



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

Tesis

**“EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE DOSIS – RESPUESTA DE LA
VACUNA INACTIVADA CONTRA LA ENFERMEDAD DE
NEWCASTLE EN POLLO DE ENGORDA (*Gallus gallus*) “COBB 700”**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE MEDICO VETERINARIO Y
ZOOTECNISTA**

PRESENTA

ROBERTO OSORIO RODRÍGUEZ

DIRECTORES DE TESIS

MVZ.ESPA. SALVADOR VELAZQUEZ CANO

MC. JUAN ANTONIO JUÁREZ CORTEZ

TECAMACHALCO, PUEBLA MÉXICO A 6 DE ENERO 2022

DEDICATORIA

Le doy gracias a la vida por permitirme alcanzar uno de mis más grandes retos que ha sido el poder titularme. La espera ha concluido y doy gracias a Dios por brindarme esta oportunidad.

Le doy gracias a mis padres Eufrasio Osorio Rodríguez e Inés Rodríguez Rojas que me brindaron este gran regalo de la vida que fue el apoyarme para poder estudiar una carrera. Gracias por todos los sacrificios y esfuerzos y gracias a todo el apoyo incondicional que siempre me brindaron, incluyendo sus consejos y correcciones.

Gracias papás por toda la confianza que depositaron en mí, gracias por haberme formado y educado por un buen camino.

Doy gracias aquellas personas que no menciono, pero que de alguna manera me brindaron su apoyo durante todo este proceso de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por todo lo proporcionado durante mi estancia.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por todo el gran personal docente que tiene para impartirnos nuestras clases.

Al MVZ. MC. DC. Ernesto Soto Priante, quien me brindó su tiempo, apoyo y dedicación. Le agradezco por aportar su conocimiento y esfuerzo en la elaboración de mi tesis, muchas gracias Dr.

Al MVZ. ESPA. Salvador Velázquez Cano, quien me brindó la oportunidad de realizar mi tesis. Gracias por todo el apoyo brindado. Gracias Médico por todo lo que me enseñó para ser un profesional responsable.

Al MVZ. MC. Juan Antonio Juárez Cortez, por su tiempo, paciencia y por el apoyo que me brindó durante la realización de mi tesis. Gracias Médico.

Al MVZ. Sergio Rubén Aguilar Mazariegos, quien me proporcionó el material necesario para la realización de este proyecto. Gracias por su apoyo.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Contenido | |
| RESUMEN | 6 |
| 1.1 ABSTRACT | 7 |
| INTRODUCCIÓN | 8 |
| Planteamiento del problema..... | 9 |
| OBJETIVOS | 10 |
| 4.1 Objetivo general | 10 |
| 4.2 Objetivos específicos | 10 |
| Hipótesis..... | 10 |
| MARCO TEORICO..... | 11 |
| 6.1 Introducción (EN) | 11 |
| 6.2 Importancia económica | 12 |
| 6.3 Importancia para la salud publica | 12 |
| 6.4 Historia | 13 |
| 6.5 Etiología | 13 |
| 6.6 Morfología | 16 |
| 6.7 Composición química | 16 |
| 6.8 Propiedades biológicas | 17 |
| 6.8.1 Actividad de hemaglutinación (ha) | 17 |
| 6.8.2 Actividad de la neuraminidasa | 17 |
| 6.8.3 Fusión celular y hemolisis | 18 |
| 6.8.4 Replicación viral | 18 |
| 6.8.5 Clasificación de las cepas | 19 |
| 6.8.6 Antigenicidad | 19 |
| 6.8.7 Inmunogenicidad | 20 |
| 6.9 Incidencia y distribución | 20 |
| 6.10 Transmisión | 21 |
| 6.11 Periodo de incubación | 22 |
| 6.12 Signos clínicos | 22 |
| 6.13 Patología | 23 |
| 6.14 Patogenia | 23 |

| | | |
|----------------------------|--|----|
| 6.15 | Lesiones microscópicas | 24 |
| 6.16 | Inmunidad..... | 24 |
| 6.17 | Aislamiento e identificación del agente causal (OIE, 2018) | 26 |
| 6.18 | Técnicas de diagnóstico | 26 |
| 6.19 | Identificación del agente | 27 |
| 6.19.1 | Muestras para el aislamiento vírico | 27 |
| 6.19.2 | Pruebas víricas | 28 |
| 6.19.3 | Índice de patogenicidad (IP) | 28 |
| 6.19.4 | Índice de patogenicidad intracerebral (ICPI) | 29 |
| 6.19.5 | Técnicas moleculares para diagnóstico | 30 |
| 6.19.6 | Pruebas serológicas..... | 30 |
| 6.19.7 | Pruebas de hemaglutinación (HA) y de inhibición de la hemaglutinación (HI). | 31 |
| 6.19.8 | Prueba de enzimoanálisis..... | 32 |
| 6.20 | Vacunación (OIE, 2018). | 32 |
| 6.21 | Diagnóstico diferencial..... | 33 |
| 6.22 | Tratamientos | 33 |
| MATERIALES Y METODOS | | 34 |
| 7.1 | Establecimiento del experimento | 34 |
| 7.2 | Metodología del estudio | 34 |
| 7.2.1 | Tratamientos o grupos | 34 |
| 7.2.2 | Desarrollo de la prueba | 35 |
| 7.2.3 | Análisis de varianza | 36 |
| 7.2.4 | Análisis estadístico | 36 |
| RESULTADOS | | 38 |
| 8.1 | Resultados de las aves del grupo control. | 38 |
| 8.2 | Resultados de aves del grupo 1, vacunadas con una vacuna inactivada y emulsionada de VEN cepa LaSota con 38% de antígeno con una dosis de 0.5 mL y dos virus activos de VEN cepa LaSota aplicados a los 10 y 21 DE..... | 38 |
| 8.3 | Resultados de aves del grupo 2, vacunados con una vacuna inactivada y emulsionada bivalente con virus de Influenza Aviar (VIA) subtipo H5N2 cepa oficial 1994 y VEN cepa LaSota con 20% de antígeno y dos virus activos de VEN cepa LaSota aplicados a los 10 y 21 DE..... | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 8.4 Resultados de aves del grupo 3, vacunados con una vacuna inactivada y emulsionada con VEN cepa Ulster con 20% de antígeno y dos virus activos de VEN cepa LaSota aplicados a los 10 y 21 DE..... | 40 |
| 8.5 Resultados de aves del grupo 4, vacunados con una vacuna inactivada y emulsionada con VEN cepa LaSota con 20% de antígeno y dos virus activos de VEN cepa LaSota aplicados a los 10 y 21 DE..... | 40 |
| DISCUSIÓN | 42 |
| CONCLUSIONES..... | 45 |
| ANEXOS | 46 |
| BLOGRAFIA..... | 51 |

RESUMEN

El presente estudio se realizó en el municipio de Tecamachalco, Puebla, en la granja San Ignacio, con el objetivo de evaluar la aplicación de la vacuna inactivada con cepa LaSota a diferentes dosis, para estimular la inmunidad humoral y así prevenir la presencia de la enfermedad de Newcastle en las aves de engorda en la región de Tecamachalco. Se probaron cuatro vacunas inactivadas y emulsionadas contra la enfermedad de Newcastle (EN) las cuales se administraron por vía subcutánea en la parte media y posterior del cuello a los 12 días de edad (DE): Vacuna con virus de la EN (VEN) cepa LaSota con 38% de antígeno; Vacuna bivalente con virus de Influenza Aviar (VIA) subtipo H5N2 cepa oficial 1994 – VEN cepa LaSota con 20% de antígeno; Vacuna con VEN cepa Ulster con 20% de antígeno; Vacuna con VEN cepa LaSota con 20% de antígeno. Se dejó un grupo sin vacuna inactivada contra la EN como control. Se realizan 8 muestreos serológicos a los días 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 DE. Únicamente se tomaron 10 sueros de cada grupo vacunado y 10 sueros de cada grupo control utilizando la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI) para determinar el nivel de anticuerpos humorales inducidos, lo cual fue expresado como media geométrica. Los resultados obtenidos indican que entre las diferentes vacunas existieron diferencias estadísticas significativas ($<.0001$). La vacuna que generó mayor nivel de anticuerpos fue la vacuna con virus de la enfermedad de Newcastle cepa LaSota con 38% de antígeno, y la que produjo menor número de anticuerpos fue la Newcastle 20% de antígeno. En la actualidad nos enfrentamos a un problema latente con la enfermedad de Newcastle y las cuantiosas pérdidas que ocasiona tanto a la avicultura nacional como mundial. El trabajo realizado genera gran controversia sobre cómo elegir tanto un adecuado calendario de vacunación, así como una vacuna adecuada que estimule una buena respuesta de anticuerpos.

PALABRAS CLAVES:

Genotipo, vacuna, antígeno.

2.1 ABSTRACT

The present study was carried out in the municipality of Tecamachalco, Puebla, at the San Ignacio farm, with the objective of evaluating the administration of different inactivated vaccines against Newcastle disease (ND) at different doses, to stimulate humoral immunity and thus prevent the effects the disease in broilers in the region.

Four inactivated and emulsified vaccines against ND were tested and administered subcutaneously in the mid and back portion of the neck at 12 days of age. ND virus (NDV) LaSota strain vaccine with 38% antigen; bivalent vaccine with NDV LaSota strain and avian influenza virus (AIV) subtype H5N2 official strain 1994; NDV LaSota strain vaccine with 20% antigen; NDV Ulster strain vaccine with 20% antigen. A group without inactivated NDV vaccine was left as a control. 8 serological samplings were carried out on days 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 and 49. 10 sera samples were taken from each vaccinated group and 10 sera samples from each control group using the hemagglutination inhibition test (HI) to determine the level of induced humoral antibodies, which was expressed as a geometric mean.

KEYWORDS:

Genotype, vaccine, antigen.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle (EN) es una infección viral de distribución mundial, altamente contagiosa de las aves domésticas y silvestres, que causa alta morbilidad y mortalidad, así como severa disminución en la producción de huevo (OIE).

Es una de las enfermedades más costosas a las que se enfrenta la industria avícola, no solo por sus efectos devastadores en la viabilidad, sanidad y productividad de las parvadas, sino por los costos inherentes a las acciones de control y a las pérdidas de mercados por barreras comerciales derivadas de su presencia (Perozo, 2012).

Diversos países desarrollados se mantienen libres (mediante la eliminación de focos de infección) de las formas altamente virulentas, como los Estados Unidos de América, Canadá, y diversos países europeos. En algunos países latinoamericanos se ha podido erradicar la forma velogénica de la EN como son Brasil, Argentina, Chile y Costa Rica, pero en otros, como México, Venezuela, Colombia, Perú, Bolivia y Ecuador esta presentación de la enfermedad es lamentablemente endémica. En países asiáticos y africanos, la EN es también un problema muy importante (Mosqueda, 2012). La EN ha sido clasificada como la cuarta enfermedad más devastadora, por detrás de la gripe aviar altamente patógena y la bronquitis infecciosa (Kumar, *et al.*, 2011).

