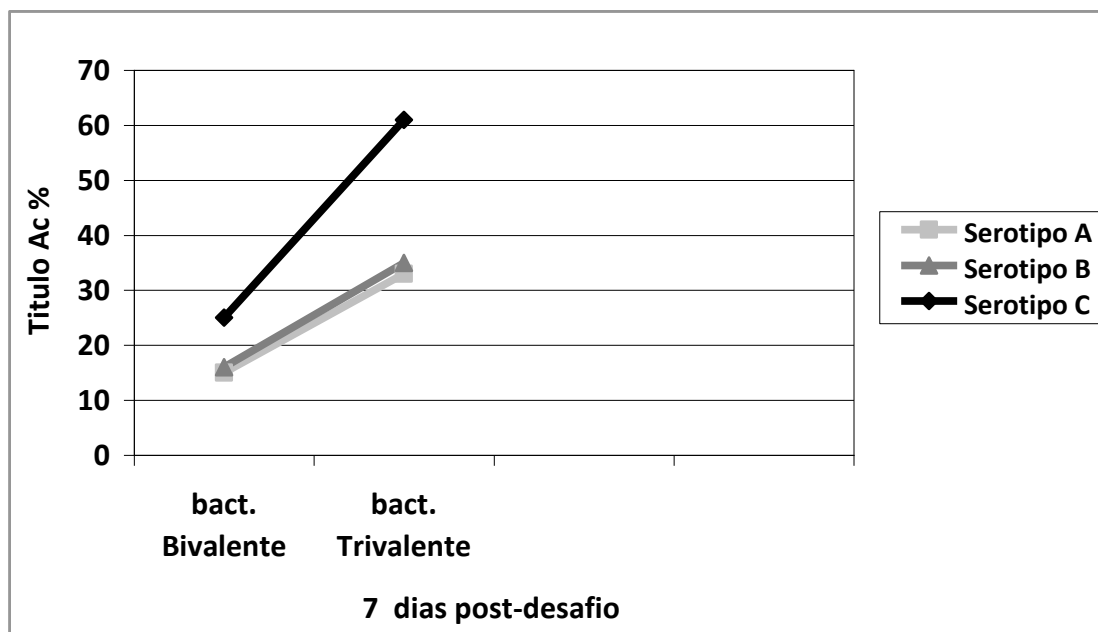


Figura 3. Títulos de anticuerpos contra *A. paragallinarum* a los 7 días post- desafío en aves tratadas con bacterina bivalente o trivalente,

6.4.3 Título de anticuerpos circulantes mediante Inhibición la Hemoaglutinación (HI), a los 14 días post- desafío

Antes del sacrificio de las aves, se realizó un último muestreo serológico 14 días después de hacer el desafío. En el grupo tratado con la bacterina trivalente, se observó una media geométrica en los títulos de anticuerpos de 40 para el serotipo A, y de 48 para los serotipos B y C. Los títulos obtenidos en las aves que se inyectaron con la bacterina bivalente tuvieron una media geométrica de 28 para el serotipo A, 28 para el serotipo B y 38 para el serotipo C. Las aves que recibieron la bacterina

bivalente presentaron títulos de anticuerpos mas bajos en comparación con el grupo que se inoculó con la bacterina trivalente (Cuadro 13)(Figura 4).

Cuadro 13. Títulos de anticuerpos contra los tres serotipos *A. paragallinarum* obtenidos 14 días post-desafío de aves inmunizadas con bacterina bivalente o trivalente.

	Bacterina Tivalente		Bacterina Bivalente	
	N° muestras	Títulos	N° muestras	Títulos
Serotipo A	4	80	2	80
	7	40	3	40
	4	20	8	20
Serotipo B	5	80	6	40
	9	40	7	20
	1	20		
Serotipo C	1	160	4	80
	5	80	4	40
	6	40	5	20
	3	20		

