

## **Efecto de la adición en la dieta de $\beta$ -glucan de levadura sobre los títulos de anticuerpos de aves ponedoras en una granja del municipio de Jamundí, valle del cauca**

Laura Andrea Anacona; Ana Maria Colonia Pineda-Tutor

### ***Resumen***

Los  $\beta$ -glucanos son homopolisacaridos de glucosa de alto peso molecular que se encuentran en plantas como los cereales y en las paredes de hongos y levaduras, esto hace que los  $\beta$ -glucanos tengan comportamientos particulares sobre la salud de los animales, el sector avícola presenta altas densidades poblacionales bajo regímenes de confinamiento intensivo lo que me interviene directamente sobre el estado sanitario de los animales aumentando así el estrés de los mismos. Para esta investigación en particular se planteó el objetivo de evaluar el efecto de la adición en la dieta de  $\beta$ -glucanos de levadura sobre la respuesta inmunológica en aves ponedoras de la línea Lohmann blanca de 33 semanas de edad en el municipio de Jamundí, Valle del cauca, para esto se manejaron tres grupos de los cuales se les hizo pruebas serológicas tipo Elisa a 20 aves por grupo antes y después de iniciar la administración con  $\beta$ -glucano de levadura (*Saccharomyces cerevisie*) en la dieta, y a dos de estos grupos en mitad del periodo experimental se les introdujo una vacuna contra Newcastle+Bronquitis. Aunque no se demostró influencia en la producción de anticuerpos postvacunales con la introducción de  $\beta$ -glucano, se evidencio un efecto positivo del mismo al ser capaz de reducir el coeficiente de variación de la vacuna en ambas enfermedades, convirtiéndose en un hallazgo importante para mejorar la eficiencia de los planes vacúnales convencionales.

***Palabras claves:*** Newcastle, Bronquitis infecciosa aviar, Serologías, respuesta inmune, suplemento, prebiótico, probiotico.

## ***Summary***

B-glucans are homopolysaccharides of high molecular weight glucose found in plants such as cereals and in the walls of fungi and yeasts, this makes  $\beta$ -glucans have particular behaviors on the health of animals, the poultry sector presents High population densities under intensive confinement regimes which directly affects the health status of animals, thus increasing their stress. For this particular investigation the objective was to evaluate the effect of dietary addition of yeast  $\beta$ -glucans on the immune response in laying birds of the 33-week-old white Lohmann line in the municipality of Jamundí, Valle del Cauca, three groups of which were serologically Elisa-type tests were performed at 20 birds per group before and after administration with yeast  $\beta$ -glucan (*Saccharomyces cerevisia*) in the diet, and two of these groups in Half of the experimental period they were given a vaccine against Newcastle + Bronchitis. Although there was no influence on the production of post-vaccinal antibodies with the introduction of  $\beta$ -glucan, a positive effect of  $\beta$ -glucan was shown to be able to reduce the coefficient of variation of the vaccine in both diseases, becoming an important finding to improve the Efficiency of conventional vaccine plans.

***Key words:*** Newcastle disease, avian infectious bronchitis, Serology's, immune response, supplement, prebiotic, probiotic

## ***Introducción***

La producción avícola en la actualidad opera en su mayoría mediante sistemas intensivos, los cuales se caracterizan por manejar grandes densidades de animales, generando situaciones de estrés que les produce susceptibilidad a contagios y transmisión de enfermedades infecciosas, es por esto que los animales demandan condiciones nutricionales, sanitarias y medioambientales especiales, por consiguiente si hay algún desequilibrio en estos aspectos se verá reflejado en enfermedad, causando grandes pérdidas a nivel económico debido a los altos costos en tratamientos, programas de vacunación que demandan y mortalidad (3).

Existen enfermedades infecciosas virales que afectan las vías respiratorias de muchas especies de aves de corral entre ellas la enfermedad de Newcastle (ND) y la bronquitis infecciosa (IBV), las cuales representan una de las principales dificultades económicas en la industria avícola, la ND es causada por un virus de la familia *paramyxovirus* (1), el cual se caracteriza por morbilidad aguda, y alta mortalidad (2), y la BIV es una enfermedad provocada por un coronavirus que afecta el tracto respiratorio superior y es altamente contagiosa(3). También puede causar una disminución en la producción y baja calidad en los huevos (3), la morbilidad puede ser del 100% mientras que la mortalidad puede variar entre el 14% y el 82%.

Particularmente en el Valle del Cauca durante el último año se ha presentado un problema sanitario debido a los brotes de enfermedades virales, los cuales han ocasionado altos índices de mortalidad y pérdidas económicas de gran importancia en diferentes granjas. De igual manera, se ha convertido en una dificultad sanitaria recurrente, la cual no ha sido resuelta satisfactoriamente con el uso de diferentes medicamentos antibióticos y vacunas.

Las estrategias actuales para la prevención de ND y BIV es la utilización de vacunas inactivadas y atenuadas, sin embargo siempre es posible que ocurra un fracaso inmunológico(4), es por esto que se hace necesario reforzar el sistema inmune y la efectividad de las vacunas en las aves desde otra perspectiva como podría ser a través de la nutrición.

La suplementación en la dieta de las aves con inmuno-estimulantes es una estrategia para mejorar la función inmune, reducir el uso de antibióticos, minimizar los residuos de medicamentos, y

mejorar la resistencia a enfermedades en las aves (5), Los  $\beta$ -glucanos son los principales componentes estructurales de la pared celular de levadura y hongos (6). La suplementación con  $\beta$ -glucanos ha demostrado aumentar la respuesta inmune humoral mediada por células(7) favoreciendo también el crecimiento de bacterias benéficas que habitan en él. (6)

El presente trabajo es una herramienta útil para todos los productores que están en busca de alternativas para minimizar los efectos que ocasiona la problemática sanitaria actual en el sector avícola, buscando reforzar los planes vacúnales habituales, evaluando el efecto inmunológico que tiene la adición de  $\beta$ -glucano en la dieta de gallinas ponedoras, es por esto que se planteó el objetivo de evaluar el efecto de la adición en la dieta de  $\beta$ -glucan de levadura sobre los títulos de anticuerpos postvacunales de aves ponedoras Lohmann LSL en la granja “Avícola Alejandría” en el municipio de Jamundí, Valle del Cauca.

La industria avícola en Colombia constituye una de las producciones más promisorias y de mayor crecimiento en los últimos años (8), siendo una de las más representativas en el sector agropecuario, ya que genera aproximadamente 240.000 empleos directos e indirectos (9), todo esto debido al acelerado aumento de la cantidad de explotaciones avícolas y a la comercialización de sus productos (8).

