



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

EFICACIA PROTECTIVA E
INMUNOGENICIDAD DE UNA
VACUNA INACTIVADA A BASE DE
CULTIVO CELULAR CONTRA LA
HEPATITIS A CUERPO DE INCLUSIÓN
EN POLLOS SPF

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS VETERINARIAS

JUAN GUILLERMO VALLENAS ROMERO

LIMA - PERÚ
2023

ASESOR

Luis Miguel Jara Salazar Mg
UPCH

COASESOR:

Melanie Claire Caballero García Mg
QUIMTIA S.A.

JURADO DE TESIS

Mg NESTOR FALCON PEREZ

PRESIDENTE

DR. CARLOS SHIVA RAMAYONI

VOCAL

DR. ENRIQUE SERRANO MARTINEZ

SECRETARIO

DEDICATORIA.

A la memoria de mi padre, mi maestro y guía.

A la memoria de mi hermano Sergio

A mi madre y hermanos, por ser el soporte de mi desarrollo
profesional

AGRADECIMIENTOS.

A Dios, por ser mi guía espiritual, iluminar mi camino

A la Escuela de Posgrado de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por su valioso apoyo durante el proceso académico y administrativo.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por otorgarme las facilidades y el apoyo para la culminación del estudio.

A mi asesor, el Mg. Luis Jara Salazar y a mi Co-asesora Mg. Melanie Caballero García por brindarme su apoyo, dedicación y compartir sus conocimientos en la elaboración y culminación del estudio.

Al personal de QUIMTIA S.A. Mg Alfredo Mendoza, MVZ Elizabeth Sianquez y a todo el personal técnico que me dio el soporte necesario para culminar este trabajo.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

A FONDECYT y QUIMTIA S.A. por el financiamiento de esta tesis mediante el proyecto "Desarrollo de una vacuna polivalente contra la hepatitis a cuerpos de inclusión en cultivos celulares usando cepas de adenovirus aisladas de explotaciones avícolas del Perú" Contrato/ N° 033-2019-FONDECYT-BM-INC.INV.

EFICACIA PROTECTIVA E INMUNOGENICIDAD DE UNA VACUNA INACTIVADA A BASE DE CULTIVO CELULAR CONTRA LA HEPATITIS A CUERPO DE INCLUSIÓN EN POLLOS SPF

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	mailman.bic.mni.mcgill.ca Fuente de Internet	1%
2	www.tandfonline.com Fuente de Internet	1%
3	journalarticle.ukm.my Fuente de Internet	1%
4	www.mpi.govt.nz Fuente de Internet	1%
5	Xun Guo, Jiang Chang, Shiyong Lu, Pan Hu et al. "Multiantigen epitope fusion recombinant proteins from capsids of serotype 4 fowl adenovirus induce chicken immunity against avian Ankara disease", <i>Veterinary Microbiology</i> , 2023 Publicación	1%
6	Qing Pan, Jing Wang, Yulong Gao, Hongyu Cui et al. "Development and application of a novel ELISA for detecting antibodies against group I	1%

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCION	1
II.	OBJETIVOS	3
	1. Objetivo general	3
	2. Objetivos específicos	3
III.	MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES	4
IV.	METODOLOGIA	9
	1. Lugar de estudio	9
	2. Tipo de estudio	9
	3. Animales	9
	4. Criterios de inclusión y exclusión	10
	5. Preparación de las vacunas a evaluar a partir de cultivo celular	11
	6. Diseño experimental	12
	7. Crianza	13
	8. Vacunación	13
	9. Desafío	14
	10. Serología	14
	11. Observación de signos clínicos	15
	12. Lesiones macroscópicas	15
	13. Identificación de HCI por PCRm	16
	14. Histopatología	16

15. Plan de análisis de datos	17
16. Consideraciones éticas	17
V. RESULTADOS	18
1. Serología	18
2. Observación de signos clínicos	19
3. Lesiones macroscópicas	22
4. Identificación de HCI por PCRm	24
5. Histopatología	24
VI. DISCUSION	25
VII. CONCLUSIONES	34
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	35
IX. ANEXOS	

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
bp:	Pares de bases (del Ingles base pair)
ELISA:	Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzima
FAdV:	Adenovirus Aviar (por sus siglas en Ingles Fowl Avian disease Virus)
HCI:	Hepatitis a Cuerpo de Inclusión
MOI:	Unidad de Multiplicidad de la Infección (por sus siglas en Ingles Multiplicity of Infection)
nm:	Nanómetros
ng/ μ L	Nanogramo por microlitro
PGT:	Promedio Geométrico de los Títulos
RT-PCR:	Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (por sus siglas en Ingles Real Time- Polymerase Chain Reaction)
SPF:	Libre de Patógenos Específicos (por sus siglas en Ingles Specific Pathogen Free)
TCID ₅₀ :	Dosis Infecciosa 50 en Cultivo Celular (por sus siglas en Ingles Tissue Culture Infectious Dose ₅₀)
μ L:	Microlitro
μ M:	Micromol

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Distribución de las aves en los grupos experimentales.
- Cuadro 2. Valor del Promedio Geométrico del Título (PGT) de anticuerpos de los grupos experimentales evaluados obtenidos por serología
- Cuadro 3. Frecuencias (%) de la presentación de los signos clínicos observados en los grupos de las aves experimentales postinfección (PI)
- Cuadro 4. Mortalidad (%) post-infección de las aves en los diferentes grupos evaluados.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Vacunación vía subcutánea en la región medio dorsal del cuello.
- Figura 2a. Signos clínicos identificados PI. Ave con ojo almendrado y plumas erizadas.
- Figura 2b: Ave con depresión (encorvada y sin reacción a estímulos) y heces líquidas de coloración verdosa.
- Figura 2c: Ave con depresión junto a otras aves muertas.
- Figura 3a: Órganos de Grupo 2, control positivo: Hígado con focos necróticos y friables al tacto, brillosos y bordes curvos (agrandamientos).
- Figura 3b: Órganos de Grupo 2: Corazón y bazo agrandado; y riñón inflamado.
- Figura 4a: Órganos de Grupo 3, control negativo. Hígados.
- Figura 4b: Órganos de Grupo 3, control negativo. Hígados.
- Figura 4c: Órganos de Grupo 3: Corazones, hígados y bazos.
- Figura 5a: Órganos de Grupo 1, inmunizados con 1×10^7 TCID₅₀.: Hígados.
- Figura 5b: Órganos de Grupo 1, inmunizados con 1×10^7 TCID₅₀.: Hígados.
- Figura 5c: Órganos de Grupo 1: Corazones, hígados y bazos.
- Figura 6a: Órganos de Grupo 2, control positivo: Hígados.
- Figura 6b: Órganos de Grupo 2, control positivo: Hígados.
- Figura 6c: Órganos de Grupo 2: Corazones, hígados y bazos.

RESUMEN

La Hepatitis a Cuerpos de Inclusión (HCI) es una enfermedad que afecta a las aves de explotación intensiva y que causa severas pérdidas económicas debido a la mortalidad que ocasiona, así como disminución de los parámetros productivos. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de una vacuna desarrollada en cultivo celular contra HCI en aves Libres de Patógenos Específicos (SPF). Para ello, se diseñó un ensayo con 3 grupos: Grupo 1 aves inmunizadas y desafiadas con el serotipo 4 (FAdV-4); Grupo 2 aves no vacunadas y desafiadas con el mismo serotipo 4; y Grupo 3 aves no vacunadas ni desafiadas. Se evaluó la respuesta inmunológica mediante la obtención del Pro medio Geométrico de Títulos (PGT) de anticuerpos en suero por ELISA, mortalidad, signos clínicos, hallazgos de necropsia y lesiones microscópicas compatibles con HCI. Los resultados mostraron un elevado PGT para el grupo 1 ($p < 0.05$) con respecto al grupo 2 y 3 a los 17 días post-vacunación (986 vs 184 vs 85, respectivamente), y a los 23 días post-vacunación (1551 vs 67 vs 96, respectivamente). Al día 56, una semana post desafío el PGT fue mayor ($p < 0.05$) para el grupo 1 (7541, 1289 y 96, respectivamente) así como a los 14 días post desafío (15083, 4300 y 109, respectivamente). Solo se registró mortalidad para el Grupo 2 (87.5%) así como la presencia de signos y lesiones compatibles con HCI. La vacuna experimental fue capaz de contrarrestar la aparición y curso de la enfermedad de HCI en las aves vacunadas.

PALABRAS CLAVES: *Adenovirus aviar*, hepatitis a cuerpos de inclusión, vacuna inactivada, cultivo celular.

ABSTRACT

Inclusion Body Hepatitis (IBH) is a disease that affects poultry industries and causes severe economic losses due to the mortality, as well as a decrease in productive yields. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of a vaccine developed in cell culture against HCI in Specific Pathogen Free (SPF) birds. For this, a trial was designed with 3 groups: Group 1 birds vaccinated and challenged with serotype 4 (FadV-4); Group 2 unvaccinated birds challenged with the same serotype; and Group 3 unvaccinated and non-challenged birds. The immunological response was evaluated by obtaining Geometric Average Titers (GAT) of antibodies in serum by ELISA, mortality, clinical signs, necropsy findings, and compatible IBH microscopic lesions. The results showed a higher GAT for group 1 ($p < 0.05$) compared to group 2 and 3 at 17 days post-vaccination (986 vs 184 vs 85, respectively) and at 23 days post-vaccination (1551 vs 67 vs 96, respectively). At day 56, one week post challenge, the GAT was higher ($p < 0.05$) for group 1 (7541, 1289 and 96, respectively) as well as at 14 days post challenge (15083, 4300 and 109, respectively). Mortality was only recorded for Group 2 (87.5%) as well as the presence of signs and lesions compatible with IBH. The experimental vaccine was able to counteract the onset and course of IBH disease in vaccinated birds.