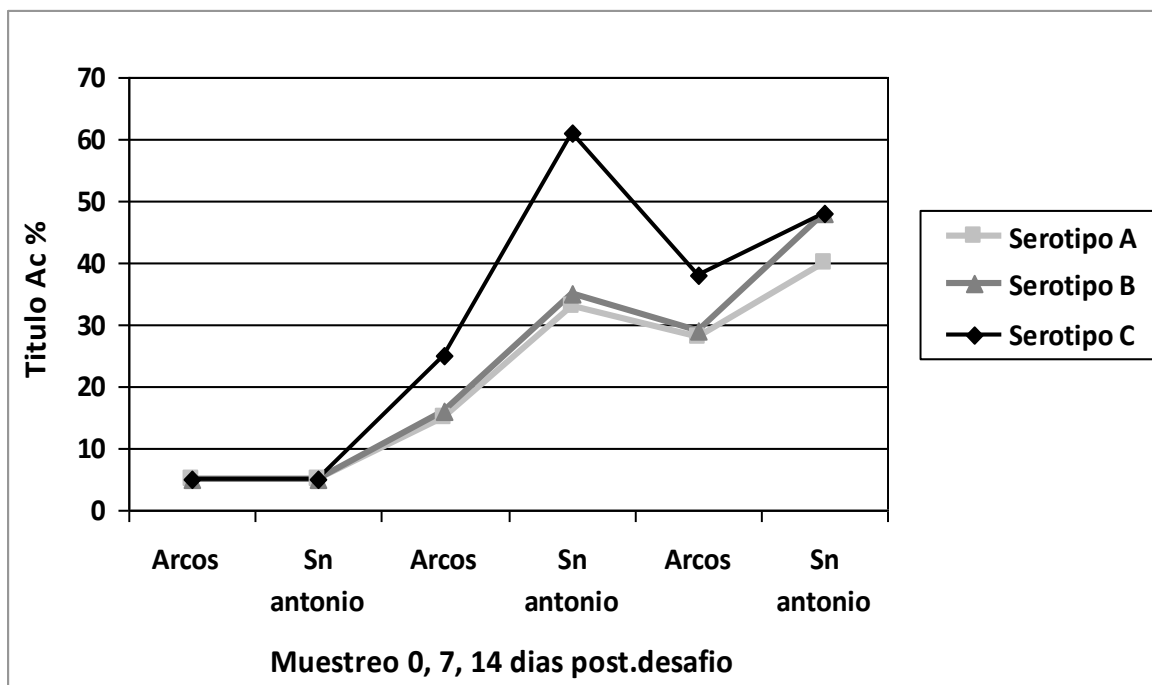


Figura 4. Títulos de anticuerpos contra *A. paragallinarum* obtenidos a los 0, 7 y 14 días post- desafío en aves tratadas con bacterina bivalente o trivalente,

Los títulos circulantes de anticuerpos mediante inhibición de la hemaglutinación durante el desafío de las aves bacterinizadas de forma bivalente (Sitio Arcos 1) muestra que antes del desafío, se presentaron títulos de anticuerpos menores a cinco, y que conforme pasaron los días, el título de anticuerpos empezó a elevarse. Para el grupo de aves tratado con la bacterina trivalente (Sitio San Antonio 3), al inicio se mostraron títulos menores de cinco, que se elevaron en los muestreos posteriores. (Figura 4).

6.4.4 Signos clínicos

En el grupo que recibió la bacterina trivalente se observó que todas las aves que se desafiaron con los serotipos A y C permanecieron sanas sin presentar signos clínicos de Coriza Infecciosa. Sin embargo, para las gallinas que se desafiaron con el serotipo B, el ave 2 presentó una ligera inflamación de los senos infraorbitarios a los 7 y 8 días, de igual modo, el ave 4 presentó una inflamación severa y exudado nasal a partir del segundo día hasta el final de la prueba. El resto de las aves no presentaron signos clínicos (Cuadro 14).

Para el grupo que se trató con la bacterina bivalente, todas las aves expuestas al serotipo C permanecieron sanas sin presentar signos clínicos sugestivos de Coriza Infecciosa. En cambio, entre las gallinas desafiadas con el serotipo A, el ave 2 presentó inflamación ligera y presencia de moco durante los días 5 a 9, pero el resto de las aves no presentaron signos clínicos. En el subgrupo desafiado con el serotipo B, las aves 2, 3 y 5 presentaron exudado nasal, inflamación facial ligera y ojos llorosos a partir del quinto día; al final de la prueba solo un ave permaneció con inflamación facial ligera y dos aves con presencia de moco (Cuadro 15).