La EN es causada por un virus perteneciente al orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Avulavirus*. Existen 10 serotipos de Paramixovirus aviar (PMVA-1 a PMVA-10), pero todos los aislamientos de virus de la EN pertenecen al serotipo 1 (APMV-1), por lo tanto, EN es sinónimo de APMV-1 (Cattoli, *et al.*, 2011).

El nombre EN está reservado exclusivamente para la enfermedad que resulta de la infección con cepas de APMV-1 que son patógenas para los pollos domésticos (OIE; Chong, *et al.*, 2010).

Planteamiento del problema

La EN se define como una infección de las aves de corral, causada por el virus de la enfermedad de Newcastle, altamente contagiosa que afecta a muchas especies de aves domésticas y silvestres. Afecta más notoriamente a las aves de corral debido a su alta susceptibilidad y a las posibilidades de impacto severo que una epidemia causa en la industria avícola (SENASICA, 2015).

La EN, sin duda alguna, se ha convertido en un problema sanitario en el sector avícola del país, ocasionando pérdidas económicas de gran magnitud, tanto en mortalidad como en la caída de producción de huevo, alterando específicamente al rendimiento productivo de las aves. Hoy en día, la elección de una vacuna adecuada que genere un nivel de inmunidad humoral suficiente es necesaria para evitar estas pérdidas económicas cuando las parvadas sean expuestas al virus de la EN (VEN).

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar diferentes vacunas inactivadas contra la EN elaboradas con diferente cepa vacunal y concentración de antígeno para estimular la inmunidad humoral que se traduce en una respuesta de anticuerpos protectores contra la EN en las aves de engorda en la región de Tecamachalco.

5.2 Objetivos específicos

Analizar la respuesta inmune de las aves luego de la aplicación de las diferentes vacunas inactivadas contra la EN en estudio, para determinar el nivel de los anticuerpos circulantes inducido a diferentes tiempos y con ello determinar cuál vacuna ofrece el mejor resultado.

Hipótesis

La aplicación de vacunas inactivadas y emulsionadas contra la EN con mayor concentración antigénica, nos dará una respuesta inmunológica mayor y por ende una mejor protección contra los efectos del VEN.

MARCO TEORICO

7.1 Introducción (EN)

La enfermedad de Newcastle (EN) está causada por cepas virulentas del paramixovirus aviar tipo 1 (PMVA-1), que es un serotipo del género *Avulavirus* perteneciente a la subfamilia *Paramyxovirinae*, familia *Paramyxoviridae*. Los paramixovirus aislados procedentes de especies aviares se han clasificado mediante pruebas serológicas y análisis filogenéticos en diez subtipos, denominados PMVA-1 a PMVA-10 (Miller *et al.*, 2010a); el virus de la EN (VEN) se ha denominado PMVA-1 (Alexander & Senne, 2008; OIE, 2018).

Las familias Paramyxoviridae, Filoviridae, Bornaviridae, y Rhabdoviridae forman el orden mononegavirales, virus de sentido negativo, de cadena única con simetría de cápside helicoidal. La subfamilia *Paramyxoviridae* incluye muchos patógenos veterinarios y humanos importantes. La subfamilia *Paramyxovirinae* actualmente los géneros que incluyen patógenos humanos y veterinarios importantes como Rubulavirus; Respirivirus; Morbillivirus; Henipavirus, y el género *Avulavirus* que contiene el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y otros paramixovirus aviares (APMV). Se han reconocido once serotipos de paramixovirus aviares siendo APMV-1 el patógeno más importante para las aves de corral con las formas virulentas del serotipo definido como virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). NDV sigue siendo un serio impedimento para la producción avícola y sigue siendo un problema de control en todo el mundo. (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

Diversos países desarrollados se mantienen libres (mediante la eliminación de focos de infección) de las formas altamente virulentas, como los Estados Unidos de América, Canadá, y diversos países europeos. En algunos países latinoamericanos se ha podido erradicar la forma velogénicas de la EN cómo son Brasil, Argentina, Chile y Costa Rica, pero en otros, como México, Venezuela, Colombia, Perú, Bolivia y Ecuador esta presentación de la enfermedad es

lamentablemente endémica. En países asiáticos y africanos, la EN es también un problema muy importante (Mosqueda, 2012).

7.2 Importancia económica

Las enfermedades de las aves de corral tienen un impacto significativo en el bienestar humano, especialmente en las zonas rurales donde los pollos de traspatio son una fuente de ingresos y una fuente de alimentos crucial para las personas de áreas rurales. Los países con producción avícola industrializada también gastan grandes cantidades de dinero para prevenir la EN, para mantener un estatus libre de EN, o erradicar la EN después de un brote (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

7.3 Importancia para la salud pública

El aislamiento del VEN, en seres humanos es raro; sin embargo, cuando ocurre, con mayor frecuencia se aísla de aquellos que trabajan estrechamente con especies avícolas, tienen infecciones adquiridas en laboratorio o tienen infección por contacto con vacunas vivas contra el VEN. Las personas desarrollan una conjuntivitis autolimitada sin afectación de la córnea, es la presentación más común después de la infección por contacto directo con líquidos infecciosos o mediante la transmisión en aerosol. Los datos de informes de los síntomas son similares a los de la gripe en humanos. El contacto casual con aves de corral vacunadas o infectadas representa un bajo riesgo de infección humana, sin embargo, la inmunosupresión puede aumentar la posibilidad de una infección grave. No hay informes de propagación de humano a humano (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

7.4 Historia

A partir de su primera aparición documentada en la Isla de Java 1926 y luego en Inglaterra, se ha diseminado paulatinamente en el resto del mundo en forma de pandemias. Los avances de la biotecnología han permitido escudriñar sobre los puntos de origen de estos peculiares brotes y su ulterior distribución a través de los países y continentes. Estos estudios, de elevado nivel científico, muestran cómo las circunstancias y la propia evolución del virus han facilitado su propagación, así como su perpetuación en muchas naciones. Mediante estudios del genoma viral se ha establecido la relación de parentesco, cercano o lejano, entre los distintos aislamientos del VEN aislados en el mundo, y por ende sus movimientos entre los países y regiones (Mosqueda, 2012). Sin embargo, hubo informes de brotes de enfermedades en pollos y palomas en Europa Central antes de 1926 similares a lo que ahora reconocemos como EN. A pesar de que Doyle inicialmente sugirió la "enfermedad de Newcastle" como un apodo temporal en brotes de aves causados por este virus, con el tiempo se ha convertido en la designación de paramyxovirus aviar tipo I (APMV-I), fue sugerido por Tumova años más tarde para distinguir VEN de otros serotipos de paramixovirus aviares. De acuerdo con las definiciones de la OIE, se define como VEN a todas aquellas infecciones causadas por un APMV-I virulento, mientras que el término APMV-I se utiliza para referirse al VEN de avirulencia o baja virulencia (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013). El VEN fue reportado por primera vez en México en 1946, aunque es muy probable que fuera introducido al país mucho tiempo atrás. Sin embargo, como la avicultura en esa época consistía en pequeños gallineros, las pérdidas nunca se consideraron de gran magnitud (Dueñas, *et al.*, 2012).

7.5 Etiología

La EN es una de las más contagiosas enfermedades virales aviares, diseminándose rápidamente entre la población susceptible. El VEN es por

definición un virus virulento, clasificado en el género *Avulavirus*, en el grupo de Paramixovirus aviar serotipo 1. Sin embargo, algunos virus dentro de este grupo no corresponden a la definición ya que también existen aislamientos avirulentos o de baja virulencia por lo que únicamente se nombren aislamientos de APMV-1 (Maclachlan Dubovi, 2011).

El genoma de los APMVs (figura 1) tiene un tamaño de 14 a 17 kb dividido en seis genes en una serie lineal, mismos que codifican para proteínas estructurales denominadas como nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M), proteína de fusión (F), proteína de fijación denominada hemaglutinina-neuraminidasa (HN), y proteína grande de la polimerasa (L) (Kumar, et al., 2011).

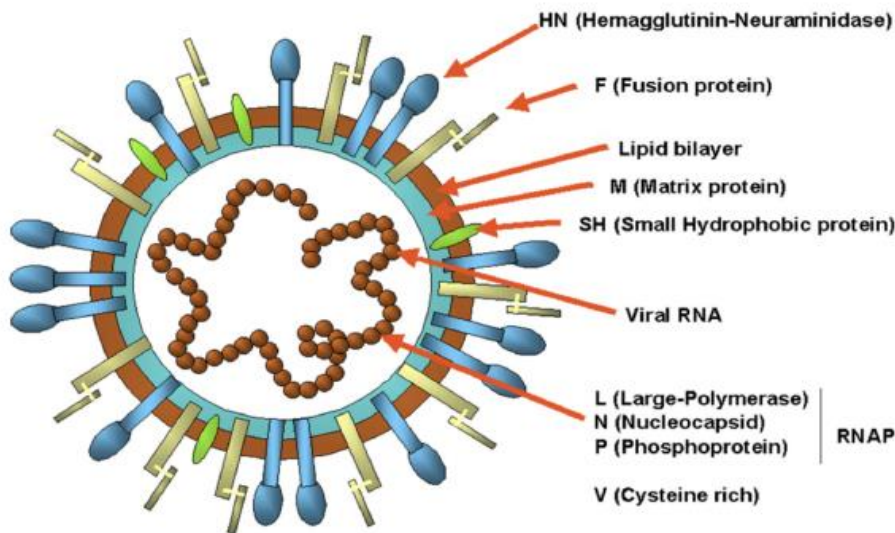


Figura 1. Estructura del virus de EN (Kumar, et al., 2011).

De acuerdo con la OIE, los aislamientos tienen diferente patogenicidad embrionaria (tiempo necesario para causar la muerte de los embriones inoculados o tiempo medio de muerte embrionaria o TMME) (OIE, 2018), clasifican como:

- Cepas Lentogénicas (TMME más de 90 horas).
- Cepas Mesogénicas (TMME entre 60 y 90 horas).
- Cepas Velogénicas (TMME menos de 60 horas).

Entre los signos clínicos que pueden estar asociados con la enfermedad se encuentran problemas respiratorios, gastrointestinales y nerviosos (Cuello, *et al.*, 2011; OIE, 2018).

De acuerdo con la OIE, existen cinco diferentes patotipos de acuerdo con su presentación clínica en aves susceptibles:

- Presentación Velogénica viscerotrópica: Muy patogénica. Se presenta con mortalidad elevada, frecuentemente se encuentran lesiones intestinales hemorrágicas.
- Presentación Velogénica neurotrópica: Muy patogénica. Se presenta con mortalidad elevada, frecuentemente con signos clínicos respiratorios y nerviosos.
- Presentación Mesogénica: Se presenta con baja mortalidad, con signología clínica respiratoria y nerviosa.
- Presentación Lentogénica: Se presenta sin mortalidad, con signología clínica respiratoria leve.
- Presentación Entérica o asintomática: Se presenta sin mortalidad y normalmente consiste en una infección intestinal subclínica.