KEYWORDS: Avian adenovirus, inclusion body hepatitis, inactivated vaccine, cell culture.

I. INTRODUCCIÓN

La Hepatitis por Cuerpos de Inclusión (HCI) es una enfermedad infecciosa que impacta severamente en el rendimiento productivo del pollo de carne, debido a la alta morbilidad y mortalidad que ocasiona (Adair y Fitzgerald, 2008), lo que finalmente repercute en pérdidas económicas para la industria avícola. Dicha enfermedad es ocasionada por el Adenovirus aviar del Grupo I (FAdV-1), el cual se ha considerado como un agente oportunista; sin embargo, en los últimos años ha sido reportado también como un agente primario (De la Torre *et al.*, 2018).

La enfermedad conlleva a cuadros severos de hepatitis con inclusiones nucleares e hidropericardio, además de erosiones de molleja, sobre todo en aves jóvenes (Hess, 2017). La transmisión generalmente es horizontal pero también puede ser vertical, por tanto, hoy en día los productores avícolas mejoran los programas vacunales para inmunizar adecuadamente a las gallinas reproductoras y así transferir anticuerpos maternos a la progenie que generen protección contra desafíos de campo (Gupta *et al.*, 2017). En pollos de carne la enfermedad ha sido observada en aves entre 3 a 5 semanas de edad y ocasionalmente en ponedoras comerciales (Ashtana *et al.*, 2013). Aparece repentinamente con una alta morbilidad y mortalidad que puede alcanzar hasta el 80% de la población (Li *et al.*, 2017). Los brotes de HCI son causados por diferentes serotipos circulantes siendo el serotipo 4 (FAdV-4) el más identificado en los brotes de campo (Mo *et al.*, 2019).

La vacunación es el único método profiláctico que puede ser utilizado. En el mercado hay vacunas vivas o inactivadas preparadas a partir de embriones de pollo o cultivo celulares. Las vacunas de origen extranjero contienen un solo serotipo, lo cual limita la protección adecuada en las parvadas (Shah *et al.*, 2017). La producción de vacunas inactivadas en embriones de pollo requiere de la importación de una cantidad importante de huevos libres de patógenos específicos (Specific Pathogen Free, SPF), permisos sanitarios de importación, tiempo elevado de operación para la replicación viral y además genera gran cantidad de residuos biológicos como cáscara, vitelo, fluidos alantoideos o membranas corioalantoideas infectadas. Por su parte, la producción de vacunas en cultivo celular disminuye la necesidad de importación de huevos SPF, así también facilita la infección viral de las células de manera masiva y no genera una carga elevada de residuos biológicos, entre otros beneficios. Las vacunas diseñadas a partir de cultivos celulares pueden ser igual de eficientes para controlar las infecciones del serotipo 4 (FAdV-4) de la enfermedad de HCI (Du *et al.*, 2017).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia de una vacuna desarrollada a base de cultivo celular contra el desafío experimental con el serotipo 4 de Adenovirus Aviar (FAdV-4) causante de la enfermedad de Hepatitis a Cuerpos de Inclusión (HCI) en pollos SPF (libres de patógenos específicos).

II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la protección contra HCI de una vacuna desarrollada en cultivo celular en pollos SPF.

Objetivos específicos

- Evaluar mediante ELISA indirecto el nivel de anticuerpos contra el Adenovirus aviar Grupo 1 post inmunización de aves SPF.
- Evaluar indicadores de mortalidad, signos clínicos, lesiones macroscópicas y microscópicas, detección del virus por PCRm e histopatología post desafío de las aves con el virus de HCI.

III. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES

La producción de carne de pollo en el Perú ha alcanzado altos niveles tecnológicos y de inversión, mostrando un crecimiento ininterrumpido durante los últimos 10 años. En el año 2022 las estadísticas oficiales muestran un volumen de producción de carne de pollo de 1 808'800,000 toneladas, y se calcula que el valor bruto bordea los 7,735 millones de nuevos soles, constituyéndose en la proteína de origen animal más consumida por los peruanos con un 54% del consumo total de carnes (MINAG, 2022).

Uno de los grandes retos que enfrenta la industria avícola en el Perú es obtener óptimos índices productivos, para lo cual es imprescindible un eficiente manejo sanitario que prevenga las enfermedades que aquejan a la producción aviar. La Hepatitis a Cuerpo de Inclusión (HCI) es una de enfermedad aviar altamente infecciosa, causada por el Adenovirus aviar (FAdV) tipo I (Asthana *et al.*, 2013). Las principales lesiones en HCI son hígados pálidos, friables e hinchados. Las hemorragias petequiales o equimóticas pueden estar presentes en el hígado y los músculos esqueléticos, además de la acumulación de fluidos en el saco pericárdico y hepatitis. Se observan cuerpos de inclusión en los hepatocitos, los cuales pueden ser eosinofílicos, grandes, redondos o de forma irregular con un claro halo pálido compuestos de un material granular fibrilar. Las lesiones también incluyen atrofia de la Bursa y Timo como también aplasia de la Médula Ósea (Adair y Fitzgerald, 2008). Además, se ha reportado que el FAdV podría ser causante de problemas

respiratorios en aves inmunodeprimidas y desarrollar cuadros junto con la presencia de otros agentes patógenos de vías respiratorias (Gowthaman *et al.*, 2012).

El FAdV es un virus DNA no envuelto, posee una estructura icosaedral de 70-90 nm, formado por 252 capsómeros, de los cuales 240 son hexones y 12 corresponden a bases de penton, los cuales tienen una proyección conocida como fibra (Li *et al.*, 2017). Diversos estudios que han caracterizado los serotipos prevalentes de brotes de campo muestran al serotipo FAdV-4 como el más prevalente e hipervirulento con mortalidades que varían entre 80 y 100% en aves desafiadas (Pan *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). La caracterización molecular de la fibra de los principales serotipos de aislados de hígados de pollos con diagnóstico de HCI entre 1998 al 2021 reportados en Perú (4, 8b y 11) ha servido para la detección y diferenciación de los serotipos de FAdV-I, tal como lo describe Sianquez (2022) quien reportó el 46.7%, 40% y 6.7% para los serotipos FAdV-4, FAdV-8b y FAdV-11, respectivamente, además de encontrar casos de coinfección entre FAdV-4 y FAdV-11 (3%). Así mismo, Rodríguez *et al.*, (2014) también reportaron el serotipo FAdV-4 circulando en casos clínicos de HCI en broilers.

Si bien es cierto que HCI fue percibida como el resultado de infecciones concurrentes de FAdV-4 y agentes inmunosupresores, tales como el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBD) y de la anemia del pollo (CAV) (Schachner *et al.*, 2018), también ha sido reportado como patógeno primario (Niu *et al.*, 2016; Hess *et al.*, 2017; Yu, *et al.*, 2019). Un estudio realizado en México demostró la

presencia de una cepa altamente virulenta de FAdV-4, la cual puede causar hasta un 100% de mortalidad en pollos SPF (Vera-Hernández *et al.*, 2016). Estudios realizados en China y basados en secuenciación del gen del hexón, concluyen que la cepa FAdV-4 fue la dominante (93%) en comparación a otros serotipos: FAdV-7, FAdV 8a, FAdV -8b, FAdV -11 (Niu *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2019), incluso con la aparición de nuevas variantes genotípicas (Chen *et al.*, 2020). En España se reporta que la cepa predominante es la FAdV -11, seguida de la FAdV -2 y la FAdV -8a (Oliver-Ferrando *et al.*, 2017). En Austria y Turquía, estudios de brotes ocurridos en 2015 y 2019 mostraron que los serotipos FAdV -8b y FAdV -11 fueron los causantes de enfermedad (Marek *et al.*, 2016; Sahindokuyucu *et al.*, 2019). En Perú, Chumbe *et al.*, (2012) reportaron los serotipos 4, 8a y 11 como los FAdV-I circulantes entre el 2009 y 2011. Además, otros autores reportan los aislamientos de los FAdV-4 (Rodríguez *et al.*, 2014; Silvera *et al.*, 2016), y del serotipo 8b (Silvera *et al.*, 2016, Izquierdo-Lara *et al.*, 2016), mientras que Gómez-Sánchez *et al.*, (2010) reportaron la presencia del serotipo 5 en el 2010, y De La Torre *et al.*, ((2018) determinaron la presencia de los serotipos 6 y 11 del FAdV-1 en el vecino país del Ecuador.

Tradicionalmente, se ha realizado el control de la HCI a través de robustos programas vacunales. Las primeras vacunas convencionales fueron desarrolladas en el año 1987 a partir de homogenizados de hígados infectados e inactivados con formalina, que no tuvieron resultados favorables (Shah *et al.*, 2017). Posteriormente se han desarrollado vacunas adaptadas en embrión de pollo en los cuales el virus fue completamente atenuado luego de 12 pasajes sucesivos lográndose protecciones

de hasta 95% (Mansoor *et al.*, 2011). En China, se han preparado vacunas inactivadas contra las cepas emergentes de FAdV-4 con resultados favorables (Pan *et al.*, 2017). Así también en Australia y Canadá se reportan brotes causados por los serotipos FAdV-8a, 8b y 11, y que al usar vacunas polivalentes se obtuvo una eficacia entre 98-100% de protección (Gupta *et al.*, 2017; Steer-Cope *et al.*, 2019). Durante los años 2006-2013 se realizó un estudio de los adenovirus circulantes en el Perú, siendo FAdV-4 el serotipo más prevalente que fue usado en la fabricación de dichos productos biológicos (Rodríguez *et al.*, 2014) Se han desarrollado también vacunas a virus inactivado principalmente, y que además podría producir protección cruzada contra los serotipos 8b y 11 (Kim *et al.*, 2014).