Cuadro 14. Resultados de signos clínicos y aislamiento bacteriológico de aves del grupo tratado con bacterina trivalente, observadas durante 14 días post-desafío

Ave	Días														Aislamiento
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Serotipo A															
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
6c*	0	0	0	0	1,2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	positivo
7c*	0	0	0	0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1	1	1	1	positivo
8c*	0	0	0	0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1	1	1	1	positivo
9c*	0	0	0	0	1,2	1,2	4	4	4	4	3	3	3	3	positivo
10c*	0	0	0	0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1	1	1	1	positivo
Serotipo B															
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
2	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	negativo
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
4	0	4	4	4	4	3	3	3	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	positivo
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
6c*	0	0	1	1	1	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1	1	1	1	positivo
7c*	0	0	1	1	4	4	4	4	4	4	4	1,2	1,2	1,2	positivo
8c*	0	1	1	1,2	1,2	12	3	3	1,2	1,2	1,2	1	1	1	positivo
9c*	0	1	1	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	positivo
10c*	0	1	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	3	3	3	1,2	1,2	1,2	positivo
Serotipo C															
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
6c*	0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	positivo
7c*	0	1,2	1,2	1,2	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	positivo
8c*	0	2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	positivo
9c*	0	1	1	1	1	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	positivo
10c*	0	1,2	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	positivo

Escala de valores de signos clínicos de Coriza Infecciosa; 0 sin signos clínicos, 1 exudado nasal, 2 inflamación ligera, 3 exudado nasal e inflamación moderada, exudado nasal+ inflamación severa.

*c aves control (SPF).

Cuadro 15. Resultados de signos clínicos y aislamiento bacteriológico de aves tratadas con bacterina bivalente, observadas durante 14 días post-desafío

Ave	Días														Aislamiento
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
	Serotipo A														
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
2	0	0	0	0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	0	0	0	0	0	positivo
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
6c*	0	0	0	0	1,2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	positivo
7c*	0	0	0	0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1	1	1	1	positivo
8c*	0	0	0	0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1	1	1	1	positivo
9c*	0	0	0	0	1,2	1,2	4	4	4	4	3	3	3	3	positivo
10c*	0	0	0	0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1	1	1	1	positivo
	Serotipo B														
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
2	0	0	0	0	1	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	2	2	positivo
3	0	0	0	0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	2	2	positivo
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
5	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	positivo
6c*	0	0	1	1	1	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1	1	1	1	positivo
7c*	0	0	1	1	4	4	4	4	4	4	4	1,2	1,2	1,2	positivo
8c*	0	1	1	1,2	1,2	12	3	3	1,2	1,2	1,2	1	1	1	positivo
9c*	0	1	1	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	positivo
10c*	0	1	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	3	3	3	1,2	1,2	1,2	positivo
	Serotipo C														
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo
6c*	0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	positivo
7c*	0	1,2	1,2	1,2	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	positivo
8c*	0	2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	positivo
9c*	0	1	1	1	1	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	positivo
10c*	0	1,2	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	positivo

Escala de valores de signos clínicos de Coriza Infecciosa; 0 sin signos clínicos, 1 exudado nasal, 2 inflamación ligera, 3 exudado nasal e inflamación moderada, exudado nasal+ inflamación severa.

*c aves control (SPF).

6.5 AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO

En todas las aves SPF, se encontró la presencia de moco y grados variables de inflamación. En los subgrupos tratados con bacterina trivalente, el aislamiento de *Avibacterium paragallinarum* fue positivo solo para un ave del serotipo B. En los subgrupos tratados con bacterina bivalente, el aislamiento de *Avibacterium paragallinarum* fue positivo, encontrándose un ave para el serotipo A, tres aves para el serotipo B y siendo negativo el aislamiento en el serotipo C. En las aves SPF se recuperó *Avibacterium paragallinarum* en animales de ambos tratamientos (Cuadro 14 y 15)

Los resultados de la prueba de desafío fueron expresados en porcentaje de aves que no mostraron signos de Coriza Infecciosa durante la prueba. Así, para el tratamiento del grupo que recibió la bacterina trivalente, la prueba se consideró satisfactoria para los tres serotipos (A, B y C) de *Avibacterium paragallinarum*, los cuales ofrecieron una protección de 100% para el serotipo A, de 80% para el serotipo B y de 100% para el serotipo C (Figura 5).

