

Estudio serológico de la bronquitis infecciosa con el virus SIN6/YUC/MEX/96 en aves de traspatio en 30 comunidades de Yucatán, México

Infectious bronchitis serological survey using SIN6/YUC/MEX/96 virus in backyard chickens from 30 communities in the State of Yucatan in Mexico

Edwin J. Gutiérrez Ruiz*
Genny T. Ramírez Cruz*
Elsie I. Cámara Gamboa*

Abstract

Infectious bronchitis (IB) is considered one of the most important causes of economical loss producing high mortality, reduced growth rates in chicks, and lesions to the oviduct of laying hens impairing egg production. One thousand and seventy six chickens were randomly selected, and sampled from 30 communities in four regions of the State of Yucatan in Mexico. Serum samples were run using the haemagglutination inhibition test. Sera with titres equal or higher than 2^5 (1/32) were considered positive. Seroprevalence was calculated by dividing the number of positive sera by the total number of samples. Seroprevalence was 74.9% (CI 95%, 68.9%-80%). Nine communities (Tixmeuac, Sotuta, Chan San Antonio, Xbec, Dzoyaxche, Cuzama, Ruinas de Ake, Xtepen and Yobain) had seroprevalences above 90%. Only four communities (Macmay-Catmis, Kanxoc, Espita and Baca) had seroprevalences of 50% or below. Seroprevalence with the IB SIN6/YUC/MEX/96 virus was higher than the seroprevalence previously reported with the M41 strain in the State of Yucatan in Mexico, indicating that the virus SIN6/YUC/MEX/96 is present and well distributed in the studied communities. However, in those regions where seroprevalence was similar with both viruses used as an antigen, or was higher with the M41 strain, it is probable that the presence of a different IB virus or a combination of different types induced cross reaction.

Key words: INFECTIOUS BRONCHITIS, SEROPREVALENCE, CHICKENS, BACKYARD.

Resumen

La bronquitis infecciosa (BI) constituye una de las principales causas de pérdidas económicas, pues ocasiona alta mortalidad, retardo en el crecimiento en animales jóvenes y daños en el oviducto de animales adultos, esto último resulta en una disminución en la producción de huevo. Se muestrearon al azar 1 076 aves provenientes de 30 poblados ubicados en cuatro regiones diferentes del estado. Las muestras de suero se sometieron a la prueba de inhibición de la hemaglutinación. Se tomaron como positivos los sueros que presentaron títulos iguales o mayores a 2^5 (1/32). El antígeno se tituló mediante la prueba de hemaglutinación (HA). La seroprevalencia se determinó dividiendo el número total de muestras positivas entre el número total de muestras. La seroprevalencia encontrada fue de 74.9% (95%

Recibido el 18 de septiembre de 2001 y aceptado el 26 de noviembre de 2001.

* Departamento de Virología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, E-mail: gruiz@tunku.uady.mx

IC 68.9%-80%). Nueve comunidades tuvieron seroprevalencias de 90% o más (Tixmeuc, Sotuta, Chan San Antonio, Xbec, Dzoyaxche, Cuzama, Ruinas de Ake, Xtepen y Yobain) y solamente cuatro presentaron seroprevalencias menores o iguales a 50% (Macmay-Catmis, Kanxoc, Espita y Baca). La seroprevalencia con el virus SIN6/YUC/MEX/96 fue alta y superior a la seroprevalencia descrita previamente con la cepa M41 en Yucatán, México, lo que demuestra que el virus SIN6/YUC/MEX/96 se encuentra bien distribuido en las comunidades estudiadas; sin embargo, en regiones donde la seroprevalencia permaneció igual con los dos tipos de antígeno o mayor con M41, es probable que la presencia de alguna cepa diferente o una combinación de tipos hayan producido respuesta cruzada.

Palabras clave: BRONQUITIS INFECCIOSA, SEROPREVALENCIA, POLLOS, TRASPATIO.

Introduction

Poultry production in Mexico is one of the most important activities in the agricultural sector characterized by both high integration and investment in recent years. It is also important to consider that there is an important population of backyard chickens, which plays an important role in the economy and cultural customs of people from rural areas of the State of Yucatan in Mexico. There are approximately 86 870 backyard chickens in Yucatan,¹ and their sanitary conditions are very different from those kept in intensive poultry. Very little is known about their situation.