El creciente número de casos notificados de HCI durante los últimos años indican la necesidad de desarrollar herramientas para controlar la enfermedad, como es el diagnóstico, la identificación del serotipo del virus causante y el desarrollo de mejores vacunas (Yugo *et al.*, 2016). Por lo tanto, es necesario utilizar una vacuna que contenga los serotipos más prevalentes de la región para asegurar la producción de anticuerpos protectores en los pollos de carne y además a las reproductoras de estas líneas en estos programas (Popovich *et al.*, 2018).

En el Perú se ha reportado al serotipo FAdV-4 como el más prevalente (Silvera *et al.*, 2014), a pesar de algunos resultados de investigación que señalan que podría haber protección cruzada contra los serotipos 8b y 11 (Kim *et al.*, 2014) a partir del desarrollo de vacunas elaboradas con el serotipo FAdV-4. De la misma forma Gupta *et al.*, (2017) y Steer-Cope *et al.*, (2018), probando vacunas originadas a partir de

cepas homologas y heterólogas, demostraron la posibilidad de un amplio espectro de protección contra otras cepas de virus de HCI causantes de la enfermedad, tanto cuando se vacunan pollos de carne como en reproductoras comerciales.

El cultivo celular es considerado como una buena tecnología para el cultivo y aislamiento viral, siendo más preciso y sensible para la identificación de virus. Se han descrito el uso de células de fibroblastos o células embrionarias de riñón de pollo para aislamiento de partícula virales de FAdVs, las cuales causan áreas con efectos citopáticos luego de 5 a 6 días post-inoculación (Niczyporuk *et al.*, 2018). Du y colaboradores (2017) compararon la eficacia de una vacuna diseñada a partir del FAdV-4 en cultivo celular versus embrión de pollo, la primera generó una respuesta de anticuerpos más temprana y más elevada. Luego del desafío experimental con el serotipo 4 no se registró mortalidad, morbilidad ni lesiones histopatológicas en ninguna de las aves vacunadas, mientras que las aves no vacunadas tenían una mortandad de 90% y lesiones de hepatomegalia, hígados friables y hemorrágicos.

Por tanto, el realizar más estudios de vacunas contra HCI desarrolladas a partir de cultivos celulares permitirá evaluar la efectividad de esta como candidata a vacuna comercial, capaz de conferir a las parvadas vacunadas una protección para controlar brotes de HCI en la región.

IV. METODOLOGIA

1. Lugar de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación Aviar (LIA) y Laboratorio de Virología Molecular (LVM) de la empresa Quimtía S.A., los cuales se encuentran ubicados al sur de Lima, Perú, a 0 m.s.n.m. Durante los primeros 21 días de vida las aves fueron acondicionadas en el laboratorio de crianza, y posteriormente se trasladaron al laboratorio de desafío. Dichos laboratorios mantienen condiciones controladas de humedad relativa y temperatura.

2. Tipo de estudio

Estudio de tipo experimental.

3. Animales

Cincuenta y cinco pollos SPF adquiridos de la Empresa Charles River (USA) de un día de edad fueron utilizados. Para determinar el tamaño de muestra se realizó la fórmula de comparación de proporciones utilizando datos de detección de anticuerpos por ELISA a los 21 días post inmunización reportados por Du et al (2017). Se contemplaron los parámetros estadísticos de nivel de confianza de 95% y potencia de 80%.

4. Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión:

Pollos SPF de 1 día edad de la línea Charles River con un peso promedio de 40 g (± 2 g) provenientes de un mismo lote. A la inspección general, las aves deben mostrar las siguientes características: ojos y patas brillantes, plumón seco, ombligo cicatrizado y estado de alerta. Esta evaluación la realizó un médico veterinario con experiencia en producción avícola.

Exclusión:

Pollos SPF de 1 a más días de edad con peso menor a 38 g y que a la inspección general muestren los ojos cerrados, patas secas, plumón húmedo, ombligo mal cicatrizado y en estado depresivo (plumas erizadas, encorvamiento, poca movilidad).

5. Preparación de las vacunas a evaluar a partir de cultivo celular

El candidato vacunal tuvo un título viral de 1×10^7 TCID₅₀, siendo el lote utilizado para esta evaluación: 203ID0453, con fecha de elaboración del 06/03/23.

La elaboración de la vacuna inactivada contra el virus de Hepatitis por Cuerpos de Inclusión (HCI) a partir de cultivo celular implicó la propagación de células derivadas de carcinoma hepatocelular de pollo (LMH), importadas de Alemania (CLS, código 661411), la cual crece en un ambiente de 37°C con 5% de CO₂, usando el medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%.

Para la obtención del inóculo vacunal se emplearon tres serotipos diferentes de FAdV-1 (serotipo 4, serotipo 8b y serotipo 11), obtenidos por Quimtia S.A provenientes de aislados de infecciones naturales en campo. Estos serotipos fueron previamente identificados por PCR y secuenciamiento genético.

La multiplicidad de infección (MOI) fue de 10 en cultivos de células. Luego de un periodo de incubación de aproximadamente 72 horas, se observó por microscopio invertido la destrucción de la monocapa como efecto citopático y se cosechó la muestra viral. Posterior a la concentración viral mediante el uso de un filtrador tangencial para optimizar la concentración viral, se procedió a titular la muestra viral para estimar la dosis infectiva en cultivo celular (TCID₅₀) por mL. Seguidamente, se realizó la inactivación viral usando etilamina binaria. Finalmente, la vacuna fue preparada con los tres serotipos virales incorporados en un adyuvante gelificado desarrollado por la misma empresa Quimtia.

El semiterminado (inóculo viral) se mantuvo por 14 días en cuarentena y fue analizado por el área de control de calidad para efectuar los análisis de identificación, titulación viral, aspecto y control de la inactivación. Por su parte, una vez obtenido el producto terminado (vacuna) en aptas condiciones, se esperaron 14 días más de cuarentena evaluándose el pH, viscosidad, aspecto y esterilidad.

6. Diseño experimental del estudio

El laboratorio de crianza y desafío fueron desinfectados con el producto comercial Glutakill F (glutaraldehído más amonio cuaternario). Se realizó flushing a las tuberías y nipples con ácido peracético semanas previas a dar inicio al vacío sanitario efectivo (semana y media antes del ingreso de las aves). Las aves se mantuvieron en jaulas en la sala de crianza hasta los 21 días de edad, luego de ello fueron trasladadas a las salas de desafío siendo distribuidas en 3 grupos experimentales (Cuadro 1). Cada grupo experimental fue identificado debidamente mediante el aretado de los animales y rotulado de los aisladores experimentales.

Las aves que fueron inmunizadas con la vacuna a los 25 días de edad y que fueron desafiadas con una cepa del FAdV-4 a los 49 días formaron parte del Grupo 1. El control positivo lo constituyeron las aves que no recibieron inmunización, pero si fueron desafiadas con el virus FAdV-4 a los 49 días de edad (Grupo 2). El control negativo lo constituyeron las aves que no recibieron inmunización ni tampoco fueron desafiadas con el virus (Grupo 3).

Cuadro 1. Distribución de las aves en los grupos experimentales.

Grupo	Tratamiento	Inmunización (25 días)	Desafío (49 días)	Sacrificio (63 días)	Cantidad de aves
1	Vacuna 1×10^7 TCID ₅₀	SI	SI	SI	29
2	Control positivo	NO	SI	SI	16
3	Control negativo	NO	NO	SI	10

7. Crianza de aves experimentales

Se brindó agua potable *ad libitum* y alimento comercial (“El Comedero”) desde el día 1 de edad hasta los 21 días (alimento de inicio); 22 a 35 días (alimento de crecimiento) y de 36 a 63 días (alimento de acabado). Condiciones de crianza como temperatura fueron configuradas siguiendo las indicaciones del manual de la empresa Charles River. Este parámetro fue controlado y registrado diariamente con un termohigrómetro digital para evitar cualquier tipo de estrés ambiental y garantizar el bienestar de las aves.

8. Vacunación

La inmunización se realizó a los 25 días de edad, a cada ave del grupo 1 se le aplicó 0.3 mL de la vacuna correspondiente vía subcutánea en la región medio dorsal del cuello (lado derecho), sin comprometer timo (Figura 1). Los grupos 2 y 3 no fueron vacunados. Las vacunas fueron retiradas de refrigeración (4°C), y temperadas a medio ambiente (21°C). Se procedió a homogenizar el contenido de cada frasco previo a la inmunización.



Figura 1. Vacunación vía subcutánea en la región medio dorsal del cuello

9. Desafío

A los 49 días de edad se realizó el desafío viral a los Grupos 1 y 2. La inoculación del virus se realizó vía intramuscular con un volumen de 1 ml por ave. El inóculo empleado fue producido a partir de una cepa del serotipo 4 de FAdV, previamente reactivada una vez en aves para asegurar su virulencia. El título viral del inóculo usado fue 1.68×10^{10} copias/ml mediante PCR en tiempo real (RT-PCR).

10. Serología

Se colectaron muestras sanguíneas de todas las aves de los grupos experimentales a los 21, 33, 42, 48, 56 y 63 días de edad. El primer muestreo sanguíneo se realizó previo a la vacunación a 20 aves al azar sin distinción de grupo experimental, y los demás fueron realizados durante las semanas posteriores para conocer la producción de anticuerpos con relación al tiempo y frente al desafío viral. Para la medición del nivel de anticuerpos post vacunales y desafío contra FAdV se utilizó el Kit de ELISA indirecto “Fowl Adenovirus Group 1 Antibody test Kit” (Biochek, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El registro de las densidades ópticas se hizo con un lector de ELISA (Multiskan sky high – Termofisher). El software del kit de ELISA utilizado arrojó automáticamente el valor del promedio geométrico de título (PGT) de cada muestra.

11. Observación de signos clínicos

Se evaluaron los signos clínicos y mortalidad de las aves desafiadas durante los 14 días posteriores al desafío. Se realizaron visitas sanitarias diarias con el

objetivo de identificar aves de cada grupo con signos de enfermedad como erizamiento, ojos almendrados, depresión, inapetencia, diarrea, además de hallazgos como heces verdosas y muerte súbita.