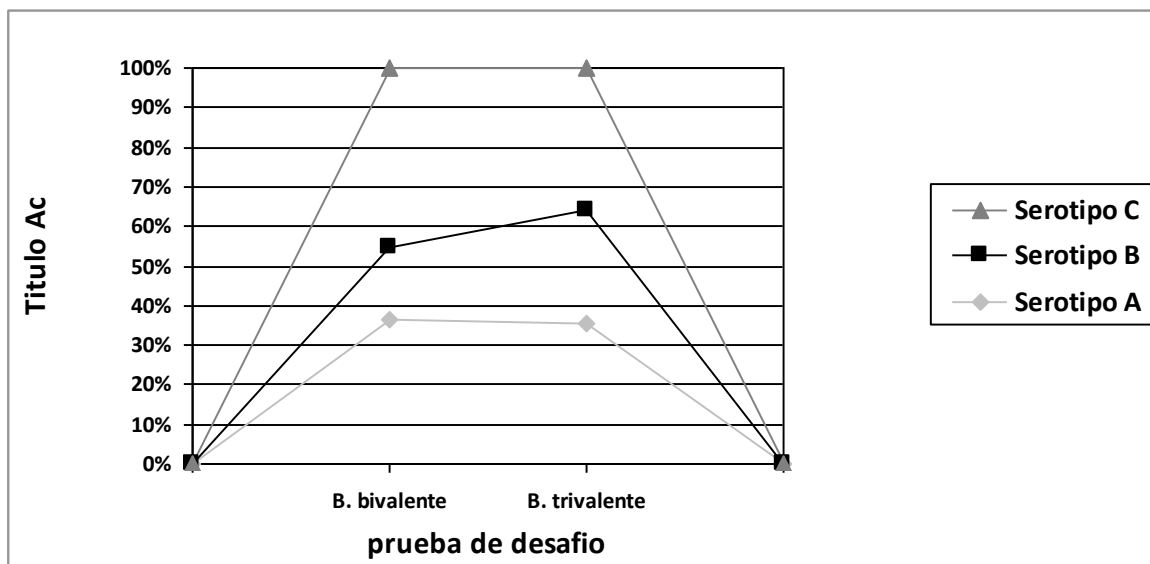


Figura 5. Protección comparativa de una bacterina bivalente y otra trivalente contra *Avibacterium paragallinarum* después de la prueba de desafío y del aislamiento bacteriológico.

Para el tratamiento del grupo que recibió la bacterina bivalente, la prueba se considera satisfactoria solo para los serotipos A y C, los cuales ofrecieron una protección igual o superior a 80%, pero no para el serotipo B, que solo logró un 40 % de protección (Figura 6). Estos resultados contrastan con los descritos por Soriano *et al.* (2001) quienes después de inmunizar gallinas con un producto bivalente y de hacer pruebas de desafío, observaron que se logró un 40 % de protección contra el serotipo A y una media de anticuerpos circulantes bajos. No obstante, para el serotipo B, se lograron buenos títulos circulantes y protección contra el desafío.

La literatura muestra información contradictoria. Por un lado, Jacobs *et al.* (1992). no encontraron protección cruzada en aves bacterinizadas con un producto bivalente y desafiadas con el serotipo B. Por el contrario, Kume *et al.* (1983) hallaron que aves inmunizadas con los serotipos A y C estuvieron protegidas al desafío con cepas del serotipo B.