Infectious bronchitis (IB) is a very contagious viral disease in chickens characterized by tracheal rales, coughing and sneezing. Chicks die with respiratory or renal signs of infection.^{2,3} This disease is one of the most important causes of economical loss, causing high mortality, poor growth rate in young birds and damage to the oviduct in adult birds, resulting in diminished egg production, egg quality and egg size.⁴

In a previous seroprevalence survey conducted in 30 towns in the State of Yucatan, using the haemagglutination inhibition test (HI) for infectious bronchitis virus, a prevalence of 56.5% (CI 95%, 50%-63%) was reported with the Massachusetts 41 strain (M41) as an antigen.⁵

A local strain of IB was isolated and characterized as a variant virus when compared to 12 reference types. Considering this finding, the objective of the present study was to determine seroprevalence of the infectious bronchitis virus using the new SIN6/YUC/MEX/96 variant as the antigen in sera from backyard chickens from the State of Yucatan, Mexico.⁶

Materials and methods

Sample size and distribution

The samples used in this study were those used in a previous study in which the antigen was prepared using the M41 reference strain.⁵ The sample size was calculated following the cluster method.^{7,8}

Introducción

En el ámbito nacional la avicultura representa uno de los sectores más dinámicos de la ganadería, pues se caracteriza por un mayor grado de integración que otros sectores; esta última es favorecida por la inversión creciente de los últimos años. Es prudente mencionar que también existe una importante población de aves de traspatio, las cuales son parte de la economía y cultura de la población de las zonas rurales del estado de Yucatán, México. Existen aproximadamente 86 870 aves de traspatio¹ que se encuentran en condiciones epidemiológicas de salud muy distintas, comparadas con las de granjas avícolas y poco se sabe acerca de su situación.

La bronquitis infecciosa (BI) constituye una enfermedad viral de los pollos, muy contagiosa, que se caracteriza por estertores traqueales, tos y estornudos. Los pollos jóvenes mueren a causa de manifestaciones respiratorias o renales de la infección.^{2,3} La presencia de esta enfermedad se encuentra entre las principales causas de importantes pérdidas económicas, ya que ocasiona alta mortalidad, retardo de crecimiento en animales jóvenes y daños en el oviducto en animales adultos, que resultan en una disminución en la producción de huevos, afectando su calidad y tamaño.⁴

En un estudio de seroprevalencia en 30 pueblos del estado de Yucatán, México, usando las pruebas de inhibición de la hemaglutinación para el virus de la bronquitis infecciosa (VBI), se encontró seroprevalencia de 56.5% (IC 95%, 50%-63%) con la cepa Massachusetts 41 como antígeno (M41).⁵

Una cepa local fue aislada, ésta es diferente a los 12 serotipos de referencia que se han estudiado. Como consecuencia de lo anterior, el objetivo de este trabajo es determinar la seroprevalencia de la BI usando el virus SIN6/YUC/MEX/96 como antígeno en sueros de aves de traspatio del estado de Yucatán.⁶

IB is a very contagious disease, and therefore, in order to obtain a similar precision to that of random sampling, where 384 samples would be required using an expected prevalence of 50%, a precision of 5%, and a confidence level of 95%, it was necessary to increase the sample size three times resulting in 1 152 sera. From these sera, 1 076 were obtained and selected at random from 30 towns from the State of Yucatan using random numbers.⁹

The State of Yucatan was divided into four regions (Centre, South, East and South-East), and clusters were selected within each region using a proportional stratification; for this purpose a percentage of the clusters was taken from each region depending on the percentage of towns in that region.

Chicken owners provided information stating that none of the birds had been vaccinated against any disease.

Sampling procedure

Blood samples (2-3 ml) were obtained from the brachial vein of chickens using a 3 ml syringe, and a 23 gauge needle. Sterile 5 ml test tubes containing the blood samples were placed in an horizontal position for two hours at approximately 37°C. Samples were kept at 4°C for transportation to the laboratory where the serum was extracted and stored at -20°C.

Haemagglutination inhibition (HI) test procedure

Samples were tested using the HI test¹⁰ in the virology laboratory of the College of Veterinary Medicine at the Universidad Autonoma de Yucatan. The antigen was diluted to contain 4-8 haemagglutinating units (HAU). Titrers were expressed as \log_2 of the reciprocal of the highest dilution of serum with 100% inhibition with at least 4 HAU. Equal titrers or those higher than $5 \log_2$ (1/32) were considered positive.