Para el año 2015 la producción avícola en Colombia alcanzo 1'424.388 toneladas de pollo entero sin vísceras y 12.142'581.694 unidades de huevos de mesa traducidos en 728.555 toneladas, teniendo en cuenta que el proceso de engorde del pollo esta promediado entre 42 y 50 días, por su parte una gallina ponedora produce aproximadamente 343 huevos en 82 semanas (10), y el consumo per cápita para el mismo año alcanzó los 250 huevos y 30,4 kilogramos de carne de pollo para el mismo año (11).

La avicultura industrial se ha caracterizado por la modificación de la modalidad de crianza de las aves desde la producción extensiva, hasta una producción intensiva con un alto nivel de integración y manejo en confinamiento (12). Debido al rápido crecimiento y tecnificación de la explotación, se han venido implementando dichos sistemas los cuales se caracterizan por el manejo de altas densidades de animales con mayores requerimientos nutricionales y de manejo, esperando así alto rendimiento productivo (13).

Las condiciones ambientales que presentan los sistemas de producción intensiva propician diferentes niveles de estrés en las aves que se relacionan casi directamente con la presencia de problemas de salud y producción (14), todo esto es debido a que las aves de alto nivel de producción son más susceptibles a las condiciones de estrés propias del manejo en la producción intensiva, en las cuales se ha demostrado en estudios previos en pollos, que estímulos externos tales como, corte de pico, coccidiosis, y altas temperaturas manifestadas en calor entre otros, provocaron estrés con disminución en la ganancia de peso, menos consumo de alimento y baja conversión alimenticia (15).

La crianza intensiva de aves limita el contacto materno, y utiliza nuevos métodos de alimentación y hábitats artificiales que favorecen el estrés (16). El término estrés se ha utilizado tanto para referirse al agente causante de la respuesta fisiológica, como para referirse a la respuesta fisiológica en sí y es la combinación de diferentes factores fisiológicos originadas por cambios adversos e impredecibles a corto y largo plazo en dichas condiciones ambientales (17).

Dichos períodos de estrés influyen casi directamente sobre el sistema inmune del ave generando respuestas inmunológicas deficientes al momento de un reto de campo o en contacto con una vacuna (18).

### ***Inmunosupresión***

La inmunosupresión representa la primera causa de pérdidas económicas en el sector avícola, mantener la integridad inmunológica garantiza la salud y la productividad de un lote, el control de agentes infecciosos inmunosupresores debe ir acompañado de buenas prácticas de bioseguridad, y un manejo adecuado para evitar altos niveles de desafíos y estrés en las aves (19).

Existen ciertas condiciones o factores que pueden llegar a afectar el funcionamiento y estructura de los órganos linfoides, dando origen a aplasia o hipoplasia de estos órganos(20), con el desarrollo subsiguiente de estados de inmunosupresión o inmunodepresión, dentro de estos factores se encuentran, la genética con inmunodeficiencias congénitas, estrés, ya que un alto nivel de este induce profundos fenómenos de inmunosupresión(21), malnutrición ya que deficiencias o

excesos nutricionales pueden llegar a tener notables efectos sobre el sistema inmune de las aves, patologías infecciosas, toxinas o fármacos (19).

La exposición a los factores de estrés estimula al hipotálamo-hipofisis-adrenal y por lo general resulta en la producción de hormonas glucocorticoides incluyendo la corticosterona que se sabe que tiene actúan lisando las moléculas globulinicas provocando una caída en la concentración de estas en el organismo (20).

### *Sistema inmune de las aves*

La mayoría de los seres vivos, no solamente para sobrevivir sino también para prosperar en un entorno potencialmente hostil, necesitan un sistema de defensas complejo y altamente sofisticado, denominado sistema inmune, este sistema empieza a desarrollarse en la etapa embrionaria a los 10 días, consiste en órganos únicos y se dividen en dos componentes morfológica y funcionalmente distintos (22).

Una característica de los tejidos linfáticos de mamíferos y aves es que están densamente poblados con linfocitos, esto se debe a que están involucradas con la formación de linfocitos, las respuestas inmunes, o ambas de las cuales se producen al mismo tiempo (22).

Cuando los linfocitos llegan en los tejidos linfoides u órganos que se conviertan en células plasmáticas, y comienzan a sintetizar inmunoglobulinas. Las células que contienen plasma diferentes clases de inmunoglobulinas, son distribuidas en los tejidos linfoides, incluyendo la glandula de harder en pollos de engorde (23).

Las inmunoglobulinas son proteínas producidas sobre la membrana celular de los linfocitos B las cuales son secretadas en grandes cantidades en respuesta a la presencia de un antígeno, lo que hace que puedan ser detectadas mediante técnicas bioquímicas tradicionales (17). Otras investigaciones han demostrado que las inmunoglobulinas no solo son producidas en células B, sino que también se han visto producidas por células endoteliales, epiteliales, neuronas, células germinales e incluso en los monocitos (24).

En los vertebrados han evolucionado dos mecanismos de defensa independiente pero interdependiente para proteger al individuo de potenciales patógenos: los mecanismos de respuesta innata y la respuesta inmune adaptativa, ambos mecanismos funcionan por medio de estructuras anatómicas, moléculas y células que funcionan para eliminar los agentes patógenos (25), las principales diferencias entre estas respuestas son los mecanismos y los tipos de receptores usados para el reconocimiento de antígenos, pero ambas respuestas inmunes son reguladas por un grupo de proteínas llamadas interleucinas o citosinas (26).

La respuesta inmune innata supone la primera línea de defensa del organismo, comprende una serie de componentes y mecanismos que actúan a través de células epiteliales de la piel, plumas y mucosas. Entre las células que participan de este proceso se destacan los fagocitos como los halterófilos que sustituyen a los neutrófilos presentes en mamíferos, las plaquetas que cumplen funciones fagocíticas, los macrófagos que se constituyen en el eslabón que conecta la respuesta inmune innata con la adquirida, y las células Natural Killer (NK) (27). En general la respuesta inmune innata a la infección por un virus es la reacción inmediata diseñada para controlar e inhibir la propagación y crecimiento del virus y generar una protección específica de un patógeno a través de la respuesta inmune adaptativa (28).

En la respuesta inmune adaptativa las células retienen en la memoria su encuentro con el patógeno aun después de que este haya sido eliminado del organismo y haya terminado la respuesta inmune frente al mismo. La inmunidad adaptativa es altamente específica para el agente que estimulo su desarrollo y es costosa para el ave por el gasto metabólico que conlleva (29).

Esta inmunidad es mediada por una variedad de células de las cuales las más importantes son las células T y B y las presentadoras de antígenos como los macrófagos y las células dendríticas, los linfocitos B son los encargados de la producción de anticuerpos específicos, por lo que se constituyen en componente de la respuesta inmune más conocido y evaluado en el sector avícola. Por su parte los linfocitos T dan lugar tanto a respuesta de inmunidad celular como de inmunidad humoral (30).