7.6 Morfología

Los miembros de la familia Paramyxoviridae tienen una envoltura lipídica bicapa que se origina en la gemación de la membrana plasmática de las células huésped en las que se replica el virus. Los viriones del VEN son pleomórficos, pero pueden parecer redondos con un diámetro entre 100 y 500 nm, o filamentosos con un diámetro de aproximadamente 100 nm y variación en su longitud. Las glicoproteínas de fusión (F) y hemaglutinina-neuraminidasa (HN), de 17 nm de longitud, están densamente empaquetadas en la superficie del virión. La proteína nucleocápside parece tener un tipo de patrón de espiga y está asociada con la fosfoproteína (P) y la proteína grande de la polimerasa (L) (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

7.7 Composición química

La masa molecular (M_r) de un solo genoma de Paramyxovirus es de aproximadamente 500×10^6 , la densidad boyante en sacarosa es de 1,18—1,20 g/cm³, y el coeficiente de sedimentación S₂₀. Los aislamientos de APMV-I tienen al menos 3 tamaños de genoma; 15,186; 15,192; y 15,198 pares de bases. Las partículas del virus son aproximadamente 20%-25% peso/peso (p/p) de lípido derivado de la célula huésped y alrededor del 6% p/p de carbohidrato. El genoma del VEN está compuesto por 6 proteínas estructurales, enumeradas de 3' a 5': proteína nucleocápside (N), fosfoproteína (P), matriz (M), fusión (F), hemaglutinina neuraminidasa (HN), y la ARN polimerasa dependiente de ARN (RNAP), designada la polimerasa grande (L) (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

La N, P y L están asociados a la nucleocápside y hay 3 proteínas asociadas a la membrana: la proteína M de la membrana interna no glicosilada, la proteína F glicosilada y la proteína de unión glicosilada HN (la edición del ARN 141 o la

proteína P produce una proteína adicional, la proteína V) cuando el residuo de guanina se añade al sitio de edición conservado del ARNm por el RNAP. La proteína V es rica en cisteína y se une al zinc, y la porción carboxy-terminal tiene una actividad anti-interferon, lo que permite al virus reducir la respuesta inmune innata del huésped. La actina de la proteína huésped también se incorpora a las partículas de virus y se utiliza para la entrada, replicación y transporte de virus a través de la célula (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

7.8 Propiedades biológicas

7.8.1 Actividad de hemaglutinación (ha)

La capacidad del VEN y otros paramixovirus aviares para aglutinar los glóbulos rojos, se debe a la unión de la proteína HN a los receptores del ácido siálico en la superficie de los glóbulos rojos. La propiedad de aglutinación del virus y su inhibición por antisueros han demostrado ser herramientas poderosas en el diagnóstico de la EN. Los glóbulos rojos de pollo generalmente se utilizan en las pruebas de inhibición de la hemaglutinación (HI), pero el VEN causa la aglutinación de glóbulos rojos de otras especies. Esto sugiere que la diferencia de receptores entre especies puede afectar la transmisibilidad y la replicación entre especies (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

7.8.2 Actividad de la neuraminidasa

La proteína HN, también tiene actividad enzimática de la neuraminidasa (mucopolisacárido N-acetil neuraminil hidrolasa) que degrada el receptor de ácido siálico, previniendo la auto-fijación de partículas virales y la agrupación resultante del virus de la progenie. La actividad enzimática también permite que los glóbulos rojos eventualmente se eludan del virus (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

7.8.3 Fusión celular y hemólisis

Las proteínas de fusión de los APMVs, son capaces de inducir la hemólisis o la fusión celular de otras células y esta fusión es independiente del pH y se produce a un pH neutro. La actividad e infectividad del virus depende de la escisión proteolítica de una proteasa huésped de la proteína F0 precursora en el heterodímero unida por un enlace disulfuro. La escisión también puede ser realizada por proteasas bacterianas. La unión del virus al sitio del receptor huésped durante la replicación es seguida por la fusión de la membrana del virus con la membrana celular, lo que puede resultar en la fusión de células vecinas y la formación de células multinucleadas. La membrana rígida de los glóbulos rojos generalmente se rompe cuando la membrana del virus se fusiona, causando hemólisis. El F0 se escinde, como se discutió anteriormente, y se relaciona con la patogenicidad de la cepa VEN (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

7.8.4 Replicación viral

La HN une el virus al receptor de la célula huésped y activa la proteína F para fusionar el virus a las membranas de la célula huésped, permitiendo que el complejo de nucleocápside viral entre en la célula huésped. La entrada del virus es posiblemente dependiente de la presencia de colesterol y puede ocurrir a través del proceso de endocitosis. Los paramixovirus se replican completamente en el citoplasma de la célula huésped. La replicación comienza cuando la ARN polimerasa dependiente de ARN (L) transportada en la partícula del virus se libera en el citoplasma, comenzando la transcripción del genoma del ARN del sentido negativo en sentido positivo, 5' capsular y 3' ARN mensajero (ARNm). Después de que el ARNm se traduce en proteínas virales, el genoma del sentido negativo se replica, produciendo un ARN antígenómico de longitud completa que sirve como plantilla para la síntesis de ARN genómico de longitud completa. Las proteínas HN virales sintetizadas en una célula infectada se transportan en la

membrana celular y se incorporan a la membrana celular, siguiendo la alineación de la nucleocápside y el ARN viral cerca de las regiones de la membrana celular que contiene las glicoproteínas virales (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

7.8.5 Clasificación de las cepas

El término cepa se utiliza para indicar un aislamiento bien caracterizado de un virus o bacteria. La nomenclatura sugerida para los aislamientos de APMV-I son similares a los aislamientos del virus de influenza aviar. El objetivo principal en la caracterización de los virus es agrupar virus similares generalmente basados en su virulencia. Todos los aislamientos de APMV-I son de un serotipo porque los anticuerpos a la tensión pueden neutralizar todos los aislamientos del VEN (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

7.8.6 Antigenicidad

Las variaciones entre diversos aislamientos de VEN han sido demostrados por la neutralización del virus (VEN). Los anticuerpos monoclonales se han utilizado para colocar cepas del VEN en grupos sobre la base de su capacidad de reaccionar con los diferentes anticuerpos monoclonales (MAbs) (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

7.8.7 Inmunogenicidad

En el sentido más amplio, todos los estudios de vacunas prueban la inmunogenicidad o la capacidad de una vacuna para inducir anticuerpos humorales circulantes y con ello proporcionar una protección significativamente mejor sobre otras vacunas para esa situación específica. Esta evaluación puede implicar la cantidad de anticuerpos producidos, la reducción en el número de aves enfermas o muertas después del desafío, y como se mencionó anteriormente, la disminución de la cantidad excretada de virus virulento de desafío. Las vacunas formuladas con la misma cepa de VEN e incluso clones de VEN pueden no tener la misma inmunogenicidad. Se ha encontrado que los clones de LaSota son menos protectores que las vacunas formuladas con la cepa LaSota de tipo silvestre. La inmunogenicidad de un virus también depende de la vía de administración de la vacuna (Miller y Koch, *Diseases of Poultry*, 2013).

7.9 Incidencia y distribución

Hay muy pocas áreas del mundo que aún no han sido afectadas por la EN. Desde julio 2009 hasta diciembre 2011, 86 países notificaron infecciones por VEN a la OIE. La EN sigue siendo una amenaza constante para los productores avícolas en todo el mundo, a pesar de la disponibilidad y el empleo mundial de vacunas desde la década de 1950 (Kapcznski, *et al.*, 2013).

El control exitoso de la enfermedad debe pasar necesariamente por el diagnóstico óptimo, medidas adecuadas de bioseguridad y la implementación de programas de vacunación ajustados a la realidad de la explotación. Los esfuerzos de investigación actualmente se dirigen al desarrollo de métodos de diagnóstico y tipificación que permitan el análisis filogenético y epidemiológico. También se detectan brotes esporádicos en países que no tienen VEN endémico en aves de

corral, aunque gracias a su política de eliminación de parvadas afectadas con compensación económica, la enfermedad no se ha vuelto endémica (Kapcznski, *et al.*, 2013).

El primer brote reconocido para la EN que se extendió por todo el mundo, parece haber comenzado en Sudoeste Asiático en 1926 y se traslada a Inglaterra en ese año. Un segundo brote da comienzo en Medio Oriente y se extendió a otros países en 1973. El tercer brote reportado da comienzo a finales de 1970 (Miller y Koch, *Diseases of Poultry*, 2013).

En países con brotes frecuentes como es el caso de México y Venezuela, es mucho lo que se ha ensayado para su control con resultados no siempre satisfactorios (Perozo, 2012).

7.10 Transmisión

Se ha documentado que el VEN afecta al menos a 241 especies de aves. Las aves inmunizadas y que se infectan, pueden excretar el VEN durante seis a nueve días después del desafío. La transmisión horizontal de VEN se ha documentado muchas veces. Las aves infectadas arrojan VEN en secreciones orofaríngeas y materia fecal, las aves susceptibles pueden infectarse inhalando polvo contaminado o virus aerosolizados, o ingiriendo dicho material. La ingestión de heces puede causar infección en pollos. Los casos de transmisión vertical de VEN por parte de las madres a la descendencia, son difíciles de probar debido a la posibilidad de que las crías sean infectadas por heces contaminadas a través de grietas en la cáscara de huevo o por exposición a un ambiente contaminado (Miller y Koch, *Diseases of Poultry*, 2013).

- Transmisión horizontal: las aves susceptibles pueden infectarse inhalando polvo contaminado, virus aerosolizados o ingiriendo dicho material.

- Transmisión vertical: La transmisión vertical de los padres hacia la progenie es difícil, pero se ha documentado de brotes de campo en México.

7.11 Periodo de incubación

El tiempo entre la exposición a VEN y el desarrollo de signos clínicos varía dependiendo de la especie huésped, el estado inmunológico del huésped a VEN, la edad del huésped, la salud del huésped, la virulencia del virus, la dosis o cantidad de virus recibido, e incluso la ruta de exposición. El período de incubación para exposiciones naturales a VEN varía entre 2 y 15 días, con un promedio de alrededor de 5-6 días, pero puede tardar de 3 a 4 semanas en algunas circunstancias. La infección experimental con VEN viscerotrópico virulento en pollos da lugar generalmente a un período de incubación de 1 a 4 días dependiendo de la dosis del desafío. La transmisión por aerosol puede tener un tiempo de incubación más corto que una infección iniciada a través de la ingestión del virus (Cuello, *et al.*, 2011; OIE, 2018; (Miller y Koch, *Diseases of Poultry*, 2013).

7.12 Signos clínicos

El VEN es pantotrofo y citocida, lo que significa que afecta todos los aparatos y sistemas destruyendo las células. La enfermedad incluye signos clínicos respiratorios, gastrointestinales y nerviosos (Cuello, *et al.*, 2011).

El conjunto particular de las manifestaciones clínicas depende de la edad, el estado inmunológico del huésped, la virulencia y el tropismo de la cepa de virus infectante.

Las cepas velogénicas pueden causar mortalidad cercana al 100% sin signos clínicos, así como una disminución en la producción de huevo que puede ser también del 100% (Maclachlan y Dubovi, 2011).