SIN6/YUC/MEX/96 antigen preparation

Twenty 11-day-old specific pathogen free (SPF) embryonated hen eggs were inoculated with IBV SIN6/YUC/MEX/96 via the corioallantoic cavity with 0.1 ml of a 10^{-2} dilution of seed virus in phosphate buffer saline (PBS) containing antibiotics. Embryonated eggs were incubated at 37°C for 36 hours, and then chilled (+4°C) for six hours. Allantoic and amniotic fluids were harvested. The virus was pelleted by centrifuging the fluids for 60 minutes at +4°C at 1 7000 g. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in neuraminidase (*Clostridium perfringens* type E culture filtrate), produced by the Central Veteri-

Material y métodos

Tamaño de muestra y distribución

Las muestras utilizadas en este estudio fueron las mismas que se utilizaron en un estudio previo en el que se empleó antígeno preparado a partir de la cepa de referencia M41.⁵ Las aves que se utilizaron en este estudio no estaban vacunadas contra BI.

El tamaño de muestra se determinó siguiendo el método de muestreo por conglomerados.^{7,8}

La BI es una enfermedad muy contagiosa, para obtener una precisión similar al muestreo al azar (para el cual se necesitarían 384 muestras usando 50% de prevalencia esperada, 5% de precisión y un nivel de confianza del 95%) se necesitó incrementar el tamaño de muestra tres veces, ello resultó en 1 152 sueros; de éstos se obtuvieron 1 076, que provenían de 30 pueblos del estado de Yucatán, seleccionados al azar.⁹ Los conglomerados se seleccionaron al azar mediante el uso de números al azar.

El estado de Yucatán se dividió en cuatro regiones (Centro, Sur, Este y Sureste) y los conglomerados se seleccionaron en cada región, usando una estratificación proporcional; con ese propósito se tomó un porcentaje de muestras de acuerdo con el porcentaje de comunidades de cada zona.

Las aves muestreadas, según información de los propietarios, no habían sido vacunadas contra alguna enfermedad.

Procedimiento utilizado para la obtención de muestras

Las muestras de sangre (2-3 ml) se obtuvieron de la vena braquial de las gallinas utilizando una jeringa de 3 ml y una aguja de calibre 23. La sangre se depositó en un tubo de vidrio estéril de 5 ml y se dejó horizontalmente durante dos horas aproximadamente a 37°C, colocándose después a 4°C verticalmente. El suero se colectó y almacenó a -20°C.

Procedimiento utilizado para la prueba de inhibición de la hemaglutinación

Las muestras se examinaron mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH)¹⁰ en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Autónoma de Yucatán. El antígeno se diluyó para contener 4-8 unidades hemaglutinantes (UHA). El título se expresó como \log_2 del recíproco de la dilución del suero que tenía 100% de inhibición con al menos 4 UHA. Títulos iguales o mayores a $5 \log_2$ (1/32) se consideraron como positivos.

nary Laboratory (CVL) in Weybridge, to a hundredth the original volume; suspensions were incubated for two hours at 37°C.

Titration of the antigen was carried out by the haemagglutination (HA) test.¹¹ The end-point was considered to be the last well with a complete agglutination (100%) of the erythrocytes which represented one haemagglutinating unit.

Prevalence calculation

Prevalence was calculated by dividing the number of positive samples into the total number of samples tested.⁷ Confidence intervals ($p \pm 2S$) were calculated using the following formulae:⁷

$$S = [c/\Sigma Xi] \sqrt{\{[\Sigma Yi^2 - 2p\Sigma XiYi + p^2\Sigma Yi^2] / [c(c-1)]\}}$$

Where:

c = total number of clusters.

Xi = number of samples from each cluster.

Yi = number of positive samples from each cluster.

Design effect (D), and intraclass correlation coefficient (r) were determined using the following formulae:^{7,8}

$$D = SE^2(\text{cluster sampling}) / SE^2(\text{random sampling}) \\ r = (D-1) / (n-1)$$

Results

Seroprevalence in backyard chickens from the State of Yucatan in Mexico, using the HI test with the viral antigen SIN6/YUC/MEX/96, was 74.9% (95% CI 68.9%-80.9%) (806 positive out of 1076 tested sera). The design effect was 5.03, and the intraclass correlation coefficient was 0.14.