Como parámetro inmunológico, la estimación de los niveles totales de inmunoglobulinas, no requiere una captura previa para la inoculación, proporcionan información sobre el estado de salud o nutricional del individuo, y puede estar relacionado de alguna manera con su nivel general de inmunocompetencia. (17), no obstante este parámetro no está exento de limitaciones, pues niveles altos de inmunoglobulinas, podrían indicar una mejor inmunocompetencia o bien estar indicando un proceso infeccioso reciente (17).

El sistema inmune digestivo de las aves, es considerado el más grande ya que es allí donde se encuentran la mayor parte de células inmunológicas organizadas en diferentes estructuras como lo son las placas de Peyer, tonsilas cecales, divertículo de Meckel, tonsila esofágica, tejido linfoide asociado a mucosas y Bursa de Fabricio (27).

La Bolsa de Fabricio macroscópicamente es reconocida como un saco ciego ubicado en la región dorsal de la cloaca, es el órgano encargado de realizar procesos de diferenciación y maduración de los linfocitos B productor de anticuerpos (31), este órgano sufre una involución durante la madurez sexual aproximadamente entre la 10-12 semanas de edad y dicho evento está influenciado por hormonas esteroides (32). La estructura de la bolsa de Fabricio, proporciona un entorno que es capaz de apoyar la diferenciación de las células B de linaje, también se conocen los factores solubles tales como la bursina y las citoquinas que pueden actuar sobre la diferenciación de células B (33).

El timo es un órgano linfoide primario encargado del desarrollo de los linfocitos T en aves y mamíferos, a diferencia del timo de los mamíferos en las aves este órgano también actúa como un órgano linfoide periférico entre la 3 y 6 semana de edad, al igual que la bolsa de Fabricio el timo también presenta una regresión al inicio de la madurez (32).

Cuando el sistema inmune se encuentra deprimido los agentes patógeno tienen la oportunidad de multiplicarse y causar enfermedad (21).

Las enfermedades infecciosas representan una de las mayores amenazas del sector avícola en Colombia, pues son causantes de cuantiosas pérdidas económicas durante la producción, debido a la mortalidad y a los altos costos en tratamientos y programas de vacunación que demandan (3).



La sanidad animal en cuanto al control y manejo de enfermedades juega un papel importante en la producción, como así también la alimentación o la genética (3).

En este sentido, se destacan tres enfermedades de control oficial, como son: Influenza aviar de la cual Colombia se encuentra libre hasta el momento, la enfermedad de Newcastle actualmente endémica en el país y la Salmonelosis aviar que por su carácter zoonótico, es considerada uno de los patógenos de mayor importancia en la salud pública por los impactos socioeconómicos que ocasiona tanto en países desarrollados como subdesarrollados (34). Si bien las enfermedades ya mencionadas son las de mayor importancia en la avicultura, también existen otras enfermedades que generan pérdidas económicas para los productores, como la micoplasmosis aviar, la Bronquitis Infecciosa y la Laringotraqueítis Infecciosa aviar (35).

La enfermedad de Newcastle es una enfermedad viral altamente contagiosa que afecta aves salvajes y domésticas (36), este patógeno se clasifica como un paramixovirus aviar del género *Avulavirus* de la familia *paramyxoviridae* (37), los animales afectados presentan signos respiratorios como jadeo, tos, estornudos; signos neurológicos como parálisis de alas y extremidades, tortícolis, desplazamiento en círculos, espasmo y parálisis. La mortalidad puede llegar a ser del 100%, y de igual manera se ve afectada la producción de huevo, al ser interrumpida parcial o completamente (38). El impacto de la NDV es más notable en las aves de corral debido a la alta susceptibilidad de estas y las graves consecuencias de los brotes de cepas virulentas en las industrias avícolas (36).

Por su parte la bronquitis infecciosa aviar es causada por un Coronavirus(39) del género *Gammacoronavirus* (40), el animal infectado presenta generalmente disnea, jadeos, estornudos, secreción ocular y nasal, entre otros síntomas (41). Su presentación es estrictamente respiratoria, aunque puede causar una baja en el consumo de alimento y disminución de la producción y calidad de huevos (42), generando pérdidas económicas importantes (8).

Es por lo anterior que la vacunación se convierte en un componente crítico para el control dichas enfermedades, el objetivo principal de la vacunación es generar inmunidad esterilizante, induciendo una respuesta inmune que reduce o impide completamente la enfermedad clínica y la

mortalidad que pueden producir los diferentes virus (28). Los productos biológicos generalmente utilizados en la industria avícola, ponedoras, pollos de engorde, y reproductoras Gumboro, Newcastle, combinada Newcastle+Bronquitis infecciosa, Mareck, Laringotraqueitis, Anemia infecciosa, Bronquitis infecciosa, y Hepatitis (34).

Con el fin de complementar el control de las patologías aviares la serología es una herramienta útil en la prevención inicial, junto a la bioseguridad y a la vacunación(43), gracias a la serología se puede conocer si los niveles de anticuerpos están relacionados con el programa vacunal llevado, igualmente puede emplearse para conocer la inmunidad maternal en los aves de un día, erradicar enfermedades y llevar un control de la efectividad que tuvo la vacunación campo entre otras (44).

Asimismo el uso de inmunoestimulantes en el sector avícola ha sido de gran importancia para las medidas de control y prevención de enfermedades causadas por agentes infecciosos y virales (5). El término inmuno-estimulación se asocia con el uso de los diferentes aditivos alimenticios como, los probióticos y prebióticos (45). Los probióticos son cultivos de microorganismos vivos que se establecen en el tracto gastrointestinal (46), también constituyen la primera línea de defensa del organismo ante microorganismos potencialmente dañinos que son ingeridos ejerciendo una acción beneficiosa para el hospedero, además han sido considerados como sustancias aditivas en la dieta (34). Por su parte los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles que proveen efectos beneficiosos para la salud del huésped, estimulando selectivamente el crecimiento y la actividad de un tipo o un número limitado de bacterias en el colon (47), en animales los prebióticos se reflejan en la mucosa intestinal y modulan las interacciones entre la morfología intestinal autóctona y su microbiota (48), diferentes estudios han demostrado el efecto sobre el crecimiento del animal, la resistencia contra bacterias patógenas, parámetros de inmunidad innata y hematoaglutinación entre otras (48).

La fibra dietética es la parte digerible de las plantas o hidratos de carbono que son resistente a la digestión y absorción en el intestino delgado, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso (7). La fibra dietética incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias asociadas de la planta; los polisacáridos son todos los polímeros de carbohidratos que contienen al menos

veinte residuos de monosacáridos. El almidón digerido y absorbido en el intestino delgado es un polisacárido, por ello se utiliza el término polisacáridos no almidón para aquellos que llegan al colon y poseen los efectos fisiológicos de la fibra. Se pueden clasificar en celulosa,  $\beta$ -glucanos, hemicelulosas, pectinas y análogos, gomas y mucílagos (49).