12. Lesiones macroscópicas

Al día 63 de edad, se realizó el sacrificio total de las aves por dislocación cervical con el fin de realizar una necropsia exploratoria y observar las posibles lesiones macroscópicas de la HCI. Se evaluaron lesiones en hígados y se registraron características como friabilidad, agrandamiento, coloración anormal, zonas necróticas, hemorragias petequiales o equimóticas, entre otras. Asimismo, se evaluaron otros hallazgos como presencia de hidropericardio y erosiones de la molleja.

13. Detección de HCI por PCRm

Tras los hallazgos de la necropsia, se seleccionaron tres hígados al azar por grupo. De cada hígado, se seleccionó 0.25 mg de tejido para la extracción del ADN mediante un kit de extracción comercial PureLink Genomic DNA mini kit (Invitrogen-Thermo Scientific, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente, se usó cada ADN para la detección de FAdV mediante una PCR múltiple (PCRm) estandarizada previamente en Quimtia S.A con las siguientes condiciones: 0.94X de concentración final de PCR Master Mix 2x, 5.18 μ M de concentración final del ion magnesio (Mg^{2+}), 0.37 μ M de concentración final de cada cebador sentido y antisentido (FAdV-4, 8b y 11, secuencia de cebadores por publicar) y, 7.54 a 15.09 ng/ μ L de concentración

final de cada ADN de hígado. El termociclador fue programado con una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C; 20 ciclos de desnaturalización de 1 min a 95°C, alineamiento de 1 min a 54°C y extensión de 1 min 30 s a 72°C, seguido de una extensión final de 10 min a 72°C. Finalmente, los productos fueron separados y visualizados por electroforesis en 0.9% de gel de agarosa sumergido en buffer Tris-acetate-EDTA a una concentración de 1X a 120 voltios por 30 minutos. El tamaño de producto esperado aproximado fue de 1186 bp, 978 bp y 1655 bp para FAdV-4, FAdV-8b y FAdV-11, respectivamente (Sianquez, 2022).

14. Histopatología

Se seleccionaron los hígados con características macroscópicas compatibles a HCI, a los cuales se les realizó cortes de 1 x 1 cm de cada lado que se conservaron en formaldehído al 10% hasta su envío hacia un laboratorio tercero para el servicio de análisis histopatológico, para examinar las lesiones asociadas a HCI (presencia de corpúsculos de inclusión intranucleares).

15. Plan de Análisis de Datos

Para el análisis de la distribución normal de utilizo la Prueba de *Shapiro-Wilk*. Se usó la prueba no paramétrica de *Kruskall-Wallis* para determinar diferencias entre los grupos experimentales de los títulos de anticuerpos (PGT); y la prueba de *Mann-Whitney* para determinar entre que grupos hay diferencias. Mientras que se usó la *Prueba Exacta de Fisher* para diferencias en la evaluación de

signos y lesiones de HCI entre grupos. La significancia fue de 95% y se usó el Software Stata Versión 16.

16. Consideraciones éticas

El protocolo fue aprobado por el Comité Institucional de Ética para el Uso de los Animales de la UPCH (CONSTANCIA CIEA-E-016-10-23) y la enmienda (CONSTANCIA CIEA-E-004-01-24).

V. RESULTADOS

1. Serología

La producción de título de anticuerpos (Anexo 1) fue tomada a partir del valor de promedio geométrico de título (PGT) obtenido de cada grupo (Cuadro 2). En el primer muestreo (previo a la vacunación) se detectaron niveles bajos de anticuerpos (PGT = 111). Una semana después de la vacunación (33 días de edad), se observó un aumento de anticuerpos ($p < 0.05$) del Grupo 1 respecto a los Grupos 2 y 3. A los 17 días post-vacunación (42 días de edad), se observó una mayor producción de anticuerpos ($p < 0.05$), casi el doble del resultado anterior. A los 23 días post-vacunación (48 días de edad), hubo una marcada elevación de la producción de anticuerpos ($p < 0.05$) frente a los grupos experimentales 2 y 3, los cuales no fueron vacunados y permanecieron con niveles bajos de anticuerpos.

Una semana después del desafío (PI), a los 56 días de edad, los Grupos 1 y 2, que fueron infectados, elevaron en gran cantidad su producción de anticuerpos, siendo el Grupo 1 el que presentó los niveles más altos con un PGT 7541 ($p < 0.05$) con respecto a los demás grupos. En el Grupo 2 (control positivo) la serología de las aves sobrevivientes mostro un PGT alto (1289) frente a FAdV. Por otro lado, el Grupo 3 (control negativo) presentó bajos valores de PGT (96) durante todo el ensayo experimental debido a que no se expuso al virus.

Cuadro 2. Valor del Promedio Geométrico del Título (PGT) de anticuerpos de los grupos experimentales evaluados obtenidos por serología

	Grupo	PGT					
		21 días	33 días	42 días	48 días	56 días	63 días
1	Vacuna 1x10 ⁷ TCID ₅₀	111 ^a	515 ^a	986 ^a	1551 ^a	7541 ^a	15083 ^a
2	Control positivo	111 ^a	222 ^b	184 ^b	67 ^b	1289 ^b	4300 ^b
3	Control negativo	111 ^a	222 ^b	85 ^b	86 ^b	96 ^c	109 ^c

^{a,b,c} Letras diferentes en columnas significa diferencia estadística (P<0.05)

2. Observación de signos clínicos

En el Cuadro 3 se detallan los signos observados durante el monitoreo de las aves después del desafío viral. A partir del segundo día post-infección se evidenciaron signos clínicos compatibles con la enfermedad de HCI. La frecuencia de presentación de los signos fue mayor (p<0.05) para el Grupo 2 con respecto al Grupo 1 y 3. Entre los signos observados se encontraron el erizamiento de las plumas, ojos almendrados, inapetencia (ausencia de apetito y de consumo de agua); y depresión caracterizada por postración, encogimiento, y falta de respuesta a estímulos sonoros (Figura 2a y 2c). La presencia de heces verdes y diarrea (Figura 2b) fueron visibles durante toda la primera semana PI en el grupo 2. A partir del octavo día PI, las aves vivas restantes no registraron signos compatibles con HCI. En las aves del Grupo 2, aves sin vacunación previa, se presentaron mayor porcentaje de signos clínicos frente al Grupo 1 que también fue desafiado.

Cuadro 3. Frecuencias (%) de la presentación de los signos clínicos observados en los grupos de las aves experimentales postinfección (PI)

Días PI	Grupo	Erizam	OjoAlm	Depres.	Inapet.	Diarrea	Heces verdes
2	G1	0 ^b	0 ^b	6.3 ^b	0 ^b	5 ^b	0 ^b
	G2	18.8^a	43.8^a	31.3^a	43.8^a	60^a	50^a
	G3	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
3	G1	3.4 ^b	6.9 ^b	3.4 ^b	6.9 ^b	5 ^b	5 ^b
	G2	12.5^a	25^a	25.0^a	25^a	90^a	80^a
	G3	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
4	G1	0 ^b	6.9 ^b	0 ^b	3.4 ^b	5 ^b	10 ^b
	G2	12.5^a	12.5^a	18.8^a	18.8^a	90^a	80^a
	G3	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
5	G1	0 ^b	3.4 ^b	0 ^b	0 ^b	5 ^b	10 ^b
	G2	12.5^a	6.3^b	6.3^b	0^b	30^a	50^a
	G3	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
6	G1	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	10 ^b
	G2	6.3^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	20^b	20^b
	G3	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b

^{a,b} Letras diferentes en columnas significa diferencia estadística (p<0.05)

Erizam: Erizamiento de plumas

OjoAlm: Presencia de ojo almendrado

Depres: Depresión

Inapet: Inapetencia

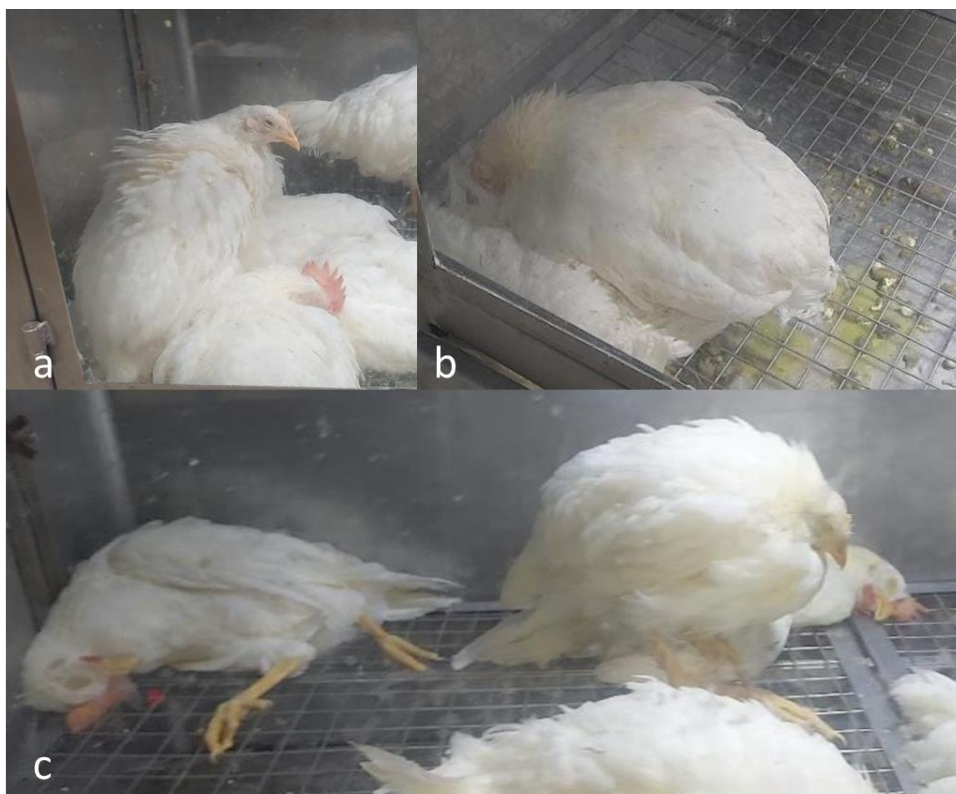


Figura 2. Signos clínicos identificados PI. 2a) Ave con ojo almendrado y plumas erizadas. 2b) Ave con depresión (encorvada y sin reacción a estímulos) y heces líquidas de coloración verdosa. 2c) Ave con depresión junto a otras aves muertas.