Nine towns presented seroprevalences above 90.0% (Ruinas de Ake, 96.4%; Dzoyaxche, 96.0%; Xbec, 95.1%; Chan San Antonio, 94.7%; Cuzama, 92.1%; Tixmeucac, 92.0% and Sotuta, 90.0%), only three towns had seroprevalences below or equal to 50% (MacMay/Catmis, 30.7%; Baca, 46.3%; Kanxoc, 47.6% and Espita, 50%). Seroprevalences for each town are presented in Table 1. Titers of positive sera ranged from 5 to 12 log₂.

Discussion

Information about prevalence and economic impact of diseases in backyard chickens is scarce. In developing countries, Newcastle disease is considered the most important cause of economical loss in the backyard system, but in the state of Yucatan in Mexico a serological survey determined that it is of little importance when compared to IB.⁵

Preparación de antígeno de SIN6/YUC/MEX/96

Se inocularon por la vía corio-alantoidea 20 huevos embrionados libres de patógenos específicos (LPE) de 11 días de edad, con 0.1 ml de semilla del virus SIN6/YUC/MEX/96 diluida 10⁻² en solución amortiguadora de fosfatos salinos (PBS con antibióticos). Los huevos se incubaron a 37°C durante 36 horas y se enfriaron a 4°C, durante seis horas. Los fluidos amnióticos y alantoideos se cosecharon y centrifugaron a 17 000 g durante 60 minutos para concentrar el virus, se descartó el sobrenadante y se reconstituyó el sedimento con neuraminidasa (filtrado de cultivo de *Clostridium perfringens* tipo E), producida por el CVL Weybridge, a una centésima parte del volumen original. La solución se incubó a 37°C durante dos horas.

El antígeno se tituló mediante la técnica de hemaglutinación (HA).¹¹ Como punto de corte se consideró el último pocillo con aglutinación del 100% que representa una unidad hemaglutinante (UHA).

Cálculo de la prevalencia

La prevalencia se determinó al dividir el número total de muestras positivas entre el número total de muestras.⁷ Los intervalos de confianza ($p \pm 2S$) se calcularon a partir de la fórmula:⁷

$$S = [c/\Sigma Xi] \sqrt{\{[\Sigma Yi^2 - 2p\Sigma XiYi + p^2\Sigma Yi^2] / [c(c-1)]\}}$$

Donde:

c = número total de conglomerados.

Xi = número de muestras de cada conglomerado.

Yi = número de muestras positivas de cada conglomerado.

El efecto de diseño (D) y el coeficiente de correlación intraconglomerado (ρ) se determinaron usando las fórmulas:^{7,8}

$$D = SE^2(\text{muestreo por conglomerados}) / SE^2(\text{muestreo simple al azar}) \\ \rho = (D-1) / (n-1)$$

Resultados

La seroprevalencia total encontrada para las aves de traspatio del estado de Yucatán con la prueba de IH usando el antígeno viral SIN6/YUC/MEX/96 fue de 74.9% (95% IC 68.9%-80.9%) (806 positivos de 1 076 sueros probados). El efecto de diseño fue de 5.03 y el coeficiente de correlación intraconglomerados fue 0.14.

Nueve comunidades tuvieron prevalencias superiores a 90.0% (Ruinas de Ake, 96.4%; Dzoyaxche,

IB seroprevalence, with SIN6/YUC/MEX/96 virus used as an antigen, found in this study (74.9%) (95% CI 68.9%-80.9%) was higher than that previously reported using an antigen prepared with the M41 reference strain (56.5%) (95% CI 50%-63%)¹² using the same sera.

The difference found in seroprevalences using two different types of IB virus was probably due to the wider distribution of SIN6/YUC/MEX/96 in the studied towns with some exceptions. Some researchers have reported that after repeated inoculations with IB virus, the antibody response detected in tests like seroneutralization and HI is of broad spectrum; in other words, it is detected regardless of the type of virus used as an antigen.^{13,14}

Zones where seroprevalences were higher with virus SIN6/YUC/MEX/96 than with the M41 strain included: in the East with 79.9%, and in the Centre with 77.5%, compared to 58.2% and 56.2%, respectively.