Los  $\beta$ -glucanos pertenecen al grupo de los inmunoestimulantes más utilizados en aves (50). Son polímeros de glucosa y constituyen el principal componente estructural de la pared celular externa de origen vegetal como granos de avena, cebada, algas marinas, y de origen fúngico como de pared celular externa de hongos y levaduras (51). Debido a sus efectos potenciales sobre la salud, la industria de alimentos ha utilizado cada vez más los  $\beta$ -glucanos para el desarrollo de alimentos funcionales (5). Los de origen fúngico son reconocidos como inmuno-estimulantes así como colonizadores de la mucosa intestinal ya que logran una fijación en los receptores de las bacterias, impidiendo así que bacterias enteropatógenas se aniden en el tracto digestivo (52).

El *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los microorganismos primarios provenientes de las paredes celulares de las levaduras utilizados en la industria para la fermentación de bebidas, el residuo mayor parte de la biomasa de levadura resultante de la fermentación, especialmente a partir de la producción de cerveza (53). Un gran número de literatura ha demostrado que este  $\beta$ -glucano tiene efectos inmuno-moduladores ya que aumenta la actividad celular de macrófagos y neutrófilos (54), las respuestas inmunes han sido diversas y comprenden la producción de anticuerpos, la producción de genes del sistema inmune, supervivencia y mejor tolerancia al estrés mejorando así la resistencia a enfermedades infecciosas (51).

En la actualidad se producen dos formas de  $\beta$ -glucanos de *S. cerevisiae*, una forma particular insoluble (Whole Cell Glucan Particle- WGP) y otra soluble (PGG-glucano). El WGP se obtiene por purificación a partir de paredes celulares deshidratadas de levaduras después de la extracción de las proteínas celulares, ácidos nucleicos, lípidos y oligosacáridos como quitinas y mananos (55).

Nutrítec S.A.S es una empresa dedicada a la elaboración de premezclas y bases mixtas para avicultura, porcicultura, ganadería y otras especies, cada uno de estos productos están diseñados de tal manera que suplen las necesidades biológicas y técnicas dependiendo de la etapa

productiva y de los requerimientos de vitaminas y minerales (25). Dentro de las ofertas nutricionales, la compañía produce el  $\beta$ -glucán de levadura®, es un producto que contiene 1,3 y 1,6  $\beta$ -glucán extraído de la pared de *Saccharomyces cerevisiae*, es insoluble en agua, y es originado de microorganismos no modificados genéticamente.

### ***Materiales y métodos***

La investigación se llevó a cabo en la granja “Avícola Alejandría” ubicada en la vereda Rio claro, aproximadamente a 6 km del municipio de Jamundí, Valle del Cauca.

Cabe notar que se estaba bajo las condiciones de la empresa quienes dieron márgenes de tiempo para trabajar sobre los animales eso de acuerdo a políticas de la misma, por lo que se debía restringir el alcance del estudio.

Se seleccionaron tres grupos de aves de postura raza Lohmann hermanas de 33 semanas de edad, constituidos de la siguiente manera

- El grupo 1 con 7994 aves de las cuales se seleccionaron 60 individuos al azar para el muestreo
- El grupo 2 con 7898 aves de las cuales se seleccionaron 60 individuos al azar para el muestreo
- El grupo 3 con 7900 aves de las cuales se seleccionaron 60 individuos al azar para el muestreo

### ***Toma de muestras***

Se tomaron 60 muestras de sangre para serología en el estudio (20 muestras sanguíneas al azar por cada grupo), Cada muestra se tomó con la técnica de punción cardiaca extrayendo 3 ml de

sangre, utilizando agujas calibre 18 pulgadas. Una vez obtenidas las muestras se depositaron en un tubo estéril sin anticoagulante, se refrigeraron y posteriormente se enviaron al laboratorio de Pronavicola ubicado en el municipio de Buga donde se procesaron las muestras con Kit IDEXX

### ***Tratamiento***

Se manejaron dos tratamientos en los tres grupos:

*Grupo 1* fue el grupo control, el cual fue alimentado de manera habitual con una dieta a base de maíz, mogolla, torta de soya, harina de sangre, harina de arroz, aceite de palma

*Grupo 2* se le adiciono  $\beta$ -glucano de levadura (concentración del 80%) a la dieta habitual durante 30 días a una dosis de 50g/ton, teniendo en cuenta que el consumo promedio que es de 105 gramos por ave-día, es decir que cada ave consumió 5 gramos por día datos que fueron tomados por la casa genética comercial. Posterior a esto, fue tratado con una vacuna viva atenuada de Newcastle+bronquitis, la cual fue suministrada a primera hora de la mañana en el agua de bebida, a los 17 días de iniciado el tratamiento con  $\beta$ -glucano ya que fue este el tiempo estimado para evaluar el efecto sobre el organismo de acuerdo al tiempo estipulado para el estudio.

*Grupo 3*, fue alimentado con la dieta habitual sin  $\beta$ -glucano, y también fue tratado con una vacuna viva atenuada de Newcastle+bronquitis, la cual fue suministrada a primera hora de la mañana en el agua de bebida, a los 17 días del tratamiento con  $\beta$ -glucano ya que fue este el tiempo estimado para evaluar el efecto sobre el organismo de acuerdo al tiempo estipulado para el estudio.

### ***Toma de muestras***

El muestreo se realizó semana 37 de edad de las aves y 14 días después de introducida la vacuna, tiempo estimado de seroconversión. Se tomaron 20 muestras de sangre por cada grupo empleando la técnica de punción cardiaca y posteriormente se enviaron al laboratorio y se procesaron con Kit IDEXX.®

### ***Análisis estadístico***

Se realizó un diseño con 3 factores (lote, semana, enfermedad), posteriormente se hizo un análisis estadístico descriptivo y un análisis de varianza ANOVA utilizando el siguiente modelo estadístico.

$$\text{Titulo} = \mu + \text{grupo} + \text{semana} + \text{vacuna} + \text{grupo} \times \text{semana} + \text{grupo} \times \text{vacuna} + \text{semana} \times \text{vacuna} + \text{grupo} \times \text{semana} \times \text{vacuna} + E$$

$$Y_{ij} = \mu + G_i + S_j + V_k + G_i \times S_j + G_i \times V_k + S_i \times V_k + G_i \times S_i \times V_k + E_{ijk}$$

Dónde:

y: es la variable respuesta (títulos de anticuerpo)

$\mu$ : es la media para los títulos de anticuerpo

$G_i$  es el efecto fijo del grupo ( $i= 1, 2, 3$ )

Finalmente se hicieron gráficos de perfiles para comparar, grupos con semanas, grupos con vacuna, y semana con vacuna.

### **Resultados y discusión**

Fueron obtenidos los siguientes datos expresados en la tabla 1 donde se muestra los resultados de las serologías pre y post tratamiento, (semana 33 y 37 respectivamente) expresado en porcentajes y organizados por rangos.