Los pollos no vacunados e infectados con VEN se tornan apáticos y deprimidos dos días posterior a la infección terminando con una mortalidad muy alta al tercer o cuarto día.

En una infección oculonasal se aprecia una conjuntivitis bilateral con cierta hinchazón facial. A menudo se observa la presencia de moco claro en la cavidad oral presentando las aves una inclinación de su cabeza hacia el suelo, hay presencia de heces verdes acuosas y crestas cianóticas. Las aves pueden parecer excitables e hipermetricas tres o cuatro días posterior a la infección; cinco días después hay presencia de temblores en cabeza, temblores musculares, torticollis o la parálisis del ala o pierna (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

7.13 Patología

La patogenicidad de los aislamientos del VEN varía de acuerdo con el hospedero. En los pollos, la enfermedad puede presentarse como muerte súbita y llegar al 100% de la parvada, o simplemente como una infección subclínica sin mortalidad (Cuello, *et al.*, 2011).

Al igual que los signos clínicos, las lesiones más severas en órganos afectados depende de muchos factores y no son patognomonicos. Las lesiones en aves vacunadas suelen no ser visibles. Los pollos ocasionalmente presentan congestión esplénica moderada y atrofia tímica leve después de una infección con VEN neurotrópico virulento (Perozo, 2012).

7.14 Patogenia

Inicialmente el virus se replica en las células epiteliales de las mucosas del tracto respiratorio e intestinal.

Inmediatamente después produce una primera viremia (4 a 24 horas post-infección) y el virus llega a diferentes órganos como son el hígado, bazo, tonsilas cecales, placas de Peyer, células linfoides circulantes y folículos linfoides.

Inmediatamente después ocurre una segunda viremia (4 a 6 días post-infección) y el virus llega a todo el tracto respiratorio, tracto digestivo, tracto urinario, aparato circulatorio y sistema nervioso central (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

7.15 Lesiones microscópicas

Las lesiones más comunes en pollos infectados con VEN virulentos son la necrosis con agotamiento linfóide de tonsilas cecales, bazo, timo y bolsa de Fabricio (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

También se observa una destrucción masiva de células en cualquier órgano del cuerpo de las aves, que incluye:

- Aerosaculitis linfocítica.
- Contenido perivasculario.
- Necrosis de medula ósea.
- Necrosis pancreática.
- Necrosis ulcerativa de epitelio intestinal.
- Traqueítis ulcerosa y hemorrágica.

7.16 Inmunidad

La inmunidad hacia el VEN se ha estudiado ampliamente en aves libres de patógenos y anticuerpos específicos (SPF) e inmunizadas con virus vacunal contra la VEN (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

- Inmunidad pasiva: Los anticuerpos maternos contra el VEN que se transmiten de las madres a los embriones a través de la yema de huevo (IgM e IgG, también denominados IgY), pueden ser protectores al desafío de la progenie contra un VEN dependiendo del nivel de anticuerpos transferidos. En aves de engorda los anticuerpos maternos son detectables

desde el primer día de edad hasta su total catabolismo, el cual sucede alrededor de los 12 días de edad.

- Inmunidad activa: La inducción de la producción de anticuerpos contra el VEN se logra mediante la aplicación de vacunas. Para la EN, en los programas de vacunación se utilizan tanto vacunas activas como vacunas inactivadas, ya que cada una de ellas estimula la producción de diferente tipo de inmunidad, pero ambas son necesarias para evitar los efectos devastadores de esta enfermedad.

Los tres diferentes tipos de inmunidad que se obtienen son:

- **Inmunidad celular (IC) o también denominada inmunidad mediada por células (IMC):** se obtiene por la estimulación de los Linfocitos T (LT), que incluyen LT Citotóxico, LT Ayudadores, LT de memoria y LT supresores son estimulados. La IMC destruye los virus que ya están infectando a las células respiratorias en donde no tienen acceso los anticuerpos. La IMC permite identificar infecciones sucesivas con una respuesta inmune más rápida. La IMC únicamente se induce cuando se aplican virus vacunales activos y se activa a partir de las 24 horas postinmunización (PI).
- **Inmunidad mucosal (IM):** Se obtiene por la estimulación del Tejido Linfoide Asociado en las mucosas (TLAM o MALT). Este tejido Linfoide tiene un área aferente que recibe las partículas extrañas, produce IgA que neutralizan a los virus, se mantiene en contacto y estimula otros sitios linfoides como son: Tejido linfoide asociado en intestino: TLAI o GALT, Tejido linfoide asociado en bronquios: TLAB o BALT. La IM únicamente se induce cuando se aplican virus vacunales activos y se activa a partir de las 24 horas postinmunización (PI).

- **Inmunidad humoral:** La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra la infección con los VEN en las aves, en el cual, los componentes del sistema inmunitario atacan y neutralizan a los virus con anticuerpos (IgM e IgG). Los anticuerpos son producidos por el contacto de los macrófagos con las células B, las cuales producen células plasmáticas (inmunoglobulinas) que circulan en la sangre a partir de los 14 días PI. La inmunidad humoral es principalmente inducida por vacuna inactivadas, pero, aunque en una pequeña cantidad, también por las vacunas activas.
- **Interferencia viral (IV):** En el caso de la vacunación contra la EN utilizando virus activos, también se estimula el fenómeno de interferencia viral, el cual consiste en el bloqueo de los receptores celulares (ácido siálico) que los VEN necesitan para poder iniciar la infección seguida de la endocitosis. La IV únicamente se induce cuando se aplican virus vacunales activos y se activa a partir de las 24 horas postinmunización (PI).

7.17 Aislamiento e identificación del agente causal (OIE, 2018)

Los hisopos traqueales, orofaríngeos y/o cloacales de aves vivas, o muestras de tejido de órganos (cerebro, hígado, bazo, riñón u órganos con lesiones) de aves muertas suspendidas en un medio antibiótico/antifúngico deben mantenerse a 4⁰C durante 1-2 horas o congelarse en hielo seco o nitrógeno líquido hasta que puedan ser descongelados y procesados. Los hisopos deben estar completamente sumergidos en medios y para las muestras de tejido se requiere una suspensión del 20% p/v para el transporte (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

7.18 Técnicas de diagnóstico

Para un manejo eficaz de la EN es importante ser capaz de identificar las aves que están infectadas con el VEN y distinguir los virus de cepas virulentas. Los signos clínicos y las lesiones observadas con las infecciones del VEN no son patognomónicas específicas para un diagnóstico. La enfermedad con la que fácilmente son confundidos es la influenza aviar o las infecciones causadas por virus de influenza A, así como la aspergilosis, la mycoplasmosis, la laringotraqueitis infecciosa, el colera aviar, la bronquitis infecciosa (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

7.19 Identificación del agente

7.19.1 Muestras para el aislamiento vírico

Cuando se estudia la EN como consecuencia de la aparición de enfermedad severa y mortalidad elevada en grupos de aves de corral, es conveniente intentar el aislamiento del virus a partir de aves muertas recientemente o aves moribundas que se sacrifican por métodos humanitarios. Las muestras procedentes de aves muertas deben consistir en hisopos oronasaes, así como tejidos de pulmón, riñones, intestino (incluyendo contenido), tonsilas cecales, bazo, encéfalo, hígado y corazón. Pueden recogerse separadamente o combinadas, aunque, habitualmente, las muestras intestinales y las de encéfalo se procesan de forma separada de otras muestras. Las muestras procedentes de aves vivas deben incluir tanto hisopos traqueales u orofaríngeos como cloacales, y estos últimos deben estar visiblemente cubiertos de material fecal. La aplicación del hisopo puede dañar a las aves pequeñas y delicadas, pero en estos casos puede optarse por la recogida de heces frescas, que constituye una buena alternativa (OIE,2018).

7.19.2 Pruebas víricas

La actividad de la HA detectada en líquidos bacteriológicamente estériles recogidos a partir de huevos inoculados puede deberse a la presencia de cualquiera de los diez subtipos de PMVA (incluido el VEN) o de los 16 subtipos de hemoaglutinina de los virus de la influenza A. El líquido no estéril podría contener actividad HA bacteriana. El VEN puede confirmarse empleando antisuero específico en una prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI). Habitualmente se utiliza el antisuero de pollo preparado contra una de las cepas del VEN (OIE,2018).

7.19.3 Índice de patogenicidad (IP)

Los términos "velogénico", "mesogénico" y "lentogénico" se definieron como los tiempos medios de muerte (TMM) en embriones de pollo, después de la inoculación del saco alantoideo, de menos de 60 horas, 60-90 horas y más de 90 horas, respectivamente. Estos términos ahora también se aplican a los virus de alta virulencia, virulencia moderada y baja virulencia, independientemente de la prueba de patogenicidad empleada (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

Las pruebas *in vivo* con cepas aisladas de especies distintas del pollo (como palomas) pueden causar ciertos problemas y pueden no producir lecturas exactas hasta que se pasan en pollos o huevos de pollo embrionados.

Mediante la infección experimental de un número estadísticamente significativo (≥ 10) de aves jóvenes y adultas con una dosis estándar de virus (por ejemplo, de 105 DIH50) administrada por vías naturales (como la oro-

nasal) se podría obtener una información más exacta sobre la patogenicidad real de los VEN en una especie susceptible (OIE,2018).

7.19.4 Índice de patogenicidad intracerebral (ICPI)

El índice de patogenicidad intracerebral (ICPI) en pollitos de un día, diferencia los virus lentogénicos con valores de ICPI inferiores a 0,7 de cepas mesogénicas virulentas con valores ICPI iguales o superiores a 0,7 y menores a 1,5, y los virus velogénicos con valores de ICPI superiores a 1,5 (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

Brevemente:

- i) Se diluye líquido alantoideo infectivo y fresco con un título HA >24 ($>1/16$) a $1/10$ en solución salina isotónica estéril sin aditivos, tales como antibióticos.
- ii) Se inyectan por vía intracerebral 0,05 ml del virus diluido en diez polluelos procedentes de huevos de un grupo de aves SPF. En el momento de la inoculación, estos polluelos deben tener más de 24 y menos de 40 horas de vida.
- iii) Las aves se examinan cada 24 horas durante 8 días.
- iv) En cada observación, las aves se puntúan: 0 si es normal, 1 si está enferma y 2 si está muerta. Las aves que están vivas, pero son incapaces de comer o beber deben sacrificarse por métodos humanitarios y ser contabilizadas como muertas en la observación posterior. (Los individuos muertos deben puntuarse como 2 en cada una de las observaciones diarias siguientes a la muerte).

v) El ICPI es la puntuación media por ave y por observación durante el periodo de 8 días. Los virus más virulentos presentarán índices que se aproximan a la puntuación máxima de 2,0, mientras que las cepas entéricas lentogénicas y asintomáticas presentarán valores próximos a 0,0.

7.19.5 Técnicas moleculares para diagnóstico

Además del uso de la RT-PCR y de otras técnicas similares para la determinación de la virulencia de los VEN o para estudios filogenéticos, cada vez se utilizan más las técnicas moleculares para detectar el VEN en muestras clínicas, con la ventaja de la demostración extremadamente rápida de la presencia del virus.