La mortalidad post infección se detalla en el Cuadro 4. A partir del segundo día PI se registró la mortalidad solo en el Grupo 2, de seis aves (37.5%). Al tercer día PI se registró mortalidad de cinco aves muertas (31.25%) igualmente solo del Grupo 2. Al cuarto día PI fueron halladas 3 aves más muertas (18.75%) del mismo Grupo 2. Al quinto día PI hacia adelante no se registró mortalidad en ningún grupo. La mortalidad acumulada para el grupo 2 fue de 87.5%, y en los grupos 1 y 3 no se registró mortalidad de ninguna ave experimental.

Cuadro 4. Mortalidad (%) post-infección de las aves en los diferentes grupos evaluados.

GRUPO	2° día PI	3° día PI	4° día PI	5° día PI	6° día PI	TOTAL
G1	0	0	0	0	0	0
G2	37.5	31.25	18.75	0	0	87.5
G3	0	0	0	0	0	0

3. Lesiones Macroscópicas

La evaluación a la necropsia de las aves muertas del Grupo 2 mostró lesiones compatibles con HCI: hígados de consistencia friables, con marcada hepatomegalia y decolorados (Figura 3). El día del sacrificio de las aves sobrevivientes, para evitar contaminación cruzada en los hallazgos durante el sacrificio y necropsia, la evaluación inició por el Grupo 3 (control sin desafío), seguido del Grupo 1 y Grupo 2. En las aves del Grupo 3, control negativo, no se hallaron lesiones compatibles con la enfermedad de HCI (Figura 4). A la evaluación del Grupo 1, los hígados presentaron apariencia aparentemente normal (Figura 5), mientras que en las dos aves restantes del Grupo 2, no se encontraron hígados friables, zonas infartadas ni hepatomegalia (Figura 6). En general, pocos hígados se observaron con leve decoloración, aunque también podría presentarse por infiltración grasa. Asimismo, al examinar los corazones y bazo, éstos se encontraron dentro de los parámetros normales.



Figura 3. Órganos de Grupo 2, control positivo. 3a) Hígado con focos necróticos y friables al tacto, brillosos y borde curvos (agrandamientos). 3b) Corazón y bazo agrandado; y riñón inflamado.



Figura 4. Órganos de Grupo 3, control negativo. 4a y 4b) Hígados. 4c) Corazones, hígados y bazos



Figura 5. Órganos de Grupo 1, inmunizados con 1×10^7 TCID₅₀. 5a y 5b) Hígados. 5c) Corazones, hígados y bazos

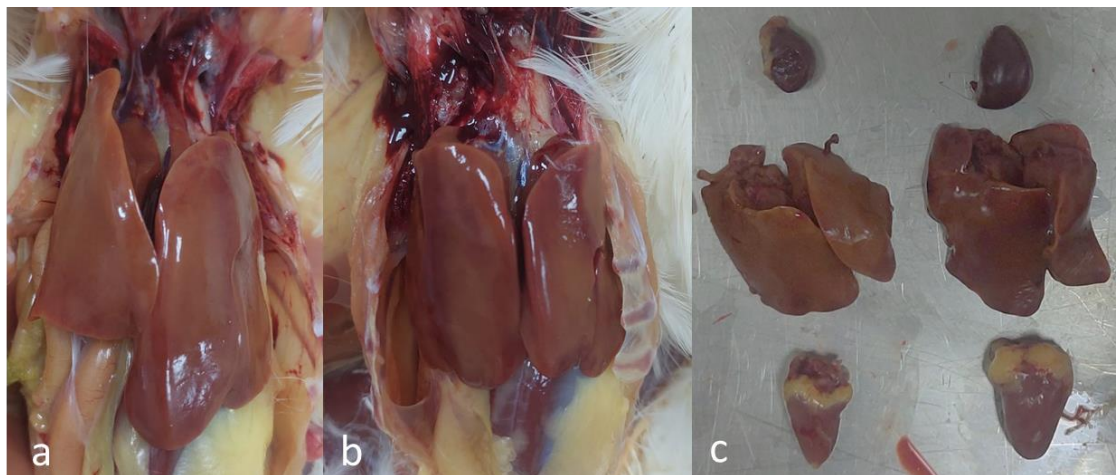


Figura 6. Órganos de Grupo 2, control positivo. 6a y 6b) Hígados. 6c) Corazones, hígados y bazos

4. Identificación de HCI por PCRm

Se seleccionó tres hígados de cada grupo infectado con FAdV para ser evaluados por la PCRm, con excepción del Grupo 2 (control positivo) del cual solo sobrevivieron dos aves. Tras culminar la electroforesis, se observó que ninguna muestra amplificó para ADN viral.

5. Histopatología

Se analizaron 3 muestras (animales) por grupo correspondientes a hígados decolorados del Grupo 1 y 2, así como también hígados del Grupo 3 control negativo para comparar los hallazgos. Los hígados del Grupo 2 de las aves muertas previo al sacrificio, mostraron las lesiones compatibles con HCI en el 100% de los animales evaluados: presencia de corpúsculos intranucleares eosinófilos, áreas de necrosis y degeneración hidrópica. Ninguna de las muestras enviadas post sacrificio de las aves sobrevivientes de los grupos experimentales fue diagnosticada con HCI.

VI. DISCUSION

La HCI es una enfermedad de las aves de crianza intensiva que es una amenaza latente en muchas partes del mundo, incluyendo Perú, traducidos principalmente en altos niveles de mortalidad, la cual incluso puede llegar al 100% (Rodríguez *et al.*, 2014; Silvera *et al.*, 2016; Vera-Hernández *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos en diversos experimentos demuestran que la vacunación ha sido el método más efectivo para controlar y reducir los efectos negativos de la enfermedad (Pan *et al.*, 2017) lográndose alcanzar eficacias de 98-100% de protección (Steer-Cope *et al.*, 2019). Un robusto programa vacunal aunado a la implementación de medidas de bioseguridad, se presentan como las principales herramientas para la prevención en sistemas de crianza intensiva (broilers y aves de puesta).

El presente estudio evaluó la protección vacunal e inmunogenicidad de una vacuna contra la HCI desarrollada en cultivo celular luego de un desafío experimental con una cepa patógena. La producción de anticuerpos protectivos fue más alta en el grupo 1 que en los grupos 2 y 3. El grupo 3 siempre presentó valores bajos de PGT, lo que indica que hubo un buen manejo de las aves durante el proceso de infección y se descarta cualquier tipo de infección cruzada entre las casetas experimentales. Esto concuerda con lo reportado por Du *et al.*, (2017), donde la presentación de signos y lesiones compatibles con cuadro clínico de HCI fue bastante baja comparado en los grupos vacunados con respecto a los otros grupos, así como el porcentaje de mortalidad post desafío (0% para el grupo vacunado y para el control negativo). Esta mortalidad en el grupo desafiado sin vacuna empezó al segundo día

y para las 96 horas todos los animales de este grupo murieron, debido a que no tuvieron anticuerpos protectivos conferidos por la inmunización.

Por otro lado, Gupta *et al.*, (2018) también reportaron en el caso de reproductoras una seroconversión alta luego de una vacunación a las 19 semanas de edad, y se mantuvo hasta las 48 semanas de edad, mientras que los controles negativos mantuvieron siempre seronegativos, tal como se describe en nuestro estudio. Junnu *et al.*, (2015) tras la evaluación de una vacuna en reproductoras hallaron niveles protectivos del 100%, y detectaron incremento en los niveles de anticuerpos 12 días post vacunación, similar a nuestro estudio donde a partir de los 8 días hubo un incremento marcado de los anticuerpos, notándose más a los 17 días y 25 días post vacunación. Mahmood *et al.*, (2014) describe a la vacuna originada en cultivo celular como la más segura, económica y fácil de administrar comparado con otras vacunas.

La eficacia de la vacuna inactivada está relacionada con una inducción mayoritariamente de la respuesta inmune humoral, por lo que el nivel de anticuerpos detectados de los pollos vacunados podría ser un criterio útil para la evaluación de la protección (Pan *et al.*, 2017). Para la valoración de la protección de forma indirecta se resalta el uso de la prueba ELISA, que en el presente estudio fue capaz de detectar la producción de anticuerpos, mostrando una alta sensibilidad y especificidad, por lo que es frecuentemente usada en estudios experimentales con desafío (Feichtner *et al.*, 2018)

Otros estudios llevados a cabo por Junnu *et al.*, (2015) en aves reproductoras, usando una vacuna originada en cultivo celular e inactivada con etilenimina binaria (BEI), encontró una protección de 90% y 100% para los huevos embrionados de 7 días y pollos BB recién nacidos, respectivamente, sugiriendo que los anticuerpos maternos transferidos a la progenie podría protegerlas de desafíos de campo tempranos. Así mismo, Pan *et al.*, (2017) reportó que a partir de nuevas cepas hipervirulentas del serotipo FAdV-4 encontradas en China, desarrollaron una vacuna originada en cultivo celular a virus inactivado en emulsión oleosa que mostró que la magnitud de la respuesta a la producción de anticuerpos fue dependiente del tiempo, siendo los títulos más altos a los 14 días después inmunización que a los 7 días,

En nuestro estudio se evidenció la alta morbilidad en aves expuestas al virus y no vacunadas. Las aves afectadas mostraron al segundo post infección los típicos signos de depresión, erizamiento, ojos almendrados, heces verdes, e inapetencia. Esto concuerda con lo descrito por Mo *et al.*, (2019), quien describe que la aparición de estos signos clínicos se da al segundo día post infección, llegando a un pico a los 5 días. Ren *et al.*, (2019), también describe como signos característicos de HCI luego de 2 días de la exposición al virus, lo que no se observa en los grupos control, tal como sucedió con nuestro estudio. Matos *et al.*, (2016) por el contrario reportan la aparición de pollos afectados a partir del 6 día post infección.