Two zones presented prevalences equal to, or lower using SIN6/YUC/MEX/96 virus than those reported with the M41 strain. There are several possible explanations for this: one is that the M41 virus or another type of IB virus is prevalent in those zones, or that there is a combination of IB viruses which induced cross-reactions. This is supported by the fact that in the State of Yucatan, different types of IB viruses have been isolated like the Connecticut strain, as well as another IB virus variant called FMVZ/UADY/YUC/MEX/97.¹²

With respect to the intracluster correlation coefficient, the one found in the present study (0.14) agrees with the reported by other researchers^{7,8} who state that for highly infectious diseases like IB, the value is usually higher than 0.1 but lower than 0.2.

Acknowledgements

The authors thank the staff of the Avian Virology Department from the Central Veterinary Laboratory at Weybridge, England, for their advice and reagents provided for this study.

96.0%; Xbec, 95.1%; Chan San Antonio, 94.7%; Cuzama, 92.1%; Tixmeuac, 92.0%; Sotuta, 90.0%), solamente tres comunidades tuvieron prevalencias menores o iguales a 50% (MacMay/Catmis, 30.7%; Baca, 46.3%; Kanxoc, 47.6%; Espita, 50%). Las prevalencias para cada comunidad se presentan en el Cuadro 1. Los títulos de los sueros positivos variaron de 5 a 12 log₂.

Discusión

Es poca la información generada sobre la prevalencia e impacto económico de las enfermedades de las aves de traspatio. En los países en vía de desarrollo, la enfermedad de Newcastle es considerada como la más importante causa de pérdidas económicas en el sistema, pero en Yucatán, México, un estudio serológico informa que ésta es de poca importancia comparada con la BI.⁵

La seroprevalencia para BI con la cepa SIN6/YUC/MEX/96 encontrada en este estudio fue superior, alcanzando 74.9% (95% IC 68.9%-80.9%), comparada con un estudio realizado anteriormente¹² en el que se notificó una seroprevalencia de 56.5% (95% IC 50%-63%), utilizando los mismos sueros que se trabajaron en el presente trabajo pero con un antígeno preparado a partir de la cepa de referencia M41.

La diferencia de las seroprevalencias encontradas con las dos cepas de BI probablemente se deben a que el virus SIN6/YUC/MEX/96 es el que se encuentra más distribuido en las comunidades estudiadas con algunas excepciones. Respecto de lo anterior, diversos investigadores han informado que después de repetidas inoculaciones con el virus de BI, la respuesta de anticuerpos detectada en pruebas como seroneutralización e IH, es de amplio espectro; es decir, es detectada sin importar el tipo de virus utilizado como antígeno.^{13,14}

Las zonas donde se observó un incremento en la seroprevalencia de la cepa SIN6/YUC/MEX/96 con respecto a la M41, fueron la zona Este con 79.9% y la Centro con 77.5%, en comparación con 58.2% y 56.2%, respectivamente.

Existen varias posibilidades que pueden explicar por qué algunas zonas tuvieron seroprevalencias iguales o menores en el estudio realizado con la cepa M41, una de ellas es que prevalece el M41 o un tipo diferente de virus, o hay una combinación de dos o más tipos del virus de BI que hayan producido respuestas cruzadas.

Lo anterior está respaldado por el hecho de que en el estado de Yucatán se han aislado otras cepas, además del SIN6/YUC/MEX/96, pertenecientes a la cepa Connecticut, así como fue aislado otro tipo de virus de la BI totalmente distinto tanto antigénica como genéticamente a los tipos de referencia, denominado FMVZ/UADY/YUC/MEX/97.¹²

Respecto del coeficiente de correlación intraconglomerados, el resultado para el presente estudio (0.14)

**Cuadro 1**

SEROPREVALENCIA DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA EN AVES DE TRASPATIO EN 30 COMUNIDADES DEL ESTADO DE YUCATÁN, USANDO EL ANTÍGENO VIRAL SIN6/YUC/MEX/96 EN LA PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN

INFECTIOUS BRONCHITIS SEROPREVALENCE IN BACKYARD CHICKENS FROM 30 COMMUNITIES FROM THE STATE OF YUCATAN IN MEXICO USING THE SIN6/YUC/MEX/96 VIRAL ANTIGEN IN THE HAEMAGGLUTINATION INHIBITION TEST