**Tabla 1.** Resultados en porcentajes de los tres grupos.

GRUPO 1 NDV				GRUPO 2 NDV				GRUPO 3 NDV			
SEMANA 33	%	SEMANA 37	%	SEMANA 33	%	SEMANA 37	%	SEMANA 33	%	SEMANA 37	%
0 – 2000	15	0 - 2000	20	0 - 2000	15	0 - 2000	20	0 - 2000	10	0 - 2000	25
2000- 4000	25	2000- 4000	30	2000- 4000	30	2000- 4000	35	2000- 4000	20	2000- 4000	30
4000 - 5000	10	4000 - 5000	20	4000 - 5000	10	4000 - 5000	10	4000 - 5000	35	4000 - 5000	10
>5000	50	>5000	30	>5000	45	>5000	35	>5000	35	>5000	35

Como se puede inferir, el grupo 1 el cual actuó como testigo, de la semana 33 a la semana 37, redujo el porcentaje del rango de títulos >5000 un 20% y la categoría más baja que iba de 0 a 2000 aumento de 15 a 20% en el transcurso de la semana 33 a 37, indicando así, que independientemente de la intervención experimental las aves marcaron la tendencia de disminuir los anticuerpos en el lapso de dichas semanas.

Por otra parte el grupo 2 paso a reducir el mayor rango en el periodo práctico de un 45 a un 35% y el menor, aumento de 15 a 20%; de acuerdo a esto se puede decir que el lote 2 siguió la tendencia del grupo control y es por esto que cabe deducir que no se puede responsabilizar el tratamiento experimental con  $\beta$ -glucan o a la introducción de la vacuna con dicho fenómeno, ya que la baja de anticuerpos puede estar relacionada por factores medioambientales, inmunosupresores, y baja calidad en los procesos de vacunación (60).

Referente a lo anterior y aunque en el grupo 3 el rango más alto se conservó en un 35%, los títulos de 0-2000 aumentaron de 10 a 25% de la semana 33 a la semana 37, permaneciendo igual al grupo 2 que si bien no tuvo el mejor comportamiento en cuanto al aumento de anticuerpos no hubo una disminución tan alta de los mismos en comparación con el grupo 3 y agrupo la mayoría de ellos en los rangos medios. (2000-4000, 4000-5000).

**Tabla 2.** Análisis estadístico

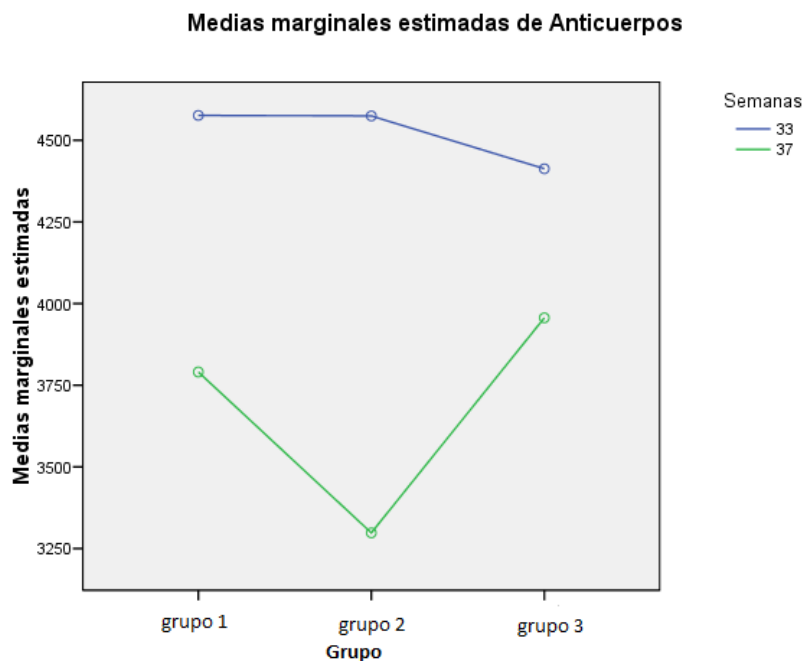
Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	106645593,633(a)	11	9.695.053,967	1,524	0,124
Intersección	4.037.024.426,667	1	4.037.024.426,667	634,542	0,000
Grupo	3.271.367,033	2	1.635.683,517	0,257	0,774
Semanas	42.267.148,017	1	42.267.148,017	6,644	0,011*
Vacuna	27.472.666,667	1	27.472.666,667	4,318	0,039*
Grupo * Semanas	6.813.012,133	2	3.406.506,067	0,535	0,586
Grupo * Vacuna	17.546.402,033	2	8.773.201,017	1,379	0,254
Semanas * Vacuna	1.760.964,017	1	1.760.964,017	0,277	0,599

Grupo * Semanas *	7.514.033,733	2	3.757.016,867	0,591	0,555
Vacuna					
Error	1.450.560.341,700	228	6.362.106,762		
Total	5.594.230.362,000	240			
Total corregida	1.557.205.935,333	239			

\*diferencia estadísticamente significativa (P<0.05)

El diseño experimental arrojó solo diferencia significativa (P<0.05) entre semana y vacuna por lo tanto no hay suficiente evidencia para determinar que hubo efecto entre los grupos experimentales, la aplicación de la vacuna y el suministro de  $\beta$ -glucano (tabla 2).

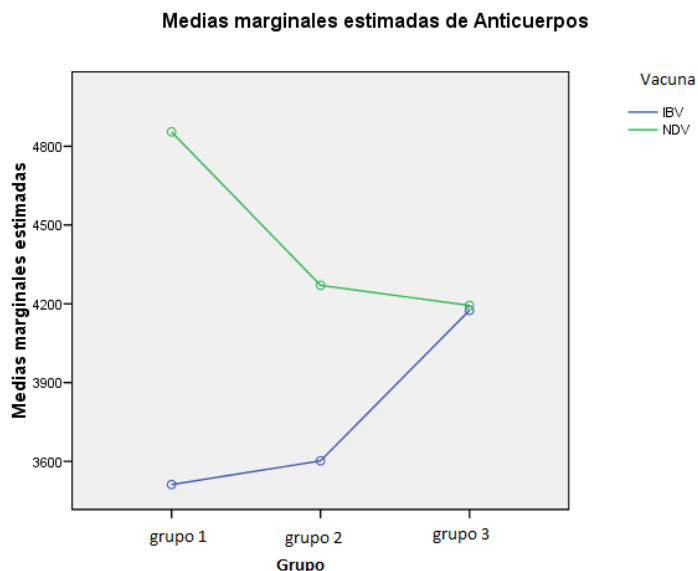
**Imagen 1.** Comparación de anticuerpos entre grupo y semana



Se muestra el efecto del  $\beta$ -glucano sobre la titulación de anticuerpos en semanas 33 y 37 en los tres lotes evaluados en donde se puede observar que todos los anticuerpos en general disminuyeron y particularmente el grupo 2 se vio afectado negativamente aproximadamente un 5% de la semana 33 a la 37 (Imagen 1).