Ante este panorama, Sandoval y Terzolo (1997). estudiaron diferentes cepas regionales de la serovariedad A, B y C de Argentina, mediante el desarrollo de modelos de reproducción de la enfermedad para evaluar su patogenicidad e invasividad, y fueron capaces de demostrar que las cepas B fueron consistentemente patógenas y causaron lesiones de coriza muy aguda, con un alto grado de contagio e invasividad. Por su parte, Soriano *et al.* (2004) evaluaron la protección cruzada en aves inmunizadas y desafiadas con las cepas de referencia de *Avibacterium paragallinarum* en el esquema de Blackall. Los resultados obtenidos en este trabajo confirmaron que las tres serotipos son diferentes. Sin embargo, se observó cierta protección cruzada entre los tres serotipos. En conclusión, hasta la fecha existían discrepancias en cuanto a la protección conferida por bacterinas bivalentes contra aislamientos del serotipo B. (Soriano *et al.* 2004). No obstante, Fernández *et al.* (2003) enfatizan la necesidad de usar bacterinas trivalentes en todas las áreas donde se han diagnosticado cepas regionales del serotipos B. Así, Soriano *et al.* 2004 en un estudio en México en el que emplearon cepas de referencia, informaron que una

bacterina bivalente fue incapaz de conferir protección en aves desafiadas con un aislamiento serovariedad B-1.

6.6 MONITOREO PRODUCTIVO

Los indicadores productivos pueden ser una referencia del impacto que tenga una enfermedad presente en la granja, aunque siempre deben considerarse otros posibles factores de manejo o problemas de salud concurrentes.

Como parte complementaria de este estudio, se registraron semanalmente algunos indicadores productivos en ambos grupos tratados. Ambos grupos experimentales tuvieron un desempeño productivo comparable, si bien mostraron una baja en su postura de la semana 26 en adelante como resultado de la presencia de un brote de Enfermedad de Newcastle (Cuadro 16).

Cuadro 16. Parámetros de producción de la semana 20 a la 29, obtenidos de aves vacunadas utilizando una bacterina trivalente contra *A. paragallinarum*.

Semana	% muertas	% postura	peso/sem, kg	consumo (gr/d)
20	.15	13.92	1.353	75
21	.44	41.54	1.444	80
22	.47	69.52	1.483	80
23	.33	82.77	1.470	80
24	.26	92.23	1.481	85
25	.21	92.91	1.488	95
26	.22	88.35	1.495	95
27	.21	85.12	1.483	95
28	.19	83.41	1.495	95
29	.13	84.03	1.496	95

En el grupo tratado con la bacterina bivalente se apreció un incremento en el porcentaje de mortalidad en la semana 29 lo que se atribuyó a estrés calórico y la presencia de un incremento en el número de aves prolapsados (Cuadro 17). No obstante lo anterior, se encontró diferencia estadística ($p < 0.05$) entre los dos grupos para las variables muertas por día y consumo (Cuadro 18).

Cuadro 17. Parámetros de producción de la semana 20 a la 29, obtenidos de aves vacunadas utilizando una bacterina bivalente contra *A. paragallinarum*.

Semana	% muertas	% postura	peso/sem (kg)	consumo (gr/d)
20	.45	14.16	1.294	71
21	.13	38.13	1.391	60
22	.18	65.34	1.469	88
23	.14	85.5	1.475	88
24	.10	91.22	1.479	94
25	.10	91.55	1.485	91
26	.11	88.39	1.489	90
27	.13	87.3	1.492	85
28	.11	88.45	1.509	85
29	.70	88.7	1.500	85

Cuadro 18. Prueba de t para grupos tratados con bacterina bivalente y trivalente contra *A. paragallinarum*.

Variable	Supuestos de varianza	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
muertas por día	Varianzas asumidas iguales	26.046	.000	8.096	141	.000
	Varianzas asumidas iguales no			8.287	103.042	.000
% postura diario	Varianzas asumidas iguales	.672	.414	.134	141	.893
	Varianzas asumidas iguales no			.134	138.799	.894
peso	Varianzas asumidas iguales	19.736	.000	1.950	141	.053
	Varianzas asumidas iguales no			1.922	114.631	.057
consumo	Varianzas asumidas iguales	9.332	.003	4.241	141	.000
	Varianzas asumidas iguales no			4.200	126.250	.000

7. CONCLUSIONES

7.1 Los títulos de anticuerpos contra Coriza Infecciosa mediante inhibición de la hemaglutinación antes del desafío fueron inferiores a 1:5 en su mayoría, y por tanto considerados negativos.