<i>Población</i>	<i>Número de muestras</i>	<i>Número de muestras positivas</i>	<i>Prevalencia (%)</i>
<i>Town</i>	<i>Sera sampled</i>	<i>Positive sera</i>	<i>Prevalence (%)</i>
Zona Sur			
Tixcuytun	38	34	89.4
Xoy	30	22	73.3
Peto/Tadziu	32	24	75
Macmay/Catmis	39	12	30.7
Tixmeuac	38	35	92
Zona Sureste			
Sotuta	33	30	90.9
Tahdzibichen	40	26	65
Kanxoc	42	20	47.61
Chankom	26	16	61.5
Kaua/San Lorenzo	29	16	55.1
Zona Este			
Espita	38	19	50
Chan San Antonio	38	36	94.7
Sucopo	38	32	84.2
Tixcancal	40	30	75
Yalsihon	39	31	79.4
Xbec	41	39	95.1
Zona Centro			
Baca	41	19	46.34
Chicxulub Puerto	41	31	85.3
Kantunil	40	26	65
Chunchucmil	40	31	77.5
Dzoyaxche	25	24	96
Noc Ac	36	20	55.5
Oxcum	31	25	80.6
Cuzama	38	35	92.1
Ruinas de Ake	28	27	96.4
Suma	36	32	88.8
Telchaquillo	35	24	68.5
Tetiz	29	20	68.9
Xtepen	35	32	91.4
Yobain	40	38	95
Total	1,070	888	82.9

concuenda con lo descrito por otros investigadores,^{7,8} quienes mencionan que para las enfermedades altamente infecciosas, como BI, el valor es mayor a 0.1 y generalmente menor a 0.2.

Agradecimientos

Los autores agradecen al personal del Departamento de Virología Aviar, del Laboratorio Central Veterinario del Reino Unido, sus consejos en la planeación y realización de este trabajo.



References

1. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Las aves de corral en la Península de Yucatán. México (DF): INEGI, 1997:45-47.
2. Cavanagh D, Naqui SA. Infectious bronchitis. In: Calnek BW, editor. Poultry diseases. Ames (Io): McGraw-Hill, 1997;18:511-526.
3. Quiroz M. Actualidades sobre la bronquitis infecciosa aviar y estrategias para su control. Tec Avipecu 1998;11:22-26.
4. Barrañon JC. Impacto económico de la bronquitis infecciosa aviar. México (DF): Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural 2000. Disponible en: <http://www.sagar.gob.mx/Conasag/8ac3brin.htm>
5. Gutiérrez-Ruiz EJ, Ramírez-Cruz GT, Camara-Gamboa EI, Alexander DJ, Gough RE. A serological survey for avian infectious bronchitis virus and Newcastle disease virus antibodies in backyard (free-range) village chickens in Mexico. Trop Anim Hlth Prod 2000; 32:381-390.
6. Gutiérrez-Ruiz EJ, Gough R, Zapata-Villalobos DM. Caracterización antigénica de un virus de la bronquitis infecciosa, aislado en pollos de traspatio en Yucatán, México. Vet Méx 1998;29:351-358.
7. Bennet S, Woods T, Liyanage W, Smith DL. A simplified general method for cluster-sample surveys of health in developing countries. Wld Hlth Stat Q 1991;44:98-106.
8. Otte MJ, Gumm ID. Intra-cluster correlation coefficients of 20 infections calculated from the results of cluster-sample surveys. Prev Vet Med 1997;31:147-150.
9. Martin SW, Meek AH, Willeberg P. Veterinary epidemiology: principles and methods. Ames (Io): Iowa State University Press, 1987.
10. 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.
11. Alexander DJ, Chettle NJ. Procedures for the haemagglutination and the haemagglutination inhibition test for avian infectious bronchitis. Avian Pathol 1977;6:9-17.
12. Gutiérrez-Ruiz EJ, Banks J, Gough RE. Caracterización del virus de la bronquitis infecciosa de los pollos aislados en aves de traspatio en Yucatán, México. Memorias del 1er Congreso Nacional de la Rama de Bioquímica y Biología Molecular de Virus; 19-21 enero 2000; Guanajuato (Gto). México (DF): Sociedad Mexicana de Bioquímica, 2000:153-154.
13. Gelb J, Killian LS. Serum antibody responses of chickens following sequential inoculations with different infectious bronchitis virus serotypes. Avian Dis 1987;3:513-522.
14. Zellen GK, Thorsen J. Determination of the antigenic relationships among six serotypes of infectious bronchitis virus using the enzyme-linked immunosorbent assay and serum neutralization test. Avian Dis 1987;31:455-458.