**Imagen 2.** Comparación entre grupos según enfermedad

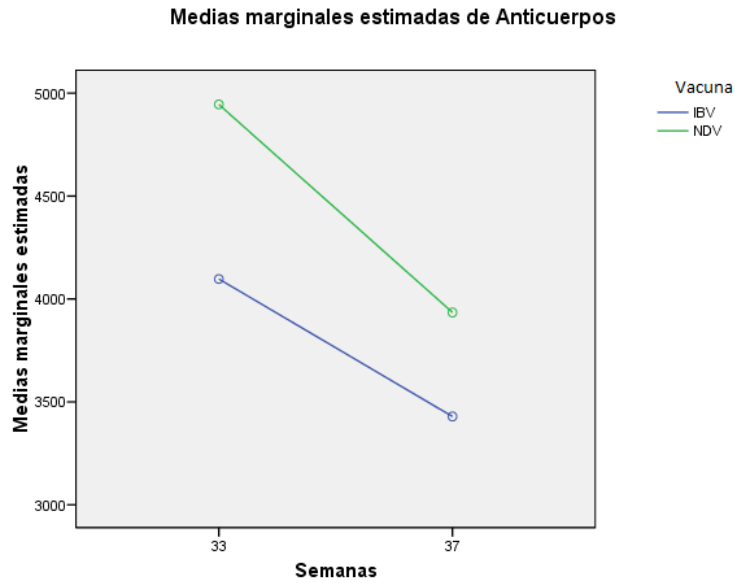


Este compara los títulos de anticuerpos en general entre la IBV y NDV, en donde se puede observar que NDV tuvo títulos más altos superando los 4800 en comparación a la IBV especialmente en el lote control en el cual los títulos no superan los 3600 (Imagen 2).

Por otro lado cabe resaltar la diferencia de aproximadamente el 5% de los títulos en NDV entre el lote control y el lote 2 el cual fue suplementado con  $\beta$ -glucano y vacunado posteriormente.

También se puede observar que, al comparar las dos enfermedades, se encuentra más amplio el rango creciente de los títulos de la IBV entre el lote 2 y el lote 3.

**Imagen 3.** Comparación de semana con vacuna



Se puede analizar la disminución en general de los títulos de anticuerpos que se presentó en todos los lotes evaluados y en ambas enfermedades entre la semana pre y post del tratamiento con  $\beta$ -glucano (Imagen 3).

Por otro lado se analizó detalladamente un resumen de porcentajes de los coeficientes de variación (%CV) de los tres grupos con las dos vacunas:

**Tabla 3.** Coeficientes de variación (%cv), desviación estándar (SD), y promedio ( $\bar{X}$ ), de los tres grupos en NDV

<b>NDV</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Semana</b>	<b>%CV</b>	<b>SD</b>	<b><math>\bar{X}</math></b>
1	33	54.4	2942	5406
2	33	52.1	2477	4750
3	33	52.2	2451	4693
<b>Grupo</b>	<b>Semana</b>	<b>%CV</b>	<b>SD</b>	<b><math>\bar{X}</math></b>
1	37	54.3	2338	4303
2	37	46.7	1770	3790
3	37	62.4	2317	3714

En esta tabla se puede ver la conducta de los tres grupos frente a la enfermedad de Newcastle en dónde, al comparar estas evidencias es conveniente resaltar que el grupo 2 tuvo mejor distribución al final del periodo experimental que los otros dos grupos, ya que después del tratamiento, agrupó los anticuerpos sobresalientemente disminuyendo el %Cv más de 5 puntos, lo que evidentemente no ocurrió especialmente en el grupo 3 el cual también recibió la vacuna, quien no solo aumento el esparcimiento de los datos, sino que también aumento el coeficiente de variación casi al doble.

**Tabla 4.** Coeficientes de variación (%cv), desviación estándar (SD), y promedio ( $\bar{X}$ ), de los tres grupos en BIV.

<b>BIV</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Semana</b>	<b>%cv</b>	<b>SD</b>	<b><math>\bar{X}</math></b>
1	33	65.8	2463	3745
2	33	70.3	3092	4398
3	33	59.1	2450	4147
<b>Grupo</b>	<b>Semana</b>	<b>%cv</b>	<b>SD</b>	<b><math>\bar{X}</math></b>
1	37	72.9	2390	3278
2	37	67.9	1770	3790
3	37	67.2	2317	3714

Por último, para el caso específico de la bronquitis, no fue indiferente el fenómeno ocurrido con la NDV, ya que si se compara el grupo 2 con el 3, la distribución de los conjuntos de datos específicamente títulos de anticuerpos, es muy evidente que el grupo 2 tuvo una disminución considerable en la dispersión de datos de la semana 33 a la semana 37, todo esto teniendo en cuenta que un valor de 40% o menos es considerado bueno y mayor de 50% debería mejorarse (43).

En síntesis, en cuanto a lo anteriormente planteado, es claro que en ambas enfermedades tuvo un mejor comportamiento el grupo 2, que si bien no aumento los títulos de anticuerpos a lo largo del tratamiento, si logro reducir en ambos casos la dispersión de los datos. Ahora si bien es cierto que el aumento de los títulos postvacunales es importante, la apreciación de la dispersión de dicha vacuna es trascendental en la evaluación de la respuesta inmune postvacunal, ya que permite verificar la uniformidad del lote vacunado que muchas veces es más valorado en la industria avícola que el hecho de obtener títulos de anticuerpos altos, porque incluso niveles bajos, pueden ser suficientes para proteger las aves de infecciones por posibles brotes (59), y por su parte la inmunidad colectiva es una de los efectos beneficiosos de un exitoso programa de vacunación (28).

Finalmente, es preciso deducir que la adición de  $\beta$ -glucano en la dieta de las aves no logro demostrar aumento de títulos de anticuerpos postvacunales como tampoco disminución significativa de los mismos, ya que como se evidencio todos los grupos tuvieron conductas similares a lo largo de la investigación, valdría la pena investigar más a fondo el posible efecto logrado de agrupar los datos disminuyendo en ambos casos estudiados el %cv, siendo esto claramente una acción positiva del  $\beta$ -glucano ya que es un excelente indicadores de la calidad y efectividad del proceso de vacunación (28).