7.2 En ambos grupos de aves, tratadas con bacterina bivalente o trivalente, se notó un incremento de anticuerpos a partir de siete días post-desafío .

7.3 Al desafío, el grupo tratado con bacterina bivalente mostró mayor cantidad de signos clínicos sugestivos de Coriza Infecciosa con respecto al grupo tratado con bacterina trivalente.

7.4 Al sacrificio de las aves desafiadas, hubo una mayor cantidad de aislamientos de *Avibacterium paragallinarum* en aves del grupo tratado con bacterina bivalente, presentando tres aves positiva para el serotipo B y un ave positiva para el serotipo A con respecto al grupo tratado con bacterina trivalente que solo presento un ave positiva para el serotipo B de *Avibacterium paragallinarum*.

7.5 El grupo tratado con bacterina bivalente mostró una pobre protección contra el serotipo B (40%), mientras que para el serotipo A (80%) y para el serotipo C (100%) protección contra los signos de Coriza Infecciosa.

7.6 La bacterina trivalente exhibió mejor protección para el serotipo B (80%) mientras que los serotipos A y C mostraron un (100%) de protección contra los signos de Coriza Infecciosa, que la bacterina bivalente.

REFERENCIAS

- Alfonso PFA, Acevedo RB. 2009. Análisis de algunos aspectos económicos en la avicultura productora de carne de pollo. Ganadería y Seguridad alimentaria en Tiempo de crisis. Universidad Autónoma de Chapingo. México, D.F.
- Blackall P J., Christensen H, Beckenham T, Blackall L. L. Bisgaard M. 2005 Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 55, 353-362
- Blackall J, Matsumoto M. 2003. Infectious Coryza. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR. Diseases of Poultry, Ames; Iowa State Press.
- Blackall PJ. 1999. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. Clin Microbiol Rev 12:627-632.
- Blackall PJ 1989. The avian haemofili. Clin Microbiol Rev: 2: 270-277.
- Blackall PJ. 1995. Vaccines against infectious coryza. World's Poultry Sci. J. 51:17-26.
- Blackall PJ, Reid DG 1987. Further efficacy studies on inactivated, aluminum-hydroxide-adsorbed vaccines against infectious coriza. Avian Diseases 31: 527-532.
- Blackall PJ, Eaves LE, Rogers DG. 1990 Proposal of a new serovar and altered nomenclatura for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. J Clin Microbiol. 28:1185-1187.
- Blackall PJ, Silva EN; Yamaguchi T, Iritani Y. 1994 Characterization of isolates of avian haemophilii from Barzil. Avian Dis 38:269-274.
- Blackall PJ, Terzolo H.R. 1995. Coriza Infecciosa: revisión de métodos de diagnóstico y vacunas. Rev. Argent. Microbiol. 27: 156- 174.
- Blackall PJ, Zheng Z, Takagi M, Terzolo HR, Sandoval VE, Silva EN. 1994. Characterization of two monoclonal antibodies directed against serovar A *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis. 38: 361-365.
- Bell D, Ortiz F, Cutler G. 1995. The dynamics of an infectious coryza outbreak. Proceedings of 44th Western Poultry Diseases Conference; 1995 March 5-7; Sacramento (California) USA. University of California, 98-99.
- Biberstein EL 1969, White DC. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. J Med Microbiol; 2:75-78

Davila EG. s/f Vacunas e inmunidad contra coriza infecciosa. Revisión bibliográfica., Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Fernández RP, Soriano VE, Longinos GM, Navarrete GP.2000. *In vivo* adherence neutralization of *Haemophilus paragallinarum* to chicken tracheal epithelial cells by hemagglutination-inhibition antibodies. Proceedings of 49th Western Poultry Disease Conference; 2000; Sacramento USA. California; 52

Garcia FA, Blackall PJ Angulo E 2002. Presencia de *Haemophilus paragallinarum* NAD independiente en México. Memorias de la XXVII Convención Anual ANECA 51st Western Poultry Disease Conference; 2002 mayo 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC: 59

Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal.2005. Enciclopedia de los municipios, Estado de Puebla, Tehuacan. Disponible en: http://www.e-local.gob.mx/wb/ELOCALNew/enciclo_pue [consultado el 20 de julio de 2010].