En relación a la mortalidad acumulada, solo se registró en el grupo desafiado sin vacunar, llegando está a 87.5%. Estos resultados son similares a lo reportado por

Du *et al.*, (2017) quienes reportan mortalidades de 90% en los grupos desafiados sin vacunar y 0% en el grupo vacunado y desafiado con el virus. Pan *et al.*, (2017) también reporta mortalidad en ensayos de vacunas a los grupos desafiados entre 2-4 días post infección, tal como lo describimos en el presente estudio, llegando a 100% cuando la vía de infección es intramuscular. Mo *et al.*, (2019) también describe hallazgos de 93%, 100 % y 83% de mortalidad cuando desafía pollos no vacunados de 7, 21 y 35 días de edad.

Con respecto a las lesiones macroscópicas, no se observaron lesiones compatibles con cuadros de HCI en los grupos 1 y 3, a diferencia del grupo 2 donde se evidenció hepatomegalia, necrosis e hidropericardio. Similares resultados reportan Du *et al.*, (2017) quienes hallaron 100% de las aves desafiadas con estas lesiones. Kim *et al.*, (2014) en su estudio reportan un significativo descenso de la aparición de hidropericardio y hepatitis en los pollos vacunados comparado con los grupos no vacunados. Del mismo modo, Mo *et al.*, 2019 encontró diferentes grados de severidad de lesiones de hepatitis e hidropericardio, por efecto de la edad y la ruta de infección, siendo más frecuente la lesión de necrosis hepática.

Nuestros resultados muestran que la excreción de virus de pollos vacunados podría detenerse, similar a lo reportado por Song *et al.*, (2023) quienes reportan que los pollos vacunados detienen la excreción del virus luego de 3 días post-desafío. Del mismo modo, Gupta *et al.*, (2017) reportan que la detección del virus en heces se empieza a detectar a los 3 días post infección y que esta se detiene a los 14 días post infección, similar resultado a nuestro estudio que no detecto virus luego de 14 días

post infección, lo que indica la recuperación de las aves expuestas al virus. La detección de excreción viral si bien puede realizarse por métodos moleculares, se requiere el cultivo celular para asegurarse la no transmisión de partículas virales efectivas a través de heces, entre otros.

La evaluación de las muestras para histopatología mostró que las lesiones presentadas en el grupo control positivo fueron compatibles con cuadro clínico de HCI, la histopatología demostró la presencia de corpúsculos de inclusión intranucleares eosinófilos característicos de esta enfermedad, tal como lo describe Ren *et al.*, (2019). Además de la presencia de pequeñas áreas multifocales de coagulación, necrosis y degeneración hidrópica en hepatocitos evaluados. Por otro lado, los cuadros de hidropericardio observados en este grupo desafiado coinciden con lo reportado por Niu *et al.*, (2019), quien describe que la disfunción cardíaca es causada por una acción directa del virus sobre el miocardio, trastornos en la circulación sanguínea, o por algún otro efecto del virus que resultara en un derrame pericárdico, afectando aún más la función cardíaca y llevando finalmente a los pollos a la muerte. Los mismos hallazgos fueron descritos por Sun *et al.*, (2019) quienes observaron hidropericardio y hepatitis típicas en pollos experimentales, además de encontrar que los niveles de citocinas inflamatorias estaban elevados, lo que puede ser causada por la misma infección viral y la respuesta inmune innata, en los que el hígado contenía la mayor concentración de DNA viral.

Existen diversas vacunas comerciales para ser usadas en pollos de carne y reproductoras. Las primeras vacunas convencionales contra la HCI fueron

desarrolladas a partir de homogenizados de hígados, en el cual el virus obtenido de estos órganos era inactivado con formol, pero los resultados fueron contradictorios (Sha *et al.*, 2017). Esto generó preocupación por la propagación de HCI debido a una inactivación inadecuada de las cepas virulentas, por las malas condiciones de manufactura durante la producción de vacunas, la falta de un adyuvante adecuado y no lograr el adecuado título protector para el virus (Li *et al.*, 2017).

Un ensayo de campo donde se evaluó la patogenicidad del virus FAdV obtenidos de homogenizados de hígado y de cultivos celulares mostró que el primero era más patogénico que el segundo, medido como porcentaje de mortalidad, tanto cuando el virus era inoculado por vía parenteral (60%) que cuando se inoculaba por vía oral (30%); esto se debía probablemente a la adaptabilidad del virus luego de continuos pasajes en cultivos celulares (Ahmad *et al.*, 2011). Como se puede apreciar, si bien este es un método sencillo para hacer autovacunas, se requiere siempre de obtener el material de partida como son los hígados infectados, con lo cual hace un proceso largo a diferencia de cultivo celular donde siempre se tiene la cepa a disposición para el desarrollo de las vacunas.

Por otro lado, Ali *et al.*, (2015) reportó que las vacunas desarrolladas a partir de homogenizados de hígado presentaban muchos inconvenientes en relación a la dosificación, generar una respuesta inmune predecible y por la posibilidad de generar infecciones bacterianas secundarias; aún con el uso de adyuvantes oleosos se formaban granulomas, por lo que el desarrollo de vacunas adaptadas a embrión de pollo surgió como alternativa por la inmunidad protectora que generaba.

Desafortunadamente el desarrollo de esta tecnología requiere un constante abastecimiento de huevos SPF, lo cual es una gran limitante; y el otro inconveniente es la gran cantidad de embriones que debían sacrificarse para obtener el virus. Así, diversos estudios se desarrollaron para evaluar la eficacia de este tipo de vacuna contra HCI, como el reportado por Mansoor *et al.*, (2011) quienes compararon una vacuna atenuada desarrollada en embrión y otra inactivada desarrollada en homogenizados de hígado, obteniendo niveles protectivos contra la enfermedad de 94% para el primer caso, cuando la vacuna se desarrolló a partir de virus atenuado tras sucesivos pasajes (12) en embriones SPF. Estos resultados además mostraron un menor desarrollo de signos clínicos de HCI, menores lesiones histopatológicas, menor mortalidad y una mejor respuesta de producción de anticuerpos protectivos. Sin embargo, existe el riesgo de la reversión del virus. Además, el nivel de eficacia de la vacunación se puede incrementar hasta 98-100% si se incluyen varios de los serotipos descritos como prevalentes en diversos aislamientos (Gruppa *et al.*, 2017), como es el caso del FAdV-4, FAdV-8, FAdV-8b y FAdV-11.

Al creciente número de vacunas descritas se suma la tecnología del cultivo celular, la cual, al ser una herramienta eficaz para el diagnóstico del virus por ser más preciso y sensible, permite el desarrollo de vacunas a partir del cultivo del virus en células de fibroblastos o células embrionarias de riñón de pollo, las cuales causan un efecto citopático luego de 5 días post inoculación (Niczyporuk *et al.*, 2018). Ali *et al.*, (2015) realizaron estudios comparativos entre vacunas obtenidas por cultivo celular con virus atenuado, virus inactivado y vacuna comercial de virus inactivado en emulsión oleosa, obteniendo 100% de protección para el primer caso, 70% para

el segundo caso y 80% para el tercer caso, no observándose signos clínicos ni lesiones compatibles con HCI.

Del mismo modo, Du *et al.*, (2017) realizaron un estudio comparativo usando vacunas originadas en embrión de pollo y en cultivo celular, encontrando niveles de seroconversión de 60% y 90%, respectivamente, a los 14 y 21 días post vacunación. Además, la respuesta más rápida de producción de anticuerpos fue otorgada por las aves vacunadas con cultivo celular como sustrato viral. Cuando se evaluó la eficacia protectora de ambas vacunas, un 10% de los animales inmunizados con la vacuna originada en embrión de pollo desarrollaron cuadros clínicos de HCI, evidenciando lesiones en hígado y presencia de corpúsculos de inclusión intranucleares a la histopatología, mientras que los animales inmunizados con la vacuna originada en cultivo celular tuvieron una protección del 100%.

Por otro lado, la industria de producción de biológicos ha empezado a desarrollar vacunas usando partículas virales como es el caso de la proteína de la fibra, tal como lo describe Gupta *et al.*, (2017) quien encontró niveles de protección de 100% en progenie de reproductoras vacunadas, debido a una buena transferencia de anticuerpos protectivos a estas progenies. Así mismo, Ruan *et al.*, (2018) desarrollaron vacunas recombinantes a partir de la proteína de la fibra-2 del virus FAdV-4, con la cual encontraron una protección de 100% contra el desafío viral, incluso con una menor dosis comparada con una vacuna originada del virus inactivado en emulsión oleosa, no observando signos clínicos ni lesiones en pollos desafiados. Los mismos resultados fueron reportados más tempranamente por

Schachner *et al.*, (2014), quien usando una vacuna recombinada en un baculovirus usando la misma proteína de la fibra-2 encontró una protección superior al 95% en pollos desafiados, por lo que esta subunidad del virus se comportaría como un efectivo inmunógeno previniendo la aparición de signos clínicos de la enfermedad mas no la infección. La detección y diferenciación de los serotipos del FAdV-1 en zonas donde ocurren brotes permitirá un mejor desarrollo de vacunas a partir de estas subunidades.