## **Conclusiones**

En conclusión, no hubo efecto en los títulos post vacúnales para la enfermedad de Newcastle y bronquitis infecciosa aviar, con la adición en la dieta de  $\beta$ -glucano de levadura en aves ponedoras en esta investigación, lo que lleva a inferir que pudo haber ocurrido algún fenómeno que desencadeno la irregularidad de disminución de títulos de anticuerpos a lo largo del tiempo evaluado, lo cual probablemente fue causado por un factor medioambiental, inmunosupresor o fisiológico, que frustró el proceso normal de seroconversión post-vacunal en los tres grupos evaluados, lo que se podría interpretar como una vacunación deficiente si el objetivo fuese incrementar la producción de anticuerpos, por lo tanto, no es conveniente responsabilizar la acción del  $\beta$ -glucano con la disminución de títulos a lo largo de la investigación, ya que incluso el grupo que no fue intervenido experimentalmente, demostró el mismo comportamiento, esto quiere decir que no solo presentaban inicialmente baja titulación de anticuerpos, si no que en vez de incrementarse dicho factor como normalmente se espera después de introducir una vacuna, en general todos mostraron una tendencia a disminuir.

A pesar de que el  $\beta$ -glucano no tuvo efecto sobre la seroconversión, posiblemente demostró la capacidad de agrupar los datos reduciendo el coeficiente de variación, aspecto importante a la hora de evaluar la efectividad de un plan vacunal ya que a pesar de que naturalmente después de la aplicación de un biológico para determinada enfermedad en las aves, es normal esperar anticuerpos en sueros altos no es el único factor a tener en cuenta para una exitosa vacunación, se valora mucho más la capacidad de disminuir al máximo la dispersión de los títulos, porque es

importante que la mayor parte de un lote de aves reciba aunque sea una pequeña porción de los antígenos de interés para que sean capaces de crear una respuesta inmunológica óptima a la hora de enfrentarse a un posible brote.

### **Recomendaciones**

- Se recomienda realizar posteriores investigaciones más a fondo sobre el efecto del  $\beta$ -glucano en el sistema inmune de aves ponedoras, donde se evalúen diferentes factores como: edades, dosis, tiempos de administración y en donde con estos datos se hagan estadística de coeficientes de variación.
- También es conveniente realizar la administración del  $\beta$ -glucan utilizando otras pruebas que nos permitan determinar a profundidad el efecto en el sistema inmune en aves ponedoras.
- Se recomienda que próximas investigaciones sean realizadas en medios experimentales con condiciones controladas ya que, es muy arriesgado realizar estudios de este tipo en campo debido a que aparecen demasiados factores influyentes que pueden alterar la metodología y los resultados de dicho estudio.

## ***Bibliografía***

1. Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu X, Bahl J, Afonso CL. Infection , Genetics and Evolution Temporal , geographic , and host distribution of avian paramyxovirus 1 ( Newcastle disease virus ). *Meegid. Elsevier B.V.*; 2016;39:22–34.
2. Ge J, Liu Y, Jin L, Gao D, Bai C, Ping W. Construction of recombinant baculovirus vaccines for Newcastle Disease Virus and an assessment of their immunogenicity. *Journal of biotechnology. Elsevier B.V.*; 2016.
3. Jackwood MW, Hall D, Handel A. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infect Genet Evol. Elsevier B.V.*; 2012;12(6):1305–11.
4. Kattenbelt JA, Stevens MP, Gould AR. Sequence variation in the Newcastle disease virus genome. *Virus Res. 2006*;116(1-2):168–84.
5. Edens, W F. An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics [Internet]. North Caroline State University. 2003. p. 75–97. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-635X2003000200001&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2003000200001&lng=en&nrm=iso). ISSN 1806-9061. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2003000200001>.
6. Chae BJ, Lohakare JD, Moon WK, Lee SL, Park YH, Hahn T. Effects of supplementation of b -glucan on the growth performance and immunity in broilers q. 2006;80:291–8.
7. Escudero Álvarez E, González Sánchez P. La fibra dietética. *Nutr Hosp. 2006*;21(SUPPL. 2):61–72.
8. Andrés J, Patricia JA, Ramírez G, Claudia D, Álvarez M, Diego E, et al. Las enfermedades infecciosas y su importancia en el sector avícola. 2010;49–61.
9. Reseñas , re exiones y controversias.
10. FAO. Organizacion de las Naciones Unidas para la alimentacion y la agricultura. FAO.

11. Fenavi, Dian comercio exterior, Dane P. Federacion Nacional de Avicultores de Colombia. Programa de estudios economicos.
12. Dottavio AM, Di Masso RJ. Mejoramiento avícola para sistemas productivos semi-intensivos que preservan el bienestar animal. BAG - J Basic Appl Genet. 2010;21(2).
13. Herrero M, Gil SB. Consideraciones ambientales de la intensificación en producción animal. Ecol Austral. 2008;18:273–89.
14. Alberto Tejeda Perea, Guillermo Téllez Isaías FGM. Técnica De Medición De Stres En Aves. Vol. 28, Veterinaria México. 1997. p. 345–51.
15. Terraes JC, Sandoval GL, Fernández RJ, Revidatti FA. Respuesta a una maniobra inductora de estrés y al tratamiento con un producto hepatoprotector en pollos de engorde \*. Vet Mex. 2001;32(3):195–200.
16. Blajman JE, Zbrun M V, Astesana DM, Berisvil AP, Romero Scharpen A, Fusari ML, et al. Probióticos en pollos parrilleros: una estrategia para los modelos productivos intensivos. Rev Argent Microbiol. Elsevier España, S.L.U.; 2015;47(4):360–7.
17. Tomás G. Interrelaciones entre estrés, inmunidad y parasitismo en el Herrerillo común (*Parus caeruleus*). 2005. 188 p.
18. GUERRERO FF. Funcionamiento del sistema inmune del ave. Inst Inmunol Clínica y Ter Cel. :55–8.
19. Veterinary A, Team S. Be Smart. 2009;(August):1–4.
20. San Gabriel Closas A. Respuesta Inmune De Las Aves Y Sus Alteraciones. ARXltiS l'Esc Sup d'Agricultura Barcelona. :81–90.
21. Heller ED. Inmunosupresión en las aves ( 1 ). 1990;(1):25–8.
22. Masum MA, Khan MZI, Nasrin M, Siddiqi MNH, Khan MZI, Islam MN. Detection of immunoglobulins containing plasma cells in the thymus, bursa of Fabricius and spleen of vaccinated broiler chickens with Newcastle disease virus vaccine. Int J Vet Sci Med.



Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University; 2014;2(2):103–8.