Jacobs AAC.Cuenen W, Storm Pk.1992. Efficacy of a trivalent *Haemophilus paragallinarum* vaccine compared to bivalent vaccines. *Vet Microbiol*, 32:43-49

Jacques M, Paradis SE. 1998. Adhesin-receptor interactions in Pasteurellaceae. *FEMS Microbiol Rev* 22:45-59

Kilian M, Biberstein EL 1984. *Haemophilus* In: Krieg NR, Holt JC, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, Maryland. Williams, 568-569

Kume K, Sawata A, Nakase Y. 1980. Immunologic relationship between Page's and Sawata strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Am J Vet Res* 41:757-760

Kume K, Sawata A, Nakai T, Matsumoto M. 1983. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J Clin Microbiol* 17: 958-964.

Kume K, Sawata A. 1990. Factors of *Haemophilus paragallinarum* for infection and protection in chicken. Proceedings of 30th Western Poultry Disease Conference;1990 march 4-6; Sacramento (California) USA: University of California; 53-60

Laboratorios Sanfer 2005. Corisan, características del producto. Sanfer. Laboratorios.

Matsumoto M, Yamamoto R, 1975. Protective quality of an aluminum hydroxide-absorbed broth bacterin against infectious coriza. *Am J. Vet. Res.* 36: 576-582.

McGuaghey CA 1932. Organisms of the *B. influenzae* group in fows. *J Comp Pathol*; 45: 58-66

North MO, Bell DD. 1993. Manual de producción avícola. 3ª ed. El Manual Moderno, México.

Page LA 1962. *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. Am J Vet Res: 23: 85-95.

Rinler RB, Davis RB, Page RK. 1977. Infectious coryza : cross protection studies, using seven strains of *Haemophilus gallinarum*. Am. J. Vet. Res. 38:1587 – 1589.

Reid GG, Blackall PJ. 1987 Comparison of adjuvants for an inactivated infectious coryza vaccine. Avian Dis. 31(1):59-63

Sandoval VE, Terzolo HR. 1997. Coriza Infecciosa. Segunda parte; reproducción experimental y patogenicidad de las bacterinas. Avicult Profes. 15:29-32

Sawata A. Kume K, Nakase Y. 1980. Biologic and serologic relationship between Page And Sawata serotypes of *Haemophilus paragallinarum*. Am J Vet Ret 41: 1901-1904.

Soriano VE, Terzolo HR. 2004. *Haemophilus paragallinarum*: Etiología de la Coriza Infecciosa. Veterinaria México. 35: 245-259.

Soriano E, Terzolo H. 2004. Epizootiología, prevención y control de la Coriza Infecciosa. Veterinaria Mexico 35: 261-279.

Soriano VE, Tellez G, Fernandez RP. 2002. Proposal of the Blackall sheme for hemagglutinin serotyping of *Haemophilus paragallinarum*. Poultry Sci. 80(Suppl.1):86

Soriano VE, Fernandez RP, Garcia DG, Ochoa GP. 2001. Evaluación de dos protocolos de bacterinización de gallina de postura, mediante detección de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y protección ante un desafío. Veterinaria México. 32: 145-148

Takagi M, Ohmae K, Hirayama N, Ohta S. 1991. Expression of hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* serotype A in *Escherichia coli*. J. Vet Med Sci. 53: 917-920.

Terry TD, Zalucki YM, Walsh SL, Blackall PJ, Jennings MP. 2003 Genetic analysis of a plasmid encoding haemocin production in *Haemophilus paragallinarum*. Microbiology.;149(11):3177-3184.

Terzolo HR. 2009. Revisión sobre Coriza Infecciosa: propuestas de investigación para su diagnostico y control. Rev Med Vet. 81:262-269.

.Thornton AM, Blackall PJ.1984. Serological classification of Australian isolates of *Haemophilus paragallinarum* Aust Vet J.;61(8):251-253

UNA. 2010. Indicadores económicos: estados productores de pollo. Unión Nacional de Avicultores. México. Disponible en: http://www.una.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=71&Itemid=94 [consultado el 20 de julio de 2010]