Los resultados de este estudio demuestran que existe una elevada protección a nivel humoral contra la enfermedad de HCI, asimismo no se registró mortalidad ni morbilidad en las aves vacunadas; tampoco hallazgos en la necropsia o lesiones microscopias asociadas al cuadro de la enfermedad. Sin embargo, se sugiere estudios de campo para evaluar la eficacia en condiciones de crianza comercial donde se puede determinar la eficacia en un número mayor de animales.

Dentro de las limitantes del estudio se puede considerar que solo se evaluó la respuesta humoral mediante la producción de anticuerpos, más no la respuesta celular que es útil para evaluar la respuesta del sistema inmune ante el desafío de cualquier agente patógeno intracelular como son los virus. Sin embargo, la utilidad de evaluar anticuerpos radica en que se conocen los títulos protectivos que finalmente son los que los productores evalúan en campo de forma rutinaria después de vacunar sus parvadas para las diferentes enfermedades infecciosas prevalentes.

VII. CONCLUSIONES

- La vacuna diseñada con cultivo celular para serotipos 4, 8b y 11 del Adenovirus aviar grupo I desencadenó una respuesta de anticuerpos positiva, con un título significativamente mayor en el grupo de aves inmunizadas respecto a las no inmunizadas.
- La vacuna experimental fue eficaz al 100% para controlar la mortalidad generada por HCI serotipo 4 en el grupo de animales inmunizados.
- La vacuna experimental redujo significativamente la frecuencia de signología clínica en los 6 primeros días de evaluación en el grupo inmunizado respecto al no inmunizado.
- La infección experimental desarrolló lesiones compatibles con HCI en el 88% de los animales no inmunizados, mientras que no se evidenció lesiones en el grupo inmunizado.
- Se logró reproducir la enfermedad de HCI con una cepa del serotipo 4 con título de 1.68×10^{10} número de copias/mL que desencadenó los signos característicos (diarrea, depresión), lesiones macroscópicas (hepatomegalia) y hallazgos a la histopatología (cuerpos de inclusión hepáticos).
- No se detectó presencia de ADN viral en los animales inmunizados al día 14 post infección.
- No se observaron reacciones adversas ni anormalidades en los animales que podría ser atribuible a la vacunación.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adair B, y Fitzgerald S. 2008. Group I Adenovirus Infections. In: Diseases of Poultry, 12th Ed. Saif Y.M editor. Blackwell Publishing. Pp 252-265.
2. Ahmad M, Zaman S, Mushtaq M, Anjum A y Akram M. 2011. Comparative pathogenicity of liver homogenate and cell propagated hydropericardium syndrome virus in broilers Birds. Pak. Vet. J. 31(4): 321-326.
3. Ali S, Mahmood S, Hussain I y Khan M. 2015. Preparation and evaluation of lyophilized live attenuated vaccine of inclusion body hepatitis Hydropericardium syndrome (IBH-HPS) against challenge in broiler chickens. Int. J. Agric. Biol. 17:658-662.
4. Asthana M, Chandra R, Kuma R. 2013. Hydropericardium síndrome: current state and future developments. Arch Virol (158): 921-931
5. Chen L., Yin L, Zhou Q, Peng P, Du Y, Liu L, Zhang Y, Xue C, Cao Y. 2019. Epidemiological investigation of fowl adenovirus infections in poultry in China during 2015-2018. BMC Veterinary Research (15): 271-277.
6. Chen L, Yin L; Peng P, Du Y, Zhang Y, Xue C, Xue C. 2020. Isolation and Characterization of A novel fowl adenovirus serotype 8a strain from China. Virologia Sinica. 35(5):517-527

7. Chumbe A, Tataje L, Izquierdo R, Best I, Saravia L, Zavaleta M, Fernandez M. 2012. Presencia de las especies C, D y E de Fowl Adenovirus (FAdV) en el Perú identificadas por PCR-RFLP y filogenias moleculares durante el período 2009-2011. En: Resúmenes XXIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias.
8. De La Torre D, Mafla E, Puga B, y Piantino A. 2018. Caracterización molecular del adenovirus aviar en pollos comerciales del Ecuador. 2018. La Granja Revista de Ciencias de la Vida 2(28):84-91.
9. Du D, Zhang X, Li H, Tian Y, Cheng D, Sheng X, Han Y, Shan X, Li Y, Yuan H, Zhang J, Xue W, Liu K, Tian P. 2017. Cell-culture derived fowl adenovirus serotype 4 inactivated vaccine provides complete protection for virus infection on SPF chickens. *Virus Dis* 28(2): 182-188
10. Feichtner F, Schachner A, Berger E y Hess M. 2018. Development of sensitive indirect enzyme-linked immunosorbent assays for specific detection of antibodies against fowl adenovirus serotypes 1 and 4 in chickens. *Avian Pathology* 47(1):73-82.
11. Gomez-Sanchez M, Hung A, Ritchie A, Jara L, y Vallenás G. 2010. Caracterización molecular de Adenovirus Aviar presente en casos de Hepatitis a Cuerpo de Inclusion (HCI). En: XXII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Lima, Perú

12. Gowthaman V, Singh S, Dhama K, Barathidasan R, Asok Kumar M, Desingu P, Mahajan N, y Ramakrishnan M. 2012. Fowl Adenovirus in India: evidence for emerging role as primary respiratory pathogen in chickens. *Pak J Biol Sci* 15(18):900-903.
13. Gupta A, Ashfaque K, Ayalew L, Popovich S, Kurukulasuriya S, Goonewardene K, Gunawardana T, Karunarathna R, Ojkic D, Tikoo S, Wilson P, Gomis S. 2017. Immunogenicity and protective efficacy of virus-like particles and recombinant fiber protein in broiler-breeder vaccination against fowl adenovirus (FAdV)-8b. *Vaccine* (36): 2716-2722.
14. Gupta A, Popovich S, Ojkic D, Kurukulasuriya S, Chow-Lockerbie B, Gunawardana T, Goonewardene K, Karunarathna R, Ayalew L, Ahmed K, Tikko S, Wilson P, y Gomis S. 2018. Inactivated and live bivalente fowl adenovirus (FAdV8b + FAdV11) breeder vaccines provide broad-spectrum protection in chicks against inclusion body hepatitis (IBH). *Vaccine* (5):744-750.
15. Hess M. 2017. Commensal or pathogen - a challenge to fulfil Koch's Postulates. *Br Poult Sci* 58(1):1-12
16. Izquierdo-Lara R, Calderon K, Chumbe A, Montesinos R, Montalvan A, Gonzales A, Icochea E, Fernandez M. 2016. Complete Genome Sequence of Fowl Adenovirus Srotyp 8b Isolated in South America. *Genome Announc* 4(5):e01174-16.

17. Jiang Z, Liu M, Wang C, Li F, Song J, Pu J, Sun Y, Wang M, Shahid M, Wei F, Sun H. 2019. Characterization of fowl adenovirus serotype 4 circulating in chickens in China. *Veterinary Microbiology* (238): 108427
18. Junnu S, Lertwatcharasarakul P, Jala S, Phattanakulanan S, Monkong A, Kulprasertsri S, thivalai C, Chakritbudsabong W, Chaichoun K y Songserm T. 2015. An Inactivated Vaccine for Prevention and Control of Inclusion Body Hepatitis in Broilers Breeders. *Thai J Vet Med* (45):55-62.
19. Kim S, Lim T, Lee D, Youn H, Yuk S, Kim B, Choi S, Jung C, Han J, Song C. 2014. An inactivated oil-emulsion fowl Adenovirus serotype 4 vaccine provides broad cross-protection against various serotypes of fowl Adenovirus. *Vaccine* (32):3564-8
20. Li P, Zheng P, Zhang T, Wen G, Shao H, Luo Q. 2017. Fowl adenovirus serotype 4: Epidemiology, pathogenesis, diagnostic detection, and vaccine strategies. *Poultry Science* (00):1-11
21. Mahmood S, Ali S, Hussain I, Aslam A y Rafique A. 2014. The development of hydropericardium syndrome vaccines. *World's Poultry Science Journal* 70(2): 355-364.

22. Mansoor M, Iftikhar H, Muhammad A, Ghulam M. 2011. Preparation and evaluation of chicken embryo-adapted fowl adenovirus serotype 4 vaccine inn broiler chickens. *Tropical Animal Health Production* (43): 331-338

23. Marek A, Kajan G, Kosiol C, Benko M, Schachner A, y Hess M. 2016. Genetic duversity of species Fowl Adenovirus D and Fowl Adenovirus E. *Journal of General Virology* 97:2323-2332.

24. Matos M, Grafl B, Liebhart D, y Hess M. 2016. The outcome of experimentally induced inclusion body hepatitis (IBH) by fowl aviadenoviruses (FAdVs) is crucially influenced by the genetic background of the host. *Vet Res* 47:69-78

25. MINAG, 2020. Boletín Estadístico Mensual de la Producción y Comercialización Avícola. .
https://siea.midagri.gob.pe/portal/phocadownload/datos_estadisticas/mensual/Avicola/2022/avicola_12_2022.pdf

26. Mo K, Lyu C, Cao S, Li X, Xing G, Yan Y, Zheng X, Liao M, Zhou J. 2019. Pathogenicity of an FAdV-4 isolate to chickens and the genomic analysis. *Biomedicine&Biotechnology* 20(9):740-752

27. Niczyporuk J. 2018. Adenoviruses and their diversity in Poultry. In: *Application og Genetic and Genomics in Poultry Science*. Editor Xiaojun Liu. Intechopen Limited. Chapter 7.