La ventaja de estas pruebas es que la rRT-PCR basada en el uso de sonda de hidrólisis fluorógena o de tinciones fluorescentes hace innecesaria la fase de procesamiento post-amplificación y se pueden obtener los resultados en menos de 3 horas.

7.19.6 Pruebas serológicas

La serología generalmente no es una herramienta útil para el diagnóstico de la EN, porque los métodos serológicos actuales no pueden diferenciar los anticuerpos inducidos de una infección con VEN o VEN de aves silvestres, o los inducidos por la vacunación con vacunas vivas o inactivadas. Desde el punto de vista diagnóstico, la serología se utiliza con mayor frecuencia para medir la efectividad de un programa de vacunación. En los países que no

vacunan, la serología puede confirmar la exposición al VEN, pero pocos países están en condiciones de hacerlo (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

El VEN puede emplearse como un antígeno en gran variedad de pruebas serológicas, lo que permite que se utilicen las técnicas de neutralización, enzimoimmunoanálisis (ELISA) y HI para valorar el nivel de anticuerpos en las aves.

En la actualidad, la prueba HI es la más ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos contra el PMVA-1 en las aves, mientras que es frecuente el empleo de kits comerciales de ELISA para evaluar los niveles de anticuerpos post-vacunación.

En general, los títulos de anticuerpos obtenidos mediante neutralización vírica o HI y los derivados del ELISA se correlacionan a nivel de parvada más que a nivel de ave. También se emplean pruebas serológicas en la vigilancia y el diagnóstico de la EN, debido al uso casi universal de vacunas en aves de corral (OIE,2018).

7.19.7 Pruebas de hemaglutinación (HA) y de inhibición de la hemaglutinación (HI).

Los ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HI) se realizan comúnmente para evaluar la respuesta de anticuerpos después de la vacunación (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

Los sueros de pollo raramente dan reacciones positivas no específicas en la HI y no es necesario aplicar ningún pretratamiento a los sueros.

Los sueros procedentes de especies distintas de los pollos a veces pueden causar aglutinación de los eritrocitos de pollo, así que esta propiedad debe determinarse primero, y posteriormente extraer mediante adsorción del suero con eritrocitos de pollo. Esto se realiza añadiendo 0,025 ml de

eritrocitos de pollo concentrados a cada 0,5 ml de antisueros, agitando suavemente y dejándolos durante al menos 30 minutos; a continuación, los eritrocitos se precipitan mediante centrifugación a 800 g durante 2–5 minutos y se decantan los sueros adsorbidos.

7.19.8 Prueba de enzimoimmunoanálisis.

Se dispone de gran variedad de kits comerciales de ELISA que se basan en diversas estrategias para la detección de anticuerpos contra el VEN, incluyendo ELISA indirecto, tipo sándwich y de bloqueo o de competición, que emplean anticuerpos monoclonales (MAbs).

Habitualmente estas pruebas están validadas y evaluadas por el fabricante y, por tanto, es importante que, para su uso, se sigan cuidadosamente las instrucciones especificadas.

7.20 Vacunación (OIE, 2018).

El papel de la vacunación usada para el control de EN, ha sido prevenir las pérdidas por morbilidad y mortalidad (efectos), ya que las vacunas no son capaces de evitar completamente que las aves vacunadas se infecten con VEN.

La aplicación masiva de vacunas activas en el agua de bebida y aerosoles es barata y requiere menos mano de obra que la administración de vacunas inactivadas o de la vacuna activa aplicada por vía ocular que deben hacerse de manera individual (Diseases of Poultry, 2013).

Desafortunadamente, con la aplicación masiva de vacunas vivas es difícil producir anticuerpos protectores en un alto porcentaje de las aves vacunadas en una parvada. La administración ocular proporciona la mejor respuesta. Las vacunas inactivadas producen altos niveles de anticuerpos humorales neutralizantes y hemoaglutinantes.

Los calendarios de vacunación contra la EN en países endémicos incluye el uso tanto de vacunas activas como de vacunas inactivadas. El calendario de vacunación más común para el pollo de engorda es:

- 10 días de edad: Aplicación simultánea de vacuna activa vía ocular y vacuna inactivada por vía subcutánea en la parte media y posterior del cuello.
- 28 días de edad: Revacunación de las aves con vacuna activa por vía oral a través del agua de bebida o por vía aspersion.

7.21 Diagnóstico diferencial

La presentación clínica de otras enfermedades, tales como aspergilosis, mycoplasmosis, laringotraqueitis infecciosa, cólera de las aves de guerra, bronquitis infecciosa y de influenza aviar altamente patógena, se puede confundir con la EN. Un número limitado de virus aviares tienen la capacidad de hemaglutinar los glóbulos rojos de los pollos: virus de los serotipos de paramixovirus aviares y el virus de la influenza aviar. La confirmación del APMV-I se puede realizar rápidamente con antisueros policlonales de VEN. Los controles positivos y negativos apropiados se deben utilizar en los análisis del HI para prevenir una diagnosis equivocada de reacciones cruzadas con los otros serotipos de APMV (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

7.22 Tratamientos

No hay tratamientos para el VEN y en la mayoría de los casos todas las aves infectadas son sacrificadas para contener un brote (Miller y Koch, Diseases of Poultry, 2013).

MATERIALES Y METODOS

8.1 Establecimiento del experimento

El estudio se realizó en la granja San Ignacio con las siguientes coordenadas (18°51'52.7"N-97°44'44.5"O), con la siguiente dirección: predio rústico ubicado en los límites de la ex hacienda Santa Inés (Santa Ana Niño) sin número, Tecamachalco Puebla, para este proyecto se cuenta con una caseta de control manual para el manejo del pollo el cual permaneció en un corral de 4 metros de ancho por 6 de largo.

8.2 Metodología del estudio

Se probaron cuatro vacunas inactivadas y emulsionadas contra la EN, las cuales se administraron por vía subcutánea en la parte media y posterior del cuello a los 12 días de edad (DE):

- Vacuna con VEN cepa LaSota con 38% de antígeno.
- Vacuna bivalente con virus de Influenza Aviar (VIA) subtipo H5N2 cepa oficial 1994 y VEN cepa LaSota con 20% de antígeno.
- Vacuna con VEN cepa Ulster con 20% de antígeno.
- Vacuna con VEN cepa LaSota con 20% de antígeno.
- Se dejó un grupo control sin vacuna inactivada contra la EN como control.

8.2.1 Tratamientos o grupos

Se utilizaron cinco grupos divididos de la siguiente forma:

- Grupo 1: 500 pollos con la vacuna con VEN cepa LaSota con 38% de antígeno con una dosis de 0.5 mL.
- Grupo 2: 500 pollos con la vacuna bivalente con VIA subtipo H5N2 cepa oficial 1994 y VEN cepa LaSota con 20% de antígeno con una dosis de 0.5 mL.

- Grupo 3: 500 pollos con la vacuna con VEN cepa Ulster con 20% de antígeno con una dosis de 0.5 mL.
- Grupo 4: 500 pollos con la vacuna con VEN cepa LaSota con 20% de antígeno con una dosis de 0.5 mL.
- Grupo 5: 500 pollos (100 en cada caseta) como grupo control sin vacuna inactivada contra el VEN.

Se realizan 8 muestreos serológicos a los días 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 DE. Únicamente se tomaron 10 sueros de cada grupo vacunado y 10 sueros de cada grupo control.

Con el suero obtenido en cada muestreo, se realizó la prueba de HI de forma individual para determinar la inmunogenicidad de cada vacuna, utilizando diluciones dobles seriadas (1:2; 1:4; etc.) en placas de micro titulación de acrílico con fondo en U, con 4 unidades hemoaglutinantes y glóbulos rojos al 1%. La lectura se realiza 60 minutos después a una temperatura de 20°C. El resultado de cada grupo y en cada ocasión fue expresado como media geométrica en logaritmo base 2 (Log_2) (OIE). Se consideran títulos positivos a partir de la dilución 1:16 equivalente a 4 Log o 4^2 .

8.2.2 Desarrollo de la prueba

El día 4 de agosto del 2015 se recibieron 2,500 pollos de 1 DE.

Las aves fueron vacunadas contra la enfermedad de Marek en la Planta Incubadora, de acuerdo con las prácticas de manejo habituales en la granja.

Los días 7 y 14, las aves en todos los grupos fueron vacunadas en el agua de bebida con la vacuna activa con Gumboro cepa Lukert intermedia, de acuerdo con las prácticas de manejo habituales en la granja.

Al día 12, las aves en todos los grupos fueron vacunadas por vía ocular con la vacuna activa contra la enfermedad de Newcastle cepa LaSota en el agua de bebida. La misma vacuna activa fue aplicada nuevamente vía oral a través del

agua de bebida a los 30 DE, de acuerdo con las prácticas de manejo habituales en la granja.

El día 12, las aves en los grupos 1 a 4 fueron vacunadas con la vacuna inactivada correspondiente, de acuerdo con el diseño experimental.

En cada caseta, se dejaron 100 aves como grupo control si vacuna inactivada.

8.2.3 Análisis de varianza

El análisis de varianza permite analizar el efecto de una o más variables o categorías en un conjunto de datos. Cada tratamiento puede tener varias observaciones, En estadística, el análisis de la varianza (ANOVA, Analysis Of Variance, según terminología inglesa) es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados, en el cual la varianza está particionada en ciertos componentes debidos a diferentes variables explicativas.

El análisis estadístico fue realizado semanalmente en todos los grupos en prueba, utilizando la media geométrica obtenida en cada ocasión.

8.2.4 Análisis estadístico

Se utilizó el Análisis de Varianza (ANOVA) que permite analizar el efecto de una o más variables o categorías en un conjunto de datos.

El análisis estadístico fue realizado sobre los promedios semanales obtenidos en todos los grupos en prueba, utilizando la media geométrica obtenida en cada ocasión (\log_2).

Cuadro (1). Promedios semanales de resultados de HI

| Grupo | 1 DE | 7 DE | 14 DE | 21 DE | 28 DE | 35 DE | 42 DE | 49 DE |
|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Grupo control | 7.0 ^a | 3.0 ^a | 1.0 ^a | 3.3 ^a | 3.1 ^a | 4.1 ^a | 3.3 ^a | 2.2 ^a |
| Grupo 1 | 7.0 ^a | 3.0 ^a | 1.0 ^a | 6.3 ^c | 7.4 ^c | 8.2 ^c | 8.1 ^c | 8.0 ^c |
| Grupo 2 | 7.0 ^a | 3.0 ^a | 1.0 ^a | 5.1 ^b | 6.1 ^b | 7.0 ^b | 6.9 ^b | 6.8 ^b |
| Grupo 3 | 7.0 ^a | 3.0 ^a | 1.0 ^a | 4.7 ^b | 5.8 ^b | 7.1 ^b | 7.0 ^b | 6.9 ^b |
| Grupo 4 | 7.0 ^a | 3.0 ^a | 1.0 ^a | 5.2 ^b | 6.2 ^b | 7.3 ^b | 7.2 ^b | 7.1 ^b |

Literales diferentes indican diferencia estadística significativa ($P>0.5$).