23. Karim MR, Kon Y. Mohammad N. Islam + , Mohammad Z.I. Khan + , Mir R. Jahan + , Mohammad R. Karim + and Yasuhiro Kon , +.
24. Shao W, Hu F, Ma J, Zhang C, Liao Q, Zhu Z, et al. Epithelial cells are a source of natural IgM that contribute to innate immune responses. *Int J Biochem Cell Biol. Elsevier Ltd*; 2016;73:19–29.
25. Moticka EJ. Chapter 1 – Innate Host Defense Mechanisms and Adaptive Immune Responses. In: *A Historical Perspective on Evidence-Based Immunology*. 2015. p. 1–8.
26. Alvarado AHM. Interleucinas e inmunidad Innata. *Rev Biomed*. 2001;12(4):272–80.
27. Verduzco G, Coello L, Bernal M, González Á, Verduzco GG, Coello CL. El sistema inmune digestivo en las aves. 2010;
28. Kapczynski DR, Afonso CL, Miller PJ. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Dev Comp Immunol. Elsevier Ltd*; 2013;41(3):447–53.
29. Esperanza A. Respuesta Inmunitaria. 2007;
30. Rosenstein Y, Garcia-garcia E. Mecanismos celulares y moleculares de la respuesta inmune adquirida. :1–22.
31. Moticka EJ. *A Historical Perspective on Evidence-Based Immunology*. Elsevier, editor. Amsterdam; 2016. 75-82 p.
32. Pasanen S, Ylikomi T, Palojoki E, Syväälä H, Pelto-Huikko M, Tuohimaa P. Progesterone receptor in chicken bursa of Fabricius and thymus: Evidence for expression in B-lymphocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 1998;141(1-2):119–28.
33. Otsubo Y, Chen N, Kajiwara E, Horiuchi H, Matsuda H, Furusawa S. Role of bursin in the development of B lymphocytes in chicken embryonic Bursa of Fabricius. *Dev Comp Immunol*. 2001;25(5-6):485–93.

34. Desarrollo. F de CE-C de I para el. Estudio del mercado de medicamentos veterinarios y biológicos de uso pecuario en el primer nivel de la cadena de distribución (Productor - Importador). 2012;1–185.
35. Luis J, Inta H, Cerro EE a, N° MM, Que LO, Saber D, et al. Guía Práctica De Enfermedades Más Comunes En Aves De Corral ( Ponedoras Y Pollos ). 2007;1–31.
36. Boven M Van, Bouma A, Fabri THF, Katsma E, Boven M Van, Bouma A, et al. Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. 2016;9457(August).
37. Cuadrado-castano S, Sanchez-aporicio MT, García-sastre A. The therapeutic effect of death : Newcastle disease virus and its antitumor potential. *Virus Res. Elsevier B.V.*; 2015;209:56–66.
38. Kumar S, Koul M. Newcastle disease virus : A constant threat to the poultry industry in India. *Vaccine. Elsevier Ltd*; 2016;34(5):597–8.
39. Dolz R, Pujols J, Ordóñez G, Porta R, Majó N. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus in Spain over a fourteen-year period. *Virology*. 2008;374(1):50–9.
40. Pradhan SK, Kamble NM, Pillai AS, Gaikwad SS, Khulape SA, Reddy MR, et al. Recombinant nucleocapsid protein based single serum dilution ELISA for the detection of antibodies to infectious bronchitis virus in poultry. *J Virol Methods. Elsevier B.V.*; 2014;209:1–6.
41. Kouakou A V., Kouakou V, Kouakou C, Godji P, Kouassi AL, Krou HA, et al. Prevalence of Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus in avian influenza negative birds from live bird markets and backyard and commercial farms in Ivory-Coast. *Res Vet Sci. Elsevier B.V.*; 2015;102:83–8.
42. Jones R. Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): Are they ever under control? *Br Poult Sci*. 2010;51(1):1–11.

43. Las CDE, Analizar MA. Uso practico e interpretación de la serología en campo. :1–9.
44. Electr R, Redvet V, Mv CV, Juan D, Norte Q. Interpretación y uso de exámenes de ELISA en Avicultura ( Interpretation and use of elisa test in poultry ). 2005;VI:1–7.
45. LONDOÑO MAA. USO DE PROBIÓTICOS EN LA NUTRICIÓN DE MONOGÁSTRICOS COMO ALTERNATIVA PARA MEJORAR UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN. 2013;
46. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. STATEMENTS The International Scientific Association for. 2015;11(August 2014).
47. Koelliker DM, Vélez JF. Prebióticos : su importancia en la salud humana y propiedades funcionales en tecnología de alimentos. 2013;1:12–24.
48. Carbone D, Faggio C. Fish & Shellfish Immunology Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants . Effects on immune system of Sparus aurata and Dicentrarchus labrax. Fish Shellfish Immunol. Elsevier Ltd; 2016;54:172–8.
49. Clínicas YSUSA, Gallego AS. Fibra y prebióticos : conceptos y perspectivas. 2003;26:6–12.
50. I MP, Ii JL, María D, Iii S, Iii LS. □ 1-3 glucano particulado lineal y otras formulaciones basadas en □ glucano , su efecto en bovinos y aves and poultry. 2012;34(2):70–7.
51. Caruffo M, López P, Navarrete N, Díaz A NP. β -Glucanos. Indualimentos. 2013;118–21.
52. Arce J, Ávila E, López C, García A. Efecto de paredes celulares ( Saccharomyces cerevisiae ) en el alimento de pollo de engorda sobre los parámetros productivos Effect of Saccharomyces cerevisiae cell walls on productive parameters in broiler chicks. 2005;43(2):155–62.
53. Campagnollo FB, Franco LT, Rottinghaus GE, Kobashigawa E, Ledoux DR, Dakovi A, et al. In vitro evaluation of the ability of beer fermentation residue containing Saccharomyces cerevisiae to bind mycotoxins. 2015;77:643–8.

54. Zhang B, Guo Y, Wang Z. The Modulating Effect of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan Supplementation in the Diet on Performance and Immunological Responses of Broiler Chickens \*. 2008;21(2):237–44.
55. Chil R, Vol N.  $\beta$ -glucanos : ¿ qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud ?  $\beta$ -glucans : what types exist and what are their health benefits ? 2014;41(tabla 1).
56. P.H. Russell a3 \* , P.N. Dwivedi a\*1 TFD. The effects of cyclosporin A and cyclophosphamide.
57. Wang, M., Yang, R., Zhang, L., Meng, X., Fei, C., Zhang, K., ... Hu, Y. (2014). Sulfated glucan can improve the immune efficacy of Newcastle disease vaccine in chicken. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 193–198.
58. Dortmans, J. C. F. M., Venema-Kemper, S., Peeters, B. P. H., & Koch, G. (2014). Field vaccinated chickens with low antibody titres show equally insufficient protection against matching and non-matching genotypes of virulent Newcastle disease virus. *Veterinary Microbiology*, 172(1-2), 100–107.
59. Dortmans, J. C. F. M., Peeters, B. P. H., & Koch, G. (2012). Newcastle disease virus outbreaks: Vaccine mismatch or inadequate application? *Veterinary Microbiology*, 160(1-2), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.003>
60. Fernández, Francisco Rojo, y Héctor García, Merial Select , EUA; Pablo Sanchez Nutrina SA, Venezuela y Rosmar Marcano, Universidad Central de Venezuela, presentada durante la XL Convención Anual ANECA, Riviera Maya, México en mayo de 2015.