28. Niu Y, Sun W, Zhang G, Qu Y, Wang P, Sun H, Xiao Y, Liu S. 2016. Hydropericardium syndrome outbreak caused by fowl adenovirus serotype 4 in China in 2015. *Journal Of General Virology* (97): 2684-2690
29. Niu Y, Sun Q, Zhuang G, Sun W, Liu X, Xiao Y, Shang Y, Liu S. 2017. Epidemiological investigation of outbreaks of fowl adenovirus infections in commercial chickens in China. *Transbound Emerg. Dis.* (65): 161-126
30. Niu Y, Sun Q, Shi Y, Ding Y, Li Z, Sun Y, Li M, y Liu S. 2019. Immunosuppressive potential of fowl adenovirus serotype 4. *Poultry Science* 98: 3514-3522.
31. Oliver-Ferrando S, Dolz R, Calderon C, Valle R, Rivas R, Perez M, Biarnes M, Blanco A, Bertran K, Ramis A, Busquets N, Majo N. 2017. Epidemiological and pathological investigation of fowl aviadenovirus serotypes 8b and 11 isolated from chickens with inclusion body hepatitis in Spain (2011-2013). *Avian Pathology* 46(2): 157-165
32. Pan, Q, Liu L, Gao Y, Liu, Qi X, Zhang Y, Wang Y, Li K, Gao L, Wang X, H. Cui. 2017. Characterization of a hypervirulent fowl adenovirus 4 with the novel genotype newly prevalent in China and establishment of reproduction infection model of hydropericardium syndrome in chickens. *Poultry Science* (96):1581-1588

33. Pan Q, Yang Y, Gao, Qi X, Liu C, Zhang Y, Cui H, Wang X. 2017. An inactivated novel genotype fowl adenovirus 4 protects chickens against the hydropericardium syndrome that recently emerged in China. 2017. *Viruses* (9): 216-225
34. Popovich S, Gupta A, Chow-Lockerbie B, Lisanevsk A, Ambrose N, Ojic D, Gunawardana T, Willson P, Tikoo S, Gomic S. 2018. Broad spectrum protection of broiler chickens against inclusion body hepatitis by immunizing their broiler breeder parents with a bivalent live fowl adenovirus vaccine. *Res Vet Sci* (118): 262-269
35. Ren G, Wang H, Yan Y, Liu F, Huang M, y Chen R. 2019. Pathogenicity of a fowl adenovirus serotype 4 isolated from chickens associated with hydropericardium-hepatitis syndrome in China. *Poultry Science* 98:2765-2771.
36. Rodríguez J, Koga Y, Alvarado A, Tinoco R .2014. Molecular Characterization of Peruvian Fowl Adenovirus (FAdV) Isolates. *Advances in Microbiology* (4):595-603
37. Ruan S, Zhao J, Yin X, He Z, y Zhang G. 2018. A subunit vaccine based on fiber-2 protein provides full protection against fowl adenovirus serotype 4 and induces quicker and stronger immune responses than an inactivated oil-emulsion vaccine. 2018. *Infection, Genetics and Evolution* 61:145-150.

38. Sahindokuyucu I. 2019. First report of fowl aviadenovirus serotypes FAdV-8b and FAdV-11 associated with inclusion body hepatitis in commercial broiler and broiler-breeder flocks in Turkey. *Archives of Virology* 165 (1): 43–51.
39. Schachner A, Marek A, Jaskulska B, Bilic I y Hess M. 2014. Recombinant FAdV-4 fiber-2 protein protects chickens Against hepatitis-hydropericardium syndorme (HHS). *Vaccine* 12: 1086-1082.
40. Schachner A, Matos M, Grafl B, Hess M. 2018: Fowl adenovirus (FAdV) induced diseases and strategies for their control – a review on the current global situation. *Avian Pathology*. 47(2):111-126.
41. Shah M, Ashraf A, Khan M, Rahman M, Habib M, Chughtai M, Qureshi J. 2017. Fowl adenovirus: history, emergence, biology and development of a vaccine against hydropericardium syndrome. *Archives of Virology* (162): 1833-1843.
42. Silvera M, Rodriguez J, Alvarado A, Koga Y, Tinoco R. 2016. Estudio de brotes de HCI en pollos de carne y la presencia de serotipos involucrados en el cuadro clínico durante el segundo semestre del 2015 y primer semestre del 2016. *Bioservice* 3–5 [Internet]. [accessed 19 de january 2020] . Available from: <https://bioservice.com.pe/hcisero.pdf>

43. Sianquez E. 2022. Caracterización molecular de la fibra de Adenovirus aviar grupo I aislado de explotaciones avícolas en Perú. Tesis para obtener el Título de Médico Veterinario Zootecnista. Lima, Universidad Peruana Cayetano Heredia, 52 pp.
44. Song C, Zhao S, Song M, Qiao Q, Yang P, Wang B, Cong Y, Wang Y, Liu H, Wang Z, Wang X, y Zhao J. 2023. An inactivated novel trivalente vaccine provides complete protection against FAdV-4 causing Hepatitis-Hydropericardium Syndrome and FAdV-8b/-11 causing Inclusion Body Hepatitis. *Transboundary and Emerging Diseases*. <https://doi.org/10.1155/2023/5122382>
45. Steer-Coope P, Sandy J, O'Rourke D, Scott P, Browning G, Noormohammadi A. 2019. Vaccination with FAdV-8a induces protection against inclusion body hepatitis caused by homologous and heterologous strains. *Avian Pathology* 48(5): 396-405
46. Sun J, Zhang Y, Gao S, Yang J, Tang Y, y Diao Y. 2019. Pathogenicity of fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) in chickens. *Infection, Genetics and Evolution*. 75

47. Vera-Hernandez, P, Morales-Garzon A, Cortes-Espinosa D, Galiote-Flores A, Garcia-Barrera L, Rodriguez-Galindo E, Toscano-Contreras A, Lucio-Decanini E, Absalon A. 2016. Clinicopathological characterization and genomic sequence differences observed in a highly virulent fowl adenovirus serotype 4. *Avian Pathology* (45): 73-81
48. Wang K, Sun H, Li Y, Yang Z, Ye J, Chen H. 2019. Characterization and pathogenicity of fowl adenovirus serotype 4 isolated from eastern China. *BMC Veterinary Research* (15): 373-382
49. Xia J, Yao K, Liu Y, You G, Li S, Liu P, Zhao Q, Wen Y, Wu R, Huang X, Cao S, Han X, Huang Y. 2017. Isolation and molecular characterization of prevalent Fowl adenovirus strains in southwestern China during 2015-2016 for the development of a control strategy. *Emerging Microbes & Infection* (6) e103.
50. Yu G, Lin Y, Dou Y, Tang Y, Diao Y. 2019. Prevalence of Fowl Adenovirus Serotype 4 and Co-infection by Immunosuppressive Viruses in Fowl with Hydropericardium Hepatitis Syndrome in Shandong Province, China. *Viruses* (11)517-525
51. Yugo D, Hauck R, Shivaprasad H, Meng X. 2016. Hepatitis Virus Infection in Poultry. *Avian Diseases* (60): 576-588.

IX. ANEXOS

Valores de Promedio Geométrico de los Títulos (PGT) Grupo 1

GRUPO 1 - CULTIVO CELULAR 10 ⁷				desafío	1 sem PI	2 sem PI
Código	21 días	33 días	42 días	48 días	56 días	63 días
1101	97	799	1495	3020	7600	18111
1102	236	378	703	1023	7588	18269
1103	548	220	209	221	7509	18350
1104	137	199	508	518	7460	17710
1105	48	214	732	1087	7556	16316
1106	141	339	759	1216	7562	17661
1107	131	158	214	244	7545	11443
1108	91	389	1043	1632	7538	17438
1109	163	447	545	995	7495	16964
1110	257	459	825	1750	7516	14064
1111	98	1144	2893	6065	7593	18679
1112	181	1142	1908	1260	7571	18811
1113	95	448	1118	1660	7543	8561
1114	81	1816	2242	3818	7584	16797
1115	49	572	1207	2200	7549	18112
1116	69	313	1360	2133	7481	18266
1117	137	290	3065	3951	7492	17703
1118	16	1158	1021	1481	7516	18269
1119	426	912	3833	5550	7559	17957
1120	30	584	3185	7818	7577	18670
1121		669	1390	3692	7525	18243
1122		500	361	628	7499	14894
1123		2938	2009	2469	7519	18503
1124		216	515	746	7555	10144
1125		833	881	2147	7606	10322
1126		910	1074	2405	7542	10328
1127		404	714	730	7531	9958
1128		142	300	561	7520	10190
1129		1121	1166	1982	7549	10182
PGT	111	515	986	1551	7541	15083

Valores de Promedio Geométrico de los Títulos (PGT) Grupo 2

GRUPO 2 – CONTROL POSITIVO

Código	21 días	33 días	42 días	desafío 48 días	1 sem PI 56 días	2 sem PI 63 días
6703	97	82	417	91		
6704	236	96	143	48		
6705	548	172	290	116		
6706	137	358	234	55		
6708	48	128	288	83		
6709	141	114	197	72		
6710	131	327	233	55		
6711	91	196	136	84		
6713	163	193	93	38		
6714	257	450	176	41	221	1819
6715	98	556	258	130		
6716	181	358	306	45		
6717	95	553	428	232	7517	10163
6718	81	148	57	56		
6719	49	171	82	30		
6720	69	324	89	65		
	137					
	16					
	426					
	30					
PGT	111.00	222	184	67	1289	4300

Valores de Promedio Geométrico de los Títulos (PGT) Grupo 3

**GRUPO 3 - CONTROL
NEGATIVO**

Código	desafío					
	21 días	33 días	42 días	48 días	56 días	63 días
8252	97	109	66	45	108	66
8253	236	606	139	242	53	83
8254	548	164	82	48	55	40
8255	137	203	140	83	67	75
8256	48	209	99	83	651	245
8257	141	467	13	260	269	204
8258	131	211	190	70	23	174
8259	91	161	40	47	84	103
8260	163	246	124	84	75	59
8261	257	162	155	80	120	271
	98					
	181					
	95					
	81					
	49					
	69					
	137					
	16					
	426					
	30					
PGT	111.00	222	85	86	96	109