El Análisis de Varianza indica que los grupos 1, 2, 3 y 4 vacunados con vacunas inactivadas y emulsionadas presentan diferencias estadísticas significativas a partir de los muestreos de 21 días de edad, comparativamente contra el grupo control que solamente incluyó vacunas activas.

También indica que el grupo 1, vacunado con una vacuna conteniendo el 38% de antígeno, resultó con una diferencia estadística significativa comparativamente a los otros tres grupos con vacuna emulsionada que contenían 20% de antígeno.

RESULTADOS

9.1 Resultados de las aves del grupo control.

Se obtuvieron resultados individuales de la prueba de HI, el promedio en logaritmo base 2 (Log₂), la desviación y el error estándar de la media de los anticuerpos obtenidos de 10 aves muestreadas a diferentes semanas (Anexos 1, 2, 3, 4 y 5).

Los resultados obtenidos al día de edad (DE) corresponden a la inmunidad materna con que nacen los pollitos y tienen un promedio de 7.0 Log₂. A los 7 DE, los mismos anticuerpos maternos descienden de manera natural a un promedio de 3.0 Log₂. A los 14 DE, los anticuerpos maternos continúan bajando de manera natural hasta alcanzar un nivel muy bajo de 1.0 Log₂, lo que indican que están totalmente catabolizados y las aves ya no tienen protección alguna. A los 21 DE, se observa un incremento de los anticuerpos, lo cual fue inducido por una vacunación activa aplicada a los 12 DE, llegando a un promedio de 3.3 Log₂. Esto se denomina inmunidad activa. A los 28 DE, los niveles de anticuerpos se mantienen en un nivel medio de 3.1 Log₂, similar al alcanzado la semana anterior y que corresponde a la primera vacunación con virus activo. A los 35 DE, los niveles de anticuerpos suben a un nivel medio de 4.1 Log₂, que corresponden a la segunda vacunación activa aplicada a los 30 DE. A los 42 DE, los niveles de anticuerpos descienden a 3.3 Log₂ y a los 49 DE, los niveles de anticuerpos disminuyen nuevamente hasta un nivel bajo de 2.2 Log₂.

9.2 Resultados de aves del grupo 1, vacunadas con una vacuna inactivada y emulsionada de VEN cepa LaSota con 38% de antígeno con una dosis de 0.5 mL y dos virus activos de VEN cepa LaSota aplicados a los 10 y 21 DE.

Se obtuvieron resultados individuales de la prueba de HI, el promedio en logaritmo base 2 (Log₂), la desviación y el error estándar de la media de los anticuerpos obtenidos de 10 aves muestreadas a diferentes semanas (Anexo 2).

Los resultados obtenidos al día de edad (DE) corresponden a la inmunidad materna con que nacen los pollitos y tienen un promedio de 7.0 Log₂. A los 7 DE, los mismos anticuerpos maternos descienden de manera natural a un promedio de 3.0 Log₂. A los 14 DE, los anticuerpos maternos continúan bajando de manera natural hasta alcanzar un nivel muy bajo de 1.0 Log₂, lo que indican que están totalmente catabolizados y las aves ya no tienen protección alguna. A los 21 DE, se observa un fuerte incremento de los anticuerpos, lo cual fue inducido por la vacuna inactivada y emulsionada, así como a la vacuna activa aplicadas a los 12 DE, llegando a un promedio de 6.3 Log₂. A los 28 DE, los niveles de anticuerpos suben a un nivel alto de 7.4 Log₂, lo cual corresponde a la vacunación realizada a los 12 DE. A los 35 DE, los niveles de anticuerpos suben a un promedio de 8.2 Log₂, que corresponden a la segunda vacunación activa aplicada a los 30 DE. A los 42 DE, los niveles de anticuerpos descienden a 8.1 Log₂ y a los 49 DE, los niveles de anticuerpos disminuyen nuevamente a 8.0 Log₂.

9.3 Resultados de aves del grupo 2, vacunados con una vacuna inactivada y emulsionada bivalente con virus de Influenza Aviar (VIA) subtipo H5N2 cepa oficial 1994 y VEN cepa LaSota con 20% de antígeno y dos virus activos de VEN cepa LaSota aplicados a los 10 y 21 DE.

Los resultados obtenidos al día de edad (DE) corresponden a la inmunidad materna con que nacen los pollitos y tienen un promedio de 7.0 Log₂. A los 7 DE, los mismos anticuerpos maternos descienden de manera natural a un promedio de 3.0 Log₂. A los 14 DE, los anticuerpos maternos continúan bajando de manera natural hasta alcanzar un nivel muy bajo de 1.0 Log₂, lo que indican que están totalmente catabolizados y las aves ya no tienen protección alguna. A los 21 DE, se observa un fuerte incremento de los anticuerpos, lo cual fue inducido por la vacuna inactivada y emulsionada, así como a la vacuna activa aplicadas a los 12 DE, llegando a un promedio de 5.1 Log₂. A los 28 DE, los niveles de anticuerpos

suben a un nivel alto de 6.1 Log₂, lo cual corresponde a la vacunación realizada a los 12 DE. A los 35 DE, los niveles de anticuerpos suben a un promedio de 7.0 Log₂, que corresponden a la segunda vacunación activa aplicada a los 30 DE. A los 42 DE, los niveles de anticuerpos descienden a 6.9 Log₂ y a los 49 DE, los niveles de anticuerpos disminuyen nuevamente a 6.8 Log₂.

9.4 Resultados de aves del grupo 3, vacunados con una vacuna inactivada y emulsionada con VEN cepa Ulster con 20% de antígeno y dos virus activos de VEN cepa LaSota aplicados a los 10 y 21 DE.

Los resultados obtenidos al día de edad (DE) corresponden a la inmunidad materna con que nacen los pollitos y tienen un promedio de 7.0 Log₂. A los 7 DE, los mismos anticuerpos maternos descienden de manera natural a un promedio de 3.0 Log₂. A los 14 DE, los anticuerpos maternos continúan bajando de manera natural hasta alcanzar un nivel muy bajo de 1.0 Log₂, lo que indican que están totalmente catabolizados y las aves ya no tienen protección alguna. A los 21 DE, se observa un fuerte incremento de los anticuerpos, lo cual fue inducido por la vacuna inactivada y emulsionada, así como a la vacuna activa aplicadas a los 12 DE, llegando a un promedio de 4.7 Log₂. A los 28 DE, los niveles de anticuerpos suben a un nivel alto de 5.8 Log₂, lo cual corresponde a la vacunación realizada a los 12 DE. A los 35 DE, los niveles de anticuerpos suben a un promedio de 7.1 Log₂, que corresponden a la segunda vacunación activa aplicada a los 30 DE. A los 42 DE, los niveles de anticuerpos descienden a 7.0 Log₂ y a los 49 DE, los niveles de anticuerpos disminuyen nuevamente a 6.9 Log₂.

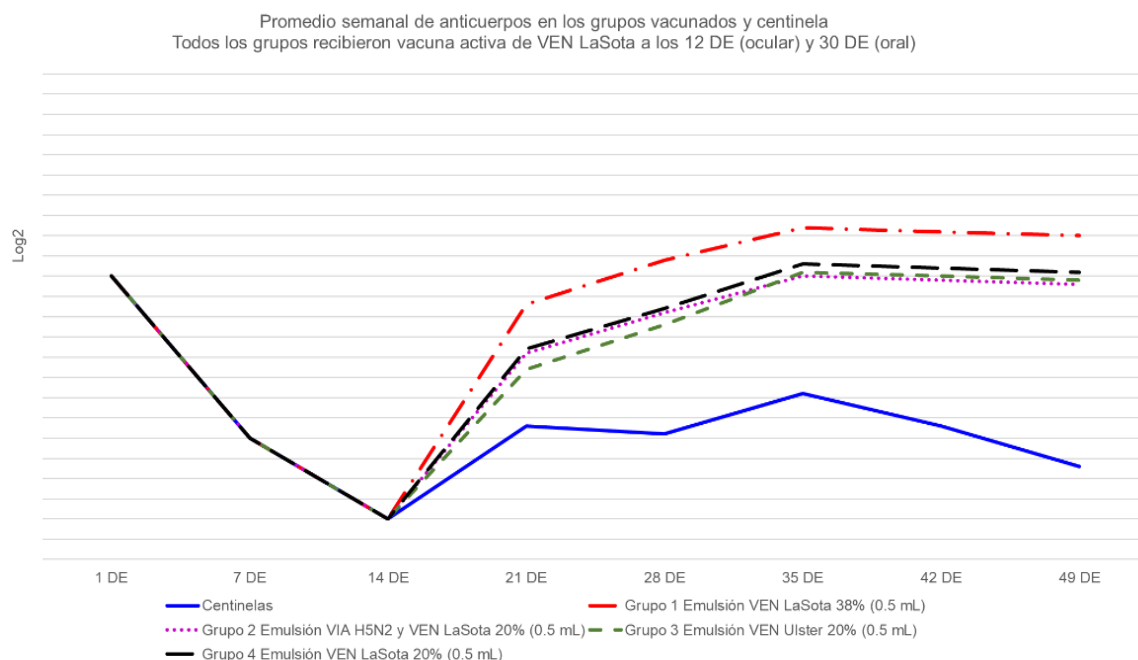
9.5 Resultados de aves del grupo 4, vacunados con una vacuna inactivada y emulsionada con VEN cepa LaSota con 20% de antígeno y dos virus activos de VEN cepa LaSota aplicados a los 10 y 21 DE.

Los resultados obtenidos al día de edad (DE) corresponden a la inmunidad materna con que nacen los pollitos y tienen un promedio de 7.0 Log₂. A los 7 DE,

los mismos anticuerpos maternos descienden de manera natural a un promedio de 3.0 Log₂. A los 14 DE, los anticuerpos maternos continúan bajando de manera natural hasta alcanzar un nivel muy bajo de 1.0 Log₂, lo que indican que están totalmente catabolizados y las aves ya no tienen protección alguna. A los 21 DE, se observa un fuerte incremento de los anticuerpos, lo cual fue inducido por la vacuna inactivada y emulsionada, así como a la vacunación activa aplicada a los 12 DE, llegando a un promedio de 5.2 Log₂. A los 28 DE, los niveles de anticuerpos suben a un nivel alto de 6.2 Log₂, lo cual corresponde a la vacunación realizada a los 12 DE. A los 35 DE, los niveles de anticuerpos suben a un promedio de 7.3 Log₂, que corresponden a la segunda vacunación activa aplicada a los 30 DE. A los 42 DE, los niveles de anticuerpos descienden a 7.2 Log₂ y a los 49 DE, los niveles de anticuerpos disminuyen nuevamente a 7.1 Log₂.

En la siguiente gráfica se aprecian los resultados de los promedios de anticuerpos (Log₂) semanales obtenidos en los diferentes muestreos, en donde puede apreciarse el comportamiento de las diferentes vacunas inactivadas y emulsionadas, así como el grupo control (Grafica 1), que solamente recibió dos vacunas activas.

Grafica 1. Títulos promedio obtenidos en los muestreos de los grupos 1,2,3, 4 y aves centinelas.



DISCUSIÓN

Un tema muy interesante en cuanto al uso de vacunas emulsionadas en un calendario de vacunación, es la respuesta humoral que estas suelen proporcionar al ave ayudando a mantener anticuerpos protectivos contra VEN por un periodo de tiempo más prolongado, siendo la inmunidad humoral uno de los mecanismos de mayor defensa contra los VEN coincide por lo reportado con Miller y Koch, *Diseases of Poultry* (2013), quien hace referencia la inmunidad humoral es principalmente inducida por vacuna inactivadas emulsionadas.

La importancia del uso adecuado en la concentración de antígeno en una vacuna inactivada por dosis es fundamental para mejorar la producción avícola, reduciendo la presencia de brotes en las parvadas haciendo que el desempeño de las aves sea bueno durante su ciclo de vida, lo que coincide con Torres, *et al.*, (2016), quienes hacen mención que con medidas profilácticas como son la aplicación indispensable de una vacuna en forma frecuente y rutinaria para la prevención de un posible brote del VEN mejora la salud de las aves y los índices de producción.

Al usar una vacuna emulsionada con una concentración antigénica adecuada se estaría generando una respuesta inmune sólida que permita al ave defenderse del VEN y sobre todo de los problemas de mortalidad que éste podría generar si no se cuenta, con una buena inmunización por parte de las vacunas esto a su vez se puede corroborar con Miller y Koch, *Diseases of Poultry*, (2013), quienes describen que la inducción de la producción de anticuerpos contra el VEN se logra mediante la aplicación de vacunas.

El uso de vacunas inactivadas ha demostrado una eficiencia en la prevención de las enfermedades debido a la memoria inmunológica que se genera posterior a una aplicación, por sus características oleosas permite que la dosis aplicada de la vacuna sea más lenta, dando como resultado una protección contra la EN por un periodo más largo, lo cual coincide con Carrera, (2015), quien describe que el aceite mineral de las vacunas inactivadas tiene dos propósitos: uno permite

estimular el sistema inmune y así elevar una mayor respuesta inmunológica, y el otro que es permitir una lenta liberación del antígeno para estimular el sistema inmune por un periodo más largo.

Uno de los objetivos a buscar en la avicultura es generar a través de un calendario de vacunación una buena protección contra la EN. Es por ello por lo que el uso de vacunas inactivadas es indispensable en el calendario de vacunación debido a la capacidad que tienen para brindar una respuesta humoral de mayor duración, esto con el fin de tener niveles de anticuerpos protectores por un periodo de tiempo prolongado coincidiendo con lo mencionado por Dimitrov, *et al.*, (2016), quienes mencionan en su investigación que las vacunas inactivadas tienden a tener niveles más altos de anticuerpos humorales para brindar una protección contra EN más adecuada por un periodo más prolongado.

La importancia de una evaluación en el uso de vacunas emulsionadas para garantizar la efectividad contra EN y la producción de anticuerpos protectivos es fundamental para mejorar la producción avícola reduciendo la presencia de brotes en las parvadas haciendo que el desempeño de las aves sea bueno durante su ciclo de vida coincide con Miller y Koch, *Diseases of Poultry*, (2013), quienes hacen mención que esta evaluación puede implicar la cantidad de anticuerpos producidos, la reducción en el número de aves enfermas o muertas después del desafío.

Hoy en día, el uso de vacunas emulsionadas es de gran ayuda por la protección que inducen siendo de gran ayuda para el control de problemas de salud en la parvada garantizando niveles adecuados de títulos protectivos que se pueden mantener hasta por cuatro semanas descrito por OIE, (2018), en donde se especifica que las vacunas inactivadas producen altos niveles de anticuerpos neutralizantes capaces de generar una buena respuesta inmunológica.

Al aplicar una vacuna inactivada y emulsionada se disminuye el manejo de las aves haciendo más eficiente el manejo de las parvadas por su capacidad de generar memoria inmunológica, beneficiando los índices productivos y costos de

producción–lo cual coincide con lo descrito por Absalón, *et al.*, (2019), quienes refieren que la utilización de vacunas emulsionadas usadas para prevenir la EN hace menor el costo de producción debido a que se disminuye la manipulación de las aves por la vacunación además de disminuir los niveles de estrés que estos manejos provocan.

De los resultados obtenidos se comparó la protección de las diferentes vacunas con la dosis sugerida por el laboratorio productor, con resultados que indican que una vacuna que contiene un mayor porcentaje de antígeno resulta en un mayor nivel de anticuerpos, el cual brindará una memoria inmunológica mayor y por lo tanto una mejor protección contra la EN, sin importar la cepa vacunal que se utilice. Es por ello por lo que una manera más adecuada de garantizar una buena protección de las parvadas es a través de ensayos como el que se realizó para comparar la efectividad de las vacunas en la zona de Tecamachalco contra el VEN y coincide con lo reportado por Perozo, (2012), quien hace referencia a tener un diagnóstico certero, además de la implementación de programas de vacunación adecuado a lo que se está viviendo hoy en día.

Hoy en día, México ya cuenta con una cultura sanitaria además de protocolos empleados para la prevención del VEN. Uno de ellos es el empleo de un calendario de vacunación diseñado con base a la zona donde se encuentran las explotaciones avícolas.

Un factor en el cual debemos hacer énfasis es en que los virus de hoy día son muy adaptables a distintas condiciones además de que pueden llegar a tener cambios en su estructura genética haciendo más difícil tener un buen control de la enfermedad dentro de una granja, es por ello que se sugiere realizar pruebas a nivel de laboratorio para verificar la protección que brinda la vacuna y la concentración antigénica en la que ésta presenta mejor resultado inmunológico, lo que ayudará a dilucidar la mejor opción para evitar que las parvadas presenten cuadros clínicos de la enfermedad.

CONCLUSIONES

Las aves nacen con niveles de anticuerpos maternos que las protegen de un desafío de virus patógenos, pero los niveles de anticuerpos se catabolizan de manera natural de tal forma que las aves dejan de estar protegidas luego de los 7 DE.

Las vacunas activas inducen una inmunidad activa que induce niveles de anticuerpos humorales medios a bajos, que protegen a las aves del desafío de virus patógenos, pero los niveles alcanzados son bajos y no son duraderos. Sin embargo, las vacunas activas son muy útiles porque inducen una interferencia viral, estimulan la inmunidad celular y la inmunidad humoral.

Las vacunas inactivadas y emulsionadas inducen una inmunidad activa que se refleja en niveles de anticuerpos humorales, que protegen a las aves del desafío con virus patógenos, con niveles altos y duraderos durante todo el ciclo de producción de 49 DE.

Las vacunas inactivadas y emulsionadas conteniendo 20% de antígeno del VEN, elaboradas de forma bivalente con el virus de la influenza aviar, o solas con la cepa Ulster o la cepa LaSota, inducen un nivel de anticuerpos similar, no existiendo diferencias estadísticas entre ellas.

La vacuna inactivada y emulsionada conteniendo 38% de antígeno del VEN, resultó con mejores niveles de anticuerpos que el resto de las vacunas inactivadas y emulsionadas a diferencia de las que el conteniendo de 20% de antígeno quienes inducen una menor protección, con diferencias estadísticas significativas, lo que indica que a un mayor porcentaje de inclusión del antígeno se obtiene un mejor resultado en la inducción de anticuerpos humorales en las aves vacunadas.

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de resultados obtenidos en las aves centinelas vacunados únicamente con dos vacunas activas a los 10 y 30 DE, como se muestra en la (Tabla 1).

Tabla 1. Anexo 1. Resultados individuales de la prueba de HI, el promedio en logaritmo base 2 (Log2), la desviación y el error estándar de la media de los anticuerpos obtenidos de 10 aves muestreadas a diferentes SE.

| Tipo de Vacuna | DE | NÚMERO DE POZO | | | | | | | | | | | | No. De Sueros | Log2 | Desviación Estándar | Error estándar de la media | |
|----------------|----|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|---------------|------|---------------------|----------------------------|---------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | | | | | 12 |
| Centinelas | 1 | | | | | | 1 | 1 | 6 | 1 | 1 | | | | 10 | 7.0 | 1.0000 | 0.31623 |
| | 7 | | 1 | 1 | 5 | 3 | | | | | | | | | 10 | 3.0 | 0.8944 | 0.28284 |
| | 14 | 2 | 6 | 2 | | | | | | | | | | | 10 | 1.0 | 0.6325 | 0.20000 |
| | 21 | | | 2 | 4 | 3 | 1 | | | | | | | | 10 | 3.3 | 0.9000 | 0.28460 |
| | 28 | | | 3 | 4 | 2 | 1 | | | | | | | | 10 | 3.1 | 0.9434 | 0.29833 |
| | 35 | | | | 2 | 5 | 3 | | | | | | | | 10 | 4.1 | 0.7000 | 0.22136 |
| | 42 | | | 2 | 4 | 3 | 1 | | | | | | | | 10 | 3.3 | 0.9000 | 0.28460 |
| | 49 | | 2 | 4 | 4 | | | | | | | | | | 10 | 2.2 | 0.7483 | 0.23664 |

Anexo 2. Tabla de resultados obtenidos en las aves del grupo 1, vacunadas con una vacuna inactivada y emulsionada de VEN cepa LaSota con 38% de antígeno con una dosis de 0.5 mL aplicada a los 12 DE y dos virus activos de VEN cepa LaSota aplicados a los 12 y 30 DE, como se muestra en la (Tabla 2).

Tabla 2. Anexo 2. Resultados individuales de la prueba de HI, el promedio en logaritmo base 2 (Log2), la desviación estándar y el error estándar de la media de los anticuerpos obtenidos de 10 aves muestreadas a diferentes SE.

| Tipo de Vacuna | DE | NÚMERO DE POZO | | | | | | | | | | | | No. De Sueros | Log2 | Desviación Estándar | Error estándar de la media | |
|----------------|----|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|---------------|------|---------------------|----------------------------|---------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | | | | | 12 |
| Grupo 1 | 1 | | | | | | 1 | 1 | 6 | 1 | 1 | | | | 10 | 7.0 | 1.0000 | 0.31623 |
| | 7 | | 1 | 1 | 5 | 3 | | | | | | | | | 10 | 3.0 | 0.8944 | 0.28284 |
| | 14 | 2 | 6 | 2 | | | | | | | | | | | 10 | 1.0 | 0.6325 | 0.20000 |
| | 21 | | | | | 1 | 1 | 4 | 2 | 2 | | | | | 10 | 6.3 | 1.1874 | 0.37550 |
| | 28 | | | | | | 1 | 1 | 3 | 3 | 2 | | | | 10 | 7.4 | 1.2000 | 0.37947 |
| | 35 | | | | | | | | 2 | 5 | 2 | 1 | | | 10 | 8.2 | 0.8718 | 0.27568 |
| | 42 | | | | | | | 1 | 1 | 4 | 4 | | | | 10 | 8.1 | 0.9434 | 0.29833 |
| | 49 | | | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | | | | 10 | 8.0 | 1.0000 | 0.31623 |

Anexo 3. Tabla de resultados obtenidos en las aves del grupo 2, vacunados con una vacuna inactivada y emulsionada bivalente con virus de Influenza Aviar (VIA) subtipo H5N2 cepa oficial 1994 y VEN cepa LaSota con 20% de antígeno con una dosis de 0.5 mL aplicada a los 12 DE y dos virus activos de VEN cepa LaSota aplicados a los 12 y 30 DE, como se muestra en la (Tabla 3).

Tabla 3. Anexo 3. Resultados individuales de la prueba de HI, el promedio en logaritmo base 2 (Log2), la desviación estándar y el error estándar de la media de los anticuerpos obtenidos de 10 aves muestreadas a diferentes SE.

| Tipo de Vacuna | DE | NÚMERO DE POZO | | | | | | | | | | | | No. De Sueros | Log2 | Desviación Estándar | Error estándar de la media | |
|----------------|----|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|---------------|------|---------------------|----------------------------|---------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | | | | | 12 |
| Grupo 2 | 1 | | | | | | 1 | 1 | 6 | 1 | 1 | | | | 10 | 7.0 | 1.0000 | 0.31623 |
| | 7 | | 1 | 1 | 5 | 3 | | | | | | | | | 10 | 3.0 | 0.8944 | 0.28284 |
| | 14 | 2 | 6 | 2 | | | | | | | | | | | 10 | 1.0 | 0.6325 | 0.20000 |
| | 21 | | | | 1 | 1 | 4 | 4 | | | | | | | 10 | 5.1 | 0.9434 | 0.29833 |
| | 28 | | | | | 1 | 1 | 4 | 4 | | | | | | 10 | 6.1 | 0.9434 | 0.29833 |
| | 35 | | | | | | 1 | 2 | 4 | 2 | 1 | | | | 10 | 7.0 | 1.0954 | 0.34641 |
| | 42 | | | | | | 1 | 2 | 4 | 3 | | | | | 10 | 6.9 | 0.9434 | 0.29833 |
| | 49 | | | | | 1 | 1 | | 5 | 3 | | | | | 10 | 6.8 | 1.2490 | 0.39497 |

Anexo 4. Tabla de resultados obtenidos en las aves del grupo 3, vacunados con una vacuna inactivada y emulsionada con VEN cepa Ulster con 20% de antígeno con una dosis de 0.5 mL aplicada a los 12 DE y dos virus activos de VEN cepa LaSota aplicados a los 12 y 30 DE, como se muestra en la (Tabla 4).

Tabla 4. Anexo 4. Resultados individuales de la prueba de HI, el promedio en logaritmo base 2 (Log2), la desviación estándar y el error estándar de la media de los anticuerpos obtenidos de 10 aves muestreadas a diferentes SE.

| Tipo de Vacuna | DE | NÚMERO DE POZO | | | | | | | | | | | | No. De Sueros | Log2 | Desviación Estándar | Error estándar de la media | |
|----------------|----|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|---------------|------|---------------------|----------------------------|---------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | | | | | 12 |
| Grupo 3 | 1 | | | | | | 1 | 1 | 6 | 1 | 1 | | | | 10 | 7.0 | 1.0000 | 0.31623 |
| | 7 | | 1 | 1 | 5 | 3 | | | | | | | | | 10 | 3.0 | 0.8944 | 0.28284 |
| | 14 | 2 | 6 | 2 | | | | | | | | | | | 10 | 1.0 | 0.6325 | 0.20000 |
| | 21 | | | | 1 | 3 | 4 | 2 | | | | | | | 10 | 4.7 | 0.9000 | 0.28460 |
| | 28 | | | | | 1 | 2 | 5 | 2 | | | | | | 10 | 5.8 | 0.8718 | 0.27568 |
| | 35 | | | | | | 1 | 2 | 3 | 3 | 1 | | | | 10 | 7.1 | 1.1358 | 0.35917 |
| | 42 | | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | | | | | 10 | 7.0 | 1.0000 | 0.31623 |
| | 49 | | | | | | | 3 | 5 | 2 | | | | | 10 | 6.9 | 0.7000 | 0.22136 |

Anexo 5. Tabla de resultados obtenidos en las aves del grupo 3, vacunados con una vacuna inactivada y emulsionada con VEN cepa LaSota con 20% de antígeno con una dosis de 0.5 mL aplicada a los 12 DE y dos virus activos de VEN cepa LaSota aplicados a los 10 y 30 DE, como se muestra en la (Tabla 5).

Tabla 5. Anexo 5. Resultados individuales de la prueba de HI, el promedio en logaritmo base 2 (Log2), la desviación estándar y el error estándar de la media de los anticuerpos obtenidos de 10 aves muestreadas a diferentes SE.

| Tipo de Vacuna | DE | NÚMERO DE POZO | | | | | | | | | | | | No. De Sueros | Log2 | Desviación Estándar | Error estándar de la media | |
|----------------|----|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|---------------|------|---------------------|----------------------------|---------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | | | | | 12 |
| Grupo 4 | 1 | | | | | | 1 | 1 | 6 | 1 | 1 | | | | 10 | 7.0 | 1.0000 | 0.31623 |
| | 7 | | 1 | 1 | 5 | 3 | | | | | | | | | 10 | 3.0 | 0.8944 | 0.28284 |
| | 14 | 2 | 6 | 2 | | | | | | | | | | | 10 | 1.0 | 0.6325 | 0.20000 |
| | 21 | | | | | 3 | 3 | 3 | 1 | | | | | | 10 | 5.2 | 0.9798 | 0.30984 |
| | 28 | | | | | | 2 | 5 | 2 | 1 | | | | | 10 | 6.2 | 0.8718 | 0.27568 |
| | 35 | | | | | | | 1 | 5 | 4 | | | | | 10 | 7.3 | 0.6403 | 0.20248 |
| | 42 | | | | | | | 2 | 4 | 4 | | | | | 10 | 7.2 | 0.7483 | 0.23664 |
| | 49 | | | | | | 1 | 1 | 4 | 4 | | | | | 10 | 7.1 | 0.9434 | 0.29833 |

BLOGRAFIA

- A. E. Absalón, Diana V. Cortés-Espinosa, E. Lucio, P. J. Miller, C. L. Alfonso. 2019. Epidemiology, control, and prevention of Newcastle disease in endemic regions: Latin America. *Trop Anim Health Prod.* 51. 1037 pp.
- ANECA. 7 de agosto de 2015. UNAM. Cd Mexico. 2-6 pp.
- Cattoli G, Susta L, Terregino C, Brown C. 2011. Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *J Vet Diagn Invest.* 23 637-647-648 pp.
- Carrera Leticia. 2015. Aspectos críticos en la utilización de vacunas oleosas.
- Cuello, Sandra; Vega Armando y Noda Julia. 2011. Actualización sobre la enfermedad de Newcastle. *REDVET.* 9-12-13-15- 18 pp.
- Dinev Ivanov Ivan. 2011. Enfermedades de las aves atlas a color. Segunda edición. Traducido al español por Dra. María Isabel Cevallos. Stara Zagora, Bulgaria. 204 pp.
- Dueñas David, Soto Andrés, Lechuga Mario, Lozano Fernando, Paulet Pascal, Gardin Yannick. 2012. Evaluación de una vacuna vectorizada contra la enfermedad de newcastle como parte de un programa de prevención. ANECA. Puerto Vallarta, Jalisco.105 pp.
- Decanini Eduardo Lucio. 2009. Características de las poblaciones de virus velogénicos de newcastle que circulan en México y sus implicaciones. Congreso latino americano. La Habana. Cuba.400 pp.

- Kiril M. Dimitrov, Claudio L. Afonso, Qingzhong Yu, Patti J. Miller. 2016. Newcastle disease vaccines—A solved problem or a continuous challenge? *J. Vetmic.* 206.129 pp.
- Manual Terrestre de la OIE. 2018. Versión adoptada en la Asamblea Mundial de Delegados d la OIE en mayo de 2012. Enfermedad de Newcastle (Infección por el virus de la enfermedad de Newcastle). Capítulo 2.3.14.
- Miller P, J. y G. Koch. Newcastle disease. EN: Diseases of Poultry, 13th ed. David E. Swayne. 2013. John Wiley & Sons, Inc.
- Mosqueda Taylor Ángel. 2012. La enfermedad de Newcastle: visión contemporánea. AMVEAV. Córdoba, Veracruz. 4-8 pp.
- Perozo Marín Francisco. 2012. Actualidades sobre la enfermedad de Newcastle. ANECA. Puerto Vallarta, Jalisco. 21-22-24 pp.
- Perez Alma. 2015. Interpretación de resultados serológicos obtenidos con diferentes técnicas de laboratorio. 4 pp.

- Sachin Kumar , Baibaswata Nayak , Peter L. Collins , y Siba K. Samal. 2011. Evaluation of the Newcastle disease virus F and HN proteins in protective immunity by using a recombinant avian paramixovirus type 3 vector in chickens Strong innate immune response and cell death in chicken splenocytes infected with genotype VIId Newcastle disease virus. Strong innate immune response and cell death in chicken splenocytes infected with genotype VIId Newcastle disease virus. Strong innate immune response and cell death in chicken splenocytes infected with genotype VIId Newcastle disease virus. *J Virol.* 13 6521-6522-6532 pp.
- SAGARPA. 2012. Declara SAGARPA a México zona libre de la Enfermedad de Newcastle. Boletín SAGARPA.
- <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2015B415.aspx>
- [https://www.gob.mx/senasica/prensa/declaran-a-mexico-zona-libre-de-la-enfermedad-de-newcastle.](https://www.gob.mx/senasica/prensa/declaran-a-mexico-zona-libre-de-la-enfermedad-de-newcastle)
- Torres Carrasco Adriano de Oliveira , Meire Christina Seki , Jyan Lucas Benevenuto , Priscila Ikeda , y Aramis Augusto Pinto. 2016. Experimental infection with Brazilian Newcastle disease virus strain in pigeons and chickens. *Braz J Microbiol.* 47 1-239 pp.
- Kapczynski DR, Afonso CL, Miller PJ. 2013. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Dev Comp Immunol.* 41 447 pp.

- Khattar SK, Nayak B, Kim SH, Xiao S, Samal S, Paldurai A, Buchholz UJ, Collins PL, Samal SK. 2013. Evaluation of the replication, pathogenicity, and immunogenicity of avian paramyxovirus (APMV) serotypes 2, 3, 4, 5, 7 and 9 in rhesus macaques. *Plos One*. 8 1-2 pp.
- Van Boven Michiel , Bouma Annemarie , Teun HF Fabri B , Elly Katsma , Leo Hartog , y Guus Koch. 2009. Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. *Aviar Pathol*. 37 2 pp.
- Yee Ling Chong , Abinash Padhi , Pedro J. Hudson y María Pos. 2010. The effect of vaccination on the evolution and population dynamics of avian paramyxovirus-1. *Plos Pathog*. 6 1 pp.
- Zenglei Hu, Jiao Hu, Shunlin Hu, Liu Xiaowen, Xiaoquan Wang, Jie Zhu y Xiufan. 2012. Strong innate immune response and cell death in chicken splenocytes infected with genotype VIId Newcastle disease virus. *Virol J*. 6 1-2 pp.